



## PRODUCCIÓN E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

### PROPUESTA METODOLÓGICA Y DE ACTIVIDADES DOCENTES

#### CARRERAS

- Bioquímica
- Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular

#### FUNDAMENTACION

Las proteínas participan en casi todos los procesos de la vida (construcción de células, órganos y cuerpo, catalizadores de la mayor parte de las reacciones químicas de la célula y regulación de las vías metabólicas que estas reacciones integran, señalización, protección y transporte) y son ampliamente utilizadas en terapia, diagnóstico, investigación y procesos industriales. Consecuentemente, la industria vinculada a la producción de proteínas ha ido tomando grandes dimensiones, teniendo actualmente un mercado que supera los 60-70 billones USD/año (considerando tanto los biofarmacéuticos, como las proteínas empleadas en investigación y diagnóstico). Desde el nacimiento de las nuevas biotecnologías (asociadas a la tecnología del DNA recombinante), la investigación y desarrollo en este campo no sólo se ha centrado en los métodos que permiten la expresión de proteínas en una forma biológicamente activa sino también en el diseño de metodologías que permitan incrementar su actividad biológica, estabilidad, afinidad, selectividad, etc y en el desarrollo y modificación de líneas celulares para la expresión. En particular, en la era post-genoma el conocimiento a nivel molecular de los diferentes procesos que ocurren en la célula (que se incrementan en una forma cada vez más vertiginosa) permiten generar herramientas para el estudio y para la manipulación de los diferentes sistemas de expresión y modificación con estrategias que años atrás eran inimaginables.

La complejidad de la estructura de las proteínas determina que su producción en una forma biológicamente activa sea todavía un problema. Los sistemas de expresión más utilizados actualmente (*E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células de insecto y células de mamífero CHO) son elegidos teniendo en cuenta las características estructurales de la proteína a expresar, sin embargo muchas veces se logran niveles de acumulación muy bajos, lo que determina que los costos de producción sean muy elevados. En algunos casos la proteína se obtiene en formas no activas que resultan difíciles de renaturalizar. Las plantas y animales transgénicos, que constituyen sistemas de expresión de alta capacidad de producción y también con habilidad para procesar correctamente proteínas de estructura compleja, están en pleno



desarrollo. En esta asignatura se van a presentar las características, las ventajas y desventajas que tienen estos sistemas de producción (y otros que están en desarrollo) y las tácticas que se están empleando tanto para el incremento de su capacidad de producción, como para la obtención de productos activos, homogéneos, estables y seguros. Además estrategias para hacer ingeniería de las diferentes líneas celulares para conferirles nuevas características.

Una de las formas de reducir los costos de producción es recurrir a la expresión de genes que codifiquen para moléculas con mayor actividad específica. Asimismo las demandas de agentes más selectivos, más pequeños o con más de una actividad para el tratamiento de distintas patologías o nuevos productos para el diagnóstico o estudios genéticos y también de moléculas con nuevas actividades biológicas o mayor estabilidad a distintas condiciones han determinado el desarrollo de una nueva disciplina conocida como ingeniería de proteínas. Algunos de los métodos empleados para hacer ingeniería de proteínas imitan el proceso biológico de evolución a través de etapas de generación de variación, amplificación y selección. Estos métodos se han ido perfeccionando en la forma de generar la variación (azar, combinación de genes con distinto grado de similitud, modificaciones en una o varias dimensiones, etc), formas de amplificación (dependiendo si se realiza en sistemas celulares o acelulares es el tamaño de la biblioteca que se puede manejar) junto con métodos de screening y selección (entre los que se pueden mencionar *high-throughput screens*), que han permitido llegar a obtener moléculas con una afinidad en el orden de lo picomolar que es muy superior a la que presentan moléculas naturales.

