



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

**Trabajo escrito vía cursos de educación continua**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**SOLÍS PÉREZ RAÚL**

**TUTORA:**

**DR.SÁNCHEZ NIETO SOBEIDA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*JURADO ASIGNADO:*

*PRESIDENTE:*           **Profesor: Rodríguez Sotres Rogelio**  
*VOCAL:*               **Profesora: Sánchez Nieto Sobeida**  
*SECRETARIO:*       **Profesora: Díaz Vilchis Adelaida**  
*1er. SUPLENTE:*     **Profesora: Rodríguez Penagos Mireya**  
*2° SUPLENTE:*      **Profesora: Vázquez Bochm Luz Xochiqueztalli**

*SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:*

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*ASESOR DEL TEMA:*

---

**Dra. Sobeida Sánchez Nieto**

*SUSTENTANTE:*

---

**Raúl Solís Pérez**

## **Agradecimientos**

El trabajo **SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES** realizado por **Raúl Solís Pérez** para obtener el título de Q.F.B fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo es parte del proyecto financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación **PE202023**.

Se agradece también a los miembros del jurado Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y Dra. Adelaida Díaz Vilchis por sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

## **Agradecimientos**

A mi mamá, que a pesar de las adversidades nunca te rendiste y nos enseñaste a mis hermanos y a mí que jamás debemos dar un paso atrás, ya que en la vida no obtendremos resultados inmediatamente, además aprendí que la responsabilidad es fundamental para lograr nuestro sueño, por otra parte, siempre confiaste en mí pese a que no era de los mejores estudiantes al inicio, por lo que me diste confianza. Sé que nunca pisaste una preparatoria, sin embargo, el conocimiento que me brindaste fue lo suficiente para obtener mis primeros objetivos.

A mi padre. Gracias por contarnos las experiencias de tu niñez, ya que, eso me hizo más fuerte mentalmente y por tus consejos que en ocasiones me provocaba risa, sé que no tuviste grandes momentos, pero a pesar de eso ahí estuviste.

A mis Hermanos. Gracias Julio, Luis que durante estos 25 años fueron mis maestros tanto de la vida como estudiantil, ustedes fueron el motor para no rendirme También, Fui afortunado tenerlos en esos momentos buenos como malos. Por último Efrén, tú y yo hemos convivido 13 años, sin embargo, he llegado aprender de ti ciertas técnicas de dibujo, aunque parezca que luego no te pongo atención en realidad si lo hago, tú tienes una habilidad que ni Julio, Luis y Yo no tuvimos a tu edad la cual debes detonar, si quieres lograr tus sueños.

“En éxito es la capacidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo”. Winston Churchill.

**Do it for your parents and brothers  
Do it for your country  
We can be the one best**

## Contenido

Abreviaturas .....	6
Resumen .....	7
Introducción.....	8
Objetivo .....	10
Antecedentes .....	11
La industria farmacéutica y los biofármacos .....	11
Consideraciones sobre la producción de proteínas recombinantes .....	15
Las células de ovario de hámster chino como modelo para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas. ....	19
Producción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i> .....	21
Levaduras para la producción de proteínas recombinantes.....	22
Plantas Transgénicas para la producción de proteínas recombinantes .....	24
Consideraciones sobre los diferentes sistemas de producción de proteínas recombinantes terapéuticas. ....	28
Conclusiones.....	33
Perspectivas.....	34
Referencias .....	35

## Índice Tablas

Tabla 1. Industrias farmacéuticas que producen biofármacos. ....	122
Tabla 2. Algunas proteínas recombinantes actualmente disponibles para su uso terapéutico. ....	13
Tabla 3. Costo de cepas o líneas usadas en la producción de proteínas recombinantes . ....	21
Tabla 4. Tabla comparativa de características de CHO, <i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i> y plantas transgénicas para producir proteínas terapéuticas recombinantes.	299

## Índice Figuras

Figura 1. Proceso para la producción de proteínas recombinantes.....	17
Figura 2. Esquema del proceso para la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero .....	177
Figura 3. Métodos de transformación de plantas.....	25

## Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo
<b>PTM</b>	Modificaciones postraduccionales
<b>FDA</b>	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
<b>CHO</b>	Del inglés <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>PIB</b>	Producto Interno Bruto
<b>VFU</b>	Unidad de cultivo vertical

## Resumen

La producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos ha ido en ascenso. Las farmacéuticas han mejorado considerablemente el sistema de producción, pero aún se tienen expectativas de mejora en varios pasos, uno de ellos son los sistemas biológicos en los cuales se pueden producir los biofármacos. Actualmente, el sistema de células de ovario de hámster chino o CHO es el más empleado en la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, principalmente debido a que las CHO son capaces de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales (PTM) como las glicosilaciones que son necesarias para que las proteínas recombinantes presenten su función biológica. Se considera que la correcta elección del huésped con su respectiva modificación genética generará una correcta producción del biofármaco. En este trabajo se revisaron algunos sistemas para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes, como son *Escherichia coli*, levaduras y plantas. *E. coli* crece en medios más baratos y con densidades celulares más altas que las CHO, por lo que es un sistema de elección cuando no es necesario colocar PTM o cuando es fácil añadirlas por medios químicos, puesto que el manejo de las células es más sencillo. Las PTMs son una parte intrínseca de los sistemas de producción de proteínas eucariontes, por ejemplo, la levadura *Pichia pastoris* es capaz de realizar PTM, si bien la posición y los residuos de carbohidratos no son los mismos a las de humano, es posible contar con cepas mutantes capaces de producir glicosilaciones similares a las de humano, además la levadura es de más fácil manejo que las CHO. Otro sistema que ha sido muy útil y de gran expectativa para la producción de proteínas recombinantes, en especial vacunas son las plantas, ya que son capaces de producir las PTM necesarias en la proteína, producirlas en abundancia y con la posibilidad de encontrarse en tejido en particular, como granos, frutos, tubérculos o tallos, que pueden ser consumidos sin la purificación de la proteína, para inmunizar a los pacientes. La eliminación del proceso de purificación reducirá los costos de producción y se obtendrían biofármacos con costos menores. La ingeniería genética rompió con el paradigma de la obtención de fármacos a base de síntesis orgánica y aún tiene muchos retos por delante, como lo investigado en el presente trabajo, la mejora en los sistemas biológicos para la síntesis de los biofármacos, en donde las plantas se ven como un huésped prometedor para la producción de las proteínas recombinantes con fines terapéuticos.



## **Introducción**

La industria farmacéutica se encuentra buscando nuevas formas de tratamiento de enfermedades de animales y humanos, y ha logrado incursionar en la producción de medicamentos que no requieren síntesis química como son las proteínas recombinantes terapéuticas, esto gracias al progreso de la Biología Molecular.

Una proteína recombinante se define como aquella proteína que se produce a través de un organismo genéticamente modificado, por lo que, la proteína se expresa en un organismo que naturalmente no la produce (1). La producción de la primera proteína recombinante comercial la cual se generó por la farmacéutica Genentech llevó entre investigación, implementación del proceso en planta y la salida al mercado cerca de 12 años. Desde los años 70 del siglo pasado, cuando comenzó la implementación de la Ingeniería Genética hasta la fecha, se han ido diversificando u optimizado los huéspedes utilizados para la producción de proteínas recombinantes, esto con el fin de generar un proceso que permita la obtención de grandes cantidades de proteína con una inversión y costos de mantenimiento mínimos, puesto que la demanda de proteínas terapéuticas ha ido en aumento (2).

Así tras la adecuada manipulación y optimización de los protocolos para obtener diferentes tipos de proteínas recombinantes, se ha logrado la generación de cientos de proteínas recombinantes comerciales, y se encuentran otros cientos en proceso de producción. Un ejemplo de proteína recombinante comercial usada como terapia es la prolantina, un biofármaco que consumen personas con deficiencia crónica del inhibidor de la proteasa alfa1, la cual, se encarga de proteger a los pulmones de la destrucción tisular (3).

Algunas de las principales empresas farmacéuticas internacionales que actualmente se encargan de la producción de proteínas recombinantes son Pfizer, Bristol Meyer, Merck y Amgen. Mientras que a nivel nacional PiSA y PROBIOMED son las encargadas de producir biofármacos en México (4).

Se ha sugerido que la producción de biofármacos tiene una ventaja económica para las empresas farmacéuticas, la elaboración de medicamentos más complejos o diferentes como una estrategia para combatir la expiración de las patentes. Diversas empresas han decidido ampliar su línea de negocios por medio de la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades oncológicas, inmunológicas e inflamatorias. México también contribuye con la producción mundial de los biofármacos, aunque, son pocas las compañías farmacéuticas que se encargan del desarrollo, si bien, muchas se dedican a su manufactura (4).

Para llevar a cabo la implementación de un protocolo de producción de una proteína recombinante, se deben considerar muchos factores, entre ellos las características de las proteínas a producir, ya que algunas de ellas necesitan modificaciones postraduccionales (PTM, *postraductional modifications*) como la adición de azúcares, es decir glicosilaciones comunes en las proteínas de humanos, lo que no es posible de lograr en un organismo procarionte como *Escherichia coli*, pero si en algunos eucariontes como los mamíferos y las plantas. Así que, un paso clave en la obtención de la proteína recombinante inicia con la búsqueda del sistema biológico capaz de generar a la proteína plegada y activa, cuyo uso pueda ser llevado a escala, de preferencia, a bajo costo (5,6).

