

## Programa de PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

**Carrera/s:** *Licenciatura en Biotecnología*

**Asignatura:** *Producción de Proteínas Recombinantes*

**Núcleo al que pertenece:** *Complementario Obligatorio (Ciclo Superior de la Orientación Bioprocesos); Complementario Adicional (Ciclo Superior de la Orientación Genética Molecular)<sup>1</sup>.*

**Profesoras:** *Mirna Sanchez, Daniela Gofré*

**Correlatividades previas:** *Recuperación y Purificación de Proteínas, Bioprocesos I, Ingeniería Genética I.*

### **Objetivos:**

El objetivo de esta asignatura es integrar los conocimientos y habilidades adquiridos en Ingeniería genética, Bioprocesos y Purificación de proteínas. Dicho objetivo se abordará mediante la discusión de trabajos científicos y la realización de trabajos experimentales integrados para la obtención de proteínas recombinantes a través de un sistema de producción bacteriano, aunque se abordarán también los otros sistemas más utilizados.

### **Contenidos mínimos:**

Producción de proteínas en bacterias Gram negativas y positivas, levaduras, células de insecto y células de mamíferos. Hospedadores utilizados. Vectores de expresión. Estrategias de optimización de sistemas recombinantes. Sistemas de fermentación utilizados. Cultivos batch, alimentados y continuos para la producción de proteínas recombinantes. Tipos de inducción. Cultivos de alta densidad. Producción de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión. Estrategias de replegado in vitro. Mecanismos de excreción. Proteínas de fusión. Escalado de sistemas de fermentación, recuperación y purificación de proteínas recombinantes. Comparación de producción de proteínas recombinantes en diferentes hospedadores. Análisis de casos industriales.

**Carga horaria semanal:** *8 horas*

---

<sup>1</sup> En plan vigente, Res CS N° 125/19. Para el plan Res CS N° 277/11, pertenece al Núcleo de Orientación.

## Programa analítico:

### Contenidos teóricos

#### **UNIDAD 1**

Introducción a la producción de productos biológicos mediante organismos biológicos. Fuentes de obtención. Producción de biológicos: biofarmacéuticos, proteínas industriales.

#### **UNIDAD 2**

Producción de proteínas en bacterias Gram negativas. Hospedadores utilizados. Vectores de expresión. Sistemas de fermentación utilizados. Mecanismos de excreción. Proteínas de fusión. Aplicaciones industriales.

#### **UNIDAD 3**

Expresión de proteínas en cuerpos de inclusión. Ventajas y desventajas. Replegado proteico in vitro. Escalado industrial. Chaperonas inmovilizadas y artificiales.

#### **UNIDAD 4**

Producción de proteínas en bacterias Gram positivas. Hospedadores utilizados. Vectores de expresión. Mecanismos de excreción. Aplicaciones industriales.

#### **UNIDAD 5**

Producción de proteínas en levaduras recombinantes. Hospedadores utilizados. Vectores de expresión. Sistemas de fermentación. Glicosilación. Aplicaciones industriales.

#### **UNIDAD 6**

Producción de proteínas células de insecto. Hospedadores utilizados. Vectores de expresión. Sistemas de fermentación. Aplicaciones industriales.

#### **UNIDAD 7**

Producción de proteínas en organismos superiores. Hongos superiores y plantas. Ventajas, desventajas y ejemplos de estos sistemas. Comparación de los sistemas de producción de proteínas.

#### **UNIDAD 8**

Producción de proteínas células de mamífero. Hospedadores utilizados. Vectores de expresión. Optimización del sistema. Sistemas de fermentación utilizados. Producción de anticuerpos monoclonales. Producción de proteínas modificadas. Aplicaciones industriales.

### Actividades prácticas

#### **SEMINARIO 1**

Proteína modelo de estudio: *Green Fluorescent Protein* (GFP). Estudio de sus propiedades y características.

#### **SEMINARIO 2**

Sistemas de expresión de proteínas en bacterias Gram negativas. Vectores de expresión comerciales. Características. Ventajas e inconvenientes.

#### **SEMINARIO 3**

Medios de cultivo: sintéticos, semi-sintéticos y complejos. Ventajas y desventajas. Composición.

#### **SEMINARIO 4**

Análisis estadístico de datos obtenidos en el laboratorio. Discusión de resultados de experiencias de laboratorio.

#### **SEMINARIO 5**

Análisis económico

#### **TRABAJO PRACTICO 1**

Estudio de la inducción de la síntesis de una proteína recombinante por *E. coli* en diferentes condiciones.