En este contexto esta asignatura tiene como objetivo introducir al alumno en las diferentes estrategias que se están utilizando tanto para la producción como ingeniería de proteínas. Se espera que esta asignatura a través de los diferentes enfoques con los que se trabajarán las distintas problemáticas, le permita al alumno integrar los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, completando de esta manera una sólida formación y orientando su carrera hacia los distintos ámbitos de la actividad profesional en los que desee desempeñarse.

### **OBJETIVOS DEL CURSO**

El curso apunta en primer lugar a dotar al alumno de los conocimientos necesarios para seleccionar los sistemas biológicos de expresión de proteínas más adecuados en base a su estructura, la forma de manipular estos sistemas para mejorarles su capacidad de producción o bien introducirle modificaciones para que puedan efectuar las modificaciones postraduccionales requeridas para las distintas aplicaciones en las que se vaya a emplear la proteína.

En segundo lugar, el curso va introducir las distintas estrategias empleadas en ingeniería de proteínas: por un lado el diseño racional y por otro la evolución dirigida en sus distintas formas. Entre ellas se pueden mencionar los métodos que involucran azar (mutágenos, PCR propenso a error, etc) y los que involucran intercambio de bloques de material genético entre dos o mas



cadenas de DNA (componente sexual de la evolución) ya sea entre genes que tienen alta identidad de secuencia (recombinación homóloga) y o entre secuencias con poca identidad (recombinación no homóloga). Además de los diferentes métodos que pueden emplearse para generar variación, se presentarán las distintas formas por las cuales se puede ligar el genotipo-fenotipo para poder llevar adelante la selección de los mutantes generados empleando sistemas dependientes e independientes de células (*Yeast, Bacterial, Phage, Ribosome y mRNA Display*), las limitaciones y ventajas de las distintas metodologías.

Se presentarán también grupos de proteínas artificiales generadas con estos métodos que están tomando mucha importancia en terapia y diagnóstico.

En tercer lugar a fin de que el alumno desarrolle habilidades manuales en relación a los temas del curso se realizarán prácticas de laboratorio que incluirán distintas estrategias para el clonado, ingeniería, expresión, purificación y análisis de proteínas recombinantes.

#### **PRERREQUISITOS:**

- Para iniciar este curso, se requiere tener aprobado el curso de **Bioquímica III**.

#### **PLANTEL DOCENTE**

Dependerá del número de alumnos que se inscriban, pero en principio se necesita de un Profesor y un Jefe de Trabajos Prácticos. Para la realización de los trabajos de laboratorio se requiere de un docente cada 8 alumnos para poder enseñar y supervisar las distintas metodologías, además de la preparación del material y organización de los trabajos prácticos.

#### **CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA Y ENFOQUES ASUMIDOS**

La materia se desarrollará con una carga horaria de 6hs por semana, con una modalidad de dictado teórico-práctica. Se espera que las clases desarrolladas de esta manera faciliten la adquisición de los conceptos teóricos de la asignatura y su utilización para resolver problemas. Esta modalidad también permitirá trabajar en el desarrollo por parte del alumno de un punto de vista crítico, capacidad de relacionar problemas y enfrentar situaciones nuevas.

En la parte de laboratorio se espera que través de las distintas actividades propuestas que el alumno siga adquiriendo destrezas en el manejo de las técnicas básicas de Biología Molecular y Bioquímica de Proteínas. Dado las restricciones en tiempo y presupuesto para el desarrollo de la asignatura, se planea la siguiente distribución del tiempo: el 60% se utilizará en la discusión de los conceptos teóricos y un 40% en el trabajo experimental.

#### **METODOLOGÍA DE LA ENSEÑANZA**



Se programarán las actividades tratando de facilitar la participación activa del alumno, con el fin de ayudarlo a razonar y desarrollar un sentido crítico. Para ello se emplearán distintas estrategias como por ejemplo:

- Preguntas para poner de manifiesto los conocimientos previos de los alumnos para ser utilizados como punto de partida en la discusión.
- Planteos de experiencias para que el alumno pueda tratar de interpretar los resultados obtenidos.
- Discusión de temas de actualidad relacionados con la asignatura y que puedan ser de interés para los alumnos.
- Desarrollo de discusiones grupales sobre diferentes temas, con el fin de lograr un intercambio de conocimiento entre los alumnos, que posteriormente será volcado en una discusión general con la participación de todos los alumnos de la clase.

