



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

## **DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

### **POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

#### **PRODUCCIÓN Y ENCAPSULAMIENTO DE PVAX1- NH36 PARA SU USO EN VACUNAS CONTRA LEISHMANIASIS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**M.C. AURORA GARCÍA RENDÓN**

**DIRECTOR: DR. ARMANDO TEJEDA MANSIR**

**CO-DIRECTOR: DRA. ADRIANA GARIBAY ESCOBAR**

**Hermosillo, Sonora**

**Marzo, 2019**

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

**M.C Aurora García Rendón**

**“Produccion y Encapsulamiento de pVAX1-NH36 para su uso en vacunas  
contra Leishmaniasis”**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

21-Feb-2019

Fecha

Armando Tejeda M.

Dr. Armando Tejeda Mansir  
Presidente

21-Feb-2019

Fecha

Patricia Guerrero German

Dra. Patricia Guerrero German  
Secretario

21-feb-2019

Fecha

Adriana Garibay Escobar

Dra. Adriana Garibay Escobar  
Sinodal

21-feb-2019

Fecha

Rosa María Montesionos Cisneros

Dra. Rosa María Montesionos Cisneros  
Sinodal

21-Febrero, 2019

Fecha

Roberto Guzman Zamudio

Dr. Roberto Guzman Zamudio  
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

## AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

Hermosillo, Sonora, a 19 de Febrero de 2019.

Por medio de la presente se hace constar que el estudiante **GARCIA RENDÓN\* AURORA** ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del examen de grado del programa Doctorado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química.

ATENTAMENTE

"El Saber de mis Hijos Hará mi Grandeza"

**Dr. Abraham Rogelio Martín García**  
Coordinador de Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería  
Química



## RESUMEN

El uso de ADN plasmídico (ADNp) es un nuevo enfoque para formular vacunas humanas contra la leishmaniasis, una enfermedad tropical desatendida con manifestaciones clínicas severas. El desarrollo de bioprocesos factibles para obtener tales vacunas es una prioridad de salud pública. El objetivo de este trabajo fue establecer un esquema de producción y de encapsulación de pVAX-NH36, para su uso como vacuna contra leishmaniasis y evaluar su eficiencia transfectiva e inmunológica. Para lograr un sistema robusto y optimizado de producción del pVAX-NH36 se procedió a estandarizar el inóculo, comparar el sistema perfusivo con alimentación exponencial (PAE) con los sistemas convencionales de lote y lote alimentado; y a optimizar a nivel biorreactor el sistema PAE. Se estandarizó la preparación del inóculo creando un banco celular de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  proveniente de un cultivo en placa. Las condiciones óptimas para la obtención del inóculo fueron cultivar a 37 °C durante 8-10 h a 350 rpm. En la comparación de los sistemas de fermentación la densidad óptica máxima obtenida en cada experimento fue de 12.0 en lote, 30.0 en lote alimentado y 41.0 DO<sub>600</sub> en el sistema PAE; y el rendimiento máximo de plásmido alcanzado fue de 2.02 mg/(L-OD<sub>600</sub>), 3.22 mg/(L-OD<sub>600</sub>) en lote y 3.67 mg/(mL-OD<sub>600</sub>), respectivamente. Los resultados experimentales de producción de biomasa y consumo de sustrato se ajustaron a modelos matemáticos y presentaron un buen ajuste con una  $r^2=0.99$ , en ambos casos. Para demostrar la flexibilidad del sistema PAE se utilizaron glucosa y glicerol como fuente de carbono. Se midieron las cinéticas de biomasa, sustrato y plásmido. Los modelos matemáticos empleados se ajustaron a los datos experimentales y se usaron para describir el comportamiento del sistema ( $r^2 > 0.95$ ). Se obtuvieron productividades de plásmidos de 13.3 mg/(L-h) con glucosa y 19.4 mg/(L-h) con glicerol. Estos niveles representan un aumento de 1 a 3 veces en productividad en comparación con cultivos reportados anteriormente utilizando *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se prepararon nanovacunas mediante la encapsulación del plásmido en nanopartículas lipídicas catiónicas, obteniéndose partículas de diámetro aproximado a 120 nm con una potencial zeta (PZ) de alrededor de 17 mV y un índice de polidispersidad (IPD) de 0.14, lo cual se encuentra en el rango

recomendado para su uso. La nanovacuna presentó un mayor porcentaje de transfección (97%) que el plásmido desnudo (78%), y no mostro citotoxicidad significativa. Las células RAW 264.7 mostraron producción de TNF- $\alpha$  pero no de IL-6, en respuesta a la nanovacuna, lo que sugiere un perfil de citocinas adecuado para la inducción de una respuesta inmune celular, lo cual es favorable en el tratamiento contra leishmaniasis. La investigación realizada proporciona el conocimiento fundamental para el diseño a escala de un bioproceso para la producción de vacunas de tercera generación, y sirve para promover la realización de los estudios clínicos correspondientes y la eventual transferencia de esta tecnología.

