

Índice

Índice de autores	15
Prólogo	17
1. Biotecnología y biotecnología farmacéutica: recorrido histórico.	
Características y tipos de biofármacos	19
1.1. Introducción a la “Biotecnología” y a la “Biotecnología Farmacéutica”	19
1.2. Historia de la Biotecnología	21
1.2.1. <i>La Biotecnología primitiva</i>	21
1.2.2. <i>La Biotecnología clásica</i>	21
1.2.3. <i>La Biotecnología molecular</i>	23
1.3. Origen de los biofármacos	24
1.4. Definición y características de los biofármacos.....	25
1.5. Relevancia económica y aplicaciones clínicas de los biofármacos	27
1.6. Biofármacos: las proteínas terapéuticas.....	28
1.6.1. <i>Ventajas de las proteínas recombinantes</i>	28
1.6.2. <i>Tipos de proteínas terapéuticas</i>	28
1.6.3. <i>Los anticuerpos monoclonales</i>	30
1.6.4. <i>Plataformas de producción de proteínas terapéuticas</i>	33
1.7. Biofármacos basados en ácido nucleicos: Terapia génica.....	35
1.7.3. <i>Oligodeoxinucleótidos antisentido (ASOS)</i>	36
1.7.4. <i>siRNA (RNAs de interferencia pequeños)</i>	37
1.8. Biosimilares	37

1.9. El futuro próximo	39
Bibliografía	39
Preguntas de repaso	40
2. Técnicas básicas de manipulación de DNA in vitro	41
2.1. Introducción a la tecnología del DNA recombinante (rDNA).....	41
2.2. Métodos de obtención y purificación de DNA.....	44
2.2.1. <i>Origen del DNA</i>	44
2.2.2. <i>Sistemas de purificación de DNA</i>	45
2.3. Enzimas utilizadas en tecnología de DNA recombinante.....	47
2.3.1. <i>Endonucleasas de restricción</i>	47
2.3.2. <i>DNA ligasas</i>	51
2.3.3. <i>Otras enzimas de interés</i>	53
2.4. Concepto de vector genético	54
2.4.1. <i>Plásmidos</i>	54
2.4.2. <i>Fagos y cósmidos</i>	57
2.4.3. <i>Vectores virales</i>	59
2.4.4. <i>Cromosomas artificiales</i>	59
2.4.5. <i>Clonación en levaduras</i>	60
2.5. Introducción de DNA en células	62
2.5.1. <i>Introducción de DNA en células microbianas</i>	62
2.5.2. <i>Incorporación del DNA en vegetales y células de mamífero</i>	67
2.6. Selección de clones recombinantes.....	69
2.7. Construcción de genotecas de DNA	71
2.7.1. <i>Bibliotecas de DNA genómico</i>	71
2.7.2. <i>Bibliotecas de cDNA</i>	73
2.7.3. <i>Sistemas de rastreo de genotecas</i>	75
2.8. Consideraciones finales y expectativas de futuro para la tecnología del DNA recombinante	78
Bibliografía	79
Preguntas de repaso	79
3. Utilidades de la PCR en Biotecnología microbiana	81
3.1. Historia.....	81
3.2. Fundamento	82
3.3. Diseño de la PCR.....	83
3.4. Diseño de cebadores.....	85

3.4.1. Orientación	85
3.4.2. Secuencia.....	86
3.4.3. Longitud	87
3.4.4. Temperaturas de hibridación Haltan	88
3.4.5. Estructuras secundarias y complementariedad	89
3.5. Condiciones del ensayo.....	90
3.6. Tipos de polimerasas	90
3.7. Contaminaciones	91
3.8. Utilidades	92
3.8.1. Marcaje de sondas de DNA	92
3.8.2. Clonación	92
3.8.3. Mutagénesis.....	94
3.8.4. PCR especiales	95
3.8.5. Diagnóstico	101
3.9. Conclusiones.....	103
Bibliografía	103
Preguntas de repaso	104
4. Tecnologías de secuenciación masiva de DNA	105
4.1. Introducción.....	105
4.2. Tecnologías de secuenciación masiva de DNA	106
4.2.1. Antecedentes: Secuenciación Sanger de DNA	106
4.2.2. Características principales de la secuenciación masiva	107
4.2.3. Diversas aproximaciones técnicas: Diferentes plataformas.....	108
4.2.4. Preparación del DNA molde.....	110
4.2.5. Secuenciación	114
4.2.6. Generación de datos.....	119
4.3. Aplicaciones de las Técnicas de secuenciación masiva de DNA en Genómica Funcional.....	120
4.3.1. Fundamento y aplicaciones del "RNA-Seq"	120
4.3.2. Caracterización de regiones de interacción DNA-Proteína: ChIP-Seq	122
4.3.3. Metagenómica: Análisis del microbioma	123
Bibliografía	124
Preguntas de repaso	125
5. El sistema CRISPR como herramienta en biotecnología.....	127
5.1. Introducción a metodología CRISPR.....	127
5.2. Breve historia del CRISPR	127