Se promoverá la integración de los conocimientos de los distintos temas de la asignatura, a través de la articulación continua de los contenidos que se van desarrollando.

Se estimulará la reflexión sobre las distintas temáticas, para que el alumno pueda tomar conciencia de sus conocimientos, dudas y errores.

Las clases de discusión se desarrollarán bajo las siguientes modalidades:

- Exposición por parte del docente, con el fin de aclarar los conceptos más importantes incluidos en el temario.
- Discusión sobre la temática a desarrollar, en base a una guía de preguntas.
- Interpretación de resultados utilizando una guía de problemas y discusión de los distintos métodos experimentales que pueden utilizarse para resolver dichos problemas.
- Diseño de experimentos por parte de los alumnos, para resolver los problemas que le sean planteados.
- Discusión de publicaciones sobre temas de la asignatura.

Se emplearán los siguientes elementos con fines didácticos:

- Filminas, diapositivas, videos y pizarrón.
- Bibliografía, temario, guía de preguntas y problemas.
- Publicaciones: los alumnos serán divididos en grupos para la exposición de trabajos seleccionados por los docentes o por ellos mismos que servirán para una mejor integración y comprensión de la asignatura.
- Se utilizarán también los recursos existentes on-line, para que el alumno pueda conocer y aprender a utilizar algunas bases de datos y herramientas accesibles a través de internet.



Las clases experimentales comprenderán los siguientes aspectos:

- Planteo de un objetivo
- Elaboración de una estrategia y confección de protocolos
- Desarrollo experimental
- Interpretación de los resultados obtenidos
- Redacción de un informe.

Durante la ejecución del mismo:

- Se discutirán los conceptos teóricos en que se basa la hipótesis de trabajo y los métodos a utilizar.
- Se hará hincapié en la importancia de un buen registro de todas las modificaciones realizadas en el protocolo, anotación de observaciones y registro de datos obtenidos.
- Se promoverá la adquisición de soltura en el manejo del material e instrumental de laboratorio.
- Se discutirá como se pueden evaluar y controlar los errores experimentales.
- Se discutirán algunas normas para la seguridad en un laboratorio

## **EVALUACION**

Se tratará de hacer una evaluación continua del curso a través de conversaciones y la promoción de discusiones durante el desarrollo de las clases de manera de poder trabajar sobre aquellos conceptos que hayan sido menos comprendidos por los alumnos. Para que esto sea posible es necesario contar con una buena relación docente alumno.

Como está establecido en la los Planes de Estudio de las carreras se tomarán dos evaluaciones escritas en las que se evaluarán los conocimientos adquiridos y su utilización en el desarrollo de problemas.

Para la aprobación de los trabajos prácticos el alumno deberá presentar un informe final en el que se plantee claramente los objetivos del trabajo, métodos a emplear, resultados obtenidos y conclusiones

## **PRESUPUESTO**

Las actividades prácticas requieren de reactivos que son sumamente caros (enzimas de restricción y modificación, dNTPs, agarosa, IPTG, anticuerpos, membranas de nitrocelulosa, placas de ELISA, medios de cultivo, etc.), por lo que solo podrá implementarse el curso con un



40% de actividad práctica si el número de inscriptos no es excesivo ya que el presupuesto que asigna la Facultad es insuficiente, por lo que el Profesor debe asumir estos costos.

### **INFRAESTRUCTURA**

Se requiere de un laboratorio con el equipamiento mínimo del Laboratorio FOMEC de Macromoléculas que cuenta con pipetas automáticas, microcentrífugas, incubadora, lector de ELISA. El otro equipamiento específico será prestado por el Profesor.