Actualmente, la producción de proteínas recombinantes comerciales se lleva a cabo principalmente en las células de ovario de hámster chino (CHO, del inglés *Chinese Hamster Ovary cells*), a pesar de su costo elevado, tanto en la obtención como en su manejo, esto debido principalmente a que las modificaciones postraduccionales de sus proteínas son muy similares a las de humano (7).

De las 71 proteínas recombinantes que se comercializan actualmente, 62 se producen en las células de ovario de hámster chino (6). Sin embargo, la mayoría de estas proteínas son anticuerpos. Aunque hay otros modelos biológicos en los cuales se podrían producir estas proteínas y otras proteínas recombinantes terapéuticas.

El presente trabajo revisa los diferentes tipos de sistemas biológicos que se utilizan en la industria farmacéutica que son capaces de generar proteínas recombinantes, así como sus características, ventajas y desventajas, con el fin de producir los biofármacos idóneos para el consumo humano.

### **Objetivo**

Describir y comparar las características, ventajas y desventajas del uso de células de ovario de hámster chino, bacterias, levaduras y plantas en la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en la industria farmacéutica.

## Antecedentes

### La industria farmacéutica y los biofármacos

La implementación de la Ingeniería Genética a mediados de 1970 abrió el camino a la industria farmacéutica para que las nuevas técnicas innovadoras se encargaran de combatir enfermedades como la diabetes. Los tratamientos que se habían seguido para reducir la hiperglucemia, antes de esa época incluían incluso el suministro por vía subcutánea de una solución que contenía extracto pancreático vacuno, sin embargo, el efecto terapéutico era adverso. Nuevos procedimientos surgieron como la aplicación de insulina purificada de porcino, sin embargo, no siempre proporcionaba los resultados esperados, en muchos casos generaba reacciones alérgicas que podían también llevar a la muerte del paciente. Por lo que los avances de la biología molecular permitieron generar un biofármaco para suplir los tratamientos previos, así el primer producto biofarmacéutico generado fue la insulina humana, proteína producida por la compañía Genentech, utilizando como organismo productor a *E.coli*. Después de la aprobación por parte de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 1982, se convirtió en el primer compuesto biofarmacéutico de este tipo en ingresar al mercado. Desde entonces, el número de solicitudes para el uso clínico de productos biofarmacéuticos va en ascenso (2), así como el de compañías que se dedican a su producción (tabla 1).

Si bien el sector farmacéutico sigue enfocado en la investigación, desarrollo, producción y comercialización de productos químicos, también lo está haciendo con los biofármacos, que son productos que poseen una sustancia activa de origen biológico o de origen biotecnológico. Los fármacos de origen biológico pueden provenir de microorganismos, órganos y tejidos de origen animal o vegetal. Algunos, biofármacos son vacunas, anticuerpos, hormonas, vitaminas entre otros (4).

Algunas de las principales empresas como Pfizer y Bristol Meyer, han perdido el control de las patentes de algunos de sus principales productos, lo que ha impactado de manera considerable en sus ganancias y en la competencia con los medicamentos genéricos. Los países más afectados han sido Reino Unido,

Alemania, Australia, Francia, Italia, España y Japón. Así, las empresas farmacéuticas están diversificando sus líneas de negocios, lo que aumentará su presencia en mercados emergentes, desarrollando medicamentos innovadores y especializados por medio del uso de la Biotecnología. Así han surgido tratamientos para enfermedades oncológicas, inmunológicas e inflamatorias. La Biotecnología es el pilar del progreso innovador de la industria farmacéutica (4).

**Tabla 1. Industrias farmacéuticas que producen biofármacos (tomado de 8 y 9.)**

Nombre de la farmacéutica	Origen	Ejemplo de biofármaco
<b>AMERICA</b>		
<b>Pfizer</b>	Estados Unidos	Etanercept
<b>Eli Lilly and Company</b>	Estados Unidos	Insulina glargiana
<b>Bristol Myers Squibb Holdings Pharma, Ltd. Liability Company</b>	Estados Unidos	Abatacept
<b>Abbvie</b>	Estados Unidos	Adalimumab
<b>Regeneron Pharmaceuticals</b>	Estados Unidos	Aflibercept
<b>Schering Plough</b>	Estados Unidos	Folitropina beta
<b>Amgen</b>	Estados Unidos	Darbepoetina alfa
<b>Merck</b>	Estados Unidos	Coriogonadotropina alfa
<b>PROBIOMED</b>	México	Interferón alfa 2b
<b>PiSA</b>	México	Interferón beta 1b
<b>EUROPA</b>		
<b>Novo Nordisk</b>	Dinamarca	Eptacog alfa (activado)
<b>Janssen-Cilag</b>	Bélgica	Golimumab
<b>Boehringer Ingelheim Promeco</b>	Alemania	Alteplasa
<b>Bayer</b>	Alemania	Interferón beta 1b
<b>Hoffmann-La Roche</b>	Suiza	Alfa-dornasa
<b>Novartis Pharma AG</b>	Suiza	Basiliximab
<b>ASIA</b>		
<b>Celltrion Incorporated</b>	Corea del sur	Infliximab
<b>Wockhardt Limited</b>	India	Insulina glargiana

México es el segundo mercado más grande de América Latina en la industria farmacéutica y es un importante productor de medicinas de alta tecnología, incluyendo antibióticos, antiinflamatorios y tratamientos contra el cáncer, entre otros. Asimismo, 14 de las 15 principales empresas a nivel internacional se encuentran ubicadas en el país, por lo que, México se ha posicionado como uno de los principales centros manufactureros del sector a nivel mundial. La industria farmacéutica representa en promedio 1.2 % del PIB nacional y 7.2 % del PIB manufacturero. Además, México se ha convertido en un destino atractivo para invertir en la industria farmacéutica debido al mejoramiento del marco regulatorio y al aumento en las certificaciones de calidad (4).

Algunos de los productos farmacéuticos que actualmente se tienen disponibles para su uso con fines terapéuticos se muestran en la Tabla 2. De hecho, se han comercializado docenas de productos farmacéuticos producidos incluidas vacunas y factores sanguíneos (10). Por tanto, la generación de otras nuevas proteínas para combatir enfermedades que en su época fueron difíciles de tratar, es uno de los objetivos de la industria farmacéutica.

**Tabla 2. Algunas proteínas recombinantes actualmente disponibles para su uso terapéutico.**

Producto	Producción	Uso terapéutico
<b>Nutropin</b>	La somatropina es una hormona que permite el crecimiento del humano, por lo que, se produce en bacterias <i>E. coli</i> (11).	Permite tratar el crecimiento de niños y debilidad de los niños, ya que, no son capaces de producir la hormona del crecimiento (12).
<b>Prolastina</b>	La alfa-antitripsina se produce a partir de levaduras (11).	Este fármaco funciona para aquellos pacientes que tienen deficiencia crónica del inhibidor proteasa alfa 1, por lo cual, se encarga de proteger a los pulmones de la destrucción tisular (13).

Producto	Producción	Uso terapéutico
<b>Regranex</b>	La Becaplermina se produce mediante la inserción del gen de la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas en levadura ( <i>S. cerevisiae</i> ) (11).	Se usa para tratar úlceras debida a la neuropatía diabética, por lo que, permite la curación de heridas (14).
<b>Glucagen</b>	El Glucagón se produce en <i>S. cerevisiae</i> (11).	Se usa para tratar la hipoglucemia en la diabetes mellitus (15).
<b>Beromun</b>	El Tarsonermin es un factor de necrosis tumoral alfa, se produce en bacterias <i>E. coli</i> (11).	Se usa como adyuvante de la cirugía para la extirpación posterior del tumor (16).
<b>Viraferon</b>	El interferón alfa-2b se produce en <i>E. coli</i> (11).	Se usa para el tratamiento de hepatitis B y C (17).
<b>Antitrombina III</b>	Esta alfa-2-glicoproteína se produce en <i>S. pombe</i> (18).	Previene los tromboembolismos en aquellas personas que con deficiencia hereditaria de Antitrombina III (19).
<b>Apidra</b>	La insulina glargina se produce en <i>E. coli</i> (20).	Se utiliza para el control de la glucemia en la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 (21).
<b>Interleucina-2</b>	La interleucina-2 se obtiene por la vía de <i>E. coli</i> (22).	Es un tratamiento para el carcinoma metastásico de células renales (22).
<b>Lechuga</b>	El antígeno de superficie <i>Hepatitis B</i> se obtuvo a partir de la lechuga (15).	Se utiliza para inmunizar a los pacientes contra la hepatitis B (23).
<b>Hirudina</b>	La hirudina se obtiene a partir de canola (15).	Se utiliza como anticoagulante en pacientes con trombocitopenia (24).
<b>Trumenba</b>	La vacuna se obtiene a partir de <i>E. coli</i> (6).	Previene la enfermedad causada por <i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B (25).
<b>Replagal (tabaco)</b>	La alfa-galactosidasa se obtiene a partir del tabaco (15).	Se usa para tratar la enfermedad de Fabry, la cual, es un trastorno hereditario del catabolismo de los glicosfingolípidos producidos por el déficit de la enzima lisosomal alfa-galactosidasa (26).