## ABSTRACT

The use of plasmid DNA (pDNA) is a new approach to formulate human vaccines against leishmaniasis, a neglected tropical disease with severe clinical manifestations. The development of feasible bioprocesses to obtain such vaccines is a public-health priority. The aim of this work was to establish a production and encapsulation of pVAX-NH36 scheme, to be used as a vaccine against leishmaniasis and to evaluate its transfective and immunological efficiency. To attain a robust and optimized production system for pVAX-NH36, the standardization of the inoculum, the comparison of the exponential-fed perfusion (EFP) system with the conventional batch and fed-batch systems and the optimization of the EFP system at bioreactor level, were conducted. The preparation of the inoculum was standardized creating a cellular bank of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  from a plate culture. The optimal conditions to obtain the inoculum were to cultivate at 37 ° C for 8-10 h at 350 rpm. Comparing the fermentation systems, the maximum optical density obtained in each experiment was 12.0 in batch, 30.0 in fed-batch and 41.0 OD<sub>600</sub> in the EFP system; and maximum plasmid yield achieved was 2.02 mg/(L-OD<sub>600</sub>), 3.22 mg/(L-OD<sub>600</sub>) in batch and 3.67 mg/(mL-OD<sub>600</sub>), respectively. The experimental results of biomass production and substrate consumption were adjusted to mathematical models and presented a good fit with a  $r^2 = 0.99$  in both cases. To demonstrate the flexibility of the EFP system, glucose and glycerol were used as a carbon source. The kinetics of biomass, substrate and plasmid were measured. The mathematical models used were adjusted to the experimental data and were used to describe the behavior of the system ( $r^2 > 0.95$ ). Plasmid productivities of 13.3 mg/(L-h) using glucose and 19.4 mg/(L-h) using glycerol were obtained. These levels represent a 1 to 3-fold increase in performance index compared with previously reported cultures using *E. coli* DH5 $\alpha$ . Nanovaccines encapsulating plasmid in cationic lipid nanoparticles were prepared, resulting particles of 120 nm of diameter, a zeta potential (ZP) 17 mV and a polydispersity index (PDI) of 0.14, values within the recommended range for their use. The nanovaccine presented a higher percentage of transfection (97%) than naked plasmid (78%) and did not show significant cytotoxicity. In respond to the nanovaccine, RAW 264.7 cells noticeably expressed the

cytokine TNF-  $\alpha$  but no the cytokine IL-6, suggesting a suitable cytokine profile for of a cellular immune response induction, which is favorable for the treatment against leishmaniasis. The present research provides the fundamental knowledge for scale-design of a bioprocess to produce third generation vaccines, suitable to promote the corresponding clinical studies and the eventual transfer of this technology.



---

---

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABLAS.....	XIV
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivo General.....	3
1.4 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO 2.....	5
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
2.1 Aplicaciones terapéuticas del ADN plasmídico.....	5
2.2 Plásmidos.....	7

---

<b>2.3 Respuesta inmune producida por las nanovacunas de ADNp .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4 Producción de ADNp.....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Condiciones de cultivo .....	14
2.4.2 Estrategia de fermentación .....	16
2.4.3 Recuperación primaria.....	18
2.4.4 Recuperación intermedia .....	18
2.4.5 Purificación final .....	19
<b>2.5 Nanopartículas para administración de vacunas .....</b>	<b>19</b>
2.5.2 Toxicidad de las nanopartículas.....	22
<b>2.6 Efectividad de las nanovacunas de ADNp .....</b>	<b>23</b>
2.6.1 Antigenicidad de nanopartículas .....	24
2.6.2 Adyuvanticidad de nanopartículas .....	24
2.6.3 Respuesta inmune mediada por nanopartículas .....	25
2.6.4 Mecanismo de la transfección celular .....	25
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Materiales y equipo.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Materiales .....	29
3.1.2 Equipo .....	31
<b>3.2 Producción del pVAX-NH36.....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Estandarización de inóculo .....	33