El uso de este laboratorio limita el número de alumnos que realizan la actividad práctica a 20-25. Debido a la gran demanda de uso que tiene este laboratorio el cronograma de actividades se realizará de acuerdo a la disponibilidad.

### **CONTENIDOS BÁSICOS DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS**

#### **Sistemas de Producción y técnicas básicas de estudio.**

Sistemas que se pueden utilizar para la expresión de proteínas, posibilidad de escalado y seguridad. Costos. Ventajas y limitaciones de los distintos sistemas de producción. Criterios de selección del sistema más adecuado. Estrategias empleadas para incrementar los niveles de acumulación y su relación con los factores que controlan los distintos procesos celulares asociados (formación de eucromatina, transcripción, estabilidad de mRNAs, síntesis, plegado, y degradación de proteínas, *unfolding protein response*, modificaciónn del ciclo celular, etc). Estabilización por direccionamiento a distintos compartimentos celulares. Modificaciones post-traduccionales en distintas especies. Vectores y líneas celulares empleados actualmente. Métodos de estudio de líneas celulares con alta capacidad de producción: transcriptómica y proteómica. Diseño y obtención de líneas celulares modificadas. Expresión de proteínas en células de mamífero, animales transgénicos, algas, suspensiones celulares y plantas transgénicas. Aspectos regulatorios. Biofarmacéuticos. Biogénicos.

Metodología utilizada para el estudio de la expresión, optimización de condiciones de expresión, purificación y caracterización de la proteína obtenida. Uso de de sistemas de expresión temporal para optimizar las construcciones.

#### **Clonado molecular de anticuerpos, mejoramiento, producción y aplicaciones.**

Estructura de inmunoglobulinas y función. Anticuerpo recombinantes: murinos, quiméricos, humanizados, humanos, Fab, simple cadena, diabodies, de camélidos. Construcción de bibliotecas combinatorias murinas, humanas, pollo. Biopanning. Análisis de las secuencias de anticuerpos en bases de datos. Estrategias empleadas para la mejora de la afinidad, modificación de la especificidad y humanización. Producción de Fab, anticuerpos simple cadena y completos. Purificación y caracterización. Glicosilación en los distintos sistemas de expresión.



Métodos utilizados en la humanización de los glicanos. Anticuerpos utilizados actualmente en terapia.

Metodología empleada para la construcción de bibliotecas, selección y caracterización.

### **Diseño Molecular de Proteínas**

Diseño racional basado en la estructura. Mutagénesis sitio dirigida.

Diseño computacional empleando algoritmos diseñados para identificar secuencias de aminoácidos de importancia en la estructura, reconocimiento, etc. Limitaciones.

### **Evolución dirigida de proteínas**

Principios de evolución dirigida y aplicaciones.

**Métodos para generar diversidad:** Evolución in vivo e in vitro.

**Evolución in vivo:** utilización de bacterias mutagenizadoras [que carecen mismatch repair (mutS), 8-oxo-GTP repair (mutT) o 3-5' exonucleasa actividad PolIII (mutD)], y termófilas. Uso de químicos, análogos de dNTPs y radiación ultravioleta. Inducción de hipermutaciones somáticas en células de mamífero y sus aplicaciones en la evolución de proteínas eucarióticas.

#### **Evolución in vitro:**

**Mutagénesis al azar:** PCR propenso a error, mutagénesis de saturación (sitio específica pero incluye variantes con todos los aminoácidos)

**Recombinación homóloga:** PCR sexual ("*DNA shuffling*") y family shuffling, **R**andom **P**riming **i**n **v**itro **R**ecombination RPR, **S**taggered **E**xtensión **P**rocess **S**tEP, **R**andom **C**himeragenesis on **T**ransient **T**emplates, RACHITT).