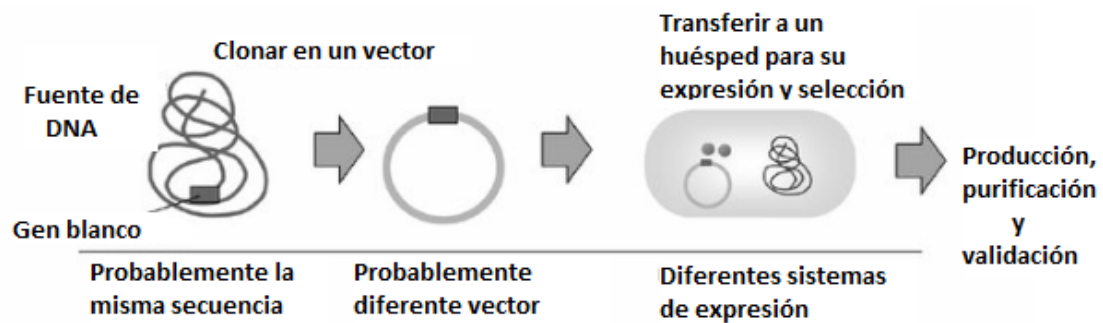
Producto	Producción	Uso terapéutico
<b>Eritropoyetina humana recombinante</b>	La Eritropoyetina humana es producida a partir de células de ovario de Hámster chino (27).	La Eritropoyetina es una glicoproteína que promueve la generación de glóbulos rojos en el torrente sanguíneo, que se utiliza en el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal crónica (27).
<b>Ocrelizumab</b>	Es un anticuerpo monoclonal producido en células de ovario de hámster chino (28).	Está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con formas recurrentes de esclerosis múltiple (28).
<b>Denosumab</b>	Es un anticuerpo monoclonal IgG2 humano producido en células ováricas de hámster chino (29).	Prevención de eventos relacionados con el esqueleto (fractura patológica, radioterapia ósea, compresión de la médula espinal o cirugía ósea) en adultos con neoplasias avanzadas con afectación ósea (29).
<b>Folitropina alfa</b>	La folitropina alfa se produce en células de ovario de hámster chino (CHO) (30).	Estimulación del desarrollo folicular múltiple en mujeres sometidas a superovulación para practicar técnicas de reproducción asistida (ART), tales como la fertilización <i>in vitro</i> (FIV) (30).
<b>BeneFIX</b>	BeneFIX se obtiene a partir de células de ovario de hámster chino (31).	Tratamiento y profilaxis de las hemorragias en pacientes con hemofilia B (deficiencia congénita de factor IX) (31).

## Consideraciones sobre la producción de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes son proteínas que son producidas por un huésped diferente del que originalmente proceden, o bien, que difieren de la proteína natural que se producía en el huésped. Para que el huésped produzca una proteína debe portar el material genético que codifica para la proteína de interés. Los avances de la Biología Molecular han permitido contar con las estrategias



necesarias para construir un vector de expresión en el que se inserte el gen que codifica para la proteína a producir, es decir la clonación del gen, así como los procedimientos para transformar o transfectar al modelo biológico (células, microorganismos u organismos) para que se pueda producir la proteína de interés (Figura 1).

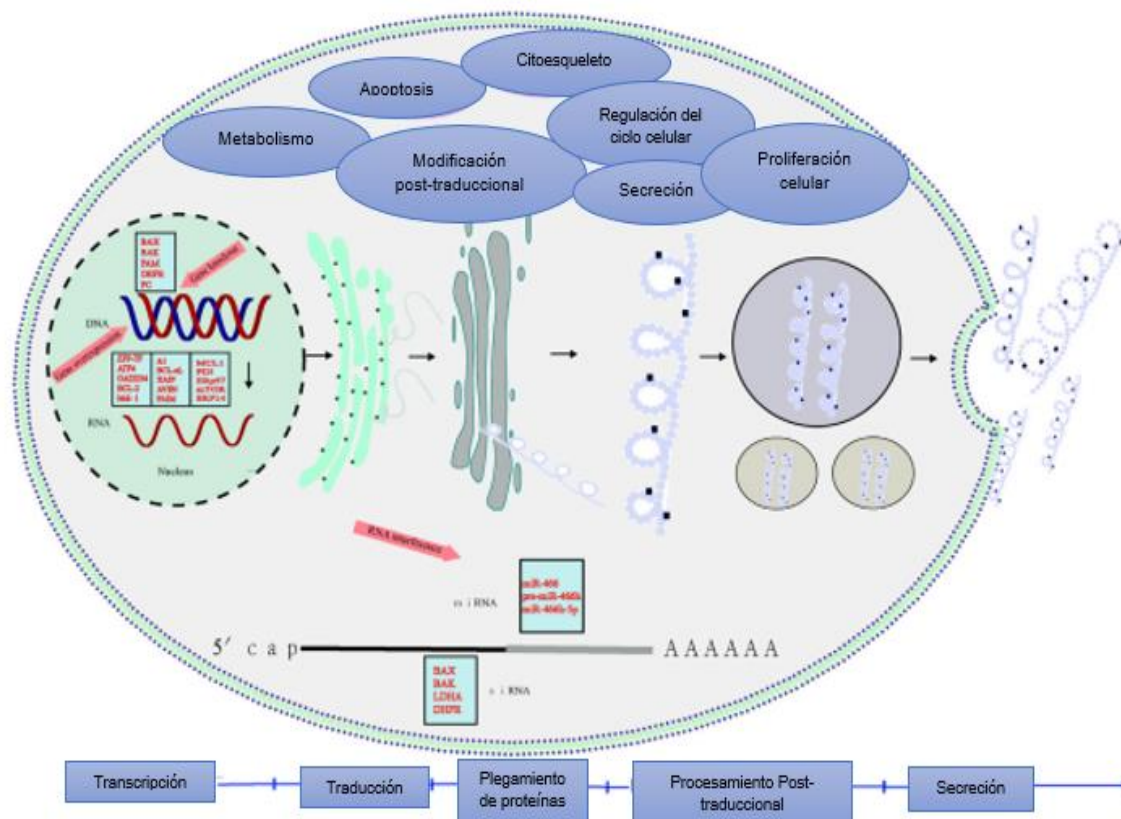


**Figura 1. Proceso para la producción de proteínas recombinantes.** Tomado y adaptado de Mellsted et al., 2008.

Sin embargo, varias consideraciones se tienen que tomar en cuenta para que al final del proceso se obtenga una proteína con su estructura nativa y funcional cuando se produce en un organismo diferente al nativo, es decir, hay que tomar en cuenta la capacidad del huésped de transcribir el gen de interés, traducirlo, llevar a cabo las PTM necesarias y liberarlo en el lugar destino sin que la proteína pierda su estructura funcional (Figura 2; 7).

De acuerdo a (7) la secuencia de nucleótidos de su región codificante determina la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente. La transcripción de esa secuencia controla la producción de la proteína. Sin embargo, es necesario que el mRNA que se produzca sea estable, es decir que se le pueda colocar el CAP, que ocurra el splicing y la poliadenilación. Por otra parte, si el mRNA no es adecuado se puede afectar también el proceso de traducción, por ejemplo, podría alterarse la unión de los factores de iniciación, su unión al ribosoma o que el RNA sea degradado durante el proceso de traducción, todo ello podría llevar a que los niveles de RNA detectados no sean consistentes con los niveles encontrados de la proteína recombinante. Una vez en el ribosoma el mRNA es traducido a proteína, entonces la proteína naciente es translocada al retículo

endoplásmico en donde podrá comenzar el proceso de plegamiento para posteriormente ser enviada al aparato de Golgi. En este trayecto, en cuando le pueden ser colocadas las PTM necesarias para completar su plegamiento y, por último, será llevada al lugar destino, que en el caso de las proteínas con uso terapéutico se prefiere que sean secretadas al exterior celular (Figura 2).



**Figura 2. Esquema del proceso para la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero.** Primero debe transcribirse el gen, el RNA debe madurar y servir de molde para la traducción. La proteína debe sufrir modificaciones postraduccionales en el trayecto de su secreción por el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Modificado de (7), una vez que el retículo endoplásmico recibe al péptido naciente comienza el proceso de plegado de la proteína, su salida del retículo endoplásmico y la posterior entrada al Golgi lleva a que la proteína adquiera las modificaciones postraduccionales que requiera para que se pliegue adecuadamente, para que sea secretada y/o bien reconocida para que sea secretada. Es posible que varias etapas del proceso necesiten de proteínas particulares para que pueda funcionar el sistema de

producción de proteínas, como es el caso de proteínas que colocan las modificaciones postraduccionales, o bien de que las células tengan una tasa de proliferación mayor para que haya una mayor producción de proteínas, esto se ha realizado cambiando el metabolismo primario o bien acelerando la proliferación celular. Modificado de (7).

Para que un organismo distinto al nativo produzca la proteína plegada y activa, en algunas ocasiones es necesario introducir modificaciones genéticas al huésped, para que contenga, por ejemplo, un sistema que evite la proteólisis de la proteína, otras veces es necesario realizar ingeniería metabólica para proveer de los azúcares para realizar las glicosilaciones adecuadas, o la energía necesaria para que se dupliquen las células, o tRNA requeridos para la síntesis de la proteína, ya que hay huéspedes que tienen codones preferidos para ciertos aminoácidos, y la abundancia de los tRNA puede ser distinta a la que se necesita para generar la proteína recombinante deseada. Asimismo, existen casos donde se requiere que los tiempos de crecimiento de las células sean optimizados, por lo que, ocasionaría un mejor rendimiento en la producción.

