



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Mejoramiento de la producción de una vacuna de
DNA contra leishmaniasis”

T E S I S

Que presenta

MYRIAM SÁNCHEZ CASCO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directores de Tesis:

Dr. Jaime Ortega López

Dr. Eric Dumonteil

México, D.F.

Agosto 2014

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de Proteínas (Laboratorio 23) del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV – IPN, bajo la dirección del Dr. Jaime Ortega López y la co-dirección del Dr. Eric Oliver Dumonteil, y con la asesoría de la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, del Dr. Rodolfo Marsch Moreno y del Dr. Roberto Ruiz Medrano del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, y la asesoría de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. También contamos con la experiencia técnica de la Auxiliar del Laboratorio Claudia Ivonne Flores Puncheta. Este trabajo se llevó a cabo en el periodo comprendido entre Septiembre del 2007 y Agosto del 2011.

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo financiero del CONACyT, así como también contó con el financiamiento del ICyTDF proyecto PIFUTP08-108. Para el cumplimiento del programa de Doctorado en Ciencias en el período Septiembre 2007 a Agosto 2011 se contó con la beca 167077 otorgada por el CONACyT.

Dedico este trabajo a las personas que siempre me han apoyado y creen en mí, que a pesar de los tiempos difíciles nunca se rinden, aunque algunos ya no estén tan frecuentemente en mi vida, siempre estarán en mi corazón.

También dedico este trabajo y agradezco a mis padres Carmen y Pedro por su confianza y amor incondicional, y gracias a mis hermanos Karla y Oswaldo por su paciencia y cariño.

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica...La voluntad."

Albert Einstein

Abreviaturas

CA	Cromatografía de afinidad
CMV	Citomegalovirus
CPB	Cistein proteinasa B
DO	Oxígeno disuelto
EhADH112	Adhesina 112 de <i>Entamoeba histolytica</i>
EhCP112	Cistein proteasa 112 de <i>Entamoeba histolytica</i>
FG	Filtración en Gel
FML	Complejo Ligando Fucosa-Manosa
GP46	Glicoproteína de 46 kDa
IEC	Cromatografía de Intercambio Ionico
LACK	Leishmania- activated C kinase
NH36	Enzima Nucleosil hidrolasa de 36 kDa
OD	Densidad óptica (optical density)
pb	Pares de bases
P CMV	Promotor de Citomegalovirus humano
pDNA	DNA plasmídico
PFO A	Piruvato Ferredoxin Oxidoreductasa
sc-pDNA	DNA plasmídico superenrollado
T2	Medio optimizado con diseño Taguchi
TvCP4	Cistein Proteinasa de <i>T. vaginalis</i>
ZMY505	Medio de cultivo de Studier

Índice	Página
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Generalidades de las vacunas	4
1.2 Vacunas de DNA plasmídico	7
1.3 Producción de vacunas de DNA plasmídico	11
1.3.1 Etapas de la producción de pDNA	11
1.3.2 Vectores	12
1.3.3 Bacterias	13
1.3.4 Composición del medio	13
1.3.5 Inducción de la producción de plásmidos por cambio de temperatura	17
1.3.6 Etapa “Downstream” o de purificación	19
1.3.7 Técnicas cromatográficas de purificación de pDNA	20
1.4 Control de calidad en las vacunas de DNA plasmídico grado farmacéutico	22
1.5 Vacunas de DNA en México	23
1.6 Vacunas de DNA contra Leishmaniasis	25
2. Justificación y objetivos del trabajo	29
2.1 Justificación	29
2.2 Hipótesis	29
2.3 Objetivo General	29
2.3.1 Objetivos específicos	29
3. Materiales y Métodos	30
3.1 Estrategia Experimental General	31
3.2 Materiales y Métodos	32
3.2.1 Materiales	32

3.2.2 Extracción de DNA plasmídico	32
3.2.3 Purificación de plásmidos	32
3.2.4 Clonación de fragmentos de genes en el vector pVAX1	32
3.2.5 Producción de sc-pDNA en matraces	34
3.2.6 Determinación de pH y Oxígeno Disuelto	35
3.2.7 Análisis densitométrico	35
3.2.8 Cuantificación de DNA de doble cadena por fluorescencia	36
3.2.9 Cuantificación de DNA por espectroscopía	37
3.2.10 Diseño experimental Plackett-Burman	37
3.2.11 Diseño experimental Taguchi	38
3.2.12 Determinación de azúcares residuales por HPLC	38
3.2.13 Determinación de glicerol	39
3.2.13 1 HPLC	39
3.2.13 2 Método Espectrofotométrico	39
3.2.14 Determinación de acetatos	40
3.2.15 Purificación de plásmidos por métodos cromatográficos	40
4. Resultados	42
4.1 Clonación de NH36 en el vector pVAX1	43
4.2 Ensayos de producción de sc-pDNA	47
4.2.1 Cultivos de VR1012-NH36 en medio LB	47
4.2.2 Producción de pDNA en diferentes medios de cultivo	49
4.3 Optimización de los elementos traza	51
4.3.1 Optimización de los elementos traza en el medio ZMY505	51
4.3.2 Producción de vacunas en ZMY505m	55
4.3.3. Optimización de los componentes del medio de cultivo con un Diseño Experimental Plackett-Burman	58
4.3.4 Optimización de los componentes del medio de cultivo con un Diseño Experimental Taguchi	62
4.4 Producción de pVAX-NH36 en el medio optimizado T2	65
4.4.1 Producción a 37°C	65
4.4.2 Efecto del incremento de temperatura del cultivo en la producción de pDNA	66

4.5 Validación de la producción de vacunas de DNA	72
4.5.1 Clonación del DNA que codifica para los antígenos EhCP112, ADH112, PFOA, TvCP4	72
4.5.2. Producción de plásmidos en los medios LB y T2	76
4.5.3 Inducción de la producción de candidatos a vacunas en T2	80
4.6 Producción y purificación de plásmidos con el kit Plasmid Select Xtra	90
4.7 Producción e inducción de pVAX-NH36 en bioreactor	100
5. Discusión	103
6. Conclusiones y Perspectivas	113
6.1 Conclusiones	114
6.2 Perspectivas	115
7. Bibliografía	116
8. Apéndices	125

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Inyección del DNA plasmídico utilizado como vacuna	10
Figura 2. Pasos en la producción de DNA plasmídico	11
Figura 3. Desarrollo de la vacuna de DNA: VR1012-NH36	28
Figura 4. Análisis electroforético de las construcciones VR1012-NH36 y pVNH36	45
Figura 5. Análisis de la construcción pVAX-NH36	46
Figura 6. Resultados de la optimización de metales traza con un Diseño Plackett-Burman	54
Figura 7. Producción de vacunas de DNA en el medio ZMY505m	57
Figura 8. Porcentajes de la influencia de los componentes del medio de cultivo para las tres variables de respuesta	64
Figura 9. Producción de pVAX-NH36 en medio T2 a 37°C	68
Figura 10. Efecto del incremento de la temperatura en la producción del plásmido pVAX-NH36 en el medio T2	69
Figura 11. Producción de pDNA en el medio T2 con inducción por temperatura	70
Figura 12. Análisis de las vacunas candidatas	75
Figura 13. Producción de pDNA de varios candidatos a vacunas en medio LB	78
Figura 14. Producción de pDNA de varios candidatos a vacunas en medio T2	79
Figura 15. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-NH36	83
Figura 16. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-CP4	84
Figura 17. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-PFO	85
Figura 18. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-CP112	86

Figura 19. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-ADH	87
Figura 20. Purificación de plásmidos con el kit Plasmid Xtra Select	92
Figura 21. Purificación del plásmido pVAX-NH36 por cromatografía de Exclusión Molecular	93
Figura 22. Purificación del plásmido pVAX-NH36 por Cromatografía de Afinidad	95
Figura 23. Purificación del plásmido pVAX-NH36 cromatografía de intercambio iónico	97
Figura 24. Producción en bioreactor con el medio T2 para la vacuna pVAX-NH36	102
Figura 25. Vectores para la expresión de antígenos en mamíferos	127
Figura 26. Secuencia del antígeno contra Leishmaniasis	129
Figura 27. Secuencia de los antígenos contra Tricomosis	130
Figura 28. Secuencia de los antígenos contra Amibiasis (CP112)	131
Figura 29. Secuencia de los antígenos contra Amibiasis (ADH)	132

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Características de los diferentes tipos de vacunas	6
Tabla 2. Composición elemental de la bacteria	14
Tabla 3. Vacunas de DNA estudiadas en México	24
Tabla 4. Producción del plásmido VR1012-NH36 en <i>E. coli</i> DH5α en medio LB	48
Tabla 5. Producción de vacunas de pDNA en diferentes medios contra Leishmaniasis en matraces	50
Tabla 6. Comparación de rendimientos utilizando diferentes composiciones de elementos traza	52
Tabla 7. Diseño experimental Plackett-Burman para la evaluación de metales traza en la producción de pDNA	53
Tabla 8. Matriz del Diseño Experimental Plackett-Burman y resultados de la variable de respuesta	60
Tabla 9. Efecto de los componentes del medio de cultivo por medio de un Diseño Plackett-Burman	61
Tabla 10. Diseño Experimental Taguchi y resultados	63
Tabla 11. Candidatos a vacunas de DNA contra enfermedades causadas por parásitos	74
Tabla 12. Rendimientos de DNA plasmídico para vacunas candidatas	88
Tabla 13. Nucleótidos de los fragmentos clonados en el pVAX1	89
Tabla 14. Purificación de pDNA por cromatografía	99

Resumen

Las vacunas de DNA son una alternativa con gran potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas porque inducen una respuesta inmune a nivel celular y humoral, no contienen patógenos y no requieren de la “cadena fría” para su transporte y almacenamiento. La producción y purificación de plásmidos para su uso como vacunas puede obtenerse a bajo costo a escala de bioreactores, con rendimientos hasta de 2.6 g/L; sin embargo, cuando se necesitan probar varios antígenos durante las etapas iniciales de desarrollo, esta escala de producción no es adecuada. Por lo que es necesario un protocolo a escala de laboratorio para producir varios miligramos.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de los medios semidefinidos en la producción de plásmidos porque la composición del medio de cultivo afecta drásticamente la calidad y el rendimiento en la producción de superenrollamiento del DNA plasmídico (sc-pDNA). Se probaron el medio LB y medios especializados como SDCAS y ZMY505, con una optimización de elementos traza el medio ZMY505 modificado ayudó a incrementar los rendimientos entre 2 y 4 veces con respecto a LB y SDCAS. Además, con una optimización posterior con dos diseños experimentales: Plackett-Burman y Taguchi, se formuló el medio de cultivo T2 para producir el plásmido pVAX-NH36, incrementándose los rendimientos hasta cuatro veces en comparación con el medio LB.

También se realizaron experimentos de inducción del número de copias de pDNA al incrementar la temperatura de cultivo de 37° a 42°C durante la fase exponencial del crecimiento, obteniéndose rendimientos de hasta 67 mg de pDNA /L de cultivo en matraces y con 80% de superenrollamiento para diferentes plásmidos construidos con el pVAX1. Para determinar los parámetros adecuados (como tiempo y temperatura de cultivo, consumo de nutrientes y producción de metabolitos) en la producción de plásmidos en matraces de 250 mL utilizando el medio T2, se midieron tanto el oxígeno disuelto de los cultivos, como pH, consumo de la fuente de carbono y la producción de acetatos. Adicionalmente, se estableció un protocolo de purificación que consta de tres pasos cromatográficos: Filtración en gel, Adsorción e Intercambio Iónico, con lo que se logró recuperar de 40 a 62.5% de DNA plasmídico con purezas superiores al 95% (superenrollamiento). Este protocolo de producción y purificación se probó con varios plásmidos, demostrándose que es una plataforma adecuada para obtener varios miligramos de DNA plasmídico superenrollado a nivel de laboratorio.

Abstract

Plasmid DNA (pDNA) vaccines are a promising means to prevent and treat infectious diseases, such as leishmaniasis. These could induce a cellular and humoral immune response, they are not pathogenous and do not require frozen temperature for transportation and storage. However, immunization protocols require large amounts of supercoiled plasmid DNA (sc-pDNA). The production and purification of plasmids can be achieved at a reasonable cost in bioreactors, reaching 2.6 g/L of volumetric yield. However, this scale of production may not be the best method during the initial steps of vaccine development, when many antigens need to be tested. A protocol for producing several milligrams of pDNA at laboratory scale is required. The goal of this work was to improve the production in shake flask cultures of VR1012-NH36 and pVAX-NH36 pDNA vaccines against leishmaniasis, by studying the effect of the culture medium and temperature on the pDNA yield.

Medium composition influences quality and yields of pDNA supercoiling, in this work plasmid production was first evaluated with semidefined LB medium and specialized media SDCAS and ZMY505, increasing volumetric yields two folds by modifying trace metals. Further, the medium was optimized with two experimental designs: Plackett-Burman and Taguchi, this optimized medium was named T2 and volumetric yields were increased up to four folds in comparison with LB production. The results indicate that the plasmid volumetric yield increased up to 67 mg/L in flask cultures by using a semi-defined medium, and shifting the culture temperature from 37 to 42°C during the late exponential growth phase. This pDNA production at a laboratory scale, with at least 80% of sc-pDNA, seems sufficient to evaluate this and other pDNA vaccine candidates during the initial steps of vaccine development.

Additionally, 42 – 62.5 % of pDNA, with more than 95% in sc-pDNA form, was recovered using a three-step chromatographic purification protocol (gel filtration, adsorption and ionic exchange) These production and purification protocols were tested with several DNA vaccine candidates. Our results show that this could be a suitable platform to obtain milligram quantities of pure sc-pDNA at a laboratory scale.

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La prevención de enfermedades a través de las vacunas es sin duda una de las mejores herramientas de la medicina para combatir las enfermedades infecciosas. Desde que Edward Jenner (1796) observó que la exposición al virus causante de la viruela ofrecía protección contra esta enfermedad, las vacunas han sido la alternativa más eficiente y económica para hacer frente a los problemas de salud pública y la biotecnología tiene mucho que aportar, en cada ramo de la medicina preventiva.

1.1 Generalidades de las vacunas

Una vacuna es generalmente una solución que contiene un antígeno, que administrada por vía oral, nasal o intramuscular, estimula artificialmente una respuesta del sistema inmune y activa una protección específica frente a los patógenos. La respuesta inmune puede ser específica o inespecífica y comienza con el reconocimiento del patógeno para terminar con su destrucción. La respuesta inmune inespecífica innata reconoce a todos los patógenos. El fagocito es la célula que se involucra en este primer contacto con el patógeno, su función es ingerirlos y destruirlos. La inmunidad específica se caracteriza por una respuesta contra patógenos individualizados, tener memoria y ser tolerante. Se divide en dos categorías: *inmunidad celular*, las células o linfocitos T destruyen al patógeno reconociendo el antígeno en la superficie celular, e *inmunidad humoral*, respuesta de anticuerpos producidos por linfocitos B (Madigan y col. 2003).

La producción de vacunas ha evolucionado buscando que sean más seguras, potentes y económicamente accesibles. Existe un gran número de enfermedades infecciosas que requieren investigación, para obtener nuevas vacunas o mejorar la potencia y producción

de las ya existentes. En la Tabla 1 se muestran las principales características de los diferentes tipos de vacunas.

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de vacunas.

Tipo de vacuna	Fundamento	Ventaja	Desventaja	Ejemplo de Enfermedades
Organismos vivos y atenuados	Se administra el agente infeccioso	Virulencia reducida. Respuesta inmune fuerte Alta Productividad.	Riesgo de reversión de la virulencia	Viruela, virus de la fiebre amarilla, tuberculosis, rubéola, varicela-
Organismos muertos o inactivados	Se inactiva con agentes químicos o calor	Virulencia eliminada Seguras	Respuesta inmune baja, necesitan adyuvantes para aumentar la potencia	Hepatitis A, rabia, tos ferina, tifoidea, influenza, polio, peste
Partículas purificadas (proteína, polisacárido)	Se purifica el antígeno y se administra	Segura y eficiente	Identificación del antígeno. Altos costos de producción	Difteria, tetanos, neumonía, influenza, tos ferina
Proteínas recombinantes	Se identifica el antígeno, se clona y produce	Respuesta de anticuerpos potente. Efectivas y seguras	Identificación del antígeno. Cuerpos de inclusión. No inducen CTL	Hepatitis B, ántrax
Partículas virales (VLP)	Se expresan las proteínas recombinantes de la capsida viral	Producción de varias copias del antígeno, fuerte respuesta inmune.	En etapa de investigación	Malaria (candidato), Rotavirus
Vacunas de DNA	Se administra el DNA del antígeno y se expresa en células del hospedero	Fuerte respuesta inmune, seguras, estables a temperatura ambiente y al administrar Bajo costo de producción, no hay riesgo de infección	Buen efecto en pequeños animales, puede presentarse inflamación crónica, sólo para proteínas	Virus del oeste del Nilo (caballos), Virus de necrosis hematopoyética (salmones)

Liu 2003; Ulmer y col. 2006; Dumonteil 2007; Ghanem y col. 2013

1.2 Vacunas de DNA plasmídico

Las tecnologías de DNA recombinante como clonación y manipulación de genes incrementan la velocidad de investigación y producción de medicina génica y vacunas de DNA, al clonar diferentes genes que codifican para proteínas que se sospecha tienen potencial como antígenos en diversas enfermedades, por esto las vacunas de DNA son una gran alternativa en el caso de enfermedades emergentes como la influenza, incluso antes de que se vuelvan pandemia (Ulmer y col., 2006, Ghanem y col., 2013). Las vacunas de DNA plasmídico tienen aplicación como vacunas preventivas y terapéuticas contra virus (Robinson, 1993), bacterias (Hahn, 2006), parásitos (Dumonteil y col., 2000; Madriz y col., 2004; Aguilar-Be y col., 2005), y cáncer (Liu, 2005). A la fecha existen aproximadamente 847 estudios activos o completos registrados en el Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health) relacionados con vacunas de DNA (<https://clinicaltrials.gov>) y aproximadamente 365 estudios de terapia génica que utilizan pDNA (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>).

Existen diversas ventajas para el uso de vacunas de DNA plasmídico, como: 1) La simplicidad en el diseño, 2) no contienen organismos patógenos, 3) inducen una respuesta completa a nivel de células T y B, 4) la vía de administración es intramuscular o intradérmica, 5) se pueden incluir diversos plásmidos en una formulación contra diversas enfermedades o contra varias cepas de la misma enfermedad, 6) la producción en sistemas bacterianos como *E. coli* ha sido muy estudiada desde hace varios años, por lo tanto es muy conocida y relativamente fácil, por esto 7) los costos de producción son relativamente bajos al existir diversas alternativas comerciales, y por último 8) el plásmido purificado es estable a temperaturas altas, por lo que su transporte y distribución no requiere cadena fría (Prather y col., 2003).

Además, las vacunas de DNA pueden inducir una respuesta inmune completa a nivel de linfocitos T citotóxicos CD8+, a nivel de linfocitos T ayudador “helper” y a nivel de anticuerpos (Liu, 2003); sin embargo, algunos antígenos únicamente tienen respuesta parcial. Por ejemplo, el grupo de Wang (1998) formuló y evaluó una vacuna de DNA plasmídico en pacientes con malaria, la cual indujo una respuesta a nivel de linfocitos citotóxicos; sin embargo, no se detectó respuesta a nivel de anticuerpos. En otros estudios se diseñó y formuló una vacuna de DNA plasmídico contra la hepatitis B en la cual el DNA fue recubierto con partículas de oro (DNA-coated gold beads), y se obtuvo una respuesta inmune completa, es decir, a nivel de anticuerpos y linfocitos citotóxicos (Prazeres y col., 1999; Wolff y col., 1990).

La mayor desventaja de las vacunas de DNA es que las células que reciben el DNA y producen la proteína son las células del músculo (Figura 1) y en condiciones normales estas células no están envueltas en la generación de la respuesta inmune ya que no son presentadoras de antígeno y tienen déficit en moléculas que co-estimulan la presentación del antígeno. Por lo tanto no se puede predecir si el uso de DNA plasmídico será efectivo para generar la respuesta deseada (Liu, 2003). Otra desventaja es que se requiere gran cantidad de DNA plasmídico superenrollado por cada dosis administrada (varios microgramos en animales y miligramos en humanos), que debe tener un alto grado de pureza y cumplir con normas estrictas establecidas por la FDA, (www.fda.gov/cber/gdlns/plasmid.pdf, 1996; www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf, 1998). Por lo que es necesario desarrollar procesos de producción de DNA plasmídico reproducibles y económicamente factibles (Montesinos-Cisneros y col., 2006).

Las vacunas de DNA pueden producirse en sistemas virales o plásmidos y consisten de un fragmento de DNA que codifica para un antígeno que se traducirá en una proteína en las células de mamífero. Para la producción de las vacunas de DNA plasmídico, se requiere que el vector de clonación tenga un origen de replicación, el cual puede ser inducido por temperatura, tiene un promotor fuerte para iniciar la traducción del DNA, una secuencia terminadora para la transcripción y con esto, expresar el antígeno en células de mamífero (Figura 1). Los vectores de clonación también cuentan con secuencias extra que les ayudan a expresar las proteínas en células de mamífero, por ejemplo, algunos investigadores han demostrado que la inclusión de secuencias consenso Kozak mejora la expresión inicial de vacunas de DNA (Huang y col., 2008) u otros potenciadores como secuencias poli A o promotores tipo CMV (citomegalovirus humano) mejoran el nivel de expresión de vacunas de DNA (Garmory y col., 2003).

Además, los vectores cuentan con un marcador de selección contra antibióticos para producir la vacuna en bacterias y favorecer el crecimiento únicamente de las células que lo contienen (Figura 1). Por razones de seguridad, el uso de genes de resistencia contra β -lactamasas, por ejemplo ampicilina, está prohibido para uso humano y se prefiere el uso de genes de resistencia contra aminoglicósidos como neomicina y kanamicina. Existen estudios para eliminar los antibióticos como marcadores de selección y hacer más seguras a las vacunas de DNA plasmídico, ya que su uso a gran escala impacta el costo del proceso (Prather y col. 2003).

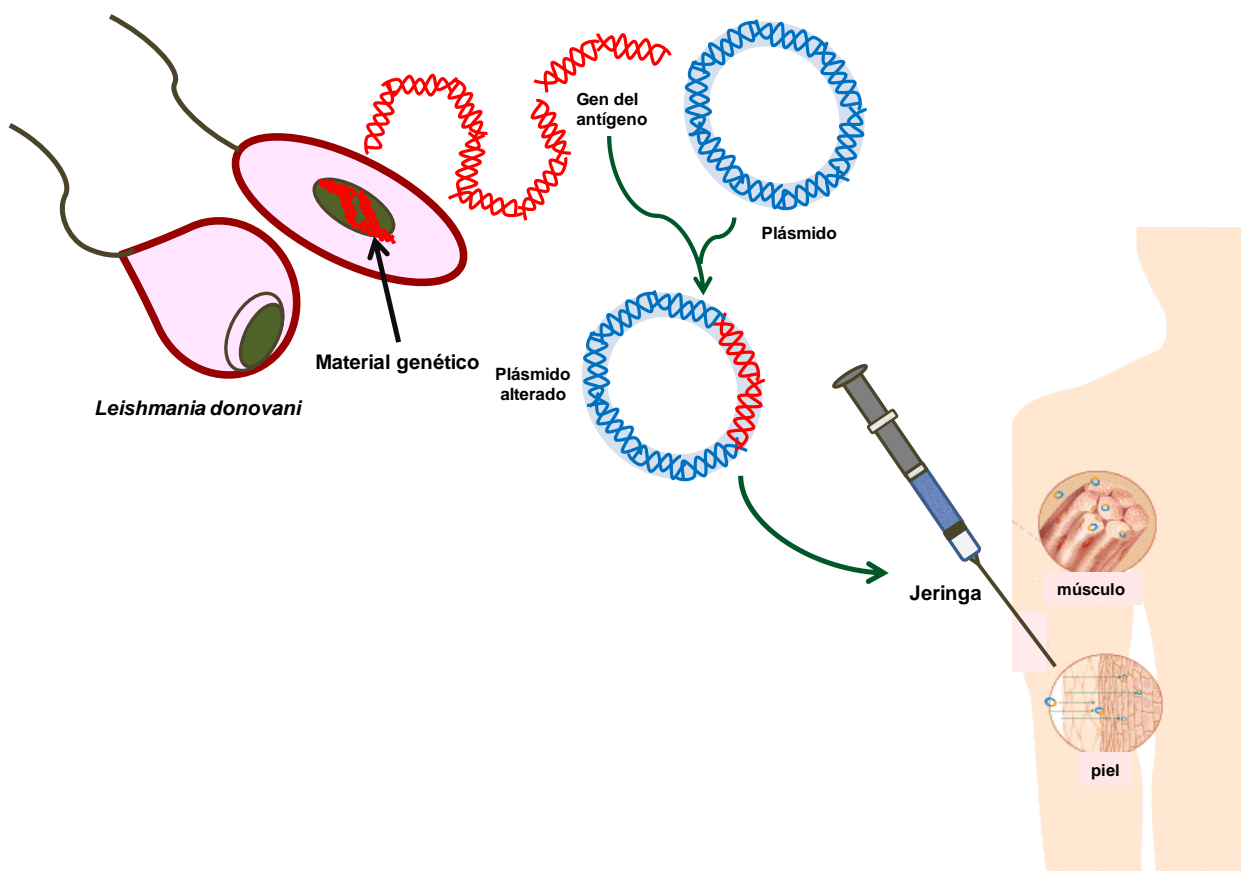


Figura 1. Inyección del DNA plasmídico utilizado como vacuna.

1.3 Producción de vacunas de DNA plasmídico

1.3.1 Etapas de la producción de pDNA

La producción de DNA plasmídico consta de las etapas “Upstream” y “Downstream”. La etapa “Upstream” considera la elección del vector de expresión, el sistema en el cual se producirá el plásmido, la preparación del inóculo, la elección, preparación del medio de cultivo, tipo de fermentación, las condiciones y el tiempo de cultivo. Por otro lado la etapa “Downstream” considera la recuperación de la masa celular y la lisis celular, hasta los diferentes pasos para la purificación del sc-pDNA (Figura 2).

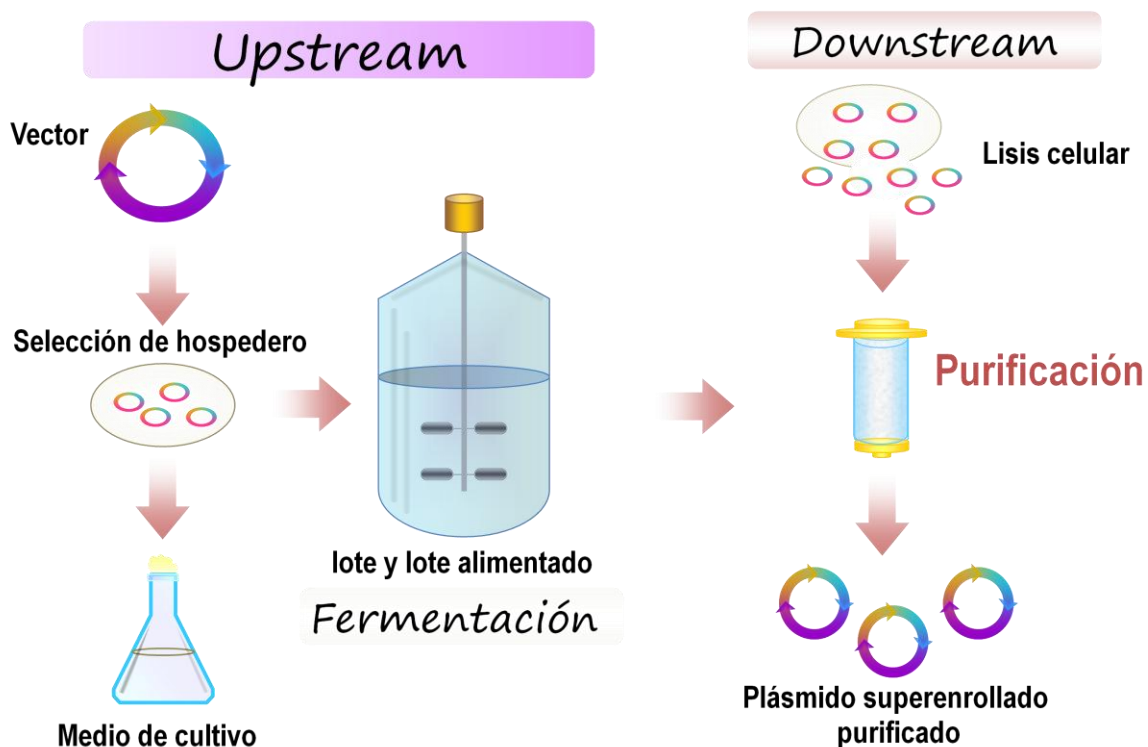


Figura 2. Pasos en la producción de DNA plasmídico (Modificado de Ferreira y col., 2000).

1.3.2 Vectores

Para la producción de DNA plasmídico se han utilizado vectores con origen de replicación tipo ColE1 y sus derivados, éstos han sido muy estudiados desde hace más de 30 años y son compatibles con *Escherichia coli*. Se sabe que estos vectores cuentan con dos transcritos, conocidos como RNA I y RNA II. El transcrito RNA II se utiliza como un pre-iniciador para la replicación de DNA, éste se une al DNA plasmídico complementario y forman un híbrido que es procesado por una RNAasa H y una DNA polimerasa I proveniente del hospedero continua con la replicación. El transcrito RNA I codifica para una cadena antisentido complementaria de una pequeña región de RNA II, el híbrido RNA I-RNA II previene la formación de un híbrido estable DNA-RNA II el cual es necesario para la formación del iniciador activo. La interacción entre RNA I y RNA II es mediada por una proteína codificada por el plásmido llamada Rop o Rom (Represor of primer y RNA one modulator) (Lin-Chao y col., 1992; Jung y col., 1996; Prather y col., 2003). Existen dos plásmidos derivados de ColE1, el plásmido pBR322 que produce un bajo número de copias y pUC18 que produce un alto número de copias del plásmido. Los plásmidos del tipo pUC contienen una mutación en RNA II y se ha suprimido la proteína Rom/Rop favoreciendo el inicio de la replicación. Con este mecanismo se incrementa el número de copias del plásmido al perder el control de la replicación (Lin -Chao y col., 1992). Algunos autores han hecho modificaciones para aumentar el número de copias, Wong en 1982 mutó el transcrito RNA II del origen de replicación tipo ColE1 e incrementó la producción de DNA plasmídico al aumentar la temperatura de 30 a 42°C; Lin-Chao en 1992 suprimió la proteína Rom/Rop de plásmidos del tipo pBR322 y el número de copias de DNA plasmídico aumentó 1.5 veces, también mutó puntualmente RNAII cambiando una G por A y aumentó el número de copias 1.5 veces, al suprimir y mutar el pBR322 el número de copias aumentó tres veces.

1.3.3 Bacterias

Las vacunas de DNA plasmídico se pueden producir en bacterias, siendo *E. coli* la más utilizada debido a que se tiene amplia información en cuanto a sus requerimientos energéticos, composición, metabolismo y tiene altas tasas de crecimiento en medios de bajo costo. La selección de la cepa para la producción de sc-pDNA es de gran importancia porque influye directamente en la calidad y rendimiento del plásmido, pero no es suficiente el genotipo de la cepa para predecir la productividad y calidad del plásmido (Yee Yau y col., 2008). Existe en el mercado un número variado de cepas de *E. coli* como DH5 y XL1 Blue o derivadas, que tienen mutaciones en genes clave, por ejemplo: 1) *endA* para prevenir la degradación del plásmido después de la lisis, 2) *recA* que causa una deficiencia en la recombinación para asegurar la estabilidad del inserto y 3) *relA* que permite aumentar la producción del plásmido al tener una respuesta relajada a la falta de alimento (Carnes, 2005). Algunas cepas que no tienen la mutación *endA1* pueden producir altos porcentajes de sc-pDNA, por ejemplo HB101 y C600 producen 100 y 99% de sc-pDNA inclusive para plásmidos de 20 kb, mientras que cepas con la mutación *endA* como TURBO, TOP10, JM107 y DH1 dan un superenrollamiento entre 65 - 81 % (Yee - Yau y col., 2008).

1.3.4 Composición del medio

Para obtener una producción de plásmidos con altos rendimientos y de buena calidad, se recomiendan medios definidos y cultivos en lote alimentado con diferentes estrategias de alimentación (Listner y col., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que los medios semidefinidos también promueven altos rendimientos de plásmido, especialmente en fermentaciones en lote alimentado (Carnes, 2008). Hay diversos estudios de optimización

de los medios de cultivo para la producción de proteínas recombinantes y más recientemente, comenzó la optimización de medios de cultivo para la producción de plásmidos. La producción de plásmidos se enfoca a la replicación del DNA, mientras que la producción de proteínas implica la transcripción y traducción. En la formulación de los medios de cultivo para producción de plásmidos se considera: 1) efecto de los componentes en el rendimiento y/o calidad del plásmido, 2) rendimiento de la biomasa, 3) consistencia de lote a lote, 4) interferencia potencial en la purificación, y 5) aspectos regulatorios. El diseño de medios balanceados se basa en los requerimientos energéticos de la bacteria como metales que actúan como coenzimas y la composición elemental de la bacteria, algunos de estos se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición elemental de la bacteria

Elemento	Peso seco (%)
Carbono	50 - 53
Hidrogeno	7
Nitrógeno	12 - 15
Fosforo	2 - 3
Azufre	0.2 – 1.0
Potasio	1.0 – 4.5
Sodio	0.5 – 1.0
Calcio	0.01 – 1.10
Magnesio	0.1 – 0.5
Cloruros	0.5
Hierro	0.02 – 0.20

Tomada de Carnes, 2005.

Entre los medios más utilizados en cultivos de *E. coli* están los **medios mínimos**, éstos constan de una fuente de carbono simple, nitrógeno como sales de amonio y otras sales; los **medios definidos** que constan de componentes definidos químicamente; los **medios semidefinidos** que están formulados con complejos como extractos de levadura, casaminoácidos, peptonas y componentes definidos como elementos químicos, por

ejemplo sales y minerales. Existe una fuerte correlación entre el rendimiento plasmídico y la velocidad de crecimiento celular, por lo que se buscan medios de cultivo que ayuden a incrementar rendimientos y disminuir las velocidades de crecimiento para maximizar la producción de pDNA (Ongkudon y col., 2011a). Los medios complejos tienden a reducir la velocidad de crecimiento específico asociada con la inestabilidad del plásmido, sin embargo, no estimulan la producción de pDNA (Shoham y col., 1990, Fleming y col., 1994). Un medio definido promueve la síntesis de DNA plasmídico y también brinda estabilidad mayor al 63% comparado con un medio complejo (Prather y col., 2003).