**Recombinación no homóloga:** Exon shuffling, **I**ncremental **T**runcation for the **C**reation of **H**Ybrid enzymes (ITCHY), **S**CRATCHY (ITCHY rearranged by shuffling)

Principios de los distintos métodos y algunas aplicaciones.

### **Métodos de screening y selección**

Selección genética, Tecnologías de display de proteínas:

**I-** que requieren de sistemas celulares: display en la superficie de fagos (Phage Display) en la superficie de células (*bacterial e yeast display*) y *plasmid display*.

**II-***Sistema independiente de células:* *ribosome display* y *mRNA display*.

Principios, ventajas y desventajas de los distintos sistemas.

*High-throughput screening. Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS).*

Aplicaciones de los distintos sistemas en el mejoramiento de enzimas, anticuerpos, vacunas moleculares, hipoalergenos, biosensores, etc.



### **Proteínas artificiales: las nuevas generaciones de terapéuticos.**

Proteínas artificiales para diagnóstico y terapia basados en la presentación de secuencias de unión en la superficie de distintos plegamientos (display o binding-scaffolds):

1- Immunoglobulin scaffolds: fragmentos variables de inmunoglobulinas (Fvs), anticuerpos de dominio simple de camélidos y tiburones, receptores de células T (TCR), dominios de moléculas de adhesión y fibronectinas.

2- No immunoglobulin scaffolds: affibodies, DARPins (designed ankyrin repeat proteins), adnectins, avimers y anticalins

### **BIBLIOGRAFIA**

Estas temáticas no han sido incluidas en libros de texto y aunque hay libros que abarcan las distintas metodologías, están más focalizados en las técnicas experimentales que en la parte conceptual. Por eso se recurrirá a algunos textos para repasar o profundizar los conceptos básicos de los mecanismos involucrados. El material bibliográfico principal de la asignatura serán artículos de revistas científicas de los últimos años: *Nature Biotechnology*, *Expert Opinión in Biological Therapy*, *Trends in Cell Biology*, *Trends in Biotechnology*, *Current Opinión in Biotechnology*, *Protein Engineering, Design and Selection*, *PNAS*, *Nature*, *Science*, *FEBS Journal*, etc. Los conceptos más importantes de las distintas temáticas serán resumidos en las presentaciones que haga el profesor, mientras que otros artículos serán utilizados para la discusión en la clase a través presentaciones que hagan los alumnos.

#### **Libros de Texto** (para revisión de conceptos básicos):

- **Biología Celular y Molecular. (5ed, 2003)** Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. . W.H. Freeman & Co. New York,
- **Molecular Biology (4ed 2008)**, Weaver, RF, The McGraw Hill Companies.
- **Recombinant DNA Genes and Genomics-A Short Course (3ed.2007)** Watson, Caudy, Myers Witkowski. Freeman and Company.
- **Molecular Biology of the Gene (5ed, 2004)** Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick. Pearson Benjamin Cummings-CHSL Press
- **Phage Display A Laboratory Manual. (2001)** Barbas, Burton, Scott, Silverman. Cold Spring Harbor, NY, USA.

#### **Libros específicos para los distintos temas:**

- **Cell Biology - A Laboratory Handbook: Ribosome Display: In Vitro Selection of Protein-Protein Interactions (2006)**. Amstutz, P., Binz, H. K., Zahnd, C., and Plückthun, A. in (Celis, J., ed) Vol. 1, 3 Ed., pp. 497-509, 4 vols., Elsevier Academic Press
- **Modern Biopharmaceuticals: Modern Antibody Technology: The Impact on Drug Development (2005)** Moroney, S., and Plückthun, A. in *Knäblein, J., ed*) Vol. 3, 1 Ed., pp. 1147-1186, 4 vols., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim





- **Protein Folding Handbook: Engineering Proteins for Stability and Efficient Folding (2005)** Schimmele, B., and Plückthun, A. in (Buchner, J., and Kiefhaber, T., eds) Vol. 5, 1 Ed., pp. 1281-1333, 5 vols., Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, Germany.
- **Cell And Tissue Culture - Laboratory Procedures In Biotechnology (1998)** Doyle, A and Griffiths, JB in (John Wiley and Sons eds)
- **Methods in Molecular Biology, vol 267: Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (2ed, 2004)** edited by Paulina Balbas and Argelia Johnson, © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- **Methods in Molecular Biology, vol 286, Transgenic Plants: Methods and Protocols (2ed, 2004)**, edited by Leandro Peña, © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- **Methods in Molecular Biology, vol. 352: Protein Engineering Protocols (2007)** Edited by: K. M. Arndt and K. M. Müller © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- **Advance in Protein Chemistry, vol 55, (2001). In Vitro Selection and Evolution Of Proteins** By Andreas Pluckthun, Christiane Schaffitzel, Jozef Hanes, And Lutz Jeremutus.
- **Bioinformatics, Volume II: Structure, Function and Applications, vol. 453 (2008) Protein Structure Prediction**, Chapter 2, Bissan Al-Lazikani, Emma E. Hill, and Veronica Morea, Humana Press, Jonathan M. Keith (ed.), Totowa, NJ.
- **Medicines from Animal Cell Culture (2007)** Edited by G. Stacey and J. Davis, John Wiley & Sons, Ltd
- **Directed evolution tools in Bioproduct and Bioprocess development (2006)** Rubin-Pitel, S; Cho, CM-H, chen, w; Zhao, H.

#### **Articulos** (este listado será actualizado todos los años)

- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C., and Plückthun, A. (2001). In vitro display technologies: Novel developments and applications.. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 400-405.
- Barnes, L. M. and A. J. Dickson (2006). "Mammalian cell factories for efficient and stable protein expression." *Current Opinion in Biotechnology* 17(4): 381-386.
- Binz, H. K., Amstutz, P., and Plückthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1257-1268.
- Birch, JR; Onakunle, Y (2005) Biopharmaceutical Proteins: Opportunities and Challenges. *Methods in Molecular Biology*, vol. 308: Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. Edited by: C. M. Smales and D. C. James © Humana Press Inc., Totowa, N
- Boehm, R. (2007). Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1102: 121-134.
- Carla Fama, M., D. Raden, et al. (2007). "The *Saccharomyces cerevisiae* YFR041C/ERJ5 gene encoding a type I membrane protein with a J domain is required to preserve the folding capacity of the endoplasmic reticulum." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1773(2): 232-242.
- Castle, L. A. e. a. (2004). "Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene." *Science* 304: 1151-1154.
- Chang, C. C. J., T. T. Chen, et al. (1999). "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling." *Nature Biotechnology* 17(8): 793-797.
- Chaparro-Riggers, JF; Loo, BLW, Polizzi, KM; Gibbs, PR; Tang, XS; Nelson, MJ, Bommarius, As (2007) Revealing biases inherent in recombination protocols. *BMC Biotechnology* 2007, 7:77
- Chiba, Y., Y. Jigami, et al. (2007). High Secretion Production Method Of Protein. Patent Cooperation Treaty Application.
- Cramer, A., S. A. Raillard, et al. (1998). "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution." *Nature* 391(6664): 288-291.
- Cudna, R. E. and A. J. Dickson (2003). "Endoplasmic Reticulum Signaling as a Determinant of Recombinant Protein Expression." *Biotechnology and Bioengineering* 81(1): 56-65.
- Coco-Martin, JM, M. Harmsen, MM (2008) A Review of Therapeutic Protein Expression By Mammalian Cells. *BioProcess International*, 4, 28-33