Por otra parte, las células eucariotas se encargan de colocar PTM como glicosilaciones en sitios específicos, así que es necesario que las células contengan un gen adicional, para que se coloquen específicamente en un aminoácido en particular o bien por el contrario hay que reducir el número de glicosilaciones en la proteína para hacer más eficiente el proceso de producción de la proteína recombinante, esto se realiza haciendo una mutación específica en el gen de interés. A lo largo del proceso se debe cuidar que la proteína se mantenga soluble, no siempre es posible, pero se han hecho esfuerzos por contar con líneas que contengan chaperonas que ayuden a que la proteína se pliegue correctamente y evite la agregación. Todas estas modificaciones en el huésped mejorarán la eficiencia del proceso de producción de las proteínas recombinantes (7).

## **Las células de ovario de hámster chino como modelo para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas.**

Las células de mamífero, en particular las CHO, son las principales células usadas para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas, debido a que tienen la habilidad de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales o (PTM) que son necesarias para su correcto plegamiento y glicosilación, aunque también se usan porque no son susceptibles a la infección por virus humanos, lo que suma un alto grado de seguridad en su uso, aparte de que las proteínas se pueden producir y secretar al medio extracelular (7). Su uso fue introducido desde 1986, para la producción del activador del plasminógeno tisular recombinante. Actualmente, es uno de los sistemas preferidos de expresión de proteínas recombinantes terapéuticas, ya que son fuente de aproximadamente el 70 % de las proteínas producidas y aprobadas para su uso terapéutico. La mayor parte de las proteínas producidas son anticuerpos monoclonales como adalimumab, bezlotumab, avelumab entre otros (tabla 2; 32).

Los mejores valores de producción de proteínas recombinantes en las células CHO llegan a estar en el rango de 1 a 10 g/L de medio. Un valor excelente pero que se logra solo para pocas moléculas, principalmente anticuerpos monoclonales. Debido al éxito de las proteínas recombinantes terapéuticas se hace necesario el aumentar el tipo y número de las proteínas que se pueden producir en este sistema. Los problemas que se han asociado a la pobre producción de proteínas distintas a los anticuerpos se encuentran a lo largo de todo el proceso de producción, pero los cuellos de botella parecen ser la capacidad de las células de sintetizar proteínas y la secreción de las proteínas glicosiladas. Lo que ha llevado a rediseñar a las células CHO para modificar el formato estándar que se tiene para la producción de anticuerpos (33).

Debido a que el aumento en el tiempo de cultivo es uno de los métodos para incrementar la producción se han generado diversas mutantes. Mutantes CHO en la expresión de genes anti-apoptóticos de la familia Bcl2 permiten que se pueda reducir la actividad de caspasas, prolongando la vida de las células con

el consecuente aumento de la productividad de la proteína recombinante. Mutantes para la producción de la enzima piruvato carboxilasa llevan a la disminución de la producción de lactato, lo que eleva la supervivencia de las células. Alteraciones en el citoesqueleto han llevado a cambios en el ciclo celular y el tráfico de proteínas, lo que ha beneficiado la producción de proteína recombinante (7).

Uno de los procesos que suele afectar la productividad de las células CHO es la toxicidad de las proteínas, generalmente un factor inherente a la proteína, pero que sería posible superar si se producen líneas que resistan a estas proteínas, por ejemplo, a través de modificaciones a las proteínas para hacerlas más estables o bien cambiar la región promotora del gen lo que puede llevar a una producción reducida pero continua de proteína, o bien remover la proteína del medio extracelular para que no se acumule y sea menos tóxica para las células (7).

Otra estrategia que se ha propuesto para incrementar la producción de proteínas es la de usar un medio de crecimiento controlado. En general se ha usado suero fetal bovino para el cultivo de las CHO, el cual es problemático en su manejo, ya que incrementa el riesgo de contaminación a lo largo del proceso de producción y adiciona pasos al proceso de purificación de la proteína, por lo que se ha propuesto el uso de medio libre de suero, es decir, un medio de composición conocida y al que se le pueden añadir algunos componentes que pueden mejorar la actividad metabólica de las CHO. Por ejemplo se puede adicionar butirato de sodio que incrementa la producción de anticuerpos al doble o añadir antioxidantes como ácido ascórbico y glutatión reducido, que se han detectado que aumentan la producción del activador tisular del plasminógeno (32), aunque se desconocen los mecanismos por los cuales actúan estos metabolitos. Aún que trabajo por hacer para mejorar el rendimiento de las células CHO. Si bien el costo de las CHO que se usan en la industria es alto (Tabla 3), son utilizadas por su alta productividad sobre otro tipo de huéspedes.

**Tabla 3. Costo de cepas o líneas usadas en la producción de proteínas recombinantes (tomado de 34, 35, 36).**

Nombre de cepa	Cantidad	Precio en dólares americanos
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	10x100 µl	\$ 20.00 (Gene Universal, Inc., 2023)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	10x100 µl	\$ 50.00 (Gene Universal, Inc., 2023)
<i>Pichia pastoris</i>	1 vial	\$ 572.00 (Thermo Fisher Scientific, 2020)
CHO	Vial con células congeladas 5X10 <sup>6</sup> por mL por vial.	\$ 550.00 (Células optimizadas para la producción de anticuerpos.

## **Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli***

Las cepas de *E. coli* son menos costosas que las células CHO (Tabla 3), también lo es su cultivo, además que, por ser de rápido crecimiento y fácil manipulación, este es un sistema que pareciera muy apropiado para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en lugar de las CHO. Sin embargo, *E. coli* presenta algunas desventajas para la producción de proteínas terapéuticas para uso humano o en animales: a) la falta de la capacidad para producir modificaciones postraduccionales de tipo humano en las proteínas, b) la frecuente formación de agregados de proteínas también llamados cuerpos de inclusión y c) problemas con la producción de endotoxinas (2,6,37, 38).

Debido a lo anterior, dentro del procedimiento para la producción de proteínas recombinantes hay que incluir al menos dos pasos que no se realizan con las CHO, adicionar las modificaciones postraduccionales por medios químicos y la eliminación de las endotoxinas, lo que lleva el riesgo de que las proteínas no queden modificadas adecuadamente, es decir que pueden quedar modificadas en sitios distintos o con un número inadecuado de glicosilaciones o con una población heterogénea de proteínas con números distintos de modificaciones, o

bien que el producto final contenga otros contaminantes y, por tanto, se descarten los lotes producidos (2, 6, 37, 38).

Para evitar las pérdidas del producto se sugiere hacer un correcto seguimiento de la proteína a lo largo del proceso de producción, o aprovechar aquellas características del sistema que inicialmente se ven como desventajas, por ejemplo, se observa que la formación de cuerpos de inclusión reduce la degradación del producto por parte de las proteasas de la célula huésped. Otra desventaja del cultivo de *E. coli* es que en condiciones aerobias generalmente hay producción de acetato, esto no es deseable, porque el acetato inhibe el crecimiento celular y la formación de proteínas, e induce respuestas de estrés incluso a una concentración baja de acetato. Además, la formación de acetato constituye una desviación del uso del carbono que puede servir a la síntesis de las proteínas. La formación de acetato comienza cuando la tasa de crecimiento celular o la tasa de captación de glucosa supera un umbral, y es paralelo a la tasa de consumo de oxígeno. Conociendo esto se ha llevado a la modificación mediante ingeniería metabólica de las cepas de *E. coli* para reducir la producción de acetato. Por otra parte, los problemas de solubilidad de las proteínas se han abordado modificando las cepas de *E. coli* para que puedan expresar chaperonas. Entonces, la correcta elección de cepas de *E. coli* que se utilizan para expresar proteínas recombinantes es fundamental, dado que, juegan un papel importante en la expresión, solubilidad y rendimientos de la proteína recombinante deseada (2, 6,37, 38).

## **Levaduras para la producción de proteínas recombinantes**

Las levaduras han sido consideradas como buenos huéspedes para la expresión de proteínas, ya que, son de manipulación genética fácil, requieren de medios de crecimiento accesibles, su crecimiento es en tiempos cortos y muy importante, son capaces de proporcionar modificaciones postraduccionales, por lo que, esto permite el ahorro de pasos químicos, y permite que la proteína se obtenga con mayor facilidad, contrario a lo que pasa con las cepas de *E. coli*. Las levaduras que más se han empleado para la producción de proteínas recombinantes



terapéuticas son *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estas cepas han sido modificadas para mejorar el sistema de tráfico de proteína y las vías secretoras, lo que ha llevado a aumentar los niveles de producción de proteína a gramos por litro, similar al que se tiene para las CHO (39).

*Pichia pastoris* es una levadura de fácil manipulación genética, produce altos niveles de proteína recombinante tanto intra como extracelularmente, es capaz de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariontes superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesado proteolítico) que generan un plegamiento correcto de la proteína, y en el caso de expresión extracelular, se requieren etapas sencillas para la concentración y purificación de la proteína recombinante. Este sistema de expresión emplea vectores de integración al DNA genómico que generan una estabilidad génica, incluso en procesos a gran escala (39). Este microorganismo se caracteriza por crecer rápidamente en medios de cultivos baratos, están compuestos por una fuente de carbono (glucosa, glicerol o metanol), biotina, sales y agua (40). Su cultivo es, además escalable. Los parámetros que influyen en la productividad y actividad de la proteína recombinante (pH, aireación, velocidad de adición de la fuente de carbono, etc.) son controlados fácilmente (39).