#### **TRABAJO PRACTICO 2**

Determinaciones analíticas sobre la proteína modelo. Determinación de proteínas en muestras crudas. Determinación de la fluorescencia. Análisis por electroforesis SDS-PAGE.

#### **TRABAJO PRACTICO 3**

Estudio de la cinética de crecimiento bacteriano de una *E. coli* recombinante en diferentes condiciones.

#### **TRABAJO PRACTICO 4**

Esterilización del reactor para cultivo en batch alimentado

#### **TRABAJO PRACTICO 5**

Preparación de pre-inoculo e inoculo y fermentación en reactor

#### **TRABAJO PRACTICO 6**

Ruptura celular mediante homogeneizador de alta presión

#### **TRABAJO PRACTICO 7**

Acondicionamiento del homogenato celular mediante filtración/centrifugación y ultrafiltración

#### **TRABAJO PRACTICO 8**

Cromatografía de afinidad y exclusión molecular en escala intermedia (mL-L)

#### **TRABAJO PRACTICO 9**

Determinaciones analíticas para determinar la pureza y recuperación de la proteína recombinante producida.

#### **OTRAS ACTIVIDADES**

Visita a la Planta de Bioprocesos del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) u otras instituciones equivalentes.

### **T.P Nº 1: Estudio de la inducción proteica.**

**Objetivo:** Evaluar distintos parámetros de la inducción y evaluar el efecto sobre la expresión de la proteína de interés (rGFP).

En el TP se trabaja sobre inóculos de la cepa recombinante *E. coli* M15 pREP 4 (pQE30-GFP). Se evalúa la inducción a distintas concentraciones de IPTG (0-1 mM) y a dos temperaturas distintas (27<sup>o</sup> y 37<sup>o</sup> C).

### **T.P Nº 2: Medios de Cultivo.**

**Objetivo:** Evaluar la cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* M15 pREP 4, con el plásmido pQE-30-GFP, en tres medios de cultivos distintos: **LB + glucosa** (medio complejo), **Riesenberg** (Medio Mineral mínimo) y **Terrific** (medio complejo). Determinar la  $\mu_{max}$  de crecimiento en los tres medios.

En el TP se trabaja en la reconstitución de distintos medios de cultivo, la inoculación de un pre-inoculo, el seguimiento de la cinética de crecimiento del microorganismo mediante DO<sub>600 nm</sub>, la construcción de una curva de crecimiento y la determinación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) del microorganismo.

### **T.P Nº 3: Esterilización del fermentador.**

**Objetivo:** Esterilizar el fermentador, por el método de calor húmedo, para su posterior uso con el medio Riesenberg.

En este TP se trabaja en la preparación del fermentador de 5 lt para su correcta esterilización y determinación del porcentaje de pérdida de agua por ciclo de autoclavado.

### **T.P Nº 4: Producción de GFP recombinante.**

**Objetivo:** Producir la proteína recombinante de interés utilizando estrategias de ingeniería de procesos, para su posterior purificación.

En este TP se emplean los conocimientos adquiridos en los trabajos prácticos (TPs) anteriores y se emplean las condiciones óptimas de crecimiento y de inducción obtenidas en los TPs anteriores, para llevar a cabo la producción de la proteína recombinante de interés, mediante el empleo del sistema Batch Alimentado, con un volumen inicial de 3.5 lt de cultivo y alimentación de 1 lt.

### **T.P Nº 5: Ruptura Celular.**

**Objetivo:** Lograr la ruptura celular mediante homogeneización por alta presión y clarificar el homogenato por filtración o centrifugación.

En este TP se emplea la técnica de homogeneización por alta presión para liberar el producto de interés (intracelular) y la técnica de filtración y centrifugación para clarificar el homogenato.

### **T.P Nº 6: Cromatografía escala analítica IMAC y CEM.**

**Objetivo:** Purificar la proteína de interés, proveniente de un lisado celular clarificado, a través de la cromatografía de afinidad IMAC-Ni en columna con matriz IDA-Sepharose CL como soporte. Además, se propone purificar la proteína de interés y cambiar el *buffer* de almacenamiento, proveniente del eluido de la IMAC-Ni, a través de la cromatografía de exclusión molecular columna con matriz Sephadex G-25 (dextrano) como soporte.

En este TP se emplean dos técnicas cromatográficas (IMAC-Ni y cromatografía de exclusión molecular) para recuperar y purificar la proteína de interés producida en el TP N° 4.