5.3. Funcionamiento básico CRISPR	129
5.4. Aplicaciones en biotecnología.....	131
5.4.1. Edición genómica	132
5.4.2. Manipulación genética.....	134
5.4.3. Expresión génica y epigenética	135
5.4.4. Motores génicos	136
5.4.5. Visualización de locus <i>in vivo</i>	137
5.5. Perspectivas.....	138
Bibliografía	140
Preguntas de repaso	140
6. Manipulación <i>in silico</i> de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas	141
6.1. Conceptos básicos y formatos.....	142
6.2. Manipulación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas	146
6.3. Análisis de propiedades de secuencias	147
6.4. Identificación de señales sencillas en secuencias	149
6.5. Búsqueda de genes en ADN	151
6.5.1. Métodos directos o basados en homología.....	152
6.5.2. Métodos indirectos o basados en principios básicos	152
6.5.3. Métodos combinados.....	154
6.6. Ensamblaje de secuencias.....	155
Bibliografía	159
Preguntas de repaso	159
7. Bases de datos y comparación de secuencias	161
7.1. Bases de datos	162
7.1.1. Bases de datos bibliográficas.....	163
7.1.2. Bases de datos de secuencias	164
7.2. Alineamientos.....	166
7.2.1. Matriz de puntos (<i>dot matrix</i>)	168
7.2.2. Algoritmos de programación dinámica.....	169
7.2.3. Métodos heurísticos (<i>BLAST</i>).....	169
7.3. Identificación de motivos conservados en proteínas.....	174
Bibliografía	176
Preguntas de repaso	176

8. Sistemas de producción a gran escala.	
Fermentadores y condiciones de cultivo	177
8.1. Introducción.....	177
8.2. Factores y parámetros críticos que afectan al crecimiento y producción del producto de interés	178
8.3. Procesos de fermentación	178
8.3.1. <i>Fermentación discontinua</i> (batch)	178
8.3.2. <i>Fermentación alimentada</i> (fed batch)	179
8.3.3. <i>Fermentación continua</i>	179
8.4. Tipos y tamaños de fermentadores	179
8.5. Partes de un fermentador agitado	180
8.6. Diseño y fabricación de fermentadores	184
8.6.1. <i>Etapas en el diseño y fabricación de fermentadores</i>	184
8.6.2. <i>Factores de diseño de un fermentador</i>	185
Bibliografía	197
Preguntas de repaso	198
9. Expresión heteróloga de proteínas en microorganismos procarióticos y eucarióticos	199
9.1. Introducción.....	199
9.2. Sistemas microbianos para la expresión de proteínas heterólogas	200
9.2.1. <i>Bacterias</i>	200
9.2.2. <i>Levaduras y hongos filamentosos</i>	203
9.3. Problemas que plantea la expresión heteróloga en microorganismos	206
9.3.1. <i>Presencia de intrones</i>	206
9.3.2. <i>Diferencias en el código genético y uso de codones</i>	208
9.3.3. <i>Modificaciones postraduccionales</i>	210
9.3.4. <i>Estabilidad de la proteína</i>	217
9.4. Optimización de la expresión heteróloga en microorganismos	217
9.4.1. <i>Elección del vector</i>	218
9.4.2. <i>Elección del promotor y terminador de la transcripción</i>	221
9.4.3. <i>Fusiones génicas</i>	228
9.4.4. <i>Mejora cualitativa de la proteína</i>	235
9.4.5. <i>Optimización de las condiciones de cultivo</i>	236
Bibliografía	237
Preguntas de repaso	238