- Dingermann, T (2008) Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol. J.* 3, 90–97.
- Dinnis, D. M. and D. C. James (2005). "Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: Lessons from nature?" *Biotechnology and Bioengineering* 91(2): 180-189.
- Franklin, S. E. and S. P. Mayfield (2005). "Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae." *Expert Opinion on Biological Therapy* 5(2): 225-235.
- Gach, J. S., M. Maurer, et al. (2007). "High level expression of a promising anti-idiotypic antibody fragment vaccine against HIV-1 in *Pichia pastoris*." *Journal of Biotechnology* 128(4): 735-746.
- Gasser, B., M. Maurer, et al. (2006). "Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments." *Biotechnology and Bioengineering* 94(2): 353-361.
- Gasser, B., M. Maurer, et al. (2007). "Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions." *BMC Genomics* 8.
- Gerngross, TU (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 11, 1409-1415.
- Hackel, B. J., A. Kapila, et al. (2008). Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling. 381: 1238-52.
- Heifetz, P. B., B. Llompарт Royo, et al. (2007). "Production Of Biologically Active Proteins."
- Herman, E. M. (2008). "Endoplasmic reticulum bodies: solving the insoluble." *Current Opinion in Plant Biology* 11(6): 672-679.
- Hey, T, Fiedler, E, Rudolph, R, Fiedler, M (2005) Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23, 514-522.
- Hoogenboom (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries *Nature Biotechnology*, 23, 1105-1116.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol. Prog.* 21, 11-16.
- Jefferis, R. (2007). "Antibody therapeutics: Isotype and glycoform selection." *Expert Opinion on Biological Therapy* 7(9): 1401-1413.
- Kolkman, J. A. and W. P. C. Stemmer (2001). "Directed evolution of proteins by exon shuffling." *Nature Biotechnology* 19(5): 423-428.
- Krumpe, L. R. H. and T. Mori (2007). "Potential of phage-displayed peptide library technology to identify functional targeting peptides." *Expert Opinion on Drug Discovery* 2(4): 525-537.
- Leong, S. R., J. C. C. Chang, et al. (2003). "Optimized expression and specific activity of IL-12 by directed molecular evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3): 1163-1168.
- Li, J., Z. Huang, et al. (2006). "Understanding the enhanced effect of dimethyl sulfoxide on hepatitis B surface antigen expression in the culture of Chinese hamster ovary cells on the basis of proteome analysis." *Enzyme and Microbial Technology* 38(3-4): 372-380.
- Lipovsek, D., E. Antipov, et al. (2007). "Selection of horseradish peroxidase variants with enhanced enantioselectivity by yeast surface display." 14(10): 1176-85.
- Locher, C. P., V. Heinrichs, et al. (2004). "Overcoming antigenic diversity and improving vaccines using DNA shuffling and screening technologies." *Expert Opinion on Biological Therapy* 4(4): 589-597.
- Lonberg, N (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology*, 1117-1125.
- Ludevid Mugica, M. D., M. Torrent Quelglas, et al. (2004). Production of peptides and proteins by accumulation in plant endoplasmic reticulum-derived protein bodies. *US 2004/5660 A1*.
- Matsuura, T. and T. Yomo (2006). "In vitro evolution of proteins." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(6): 449-56.
- Mazor, Y, Van Blarcom, T; Mabry, r, Iverson, BL ; Georgiou, G (2007) Isolation of engineered, fulllength antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. . *Nature Biotechnology*, 25, 563-565.