---

3.2.2 Comparación de sistemas de fermentación .....	34
3.2.3 Optimización del sistema PAE .....	36
3.2.4 Análisis de muestras .....	37
<b>3.3 Marco teórico .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4 Preparación y caracterización de nanovacunas.....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Preparación .....	41
3.4.2 Caracterización .....	42
3.4.3 Eficiencia de encapsulación .....	42
<b>3.5 Evaluación <i>in vitro</i> de las nanovacunas .....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>46</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Producción del plásmido.....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Estandarización de inóculo .....	46
4.1.2 Comparación de sistemas de fermentación .....	50
4.1.3 Optimización del sistema PAE .....	52
<b>4.2 Preparación y caracterización de la nanovacuna.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3 Evaluación <i>in vitro</i> de las nanovacunas .....</b>	<b>65</b>
4.3.1 Evaluación de la internalización celular .....	65
4.3.2 Evaluación de la respuesta inmune de la nanovacuna.....	67
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>70</b>

---

<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparación de costo y facilidad de procesamiento de vacunas. . . . .	7
<b>Figura 2.</b> Principales isoformas de los plásmidos. . . . .	8
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de un vector plasmídico. . . . .	9
<b>Figura 4.</b> Esquema del plásmido pVAX1-NH36. . . . .	11
<b>Figura 5.</b> Mecanismo global de la respuesta inmune inducida por las vacunas de ADNp. Respuesta humoral y celular. . . . .	13
<b>Figura 6.</b> Proceso de producción de plásmido para su uso en nanovacuna. . . . .	15
<b>Figura 7.</b> Modos de fermentación para producción de ADNp. . . . .	17
<b>Figura 8.</b> Estructura de las nanopartículas de lípidos catiónicos. (1) Bicapa fluida, (2) ADNp encapsulado, (3) carga catiónica y (4) multilaminar. . . . .	23
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de transfección de las nanovacunas lipídicas. (1) Fusión y (2) endocitosis. . . . .	26
<b>Figura 10.</b> Esquema general de la metodología empleada en la investigación. . . . .	28
<b>Figura 11.</b> Extrusor Liposome Fast Factory utilizado. . . . .	33
<b>Figura 12.</b> Esquema de los sistemas de fermentación utilizados para el cultivo de <i>E. coli</i> a nivel biorreactor. . . . .	36
<b>Figura 13.</b> Esquema de organización del programa de MATLAB. . . . .	40
<b>Figura 14.</b> Preparación de nanovacunas por el método de hidratación de lípidos. . . . .	41
<b>Figura 15.</b> Protocolo para ELISA adaptado de biolegend. . . . .	45
<b>Figura 16.</b> Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> . . . . .	47
<b>Figura 17.</b> Efecto de la oxigenación del cultivo sobre el crecimiento y rendimiento de plásmido en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . a) Crecimiento celular y b) rendimiento final de plásmido. Matraz 1 L ( $\blacktriangle$ ) y frasco de 500 mL ( $\bullet$ ) . . . . .	48
<b>Figura 18.</b> Efecto de la temperatura del cultivo sobre el crecimiento y producción de plásmido en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . a) crecimiento celular. b) Rendimiento específico de plásmido. Temperaturas: (- $\bullet$ -) 25°C, (- $\bullet$ -) 30°C, (- $\bullet$ -) 37°C, (- $\bullet$ -) 37-42°C y (- $\bullet$ -) 30-42°C . . . . .	49