*P. pastoris* posee un promotor fuerte y regulado correspondiente al gen de la alcohol oxidasa1 (pAOX1), ya que su metabolismo preferentemente respiratorio le permite alcanzar elevadas densidades celulares en biorreactores sin que los productos del metabolismo como el etanol inhiban su crecimiento. pAOX1 es un promotor fuerte y regulable por metanol, lo que hace que *P. pastoris* pueda alcanzar altas densidades celulares en biorreactores con medios de cultivo baratos. Se debe resaltar que *P. pastoris* es más eficiente que *S. cerevisiae* para la producción de proteínas recombinantes, debido a que esta última presenta inestabilidad plasmídica (40).

En general, en las levaduras existe el fenómeno de la hiperglicosilación que ha limitado el desarrollo de procesos industriales rentables en este sistema. El desarrollo de la plataforma llamada GlycoSwitch, se encarga de eliminar el gen que produce la hipermanosilación de proteínas y también se encarga de



reemplazarlo por los genes de glicosiltransferasas y glucosidasas, esto permite que se produzca la proteína glicosilada deseada. No obstante, el sistema presenta una desventaja, el rendimiento de la proteína glicosilada es baja, por tanto, el sistema GlycoSwitch es factible de uso en investigación, pero no lo es para la producción en la industria farmacéutica (6).

En *P. pastoris* se han producido fragmentos de anticuerpos, uridina recombinante, eritropoyetina humana recombinante e insulina humana recombinante (40). También, se ha expresado a la lactoferrina humana recombinante (rhLf) para determinar su actividad citotóxica potencial en un panel de seis líneas celulares de cáncer de mama humano (41). Por lo que, es posible que con ajustes en el sistema de producción pueda competir con la producción de proteínas recombinantes terapéuticas producidas en CHOs.

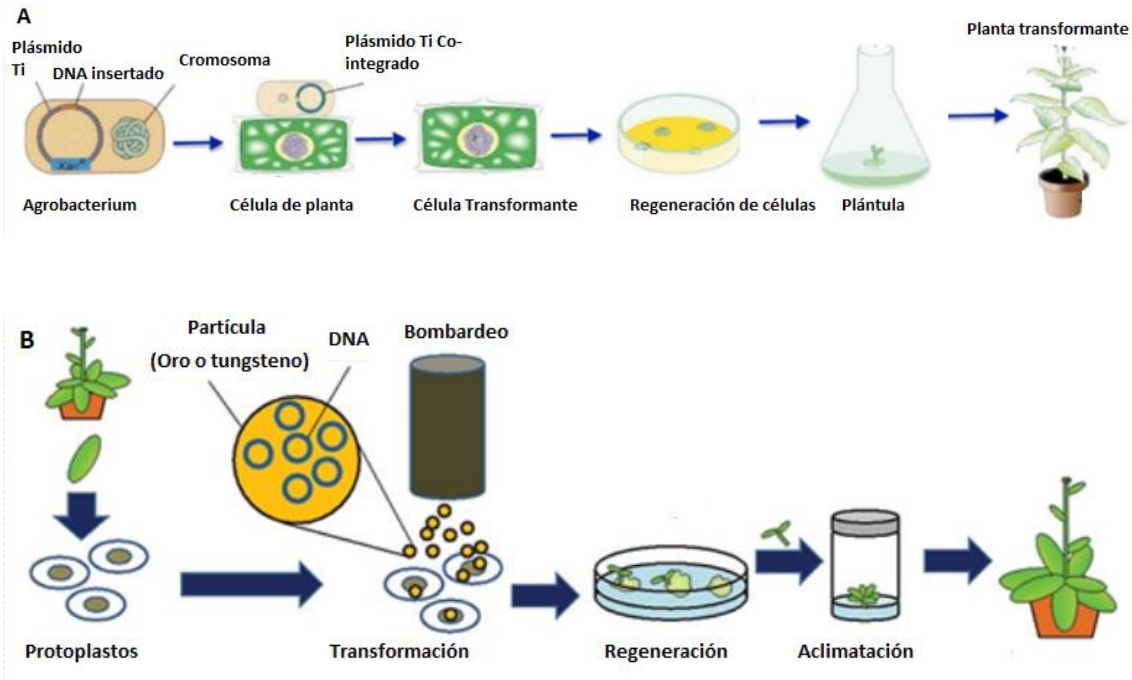
## **Plantas Transgénicas para la producción de proteínas recombinantes**

Las plantas transgénicas tienen varias ventajas para la producción de proteínas recombinantes, tales como: bajo costo, seguridad, estabilidad de la proteína y capacidad para producir proteínas N-glicosiladas. El uso de las plantas como huésped ha aumentado para incluir agentes de inmunoterapia contra el cáncer (6).

Es importante resaltar que el costo total de producir plantas transgénicas que sintetizan proteínas recombinantes es bajo, mientras se mantiene un alto rendimiento. En comparación con los sistemas procarióticos y otros eucarióticos, se estima que los costos podrían ser de 10 a 50 veces menores que en los otros sistemas. Las proteínas farmacéuticas humanas sintetizadas en plantas a menudo producen un tipo de glicosilación similar al de una planta y diferente al humano, para resolver este problema, se ha desarrollado la glico-ingeniería de sistemas de expresión vegetal (42).

El gene foráneo se introduce generalmente en las plantas mediante infección bacteriana o infección viral (Figura 3A) o mediante enfoques directos como el

bombardeo por biolística (Figura 3B). El método elegido dependerá no solo de los recursos con los que cuenta el laboratorio sino también de la capacidad de la planta para adquirir la nueva información y el tejido que se desea exprese a la proteína recombinante de interés.



**Figura 3. Métodos de transformación de plantas A.** Mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* transformante y **B.** Mediante biolística. En ambos casos lo que se desea es que las células vegetales adquieran la nueva información genética. Tomado y adaptado de Peralta, 2020 (<https://ubiquisciencia.medium.com/transformaci%C3%B3n-gen%C3%A9tica-en-plantas-302fcd107bde>).

Uno de los desafíos de la producción de proteínas en plantas es controlar el nivel de expresión del transgén, esto puede variar entre órganos o en generaciones posteriores (42). A pesar de que parece una desventaja, con el promotor adecuado se podrían producir cantidades terapéuticamente relevantes en algún tejido en particular, como los frutos, los tubérculos o las hojas, tejidos que podrían ser consumidos por los pacientes.

Se ha planteado que la etapa de purificación de la proteína recombinante en la planta puede ser más compleja que en los otros tres sistemas analizados hasta

el momento, dado que, se deben eliminar contenidos como metabolitos secundarios o pesticidas (42). Sin embargo, si es rentable si se considera que podrían omitirse los pasos de purificación y el almacenamiento, en algunos productos como en el caso de las vacunas comestibles, donde el alimento se convierte en una vacuna en sí mismo, es decir la planta modificada genéticamente comienza a producir componentes de patógenos que dan como resultado la inmunización del consumidor contra una enfermedad en particular, por tanto, este tipo de sistema comestible se encargaría de reducir costos.

En el caso de las plataformas vegetales para la producción de proteínas recombinantes, su contenido bajo en los tejidos vegetales sigue siendo el principal problema, por lo tanto, el trabajo experimental para mejorar la productividad de los sistemas de plantas de numerosos productos biofarmacéuticos es uno de los retos actuales. Aún se debe de seleccionar el sistema vegetal adecuado, así como un promotor correcto para la expresión de la proteína o una secuencia reguladora o una secuencia señalizadora que clasifique las proteínas en compartimientos celulares o que se secreten bajo ciertas condiciones. Algunos candidatos para expresar proteínas recombinantes con fines terapéuticos podrían ser cultivos de maíz, lechuga, plátanos y arroz. A la fecha, la mayoría de los productos biofarmacéuticos producidos en plantas se encuentran en diversas etapas de ensayos clínicos, aun así, hay proteínas recombinantes que se comercializan (42). Más adelante se da una descripción de las proteínas producidas en plantas.

El potencial para la producción de proteínas recombinantes en planta es grande. Se debe pasar de la etapa de laboratorio a su escalamiento. Esto involucra cultivos de campo, donde cada planta sirve como biorreactor y dicho cultivo puede expandirse fácilmente sembrando nuevos individuos o utilizando una unidad de cultivo vertical (VFU), es decir instalaciones de manejo de plantas totalmente automatizadas que cumplen con los requisitos de buenas prácticas de fabricación. Cuando se usa VFU los rendimientos de proteína recombinante alcanzaron  $2gKg^{-1}$  (después de la optimización). Además, afirman que la demanda anual de 50 ton de proteína pura (por ejemplo, anticuerpo monoclonal

o mab) puede cubrirse con 72 toneladas por año de mab a granel de 3.5-11.0  $km^2$  de campos abiertos o 0.4-1.2 $km^2$  de área de VFU (42).

Numerosos estudios demuestran que los sistemas de células vegetales se utilizan con éxito para producir proteínas terapéuticas a escala industrial a través del uso de biorreactores. Sin embargo, solo se han comercializado unos pocos ejemplos de productos terapéuticos. La principal limitación en cuanto a la comercialización es el bajo rendimiento proteico (0.01-10 mg/L). Un rendimiento de proteína de 10 mg/L se considera como el nivel de entrada para expandir el proceso comercial. Pero el progreso reciente en la ingeniería genética de plantas permite mejorar los rendimientos de proteínas recombinantes a un nivel de 100 mg/L (por ejemplo, los anticuerpos) o incluso hasta 247 mg/L (por ejemplo,  $\alpha$  1-antitripsina) en cultivos de células de arroz (42). Lo anterior supera la producción en las células CHO.