Existen diversos reportes sobre optimización de medios de cultivo para la producción de plásmidos en bioreactores, por ejemplo Carnes y su grupo reportaron rendimientos de 230 mg/L (en fermentaciones por lote) y 1500 mg/L (en fermentaciones por lote alimentado), utilizando los medios de cultivo NTC3018 y NTC3019, respectivamente, optimizados en nutrientes y elementos traza, adicionalmente, la estrategia de producción incluyó incrementar la temperatura de 30 - 37, 30 – 42°C, 30 – 45°C (Carnes 2005; Carnes y col., 2006).

Se ha visto que los medios definidos y semidefinidos favorecen la producción del plásmido por célula, además disminuyen la velocidad de segregación por lo que hay menos células sin plásmido (Fleming y col., 1994; Kennedy y Patching, 1997); sin embargo, las velocidades de crecimiento son altas y están asociadas con la producción de acetato (Carnes, 2005). El acetato es generado por la sobrecarga del metabolismo y su formación es debida a un desbalance del consumo de sustrato, sobre todo al utilizar glucosa como fuente de carbono y la utilización de componentes necesarios para la síntesis de proteínas (Duttweiler y Gross, 1998). Para resolver este inconveniente se

pueden utilizar otras fuentes de carbono como glicerol, el cual no inhibe el crecimiento y puede reducir la velocidad de crecimiento específico. Preferentemente los componentes del medio de cultivo deben ser certificados como productos libres de contaminantes animales, por lo que existen componentes sustitutos derivados de vegetales, como glicerol vegetal y peptona de soya (Carnes, 2005).

La adición de sales y minerales como magnesio, fósforo, potasio y azufre son necesarias para el crecimiento de la bacteria, el metabolismo en general y ayudan como cofactores en las reacciones enzimáticas. Un ejemplo de la influencia de estos componentes es el estudio que realizaron Schmidt y colaboradores (2003), quienes observaron que altas concentraciones de sales de magnesio (alrededor 80 mM) favorecían la producción homogénea de monómeros de plásmidos superenrollados. Otros minerales esenciales para las reacciones enzimáticas son calcio, cobre, cobalto, hierro, manganeso, molibdeno y zinc, estos generalmente se encuentran en trazas dentro de las formulaciones de medios.

Además, la composición del medio de cultivo afecta drásticamente la calidad y el rendimiento en la producción de superenrollamiento del pDNA. Existen algunos reportes que se enfocan en la adición de nutrientes y optimización de los mismos en matraces para incrementar los rendimientos específicos o la generación de biomasa; por ejemplo, Filomena y colaboradores probaron diferentes fuentes de carbono en la producción de plásmidos y encontraron que los medios de cultivo formulados con triptona incrementaron los rendimientos específicos hasta 20.43 mg/g (Filomena y col., 2009). Por otro lado Duttweiler y Gross (1998) reportaron rendimientos volumétricos de 12.6 y 48 mg/L en *E.*

coli DH5 α producidos en matraces, utilizando un medio fuertemente amortiguado formulado con RNA y RNasa A, glucosa, extracto de levadura y casaminoácidos.

Mientras que O'Kennedy y col. (2000) utilizaron un medio semi-definido nombrado como SDCAS que fue formulado con casaminoácidos y reportaron un incremento de biomasa de 0.13 a 2.5 g/L y 50% de rendimientos específicos con respecto al medio LB, el medio más utilizado en los protocolos estándar de laboratorio. Otro medio semidefinido formulado con casaminoácidos y nombrado como ZMY505, logró incrementar densidades celulares y obtener $OD_{600} = 10$ (Studier, 2005). Finalmente, al formular con suplementos como aminoácidos y nucleósidos, aunque se elevan los costos, puede incrementar la producción de plásmidos, este medio fue nombrado como M1 y reportaron rendimientos volumétricos hasta de 60 mg/L y al formular sin nucleósidos (medio M2) se obtuvieron rendimientos volumétricos únicamente de 30 mg/L (Wang y col., 2001). Considerando el impacto económico del medio M1, éste se reformuló y se propuso el medio PDMR al reemplazar los aminoácidos puros y nucleósidos con extracto de levadura y triptona, Danquah y col. produjeron el plásmido pUC19 y obtuvieron 23.8 mg/L, y al producir el mismo plásmido comparado con los medios TB y LB, se obtuvo únicamente 11.4 mg/L y 2.8 mg/L, respectivamente (Danquah y col., 2007).

1.3.5 Inducción de la producción de plásmidos por cambio de temperatura

Existen tres estrategias para inducir y con esto aumentar la producción de DNA plasmídico: 1) estimular la producción de pDNA mediante choque térmico, es decir incrementando la temperatura (Lahijani y col., 1996), 2) adicionar antibióticos como cloranfenicol (Reinikainen y col., 1989) o 3) favorecer las condiciones de hambre de la bacteria, esto es limitando el consumo de aminoácidos (Hofmann y col., 1990).

La inducción de la producción de pDNA por choque térmico se logra al perder el control de la replicación y con esto se incrementa el número de copias, esto para plásmidos que han sido manipulados al suprimir la proteína rom/rop o con una mutación puntual en el primer RNA II lo cual impacta en la afinidad de unión del complejo RNA I: RNA II, y esto afecta el número de copias del plásmido de manera dependiente a la temperatura del cultivo (Lin-Chao y col., 1992). Algunos vectores tipo pUC tienen esta mutación lo cual incrementa el número de copias al cambiar la temperatura a 42°C (Yanisch – Perron y col., 1985), esto no se observa al mantener la temperatura de crecimiento a 30°C (Lahijani col., 1996).

Típicamente los cultivos en matraces producen de 1 a 5 mg/L de pDNA, mientras que un fermentador controlado puede producir de 10 a 250 mg/L (Lahijani y col., 1996), pero al inducir la producción de pDNA al incrementar la temperatura de 30 a 37, 30 a 42°C o 30 a 45°C en fermentaciones con alimentación lineal o exponencial se han reportado rendimientos de 620 a 1500 mg/L (Carnes y col., 2006).

Además, la producción del plásmido pVAX1-LacZ, el cual cuenta con un origen de replicación tipo pUC, en *E. coli* DH5 α a diferentes temperaturas de cultivo 30, 32, 37 y 40°C, mostró los mayores rendimientos específicos de 4.60 y 5.56 mg/g a 37 y 40°C y pureza de 35.68 y 45.72 % a nivel de matraces (Filomena y col., 2009).

Existe una diferencia marcada en los rendimientos volumétricos en cultivos en matraces y en bioreactores, por ejemplo Ongkudon y su grupo produjeron el plásmido pcDNA3F e incrementaron el rendimiento volumétrico a 13.65 mg/L en cultivos en matraces con el

medio PDM a 37°C, mientras que al incrementar la temperatura del cultivo de 35 a 45°C por 5 h el rendimiento se incrementó a 23.4 mg/L, 1.75 veces (Ongkudon y col., 2011b). Por otro lado en cultivos con lote alimentado con condiciones de cultivo optimizadas, los rendimientos del plásmido pcDNA3F fueron muy superiores hasta 110 mg/L y 14 mg/g, volumétrico y específico respectivamente (Ongkudon y col., 2011b).

Por último, en 2013 se estudió el cambio de temperatura de cultivo de 37 a 42°C en la fase exponencial en cultivos de matraces y se obtuvieron incrementos de dos veces en los rendimientos específicos y volumétricos con respecto a la producción estándar a 37°C, hasta 65 mg/L con superenrollamiento de 80% (Sánchez-Casco y col., 2013). A pesar de esto, todavía existen pocos reportes sobre la inducción de la producción de pDNA en matraces y son necesarios para establecer nuevos protocolos de laboratorio para la producción de plásmidos.

1.3.6 Etapa “Downstream” o de purificación

Existen tres tipos de lisis bacteriana: química, mecánica y térmica. A nivel laboratorio se utiliza la lisis química reportada desde hace más de 30 años (Bimboim y Doly, 1979), las últimas dos son menos utilizadas porque no son tan eficientes, a nivel industrial las células son recuperadas por centrifugación y resuspendidas en un amortiguador (buffer) para la posterior lisis esto se lleva a cabo en reactores agitados (Shamlou, 2003). Uno de los problemas durante el rompimiento mecánico es la fuerza de cizalla utilizada durante la lisis; porque se generan fragmentos de DNA plasmídico y cromosómico complicando el proceso de purificación.

Para la purificación de DNA plasmídico a nivel industrial el lisado se clarifica por centrifugación, y los contaminantes residuales como chDNA, RNA e incluso algunas proteínas se pueden precipitar con sulfato de amonio o dos precipitaciones con PEG 4% y 10%, seguido de una filtración, diafiltración o ultrafiltración (con diámetro molecular (NMMCO) de 100 kDa). Comercialmente existe una gran variedad de membranas disponibles, de acetato de celulosa, polisulfona, polietersulfona y PVDF. A pesar de todo el conocimiento generado para la producción de sc-pDNA actualmente existen huecos o cuellos de botella por lo que hay considerables pérdidas en la lisis y en la purificación (Leitner y col., 2000). Para tener un proceso de producción de sc-pDNA económicamente factible es importante generar procesos de producción con altos rendimientos no sólo para poder pasar a etapas clínicas sino también para disminuir los costos de producción (Ferreira y col., 2000).

1.3.7 Técnicas cromatográficas de purificación de pDNA

Cromatografía de exclusión molecular (SEC). En esta cromatografía se fracciona y purifica el plásmido de acuerdo a su tamaño molecular y puede utilizarse sola o secuencialmente con otro método cromatográfico, como intercambio aniónico. Es ideal para refinar la purificación permitiendo la remoción de contaminantes residuales con el intercambio simultáneo de amortiguador (buffer) para una adecuada formulación o un amortiguador (buffer) de almacenamiento. SEC tiene algunos inconvenientes como su capacidad limitada y selectiva del pDNA.

Cromatografía de intercambio iónico. La separación del pDNA está basada en la interacción entre la carga negativa de los grupos fosfato de la cadena de pDNA y los grupos de carga positiva de la fase estacionaria. A pesar de la similitud las cargas totales

y el peso molecular de las diferentes topologías, las diferentes isoformas poseen diferentes conformaciones y en consecuencia diferentes densidades de carga local. Por lo tanto las isoformas tendrán diferentes tiempos de retención al incrementar el gradiente de sal, así el sc-pDNA tiene mayor densidad de carga que la forma abierta circular la cual está menos enrollada.

Cromatografía de fase reversa (RPC), de interacción hidrofóbica y de par iónico (IR-HPLC). En este tipo de cromatografías se explota la interacción de las regiones hidrofóbicas de las moléculas destino y de los ligandos inmovilizados no polares en la resina, en HPLC de fase reversa. Los solventes orgánicos son requeridos para la elución de moléculas unidas. Esto último se lleva a cabo al agregar eluyentes con modificantes orgánicos a la columna, los componentes van eluyendo de acuerdo al decremento de la polaridad o incrementando la hidrofobicidad. Si las moléculas destino son polares (ejemplo los ácidos nucleicos), se agregan iones orgánicos anfifílicos a los amortiguadores para crear el par iónico con las moléculas destino (ejemplo plásmidos) formando un par iónico no polar hidrofóbico que puede ser retenido por adsorbentes de fase reversa. La fase reversa y la cromatografía iónica se han utilizado para purificar sc-pDNA y usarlos como vacunas (Ghanem y col., 2013).

Cromatografía de afinidad. Ésta usa los procesos biológicos naturales como el reconocimiento molecular para la purificación selectiva de biomoléculas en base a su función biológica o estructura química. A pesar de que los métodos de afinidad tienen el poder de eliminar pasos adicionales de purificación, incrementando rendimientos y mejorando la economía del proceso, tienen limitaciones en los orígenes biológicos de los ligandos, ya que suelen ser frágiles y tienen baja capacidad de unión, por tal motivo, se

han desarrollado ligandos sintéticos para combinar la selectividad con los ligandos naturales de alta capacidad, durabilidad y costo. Algunos ejemplos de cromatografía de afinidad son afinidad a metales, a triple hélice, DNA-proteína y DNA-aminoácido (Ghanem y col., 2013).

1.4 Control de calidad en las vacunas de DNA plasmídico grado farmacéutico

Entre las principales pruebas para control de proceso y análisis de producto final en la producción de sc-pDNA, de acuerdo a la FDA (1996 www.fda.gov/cber/gdlns/plasmid.pdf, 1998 www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf, Przybylowki 2007), están:

Pureza, consiste en el análisis del contenido de DNA y RNA con la relación A_{260}/A_{280} , la homogeneidad de tamaño y su estructura mediante electroforesis en geles de agarosa, así como detección de proteínas contaminantes utilizando geles teñidos con plata.

Identidad del vector y del inserto, para la identificación del vector un análisis con enzimas de restricción, para liberar el inserto o su amplificación por PCR.

Pruebas de esterilidad, para determinar la presencia de agentes contaminantes como micoplasma y de virus en caso de existir riesgo de contaminación.

Potencia, se trasfectan células de mamífero para caracterizar la sensibilidad y especificidad de la actividad biológica.

Seguridad, se debe determinar la concentración de contaminantes como RNA, proteínas, DNA cromosómico, solventes utilizados en la extracción y purificación.

1.5 Vacunas de DNA en México

Desde hace algunos años diversos grupos de investigación en México, se han enfocado en el estudio de posibles antígenos contra diferentes enfermedades causadas por parásitos, debido a que éstas afectan principalmente a los pobres o los tratamientos tienen diversos efectos secundarios, estos antígenos se han obtenido como proteínas recombinantes y más recientemente como plásmidos, para inyectarlos como posibles vacunas de DNA y así utilizarlas como tratamiento preventivo o terapéutico.

Por ejemplo, para el tratamiento de amibiasis, Madriz y col. (2004) enfocaron sus esfuerzos en la administración de los plásmidos EhCP112 y EhAD112 de *Entamoeba histolytica*, utilizando un modelo murino y determinaron el efecto inmunológico, los plásmidos por separado generaron anticuerpos, mientras que al combinarlos observaron un efecto inmunoprotector completo, por lo que son candidatos a vacunas de DNA preferentemente combinando los dos plásmidos (Tabla 3).

Mientras que para el tratamiento de la enfermedad de Chagas el plásmido Tc52 redujo la parasitemia, mientras que los plásmidos Tc24 y TSA1 mostraron un efecto inmunoterapéutico e inmunoprotector contra diferentes cepas de *Trypanosoma*; esto se probó tanto en ratones (Dumonteil y col., 2004, Sánchez-Burgos y col., 2007) como en perros (Quijano-Hernández y col., 2013). Por lo tanto, son excelentes candidatos como vacunas de DNA para diferentes animales (Tabla 3).

También se han estudiado diferentes plásmidos contra la leishmaniasis, que es una enfermedad infecciosa que puede ser incapacitante y mortal, además el número de casos aumenta cada año en nuestro país (Tabla 3).

Tabla 3. Vacunas de DNA estudiadas en México.

Enfermedad	Parásito	Antígeno	Respuesta	Referencia
Amibiasis	<i>Entamoeba histolytica</i>	EhCP112	Anticuerpos	Madriz y col. 2004
		EhADH112	Mayor cantidad de anticuerpos	
		EhCP112 - EhADH112	Mayor cantidad de anticuerpos en menor tiempo, Inmunoprotección	
Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	TS, ASP-2-like	--	Sanchez-Burgos y col. 2007
		Tc52	Reduce paritemia	
		Tc24, TSA-1	Efecto Inmunoterapéutico potente	Dumonteil y col. 2004
		Tc24, TSA-1	Efecto inmunoprotector e inmunoterapéutico	
Leishmaniasis Cutanea y visceral	<i>L. mexicana</i>	VR1012-GP46	Anticuerpos Inmunoprotección parcial	Dumonteil y col. 2000
	<i>L. amazonensis</i>	VR1012-CPb	Anticuerpos Inmunoprotección parcial	
	<i>L. amazonensis</i>	VR1012-GP63	Anticuerpos Inmunoprotección parcial	
	<i>L. major</i>	VR1012-LACK	---	
	<i>L. major</i>	VR1012-NH36	Inmunoterapéutica e inmunoprotectora	Aguilar-Be y col. 2005

1.6 Vacunas de DNA contra leishmaniasis

La leishmaniasis es una infección causada por el parásito *Leishmania*, se presentan dos tipos: cutánea y visceral, esta infección puede ser incapacitante o mortal. La leishmaniasis es una enfermedad tropical olvidada, que afecta cerca de 12 millones de personas pobres en países en vías de desarrollo (Hotez, 2008). En México la leishmaniasis se presenta en zonas tropicales y el tratamiento actual incluye antiparasitarios de amplio espectro con efectos secundarios severos, por esto, las vacunas de DNA son una buena alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis. Con la reciente secuenciación del genoma de *Leishmania major* se han identificado nuevos antígenos candidatos, por lo que se estudiarán un gran número de plásmidos con posible actividad inmunológica (Herrera-Najera y col., 2009). Hasta el día de hoy se han estudiado alrededor de 20 plásmidos candidatos a vacunas contra Leishmaniasis utilizando modelos murinos (Dumonteil, 2007) y cuatro de estos se han probado en perros (Kumar y col., 2004). Sin embargo, estos investigadores han probado una serie de plásmidos para poder descartar los que no tienen actividad, por otro lado algunas formulaciones incluyen combinaciones de plásmidos contra varias especies de *Leishmania*, por lo que se requieren varios miligramos de plásmido para probarlos (Dumonteil, 2007).

Entre los primeros plásmidos estudiados por el grupo de Dumonteil con actividad prometedora contra leishmaniasis se encuentran VR1012-GP46, VR1012-CPb y VR1012-GP63 (Tabla 3), estos se probaron en ratones e indujeron una respuesta inmunoprotectora parcial pero únicamente a nivel de anticuerpos contra la leishmaniasis causada por las cepas *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Dumonteil y col., 2000).

Posteriormente en el 2002, Santana logró aislar del complejo FML (ligando mucosa - manosa) del parásito *Leishmania donovani*, la glicoproteína GP36 de aproximadamente 36 kDa tiene actividad de nucleósil hidrolasa. El gen codificante de GP36 fue clonado en un vector para obtener la proteína recombinante como una proteína de fusión unida a maltosa y se produjo en *Escherichia coli*. La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad y demostró ser un potente agente diagnóstico en perros sintomáticos y asintomáticos, además de mostrar una respuesta fuerte en anticuerpos. Por lo que este antígeno es un excelente candidato como vacuna de DNA, ya que no se encuentra en humanos o en perros, únicamente en el parásito (Santana y col., 2002).

El principal componente inmunológico del complejo FML y de la proteína GP36 es el fragmento NH36. El DNA codificante de este fragmento se clonó en el vector VR1012 y se obtuvo la vacuna VR1012-NH36; ésta probó ser inmunoterapéutica e inmunoprotectora en ratones de laboratorio contra diferentes cepas de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. mexicana* (Aguilar-Be y col., 2005). Por lo anterior, este antígeno tiene un gran potencial para usarse en el tratamiento y prevención de la Leishmaniasis (Figura 3).

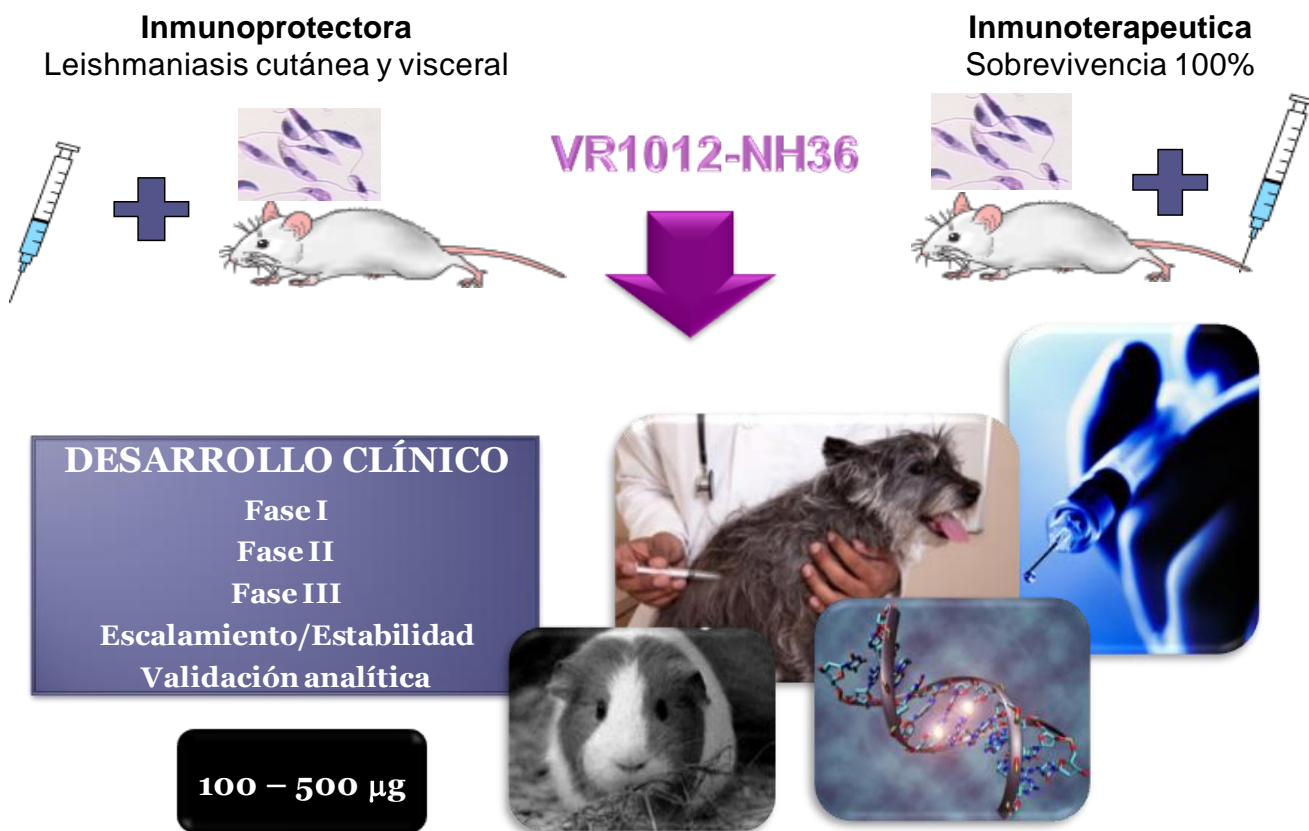


Figura 3. Desarrollo de la vacuna de DNA: VR1012-NH36

Para poder estudiar la vacuna VR1012-NH36 es necesario obtener varios miligramos de plásmido, además se desea probar otra construcción de NH36 clonada en el vector pVAX1 para determinar el efecto del tamaño del plásmido en la actividad inmunoterapéutica. En cuanto a la producción de VR1012-NH36, se han utilizado tanto matraces como fermentadores de 2 L y los medios TB y 2TY, en fermentador únicamente se obtuvieron 8 mg de pDNA/L (Rodríguez y col., 2005), este rendimiento está muy por debajo de lo reportado para la producción de plásmidos en bioreactores, en los cuales se han alcanzando rendimientos volumétricos de 2 a 2.6 g/L en fermentaciones por lote alimentado (Phue y col. 2008; Carnes y col. 2011). Sin embargo, esta escala de producción de pDNA no es recomendable al inicio del desarrollo de una vacuna cuando se deben probar muchos antígenos o sólo se necesitan obtener algunos miligramos para su utilización en pruebas preclínicas. Debido al gran potencial de las vacunas de DNA es necesario incrementar los rendimientos de DNA plasmídico superenrollado en cultivos en matraces para facilitar el desarrollo de vacunas de DNA plasmídico.

Con el objetivo de incrementar los rendimientos en la producción de las vacunas de DNA VR1012-NH36 y pVAX-NH36 en matraces, en el presente proyecto se propone explorar diferentes condiciones de cultivos en matraces y optimización de medios de cultivo, para incrementar los rendimientos específicos y volumétricos finales.

2. Justificación y Objetivos

2.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a la enorme oportunidad que ofrecen las vacunas de DNA plasmídico es necesario proponer protocolos de producción y purificación de sc-pDNA en cultivos en matraces, para obtener plásmidos candidatos a vacunas con la calidad requerida y en cantidades suficientes para su estudio en las etapas iniciales de desarrollo.

2.2 HIPÓTESIS

El aumento del número de copias relativo del plásmido con estrategias de cultivo y la optimización del medio de cultivo ayudarán a incrementar la producción de DNA plasmídico en matraces para vacunas de pDNA.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Aumentar la producción de DNA plasmídico superenrollado en un cultivo en matraces utilizando como modelo una vacuna de DNA contra leishmaniasis basada en el antígeno NH36.

2.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

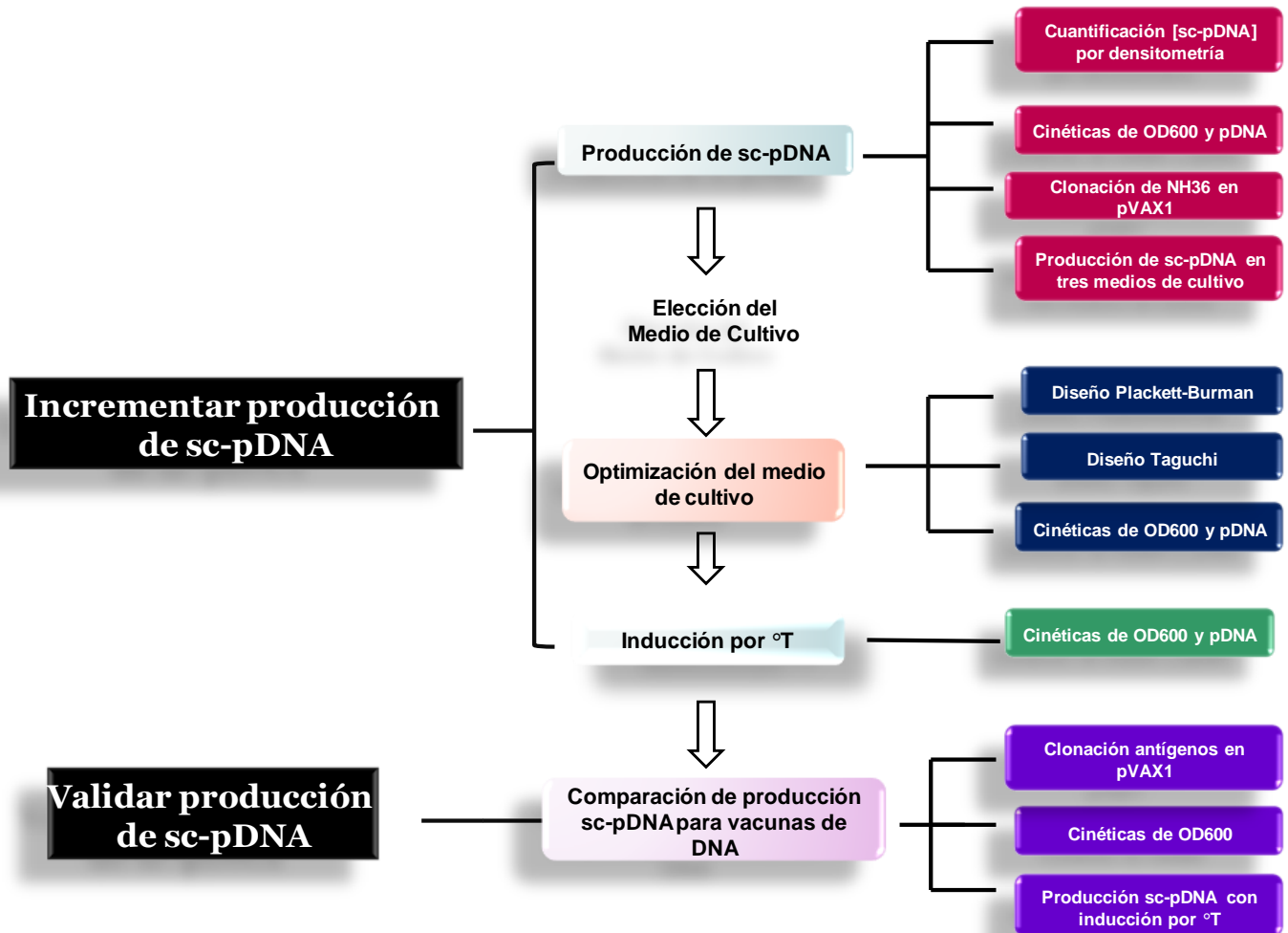
- 1) Aumentar la producción de sc-pDNA
 - a. Establecer condiciones para la producción de DNA plasmídico superenrollado en matraces utilizando los plásmidos VR1012-NH36 y pVAX-NH36.
 - b. Elegir un medio de cultivo y optimizarlo para aumentar los rendimientos de sc-pDNA a nivel de matraz.
 - c. Estudiar el efecto de inducción por temperatura en el aumento del número de copias relativas.
 - d. Purificar el sc-pDNA por métodos cromatográficos.

- 2) Validar la producción de vacunas de DNA
 - a. Clonar otros antígenos candidatos a vacunas de DNA en el vector pVAX1.
 - b. Comparar los rendimientos de sc-pDNA de las nuevas construcciones, utilizando el medio optimizado y la inducción por temperatura.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Materiales

El extracto de levadura fue adquirido de Difco (NJ, USA), la kanamicina y el bromuro de etidio son de Sigma-Aldrich (MO, USA), y el reactivo dsDNA PicoGreen de Molecular Probes Inc. (USA). El resto de los reactivos y químicos utilizados en este estudio fueron de grado analítico (Sigma-Aldrich or JT Baker, USA).

3.2.2 Extracción de DNA plasmídico

E. coli DH5 α [*F- Φ 80 dlacZ Δ M15 (lacZYA –argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) pho A supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*] transformadas con los diferentes plásmidos de interés, se crecieron en cultivos adicionados con 50 μ g/mL de kanamicina a 37°C y velocidad de agitación de 100 o 200 rpm en una incubadora con agitación orbital (MRC, USA), hasta llegar a OD₆₀₀ deseada (de 0.55 a 1.0), se tomaron muestras de los cultivos (1 mL) en tubos para microcentrífuga, se centrifugaron a 12,000 g, 5 min 4°C, para separar el paquete celular. El DNA plasmídico (pDNA) se extrajo por lisis alcalina (Sambrook y col., 2001). El pDNA se resuspendió en agua y se analizó por densitometría y fluorescencia.

3.2.3 Purificación de plásmidos con kit QIAGEN

Para poder realizar las clonaciones en el vector pVAX1; el pDNA, productos de PCR o bandas de geles de agarosa se purificaron usando kit QIAprep Miniprep (QIAGEN, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.4 Clonación de fragmentos de genes en el vector pVAX1

En este trabajo se utilizaron los plásmidos VR1012-NH36 (5850 pb) de un trabajo previo (Aguilar-Be y col. 2005) y pVAX-NH36 (3936 pb), éste se obtuvo al clonar el fragmento de DNA *nh36* de 936 pb que codifica para el antígeno NH36 de *L. donovani*, en el vector pVAX1 (Invitrogen), como describen Sambrook y colaboradores (2001). Para esto, *nh36*

fue amplificado por PCR utilizando VR1012-NH36 como molde usando los oligonucleótidos 5'-TGGCGCGGATCCGCCACCATGGCGCGCAAGATTATTCTC-3' y 5'-GGATGC TCTAGATTAT TGAGGATCGCCGATGC-3' que contienen los sitios de restricción para *Bam*HI and *Xba*I, respectivamente. Siguiendo protocolos establecidos (Sambrook y col., 2001). Se preparó la mezcla de reacción para 50µL: amortiguador (buffer) de amplificación para PCR 1x, MgCl₂ 1.5 mM, DNA molde 0.5 ng, oligonucleótidos 10 µM, dNTP's 0.1 mM y DNA polimerasa 0.01 U. Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s 95°C, 30 s a 55°C ó 58°C, 30 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. Las digestiones enzimáticas se realizaron con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, buffer 2 y BSA, por 20 h a 37°C (Manual Biolabs).

Los plásmidos pVAX-CP4, pVAX-PFO, pVAX-CP112 y pVAX-ADH se obtuvieron al amplificar por PCR los genes que codifican para *tvcp4* (Gen Bank Accesion No. AY679763; Solano-González y col., 2007), *pfoA* (Gen Bank Accesion No. AY652962; Moreno-Brito y col., 2005) *Ehcp112* y *ADHcp112* (Madriz y col., 2004), utilizando los moldes de DNA correspondientes, y los oligonucleótidos directo y reverso, conteniendo los sitios de restricción para *Bam*HI y *Xba*I (subrayados), respectivamente. ***tvcp4***: 5' TGGCGCGGATCCGCCACCATGGTTCAG CATGAG 3' y 5' GGCTAGTCTAGATTAC TTGCCTGTGGGATGCA 3'; ***pfoA***: 5' TGGCGCGGATCC_GCCACCAT GGAGGGCAA GAACTGG 3' y 5' GGCTAGTCTAGATTACTGTGTTT CGTGGA TCTTC 3'; ***Ehcp112***: 5' TGGCGCGGATCCGCCACCATGGCGTTTAATCTAG GAA 3' y 5' GGCTAG TCTAGA TTAGA TTGTATGATTGTAGAA 3'. ***ADHcp112***: 5' TGGCGCGGATCCGCCACC ATGGTC TACTCAACACTT 3' y 5' GGCTAGTCTAGATTA AAGAGATGGAAACATAGG 3' (Ver apéndice 2).

Para verificar los productos de digestión se corrieron geles de agarosa 0.8%. Después de la digestión del amplicón con las enzimas de restricción, los fragmentos de DNA fueron

ligados al plásmido pVAX1. Una vez corroborada la secuencia, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico, se sembró en cajas de Petri con antibiótico (kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las clonas candidatas se analizaron por digestión con enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I (New England Biolabs).

3.2.5 Producción de sc-pDNA en matraces

Para determinar la producción de pDNA en los diferentes medios formulados u optimizados se desarrollaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Primero se preparó un inóculo transfiriendo una colonia de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido de interés (VR1012-NH36, pVAX-NH36, pVAX-CP4, pVAX-PFO y pVAX-CP112) a un tubo con 5 mL de medio LB conteniendo kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó por 6 h a 200 rpm y 37°C. Luego se les adicionó 5% v/v (a $\text{OD}_{600} = 0.6$) del inóculo a matraces de 250 mL conteniendo 30 mL de medio seleccionado y kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se incubaron durante 12 ó 18 h. Se tomaron muestras cada 2 h para determinar el crecimiento y producción de plásmidos, y determinar la cinética de crecimiento.