---

<b>Figura 19.</b> Efecto de la temperatura y tiempo de cultivo sobre la producción de plásmido en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . Gel de electroforesis de muestras en buffer de lisis tomadas a diferentes tiempos.....	49
<b>Figura 20.</b> Microscopía óptica de tinción Gram de células de <i>E. coli</i> a diferentes temperaturas.....	51
<b>Figura 21.</b> Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de los sistemas de fermentación. a) lote, b) lote alimentado y c) PAE.....	52
<b>Figura 22.</b> Comparación de producción de plásmido en los sistemas de fermentación <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . Gel de electroforesis de muestras de plásmido en buffer de lisis.....	54
<b>Figura 23.</b> Comparación de medios de cultivo en los sistemas de fermentación <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	55
<b>Figura 24.</b> Cinética de las fermentaciones en lote. Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato a) glucosa y b) glicerol.....	56
<b>Figura 25.</b> Electroforesis en gel de agarosa de lisados celulares de las fermentaciones por lote. a) glucosa y b) glicerol. ....	58
<b>Figura 26.</b> Cinética de las fermentaciones del sistema PAE. Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato a) glucosa y b) glicerol.....	59
<b>Figura 27.</b> Electroforesis en gel de agarosa de lisados celulares de las fermentaciones PAE. a) Glucosa y b) glicerol.....	61
<b>Figure 28.</b> Control de oxígeno disuelto. Experimentos usando glucosa a) Lote y b) PAE. Experimentos usando glicerol c) Lote y d) PAE.....	62
<b>Figura 29.</b> Análisis de distribución de tamaño por dispersión dinámica de la luz.....	64
<b>Figura 30.</b> Encapsulación del plásmido en nanopartículas lipídicas. a) Cromatograma y b) Electroforesis en gel de agarosa de ADNp (1) desnudo y (2) encapsulado.....	65
<b>Figura 31.</b> Ensayo de viabilidad celular mediante citometría de flujo. a) células control, b) liposomas vacíos, c) vector pVAX, d) pVAX-NH36 y e) nanovacuna.....	66
<b>Figura 32.</b> Ensayo de internalización celular mediante citometría de flujo. a) células control, b) liposomas vacíos, c) vector pVAX1, d) pVAX1-NH36 y e) nanovacuna.....	67
<b>Figura 33.</b> Análisis de citocinas producidas por la administración <i>in vitro</i> de la nanovacuna. a) citocina IL-6 y b) citocina TNF- $\alpha$ .....	69

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de vacunas humanas agrupadas en tres generaciones. Adaptada de (García-Rendón et al., 2018).....	6
<b>Tabla 2.</b> Candidatos prometedores para vacunas de tercera generación.....	11
<b>Tabla 3.</b> Parámetros analíticos recomendados para el control en proceso y pruebas de ADNp para su uso a nivel farmacéutico.....	20
<b>Tabla 3.</b> Componentes del medio definido utilizado en el cultivo <i>E. coli</i> . ....	30
<b>Tabla 4.</b> Composición de soluciones trazas (1000X). ....	31
<b>Tabla 5.</b> Componentes del medio DMEM utilizado en los ensayos <i>in vitro</i> . ....	32
<b>Tabla 6.</b> Rendimientos finales de plásmido en la comparación de sistemas de fermentación. ....	54
<b>Tabla 7.</b> Parámetros cinéticos obtenidos de las fermentaciones por lote. ....	57



## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 Introducción

El empleo de vacunas de ADN plasmídico es una nueva tecnología para mimetizar infecciones y generar una adecuada respuesta inmune (González-Valdez et al., 2013). Esta técnica consiste en la introducción de genes a células hospederas que dirigen la síntesis de una proteína o péptido que al expresarse realiza una acción inmunizante. Las vacunas de ADNp están dirigidas a la prevención de enfermedades para las cuales aún no existen vacunas, o su costo es elevado (Misra, 2013; Prazeres et al. 2001).

Se considera que las vacunas de esta nueva generación son más seguras, baratas, y más fáciles de producir que las convencionales; además presentan alta estabilidad de almacenamiento, baja inmunogenicidad y toxicidad (Forde, 2005). La gran demanda ADNp para el uso en vacunas ha propiciado una gran actividad de investigación relacionada con el desarrollo de procesos económicos de producción de plásmidos para su uso terapéutico (Prazeres y Ferreira, 2004; Shamlou, 2003; Stadler et al., 2004)

El ADNp es producido por células modificadas genéticamente, generalmente *Escherichia coli*, que hospedan el plásmido con el gen de interés (Tejeda-Mansir and Montesinos, 2008). El proceso utilizado para producir plásmidos puede influir en su actividad y estabilidad biológica (De La Vega et al., 2013). Los cultivos convencionales de alta densidad celular (HCDC, por sus siglas en inglés) utilizados para producir ADNp en modo de alimentación por lotes, están limitados por la acumulación de sustancias tóxicas, daño celular o inestabilidad plasmídica (García-Rendón et al., 2017).