- Michnick, MW ; Arnold, FH (1999) "Itching" for new strategies in protein engineering. *Nature Biotechnology*, 17, 1159-1160
- Neuenschwander, M; Butz, M; Heintz, C; Kast, P; Hilvert, D (2007) A simple selection strategy for evolving highly efficient enzymes. *Nature Biotechnology*, 25, 1145-1147.
- Nuttall, SD; Walsh, RB (2008) Display scaffolds: protein engineering for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 8:609-615 613.
- Pavlou, AV; Reichert, JM (2004) Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 22, 1513-1520.
- Petrenko, V. A. (2008). "Evolution of phage display: From bioactive peptides to bioselective nanomaterials." *Expert Opinion on Drug Delivery* 5(8): 825-836.
- Rader, R (2008) (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*, 26, 743-751.
- Rakestraw, A. and K. D. Wittrup (2006). "Contrasting secretory processing of simultaneously expressed heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology and Bioengineering* 93(5): 896-905.
- Reichert, J. (2003). "Trends In Development And Approval Times For New Therapeutics In The United States." *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 695 -702.
- Reichert, J. and A. Pavlou (2004). "Monoclonal antibodies market. Market analysis." *Nature Reviews Drug Discovery* 3(5): 383-384.
- Reichert, J. M. (2007). "Trends in the development and approval of monoclonal antibodies for viral infections." *BioDrugs* 21(1): 1-7.
- Reichert, J. M. and M. C. Dewitz (2006). "Anti-infective monoclonal antibodies: Perils and promise of development." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(3): 191-195.
- Reichert, J. M. (2006) Trends in US approvals: new biopharmaceuticals and vaccines. *TRENDS in Biotechnology*, 24, 293-298.
- Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, et al. (2005). "Monoclonal antibody successes in the clinic." *Nature Biotechnology* 23(9): 1073-1078.
- Reichert, J. M. and V. E. Valge-Archer (2007). "Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics." *Nature Reviews Drug Discovery* 6(5): 349-356.
- Ripoll, P. J. and L. M. Houdebine (2006). "Where are the bioreactor animals?" *Biofutur*(264): 28-31.
- Rothe, A., R. Hosse, et al. (2006). "In vitro display technologies reveal novel biopharmaceuticals. ." *The FASEB Journal*, 20: 1599-1610.
- Satoh, M., S. Iida, et al. (2006). "Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies." *Expert Opinion on Biological Therapy* 6(11): 1161-1173.
- Schillberg, S., R. Fischer, et al. (2003). "Production of therapeutic antibodies in plants." *Expert Opinion on Biological Therapy* 3(7): 1153-1162.
- Schaffitzel, C., and Plückthun, A. (2001). Protein-fold evolution in the test tube. *Trends Biochem. Sci.* 26, 577-579.
- Sieber, V, Martinez, CA; Arnold, FH (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nature Biotechnology*, 19, 456-460.
- Silverman, J., Q. Lu, et al. (2005). "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains." *Nature Biotechnology* 23(12): 1556-1561.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, et al. (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein." *Nat Biotechnol* 22(12): 1567-72.
- Stemmer, W., P. Patten, et al. (2006). "Modification of virus tropism and host range by viral genome shuffling." Patent record available from the European Patent Office.
- Stemmer, W. P. C. (1994). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." *Nature* 370(6488): 389-391.
- Stumpp, MT; Binz, H K; Amstutz, P (2008) DARPinS: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, 13, 695-701.
- Teruya, K., Y. Daimon, et al. (2005). "An approach to further enhance the cellular productivity of exogenous protein hyper-producing Chinese hamster ovary (CHO) cells." *Cytotechnology* 47(1-3): 29-36.



- Tolley, N., I. A. Sparkes, et al. (2008). "Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport." *Traffic* 9(1): 94-102.
- Torrent, M., B. Llompарт, et al. (2009). "Eukaryotic protein production in designed storage organelles." *BMC Biology* 7.
- Twyman, R. M., S. Schillberg, et al. (2005). "Transgenic plants in the biopharmaceutical market." *Expert Opinion on Emerging Drugs* 10(1): 185-218.
- Vidi, P. A., F. Kessler, et al. (2007). "Plastoglobules: A new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast." *BMC Biotechnology* 7.
- Walsh G; Jefferis, R (2006) Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, 24, 1241-1252.
- Wurm, F M (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 1393-1398.
- Xu, P., D. Raden, et al. (2005). "Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding." *Metabolic Engineering* 7(4): 269-279.
- Zhao, H. and F. H. Arnold (1997). "Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15): 7997-8000.

Dra. Silvana Petruccelli

Profesora Adjunta

Area Biotecnología y Biología Molecular