Para la producción de plásmidos en medio T2 (medio optimizado en este trabajo), los experimentos se llevaron a cabo en cinco matraces incubados a 37°C y 200 rpm por 18 h en una incubadora con control de temperatura (MRC, USA). Para los experimentos con inducción por temperatura, las condiciones de los cultivos fueron similares a lo ya descrito, excepto que después de 6 h de incubación a 37°C ($\text{OD} = 7$, en la última fase de crecimiento exponencial) la temperatura se incrementó a 42°C y se mantuvo por 5 h. Dos matraces fueron utilizados para determinar el pH y el DO (oxígeno disuelto) durante la fermentación al adaptar electrodos para pH y DO. Los otros tres matraces restantes se usaron para determinar el peso celular, los rendimientos específico y volumétrico, el porcentaje de sc-pDNA, el consumo de la fuente de carbono y la producción de acetatos, en muestras de 1 mL tomadas cada 2 h.

El crecimiento celular fue determinado midiendo al medio la OD (optical density = densidad óptica) de cada muestra, y el peso fue estimado utilizando una curva estándar de OD₆₀₀ en relación al peso celular previamente obtenidos (Apéndice 4.1).

La máxima velocidad de crecimiento específico (μ) se estimó por la pendiente del logaritmo del peso celular seco en relación con tiempo de cultivo.

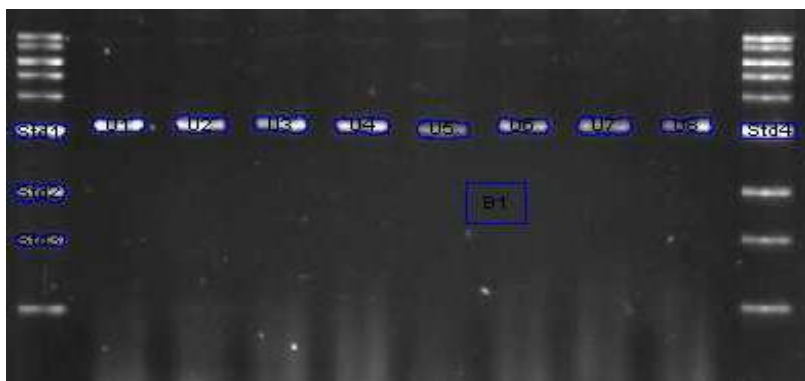
3.2.6 Determinación de pH y Oxígeno Disuelto

Dos matraces con medio de cultivo T2 (medio optimizado en este trabajo) e inoculados con bacterias transformadas con pVAX-NH36, fueron utilizados para determinar el pH y la DO (oxígeno disuelto) durante la fermentación, se adaptaron un electrodo de pH y un electrodo de DO (Mettler Toledo) a la tapa del matraz, previamente esterilizados y calibrados.

3.2.7 Análisis densitométrico

Para determinar la concentración de sc-pDNA y la pureza se utilizó un estándar de concentración conocida (1kb DNA ladder, New England Bio Labs), el estándar y las muestras se corrieron en geles de agarosa al 0.8% utilizando regulador TBE (45 mM Tris HCl pH = 8.0, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA pH = 8.0) por 120 min a 70 V. Con el programa Quantity One 4.6.5 se seleccionó la banda deseada y se determinaron los pixeles de la muestra y el estándar, para cada gel se obtuvo una curva midiendo tres bandas estándar.

El cálculo de la concentración de cada recuadro se realizó seleccionando un volumen o recuadro delimitado multiplicado por el área (mm²) y se sumaron las intensidades de los pixeles dentro del recuadro, también se tomó un blanco del fondo del gel el cual se restó a cada valor calculado. Para calcular la concentración se realizó una regresión lineal con las concentraciones de los estándares y en cada caso, se obtuvo una ecuación:



Name	Volume CNT*mm ²	Concentration ng/ul	Area mm ²	Density CNT/mm ²	# of pixels
Std1	3511.92	49.70	36.84	766.03	296
Std2	1958.88	19.08	34.47	456.59	277
Std3	1247.63	14.31	20.91	479.48	168
Std4	4614.69	49.70	42.44	873.74	341
U1	2556.50	30.44	29.50	696.45	237
U2	2790.84	31.87	34.10	657.63	274
U3	2530.36	27.05	33.85	600.63	272
B1	2696.50	N/A	114.25	189.65	918

El programa grafica concentración vs area, dando una ecuación como la siguiente:

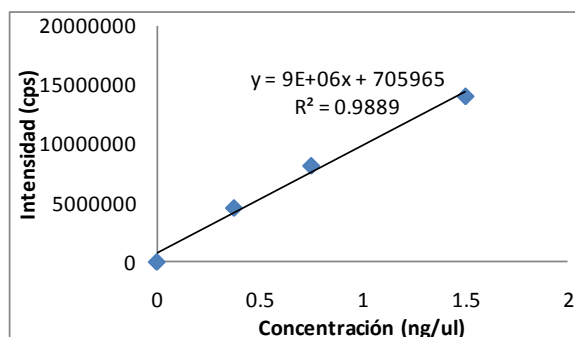
$$R\text{-Squared} = 0.955260, \text{ Conc} = 0.0165 * \text{Vol} + 6.52, \quad \text{conc} = m * \text{Vol. adj} - b$$

conc es la concentración de DNA en ng/μl, m es la pendiente, Vol. adj es el volumen ajustado en CNT*mm², b es la ordenada al origen de la gráfica en ng/μl

3.2.8 Cuantificación de DNA de doble cadena por fluorescencia.

Se determinó la concentración de DNA plasmídico total y superenrollado utilizando el fluróforo Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, USA). Primero se preparó una solución stock de dsDNA 2 μg/mL en TE 1x, y se determinó la concentración de DNA a una longitud de onda de 260 nm en una celda de 1 cm, posteriormente se realizaron diluciones para obtener una curva estándar de 0 – 1.5 ng/uL.

Plásmido STD (ng/ul)	Intensidad (cps)
0	59942
0.375	4600000
0.75	8150000
1.5	14000000



Las muestras de pDNA se diluyeron para obtener un volumen final de 1 mL en buffer TE y se mezclaron con 1 mL de reactivo PicoGreen (diluido 1:200 en TE) y se incubó 5 min a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron en un fluorómetro Fluoro Max-3 (Jobin Yvon Horiba), a las longitudes de onda de excitación 480 nm y emisión 520 nm (Manual Quant-iT Pico Green, Invitrogen).

3.2.9 Cuantificación de DNA por espectroscopia

Se diluyeron 2 μ L del DNA muestra en 1 mL de agua grado inyectable, las muestras se leyeron a 260 y 280 nm para determinar cantidad de DNA y pureza.

3.2.10 Diseño experimental Plackett-Burman

Para determinar la influencia de los componentes del medio de cultivo se utilizó el diseño experimental Plackett-Burman, se seleccionaron colonias únicas de *E. coli* DH5 α transformadas con pVAX-NH36 de placas de LB kanamicina, éstas fueron subcultivadas en 5 mL de medio LB por 6 h y se inocularon con 5% v/v matraces de 250 mL con 30 mL de medio que contenían kanamicina (50 μ g/mL), incubados a 37°C y 200 rpm por 12 h, posteriormente, se tomaron muestras de 1 mL para determinar peso seco y rendimientos específico y volumétrico.

Se tomó como medio base el ZMY505 (Studier, 2005), la Tabla 8 se construyó con un nivel alto y uno bajo, se estudiaron 11 componentes con 12 experimentos, se exploraron

únicamente tratamientos independientes, no las interacciones. Los componentes estudiados fueron seis componentes del medio ZMY505m, glicerol, glucosa, extracto de levadura, casaminoácidos, sulfato de magnesio, cloruro de amonio y dos componentes extra: tiamina (O'Kennedy y col., 2000) y lactosa (Zheng y col., 2007); en la Tabla 8 se muestran los intervalos de estudio propuestos para el diseño experimental Plackett-Burman. Se propusieron tres variables control (dummy) para el cálculo de error, sulfato de sodio, fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio dibásico. Los datos fueron analizados por *t-student* y la significancia fue establecida por $\alpha = 0.05$.

3.2.11 Diseño experimental Taguchi.

Los componentes que tuvieron un efecto en la producción de pDNA se seleccionaron para una optimización del medio de cultivo mediante un diseño experimental Taguchi L18 ($2^1 \times 3^7$). La L y el 18 representan el cuadrado latino y el número de experimentos realizados, se utilizaron tres niveles de estudio 1, 2 y 3 (bajo, medio y alto). Se seleccionaron colonias únicas de *E. coli* DH5 α transformadas con pVAX-NH36 y se inocularon con 5% v/v matraces de 250 mL con 30 mL de medio que contenían kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubados a 37°C y 200 rpm por 12 h y se tomaron muestras de 1 mL para determinar peso seco y rendimientos específico y volumétrico.

Los componentes estudiados y los intervalos de estudio se muestran en la Tabla 10. Se propusieron dos variables control (dummy) para el cálculo de error, sulfato de sodio y fosfato de sodio dibásico. Los datos fueron analizados por ANOVA y se calculó el valor F. El mejor medio fue seleccionado para los siguientes experimentos.

3.2.12 Determinación de azúcares residuales por HPLC

Las concentraciones de azúcares residuales se determinaron por HPLC (high-performance liquid chromatography), se utilizó un cromatógrafo Varian (Santa Clara CA) equipado con un detector de índice de refracción, y se usó una columna Aminex HPX-87C

(Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: agua como fase móvil, flujo de 0.4 mL/min, temperatura de la columna 60°C, tiempo de corrida 30 min. Primero se corrieron estándares de lactosa, glucosa, xilosa, galactosa, y fructosa de concentración conocida (0.2 mg/mL) y se compararon los tiempos de retención con las muestras, con esto se calcularon las concentraciones finales.

3.2.13 Determinación de glicerol

3.2.13.1 Método HPLC: se utilizó un cromatógrafo Varian (Santa Clara CA) equipado con un detector de índice de refracción, y se usó una columna para ácidos orgánicos de 300 mm de largo (Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones cromatograficas fueron las siguientes: 5 mM H₂SO₄ como fase móvil, flujo de 0.4 mL/min, temperatura de la columna 70°C, tiempo de corrida aproximado de 30 min. Se corrió un estándar de glicerol de concentración conocida (3.0 mg/mL) y se compararon los tiempos de retención con las muestras, con esto se calcularon las concentraciones finales.

3.2.13.2 Método Espectrofotométrico: se prepararon soluciones madre de ácido acético 1.6 M (9.6 g/ 100 mL) y acetato de amonio 4.0 M (30.8 g/ 100 mL). Se preparó una solución de acetilcetona al 0.2 M: se disolvieron 200 µl (195 mg) de acetilcetona en 5 mL de la solución madre de ácido acético y 5 mL de la solución madre de acetato de amonio. Por último se preparó una solución de peryodato de sodio 10 mM: se pesaron 21 mg de meta-peryodato de sodio, se adicionaron 5 mL de la solución madre de ácido acético, se agitó hasta completa disolución, y se adicionaron 5 mL de la solución madre de acetato de amonio. La solución de trabajo con la que se diluyen los estándares o muestras, se preparó de la siguiente manera: se mezclaron volúmenes iguales de agua destilada y etanol al 95%. Se preparó una solución madre de glicerol a una concentración de 0.03 mg/mL, se realizó una curva a concentraciones de 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 y 0.06 mg en 2 mL de muestra. Adicionalmente se prepararon las muestras tomando 5, 10, 20 ó

50 μ L de muestra y se agregaron 1995, 1990, 1980 ó 1950 μ L de solución de trabajo, esto para caer dentro de la curva de glicerol. A los 2 mL de estándar y muestras se les hizo el siguiente tratamiento: se agregó 1.2 mL de peryodato de sodio 10 mM y se agitó por 30 s. Se agregaron 1.2 mL de acetilcetona 0.2 M, se agitó manualmente y se incubó a 70°C por 1 min. La muestra se enfrió inmediatamente por inmersión en agua a 25°C. Las muestras se leyeron a 410 nm, también se leyó un blanco preparado de la misma manera (Bondioli y col., 2005).

3.2.14 Determinación de acetatos

La concentración de acetatos se determinó por HPLC, se utilizó un cromatógrafo Varian (Santa Clara CA) equipado con un detector de índice de refracción, y se usó una columna para ácidos orgánicos de 300 mm de largo (Bio-Rad, Hercules, CA). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: 5 mM H₂SO₄ como fase móvil, flujo de 0.4 mL/min, temperatura de la columna 70°C, tiempo de corrida aproximado de 30 min. Se corrieron estándares de acetato de zinc, de sodio y de potasio de una concentración conocida (1.0 mg/mL), los tiempos de retención y valores fueron similares para los tres tipos de acetatos, por último, se compararon los tiempos de retención con las muestras, con esto se calcularon las concentraciones finales.

3.2.15 Purificación de plásmidos por métodos cromatográficos

Para purificar el sc-pDNA de las vacunas candidatas, las células de *E. coli* DH5 α transformadas con pVAX-NH36, pVAX-CP4, pVAX-PFO and pVAX1 fueron crecidas en 1 L de medio T2 suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) en matraces Fernbach de 2800 mL. Los cultivos fueron incubados por 12 h a 37°C y 200 rpm o por 6 h a 37°C y se incrementó la temperatura de 37 a 42°C por 5 h. Luego la biomasa fue recuperada por centrifugación (4 500 x g por 20 min a 4°C) y las bacterias se lisaron mediante el método de lisis alcalina (250 mL de solución; Sambrook y col., 2001). El lisado fue centrifugado (4

500 x g por 40 min a 4°C) y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm. El pDNA fue purificado utilizando un protocolo de tres cromatografías (Lemmens y col., 2003; www.gehealthcare.com/protein-purification-bioprocess).

Primero se cargaron 125 mL de lisado en una columna de vidrio (2.5 x 100 cm, Bio-Rad) empacada con 500 mL de resina Sepharose 6 Fast Flow (GE-Healthcare, USA), previamente equilibrada con 2 VC (volumen de columna) de solución A (2.1 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5), la muestra fue eluida con un flujo de 1 mL/min, y se colectaron fracciones de 4 mL, que se analizaron con geles de agarosa al 0.8 %. Posteriormente las fracciones libres de RNA fueron separadas y cargadas en una eco-columna (1x15 cm, Bio-Rad) empacada con 50 mL de resina Plasmid Select Xtra a un flujo de 0.1 mL/min (GE-Healthcare, USA), equilibrada con solución B (2.0 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5). La columna fue lavada con 4 VC de solución B y el pDNA fue eluido con 5 VC de solución C (0.3 M NaCl, 1.7 M (NH₄)₂SO₄, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5). Se colectaron y analizaron fracciones de 4 mL. Se escogieron las muestras libres de oc-pDNA y se diluyeron con 2V de agua y cargadas en una columna (1x15 cm, Bio-Rad) empacada con 50 mL de resina SOURCE 30Q (GE-Healthcare, USA), se equilibró con solución D (0.4 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5) a un flujo de 2 mL/min, la columna fue lavada con 4 VC de solución D y se eluyó con un gradiente de 0.4 M a 1.0 M NaCl de solución E (40 a 100% de 1.0 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5), se colectaron fracciones de 4 mL que fueron analizadas en geles de agarosa 0.8%. Las cromatografías de filtración en gel, adsorción e intercambio iónico, fueron llevadas a cabo en un cromatógrafo Biologic HR (Bio Rad, Hercules, USA) a 25°C. Las muestras fueron analizadas por densitometría, fluorescencia y espectrofotometría a 260 y 280 nm.

Capítulo 4
RESULTADOS

4.1 Clonación de NH36 en el vector pVAX1.

Para poder estudiar la producción de vacunas de DNA plasmídico, se probaron los plásmidos VR1012-NH36 (Gamboa-León y col., 2006) y pVAX-NH36. El plásmido VR1012-NH36 es una vacuna de DNA que mostró un efecto inmunoprotector e inmunoterapéutico contra leishmaniasis en ratones (Aguilar-Be y col., 2005; Gamboa-León y col., 2006), este plásmido tiene un tamaño aproximado de 6 kb. En la figura 4 panel A se muestra la comprobación de la construcción VR1012-NH36, se observa la linearización del plásmido VR1012-NH36 (carril1) y del vector VR1012 (4914 pb, carril 2), y la liberación del DNA correspondiente al fragmento NH36 (945 pb, carril 3) con la doble digestión con las enzimas *BamHI* y *XbaI*. Se mandó secuenciar y se encontró una mutación puntual en aproximadamente 826 pb con respecto a lo reportado para la NH36 en el Gene Bank, con esta mutación se substituyó una alanina (aminoácido pequeño con un metilo) por treonina (aminoácido nucleofilico con dos metilos y un grupo OH).

Posteriormente para obtener la construcción de NH36 en pVAX1 y realizar los experimentos de producción, se probaron dos estrategias de clonación, la primera por subclonación en el vector pCRII-TOPO, y la segunda por clonación directa en el pVAX1.

En la clonación utilizando el vector TOPO y los oligonucleótidos NH36K- F y NH36X-R se presentó una mutación y el fragmento NH36 se liberaba con la enzima *XbaI* (Figura 4 panel B). Se diseñaron los oligonucleótidos NHvaxF y MNH36 X-R para la clonación directa del fragmento NH36 en el vector pVAX1. El oligonucleótido NHvaxF (Apéndice 2) se diseñó con un sitio de restricción para cortar con la enzima *KpnI*, después de agregar el codón ATG se modificó el nucleótido de C a G, para agregar la secuencia Kozak, cambiando la prolina por una alanina, el oligonucleótido MNH36 X-R (Apéndice 2) se diseñó con un sitio de restricción para cortar con la enzima *XbaI*, y se agregó un codón de

para TAA. Se amplificó el fragmento NH36 (945 pb) proveniente de la construcción VR1012-NH36 (5 kb), el cual se digirió con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, posteriormente se ligó al vector pVAX1 (3 kb) previamente cortado con las mismas enzimas. En la Figura 5 se muestra el análisis con enzimas de restricción y PCR del pVAX-NH36. Como se puede observar la doble digestión con las enzimas *KpnI* y *XbaI* liberó un inserto del tamaño esperado (945 pb) y del vector pVAX1 (3 kb) de dos clonas candidatas (6 y 7, carriles 1 y 2), de estas clonas se eligió la clona 7 para seguir trabajando, debido a que su producción fue mayor. En el panel B se muestra la linearización de pVAX-NH36 (clona 7) con las enzimas *XbaI* y *KpnI* (carriles 1 y 2). Por último, se amplificó el inserto con los oligonucleótidos T7 promotor y BGH reverso que son específicos para el vector pVAX1. En la Figura 5 panel C se muestra el perfil electroforético de la amplificación, del control el vector pVAX1 (carril 1, 200 pb), en el carril 2 el control negativo sin DNA molde y la construcción pVAX-NH36 (ca.1200 pb, carril 3). Por último, se comprobó la secuencia del inserto, (Apéndice 3 Figura 26 se muestra esta secuencia de nucleótidos en el panel A), encontrándose una mutación de guanina a adenina (ca. a las 860 pb), en la secuencia de la proteína se tendría un cambio de una alanina por treonina (ca. del aminoácido 290, panel B). Este cambio también se encontró en el inserto de NH36 del plásmido VR1012-NH36, el cual se usó como molde. Una vez teniendo los dos plásmidos de interés VR1012-NH36 y pVAX-NH36, estos se utilizaron para los posteriores ensayos buscando las condiciones de producción más convenientes para incrementar la producción de DNA plasmídico en matraces.

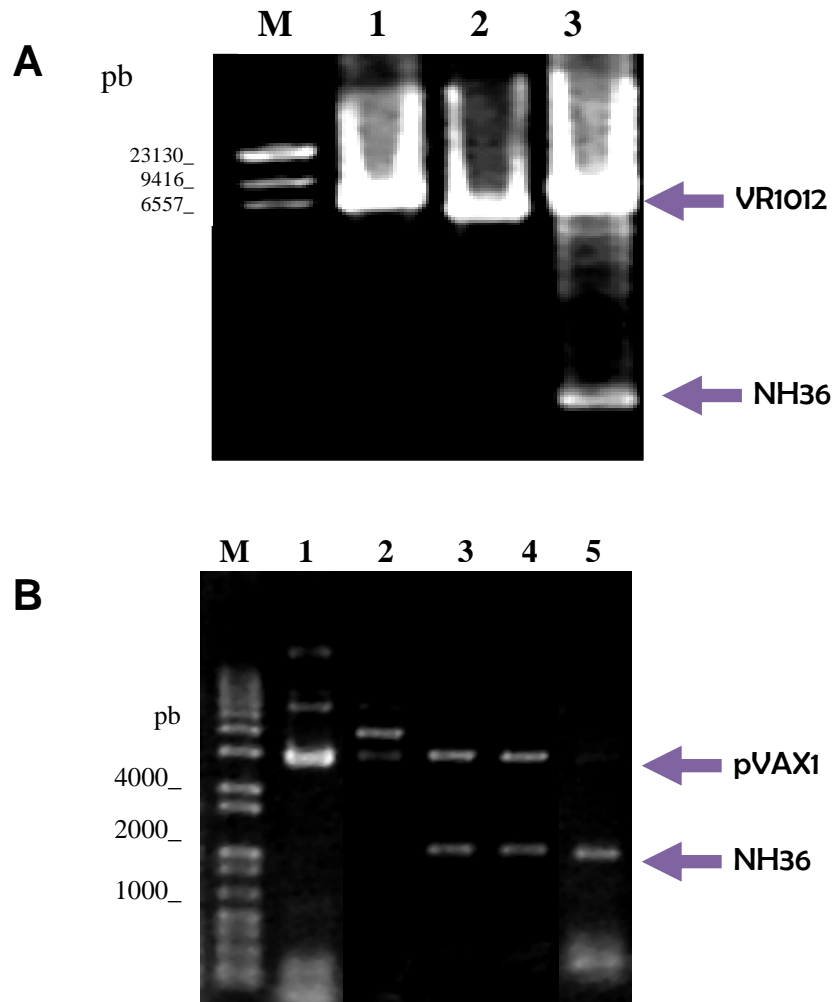


Figura 4. Análisis de las construcciones VR1012-NH36 y pVAX-NH36

Análisis de restricción de los plásmidos: A) VR1012-NH36 (Carril 1), digestión con *BamHI* (carril 2), y doble digestión con *BamHI* y *XbaI*. B) pVAX-NH36 (carril 1), DNA plasmídico digerido con *KpnI*, (carril 2), con *XbaI* (carril 3), doble digestión con *KpnI* y *XbaI* (carril 4), y amplificación por PCR de NH36 usando como molde pVAX-NH36 (carril 5). Marcador de tamaño molecular (λ DNA *HindIII*, Invitrogen) (carril M).

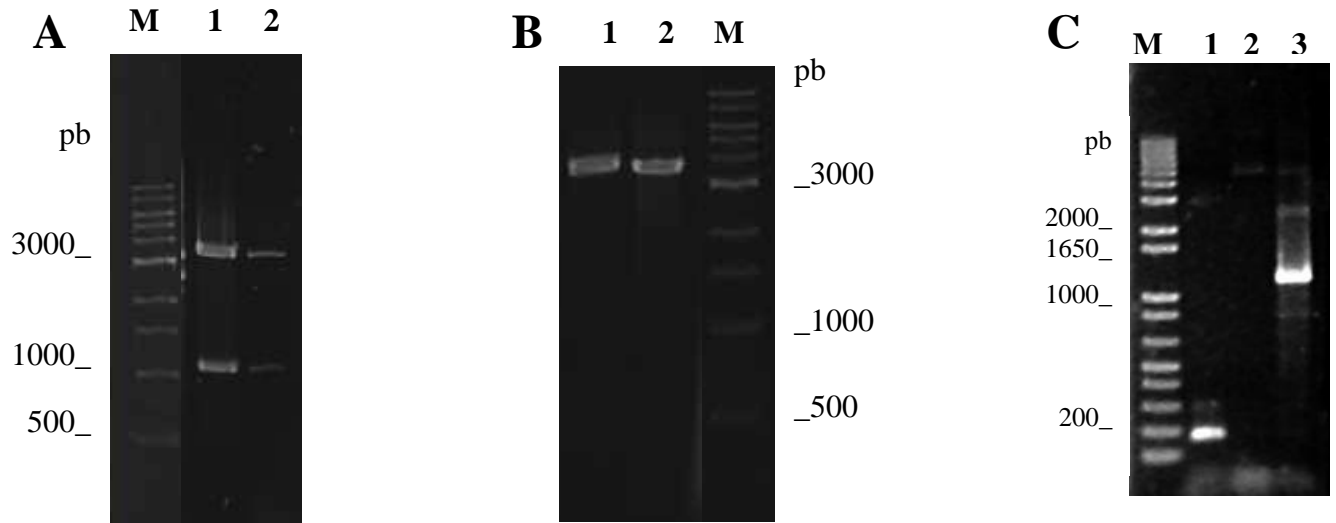


Figura 5. Análisis de la construcción pVAX-NH36

Análisis de restricción del plásmido pVAX-NH36: A) Doble digestión con *XbaI* y *KpnI*, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA ladder (New England Biolabs, carril M), clona 7 (carril 1) y clona 6 (carril 2). B) Linearización con *XbaI* y *KpnI* de la clona 7 (carril 1 y carril 2). M marcador de tamaño molecular 1 kb DNA ladder (New England Biolabs). C) PCR con los oligonucleotidos del vector pVAX1: T7 promotor y BGH reverso, Marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), control positivo y negativo de PCR pVAX1 (carril 1 y 2), PCR de la construcción pVAX-NH36 (carril 3).

4.2 Ensayos de producción de sc-pDNA

4.2.1 Cultivos de VR1012-NH36 en medio LB

Para determinar cuáles son las mejores condiciones en la producción de DNA plasmídico, se hicieron experimentos variando la velocidad de agitación y temperatura de incubación, se utilizaron cultivos de *E. coli* DH5 α transformados con VR1012-NH36 en medio LB, se crecieron a 30, 35 y 37°C, y a velocidades de agitación de 25, 50, 100, 200 y 250 rpm, se calcularon las velocidades de crecimiento máximas y los rendimientos volumétricos finales. En la Tabla 4 se muestran los mejores rendimientos obtenidos.

Se observó que los cultivos crecidos a 250 rpm a 37°C obtuvieron la mayor velocidad de crecimiento ($0.936h^{-1}$), mientras que los cultivos con agitación a 100 y 200 rpm presentaron velocidad de crecimiento baja, lo cual es recomendable ya que al disminuir la velocidad de crecimiento se incrementa el superenrollamiento (Lin-Chao y col., 1992; O'Kennedy y col., 2003; Carnes, 2005). Los mejores rendimientos específico y volumétrico se observaron a 200 rpm (10.7 mg/L). Al comparar la producción del plásmido a las diferentes condiciones probadas, el mayor rendimiento volumétrico se obtuvo a 37°C y 200 rpm.

Debido a que se obtuvieron mejores rendimientos con la condición de 37°C y 200 rpm, ésta se estableció para la producción de los dos plásmidos VR1012-NH36 y pVAX-NH36, en los tres medios de cultivo LB, SDCAS o ZMY505 por probar.

Tabla 4. Producción del plásmido VR1012-NH36 en *E. coli* DH5 α en medio LB

Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	μ (h ⁻¹)	Rendimiento	
			específico (mg/g)	volumetrico (mg/L)
37	200	0.708	9.8	10.7
37	100	0.528	7.7	7.0
30	100	0.373	2.9	2.0

Los cultivos de *E. coli* DH5 α fueron transformados con VR1012-NH36 en 30 mL de medio LB e incubados a diferentes condiciones.

4.2.2 Producción de pDNA en diferentes medios de cultivo.

Para optimizar los elementos traza primero es necesario probar varios medios de cultivo para así seleccionar alguno en el cual la producción de los plásmidos sea favorable, por lo tanto, se analizó la producción de los plásmidos VR1012-NH36 y pVAX-NH36 en el medio LB (medio control) y en dos medios previamente reportados para la producción de DNA plasmídico superenrollado, SDCAS (O'Kennedy y col., 2000) y ZMY505 (Studier, 2005; Apéndice 1). En la Tabla 5 se muestran los resultados de velocidad específica de crecimiento (μ), el crecimiento celular y los rendimientos específico y volumétrico de pVAX-NH36 producido en los tres medios y de VR1012-NH36 únicamente producido en el medio ZMY505.

El crecimiento celular (1.9 g/L) y los rendimientos de pDNA obtenidos con LB (7.3 a 10.62 mg/L) y SDCAS (14.76 mg/L) fueron similares a lo reportado (O'Kennedy et al., 2000), el máximo rendimiento volumétrico fue obtenido con el medio ZMY505 (22.5 y 24.8 mg/L) para los dos plásmidos, también el crecimiento celular fue similar a lo reportado por Studier (2005). El pH final para SDCAS (5.2) y ZMY505 (5.4 - 5.9) indica la excreción de acetatos al final del cultivo, estos valores de pH son similares a los reportados por Zheng y colaboradores (2007), después de 24 h de incubación en un medio semi-definido.

Ya que el medio ZMY505 presentó mejores rendimientos específicos y volumétricos este medio se utilizó para optimizar los elementos traza con un diseño Experimental Plackett-Burman. Estos experimentos posteriores se realizaron únicamente con el plásmido pVAX-NH36.

Tabla 5. Producción de vacunas de pDNA en diferentes medios contra leishmaniasis en matraces.

Plásmido	Medio	μ (h ⁻¹)	Crecimiento celular (g/L)	Rendimiento específico (mg/g)	Rendimiento volumétrico (mg/L)	sc- pDNA (%)	pH ^a
pVAX-NH36	LB	0.71	1.19 ±0.01	8.93±0.8	10.62 ±0.7	72	8.4
	SDCAS	0.64	2.40 ±0.01	6.15 ±0.5	14.76 ±1.2	83	5.2
	ZMY505	0.73	2.72 ±0.07	9.15 ±0.7	24.88 ±1.1	80	5.4
VR1012- NH36	ZMY505	0.73	2.56±0.02	8.81±1.0	22.55 ±1.3	83	5.9

E. coli DH5 α transformadas con pVAX-NH36 fue crecida sólo en matraces de 250 mL con LB, SDCAS o ZMY505, VR1012-NH36 fue producido solo en el medio ZMY505 a 37 °C y 200 rpm por 18 h. El crecimiento celular, rendimientos específico y volumétrico, y el porcentaje de sc-pDNA fueron determinados cada 2 h (Materiales y Métodos). Los datos representan la desviación estándar de tres réplicas de la producción máxima de pDNA (14 h). ^a pH final del cultivo (18 h).

4.3 Optimización del medio de cultivo para la producción de pDNA.

4.3.1 Optimización de los elementos traza en el medio ZMY505

Los elementos traza son de suma importancia en la producción de plásmidos ya que proporcionan cofactores para el funcionamiento de enzimas que sintetizan y participan en el superenrollamiento del DNA (Schmidt y col., 2003), para la optimización de la concentración de los elementos traza se utilizó el medio ZMY505 como base.

Primero se probaron los elementos trazas de cuatro medios de cultivo: MMBL (Xu y col., 2005), SDCAS (O'Kennedy y col., 2000), Schmidt (Schmidt y col., 2003) y ZMY505 (Studier, 2005). Las condiciones probadas fueron sin elementos traza y con adición de elementos traza, en la Tabla 6 se muestran los resultados. El mayor rendimiento se obtuvo con las trazas del medio ZMY505 (13.18 mg/L) y la composición de estas trazas se utilizó para la posterior optimización con un diseño Plackett-Burman.

En la Tabla 7 se muestra el diseño experimental Plackett-Burman, los resultados de la optimización de los elementos traza se muestran en la Figura 8, el mejor rendimiento volumétrico fue obtenido con el tratamiento 5 (37 mg/L); aproximadamente 50 % más que con el medio control ZMY505 (24.7 mg/L). Los elementos con un efecto positivo significativo en el rendimiento volumétrico fueron $MnCl_2$ y $CoCl_2$, por lo que se tomaron las mayores concentraciones. Además, la calidad del plásmido con los tratamientos 5 y 8 fue mayor del 80% sc-pDNA. Por estos incrementos la formulación de los elementos traza del tratamiento 5 se utilizará para el medio ZMY505 modificado. Con este medio modificado se realizaron varios experimentos de producción e inducción para comprobar así el incremento de los rendimientos volumétricos.

Tabla 6. Comparación de rendimientos utilizando diferentes composiciones de elementos traza

Trazas	Crecimiento celular (g/L)	Rendimiento específico (mg/g)	Rendimiento volumétrico (mg/L)
No trazas	1.72	2.79 (± 0.1)	4.78 (± 0.5)
ZMY	1.76	6.67 (± 0.3)	13.18 (± 1.5)
ZMY-comp	1.67	3.55 (± 0.2)	5.91 (± 0.8)
SDCAS	1.69	4.46 (± 0.3)	7.55 (± 1.4)
MMBL	1.67	7.88 (± 0.4)	11.76 (± 1.8)
Schmidt	1.64	7.17 (± 0.4)	11.76 (± 1.3)

Composición de los elementos traza: SDCAS: 22.6 μM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.5 μM $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 67.3 μM $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 7.7 μM $\text{CuSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 48.4 μM H_3BO_3 , 10.3 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 95.9 μM ZnCl_2 , 408 μM Fe(III) citrato;; solución de los elementos traza MMBL (g/L), 1.0 ml/L: $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.162; $\text{ZnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.0144; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.12; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.012; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.006; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.9; H_3BO_3 , 0.5; HCl (37%, w/v), 37 ml/L. Solución de elementos traza de Schmidt 10 ml/l 5.40 g/l $\text{FeCl}_3\cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.38 g/l $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.85 g/l $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.56 g/l $\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.17 g/l CuCl_2 , 1.0 g/l H_3BO_3 , 2.5 g/l $\text{Na}_2\text{MnO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 5.0 g/l de ácido cítrico. ZMY505: 0.4 μM $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4 μM H_3BO_3 , 0.4 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM FeCl_3 , 4 μM CaCl_2 , 2 μM $\text{MnCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 μM ZnSO_4 , 0.4 μM $\text{CuCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.4 μM NiCl_2 , 0.4 μM NaSeO_3 . ZMY505m: 10 μM $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4 μM H_3BO_3 , 10 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM FeCl_3 , 7 μM CaCl_2 , 4 μM $\text{MnCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 μM ZnSO_4 , 10 μM $\text{CuCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 μM NiCl_2 , 0.4 μM NaSeO_3 .