### **Inmunidad dada por plantas transgénicas**

Existen dos tipos de estrategias para la terapia con anticuerpos, usando proteínas derivadas de plantas, la primera es por administración intravenosa en la cual, la proteína recombinante se obtiene a partir de la biomasa vegetal, en un proceso de purificación que es costoso. Por otra parte, se encuentra la administración oral que permite que una parte comestible de la planta contenga el inmunógeno que permitirá generar los anticuerpos, o bien que los anticuerpos hayan sido producidos por la planta, este vehículo es más beneficioso para la industria, ya que, elimina los pasos de purificación por lo que los costos se reducen. Las vacunas comestibles tienen la capacidad de activar la inmunidad sistémica como la de mucosas al entrar en contacto directo con el tracto digestivo, lo cual provee la primera línea de defensa contra patógenos que invaden las mucosas (43).

Estas vacunas deben producirse en vegetales que se coman crudos, ya que el antígeno expresado en tejidos que requieran cocción podría degradarse,

además debe tenerse en cuenta que el sistema vegetal a elegir no produzca naturalmente compuestos tóxicos. Otro aspecto que hay que considerar es que la selección basada en el tamaño de anticuerpos recombinantes y la modificación postraducciona en las que se incluyen las estructuras de glucano, son cuestiones clave en la expresión de anticuerpos de origen vegetal (43).

Los anticuerpos en las plantas pueden mejorarse mediante varios enfoques: la selección de las especies de plantas a transformar, el método de transformación, la optimización de codones (puesto que las plantas tienen algunos codones que prefieren usar para colocar cierto aminoácido y es distinto al que se usa en humano), el diseño de los vectores de expresión génica para la localización subcelular de anticuerpos recombinantes, elección de tejidos vegetales específicos para ser cosechada y el momento de la cosecha para obtener la mayor biomasa (44).

La transcripción y la modificación postraducciona en plantas controla tanto la expresión como los niveles de cosecha de compuestos terapéuticos recombinantes de la biomasa vegetal, que son características esenciales para un sistema de expresión alternativo, adecuado en comparación con sistemas de producción basados en células animales. En las plantas se ha producido varias proteínas terapéuticas, en *Lactuca sativa* (lechuga) se ha expresado el antígeno de Hepatitis B, en *Glycine max* (soya) se ha generado el péptido de la rabia, en *Nicotiana tabacum* (tabaco) se ha expresado un anticuerpo murino (44).

## **Consideraciones sobre los diferentes sistemas de producción de proteínas recombinantes terapéuticas.**

Como se expuso en el texto hay diferencias entre los sistemas de producción de proteínas recombinantes que permiten separarlos de acuerdo, por ejemplo, a su capacidad de producir una proteína plegada correctamente, con la capacidad

biológica para ser usada como agente terapéutico (Tabla 4). El sistema de *E. coli* no podría hacer esto en proteínas que necesitan ser glicosiladas, aunque *P. pastoris* y las plantas pueden llevar a cabo las glicosilaciones necesarias, si bien para ello es necesario aportar estrategias genómicas adicionales para que las glicosilaciones sean las adecuadas.

**Tabla 4. Tabla comparativa de características de CHO, *E. coli*, *P. pastoris* y plantas transgénicas para producir proteínas terapéuticas recombinantes.** (tomado de 2,5, 6,7, 33, 43,50).

CHO	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	Plantas transgénicas
Células de crecimiento lento y tiempos prolongados para la producción de proteína recombinante	Células de crecimiento rápido y rápida expresión de proteínas	Células de crecimiento rápido	Crecimiento variable dependiendo de la especie de planta y el tipo de transformante
Células costosas y muchas veces inestables, muchos cuidados para mantener los plásmidos	Células de bajo precio y de fácil manipulación de genes	Células de costo accesible y de relativamente fácil manipulación genética y estabilidad de las células	Células en cultivo complicadas de mantener, no todos los países tienen la regulación para su uso
Medios de composición compleja que aumentan los costos de producción	Medios de composición simple	Medios de composición simple	Cultivo complicado
Se acerca a la glicosilación humana	La glicosilación raramente ocurre	Las glicosilaciones si ocurren, pero no son similares al humano	Se producen proteínas N-glicosiladas, pero no son similares al humano
Secreción de las proteínas recombinantes en el medio de cultivo	Secreción de las proteínas recombinantes en el periplasma	Secreción de proteínas recombinantes al medio de cultivo	Las proteínas podrían secretarse, pero también podrían quedarse en las hojas, tallos, raíces, tubérculos o semillas

No se producen endotoxinas	Se requieren de pasos adicionales para la eliminación de contaminantes como endotoxinas y proteasas (desventaja)	Proceso de purificación más sencillo que <i>E. coli</i> , ya que es más fácil que las proteínas queden en el medio de cultivo	Las glicosilaciones en las proteínas podrían ser inmunógenas
No hay producción de cuerpos de inclusión	Se pueden producir cuerpos de inclusión en proteínas de más de 30 kDa (desventaja)	Las proteínas suelen plegarse bien	Las proteínas suelen plegarse bien
La producción es de 1 a 10 g/L	La producción es alta pero no alcanza la de las CHO	La producción puede ser comparable a las células CHO	La producción puede ser comparable a las células CHO

En cuanto a la disponibilidad de la proteína, ya sea para su posterior paso de purificación o uso directo, podemos decir que los cuatro modelos aquí presentados son capaces de secretar la proteína, sin embargo, la facilidad de su purificación si es distinta, en el caso de *E. coli* y *P. pastoris* se pueden secretar al medio extracelular, mientras que en las plantas transgénicas la proteína queda contenida en el tejido, si se usan células en suspensión de plantas el biofármaco podría encontrarse en el medio extracelular. En el caso de plantas el que la proteína quede en un tejido particular puede ser una ventaja ya que puede ser consumido como un alimento más y obtener de allí al biofármaco que podría ser un inmunógeno, lo cual elimina los pasos de la purificación que son muy costosos.

La purificación de la proteína recombinante es el paso esencial para remover todos los contaminantes (45), por lo que, la técnica que mayormente se utiliza para remover las impurezas es la cromatografía, la cual, ha sido utilizada en el análisis y purificación de proteínas (46). Por ejemplo, el costo aproximado de un dispositivo de separación cromatografía de control automático esta entre US \$300,000.00-3,000,000.00 cada pieza, por lo que, es un precio demasiado elevado (47). Por otra parte, se debe tomar en cuenta que los biorreactores son

esenciales para la producción de las proteínas, por lo cual, las farmacéuticas necesitan no solo comprarlos sino muchas veces adaptarlos para el proceso en particular que se requiere para la proteína de interés. Los precios de estos biorreactores varían, por ejemplo, los Biorreactores de tanque agitado (2l-500l-5000l) tiene un costo de US \$30,000.00-500,000.00 por pieza (48), el Biorreactor de transporte aéreo (316l) tiene un valor de US \$ 55,000.00 (49). Por lo que si se tienen proteínas en plantas que no pasan por el proceso de purificación el ahorro es grande y ello beneficia al consumidor. Finalmente, vale decir que el proceso de producción de proteínas recombinante terapéuticas en plantas es prometedor.

## **Discusión**

El descubrimiento de la estructura del DNA en 1953 marcó el comienzo del desarrollo de nuevas técnicas, las cuales, abrieron el camino para llegar a la obtención de proteínas recombinantes para el consumo humano (55). La industria farmacéutica se interesó en las innovaciones que estaban surgiendo, y en 1982 con el uso de las técnicas de biología molecular comenzaría un gran cambio en la producción de fármacos, por ejemplo, la insulina, el primer fármaco recombinante que fue aprobado por la FDA para su uso en humanos (56). La producción de proteínas recombinantes por la industria farmacéutica revolucionó la forma de tratar enfermedades que no tenían cura, actualmente la industria se encuentra en la mejora de los procesos debido a la gran demanda que hay de estos productos y los avances de la Biología Molecular permitirán el que se siguen produciendo.

La correcta elección del huésped es de gran importancia en la producción de las proteínas recombinantes. Muchos de los huéspedes ya no son cepas o líneas silvestres, sino que se les han incluido modificaciones para mejorar la producción de las proteínas recombinantes. Generalmente, para el aumento en la producción de proteínas recombinantes se propicia el aumento en el tiempo de cultivo de los huéspedes, la reducción de metabolitos tóxicos y la mejora del plegamiento proteico. Para lograrlo se reduce la apoptosis, se ha cambiado la expresión de genes del ciclo celular, la continua remoción del medio de cultivo



para remover los productos tóxicos, la adición de algunos antioxidantes o la producción de enzimas que desvían las vías metabólicas o la producción de proteínas que ayudan al plegamiento de las proteínas. La generación de las mutantes generalmente se ha hecho mediante el uso del sistema CRISPR/CAS9 que es de gran utilidad para encender o apagar genes o reactivar vías metabólicas completas. Por otra parte, la modificación de los plásmidos permite reducir pasos de purificación, dado que, al añadir por ejemplo una etiqueta de histidinas en el biofármaco, se permite el uso de la cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado y acelera el proceso de purificación (6, 38, 41, 51, 52).