10. Producción microbiana de proteínas recombinantes y metabolitos de uso farmacológico.....	239
10.1. Visión general de la producción de proteínas terapéuticas recombinantes	239
10.2. Proteínas terapéuticas recombinantes producidas en <i>Escherichia coli</i>	240
10.3. Producción en <i>Escherichia coli</i> de anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos.....	242
10.4. Proteínas terapéuticas producidas en levadura	243
10.5. Producción de VLPs en levaduras como formas de inmunización	245
10.6. Insulina: tipos y obtención.....	247
10.6.1. <i>Perspectiva histórica</i>	247
10.6.2. <i>Estructura y actividad de la insulina</i>	248
10.6.3. <i>Análogos de la insulina</i>	250
10.6.4. <i>Plataformas de producción de insulina</i>	252
10.7. Producción de metabolitos primarios y secundarios. Ingeniería metabólica	254
10.7.1. <i>Mejora de la síntesis de antibióticos y antiparasitarios mediante ingeniería metabólica</i>	255
10.7.2. <i>Producción de metabolitos primarios por microorganismos recombinantes</i>	257
10.7.3. <i>Utilización de la ingeniería metabólica para la identificación de nuevos metabolitos</i>	259
Bibliografía	260
Preguntas de repaso	262
11. Descubrimiento y desarrollo de moléculas con actividad farmacológica.....	263
11.1. Introducción.....	263
11.1.1. <i>Un poco de historia</i>	263
11.1.2. <i>Para empezar, la enfermedad</i>	264
11.1.3. <i>Buscando un nuevo fármaco</i>	264
11.1.4. <i>¿Cuánto cuesta?</i>	266
11.2. La diana terapéutica	266
11.2.1. <i>Identificación de nuevas dianas terapéuticas</i>	267
11.2.2. <i>Validación de dianas</i>	269
11.3. Colecciones de compuestos	270
11.3.1. <i>¿Moléculas sintéticas o naturales?</i>	270
11.3.2. <i>Síntesis combinatoria</i>	272
11.3.3. <i>Diseño racional</i>	272
11.3.4. <i>Screening virtual</i>	273
11.3.5. <i>Diseño de fármacos basado en fragmentos (fragments-based drug design o FBDD)</i>	273

11.3.6. <i>Fármacos basados en RNA mensajero</i>	275
11.4. <i>Screening de las colecciones de compuestos</i>	276
11.4.1. <i>Screening in vitro</i>	277
11.4.2. <i>Screening in vivo: estrategias emergentes alternativas o complementarias al HTS</i>	278
11.5. <i>Hits y leads</i>	281
11.5.1. <i>Del hit al lead</i>	281
11.5.2. <i>Optimización de leads</i>	282
11.6. <i>Del candidato a fármaco al medicamento</i>	283
11.6.1. <i>Introducción</i>	283
11.6.2. <i>Estudios preclínicos</i>	284
11.6.3. <i>Desarrollo de la formulación</i>	284
11.6.4. <i>Ensayos clínicos</i>	285
11.6.5. <i>Registro</i>	285
11.6.6. <i>Farmacovigilancia (Fase IV de los ensayos clínicos)</i>	286
Bibliografía	286
Preguntas de repaso	287

12. Bases moleculares de la biocatálisis aplicada y biotransformaciones.

Preparación y optimización de un biocatalizador dentro del marco de la biotecnología farmacéutica	289
12.1. <i>La biocatálisis dentro del marco de la biotecnología farmacéutica</i>	289
12.1.1. <i>Introducción</i>	289
12.1.2. <i>Ventajas e inconvenientes de la biocatálisis</i>	290
12.1.3. <i>Selectividad en los procesos catalizados por un biocatalizador</i>	292
12.1.4. <i>Tipos de biocatalizadores</i>	293
12.1.5. <i>Etapas en el escalado industrial de un proceso biocatalizado por enzimas</i> .	294
12.1.6. <i>Biocatálisis y química sostenible (química verde)</i>	295
12.2. <i>Producción de biocatalizadores para uso biotecnológico</i>	301
12.2.1. <i>Búsqueda de nuevas enzimas naturales a través de screening de nuevos organismos productores de enzimas y metagenómica</i>	301
12.2.2. <i>Obtención de enzimas mediante mutagénesis y evolución dirigida de enzimas.</i>	302
12.2.3. <i>Diseño de novo, enzimas a la carta</i>	304
12.3. <i>Inmovilización de enzimas</i>	304
12.3.1. <i>Ventajas e inconvenientes en la inmovilización de enzimas</i>	304
12.3.2. <i>Métodos de inmovilización de enzimas</i>	305
12.3.3. <i>Elección del método de inmovilización de enzimas</i>	309
12.4. <i>Ingeniería del medio de reacción</i>	309
12.4.1. <i>Enzimas en medios no convencionales</i>	309