Tabla 7. Diseño experimental Plackett-Burman para la evaluación de metales traza en la producción de pDNA

Trial	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
2	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
4	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
5	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
6	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
7	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
8	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
9	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
10	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
11	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
12	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-

E. coli DH5 α transformada con pVAX-NH36 fue crecida en matraces de 250 mL que contenían 30 mL de diferentes medio de cultivo (se propusieron 12 tratamientos con medio base y control ZMY505), incubados a 37°C y 200 rpm. Se determinaron los rendimientos específicos y volumétricos de pDNA. En paréntesis siguientes se muestran las concentraciones estudiadas de los metales traza y los niveles bajo (-) y alto (+). Los metales traza: X1 = FeCl₃ (10 - 100 μ M); X2 = MnCl₂·H₂O (1 - 4 μ M); X3 = CoCl₂·6H₂O (1 - 10 μ M); X4 = ZnSO₄ (4 - 40 μ M); X5 = variable de error; X6 = CaCl₂ (1 - 7 μ M); X7 = NiCl₂·(1 - 10 μ M); X8 = CuCl₂·H₂O (1 - 10 μ M); X9 = NaSeO₃·(1 - 10 μ M); X10 = Na₂MoO₄·2H₂O (1 - 10 μ M); X11 = variable de error.

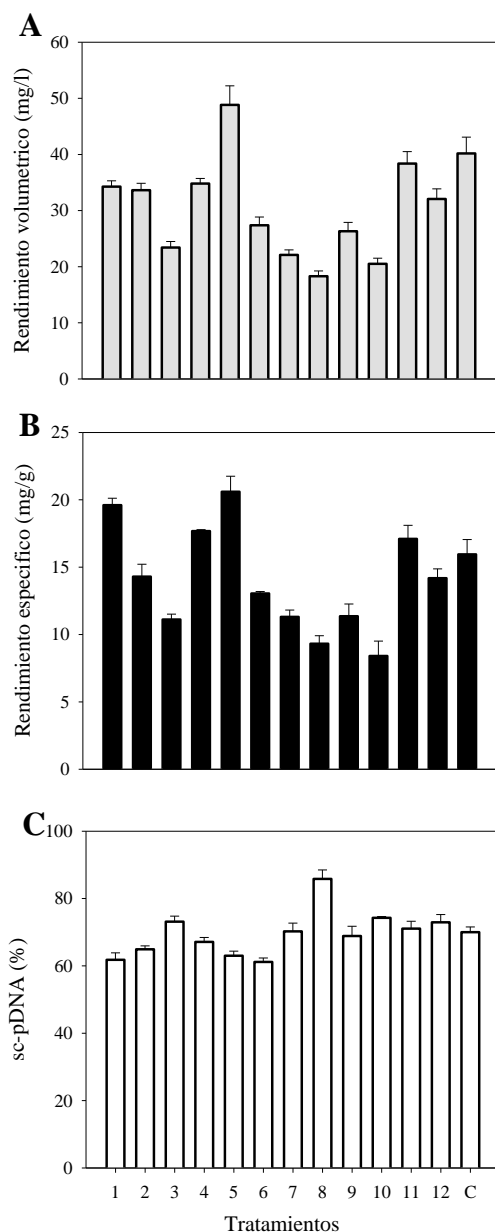


Figura 6. Resultados de la optimización de metales traza con un Diseño Plackett-Burman. *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pVAX-NH36 fue crecida por 12 h en matraces de 250 mL con 30 mL de los medios propuestos en el diseño Plackett-Burman a 37 °C y 200 rpm. A) Los rendimientos volumétricos (barras grises), B) rendimientos específicos (barras negras) y C) porcentaje de sc-pDNA (barras blancas) Los números representan los 12 tratamientos del diseño Plackett-Burman y C representa el medio control ZMY505. Las determinaciones de pDNA se realizaron por densitometría y fluorescencia. Cada punto representa el promedio de cinco réplicas \pm desviación estándar (SD, barras de error).

4.3.2 Producción de vacunas en ZMY505m

Para determinar las mejores condiciones de crecimiento en el medio ZMY505m modificado, se crecieron cultivos de *E. coli* DH5 α transformados con los plásmidos VR1012-NH36 o pVAX-NH36 y se tomaron muestras cada 2 h, con esto se construyeron las cinéticas de crecimiento, rendimientos específico y volumétrico, y porcentaje de sc-pDNA (Figura 7).

Los resultados mostraron que para la producción de VR1012-NH36 el crecimiento de la bacteria tuvo una fase lag de aproximadamente 3 h seguida de una fase exponencial hasta las 14 h, el rendimiento final fue de 2.96 g/L (18h) y la velocidad específica fue de 0.72 h⁻¹ (Figura 7 A). Simultáneamente, cuando empezó la fase de crecimiento exponencial, comenzó la producción de pDNA (4 h) y la acumulación máxima ocurrió a las 12 h y 14 h (13.67 mg/g panel B y 33.28 mg/L panel C). Mientras que en la producción de pVAX-NH36 la cinética de crecimiento mostró una fase exponencial hasta las 16 h, ésta fue más prolongada que para el VR1012-NH36, y mostró un rendimiento final de 3.48 g/L (18 h), la velocidad específica de crecimiento fue similar en la producción de los dos plásmidos 0.73 h⁻¹. La producción de pDNA comenzó a las 4 h alcanzando el máximo rendimiento específico a las 12 h (10.45 mg/g, panel B) y del rendimiento volumétrico a las 14 h (33.08 mg/L, panel C). También se determinó el porcentaje de sc-pDNA para los dos plásmidos, (Figura 7 D) que fue entre 70 a 80% para ambos plásmidos.

Los rendimientos finales fueron similares para la producción de ambos plásmidos, sin embargo la densidad óptica de *E. coli* DH5 α fue mayor con pVAX-NH36, hasta OD₆₀₀ 10.5 por esto, el rendimiento volumétrico fue superior que con el plásmido a VR1012-NH36. Además, la calidad de pDNA corresponde a lo reportado utilizando *E. coli* DH5 α

(Duttweiler y col., 1998; Wang y col., 2001; Zheng y col., 2007). El medio ZMY505m modificado es una buena alternativa para la producción de plásmidos, sin embargo, es necesario realizar posteriores optimizaciones para mejorar tanto los rendimientos, como los tiempos de producción, para esto se utilizarán un Diseño Plackett-Burman y un Diseño Taguchi.

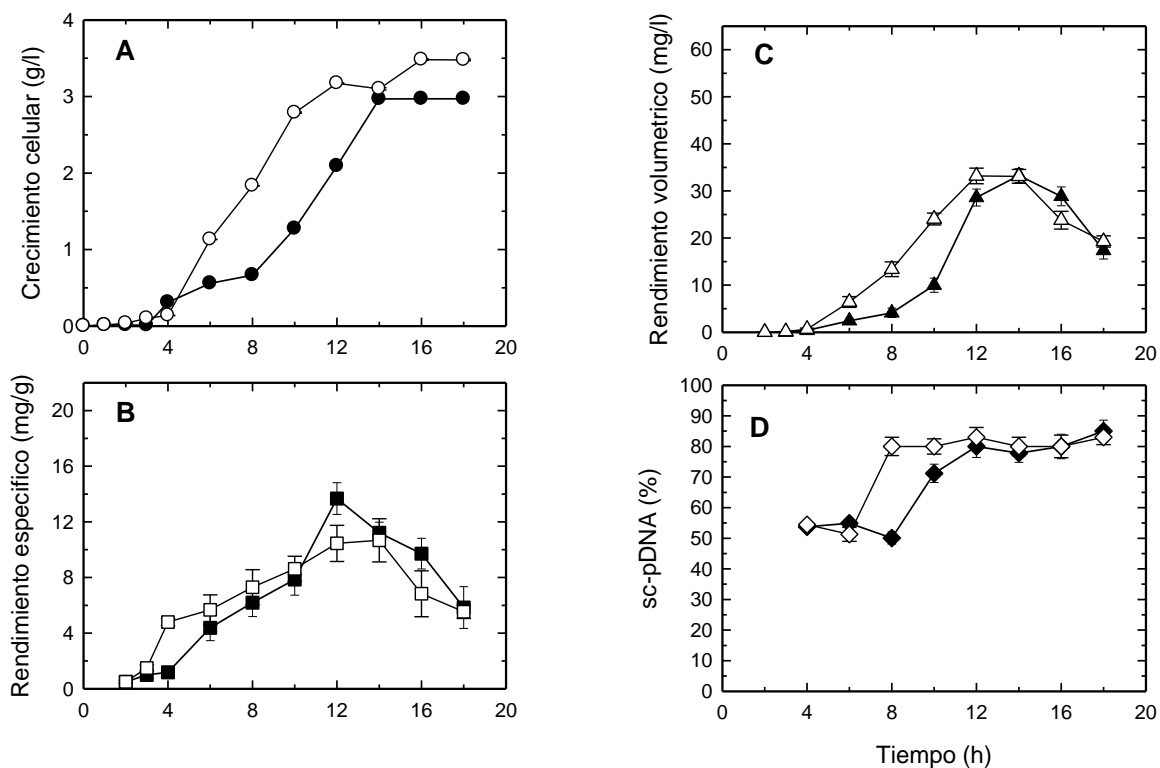


Figura 7. Producción de vacunas de DNA en el medio ZMY505m

Las bacterias *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los plásmidos VR1012-NH36 (símbolos negros) y pVAX-NH36 (símbolos blancos) y se crecieron en 30 mL de medio ZMY505m en matraces de 250 mL a 37°C y 200 rpm por 18 h. Panel A) Cinética de crecimiento de *E. coli*, Perfil de producción específica y volumétrica de pDNA (panel B y C), panel D) porcentaje de superenrollamiento. Los rendimientos específicos (mg/g) fueron determinados por densitometría en geles de agarosa 0.8%, y los rendimientos volumétricos (mg/L) son la relación de biomasa seca (g/L) y rendimiento específico (mg/g).

4.3.3 Optimización de los componentes del medio de cultivo con un Diseño Experimental Plackett-Burman

Para optimizar el medio de cultivo e incrementar los rendimientos volumétricos, se propuso un diseño experimental Plackett-Burman, la matriz consta de 12 tratamientos (múltiplos de 4, donde se analizaron n-1 componentes) y se analizaron dos concentraciones: alta y baja. El rendimiento volumétrico de DNA plasmídico de pVAX-NH36 se usó como variable de respuesta. Se analizaron seis componentes (glicerol, glucosa, extracto de levadura, casaminoácidos, magnesio y cloruro de amonio) del medio de cultivo base ZMY505m y dos componentes extra (tiamina y lactosa). El error experimental fue estimado usando sulfato de sodio, fosfato de sodio dibásico y fosfato de potasio monobásico como variables de error (Tabla 8). Los resultados fueron analizados por *t-student*.

A pesar de que Studier (2005) sugiere concentraciones de fosfatos de 100 mM, pero indica que las altas concentraciones incrementan la fuerza iónica y afectan el crecimiento celular, y Ongkudon (2011) reportó mejores rendimientos utilizando concentraciones de fosfatos de 130 mM (Na_2HPO_4), en este trabajo no se encontraron diferencias en el rendimiento volumétrico al incrementar los fosfatos de 50 mM (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4) a 100mM en el medio ZMY505m.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para el Diseño Plackett-Burman, con el tratamiento 5 se alcanzó una producción de 36.50 mg/L y 82% de superenrollamiento. El segundo mejor resultado fue el tratamiento 6 (35.05 mg/L y 81%). Cuatro tratamientos tuvieron rendimientos superiores al control ZMY505m de 28.13 mg/L y los rendimientos de otros tratamientos fueron similares. Los componentes que tuvieron un efecto positivo significativo fueron extracto de levadura, lactosa y magnesio. La glucosa y los

casaminoácidos tuvieron un efecto significativo en el crecimiento celular, mientras que el amonio y glicerol tuvieron un efecto significativo en los rendimientos específicos, en combinación no se observó un incremento en los rendimientos volumétricos. Se analizó el efecto de las concentraciones propuestas para los componentes del medio de cultivo, en la Tabla 9 se muestra las concentraciones que favorecieron el rendimiento volumétrico, el crecimiento celular y rendimiento específico.

Con el diseño experimental Plackett-Burman se obtuvo un error de 1.5% y una optimización de 1.3 veces con respecto al control ZMY505m, sin embargo es necesaria una optimización posterior con un diseño experimental Taguchi para confirmar los componentes y determinar las concentraciones óptimas del medio de cultivo.

Tabla 8. Matriz del Diseño Experimental Plackett-Burman y resultados de la variable de respuesta.

Tratamiento	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	pDNA (mg/l)	Sc-pDNA (%)
1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	28.00	80
2	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	18.04	56
3	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	34.84	80
4	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	13.86	62
5	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	36.50	82
6	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	35.05	81
7	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	24.13	80
8	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	25.4	80
9	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	23.07	69
10	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	22.57	70
11	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	25.34	70
12	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	25.74	71

Las concentraciones en el paréntesis indican los niveles bajo (-) y alto (+) de los componentes optimizados. X1= glicerol 0.5 - 3%, X2= glucosa 0 – 0.1%, X3= lactosa 0.1 – 0.5%, X4= extracto de levadura 0.5 – 1.5%, X5= casaminoácidos 0 – 0.5%, X6= sulfato de magnesio 0 – 10mM, X7= cloruro de amonio 0 - 100mM (5.34 g/L), X8= tiamina 0 – 4.5 mg/L, X9= dummy, X10= dummy, X11= dummy. Resultados del medio control (ZMY505m) 2.59 g/L, 10.86 mg/g y 28.13 mg/L (80% sc-pDNA).

Tabla 9. Efecto de los componentes del medio de cultivo por medio de un Diseño Plackett-Burman

Componente	Concentración (%)	Uso	Referencia
Glicerol	0.5	vol y OD	NR
	3.0	sc-pDNA	Vaz , 2007
Glucosa	0.0	sc-pDNA y vol	NR
	0.1	OD	Xu y col., 2005
Lactosa	0.1	OD	Studier, 2005
	0.5	sc-pDNA y vol	NR
Extracto de levadura	1.5	OD, sc-pDNA y vol	Vaz, 2007; Difco y BBL manual, 2003
Casaminoácidos	0.0	OD	Sigma Manual, 2006-2007
	0.5	Vol y sc-pDNA	NR
Sulfato de Magnesio	0.25 (10mM)	sc-pDNA, Vol y OD	Schmidt y col., 2003 NR
Cloruro de Amonio	100mM	sc-pDNA	Carsten y col., 2004

NR= No Reportado en bibliografía y reportado en este trabajo

4.3.4 Optimización de los componentes del medio de cultivo con un Diseño Experimental Taguchi

Para optimizar las concentraciones de los componentes del medio se propuso un diseño experimental Taguchi L18 ($2^1 \times 3^7$, Tabla 10), se determinaron el rendimiento volumétrico, el porcentaje de sc-pDNA y el pH.

Nueve tratamientos mostraron rendimientos volumétricos mayores comparados con el medio control ZMY505m, siendo el tratamiento T2 el de mayor rendimiento (41.9 mg/L). La significancia de cada componente fue determinada por ANOVA y se calculó la contribución. En este caso la mayoría de los componentes tuvieron un efecto significativo ($P < 0.05$), excepto el glicerol y los elementos traza, las concentraciones se mantuvieron como en la optimización con el diseño Plackett-Burman del ZMY505m (Sánchez Casco y col., 2013). La glucosa, lactosa y magnesio mostraron la mayor contribución en los rendimientos volumétricos de pDNA al incrementar los rendimientos celulares (Figura 8).

Los mejores rendimientos se observaron con el medio T2 (su composición se muestra en el Apéndice 1), ahora fue necesario determinar los tiempos de cultivo y producción máxima, tanto específica como volumétrica, por lo que se realizaron experimentos y se obtuvieron las cinéticas de producción con el medio optimizado T2.

Tabla 10. Diseño Experimental Taguchi y resultados

Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	pDNA (mg/L)	sc-pDNA (%)	pH
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	33.8± 1.6	83	5.6
T2	1	1	2	2	2	2	2	2	41.9 ± 1.2	85	6.0
T3	1	1	3	3	3	3	3	3	30.0 ± 0.7	85	5.4
T4	1	2	1	1	2	2	3	3	38.3 ± 1.0	85	5.6
T5	1	2	2	2	3	3	1	1	12.0 ± 0.8	83	5.48
T6	1	2	3	3	1	1	2	2	16.8 ± 0.5	81	5.3
T7	1	3	1	2	1	3	2	3	40.3 ± 0.7	81	5.5
T8	1	3	2	3	2	1	3	1	25.0 ±1.4	82	5.4
T9	1	3	3	1	3	2	1	2	34.4 ± 0.9	70	5.5
T10	2	1	1	3	3	2	2	1	25.2 ± 1.1	73	5.6
T11	2	1	2	1	1	3	3	2	36.6 ± 0.9	83	5.5
T12	2	1	3	2	2	1	1	3	33.5 ± 0.6	58	5.5
T13	2	2	1	2	3	1	3	2	15.6 ± 1.4	81	5.5
T14	2	2	2	3	1	2	1	3	38.4 ± 0.4	70	5.4
T15	2	2	3	1	2	3	2	1	19.4 ± 0.8	83	5.5
T16	2	3	1	3	2	3	1	2	22.4 ± 0.5	82	5.5
T17	2	3	2	1	3	1	2	3	25.5 ± 1.1	60	5.6
T18	2	3	3	2	1	2	3	1	19.3 ± 0.5	60	5.4

Datos del medio control ZMY505m para crecimiento celular 2.3 g/L, pH final 5.8, rendimientos específico 12.5 mg/g y volumétrico 28.4 mg/L (80% de sc-pDNA).

Los niveles fueron definidos como A = CAS 0 y 10 g/L; B = NH₄Cl 0, 0.53 y 2.67 g/L, C = glucosa 0.1, 0.5 y 1.0 g/L; D = glicerol 1, 5 y 10 g/L; E = MgSO₄ 2.46, 7.39 y 19.68 g/L; F = lactosa 0, 5 y 10 g/L; G = trazas 0, 0.02 y 0.1%v/v; H = extracto de levadura 15, 25 y 35 g/L. *E. coli* DH5α fue transformada con pVAX-NH36 y crecida en matraces de 250 mL con 30 mL de los medio a 200 rpm, 37°C por 12 h. Cada valor representa el promedio de tres réplicas.

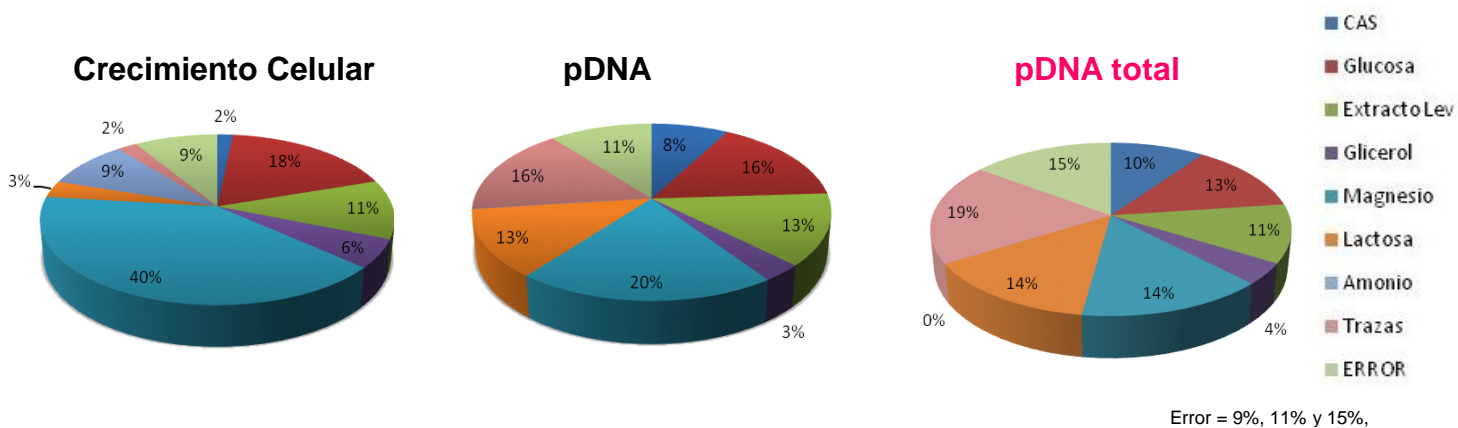


Figura 8. Porcentajes de la influencia de los componentes del medio de cultivo para las tres variables de respuesta

Las variables de respuesta elegidas fueron crecimiento celular, rendimiento específico y rendimiento volumétrico. Se realizaron 18 experimentos y con un análisis de varianza se determinó si el efecto de cada componente era significativo, se calcularon los porcentajes de la contribución de cada componente del medio en la producción de biomasa, plásmido o los rendimientos totales. Los porcentajes del error del experimento y la matriz fueron 9, 11 y 15% para el crecimiento celular, superenrollamiento y sc-pDNA total, respectivamente.

4.4 Producción de pVAX-NH36 en el medio optimizado T2

4.4.1 Producción a 37°C

Con el medio de cultivo optimizado nombrado como T2, se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de DNA plasmídico utilizando el medio optimizado T2.

El crecimiento celular final fue de 3.7 g/L, ligeramente mayor que en ZMY505m 3.5 g/L, la fase estacionaria comenzó a las 12 h (Figura 9 A). El oxígeno disuelto y el pH cayeron rápidamente, luego el porcentaje de DO permaneció y fue bajando lentamente hasta casi cero al final del cultivo, el pH final fue 5.58 (Figura 9 A). Luego se determinó el consumo de la fuente de carbono y la formación de acetatos (Figura 9 B), la glucosa fue consumida inmediatamente y agotada a las 2 h, mientras que el glicerol fue agotado a las 18 h, la última fuente de carbono consumida fue la lactosa, ésta se consumió lentamente y sólo la mitad (sobró cerca del 2.7 g/L). La formación de acetatos comenzó a las 10 h alcanzando 0.7 g/L al final del cultivo. Finalmente, fue analizada la producción de pDNA (Figura 9 C), el máximo rendimiento específico fue 15.5 mg/g a las 10 h, la acumulación de pDNA empezó ligeramente antes de la fase estacionaria de crecimiento y luego decayó. El rendimiento volumétrico en el medio T2 fue 1.7 y 4.7 veces mayor que lo obtenido con los medios ZMY505m y LB, respectivamente (Figura 7 y 9), los rendimientos volumétricos fueron aceptables con el medio T2, siendo una buena alternativa para la producción de plásmidos a 37°C. El porcentaje de sc-pDNA fue cercano a 80% para todas las muestras (Figura 9 D).

Una vez comprobada la producción del plásmido pVAX-NH36 en el medio T2 a condiciones estándar, se realizaron ensayos de inducción de la producción aumentando la temperatura del cultivo.

4.4.2. Efecto del incremento de temperatura del cultivo en la producción de pDNA

Para inducir la producción específica del plásmido pVAX-NH36 al cambiar la temperatura del cultivo a 42°C, se probó incrementar la temperatura a diferentes etapas de crecimiento, por lo que se aumentó la temperatura a 42°C cuando los cultivos de *E. coli* DH5α transformados con pVAX-NH36 y crecidos en medio T2, alcanzaron diferentes densidades ópticas, y se tomaron muestras para construir las cinéticas de crecimiento y producción del plásmido.

A OD = 2 que corresponde a 3 h de cultivo, el rendimiento fue de 3.35 g/L a las 12 h, y alcanzó su máximo a las 10 h de cultivo (7 h de inducción), mostrando el máximo rendimiento específico y volumétrico 19.14 mg/g y 57.12 mg/L, respectivamente (Figura 10 A). A OD = 4 que se refiere a 4 h de cultivo, el rendimiento final del cultivo fue de 3.63 g/L (13 h), y a 5 h de inducción se alcanzó el máximo rendimiento específico y volumétrico, de 18.28 mg/g y 57.12 mg/L. (Figura 10 B). Posteriormente a OD = 6 que corresponde a 5 h de cultivo, el rendimiento final del cultivo fue de 3.57 g/L (14 h), el máximo rendimiento volumétrico fue a las 7 h de inducción de 57.12 mg/L (Figura 10 C). Finalmente a OD = 7 que corresponde a 6 h de cultivo, el rendimiento final del cultivo fue de 3.23 g/L (15 h), mientras que a las 11 h de cultivo (5 h de inducción) se alcanzó el máximo rendimiento específico y volumétrico, 20.74 mg/g y 61.88 mg/L (Figura 10 D).

Se alcanzaron los máximos rendimientos con la OD =7, esta condición corresponde al final de la fase de crecimiento exponencial, por esto se repitió el experimento y se monitoreó el pH, consumo de la fuente de carbono, formación de acetatos y producción de plásmidos (Figura 11). Dentro de los resultados se observó que el crecimiento celular en los cultivos inducidos fue menor a lo obtenido a 37°C, el oxígeno disuelto cayó

rápidamente y el pH final fue de 5.43, similar a lo observado para cultivos a 37°C (Figura 11 A). También se determinó el consumo de la fuente de carbon y la formación de acetatos (Figura 11 B), la glucosa se agotó a las 2 h, mientras que el glicerol disminuyó hasta 0.75 g/L a las 15 h, la última fuente de carbono en consumirse fue la lactosa, el consumo fue lento y sólo se consumió la mitad (2.5 g/L). Más interesante fue la formación de acetatos, ésta comenzó inmediatamente después del cambio de temperatura a las 7 h del cultivo y a las 15 h alcanzó 1.47 g/L, casi dos veces mayor que los cultivos a 37°C. Finalmente, se analizó la producción de pDNA (Figura 11 C), los rendimientos específico y volumétrico incrementaron después del cambio de temperatura (lo indica la flecha a las 6 h de cultivo), hasta 66.0 mg/L después de 5 h de inducción (tiempo de cultivo 11 h), después disminuyeron los rendimientos hasta 41.8 mg/L a las 9 h de inducción; estos datos indican que inclusive en matraces la producción de pDNA puede ser inducida con el cambio de temperatura, y el tiempo óptimo de inducción fue de 5 h, esto corresponde a lo analizado en otros reportes (Wong y col., 1982, Ongkudon y col., 2011, Sánchez-Casco y col., 2013). Los rendimientos volumétricos fueron 6.4 veces mayores a lo obtenido con LB, y el porcentaje de sc-pDNA para todos los cultivos fue alrededor de 80% (Tabla 12).

Se incrementaron los rendimientos específicos y volumétricos del plásmido pVAX-NH36 con la estrategia de inducción de la producción utilizando los medios ZMY505m y T2, los rendimientos fueron de 66 mg/L, además el tiempo de cultivo se redujó con el medio T2, de 17 h a 11 h. Para determinar los incrementos de la producción de otros plásmidos clonados en el pVAX1, se clonaron pVAX-PFO, pVAX-CP4, pVAX-CP112 y pVAX-ADH y se produjeron los plásmidos en los medios LB y T2.

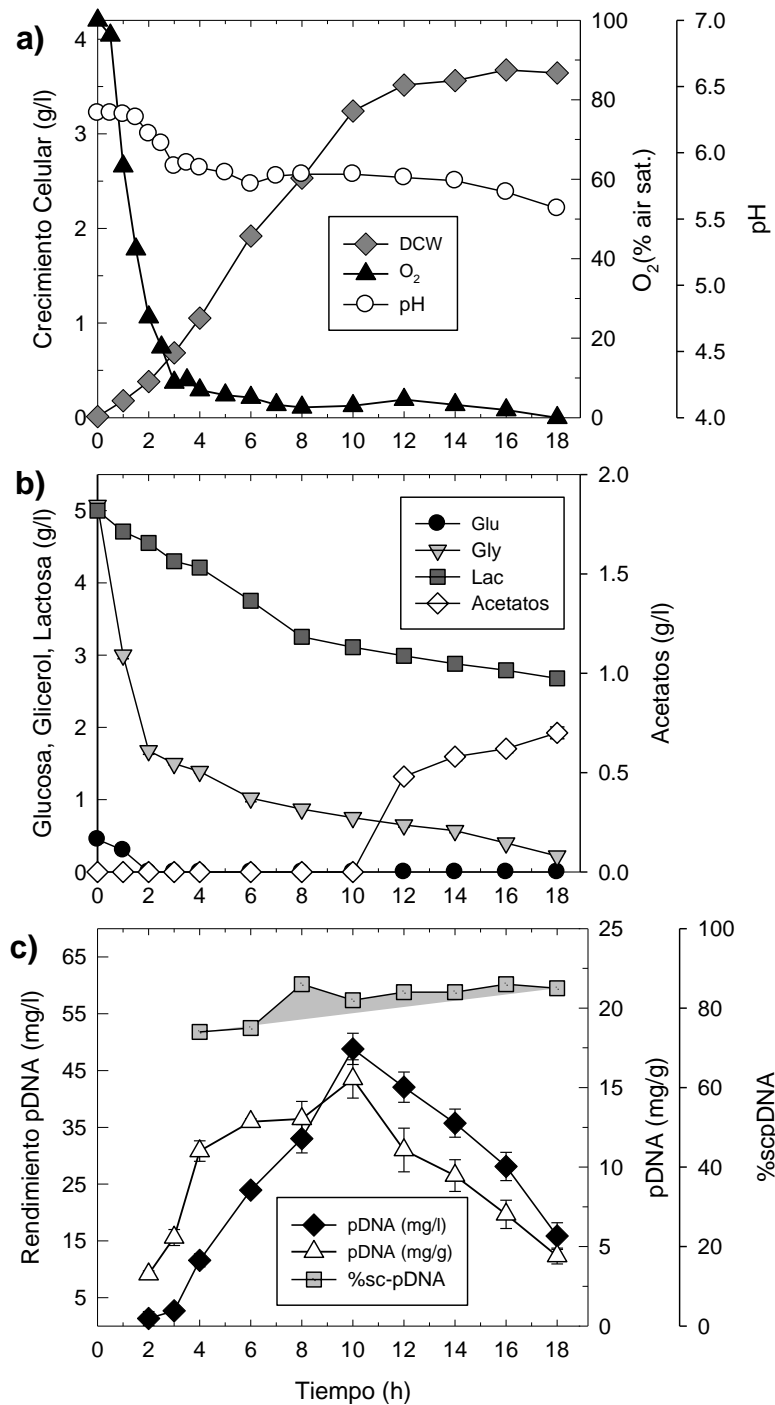


Figura 9. Producción de pVAX-NH36 en medio T2 a 37°C.

E. coli DH5 α fue transformada con pVAX-NH36 y crecida en matraces a 37°C y 200 rpm por 18 h, (A) se midieron continuamente y se registraron cada 30 o 60 min el porcentaje de oxígeno disuelto (triángulos blancos) y pH (círculos blancos). (B) Se tomaron muestras cada 2 h para determinar el consumo de fuente de carbono como glucosa (círculos blancos), glicerol (círculos negros) y lactosa (triángulos blancos). (C) Se obtuvieron los perfiles de rendimientos específicos (círculos blancos) y volumétricos (círculos negros) de pDNA y porcentaje de sc-pDNA (triángulos blancos).

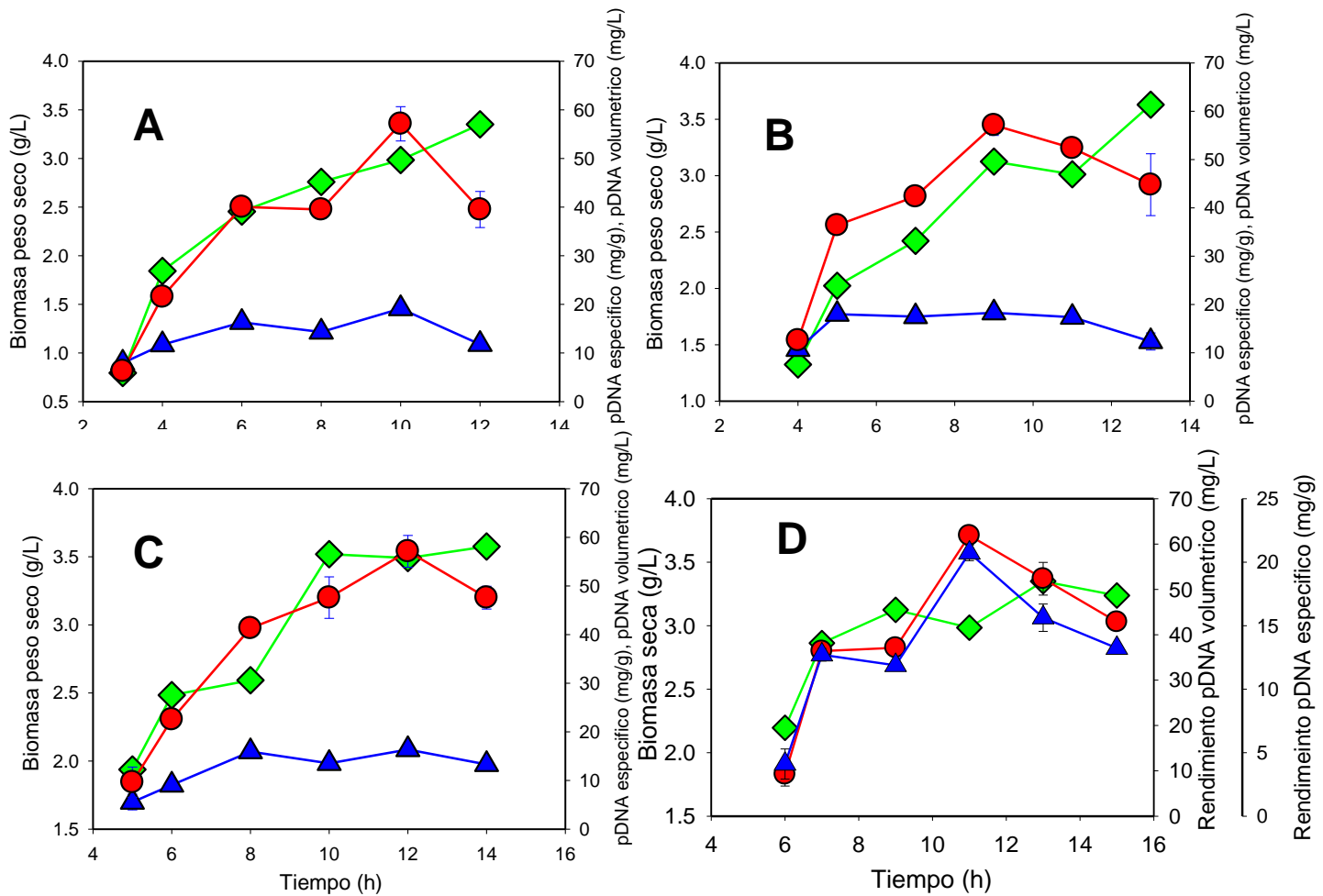


Figura 10. Efecto del incremento de la temperatura en la producción del plásmido pVAX-NH36 en el medio T2

Se indujo la producción del plásmido pVAX-NH36 en el medio T2 a diferentes etapas del crecimiento de *E. coli* DH5 α , OD = 2 (panel A), OD = 4 (panel B), OD = 6 (panel C) y OD = 7 (panel D), en la inducción se incrementó la temperatura a 42°C. Se tomaron muestras de 1 mL a 0, 1, 3, 5, 7 y 9h de inducción, por triplicado. Se construyeron las cinéticas de crecimiento en peso seco (g/L; rombos verdes), de rendimiento específico (mg/g; triángulos azules) y volumétrico (mg/L; círculos rojos).

