

PRODUCCIÓN DE INSULINA HUMANA por técnicas de ADN recombinante

La *diabetes mellitus* es una enfermedad crónica caracterizada por la incapacidad del individuo para metabolizar glucosa de manera normal, debido a una deficiencia total o parcial de la hormona insulina, por lo que en algunos casos, los pacientes diabéticos pueden ser controlados mediante la aplicación de insulina.

En México, toda la insulina es importada por una sola compañía productora. Se ha calculado que su consumo en 1989 fue de 56 kg y se estimó que para el año 2000 se requerirán entre 81 y 100 kg de la hormona.

Hasta 1983 toda la insulina utilizada para el tratamiento de la diabetes era extraída de páncreas de porcino y bovino, sin embargo, el uso prolongado de este tipo de insulinas provoca, en algunos individuos, una respuesta inmune. Además, la disponibilidad de páncreas de los animales mencionados es limitada, por lo que es deseable la obtención y uso de insulina humana.

La síntesis natural de la insulina comienza con la producción y procesamiento de una proteína precursora llamada proinsulina. Posteriormente, esta proteína sufre

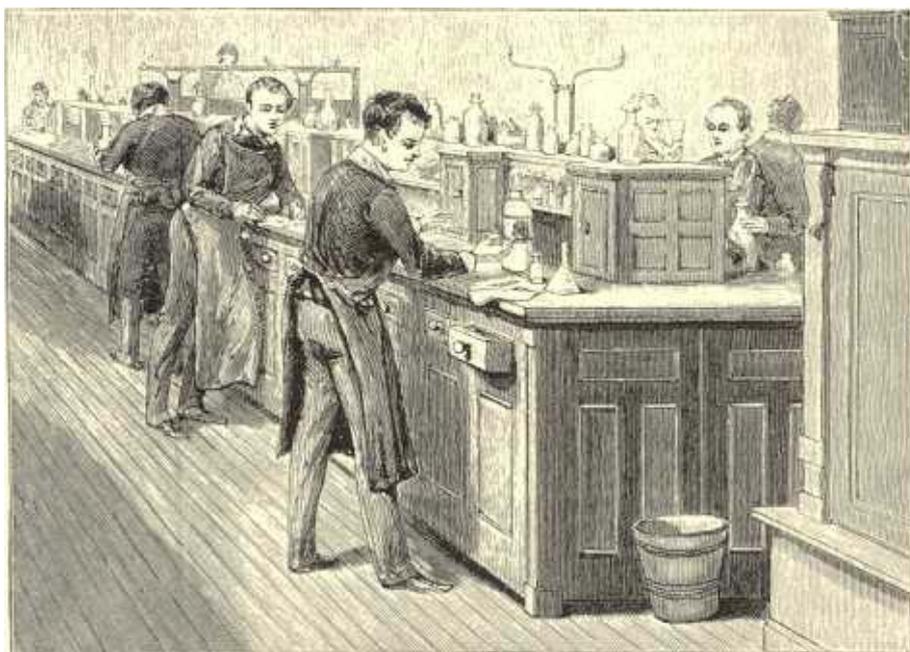
degradación en el centro, dando lugar a dos proteínas (cadenas A y B) unidas mediante dos puentes disulfuro; esta molécula es la insulina madura.

El Instituto de Biotecnología de la UNAM ha desarrollado un método de obtención de insulina humana mediante ingeniería genética de bacterias. La ingeniería genética es un conjunto de metodologías que permiten el aislamiento, caracterización y manipulación del material genético de los seres vivos. Desde 1974 ha sido posible aislar genes de algunos organismos e introducirlos en otros para su expresión. En este caso, el objetivo sería conseguir que los genes humanos, responsables de la producción de la hormona se expresaran en la bacteria. De este modo, las bacterias producirían insulina a grandes velocidades, pudiéndose escalar el modelo en tanques de fermentación para la obtención de grandes cantidades.

Existen dos rutas para la obtención de insulina humana utilizando microorganismos modificados por ingeniería genética. Una de ellas, consiste en producir por separado ambas cadenas para, posteriormente, asociarlas químicamente. La otra se basa en la producción de proinsulina que es procesada hasta insulina madura mediante métodos enzimáticos.

En el laboratorio del Dr. Francisco Bolívar Zapata se han desarrollado ambos tipos de opciones para la síntesis de la insulina humana. Este tipo de manipulación de material genético incluye varios pasos:

- 1) Obtención por síntesis química del gene deseado.
- 2) Aislamiento del gene en un vehículo de transporte tal que permita una expresión eficiente y estable en el organismo receptor.
- 3) Introducción del gene en el organismo receptor mediante el vehículo; en este caso se utilizó la bacteria *Escherichia coli*.



Este tipo de bacterias, denominadas recombinantes, pudieran ser el punto de partida para el desarrollo de procesos industriales. Sin embargo, para que esto sea posible, deberán ser cepas bacterianas que además de ser óptimas en cuanto al transporte y expresión estable del gene dentro del organismo receptor, tendrán que serlo en cuanto al procesamiento y purificación de los productos génicos expresados en el organismo recombinante.

La estrategia que el grupo del Dr. Bolívar siguió para obtener proteínas estables, fue el aislamiento de éstas unidas a otra proteína (represor C1), que se expresa normalmente en la bacteria y se caracteriza por ser de tamaño pequeño. Este tipo de proteínas se conocen como proteínas híbridas o de fusión y se acumulan en el interior de la célula bacteriana dentro de unos compartimientos llamados cuerpos de inclusión que, posteriormente, pueden ser recuperados mediante centrifugación diferencial. De ahí, las cadenas A y B o la proinsulina, son liberadas de la proteína de fusión por métodos químicos para proceder a su purificación. En este último paso, se utilizaron técnicas cromatográficas diferentes para cada una de las cadenas A y B. Una vez aisladas las proteínas A y B, se someten a reacción para que se unan químicamente, esta unión se lleva a cabo mediante cisteínas presentes en ambas cadenas, que formarán los mencionados puentes disulfuro. El producto de esta reacción es la molécula de insulina activa. En el caso de la obtención de proinsulina, se libera ésta de la proteína de fusión por métodos químicos y se somete a reacción a fin de que se produzca la insulina activa. La pureza y actividad del producto se prueba en ratas.

Una vez que funciona el modelo en el laboratorio, donde se manejan volúmenes de 100 mls, se prueba en lo que se conoce como planta piloto,



donde es posible hacer un escalamiento a diez y cien litros, esto es, dos y tres órdenes de magnitud más, respectivamente. Este proceso requiere de una optimización en cuanto a la cantidad de biomasa que se puede recuperar.

La recuperación de las células bacterianas se lleva a cabo por filtración. Posteriormente se rompen las células por medio de una prensa francesa a fin de que se liberen los productos protéicos intracelulares. Los cuerpos de inclusión, donde se encuentra la proteína de interés, son recuperados por centrifugación diferencial. Hasta ahora, se han obtenido 1.2 grs de Insulina Activa por litro de cultivo en el escalamiento de

diez litros y 0.59 grs/lit. en el escalamiento de cien litros. En ambos procesos, la eficiencia es de un 60% y la diferencia de las cantidades obtenidas entre uno y otro tanque, radica en la cantidad de biomasa obtenida: en el tanque de diez litros se han obtenido veinte grs de células por litro, mientras que en el tanque de cien lts. sólo se obtuvieron nueve grs. de células por litro.

El desarrollo de este tipo de tecnologías, resulta muy importante para nuestro país, ya que por este medio podrán subsanarse necesidades clínicas de manera inmediata.

Beatriz Flores.
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.