12.4.2. <i>Enzimas en disolventes neotéricos</i>	313
Bibliografía	316
Preguntas de repaso	317
13. Ejemplos de utilización de biocatalizadores en procesos de preparación de moléculas bioactivas de interés farmacológico	321
13.1. Introducción.....	321
13.2. Empleo de biocatalizadores en procesos de preparación de moléculas bioactivas de interés farmacológico	322
13.2.1. <i>Oxidorreductasas (EC 1)</i>	322
13.2.2. <i>Transferasas (EC 2)</i>	336
13.2.3. <i>Hidrolasas (EC 3)</i>	339
Bibliografía	346
Preguntas de repaso	347
14. Biotecnología Vegetal. Cultivos vegetales <i>in vitro</i>. Obtención de productos de interés farmacéutico	351
14.1. Biotecnología Vegetal: cultivos vegetales <i>in vitro</i>	351
14.2. Producción de metabolitos secundarios.....	357
14.3. Metabolitos secundarios de interés farmacéutico en cultivos <i>in vitro</i>	361
14.4. Ventajas del cultivo <i>in vitro</i> frente a los sistemas tradicionales de producción	371
Bibliografía	371
Preguntas de repaso	373
15. Biotecnología Vegetal. Optimización de la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en cultivos <i>in vitro</i>	375
15.1. Producción industrial de metabolitos secundarios: procedimientos	375
15.1.1. <i>Obtención de explantos y selección de líneas celulares productivas</i>	377
15.1.2. <i>Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de metabolitos secundarios</i>	379
15.1.3. <i>Adición de precursores</i>	382
15.1.4. <i>Tipos de cultivos para la producción industrial de metabolitos secundarios</i>	383
15.1.5. <i>Elicitación</i>	388
15.1.6. <i>Biotransformaciones o bioconversiones</i>	389
15.1.7. <i>Sistemas de producción a gran escala de metabolitos secundarios: biorreactores</i>	389

15.1.8. Transformaciones genéticas	397
15.2. Perspectivas de la Biotecnología Vegetal en el ámbito de la salud	401
Bibliografía	402
Preguntas de repaso	404
16. Aspectos básicos de la manipulación <i>in vitro</i> de células de mamífero	405
16.1. Cultivo celular: definición, ventajas e inconvenientes de los cultivos celulares y sus aplicaciones	405
16.1.1. Definición de cultivo celular	405
16.1.2. Ventajas e inconvenientes de los cultivos celulares	405
16.1.3. Aplicaciones de los cultivos celulares	406
16.2. Elementos necesarios para un laboratorio de cultivos de células de mamífero	407
16.3. Contaminaciones	410
16.3.1. Agentes químicos	410
16.3.2. Agentes biológicos	411
16.4. Ambiente estéril	415
16.4.1. Utilización de material aséptico	415
16.4.2. Evitar la posibilidad de accidentes	416
16.5. Ambiente de cultivo	417
16.5.1. Fase gaseosa	417
16.5.2. Propiedades físicas	417
16.5.3. Medios de cultivo y suplementos	419
16.5.4. Sustratos	422
16.6. Tipos de cultivo	424
16.6.1. Tipos de cultivos celulares	425
16.7. Cultivos bidimensionales y tridimensionales.	430
Bibliografía	432
Preguntas de repaso	433
17. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo <i>in vitro</i> de células de mamífero	435
17.1. Obtención de productos de interés farmacológico e industrial	435
17.2. Ejemplo de aplicación biotecnológica: producción de α -1,4-Glucosidasa (<i>Myozyme</i>) para el tratamiento de la enfermedad de Pompe	437
17.3. Ingeniería tisular. Bioingeniería de órganos	439
17.4. Búsqueda de dianas y nuevos fármacos	444

17.4.1. Ejemplo de proceso de búsqueda de nuevos fármacos: fármacos antitumorales de origen marino desarrollados por PharmaMar ..	444
17.4.2. Ensayos de toxicidad de fármacos y otros compuestos en cultivos de células de mamífero	447
17.5. Terapia génica celular	451
17.5.1. Reprogramación celular a partir de células somáticas: células iPS	451
17.5.2. Retos de la terapia celular y de los modelos de enfermedad	454
Bibliografía	455
Preguntas de repaso	456