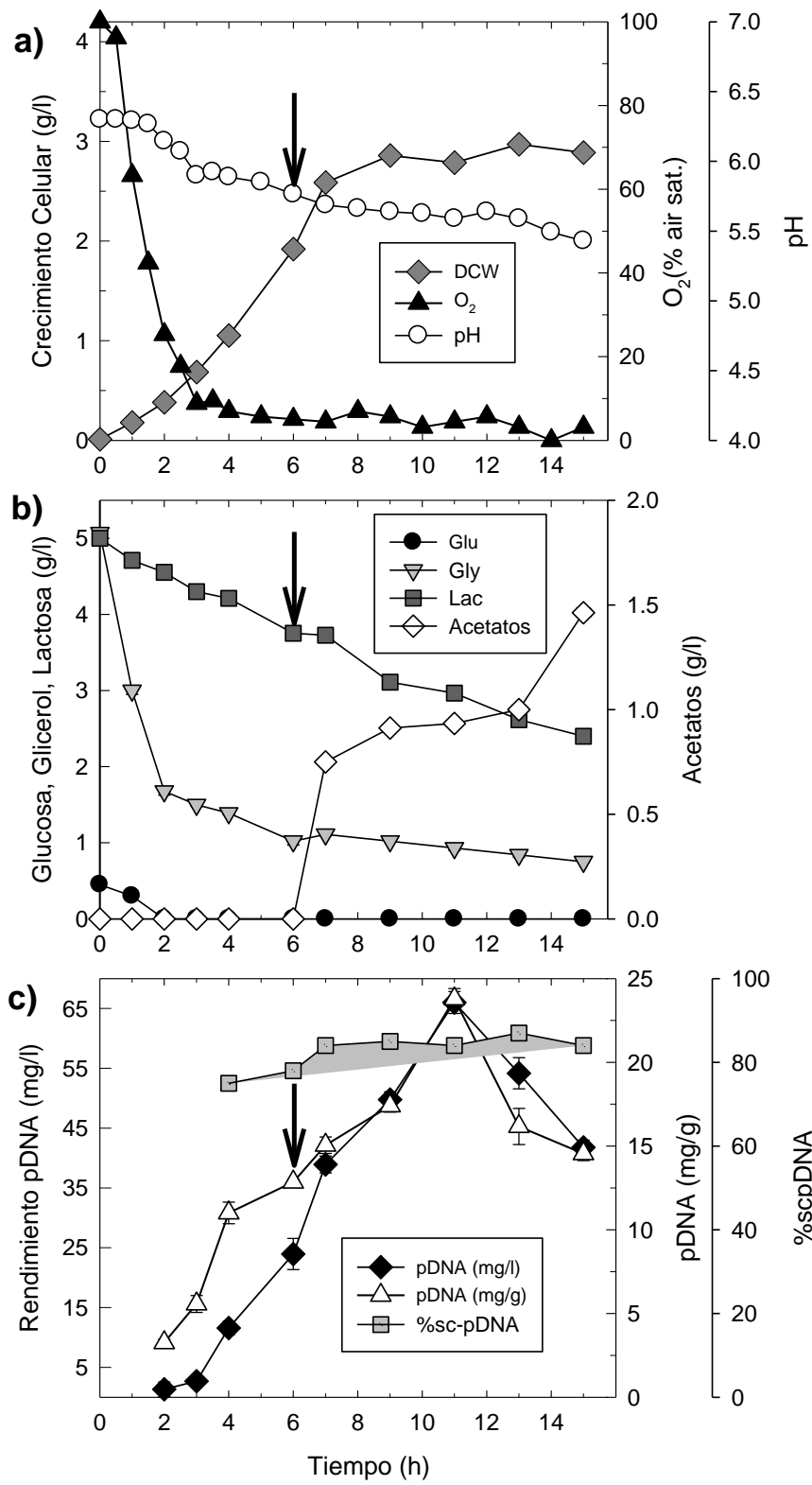


Figura 11. Producción de pDNA en el medio T2 con inducción por temperatura

E. coli DH5 α fue transformada con pVAX-NH36 y crecida en matraces a 37°C y 200 rpm con cambio de temperatura a 42°C por 9 h, (A) se midieron continuamente y se registró el porcentaje de oxígeno disuelto (triángulos blancos) y pH (círculos blancos) cada 30 o 60 min. (B) Se tomaron muestras cada 2 h para determinar el consumo de fuente de carbono como glucosa (círculos blancos), glicerol (círculos negros) y lactosa (triángulos blancos). (C) Se obtuvieron los perfiles de rendimientos específicos (círculos blancos) y volumétricos (círculos negros) de pDNA y % de sc-pDNA (triángulos blancos).

4.5 Validación de la producción de vacunas de DNA

4.5.1 Clonación del DNA que codifica para los antígenos EhCP112, ADH112, PFOA, TvCP4

Se clonaron cuatro genes que codifican para diferentes antígenos contra enfermedades producidas por parásitos en el pVAX1, los cinco antígenos propuestos para este trabajo fueron NH36, EhCP112, ADH112, PFOA, TvCP4; por las características de estos antígenos y la necesidad de probar su respuesta inmunológica, se llevó a cabo la producción de estos plásmidos en el medio T2 (Tabla 11).

La proteína EhCPADH está formada por EhCP112 (una cisteína proteasa) y ADH112 (una adhesina), estos polipéptidos están involucrados en el efecto citopático de *Entamoeba histolytica*, la adherencia a la célula blanco y la fagocitosis. Los antígenos EhCP112 y EhADH112 se clonaron en el vector pcDNA3, para probarse como vacunas de DNA (pcDNA-EhCP112 y pcDNA-EhADH112) y se determinó una respuesta inmune a nivel de anticuerpos en hamsters (Madriz y col., 2004). Por otro lado, la PFO A piruvato: ferredoxín oxidoreductasa A de *Trichomonas vaginalis* puede ser localizada en la superficie del parásito y participar en la citoherencia de *T. vaginalis* y es inducida por altas concentraciones de hierro (en 250 μ M) (Moreno-Brito y col., 2005, Meza-Cervantes y col., 2011). Finalmente la TvCP4 es una cisteína proteasa de *T. vaginalis* y es un factor de virulencia que participa en la hemólisis (Solano-González y col., 2007; Cárdenas-Guerra y col., 2013).

Para las clonaciones de CP112, ADH112 y TvCP4, se cambió el primer nucleótido para cumplir con la secuencia Kozak propuesta en el manual del vector pVAX1 (Manual Invitrogen 1998 - 2002), en éste se muestran los oligonucleótidos necesarios y los sitios adicionados para el corte con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, y la adición de un

codón de paro (Apéndice 2). Se seleccionó una clona de cada construcción y se linearizaron con la enzima de restricción *BamHI* (Figura 12 A), todos los tamaños del DNA linearizado coinciden con lo esperado para las diferentes construcciones de 4 a 5 kb. La amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de cada clonación (Figura 12 B), mostró la amplificación de pVAX-PFO con un tamaño de 1200 pb (carril 1), pVAX-NH36 y pVAX-CP4 con un tamaño menor de 1000 pb (carril 2 y 3), pVAX-CP112 con un tamaño de 1300 pb (carril 4) y pVAX-ADH de 1400 pb (carril 5), todos los tamaños de los fragmentos amplificados coinciden con lo esperado para las diferentes construcciones. Mientras que para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos correspondientes al vector pVAX1, T7 y BGH, se aumentaron 200 pb a cada fragmento amplificado (Figura 12 C). Adicionalmente se secuenció cada construcción; en el Apéndice 3 se muestra el alineamiento con las secuencias originales y las construcciones obtenidas al clonar en el vector pVAX1. En la secuencia se observan cambios en el aminoácido inicial debido a los cambios de nucleótidos que se hicieron con el objetivo de cumplir con la secuencia Kozak para que se sintetice la proteína en eucariontes y con esto obtener una respuesta inmunológica.

Con estas construcciones se realizaron ensayos para comprobar su producción en el medio LB y determinar si con el medio T2 se incrementan los rendimientos volumétricos, como en el caso de la producción del plásmido pVAX-NH36.

Tabla 11. Candidatos a vacunas de DNA contra enfermedades causadas por parásitos

Antígeno	Microorganismo	Tipo	Infección	Referencia
NH36 (936pb)	<i>L. donovani</i>	Nucleosil hidrolasa	Leishmaniasis	Santana y col., 2002
EhCP112 (1296pb)	<i>E. histolytica</i>	Cistein Proteinasa	Amibiasis	Madriz y col., 2004
ADH112 (1766pb)	<i>E. histolytica</i>	Adhesina	Amibiasis	Madriz y col., 2004
PFOA (1191pb)	<i>T. vaginalis</i>	Piruvato:Ferreodoxín Oxidoreductasa	Tricomonosis	Moreno-Brito y col., 2005
TvCP4 (915pb)	<i>T. vaginalis</i>	Cistein Proteinasa	Tricomonosis	Solano-González y col., 2007, Cárdenas-Guerra y col., 2013.

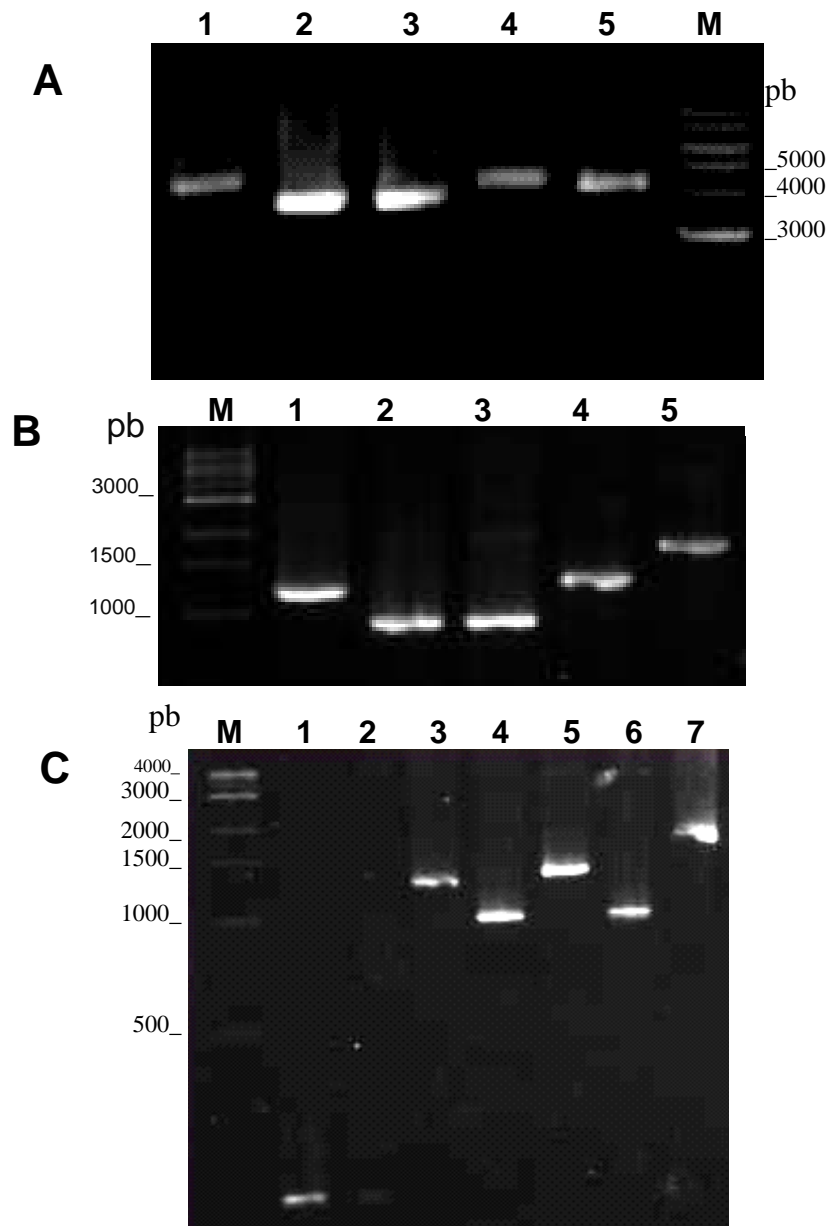


Figura 12. Análisis de las vacunas candidatas

Análisis de restricción de los plásmidos con la enzima *Bam*HI: A) clona ADH_7 (carril 1), clona CP4_9 (carril 2), pVAX-NH36 (carril 3), clona PFO_4 (carril 4), clonaCP112_4 (carril 5). Amplificación por PCR con los oligonucleótidos de cada construcción B) clona PFO_4 (carril 1), pVAX-NH36 (carril 2), clona CP4_9 (carril 3), clonas CP112_4 (carril 4), clona ADH_7 (carril 5). Amplificación por PCR con los oligonucleótidos del vector pVAX1 C) pVAX1 control positivo (carril 1), pVAX1 control negativo (carril 2), clona PFO_4 (carril 3), clona CP4_9 (carril 4), clona CP112_4 (carril 5), pVAX-NH36 (carril 6), clona ADH_7 (carril 7). Marcador de tamaño molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen) (Carril M).

4.5.2 Producción de plásmidos en los medios LB y T2

Para determinar los rendimientos volumétricos al producir el pDNA de los diferentes plásmidos, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α con pVAX-NH36, pVAX-CP4, pVAX-PFO, pVAX-CP112 y pVAX-ADH se crecieron e incubaron en medio LB y T2 a 37°C y 200 rpm por 14 y 18 h (Figuras 13 y 14, respectivamente). Se tomaron muestras del cultivo y se determinaron los perfiles de crecimiento celular, rendimientos específico y volumétrico.

En la producción de plásmidos en medio LB la velocidad de crecimiento fue similar para la producción de los cinco plásmidos entre 0.56 – 0.71 h⁻¹, el crecimiento celular fue similar entre 0.8 - 1 g/L, y la fase estacionaria de crecimiento se alcanzó entre 8 y 10 h (Figura 13 A). La mayor producción de pDNA para pVAX-PFOA se alcanzó a las 12 h y para los plásmidos restantes a las 10 h. De acuerdo a las cinéticas se puede afirmar que el comportamiento de las diferentes construcciones fue similar (Figura 13 B y C), los rendimientos volumétricos finales fueron de 8.5 – 11.1 mg/L. La producción de pDNA en el medio LB no mostró diferencias en el crecimiento ni en la producción de pDNA al variar el tamaño de los insertos.

Con respecto a la producción de las vacunas en medio T2, la velocidad de crecimiento fue similar para los cinco plásmidos entre 0.535 – 0.56 h⁻¹, el crecimiento mostró una fase de adaptación de 1 h mientras que la fase de crecimiento estuvo entre 2 y 10 h para los cinco cultivos. La fase estacionaria de crecimiento comenzó a las 10 h, el crecimiento celular final fue 3.5 veces mayor en comparación con LB (Figura 14 A). El máximo rendimiento específico se alcanzó a las 12 h, excepto para el plásmido pVAX-NH36 que fue a las 10 h (Figura 14 B). Los rendimientos volumétricos (Figura 14 C) llegaron a un máximo a las 12 h entre 25.36 y 46.07 mg/L (Tabla 12), posteriormente se observó una disminución en la

producción hasta 15 – 20 mg/L (18 h). Con el medio T2 se incrementó la producción del plásmido de 2.5 a 4 veces, siendo una buena alternativa para incrementar densidades celulares para la producción de cualquier plásmido tipo pUC.

Finalmente, se probó la inducción de la producción de los diferentes plásmidos clonados en el pVAX1 con el aumento de la temperatura de cultivo en la fase exponencial de crecimiento.

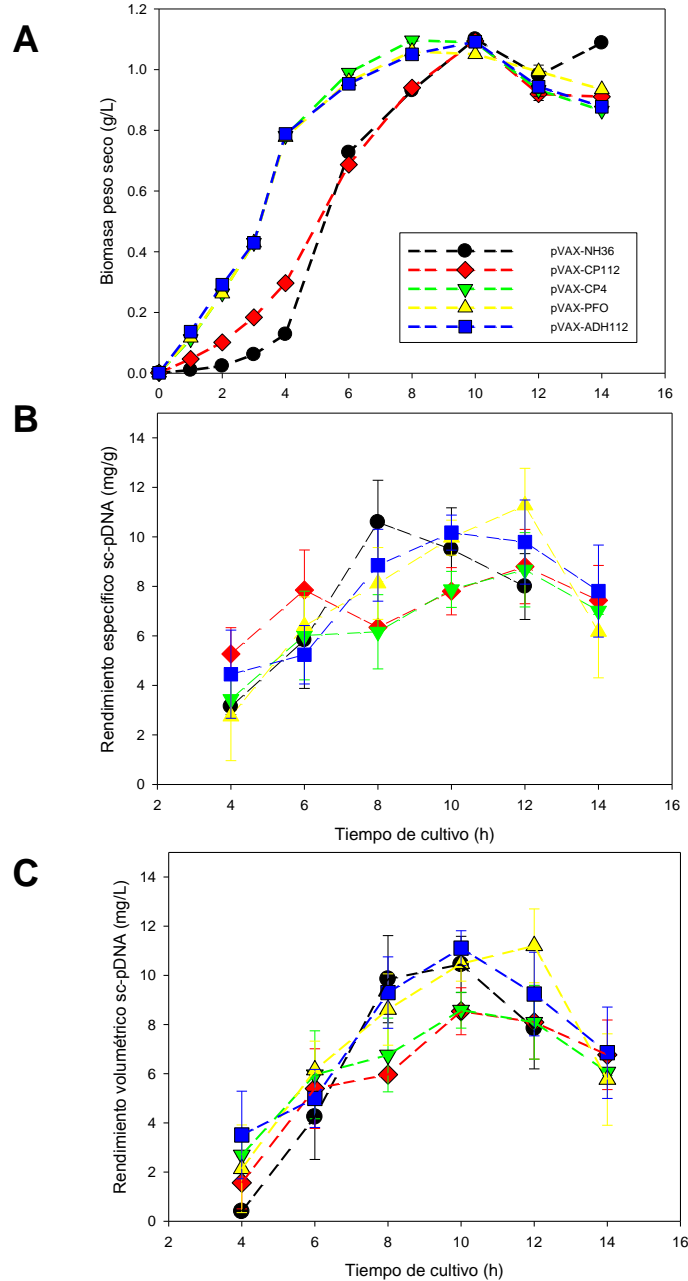


Figura 13. Producción de pDNA de varios candidatos a vacunas en medio LB

Las bacterias *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los plásmidos pVAX-NH36 (círculos negros), pVAX-CP112 (rombos rojos), pVAX-TvCP4 (triángulos invertidos verdes), pVAX-PFOA (triángulos amarillos) y pVAX-ADH (cuadros azules), y se crecieron en 30 mL de medio LB en matraces a 37°C y 200 rpm por 14 h. A) Cinética de crecimiento de la bacteria, B) Producción específica y C) Producción volumétrica de sc-pDNA. Los rendimientos específicos (mg/g) fueron determinados por densitometría en geles de agarosa 0.8%. Los rendimientos volumétricos (mg/L) se calcularon de la relación biomasa seca - rendimiento específico.

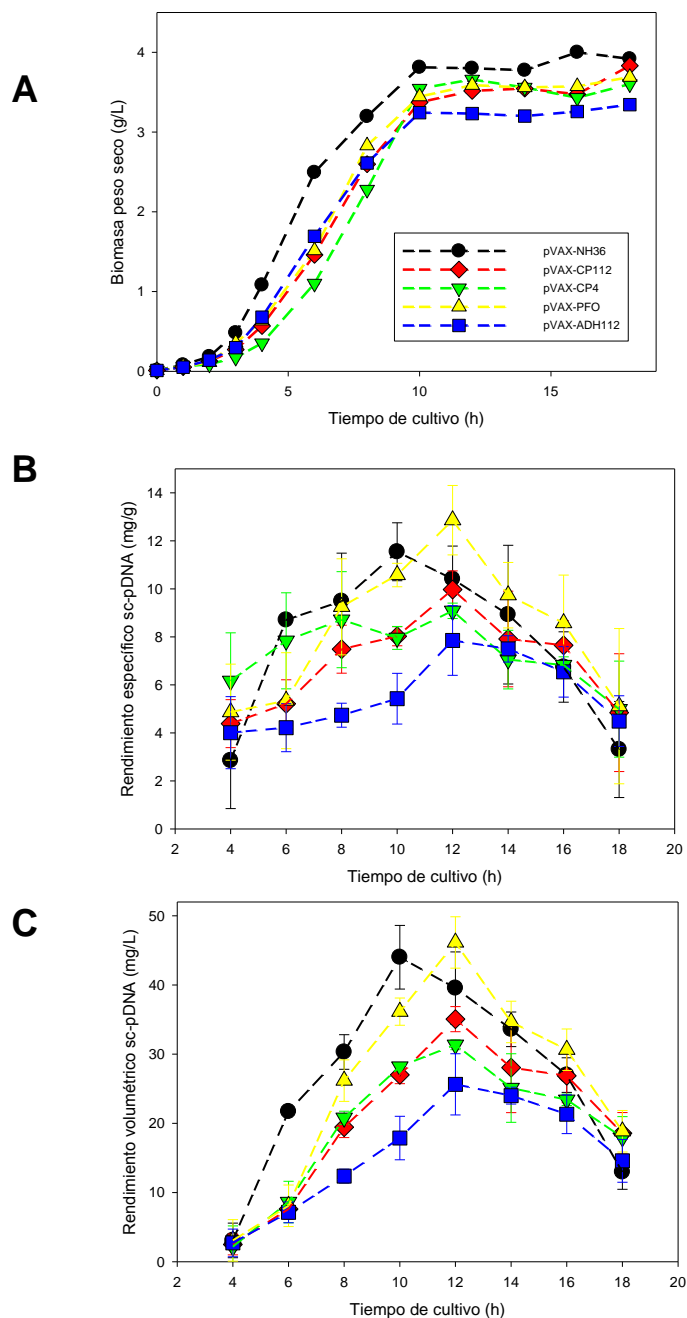


Figura 14. Producción de pDNA de varios candidatos a vacunas en medio T2

Las bacterias *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los plásmidos pVAX-NH36 (círculos negros), pVAX-CP112 (rombos rojos), pVAX-TvCP4 (triángulos invertidos verdes), pVAX-PFOA (triángulos amarillos) y pVAX-ADH (cuadros azules), y se crecieron en 30 mL de medio T2 en matraces a 37°C y 200 rpm por 18 h. A) Cinética de crecimiento de la bacteria, B) Producción específica y C) Producción volumétrica de sc-pDNA. Los rendimientos específicos (mg/g) fueron determinados por densitometría en geles de agarosa 0.8% y por fluorescencia. Los rendimientos volumétricos (mg/L) se calcularon de la relación biomasa seca - rendimiento específico.

4.5.3 Inducción de la producción de candidatos a vacunas en T2

Para inducir la producción de los plásmidos pVAX-TvCP4, pVAX-PFOA, pVAX-CP112 y pVAX-ADH se cambió la temperatura del cultivo de 37 a 42°C al final del crecimiento exponencial durante 5 h ó 3 h, utilizando el medio T2.

Los resultados para pVAX-NH36 mostraron que el crecimiento disminuyó a 3.37 g/L en las condiciones de inducción 42°C 3 h y 25°C 2 h. La fase de crecimiento fue similar para los dos tipos de inducciones (Figura 15 A y B). El máximo rendimiento específico fue a las 10 h y 11 h, los rendimientos volumétricos fueron 56.92 y 61.42 mg/L para las dos condiciones.

Mientras que la producción de pVAX-CP4 mostró que el crecimiento en la condición de 42°C 5 h (3.07 g/L, Figura 16 A) fue menor que al inducir 3 h a 42°C y bajar la temperatura 2 h a 25°C (4.14 g/L, Figura 16 B). Los rendimientos específico y volumétrico a las 4 h de inducción fueron de 13.45 mg/g y 41.28 mg/L (10 h de cultivo, Figura 16 A). Para la inducción a 42°C 3 h - 25°C 2 h el rendimiento específico máximo fue de 17.56 mg/g el rendimiento volumétrico máximo a las 5 h fue 64.4 mg/L (4 y 5 h de inducción, Figura 16 B).

Los resultados de inducción en el medio T2 para pVAX-PFO mostraron que el crecimiento celular fue similar (3.11 y 2.96 g/L), a las 11 h no se observó un término en la fase de crecimiento para la condición 42°C 5 h (Figura 17 A). Los rendimientos específicos aumentaron a partir de las 3 h (a 18 mg/g), los máximos rendimientos específico y volumétrico fueron 19.78 mg/g y 61.47 mg/L para 42°C 5 h (Figura 17 A). Mientras que para la condición de 42°C 3 h y 25°C 2 h se alcanzó 19.97 mg/g y 59.03 mg/L (Figura 17 B).

Los resultados de inducción en el medio T2 para pVAX-CP112 mostraron el crecimiento celular en la condición de 42°C a 5 h fue de 2.42 g/L (Figura 18 A), y para la condición de 42°C 3 h y 25°C 2 h el fue de 3.24 g/L (Figura 18 B). La fase de crecimiento fue similar para las dos condiciones de 2 a 10 h. Los máximos rendimientos específico y volumétrico fueron 16.33 mg/g y 39.53 mg/L para 42°C 5 h (Figura 18 A) y para la condición de 42°C 3 h - 25°C 2 h se alcanzó 19.64 mg/g y 63.60 mg/L (Figura 18 B).

Los resultados de inducción en el medio T2 para pVAX-ADH mostraron el crecimiento celular para la condición de 42°C 3 h y 25°C 2 h bajo el crecimiento (1.59 g/L, Figura 19 B). El mayor rendimiento específico y volumétrico fue a las 3 h cuando se cambio la temperatura a 42°C, los valores fueron 2.56 g/L, 21.11 mg/g y 54.08 mg/L (Figura 19 A y B), posteriormente los valores bajaron para las dos condiciones.

Se ha demostrado que la producción de sc-pDNA en cultivos en matraces se incrementó más de seis veces utilizando el medio semidefinido optimizado T2 y cambiando la temperatura de 37 a 42°C. Los rendimientos volumétricos finales se acercaron a los 60 mg/L y se incrementaron de 1.2 a 2 veces con respecto a la producción estándar de 37°C (Tabla 12), los máximos rendimientos específicos alcanzados fueron alrededor de 20 mg/g. También se observó que al incluir la condición de enfriamiento (25°C), después de una condición de 42°C se pueden incrementar los rendimientos de acuerdo a la secuencia del plásmido, como lo fue el caso de pVAX-CP4 y pVAX-CP112.

No se observó una relación directa del tamaño del plásmido y la producción de pDNA, también se analizaron las secuencias en cuanto a número de nucleótidos y la frecuencia de estos (Tabla 13), se analizó la frecuencia para los plásmidos, la frecuencia de C+G y

A+T para *nh36*, *pfoA* y *tvcp4* fue 0.5 y 0.5 aproximadamente, mientras que para *Ehcp112* y *Adh112* la frecuencia de C+G y A+T fue 0.3 y 0.7 (Tabla 13).

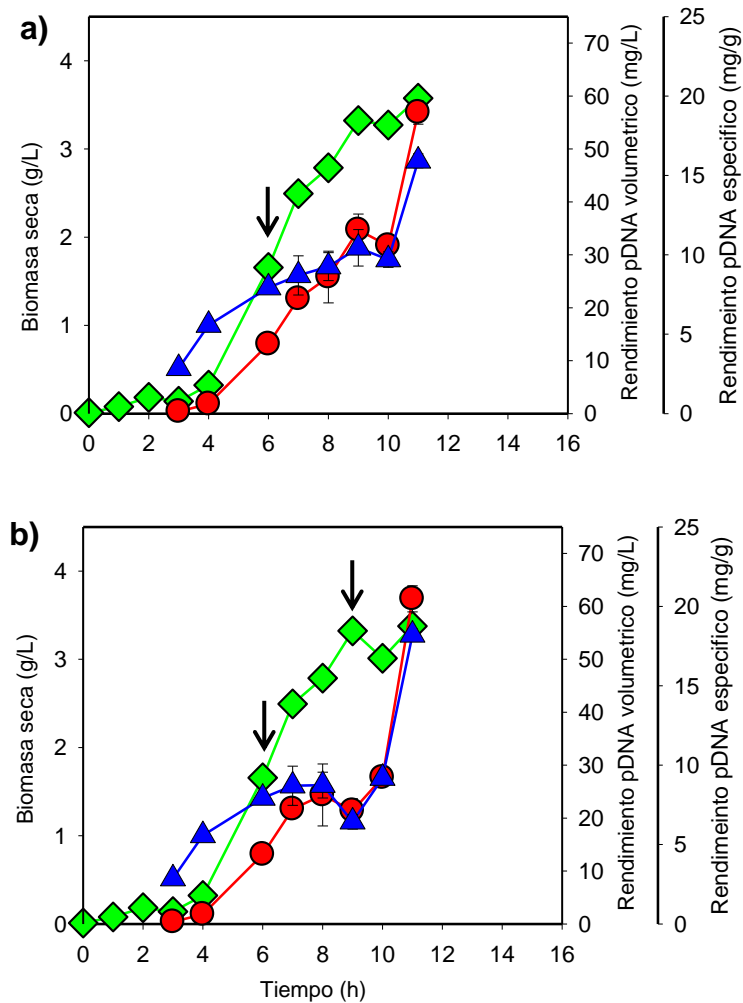


Figura 15. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-NH36
E. coli DH5a transformada con pVAX-NH36 se creció en 30 mL del medio T2 en matraces a 37°C y 200 rpm, por 5 h se indujo la producción de plásmidos por temperatura. Se tomaron muestras cada hora por triplicado, se construyeron los perfiles de crecimiento (rombos verdes, g/L), rendimiento específico (triángulos azules, mg/g) y volumétrico (círculos rojos, mg/L). A) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 5 h. B) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 3 h y 25°C 2 h.

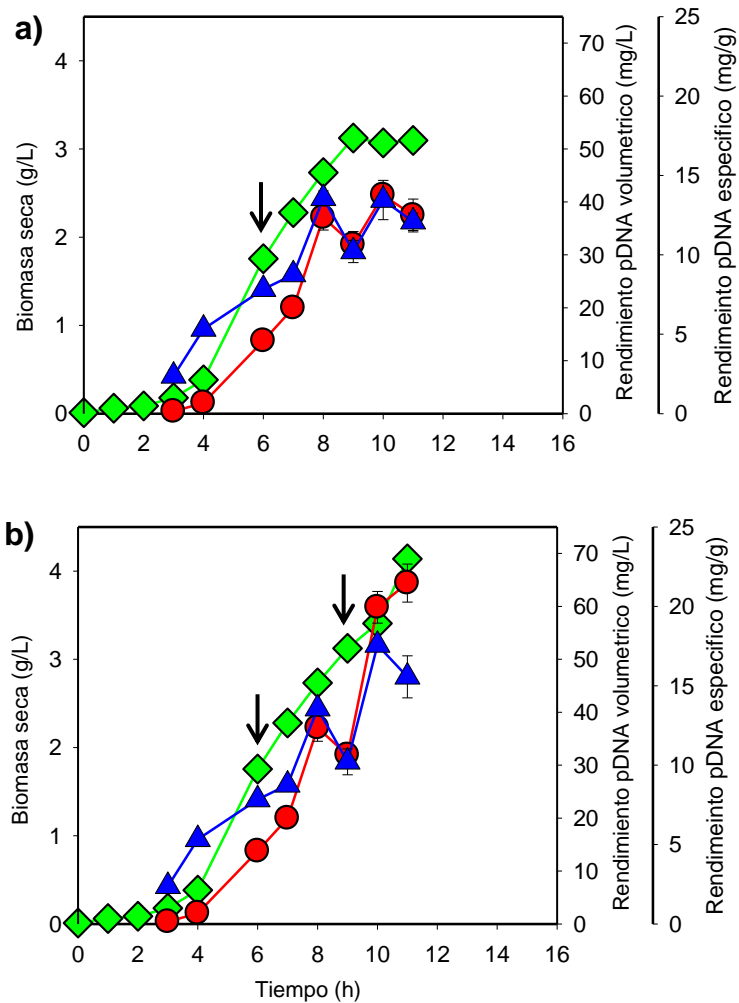


Figura 16. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-CP4
E. coli DH5 α transformada con pVAX-NH36 se creció en 30 mL del medio T2 en matraces a 37°C y 200 rpm, por 5 h se indujo la producción de plásmidos por temperatura. Se tomaron muestras cada hora por triplicado, se construyeron los perfiles de crecimiento (rombos verdes, g/L), rendimiento específico (triángulos azules, mg/g) y volumétrico (círculos rojos, mg/L). A) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 5 h. B) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 3 h y 25°C 2 h.