Mantener la función de las proteínas recombinantes es de vital importancia, ya que se obtienen para mejorar la calidad de vida de personas que padecen ciertas enfermedades, la proteína recombinante se usará como sustituto a la proteína faltante o defectuosa, por ejemplo, la diabetes es un padecimiento que puede generarse por la incapacidad de las células  $\beta$  del páncreas de generar insulina, por lo cual, la ingeniería genética permite la obtención de las proteínas recombinantes para tratar este tipo de enfermedades y así aumentar la esperanza de vida de la población. Pensando en ello algo que limita el uso de los diferentes organismos potenciales para la producción de proteínas recombinantes es la capacidad de estos de producir PTMs, ya que muchas de las proteínas con función terapéutica tienen acetilaciones, forman puentes disulfuro o presentan N-glicosilaciones colocadas en posiciones estratégicas. Esas PTMs permiten que la proteína tenga cierta solubilidad, le dan instrucciones de su localización subcelular y al final su capacidad o actividad biológica. Las células CHO son un sistema ideal para colocar las N-glicosilaciones en las proteínas recombinantes terapéuticas ya que las colocan en posiciones similares a las de humano (5, 32).

A pesar de que, en el mercado mundial, la mayoría de biofármacos que han sido aprobados son de origen de CHO, diferentes compañías farmacéuticas siguen optando por el uso de sistemas tales como bacterias y levaduras (tabla 4) y más recientemente plantas (2, 6), ya que en el caso de los organismos eucariontes, sí son capaces de introducir las PTMs, eventos que ocurren en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi. En el caso de bacterias no se encuentran

los organelos encargados de las PTM y por tanto la colocación de las PTMs se realiza mediante métodos químicos, que podrían afectar de maneras diferentes al producto, aumento en costos o la formación de productos indeseados (2, 7, 43, 50), por lo que es probable que los sistemas eucarióticos sean los preferidos en adelante para la producción de las proteínas recombinantes terapéuticas.

Sin embargo, cada sistema de elección tendrá retos importantes para las compañías farmacéuticas para la producción de las proteínas en los fermentadores y en el caso de plantas posiblemente eliminara algunos o todos los pasos de purificación, ya que, estos sistemas al igual que las CHO tienen la capacidad de realizar (PTM). Sin embargo, en el caso de las plantas habrá que generar las instalaciones para el cultivo correcto de las plantas, como es el caso de la cantidad de luz que deben recibir, el consumo de agua y, además, implementar otros métodos de controles de calidad para la optimización de la producción de las proteínas recombinantes. Por lo que se prevé que las plantas revolucionaran el sector farmacéutico (53, 54).

En el contexto mundial amplios avances se están haciendo en la producción de biofármacos, solo en los Estados Unidos, en el año 2014 obtuvo un PIB del 17.1 % solo en el sector farmacéutico (57). En México, hay compañías que se encargan de producir proteínas recombinantes para consumo humano al igual que otras naciones. Sin embargo, México no cuenta con la suficiente infraestructura necesaria para la producción de ciertos biofármacos, no obstante, tanto el Gobierno Federal como las compañías farmacéuticas deben trabajar conjuntamente, con el fin de obtener beneficios económicos y en el sector salud.

## **Conclusiones**

Los avances en la ingeniería genética han permitido la producción de proteínas recombinantes en diferentes tipos de huéspedes, se han usado cepas o líneas silvestres, aunque la mayoría mutantes de bacterias, levaduras, células de mamífero y plantas para optimizar la producción de proteínas a niveles de rendimiento de gramos por litro de cultivo.

Las células de ovario de hámster son las más empleadas para la producción de proteínas recombinantes, pero tanto *E. coli*, como levaduras e incluso plantas han sido utilizadas a lo largo de los últimos 50 años. Las plantas actualmente son un sistema biológico muy prometedor para la producción de proteínas terapéuticas ya que el huésped es el biorreactor y además potencialmente puede ser consumido para aportar las propiedades terapéuticas de la proteína, lo que elimina los pasos de purificación, con la reducción de costos y tiempo de producción asociados. Se espera que su implementación como organismo preferido para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas hará que los productos biofarmacéuticos serán más accesibles a la población.

### **Perspectivas**

La necesidad de aumentar la producción de proteínas recombinantes para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades, han llevado al sector farmacéutico a optimizar los diferentes procesos que permiten obtener con mayor eficiencia. Uno de estos es el revisado en esta tesis el huésped que producirá la proteína recombinante. Si bien las células de ovario de hámster chino han sido ampliamente utilizadas y seguramente lo seguirán siendo, hay otras alternativas que pueden llevar a obtener plataformas de alta producción a un menor costo, lo que permitiría que una población mayor pueda adquirir estos productos. Las plantas son el sistema que promete tendrá beneficios en un futuro, sin embargo, es claro que se tienen que tener las instalaciones apropiadas para establecer los cultivos en el campo y la regulación para el cultivo de estas variedades.

## Referencias

1. Guerrero, M. (24 de Agosto de 2017). Bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes. [Consultado el 12 de marzo del 2023]. Obtenido de Gobierno de México: <https://conacyt.mx/cibiogem/index.php/seminarios-en-bioseguridad-y-biotecnologia-de-ogms/bioprosesos-prod-proteinas-recombinantes#:~:text=Una%20prote%C3%ADna%20recombinante%20es%20aquella,se%20produce%20de%20forma%20natural.>
2. Hendrik, W., & Wim, S. (2011). Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1891–1910. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1034-4>
3. DrugBank Online. (s.f.). Recombinant alpha 1-antitrypsin. [Consultado el 12 de marzo 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB05481>
4. ProMéxico. (Enero de 2013). Secretaria de Economía. [Consultado el 13 de marzo del 2023]. Obtenido de Secretaria de Economía: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62881/130820\\_DS\\_Farmacuetica\\_ESP.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/62881/130820_DS_Farmacuetica_ESP.pdf)
5. Gupta, S., & Shukla, P. (2017). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1-17. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00419>
6. Nagesh, T., & Ambuj, S. (2019). Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 1-23. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
7. Zheng-Mei, L., Zhen-Lin, F., Xiao-Yin, W., Tian-Yun, W. (2022). Factors affecting the expression of recombinant protein and improvement strategies in Chinese Hamster Ovary cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 880155. DOI: [10.3389/fbioe.2022.880155](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.880155)
8. COFEPRIS. (27 de Noviembre de 2017). *Gobierno de México*. [Consultado el 16 de marzo del 2023]. Obtenido de Gobierno de México: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/303235/Listado\\_de\\_Medicamentos\\_Biotecnologicos\\_Biocomparables\\_\\_Versi\\_n\\_4\\_\\_27-11-2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/303235/Listado_de_Medicamentos_Biotecnologicos_Biocomparables__Versi_n_4__27-11-2017.pdf)
9. Secretaria de Salud. (11 de JUNIO de 2019). *COFEPRIS*. [Consultado el 16 de marzo del 2023]. Obtenido de COFEPRIS: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/468861/Listado\\_de\\_Medicamentos\\_Biotecnologicos\\_de\\_Referencia\\_\\_versi\\_n\\_8\\_\\_11-06-2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/468861/Listado_de_Medicamentos_Biotecnologicos_de_Referencia__versi_n_8__11-06-2019.pdf)
10. Hothersall, J., Osgerby, A., Godfrey, R.E., Overton, T.W., Busby, S.J., & Browning, D.F. (2022). New vectors for urea-inducible recombinant protein production. *New Biotechnology*, 89-96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.10.003>
11. Drago, M., & Sainz, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37, 38-44.

12. DrugBank Online. (s.f.). Somatotropin. [Consultado el 18 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00052>
13. DrugBank Online. (s.f.). Recombinant alpha 1-antitrypsin. [Consultado el 18 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB05481>
14. DrugBank Online. (s.f.). Becaplermin. [Consultado el 18 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00102>
15. García, D. (2010). Plantas como fábricas de proteínas recombinantes humanas. *Cultura del Cuidado Enfermería*, 39-50.
16. DrugBank Online. (s.f.). Tasonermin. [Consultado el 18 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11626>
17. DrugBank Online. (s.f.). Interferon alfa-2b. [Consultado el 18 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00105>
18. Cardona-Fuentes, L. G. (12 de 2017). Producción y purificación de la LAPyspII recombinante producida en la levadura *Pichia pastoris*, estudio cinético y determinación de metales. [Consultado el 18 de marzo del 2023]. Obtenido de BUAP: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/635>
19. DrugBank Online. (s.f.). Antithrombin III human. [Consultado el 19 de marzo del 2023]. Obtenido DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11598>
20. Hae-Gwang, H., Kwang-Jin, K., Se-Hoon, L., & Young-jin, S. (2016). Recombinant glargine insulin production process using *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1781-1789. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1602.02053>
21. DrugBank Online. (s.f.). Insulin glulisine. [Consultado el 19 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01309>
22. Vega, M., Gorrin, K., García, G., Gerónimo, H., Moya, G., Quintana., & Castiñeira, M. (2005). Establecimiento de un material de referencia de trabajo para interleucina-2 recombinante. *Revista Cubana de Farmacia*, 39, 12.
23. DrugBank Online. (s.f.). *Hepatitis B Vaccine (Recombinant)*. [Consultado el 19 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11627>
24. DrugBank Online. (s.f.). Lepirudin. [Consultado el 19 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00001>
25. DrugBank Online. (s.f.). *Neisseria meningitidis* serogroup B recombinant LP2086 B01 protein variant antigen. [Consultado el 19 de marzo del 2023]. Obtenido de DrugBank Online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB10285>
26. Calvo, J. (2008). Enfermedad de Fabry: una forma de enfermedad renal crónica diagnosticable y tratable. *Nefrología*, 28, 13-19.
27. Medina R, E., Ortiz E., C., González R., E., & O. Pérez R, N. (2011). Cuantificación de EPO humana recombinante por Fase Reversa-Cromatografía Líquida de Ultra Resolución. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42, 20-22.

28. agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima. (21 de Septiembre de 2022). Ocrelizumab. [Consultado el 21 de marzo del 2023]. Obtenido de agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171231001/FT\\_1171231001.html#:~:text=Ocrelizumab%20es%20un%20anticuerpo%20monoclonal,por%20tecnolog%C3%ADa%20recombinante%20del%20ADN](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171231001/FT_1171231001.html#:~:text=Ocrelizumab%20es%20un%20anticuerpo%20monoclonal,por%20tecnolog%C3%ADa%20recombinante%20del%20ADN)
29. agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima. (4 de abril de 2016). Denosumab. [Consultado el 24 de marzo del 2023]. Obtenido de agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/11703001/FT\\_11703001.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/11703001/FT_11703001.html)
30. agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima. (8 de mayo de 2017). Pergoveris. [Consultado el 24 de marzo del 2023]. Obtenido de agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/107396006/FT\\_107396006.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/107396006/FT_107396006.html)
31. agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima. (20 de julio de 2012). BeneFix. [Consultado el 24 de marzo del 2023]. Obtenido de agencia española de medicamentos y productos sanitarios cima: [https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/97047005/FT\\_97047005.html](https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/97047005/FT_97047005.html)
32. Weifeng, L., Zhenlin, F, Yan, L., Tian-Yun, W. 2021. Serum-free medium for recombinant protein expression in Chinese Hamster Ovary cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. DOI: [10.3389/fbioe.2021.646363](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.646363)
33. Latorre, Y., Torres, M., Vergara, M. *et al.* 2023. Engineering of Chinese Hamster Ovary cells for co-overexpressing MYC and XBP1s increased cell proliferation and recombinant EPO production. *Scientific Reports*, 13, 1482. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28622-z>
34. Gene Universal, Inc. (2023). *Gene Universal, Inc.* [Consultado el 27 de marzo del 2023] Obtenido de Gene Universal, Inc.: <https://www.geneuniversal.com/company/profile?id=3>
35. Thermo Fisher Scientific. (30 de Mayo de 2020). *Invitrogen™ X-33, Pichia pastoris* Yeast Strain. [Consultado el 27 de marzo del 2023]. Obtenido de Invitrogen™ X-33, *Pichia pastoris* Yeast Strain: <https://www.fishersci.com/shop/products/invitrogen-x-33-i-pichia-pastoris-i-yeast-strain/C18000>
36. Antibody Research Corporation. (2023). *Antibody Research Corporation*. [Consultado el 27 de marzo del 2023]. Obtenido de Antibody Research Corporation: <https://antibodyresearch.com/cho-cell-line-hamster-ovary-cells>
37. Han, Q., & Eiteman, M. (2019). Acetate formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* K-12 with an elevated NAD (H) pool. *Engineering in Life Sciences*, 19, 773. DOI: [10.1002/elsc.201900045](https://doi.org/10.1002/elsc.201900045)
38. Jia, B. &. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, 6, 170-186. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
39. Viader-Salvadó, J., & Guerrero-Olazarán, M. (s.f.). Biotecnología de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*. San Nicolás de los Garza, N.L., México: Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.



40. Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2015). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47, 68-71.
41. Iglesias-Figueroa, B.F., Siqueiros-Cendón, T.S., Gutierrez, D.A, Aguilera, R.J., Espinoza-Sánchez, E.A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2019). Recombinant Human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F-actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells. *Apoptosis*, 24, 562-577. DOI: [10.1007/s10495-019-01539-7](https://doi.org/10.1007/s10495-019-01539-7)
42. Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed Research International*, 2-5. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>
43. Ortega Berlanga, B. (2009). Gen sintético que codifica péptidos antigénicos del *virus sincicial* respiratorio: diseño y expresión en sistemas vegetales. San Luis Potosí: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C
44. Ko, K. (2014). Expression of recombinant vaccines and antibodies in plants. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 33, 192-195. DOI: [10.1089/mab.2014.0049](https://doi.org/10.1089/mab.2014.0049)
45. García, J., Santana, Z., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22, 30-39.
46. Deloisa, K., Martínez, L., & Rito-Palomares, M. (2012). Técnicas cromatografías y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y repliegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11, 416.
47. Made-in-china Conneting Buyers with Chinese Suppliers. (30 de Diciembre de 2019). ISO alta Económico dispositivo de separación Cromatografía de Control automático de bajo consumo profesionalmente diseñado sistema de cromatografía. [Consultado el 9 de abril del 2023]. Obtenido de ISO alta Económico dispositivo de separación Cromatografía de Control automático de bajo consumo profesionalmente diseñado sistema de cromatografía: [https://es.made-in-china.com/co\\_oushangyuan/product\\_ISO-Economic-High-Automatic-Control-Chromatography-Separation-Device-Low-Consumption-Professionally-Designed-Chromatography-System\\_uonighrny.html](https://es.made-in-china.com/co_oushangyuan/product_ISO-Economic-High-Automatic-Control-Chromatography-Separation-Device-Low-Consumption-Professionally-Designed-Chromatography-System_uonighrny.html)
48. Made-in-china Conneting Buyers with Chinese Suppliers. (20 de Junio de 2017). Industrial inoxidable tanque agitados fermentadores Bioreactor de fermentación de bacterias que crecen con el sistema de automatización avanzada y fiable. [Consultado el 9 de abril del 2023]. Obtenido de Industrial inoxidable tanque agitados fermentadores Bioreactor de fermentación de bacterias que crecen con el sistema de automatización avanzada y fiable: [https://es.made-in-china.com/co\\_bailunbio/product\\_Stainless-Industrial-Stirred-Tank-Fermentation-Fermenters-Bioreactor-Growing-Bacteria-with-Reliable-and-Advanced-Automation-System\\_ysihhuynrg.html](https://es.made-in-china.com/co_bailunbio/product_Stainless-Industrial-Stirred-Tank-Fermentation-Fermenters-Bioreactor-Growing-Bacteria-with-Reliable-and-Advanced-Automation-System_ysihhuynrg.html)
49. Made-in-china Conneting Buyers with Chinese Suppliers. (19 de Marzo de 2015). Bioreactor Mc Subnatica biorreactor es mi trabajo, el transporte aéreo biorreactores Christi. [Consultado el 9 de abril del 2023]. Obtenido de Bioreactor

Mc Subnatica biorreactor es mi trabajo, el transporte aéreo biorreactores Christi:  
[https://es.made-in-china.com/co\\_dlreyes/product\\_Bioreactor-Mc-Subnatica-Is-My-Bioreactor-Working-Airlift-Bioreactors-Christi\\_eryossoiy.html](https://es.made-in-china.com/co_dlreyes/product_Bioreactor-Mc-Subnatica-Is-My-Bioreactor-Working-Airlift-Bioreactors-Christi_eryossoiy.html)

50. Valencia-Lozano, E. (2016). Transformación genética de *Coffea arabica* para desarrollo de resistencia a *Hypothenemus hampei*. Irapuato, Guanajuato, México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética.
51. Kim, H., Yoo, S.J., & Kang, H.A. (2015). Yeast Synthetic Biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, 15. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>
52. Soni, A. P. (2022). Production of recombinant active human TGFβ1 in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 9-11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.922694>
53. Diaz-Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Plant genetic transformation methods. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 15, 49. DOI: <https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n1.2012.802>
54. Mirkin, F., & Segret, M. (2015). Las plantas como biorreactores: un camino atractivo para producir proteínas recombinantes. *Revista Ciencia Hoy*, 146, 3-4.
55. Nelson, D., & Cox, M. (2018). Estructura de los ácidos nucleicos. En D. L. Nelson, Lehninger. *Principios de Bioquímica* (pág. 287). OMEGA.
56. AMIIF. (Noviembre de 2021). La Asociación Mexicana de Industrias de Investigación Farmacéutica. [Consultado el 14 de agosto del 2023]. Obtenido de La Asociación Mexicana de Industrias de Investigación Farmacéutica: <https://amiif.org/wp-content/uploads/2021/11/tamiz-noviembre-2021-para-tableta-y-computadoras.pdf>
57. Coface FOR TRADE. (AGOSTO de 2016). [Consultado el 17 de agosto del 2023]. Obtenido de Coface FOR TRADE: <https://www.coface.com.mx/Actualidad-y-publicaciones/Publicaciones/EL-SECTOR-FARMACEUTICO-EN-ESTADOS-UNIDOS-HA-DISFRUTADO-DEL-BUEN-TIEMPO-HASTA-AHORA-PERO-ES-HORA-DE-SACAR-EL-PARAGUAS>
58. Mellstedt, H., Niederwieser, D., & Ludwig, H. (2008). The challenge of biosimilars. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 19(3), 411–419. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm345>