El cultivo PAE para la producción de plásmidos es un modo alternativo de conducir HCDC y evitar las limitaciones de los cultivos convencionales (Munguia-Soto et al.,

2015). El cultivo PAE comienza con una fase lote con una concentración inicial del sustrato limitante. Una vez que la cantidad inicial del sustrato es consumido, se inicia una etapa de alimentación exponencial del sustrato y al mismo tiempo un volumen igual al alimentado es removido, permitiendo la eliminación de tóxicos. Las células son recirculadas al biorreactor mediante un equipo de ultrafiltración (García-Rendón et al., 2017; Munguia-Soto et al., 2015).

El termino leishmaniasis se refiere a una variedad de síndromes clínicos que van desde lesiones cutáneas autolimitadas a una infección potencialmente fatal de las vísceras, causado por el protozoo intracelular del género *Leishmania*, provocando una significativa morbilidad y mortalidad en muchos países del mundo (Dunning, 2009). Su distribución geográfica en el país de México es amplia y afecta por lo menos a 17 estados (Hernández-Flores et al., 2007). Actualmente, los tratamientos para la leishmaniasis tienen una capacidad limitada y es necesario el desarrollo de una vacuna económica para controlar o eliminar la enfermedad.

En México se realizan diversos trabajos en esta área, se ha reportado el uso del plásmido VR1012-NH36 como vacuna contra la leishmaniasis y se está trabajando con el plásmido pVAX1-NH36 para producir una vacuna contra esta misma enfermedad (Dumonteil et al., 2000; Munguia-Soto et al., 2015). El gen NH36 de la hidrolasa nucleosídica del parásito es un candidato prometedor para una vacuna ADNp contra la leishmaniasis y ya se ha analizado en modelos animales (Ureña-Búrquez et al., 2019).

La baja inmunogenicidad sigue siendo el mayor desafío para el uso práctico de vacunas con ADNp desnudo en humanos, debido a la baja eficacia de transfección y la breve expresión del gen. Una vez administrado el ADNp desnudo, estas limitaciones son causadas por factores como: a) degradación por nucleasas y eliminación por el sistema endotelial reticular, b) dificultad para superar múltiples barreras celulares y subcelulares, incluida la membrana plasmática, c) falta de habilidad para facilitar la captación específica por parte de células dendríticas (las células presentadoras de antígeno más importantes) y d) su gran tamaño y su naturaleza hidrofílica. (Ureña-Búrquez et al., 2019; Zagato et al., 2018)

El diseño de sistemas de entrega para transportar el vector con el gen seleccionado a células u órganos objetivo, para lograr una adecuada eficiencia de expresión génica y baja citotoxicidad, es un desafío importante que se ha emprendido utilizando varios enfoques, incluido el desarrollo de nanopartículas (NP) lipídicas. Las dispersiones de lípidos con un tamaño entre 100 y 200 nm pueden viajar dentro del sistema circulatorio y penetrar muchas barreras fisiológicas, además de que ya han sido probadas clínicamente (Akagi et al., 2012; Nitta y Numata, 2013; Ureña-Búrquez et al., 2019).

## **1.2 Justificación**

Es necesario el desarrollo de un bioproceso para la producción de nanovacunas contra la leishmaniasis, basada en partículas lipídicas cargadas de pVAX-NH36. Considerando los avances existentes en esta dirección, ahora es importante optimizar el proceso de producción del plásmido pVAX1-NH36 hospedado en *E. coli* DH5 $\alpha$  en un sistema de fermentación perfusiva. Asimismo, desarrollar un método de encapsulamiento del plásmido en nanopartículas lipídicas y evaluar el comportamiento de estas en un sistema *in vitro*.

## **1.3 Objetivo General**

Producir y encapsular pVAX1-NH36 para su uso como vacuna contra leishmaniasis y evaluar su eficiencia transfectiva e inmunológica.

## **1.4 Objetivos Específicos**

- Estandarizar el inóculo
- Comparar los sistemas de fermentación lote y lote alimentado con el sistema perfusivo.
- Optimizar el proceso de fermentación perfusiva para la producción del plásmido pVAX1-NH36 hospedado en *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- Preparar y caracterizar nanopartículas lipídicas conteniendo el plásmido pVAX1-NH36.