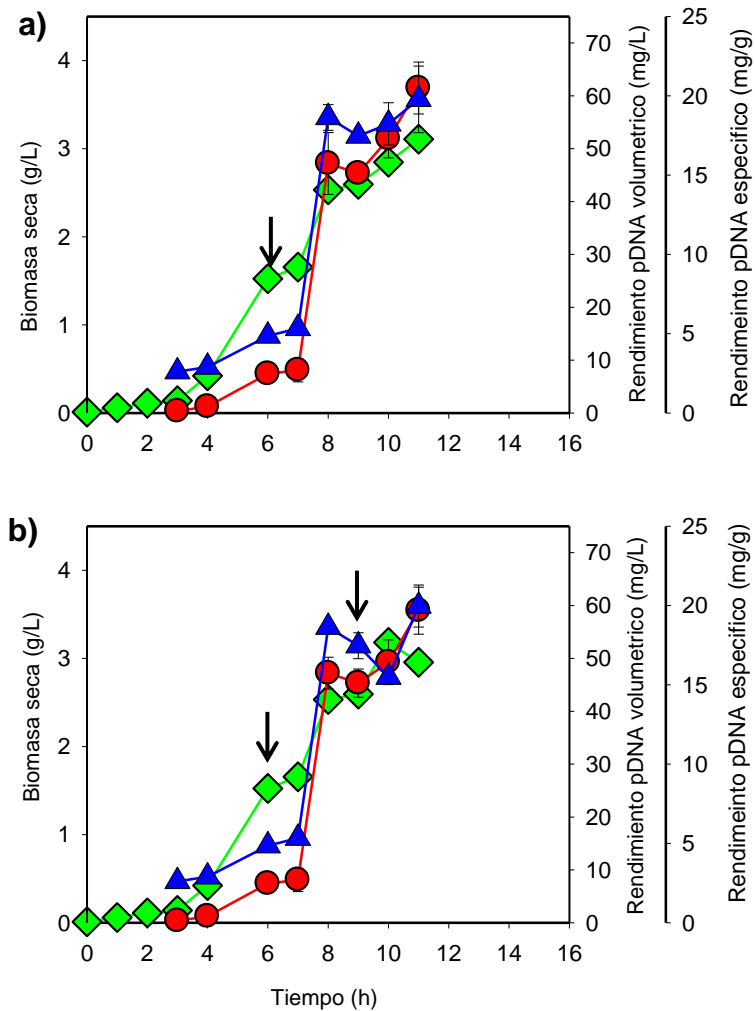


Figura 17. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-PFO
E. coli DH5 α transformada con pVAX-PFO se creció en 30 mL del medio T2 en matraces a 37°C y 200 rpm, por 5 h se indujo la producción de plásmidos por temperatura. Se tomaron muestras cada hora por triplicado, se construyeron los perfiles de crecimiento (rombos verdes, g/L), rendimiento específico (triángulos azules, mg/g) y volumétrico (círculos rojos, mg/L). A) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 5 h. B) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 3 h y 25°C 2 h.

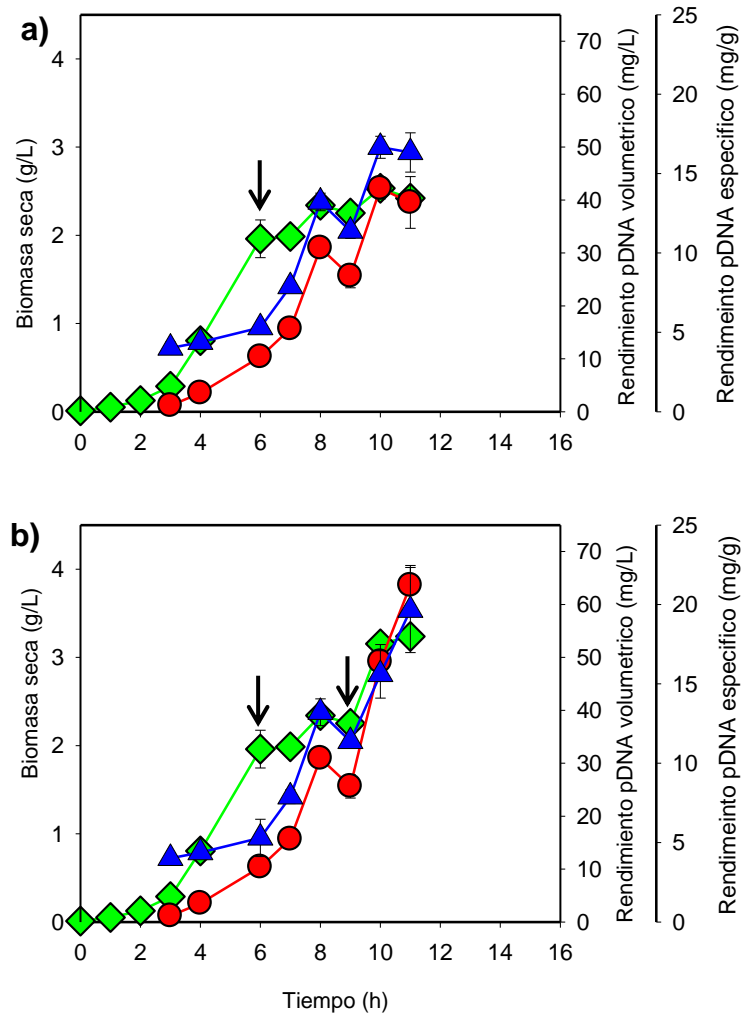


Figura 18. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-CP112
E. coli DH5 α transformada con pVAX-CP112 se creció en 30 mL del medio T2 en matraces a 37°C y 200 rpm, por 5 h se indujo la producción de plásmidos por temperatura. Se tomaron muestras cada hora por triplicado, se construyeron los perfiles de crecimiento (rombos verdes, g/L), rendimiento específico (triángulos azules, mg/g) y volumétrico (círculos rojos, mg/L). A) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 5 h. B) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 3 h y 25°C 2 h.

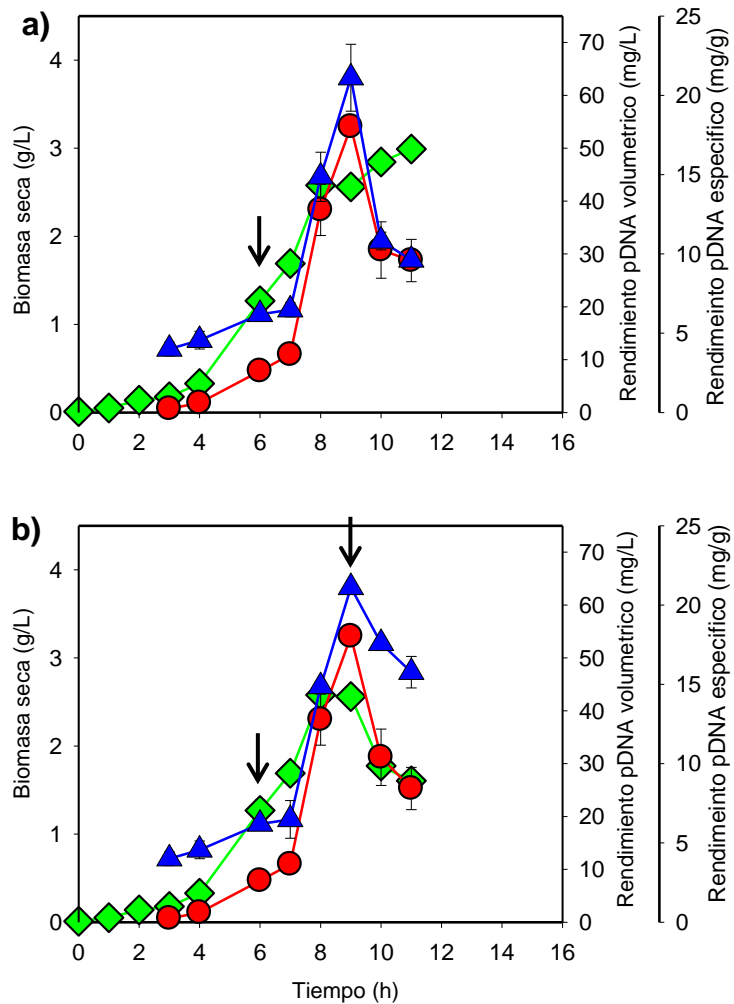


Figura 19. Efecto de cambios en la temperatura del cultivo en la producción de pVAX-ADH
E. coli DH5 α transformada con pVAX-ADH se creció en 30 mL del medio T2 en matraces a 37°C y 200 rpm, por 5 h se indujo la producción de plásmidos por temperatura. Se tomaron muestras cada hora por triplicado, se construyeron los perfiles de crecimiento (rombos verdes, g/L), rendimiento específico (triángulos azules, mg/g) y volumétrico (círculos rojos, mg/L). A) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 5 h. B) Aumento de temperatura de crecimiento de 37 a 42°C por 3 h y 25°C 2 h.

Tabla 12. Rendimientos de DNA plasmídico para vacunas candidatas

Plásmido	Medio	μ (h ⁻¹)	Crecimiento (g/L)	pDNA		pH	sc- pDNA (%)
				Específico (mg/g)	Volumétrico (mg/L)		
pVAX-NH36	LB	0.71	1.1±0.01	9.5±1.1	10.4±1.6	8.40	75
	T2 ^a	0.53	3.2 ±0.01	15.5 ±0.2	41.8 ±2.7	5.58	82
	T2 ^b		2.8 ±0.02	23.8 ±0.4	66.0 ±2.2	5.43	84
pVAX-CP4	LB	0.63	1.09±0.01	7.9±0.6	8.6±0.7	9.26	72
	T2 ^a	0.56	3.7 ±0.01	9.5 ±0.3	34.7 ±0.7	5.60	75
	T2 ^b		4.1 ±0.01	16.7 ±0.5	68.5 ±3.1	5.54	78
pVAX-PFO	LB	0.62	1.05±0.01	11.0±0.8	10.5±0.7	9.23	75
	T2 ^a	0.54	3.6 ±0.01	13.9 ±1.4	50.0 ±3.6	5.75	80
	T2 ^b		3.1 ±0.01	21.1 ±2.0	65.5 ±4.9	5.59	78
pVAX-CP112	LB	0.61	1.09±0.01	7.8±0.9	8.5±1.0	9.10	73
	T2 ^a	0.56	3.5 ±0.02	10.7 ±0.8	37.5 ±1.8	5.70	77
	T2 ^b		3.2 ±0.01	21.0 ±1.2	67.8 ±4.8	5.44	81
pVAX-ADH	LB	0.57	1.09±0.01	10.2 ±1.0	11.1 ±1.1		73
	T2	0.56	3.2 ±0.01	7.9 ±0.5	25.6 ±4.2		80
	T2		1.6 ±0.01	15.8 ±0.9	25.3 ±4.0		78

Las células se cultivaron 30 mL de medio LB o T2 en matraces de 250 mL a 37°C y 200 rpm. Los datos representan la media ± SD de tres réplicas. Los tamaños de los plásmidos fueron de 915 a 1300 pb. ^a Para la incubación a 37°C el rendimiento máximo fue obtenido a las 12 h, con excepción de pVAX-NH36 donde el máximo fue a 10 h. ^b Para la incubación a 37°C (6 h) con cambio de temperatura a 42°C al final de la fase exponencial de crecimiento por 5 h, el rendimiento máximo de pDNA fue obtenido a las 11 h. La μ fue determinada antes del incremento de temperatura.

Tabla 13. Nucleótidos de los fragmentos clonados en el pVAX1

Nucleótidos	NH36	PFOA	TvCP4	EhCP112	EhADH112
Adenina (A)	194	323	228	456	713
Citosina (C)	264	342	265	187	249
Guanina (G)	302	266	217	213	285
Timina (T)	185	263	208	437	519
C + G	566 (0.599)	608 (0.509)	482 (0.525)	400 (0.309)	534 (0.302)
A + T	379 (0.401)	586 (0.491)	436 (0.475)	896 (0.691)	1237 (0.698)

Entre paréntesis se muestra la frecuencia de los nucleótidos en la secuencia

4.6 Producción y purificación de plásmidos con el “kit Plasmid Select Xtra”

Una vez determinadas las condiciones de crecimiento en el medio T2 para los diferentes plásmidos, los cultivos se escalaron a 1 L de medio T2 en matraces Fernbach de 2800 mL, las bacterias se lisaron con 250 mL (de soluciones 1, 2 y 3), la concentración inicial de sc-pDNA fue de 80%. Para la purificación de los plásmidos se utilizó un protocolo de tres pasos cromatográficos: filtración en gel, cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico (Figura 20).

En la Figura 21 se muestra el perfil de elución para la purificación de pVAX-NH36 por filtración en gel, se corrieron dos ciclos de purificación para separar el DNA del RNA (Figura 21 A), para cada ciclo se observan dos picos el primero corresponde a DNA y el segundo a RNA, las fracciones se analizaron con geles de agarosa (Figura 21 B), se eligieron las fracciones libres de RNA (f1 – f3, f31 - f33). Posteriormente las isoformas de pDNA fueron separadas por cromatografía de afinidad, primero se eluyeron las fracciones de oc-pDNA (pico pequeño) y enseguida las fracciones de sc-pDNA (figura 22 A), éstas se analizaron con geles de agarosa (Figura 22 B), se seleccionaron las fracciones libres de oc-pDNA (f4 – f8). Finalmente, se realizó un paso de refinamiento del sc-pDNA con una columna de intercambio iónico (Figura 23 A), el sc-pDNA eluido mostró una pureza de 95 %. Las fracciones se analizaron con geles de agarosa (Figura 22 B), y se eligieron las que presentaban mayor cantidad de sc-pDNA (f1 – f8). Para formular la vacuna se realizó un cambio de amortiguador (buffer) por ultrafiltración por una solución isotónica. Esta solución se filtró con una membrana de 0.22 μm y se liofilizó para su posterior reconstitución y uso en experimentos en animales de laboratorio.

Para la purificación de otros plásmidos se realizaron ensayos de purificación, inicialmente la recuperación era de 15 % y posteriormente se recuperó un 62%. En la Tabla 14 se

muestran los rendimientos de purificación para los plásmidos pVAX-TvCP4, pVAX-PFO o pVAX1, los rendimientos volumétricos fueron de 51.7 mg/L a 37°C y alcanzaron hasta 69.4 mg/L con inducción por temperatura (37 – 42°C), la pureza fue superior del 97% independientemente del tamaño del plásmido. La recuperación final fue superior a 40 %, con lo que se purificaron más de 25 mg de cada plásmido para posteriores ensayos en animales. Los perfiles cromatográficos y recuperación de los plásmidos de la Tabla 14, fueron similares a lo reportado previamente (Lemmens y col., 2003).

En este proceso de purificación nos hemos enfrentado con diversos retos como el volumen del lisado, mejorar rendimientos finales de sc-pDNA y se ha observado que un punto crítico es la concentración del lisado y la filtración en gel, las concentraciones finales que se han alcanzado son de 226 µg/mL y es deseable que éstas aumenten. Sin embargo, hemos perdido producto en este paso de concentración, además, si no se almacena correctamente se observa un precipitado. Recientemente, los plásmidos pcDNA3-TSA1, pCDNA3-TC24 y pCDNA3 fueron producidos utilizando *E. coli* XL1 y se purificaron siguiendo el mismo protocolo descrito en este trabajo, los rendimientos plasmídicos en la solución de lisis fueron entre 47 a 59 mg/L, los rendimientos de recuperación finales fueron 25 - 48 % y la pureza final fue de 97% para todos los plásmidos, estos plásmidos se utilizaron en ensayos inmunológicos contra la enfermedad de Chagas en perros (Quijano-Hernández y col., 2013).



Figura 20. Purificación de plásmidos con el kit Plasmid Xtra Select

Las bacterias fueron tratadas por lisis alcalina y se pasaron por una columna empacada con la resina 10 Sepharose (cromatografía de exclusión molecular) para separar el DNA del RNA, las muestras libres de RNA se pasaron por la columna empacada con la resina Plasmid Select Xtra (cromatografía de afinidad) para separar el oc-pDNA (plásmido abierto circular) y sc-pDNA, por último la muestra se pasó por la columna empacada con la resina SOURCE 30Q (cromatografía de intercambio iónico) para obtener sc-pDNA.

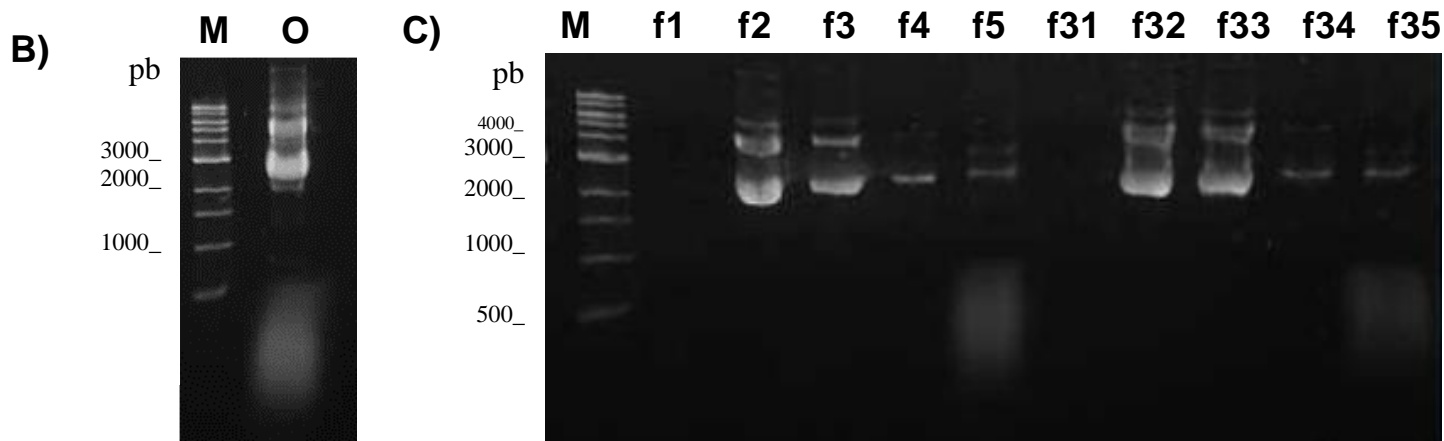
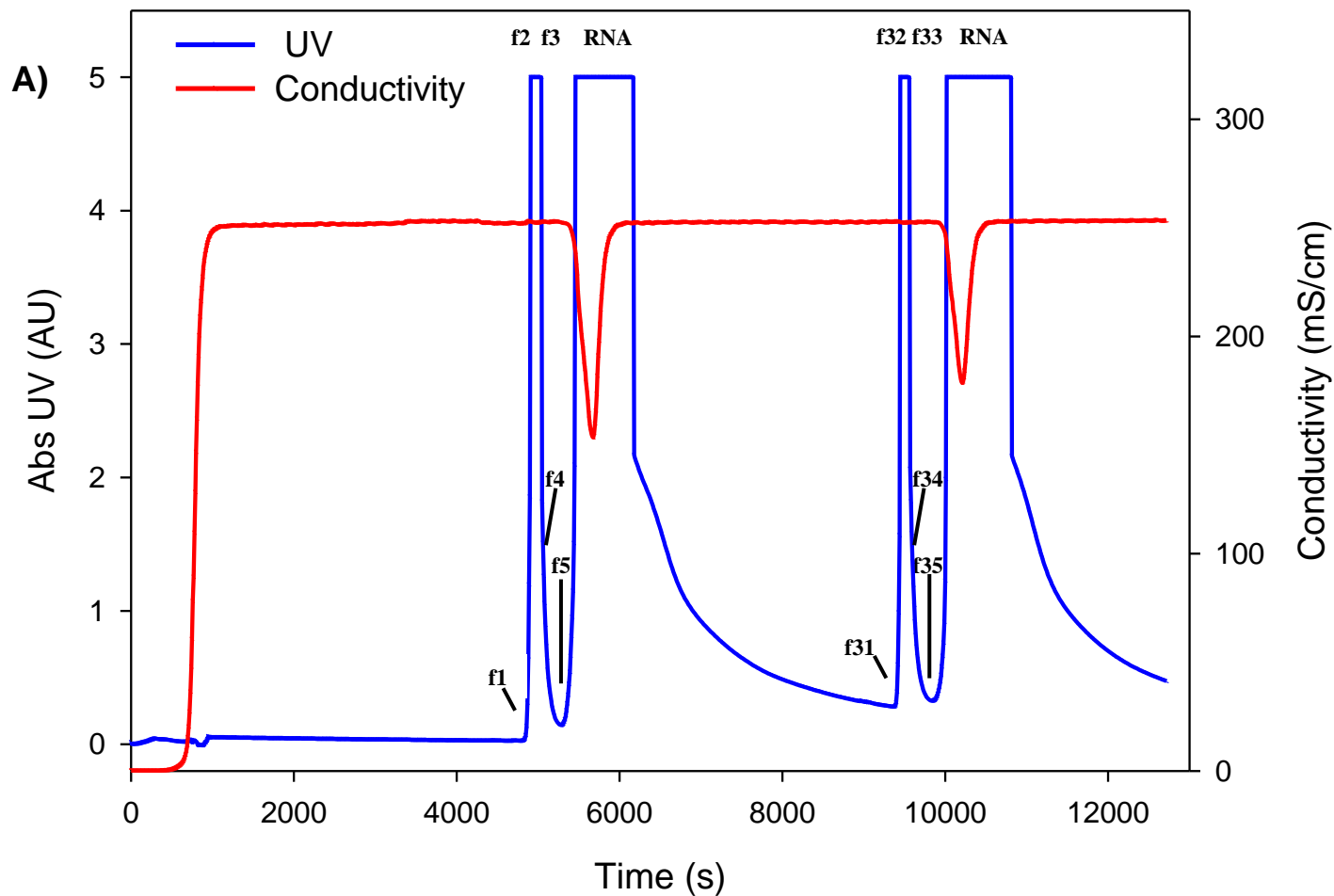


Figura 21. Purificación del plásmido pVAX-NH36 por cromatografía de Exclusión Molecular

El DNA se separó del RNA por cromatografía de exclusión molecular, Panel A) corrida 1 carriles f1 - f5 colección de fracciones 1, 2, 3, 4 y 5, corrida 2; carriles f 31 – 35 colección de fracciones 31, 32, 33, 34 y 35. En azul se muestra la señal de absorbancia en AU, en rojo la conductividad en mS/cm. Panel B) Análisis de las fracciones carril M marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), carril O muestra original de lisis. Panel C) Carril M marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) y se analizaron las fracciones f1 - f5 y f31 - f35.

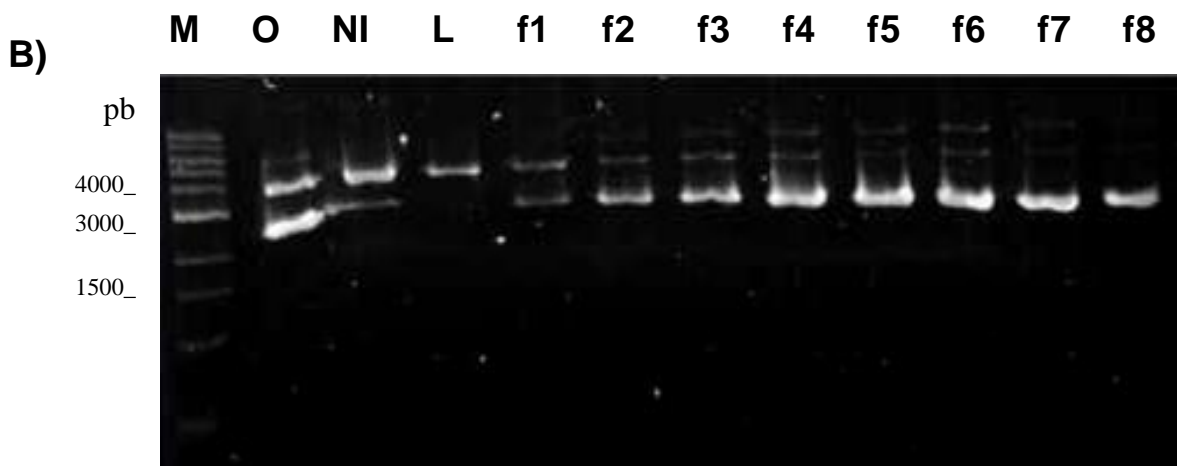
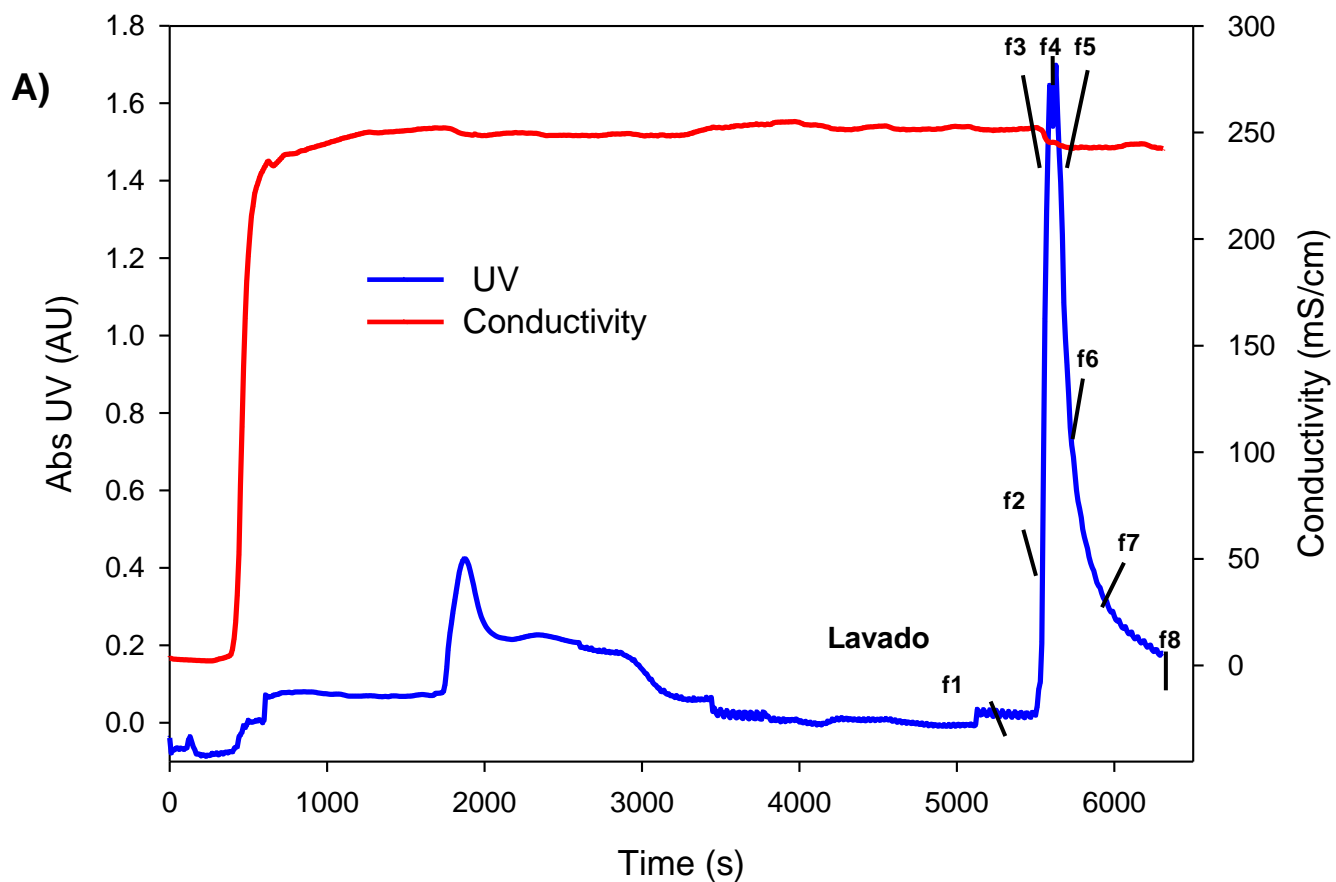


Figura 22. Purificación del plásmido pVAX-NH36 por Cromatografía de Afinidad

Las isoformas del pDNA se separaron por cromatografía de afinidad, panel A) se observan las fracciones recolectadas de la cromatografía 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de 4 mL. En azul se muestra la señal de absorbancia en AU, en rojo la conductividad en mS/cm. Panel B) Análisis de las fracciones carril M marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), carril O muestra original (proveniente de filtración en gel), carril NI fracción que no interactuó con la columna, carril L lavado de la columna, fracciones colectadas carriles f1 – f8.

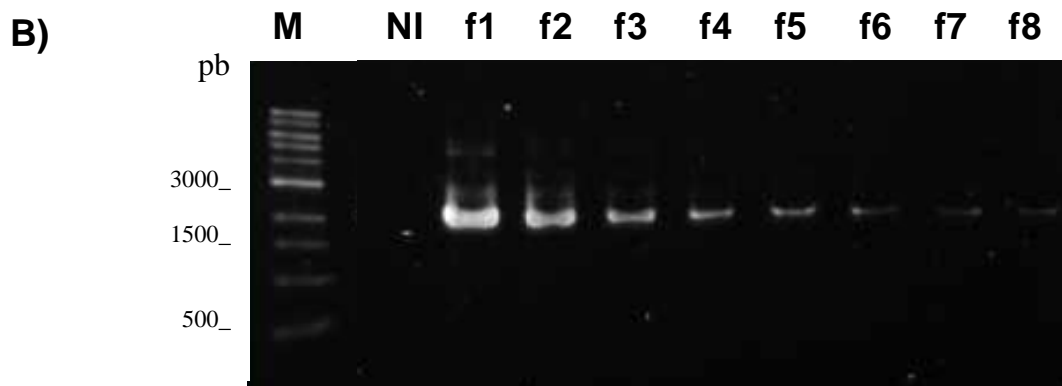
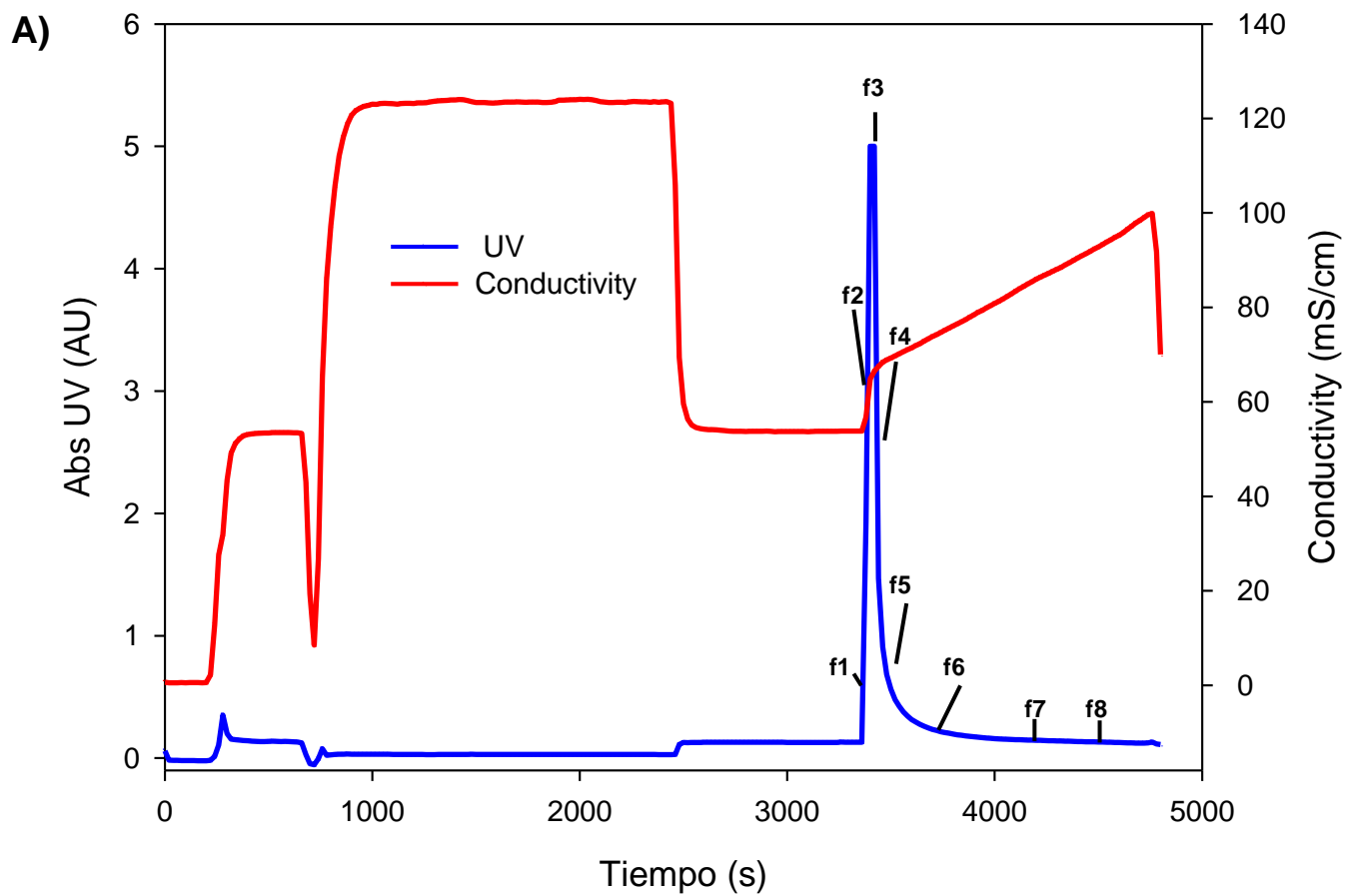


Figura 23. Purificación del plásmido pVAX-NH36 cromatografía de intercambio iónico

Para el pulido de la purificación del sc-pDNA las muestras se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, panel A) se observan las fracciones recolectadas de la cromatografía 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de 4 mL cada una. En azul se muestra la señal de absorbancia en AU, en rojo la conductividad en mS/cm. Panel B) Análisis de las fracciones carril M marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), carril NI fracción que no interactuó con la columna, fracciones colectadas carriles f1 – f8.

Tabla 14. Purificación de pDNA por cromatografía

Plásmido	Tamaño (pb)	Lisis (mg)	FG (mg)	CA (mg)	IEC (mg)	sc-pDNA ^a (%)	Recuperación (%)
pVAX-NH36 ^b	3945	63.5	52.7	30.5	26.7	97	42.0
pVAX-PFO ^b	4191	69.4	60.0	50.5	42.3	97	61.0
pVAX-TvCP4 ^c	3915	51.7	40.6	32.6	25.4	97	48.9
pVAX1 ^c	3000	58.8	45.3	40.7	36.5	98	62.5

Las células fueron cultivadas en matraces Fernbach con 1 L de medio T2 a 200 rpm, 37°C. ^a El contenido inicial aproximado de sc-pDNA fue de 80% para todos los cultivos. ^b Los cultivos fueron incubados a 37° C por 6 h y se cambió la temperatura a 42°C por 5 h. ^c Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 12 h.

FG – Filtración en Gel

CA – Cromatografía de afinidad

IEC – Cromatografía de Intercambio Iónico

4.7 Producción e inducción de pVAX-NH36 en bioreactor

Por último se realizaron ensayos para la producción de plásmidos en bioreactor con 2.5 L de medio T2, primero se comenzó la fermentación con un 96% de oxígeno disuelto y este disminuyó a 30% y así se mantuvo durante todo el cultivo, las velocidades de agitación fueron de 300 a 700 rpm a 37°C por 20 h, para mantener el porcentaje de oxígeno disuelto. Se tomaron muestras cada 2 h para determinar biomasa y producción del plásmido. Se tomaron muestras y se determinaron las cinéticas de crecimiento, producción específica y volumétrica de pDNA (figura 24).