### **Bibliografía (obligatoria y de consulta):**

- Gellissen G. "Production of Recombinant Protein" Wiley-VCH Verlag.
- Belter P.A., Cussler E.L. and Hu W.S. "Bioseparations, Downstream Processing for Biotechnology". J. Wiley & sons.
- Micklos D.A. and Freyer G.A. 1990. DNA Science: a first course in Recombinant DNA technology. Cold Spring Harbor Laboratory Press and Carolina Biological Supply Company. Cold Spring Harbor. USA.
- Moo-Young M. "Comprehensive Biotechnology". Pergamon Press.
- Rehm H.J., Reed G, Puhler A. and Stadler P. "Biotechnology". 3. "Bioprocessing"
- Proteínas puras, entre el Laboratorio y la Industria. 2015. Grasselli. Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes.
- Schmid, Rolf D., Pocket guide to biotechnology and genetic engineering, Weinheim : Wiley-VCH
- Sadana, A. "Bioseparation of proteins" Academic Press
- Deutscher M.P. "Guide to Protein Purification". Academic Press

### Publicaciones Periódicas:

- Biotechnology and Bioengineering
- Biotechnology Progress

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

### **Organización de las clases:**

La asignatura se desarrollará mediante las siguientes actividades:

1. Clases teóricas
2. Discusiones grupales y resolución de problemas (seminarios)
3. Actividades experimentales de laboratorio

### **Modalidad de evaluación:**

Las/os alumnas/os serán evaluados a través de exámenes parciales y diversas actividades que se propongan (informes de laboratorio, monografías, trabajos de investigación, participación en clase, evaluaciones periódicas, etc.), según los objetivos de la asignatura.

A los fines de la evaluación la asignatura se divide en dos etapas: Etapa 1 (Unidades 1 a 4) y Etapa 2 (Unidades 5 a 8).

La evaluación de cada bloque estará conformada por un examen parcial de los conocimientos teóricos de la etapa y representarán en conjunto el 70% de la nota total. El 30% restante estará conformado por la evaluación de diversas actividades realizadas durante las clases y la presentación de los informes parciales y final.

Cada uno de los parciales desaprobados tendrá una instancia de recuperación al finalizar el tratamiento de todos los contenidos de la asignatura. Las actividades de laboratorio requerirán de la elaboración de informes de las actividades y de un informe final. Los informes serán grupales.

### **Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:**

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.
- (b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los/as alumnos/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el cuerpo docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

### **Modalidad de evaluación exámenes libres:**

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Anexo II

**CRONOGRAMA TENTATIVO**

Semana	Tema/unidad	Actividad*			Evaluación
		Teórico	Práctico		
			Res Prob.	Lab.	
1	Teórico Introducción-Seminario sobre proteína modelo en estudio	X	X		
2	Teórico: Producción de proteínas recombinantes – Seminario de sistemas de inducción en gram negativos				
3	Teórico: Sistemas de expresión en gram negativos- Lab: estudio de la inducción en gram negativos	X	X		
4	Teórico: Sistemas de expresión en gram negativos (2)- Lab: Técnicas analíticas para la determinación de una proteína recombinante	X		X	
5	Teórico: Cuerpos de inclusión y replegado molecular. Seminario de medios para cultivo de gram negativos.	X	X		
6	Teórico: Sistemas de expresión en gram positivos- Lab: estudio de la cinética de crecimiento en gram negativos	X		X	
7	Seminario de análisis de datos	X	X		
8	Teórico: Sistemas de expresión en levaduras- Lab: esterilización de un bioreactor – Seminario sobre análisis económico de un proceso	X		X	
9	Lab: Preparación de inóculo y fermentación alimentada de E. coli e inducción para la obtención de una proteína recombinante	X		X	
10	Examen parcial				X
11	Visita a una planta de bioprocesos			visita	

12	Teórico: Sistemas de expresión en células de insecto- Lab: ruptura celular	X	X	
13	Teórico: Sistemas de expresión en células animales- Lab: filtración y ultrafiltración	X	X	
14	Teórico: Obtención de anticuerpos monoclonales y proteínas modificadas- Lab: cromatografía de afinidad	X	X	
15	Lab: Determinaciones analíticas del proceso	X	X	
16	Asistencia al congreso nacional sobre procesos biotecnológicos (SaProBio)		visita	
17	Examen parcial			X
18	Recuperatorios y examen final			X
19	Cierre de actas			

\*INDIQUE CON UNA CRUZ LA MODALIDAD