Para la producción de pVAX-NH36 en bioreactor, la fase estacionaria comenzó a las 16 h, en este tiempo se observó el máximo rendimiento volumétrico de 77.07 mg/L. Sin embargo, no se observó un máximo en el rendimiento específico, esto difiere al comportamiento observado en la producción en matraces. Los rendimientos específicos aproximados fueron de 5.46 mg/g menores a lo obtenido en matraces. El pH inicial del medio fue de 6.8 y el pH final fue de 7.8, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.62h^{-1} .

Adicionalmente se realizaron experimentos para determinar la inducción de la producción de pDNA al cambiar la temperatura de crecimiento de 37 a 42°C, *E. coli* DH5 α - pVAX-NH36 se creció en 2.5 L de T2 a 37°C por 12 h y cuando el cultivo alcanzó OD de 30, se cambió la temperatura de 37 a 42°C por 5 h. Se tomaron muestras cada hora para determinar el crecimiento y la producción del plásmido. El crecimiento celular fue 15.8 g/L similar a lo obtenido a 37°C (14 g/L), los rendimientos específicos aproximados fueron de 6.41 mg/g ligeramente superiores que a 37°C, el rendimiento volumétrico final fue de 100.98 mg/L (datos no mostrados).

De lo anterior podemos concluir que en bioreactor es posible inducir la producción de pDNA (incremento aproximado de 1.3 veces); sin embargo, se necesitan más experimentos en bioreactor para determinar cuáles son las condiciones óptimas para la inducción.

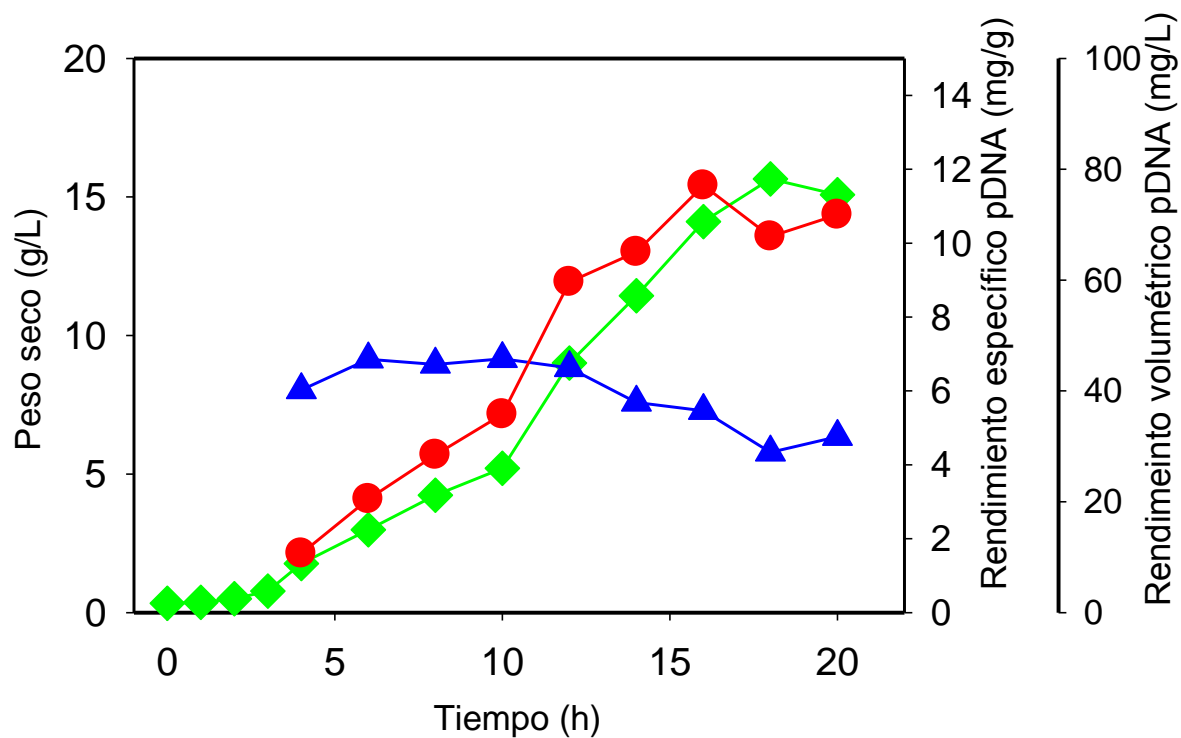


Figura 24. Producción en bioreactor con el medio T2 para la vacuna pVAX-NH36

E. coli DH5 α transformadas con pVAX-NH36 se crecieron en un bioreactor con 2.5 L de medio T2 por 20 h. Se construyó la cinética de crecimiento (g/L, rombos verdes), de rendimientos específico (mg/g, triángulos azules) y volumétrico (mg/L, círculos rojos).

Capítulo 5
DISCUSIÓN

5. Discusión

La investigación de nuevas vacunas de DNA requiere incrementar los rendimientos de producción de plásmidos en matraces para facilitar el desarrollo de diversas vacunas de DNA. Por ejemplo, contra la leishmaniasis, al conocer el genoma de otras cepas como *Leishmania major*, se identificaron nuevos antígenos candidatos (Herrera-Najera y col., 2009), por lo que es necesario producir grandes cantidades de plásmido (varios miligramos), con pureza superior al 95% de acuerdo a especificaciones de la FDA (FDA, 1996). Debido al gran potencial terapéutico y preventivo que representan las vacunas de pDNA y la necesidad de probar nuevos antígenos, en este trabajo se probaron diferentes alternativas para incrementar los rendimientos de producción de DNA plasmídico en matraces y la purificación de varios miligramos de sc-pDNA por métodos cromatográficos.

En este trabajo en los primeros ensayos de producción se probaron diferentes velocidades bajas en la producción de los plásmidos pVAX-NH36 y VR1012-NH36 debido a que se sugieren velocidades de crecimiento de sc-pDNA (Lin-Chao y col., 1992; O'Kennedy y col., 2003; Carnes, 2005), en este trabajo se estableció la condición de 200 rpm y las velocidades específicas de crecimiento fueron de $0.528 - 0.708 \text{ h}^{-1}$ similares a lo reportado para cultivos en matraces (O'Kennedy y col., 2000; Danquah y col., 2007).

Para mejorar la producción de sc-pDNA se probaron los medios LB, SDCAS y ZMY505, nuestros rendimientos en LB y SDCAS fueron similares a lo reportado (O'Kennedy y col., 2000; Wang y col., 2001), mientras que el máximo rendimiento volumétrico se obtuvo con el medio ZMY505 (22.5 a 24.8 mg/L), debido a que produjo mayor cantidad de células, por lo tanto el rendimiento volumétrico final fue mayor (Studier, 2005). El pH final de SDCAS (5.2) y de ZMY505 (5.4 – 5.9) indicó que hubo una acumulación de acetato al final del

cultivo, similar a lo reportado por Zheng y col. (2007), por tal motivo en experimentos posteriores se determinó la producción de acetato. Se eligió el medio ZMY505 para optimizar los elementos traza por medio de un diseño Plackett-Burman, se propusieron nueve tratamientos, de los cuales el tratamiento 5 mostró un mayor rendimiento (37 mg/L), con esto se obtuvo el medio **ZMY505m**. A pesar de que los rendimientos volumétricos de ZMY505m son menores que otros estudios, la calidad del pDNA es similar a lo reportado utilizando *E. coli* DH5 α (Duttweiler y col., 1998; Wang y col., 2001; Zheng y col., 2007). Por lo que para mejorar estos rendimientos se realizaron estudios de inducción de la producción del plásmido al incrementar la temperatura, esto para aprovechar el origen de replicación de los plásmidos VR1012 y pVAX1, tipo pUC.

Se observaron ligeras diferencias en la producción de pVAX-NH36 (4 kb) con respecto a VR1012-NH36 (6 kb), en cada sistema la producción de plásmido es diferente y al afectarse el crecimiento celular, incrementar el número de copias, el tamaño de plásmido o sobreexpresar genes (DaSilva y col., 1986; Bentley y col., 1989). Además, la carga metabólica extra disminuye los recursos para la replicación del plásmido y el crecimiento celular en *E. coli* (Huber y col., 2008).

Para los plásmidos pVAX-NH36 y VR1012-NH36, el máximo rendimiento específico de pDNA fue obtenido a 37°C (10.67 a 13.67 mg/g) y estos incrementaron a 21 mg/g para pVAX-NH36 y 18 mg/g para VR1012-NH36 con un perfil de sc-pDNA mayor a 80% para ambos plásmidos. Estos rendimientos volumétricos de pDNA fueron similares a lo obtenido con el medio definido M1 formulado con aminoácidos y nucleósidos (Wang y col., 2001), y cerca de tres veces mayor que con el medio PDMR (Danquah y col., 2007). Zheng y colaboradores (2007), también sin inducción por temperatura, reportaron

rendimientos de pDNA de 51.80 mg/L pero con tiempos de incubación mayores de 24 h comparados con las 16 h de este trabajo. Además, Duttweiler y colaboradores (1998) reportaron una producción arriba de 109 a 87 mg/L de pDNA. No obstante, estos rendimientos fueron obtenidos sólo para dos plásmidos utilizando otras cepas de *E. coli*, pero al utilizar *E. coli* DH5 α con seis plásmidos, usando un medio altamente amortiguado llamado H15 y tiempos de incubación de 24 – 30 h o incluso 48 h, se obtuvieron rendimientos de pDNA de 12.6 – 48 mg/L que fueron menores a lo reportado en este trabajo.

A pesar de que Studier (2005) recomendó una concentración de fosfatos de 100 mM, previno que altas concentraciones incrementan la fuerza iónica y esto puede afectar el crecimiento celular, y Ongkudon (2011) reportó mejores rendimientos utilizando una concentración de 130 mM de fosfatos (Na_2HPO_4). Sin embargo, en el actual trabajo se realizaron experimentos y no se observaron diferencias en los rendimientos volumétricos al utilizar fosfatos a 50 o 100 mM (Na_2HPO_4 and KH_2PO_4) en el medio ZMY505m, por esto se utilizaron como variables “dummy”.

Se realizó una optimización posterior de los componentes restantes del medio de cultivo con un diseño experimental Taguchi (Chang y col., 2006). El diseño Taguchi es una buena opción para optimizar la producción, por ejemplo de amilasas en *Aspergillus* (Kammoun y col., 2008). Además se identifican componentes y optimizan concentraciones del medio de cultivo con varios experimentos (Wei y col., 2007). El extracto de levadura (Wang y col., 2001; Xu y col., 2005), la lactosa (Studier, 2005) y el magnesio (Schmidt y col., 2003) tuvieron un efecto positivo significativo en el rendimiento volumétrico; a pesar de que la glucosa y los casaminoácidos (Studier, 2005) tuvieron un efecto significativo en

el crecimiento celular y el cloruro de amonio (Carsten y col., 2004) y el glicerol en los rendimientos específicos. En combinación no se observó un incremento en los rendimientos volumétricos de pDNA. Nueve tratamientos mostraron rendimientos volumétricos superiores al control ZMY505m (Sánchez-Casco y col., 2013), siendo T2 el mayor (41.9 mg/L).

Por otro lado, al producir el pVAX-NH36 en el medio T2 a 37°C no se observó una fase lag y la glucosa fue agotada a las 2 h. Posteriormente, las células utilizaron otras fuentes de energía como glicerol o lactosa (Duttweiler y col., 1998). Las células crecieron rápidamente con la glucosa pero a grandes concentraciones ésta produce bastante acetato el cual es tóxico a 5 g/L (Luli y col. 1990). Las concentraciones de acetato al producir plásmidos en el medio T2 fueron consistentes con el crecimiento de DH5α en cultivo en matraces cerca de 0.6 g/L (Borja y col. 2012). Para evitar la producción de acetato se utilizan medios reducidos en glucosa o cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería (Borja y col. 2012). A las 2 h también cayó el pH y el % de oxígeno disuelto, este comportamiento se ha observado en otros trabajos llegando a 0 a las 4 h (Tissot y col., 2013). El pH y la oxigenación están relacionados ya que ésta previene una rápida caída de pH por el tipo de fermentación (Duttweiler y col 1998), en este trabajo el pH solo cayó una unidad y el valor final de 5.6 fue similar a lo reportado con cultivo en matraces (Zheng y col., 2007; Sánchez-Casco y col., 2013).

Para las cuatro construcciones restantes clonadas en el vector pVAX1, el rendimiento volumétrico a 37°C se incrementó entre 2.6 y 4.6 veces comparado con lo obtenido en el medio LB (10 mg/L). El mayor rendimiento fue el del plásmido pVAX-PFO (50.0 mg/L a 80% sc-pDNA), mientras que con pVAX-TvCP4 (915 pb de menor tamaño) se obtuvieron 34.7 mg/L (75 % sc-pDNA). No se observó una correlación directa entre el tamaño de los

plásmidos y/o la frecuencia de los nucleótidos con los rendimientos específicos o volumétricos; no se ha podido predecir como se afectan los rendimientos al afectar el crecimiento de la bacteria o la replicación de DNA (Yee Yau y col., 2008). Como en el caso de la producción de pVAX-NH36, la fase estacionaria comenzó entre las 10 y 12 h a 37°C, a este tiempo los plásmidos se acumularon y mostraron los máximos rendimientos (Wang y col., 2001, Danquah y col., 2007, Sánchez-Casco y col., 2013).

En este trabajo se realizaron experimentos de inducción por temperatura, ya que el VR1012 y pVAX1 cuentan con la mutación puntual de G a A y tiene suprimida la proteína rom/rop (Yanisch – Perron y col., 1985, Lin-Chao y col., 1992) esto afecta el número de copias del plásmido de 3 a 4 veces (Minton 1984; Chambers y col., 1988) al incrementar la temperatura a 42°C, lo cual no se observa al mantener la temperatura del cultivo a 30°C (Lahijani y col., 1996). En este trabajo se realizaron ensayos cambiando la temperatura de 30 a 42°C. Sin embargo no se observó una inducción aparente (datos no mostrados) contrario a lo reportado para lote alimentado donde se observó una mayor inducción a esta condición (Wong y col., 1982; Carnes y col., 2006). Similar a lo ocurrido en la producción de 37°C, al inducir la producción de pVAX-NH36 en el medio T2 no se observó una fase lag y la glucosa fue agotada a las 2 h, posteriormente las células utilizaron otras fuentes de energía como glicerol o lactosa (Duttweiler y col., 1998). Las células crecieron rápidamente con la glucosa pero a grandes concentraciones ésta produce bastante acetato el cual es tóxico a 5 g/L (Luli y col., 1990).

Al incrementar la temperatura del cultivo de 37 a 42°C también aumentó la producción de acetato debido a la sobreproducción o limitación de oxígeno (Duttweiler y col., 1998; Wolfe, 2005), por lo que se utilizan medios reducidos en glucosa o cepas de *E. coli*

modificadas por ingeniería (Borja y col., 2012). A las 2 h también cayó el pH y el % de oxígeno disuelto, este comportamiento se ha observado en otros trabajos llegando a 0 a las 4 h (Tissot y col., 2013). El pH y la oxigenación están relacionados, ya que ésta previene una rápida caída de pH por el tipo de fermentación (Duttweiler y col., 1998), nuestro pH sólo cayó una unidad y el valor final de 5.4, un valor menor al reportado en cultivos a 37°C pero similar a lo reportado en matraces después de 24 o 18 h (Zheng y col., 2007; Sánchez-Casco y col., 2013).

Los máximos rendimientos específicos (20 mg/g) se detuvieron a las 5 h y después cayó la producción de pDNA, este comportamiento es consistente con lo observado por Wong y col., donde una mutante del plásmido ColE1 (pEW2762) mostró un aumento en el número de copias de 30 a 40 veces a las 4 h, luego a las 6 h se observó una disminución en el número de copias posiblemente debido al decremento de la viabilidad a 42°C (Wong y col. 1982). Se sabe que los rendimientos específicos y volumétricos dependen del tipo de plásmido, el número de copias, el tamaño del gen, las condiciones de crecimiento del cultivo y de la temperatura de inducción (Lahijani y col., 1996; Chen y col., 1997).

Los rendimientos volumétricos al cambiar la temperatura de 37 a 42°C para los cinco plásmidos utilizando el medio T2 fueron aproximadamente de 65.0 mg/L, lo cual es superior a los rendimientos obtenidos con otros medios especializados para plásmidos (Duttweiler y col., 1998; Wang y col., 2001; Danquah y col., 2007; Zheng y col., 2007; Ongkudon y col., 2011). Por ejemplo, dos medios definidos basados en un modelo estequiométrico (con aminoácidos y nucleósidos) M1 y M2, produjeron 60 mg/L y 30 mg/L, respectivamente (Wang y col. 2001), y reemplazando los nucleósidos y aminoácidos con extracto de levadura y peptona, se obtuvieron rendimientos de 14.6 mg/L con el medio

PDM, y al optimizar la relación C/N se alcanzó una producción de 23.8 mg/L para el pUC19 en matraces con el medio PDMR (Danquah y col., 2007). Sin embargo, al producir plásmidos que contienen genes de interés inmunológico se afecta el crecimiento celular y por lo tanto los rendimientos volumétricos finales (DaSilva y col., 1986). Para la producción del plásmido pcDNA3F se optimizó el medio de cultivo por RSM y se obtuvieron rendimientos de 13.65 mg/L en matraces de 500 mL, además el tiempo óptimo de inducción fue de 5 h (Ongkudon y col., 2011), este tiempo fue igual al obtenido en nuestro trabajo.

Por otro lado las inducciones con enfriamiento a 42°C por 3 h y 25°C por 2 h presentaron buenos rendimientos para pVAX-CP4 y pVAX-CP112, por lo que este tipo de inducción es una buena alternativa para los plásmidos que no presentan inducción aparente a 42°C (Williams y col., 2009). Williams y col. (2009) realizaron experimentos al bajar la temperatura a 10 o 25°C post-inducción a 42°C, se observó un incremento en el crecimiento celular hasta del doble con una post-inducción de 1 ó 2 h a 25°C en bioreactores en cultivos en lote con alimentación.

A diferencia de la purificación de proteínas separar polinucleótidos con base en las propiedades físicas es más complicado, los perfiles de purificación de los diferentes plásmidos fueron similares a lo reportado en la purificación de plásmidos utilizando el protocolo de tres cromatografías: filtración en gel, por afinidad y por intercambio aniónico (Lemmens y col., 2003).

El porcentaje de recuperación en este trabajo fue del 42 al 62.5% para los diferentes plásmidos, sin embargo, fueron ligeramente menores que con el manual GE (57 – 78%)

para columnas preempacadas o empacadas con resinas al escalar 30 veces (www.gehealthcare.com/). Estos rendimientos son similares a los obtenidos con protocolos con menos pasos para plásmidos de 8.8 kb, por cromatografía de intercambio aniónico y de afinidad con rendimientos de 65 – 76% (Hitchcock y col., 2010). Otros estudios no reportan los rendimientos de recuperación, pero sí la producción de 142 mg de plásmido con pureza mayor al 99% determinada por HPLC, y que la vacuna cumple con las especificaciones de FDA (Diogo y col., 2001).

Además, con este protocolo se purificaron y evaluaron las vacunas de DNA que codificaban para los antígenos TSA-1 y Tc24 en perros con infección aguda con *T. cruzi* como modelo, y fueron inmunizados con dos dosis de 500 µg, y se observó que las vacunas de DNA tuvieron un efecto tanto preventivo como terapéutico, y redujo la transmisión de parásitos y la progresión de la enfermedad de Chagas (Quijano-Hernández y col., 2013).

Por último, nuestros resultados para la fermentación en lote 100.98 mg/L con inducción con temperatura, fueron bajos en comparación con los rendimientos de otros trabajos de 230 mg/L (Schmidt y col., 2003) hasta 600 mg/L (Carnes, 2006). Esto puede ser por la utilizaron de vacunas modelo con genes para enfermedades específicas, lo cual evidentemente afecta la producción con respecto al plásmido desnudo (Carnes y col., 2006; Ongkudon y col., 2011). A pesar de que la inducción de la producción de pDNA es posible, en bioreactor se observó un incremento de 1.3 veces. Sin embargo, faltan más experimentos para determinar las condiciones óptimas para la inducción en bioreactor.

La producción de pDNA en bioreactores ha alcanzado rendimientos volumétricos de 2 a 2.6 g/L de plásmido en fermentaciones en lote alimentado (Phue y col., 2008; Carnes y col., 2011). Para llevar a cabo la inducción en los cultivos en lote con alimentación, los cultivos alcanzan densidades celulares de OD alrededor de = 30 a 60 en 35 h aproximadamente y densidades ópticas (OD) finales de 100 a 120, dependiendo el plásmido y el tipo de alimentación (Carnes y col., 2006). Por otro lado utilizando la estrategia de lote alimentado exponencialmente, se vio una diferencia al usar las cepas *E. coli* BL21 y la mutante *E. coli* BL21 recA- 259 mg/L y 2 g/L del plásmido pVRC5737Ap, respectivamente, mientras que utilizando *E. coli* DH5 α se obtuvieron 991 mg/L (Phue y col., 2008).

Capítulo 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6. 1 Conclusiones

Se analizó la producción de sc-pDNA al crecer *E. coli* DH5 α en tres medios de cultivo diferentes, al comparar los rendimientos totales se observó que el medio ZMY505 tuvo mayor producción de sc-pDNA, para ambos plásmidos VR1012-NH36 y pVAX-NH36.

Se seleccionó el medio ZMY505 para la optimización del medio de cultivo con los diseños experimentales Plackett-Burman y Taguchi, se formuló el medio ZMY505m con lo que se incrementó la producción de 2 a 4 veces con respecto a la producción en el medio ZMY505 y LB, respectivamente.

Al incrementar la temperatura de cultivo de 37 a 42°C en la fase exponencial se incrementaron los rendimientos seis veces, se obtuvieron rendimientos volumétricos hasta de 67 mg/L y rendimientos específicos de 21 mg/g y la calidad del pDNA fue mayor del 80% de superenrollamiento en cultivos en matraces, lo cual parece suficiente para la purificación de plásmidos candidatos a vacunas. Además, los rendimientos reportados en este trabajo fueron únicamente después de 11 h de incubación, incrementando las productividades de plásmido.

Con el protocolo de purificación propuesto de tres pasos cromatográficos, reportamos recuperaciones mayores de 40% de pDNA, con más de 95% de sc-pDNA (superenrollamiento).

Estos protocolos de producción y purificación representan una plataforma adecuada para obtener miligramos de pDNA puro para etapas iniciales en el desarrollo de vacunas de DNA.

6.2 Perspectivas

1. Estudiar las condiciones de producción de plásmidos de diferentes tamaños en bioreactor de 5 L a 37 °C para determinar las condiciones óptimas de crecimiento e incrementar los rendimientos específicos y obtener 11 mg/g como se observó en matraces.
2. Estudiar las condiciones de producción de plásmidos en bioreactor de 37 a 42°C para determinar las condiciones óptimas de inducción de los rendimientos específicos como se observó en matraces.
3. Estudiar y modificar cepas de *E. coli* para evitar inhibición por sustrato e incrementar la producción de los plásmidos.
4. Determinar la respuesta inmunoprotectora e inmunoterapéutica de los plásmidos pVAX-NH36, pVAX-PFO, pVAX-CP4, pVAX-CP112 y pVAX-ADH en ratones u otro modelo.

Capítulo 7
BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Be, Da Silva Zardo, Souza, Borja-Cabrera, Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis, *Inf. Imm.* 2005, 73 (2), 812 -819

Ahuja S. K., G. M. Ferreira, A. R. Moreira, Application of Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology to Achieve Exponential Growth for Aggregated Shipworm Bacterium, *Biotech Bioeng*, 2004 VOL. 85, NO. 6

Bentley, W. E. and Kompala, D. S. 1989. A novel structured kinetic modeling approach for the analysis of plasmid instability in recombinant bacterial cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 49-61

Bimboim H.C y Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7: 1513 - 1523

Bondioli Paolo, Laura Della Bella, An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2005, 107: 153–157

Borja Gheorghe M, Eugenio Meza Mora, Blanca Barrón, Guillermo Gosset, Octavio T Ramírez and Alvaro R Lara, Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microbial Cell Factories* 2012, 11:132

Carnes A. E., Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA, *BioProcess Int.* 2005, 2 - 7

Carnes A. E., Hodgson C. P. y Williams J. A., Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2006, 45, 155 – 166

Carnes AE. 2008. Fermentation Process for Continuous Plasmid DNA Production. U.S. Patent 20080318283.

Carnes A E., Jeremy M Luke, Justin M. Vincent, Angela Schukar, Sheryl Anderson, Clague P. Hodgson, James A. Williams, Plasmid DNA Fermentation Strain and Process-Specific Effects on Vector Yield, Quality and Transgene Expression, *Biotech Bioeng* **2011**, 108 (2), 354 – 63.

Carsten Voss, Schmidt, Scheleef y col., Effect of ammonium chloride on plasmid DNA production in high cell density batch culture for biopharmaceutical use, *J. Chem Technol Biotechnol*, 79: 57 – 62 (2004)

Carter K.C., F.L. Henriquez, S.A. Campbell, C.W. Roberts, A. Nok, A.B. Mullen, E. McFarlane, DNA vaccination against the parasite enzyme gamma - glutamylcysteine synthetase confers protection against *Leishmania donovani* infection, *Vaccine* 25 (2007) 4502–4509

Center for biologics evaluation and research. *Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications* (Draft Guidance). US Food and Drug Administrations: Rockville, MD, December 1996; www.fda.gov/cber/gdlns/plasmid.pdf

Center for biologics evaluation and research. *Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy*. Rockville, MD: US Food and Drug Administration: Rockville, MD, March 1998; www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf

Chambers S, Barstow D, Minton N. The pMTL nic-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene* 1988; 68:139–49.

Chang Ming-Yao, Tsai Guo-Jane, Hounq Jer-Yiing, Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006) 407–414

Chen W, Graham C, Ciccarelli RB. 1997. Automated fed-batch fermentation with feedback controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18:43–48.

Danquah MK, Forde GM. 2007 Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *J Biosci Bioeng* 104: 490–497.

DaSilva, N. A. and Bailey, J. E. 1986. Theoretical growth yield estimates for recombinant cells. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 741-746

Diogo Maria M, Ribeiro Sofia C, Queiroz Joa A, Monteiro Gabriel A, Tordo Noel, Duarte Pierre Perrin, Prazeres M F, Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies, *J Gene Med* 2001; 3: 577–584

Dumonteil E, Andrade-Narvarez F, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra MJ, Valencia-Pacheco G, Flores-Serrano A, Canto-Lara S, Arjona-Torres A, Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. *Dev Biol (Basel)*. 2000; 104:135-41

Dumonteil E, Review DNA Vaccines against protozoan parasites: Advances and challenges, *J. Biom. Biotech*, 2007, 1- 11

Duttweiler HM, Gross DS, Bacterial growth medium that significantly increases the yield of recombinant plasmid. *BioTechniques* (1998) 24: 438 - 444

Filomena S, Passarinha L, Sousa F, Queiroz JA, Domingues FC. 2009. Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1408–1414

Ferreira GN, Monteiro GA, et al. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol.* 18 (9): 380 – 388.

Fleming G.T.A., Patching J.W. Plasmid instability in an industrial strain of *Bacillus subtilis* grown in continuous culture. *J. Ind. Microbiol.* 1994, 13, 106 -111

Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K.M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., Pandey, A., 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* 15, 107–115.

Ghanem A, Healey R, Adly FG, Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review, *Analytica Chimica Acta* 760 (2013) 1 - 15

Gamboa-León R, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Myashiro LM, Pinheiro RO, Dumonteil E, Palatnik de Sousa CB, Immunotherapy against visceral leishmaniasis with the nucleoside hydrolase-DNA vaccine of *Leishmania donovani*, *Vaccine* 2006, 24; 4863 – 4873

Garmory HS, Brown KA, Titball RW, DNA vaccines: Improving expression of antigens. 2003 *Genet Vaccines Ther* 1: 1–5.

Hahn, U.K., Boehm R. y Beyer W., DNA vaccination against anthrax in mice – combination of anti-spore and anti – toxin components, *Vaccine* 2006, 24 (21) 4569 – 4571

Herrera-Najera C, Pina-Aguilar R, et al. (2009). Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. *Proteomics* 9 (5): 1293-1301.

Hitchcock A.G., J.A. Sergeant, S.F. Rahman, H.A. Tharia, and H. Blom Scale-Up of a Plasmid DNA Purification Process, Use of a Commercial Resin to Produce GMP-Grade pDNA for Clinical Studies, *BioProcess International*, Dec **2010**, 46 - 54

Hofmann K. H., Neubauer P., Reithdorf S., Hecker M., Amplification of pBR3222 plasmid DNA in *Escherichia coli rel A* strains during batch and fed-batch fermentation. *J. Basic Microbiol.* 1990, 30, 37 – 41.

Hotez P (2008). *Forgotten People, Forgotten Diseases: The Neglected Tropical Diseases and Their Impact on Global Health and Development*, ASM Press. Washington D.C., USA. 95-102.

Huang Y, Krasnitz M, Rabadan R, Witten DM, Song Y, Levine AJ, Ho DD, Robins H. A recoding method to improve the humoral immune response to an HIV DNA vaccine. 2008.PLoS ONE 3: 3214–3218.

Huber H, Buchinger W, Diewok J, Ganja R, Keller D, Urthaler J, Necina R. 2008. Industrial manufacturing of plasmid DNA:Boehringer's new cGMP production system employs prudent vector design as a backbone. *Genet Eng Biotechnol News* 28: 4–6.

Jung Y.H., Lee Y., RNAses in ColE1 DNA metabolism. *Mol. Biol. Reports*, 1996, 22, 195 – 200.

Kammoun Radhouane , Belgacem Naili, Samir Bejar Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for a-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product) *Bioresource Technology* 99 (2008) 5602–5609

Kumar Rajiv y Engwerda Christian, Vaccines to prevent leishmaniasis, *Clinical & Translational Imm.* 2014, 3, e13; pag 1-5

Lahijani R, et. al High-Yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature controllable point mutation. *Hum. Gene Ther* 7 (16) 1996: 1971 - 1980

Leitner W. Ying H, Restifo N. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 2000, 18, 765 – 777

Lemmens R, Olsson U, Nyhammar T, Stadler J, Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/ aromatic adsorption, *J. Chromatogr. B*, **784**, 291-300 (2003).

Lin-Chao S, Chen W, Wong T. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol* 1992; 6(22):3385–93.

Listner K., L. Bentley, J. Okonkowski, C. Kistler, R. Wnek, A. Caparoni, B. Junker, D. Robinson, P. Salmon, and M. Chartrain, Development of a Highly Productive and Scalable Plasmid DNA Production Platform, *Biotechnol. Prog.* 2006, 22, 1335-1345

Liu MA, DNA vaccines: a review, 2003 *Journal of Internal Medicine*; 253: 402 -410.

Liu MA y Ulmer JB, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv. Genet.* 2005, 55, 25 - 40

- Luli, G.W. and Strohl W.R, Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Eschericia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 1990, 56: 1004-1011.
- Madigan, M., Martinko J., Parker J, Brock, Biología de los microorganismos, 10ed. Ed. Prentice Hall, 2003
- Madriz X, Maximo B. Martinez, Mario A. Rodriguez, Gustavo Sierra, Carolina Martinez-Lopez, Ana M. Riveron, Leopoldo Flores and Esther Orozco; Expression in fibroblasts and in live animals of *Entamoeba histolytica* polypeptides EhCP112 and EhADH112 Microbiology (2004), 150, 1251–1260
- Manual TD-700 Fluorometer Method for dsDNA Quantitation usind PicoGreen, Turner BioSystems, www.turnerbiosystems.com/doc/appnotes/998_2630.php
- Manual Invitrogen pVAX1, version B, 1998 – 2002
- Manual PlasmidSelect Xtra Starter Kit, GE Healthcare, 2006
- Meza-Cervantes P, González-Robles A, Cárdenas-Guerra RE, Ortega-López J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R, Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. Microbiology. 2011 Dec;157: 3469-3482.
- Minton N. Improved plasmid vectors for the isolation of translational lac gene fusions. Gene 1984; 31: 269–73.
- Montesinos-Cisneros RM, Ortega J, Guzmán R, Tejeda-Mansir A, Breakthrough performance of linear-DNA on ion-exchange membrane columns, Bioprocess Biosyst Eng (2006) 29: 91–98
- Moreno-Brito V., Yáñez-Gómez C., Meza-Cervantez P., Ávila-González L., Rodríguez M.A., Ortega-López J., González-Robles A. and Arroyo R.; A; *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron, Cellular Microbiology (2005) 7 (2), 245 – 258
- O’Kennedy, R.D., Patching, J.W.. Effects of medium type and limitation on the loss of the recombinant plasmid pLG669-z and b-galactosidase expression from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. 1997, 18, 381–387
- O’Kennedy RD, Baldwin C y Keshavarz-Moore E, Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps, J. Biotech. 2000, 76, 175 - 183

O'Kennedy RD, Ward JM, Keshavarz-Moore E, Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003, 37, 83 - 90

Ongkudon Clarence M., Jenny Ho, and Michael K. Danquah. Mitigating the looming vaccine crisis: production and delivery of plasmid-based vaccines *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011a; 31(1): 32–52

Ongkudon Clarence M, Raelene Pickering, Diane Webster, Michael K Danquah, Cultivation of *E. coli* carrying a plasmid-based measles vaccine construct (4.2 kbp pcDNA3F) employing medium optimization and pH – temperature induction techniques, *Microb. Cell Fac.* 2011b, 10: 16.

Phue JN, Lee SJ, et al. (2008). Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 α). *Biotechnol. Bioeng.* 101(4): 831-836.

Plackett, R.L., Burman, J.P., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33, 305–325.

Prather K.J., Sagar S., Murphy J. y Chartrain M., Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.* 2003, 33, 865 – 883

Przybylowski Mark, Shirley Bartido, Oriana Borquez-Ojeda, Michel Sadelain, Isabelle Rivière, Production of clinical-grade plasmid DNA for human Phase I clinical trials and large animal clinical studies *Vaccine*, **25**, 5013–5024 (2007)

Quijano-Hernández Israel A, Alejandro Castro-Barcenab, Juan C. Vázquez-Chagoyán, Manuel E. Bolio-González, Jaime Ortega-López, Eric Dumonteil, Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against an infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*, *Vaccine* 31 (2013) 2246– 2252

Reinikainen P., Korpela D., Nissien V., Oikku J., Soderlund H., Markkanen P., *Escherichia coli* plasmid production in a fermenter. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, 33, 386 – 393.

Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993;11:957-960.

Rodríguez-Vargas VH, Montesinos-Cisneros RM, Tejeda-Mansir A, Ortega-López J. Purificación de DNA plasmídico por cromatografía en membranas de intercambio iónico: un proceso factible de escalar, Congreso SMBB, Mérida 2005

Sambrook J., Russell D. W., Molecular cloning a laboratory manual, 3ra ed., Cold Spring Harbor, NY, 2001

Sánchez-Burgos G, Mezquita-Vega G, Escobedo-Ortegon J. y col. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice, FEMS Imm Med Microb. 2007, 50, 333 - 341

Sánchez- Casco M, E. Dumonteil, J Ortega-Lopez, Production optimization of a DNA vaccine candidate against Leishmaniasis in flask culture, African J Biotech, 2013, 12 (31), 4874-4880,

Santana D, Borja-Cabrera G, Paraguai de Souza E, Sturm N, Palatnik de Sousa C, Campbell D, Nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis, Molec. Bioch. Parasit. 120 (2002) 315 - 319

Schmidt Torsten, Karl Friehs, Erwin Flaschel, Martin Schleef. Method for the isolation of ccc plasmid DNA. US Patent 6,664, 078 B1 (Qiagen GmbH, Hilden, DE) 16 december 2003.

Shamlou P. A., Review scalable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA, Biotechnol. Appl. Biochem. 2003, 37, 207 - 218

Shoham Y., Demain A. L., Effect of medium composition on the maintenance of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. Enzyme Microb. Technol. 1990, 12, 330 – 336.

Solano-González E., Burrola-Barraza E., León-Sicairos C., Avila-González L., Gutiérrez-Escolano L., Ortega-López J., and Arroyo R., The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element, FEBS Letters 581 (2007) 2919–2928

Studier, WF, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, Protein Exp. Purif. 2005, 41 (1): 207 – 234.

Tissot Stéphanie, Patrik O. Michel, Clara J. Douet, Sarah Grezet, Lucia Baldi, David L. Hacker and Florian M. Wurm, Helical-Track Bioreactors for Bacterial, Mammalian and Insect Cell Cultures, Processes 2013, 1, 3-11

Trindade I P, Diogo M M, Prazeres D M F, Marcos J C, Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography, J. Chromatogr. A, 1082 (2005) 176 – 184

Ulmer J.B., Valley U., Rappuoli R., Vaccine manufacturing: challenges and solutions, Nature biotech. 2006, 24 (11) 1377 - 1383

Vaz G. 2007, Metabolic and proteomic analysis of recombinant *Escherichia coli* DH5 α in high-cell density cultivations for production of therapeutic grade plasmid DNA, 2007,

Wang R., Dooland DL., Le TP., Hedstrom RC., Coonan KM., Charoenvit Y., y col.. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccines. *Science* 1998, 282 (5388) 476 - 480

Wang Z, Le G, Shi Y, Wegrzyn G: Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochemistry* 2001, 36:1085-1093.

Wei Yu-Hong, Chin-Chi Lai, Jo-Shu Chang, Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Process Biochemistry* 42 (2007) 40–45

Williams James A., Jeremy Luke, Sarah Langtry, Sheryl Anderson, Clague P. Hodgson, Aaron E. Carnes, Generic Plasmid DNA Production Platform Incorporating Low Metabolic Burden Seed-Stock and Fed-Batch Fermentation Processes *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 103, No. 6, August 15, 2009

Wolf JA, Malone RW, Williams P., Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, 247, 1465 – 1468.

Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005 69: 12 -50

Wong E. M., Muesing M. A., y Polisky B. Temperature-sensitive copy number mutants of ColE1 are located in an untranslated region of the plasmid genome *Proc. Natd Acad. Sci.* 1982, 79, 3570-3574

Xu ZN, Shen WH, Chen H, Cen PL. Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6:396-400.

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; 33:103–19.

Yee Yau, Sin; Keshavarz-Moore, Eli; War, John. Host Strain Influences on Supercoiled Plasmid DNA Production in *Escherichia coli*: Implications for Efficient Design of Large-Scale Processes. *BiotechBioeng*, 2008, 101 (3), 529 - 544.

Zheng S, Friehs K, He N, et al. (2007). Optimization of Medium Components for plasmid production by Recombinant *E. Coli* DH5 α pUK21CMV β 1.2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 213 – 221

Capítulo 8
APÉNDICES

APÉNDICE 1: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

MEDIOS DE CULTIVO

LB

LB fue preparado como indica Sambrock y col. (2001)
Tryptona (10 g), Extracto de Levadura (5 g), NaCl (10 g) por litro.

SDCAS

SDCAS fue preparado como indica O'Kennedy y col. (2000)
D-glucose (25 g), casamino ácidos (10 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.2 g), $(NH_4)_2SO_4$ (4 g), KH_2PO_4 (13.3 g), ácido cítrico (1.7 g), $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (8.4 mg), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (2.5 mg), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (15.0 mg), $CuSO_4 \cdot 2H_2O$ (1.5 mg), H_3BO_3 (3 mg), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (2.5 mg), $ZnCl_2$ (13 mg), Fe(III) citrato (100 mg), Clorhidrato de tiamina (4.5 mg) por litro.

ZMY505

ZMY505 fue preparado como indica Studier (2005)
Extracto de levadura (5 g), Glucosa (0.5 g), Glicerol (5 g), NZ amino (casaminoácidos) (10 g), $MgSO_4$ (0.49 g), Na_2HPO_4 (3.55 g), KH_2PO_4 (3.04 g), NH_4Cl (2.67 g), Na_2SO_4 (0.71 g) por litro. Agregar 0.2x de trazas.
Trazas 1000x: Disolver 810 mg $FeCl_3$ en 0.5 mL HCl y 45mL de Agua, $CaCl_2$ (40 mg), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (3mg), $MnCl_2 \cdot H_2O$ (400 mg), $CuCl_2 \cdot H_2O$ (85 mg), $NiCl_2$ (119 mg), H_3BO_3 (31 mg), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (121 mg), $NaSeO_3$ (86.5 mg), $ZnSO_4$ (580 mg) por 100mL.

ZMY505m

ZMY505 fue preparado como indica Studier (2005)
Extracto de levadura (5 g), Glucosa (0.5 g), Glicerol (5 g), NZ amino (casaminoácidos) (10 g), $MgSO_4$ (0.49 g), Na_2HPO_4 (3.55 g), KH_2PO_4 (3.04 g), NH_4Cl (2.67 g), Na_2SO_4 (0.71 g) por litro. Agregar 0.2x de trazas.
Trazas 1000x modificadas: Disolver 810 mg $FeCl_3$ en 0.5 mL HCl y 45mL de Agua, $CaCl_2$ (70 mg), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (30 mg), $MnCl_2 \cdot H_2O$ (800 mg), $CuCl_2 \cdot H_2O$ (212.5 mg), $NiCl_2$ (297.5 mg), H_3BO_3 (31 mg), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (302.5 mg), $NaSeO_3$ (216.3 mg), $ZnSO_4$ (1.16 g) por 100mL.

T2

Extracto de levadura (20 g), Glucosa (0.5 g), Glicerol (5 g), Lactosa (5 g), $MgSO_4$ (7.35 g), Na_2HPO_4 (3.55 g), KH_2PO_4 (3.04 g), Na_2SO_4 (0.71 g) por litro. Agregar 0.2x de trazas. Usar las trazas 1000x modificadas.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS POR CROMATOGRAFIA

Buffer A: 2.1 M $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

Buffer B 2.0 M $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

Buffer C: 0.3 M NaCl, 1.7 M $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

Buffer D: 0.4 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

Buffer E: 1.0 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

Utilizar agua y reactivos de alta pureza, antes de utilizarse, filtrar los buffers a través de membranas de 0.22 o 0.45 μm .

APÉNDICE 2: VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las características del vector pVAX1 son:

- ◆ Promotor CMV (human cytomegalovirus) para un alto nivel de expresión en células de mamífero
- ◆ Señal de poliadenilación BGH (Bovine growth hormone) para la eficiencia en la terminación de la transcripción y poliadenilación de mRNA.
- ◆ Gen para resistencia a Kanamicina para la selección de *E. coli*.
- ◆ Origen de replicación tipo pUC que puede ser inducido por temperatura para obtener un alto número de copias.

Estas son algunas consideraciones que ha establecido la FDA para el diseño de vacunas de DNA plasmídico:

- ◆ Deben removerse secuencias de DNA que no son necesarias para la expresión de proteínas recombinantes o en la replicación en *E. coli*, con el fin de minimizar la posibilidad de integración cromosomal.
- ◆ El gen para resistencia a kanamicina es recomendado porque presenta menor riesgo de reacciones de hipersensibilidad en algunos pacientes.

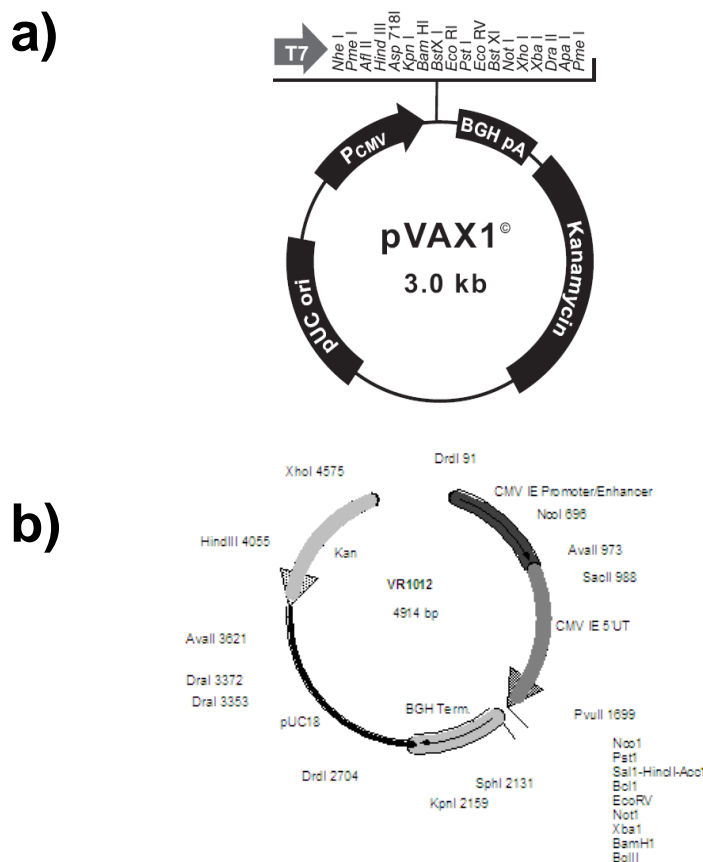


Figura 25. Vectores para la expresión de antígenos en mamíferos

Esquema de los elementos que componen los vectores para expresión de antígenos en mamíferos. Panel A) Vector pVAX1 (Manual Invitrogen pVAX1 2002), panel B) Vector VR1012.

OLIGONUCLEÓTIDOS

NH36 K-F TAGGTACCATGGCGCGCAAGATTATTCTC
 NH36X-R AGGTCTAGATAATTTGAGGATCGCCGATGC

T7 promotor TTAATACGACTCACTATAGGGA
 BGH reverso CTAGAAGGCACAGTCGAGGC

OLIGOS PARA SUBCLONAR NH36 EN pVAX1

Primer forward NHvaxF

5' tGGCGc **GGA TCC** gcc **ACC ATG** G CG CGCAAGATTATTCTC 39pb
 BamHI kozac de vertebrados Cambiar prolina por alanina

Primer Reverse MNH36X-R

5'GGATGC **TCTAGA** **TTA** TTGAGGATCGCCGATGC 3'
 Xbal codón de paro

OLIGOS PARA SUBCLONAR EL PRECURSOR DE LA PFO EN pVAX1

Primer Foward PFO5vax

5' tGGCGc **GGA TCC** gcc **ACC ATG** GAG GGC AAG AAC TGG 3' 36pb
 BamHI kozac de vertebrados

Primer Reverse PFO3vax

5' GGCTaG **TCTAGA** **TTA** CTG TGT TTC GTG GAT CTT C 3' 34pb
 Xbal codón de paro

OLIGOS PARA SUBCLONAR EL PRECURSOR DE LA TvCP4 EN pVAX1

Primer Foward CP4vax-F

5' tggcgc **ggatcc** gcc **ACCATG** gtt cag gca cat gag 3' 36pb
 BamHI kozac debe ser g

Primer Reverse CP4vax-R

5' GGCTaG **TCTAGA** **TTA** ctt gtc ctg tgg gat gca 3' 33pb
 Xbal

OLIGOS PARA SUBCLONAR PROENZIMA DE LA EhCP112 EN pVAX1

Primer forward EhCP112vax-F

5' tGGCGc **GGA TCC** gcc **ACC ATG** Gcgtttaacttagaa 3' 36pb
 BamHI kozac debe ser g

Primer reverse EhCP112vax-R

5' GGCTaG **TCTAGA** **TTA** gattgtatgatttagaa 3' 33pb
 Xbal

OLIGOS PARA SUBCLONAR UN FRAGMENTO DE LA ADHESINA ADH112 EN pVAX1

Primer forward AD112vax-F

5' tGGCGc **GGA TCC** gcc **ACC ATG** Gtctactcaacactt 3' 36pb
 BamHI kozac debe ser g

De isoleucina cambio a valina

Primer reverse AD112vax-R

5' GGCTaG **TCTAGA** **TTA** aagagatggaacatagg 3' 33pb
 Xbal

APÉNDICE 3: SECUENCIAS

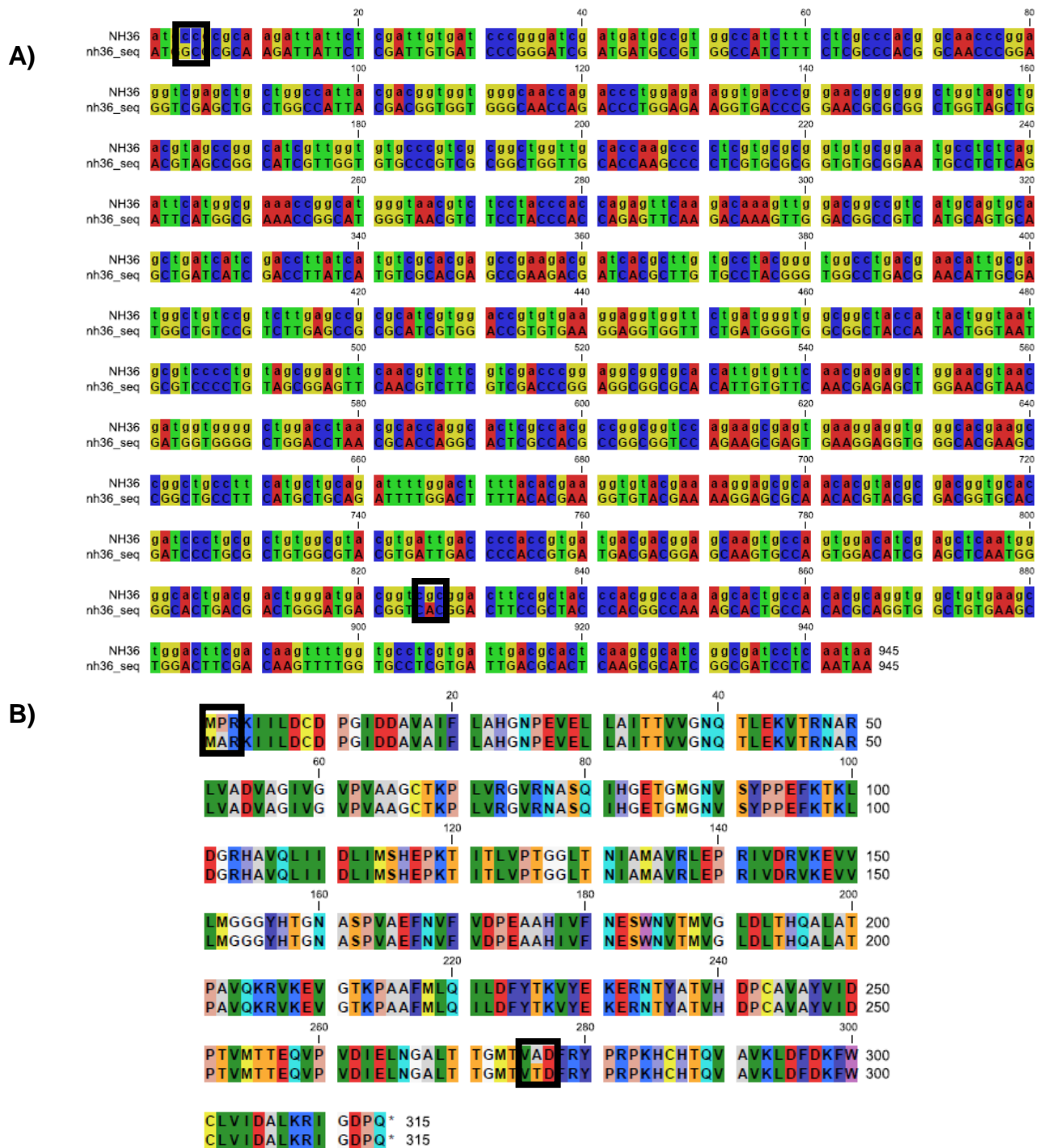


Figura 26. Secuencia del antígeno contra Leishmaniasis

Panel a) Secuencia de nucleótidos de la construcción pVAX-NH36. Panel b) Secuencia de aminoácidos de NH36 clonado en el pVAX1, en los recuadros negros se muestra las mutaciones en el nucleótido 4 y 826 y en los aminoácidos 2 y 276.

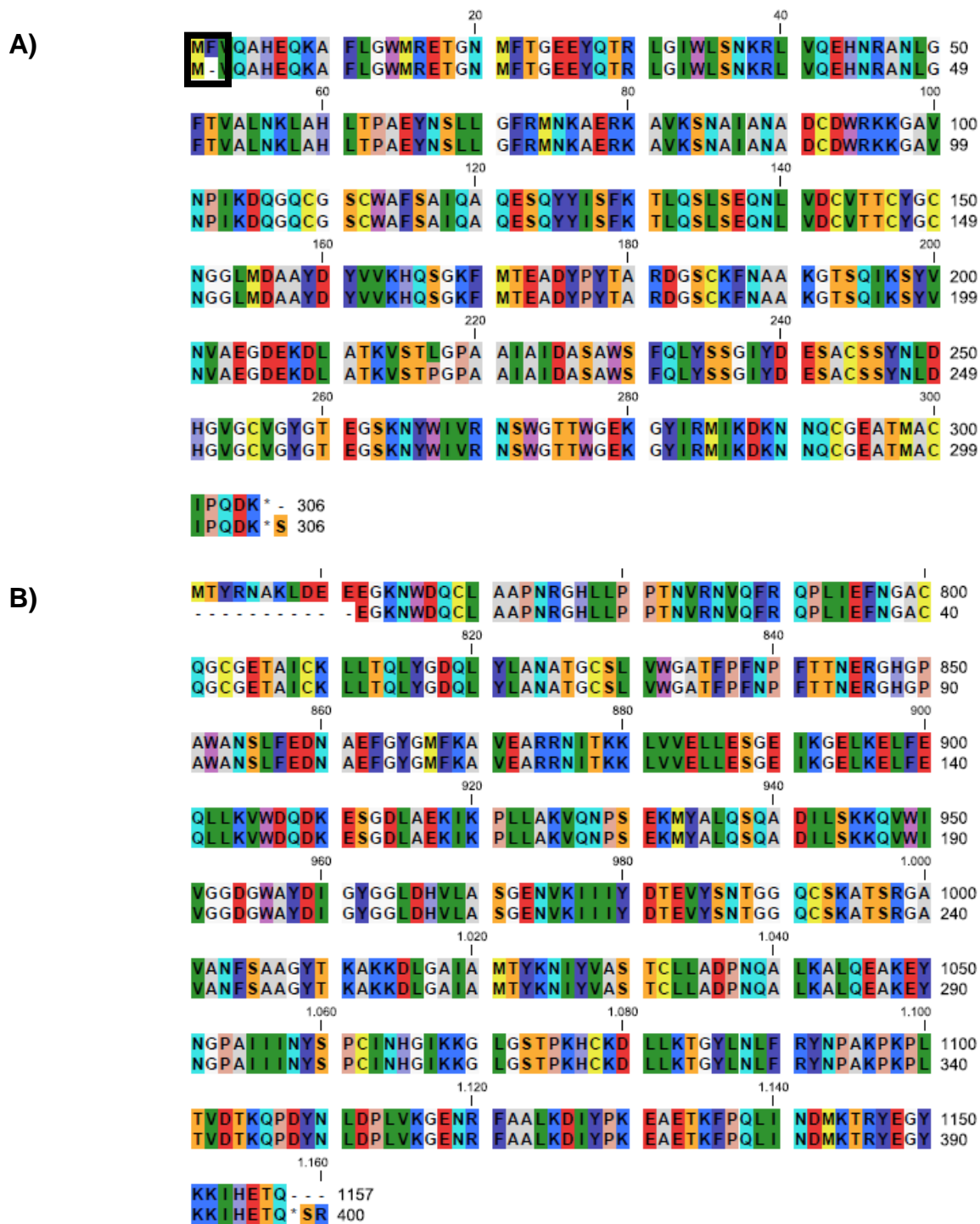


Figura 27. Secuencia de los antígenos contra Tricomonosis

Panel a) Secuencia de aminoácidos de la pVAX-CP4 (preproenzima), en el recuadro negro se muestra la mutación en el aminoácido 2. Panel b) Secuencia de aminoácidos de la pVAX-PFO (fragmento).

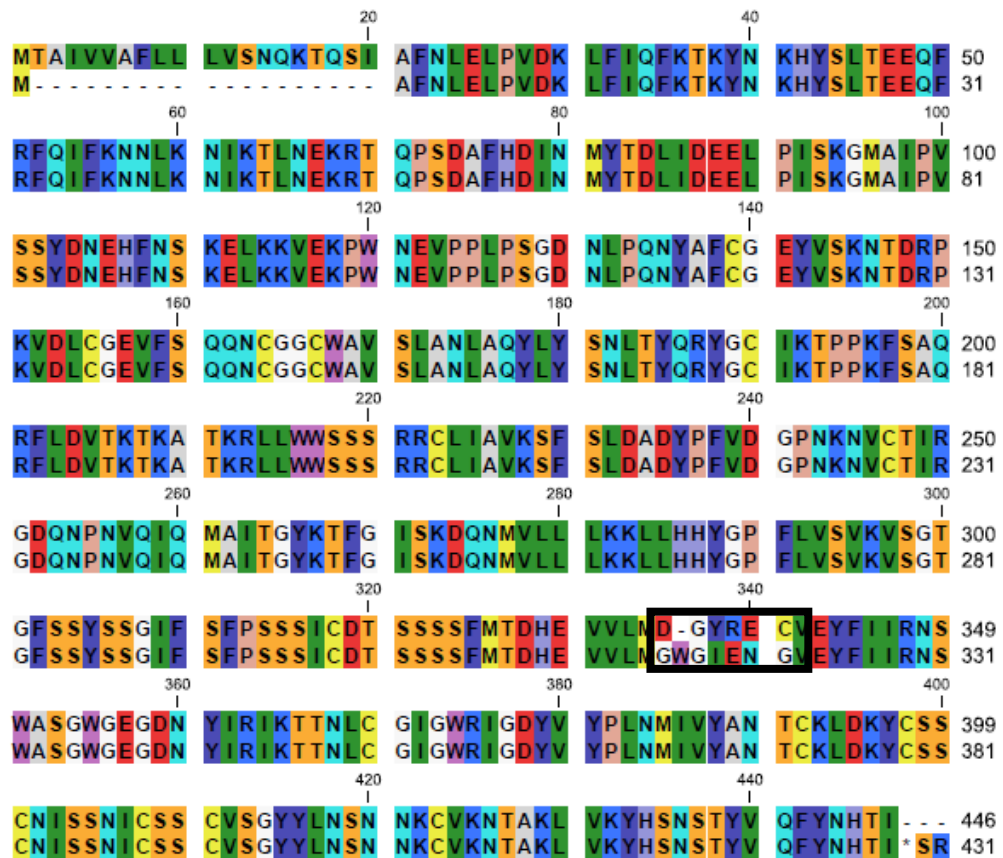


Figura 28. Secuencia de los antígenos contra Amibiasis (CP112)

Secuencia de aminoácidos de la pVAX-CP112 (proenzima), en el recuadro negro se muestra la mutación en el aminoácido 316 - 322.

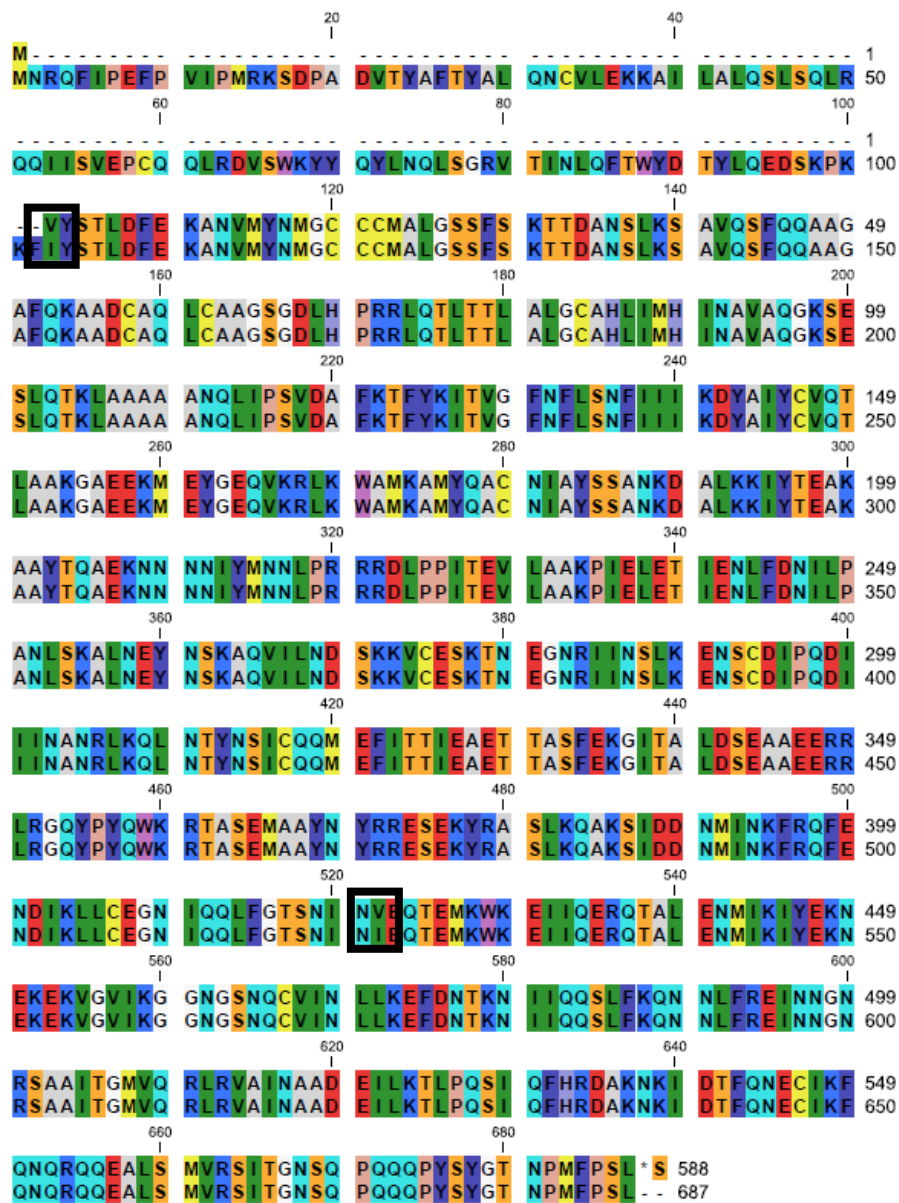


Figura 29. Secuencia de los antígenos contra Amibiasis (ADH)

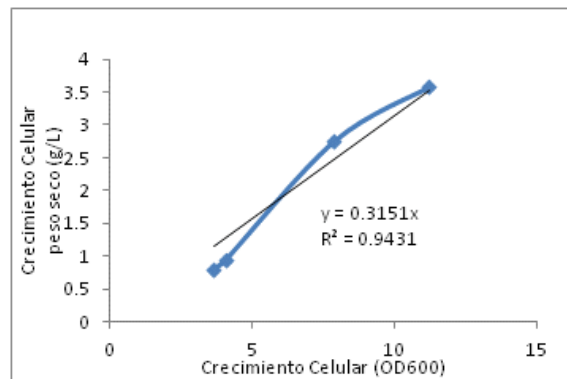
Panel a) Secuencia de aminoácidos de la pVAX-ADH (proenzima), en el recuadro negro se muestra la mutación en el aminoácido 2 y 421.

APÉNDICE 4: Cálculos

4.1 Determinación de peso seco en medio T242

Se construyeron graficas para cada medio para determinar la relación entre el crecimiento celular en densidad óptica y el peso seco, se determino el crecimiento celular, se filtro y se pesaron las membranas con la biomasa, posteriormente se secaron a 45°C, y los datos fueron graficados,

OD	Peso en g/L
3.653	0.797
4.063	0.934
7.87	2.75
11.2	3.58



4.2 Cálculos estadísticos para el diseño Plackett-Burman

Ejemplo de los cálculos estadísticos para el diseño Plackett-Burman, realizados para la variable de respuesta rendimiento volumétrico total, se realizó un análisis t-student, al final la contribución se calculo por medio de tablas. Se muestran las ecuaciones con las que se realizaron los cálculos t-student así como los resultados de la matriz experimental propuesta.

$$S = \sum_{n=1}^{18} Y_n$$

$$EMS = \frac{S * 2}{12}$$

$$Varianza (\sigma) = \frac{E_1^2 + E_2^2 + E_3^2}{3}$$

$$Error STD = \sqrt{\sigma}$$

$$tx_n = \frac{EMS}{Error STD}$$

Experimento	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
Y1	28	28	-28	28	-28	28	-28	-28	-28	28	28
Y2	-18.04	18.04	18.04	-18.04	18.04	-18.04	18.04	-18.04	-18.04	-18.04	18.04
Y3	34.84	-34.84	34.84	34.84	-34.84	34.84	-34.84	34.84	-34.84	-34.84	-34.84
Y4	13.86	13.86	-13.86	13.86	13.86	-13.86	13.86	-13.86	13.86	-13.86	-13.86
Y5	-35.33	35.33	35.33	-35.33	35.33	35.33	-35.33	35.33	-35.33	35.33	-35.33
Y6	-35.05	-35.05	35.05	35.05	-35.05	35.05	35.05	-35.05	35.05	-35.05	35.05
Y7	-24.13	-24.13	-24.13	24.13	24.13	-24.13	24.13	24.13	-24.13	24.13	-24.13
Y8	25.4	-25.4	-25.4	-25.4	25.4	25.4	-25.4	25.4	25.4	-25.4	25.4
Y9	-23.07	23.07	-23.07	-23.07	-23.07	23.07	23.07	-23.07	23.07	23.07	-23.07
Y10	22.57	-22.57	22.57	-22.57	-22.57	-22.57	22.57	22.57	-22.57	22.57	22.57
Y11	-25.34	25.34	-25.34	25.34	-25.34	-25.34	-25.34	25.34	25.34	-25.34	25.34
Y12	25.74	-25.74	25.74	-25.74	25.74	-25.74	-25.74	-25.74	25.74	25.74	-25.74
S	-10.55	-24.09	31.77	11.07	-26.37	52.01	-37.93	23.85	-14.45	6.31	-2.57
ems	-1.758	-4.015	5.295	1.845	-4.395	8.6683	-6.322	3.975	-1.048	1.0517	-0.428
tx_n	-1.744	-2.612	3.4444	1.8002	-2.859	5.6388	-4.112	2.5858	-0.567	0.6841	-0.279
%	94	98	100	95	99.5	100	100	97			

Varianza (σ) = 2.3632
12 - 1 = 11

Error std = 1.54

Grados de libertad =

Una vez determinado el valor txn en una tabla t de Students se busco este valor de acuerdo a los grados de libertad, se obtuvo un valor de significancia, por ejemplo 0.95 se puede transformar en porcentaje y reportarlo como 95%. El signo del valor txn determina la influencia positiva o negativa de cada componente. Las variables dummies no tuvieron un efecto significativo (menor del 60%) como se esperaba.

4.3 Cálculos estadísticos para el diseño Taguchi

Ejemplo de los cálculos estadísticos para el diseño Taguchi, realizados para las tres variables de respuesta crecimiento celular (DCW), rendimiento específico sc-pDNA y rendimiento volumétrico total sc-pDNA total, se realizó un análisis de varianza, al final para determinar si cada compuesto tenía un efecto significativo se calculo por medio de tablas buscando los grados de libertad y el valor F0. También se pudo calcular el porcentaje de contribución de cada compuesto en %, así como el error experimental. Se muestran las ecuaciones con las que se realizaron los cálculos ANOVA así como los resultados de la matriz experimental propuesta.

$$SYn = \sum_{n=1}^{18} Yn^2$$

$$S1 = \sum_{n=1}^6 \text{Concentracion 1}$$

$$ST = S1 + S2 + \dots Sn$$

$$Sstrat = \frac{(S_1^2 + S_2^2 + S_3^2)}{6} + \frac{ST}{18}$$

$$SStotal = SYn - \frac{S1^2}{18}$$

$$SSE = SStotal - Sstrat1 - \dots - Sstrat n = 8$$

$$Mstrat = \frac{Sstrat}{gl}$$

$$\text{grados de libertad (gl)} = n - 1 = 2$$

$$MSE = \frac{SSE}{15}$$

$$F0 = \frac{Mstrat}{MSE}$$

$$\text{Contribucion \%} = \frac{Sstrat}{SStotal} * 100$$

$$\text{Error experimental} = 100 - \sum_{n=1}^8 \text{Contribucion \%}$$

Ejemplo para el componente magnesio dentro del medio de cultivo

Tratamiento DCW	Tratamiento sc-pDNA	Tratamiento sc-pDNA total
Sstrat		
0.24787196	23.5128025	143.214387
Mstrat		
0.12393598	11.7564013	71.6071934
MSE		
0.00826248	0.81268512	8.35984914
F2		
14.9998473	14.466121	8.56560833
Contribución en %		
11.1682041	13.1033065	10.8672004
Suma Error Trata		
91.1664352	89.2397792	85.1221576
Error Exp		
8.83356482	10.7602208	14.8778424

Con el valor F_2 y los grados de libertad se busca en tablas y se determina si es o no significativo el efecto de cada componente con cada una de las variables de respuesta, en este ejemplo la contribución del magnesio fue del 100% para las tres variables de respuesta.