- Evaluar la capacidad de internalización celular de las nanopartículas con plásmido, mediante estudios *in vitro*.
- Evaluar la respuesta inmunológica producida por la internalización de las nanopartículas con plásmido mediante estudios *in vitro*.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 2.1 Aplicaciones terapéuticas del ADN plasmídico

El empleo de vacunas de ADNp es una nueva tecnología que consiste en la introducción de genes a células huésped que dirigen la síntesis de una proteína o péptido que al expresarse realiza una acción inmunizante. Estas vacunas de ADNp (también conocidas como vacunas genéticas, o vacunas de ADN desnudo, entre otros) están dirigidas a la prevención de enfermedades, principalmente para las cuales aún no existen tratamientos, o su costo es elevado (Misra, 2013; Prazeres, 2001).

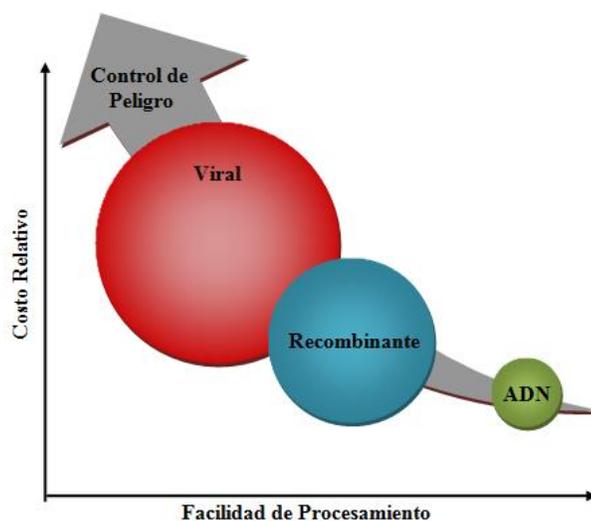
Existen varios tipos de vacunas (Tabla 1): (i) vacunas convencionales (primera generación) basadas en microorganismos inactivados o atenuados o en subunidades de patógenos como toxinas, polisacáridos y proteínas (Hasson et al., 2015). Las vacunas de subunidades de patógenos generalmente no proporcionan inmunidad de por vida. En contraste las vacunas de patógenos atenuados pueden activar tanto la respuesta inmune celular como la humoral y generalmente inducen una inmunidad más prolongada (Ferraro et al., 2011). (ii) Vacunas recombinantes (segunda generación) que se basan en antígenos proteicos altamente purificados provenientes de secuencias de ADN recombinante construidas *in vitro* y expresados en sistemas heterólogos tales como células de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos. (iii) Vacunas de ADNp (tercera generación) que se basan en una secuencia de ADN que ha sido diseñada genéticamente para expresar proteínas de un patógeno específico cuando se introduce en un organismo (Tejeda-Mansir et al., 2018).

**Tabla 1.** Tipos de vacunas humanas agrupadas en tres generaciones. Adaptada de (García-Rendón et al., 2018)

Generación	Técnica de producción y enfermedad
Primera (aprobada)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Virus y bacterias atenuados</i>. Varicela, rabia, tuberculosis, fiebre amarilla, polio (OPV), sarampión, rubeola, tifoidea, rotavirus, zoster.</li> <li>2. <i>Virus y bacterias inactivos</i>. Tifoidea, cólera, plaga, tosferina, polio (IPV), rabia, y hepatitis A.</li> <li>3. <i>Proteína/toxoide</i>. Difteria, tétanos, tosferina, ántrax y hepatitis A.</li> <li>4. <i>Polisacárido y glicoconjugado</i>. Neumococos, meningococos (C, ACWY), <i>Haemophilus influenzae</i> B, tifoidea (Vi), pneumococos (7, 10 y 13).</li> </ol>
Segunda (aprobada)	<i>Proteína recombinante</i> . Hepatitis B, toxina B del cólera, virus del papiloma humano, meningococos B y hepatitis E.
Tercera (ensayos clínicos)	<i>ADN plasmídico</i> . VIH, influenza, malaria, ébola, virus del papiloma humano, zika, dengue y cáncer (12 tipos).

Se considera que las vacunas de tercera generación son más seguras, baratas, y más fáciles de producir que las convencionales; además presentan alta estabilidad de almacenamiento, baja inmunogenicidad y toxicidad (Forde, 2005; Kutzler y Weiner, 2008). Esto se debe a que combinan muchas de las características deseables de las vacunas tradicionales, pero ofrecen ventajas adicionales, como las siguientes: a) seguridad, dado que no usan microorganismos vivos; b) capacidad de inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral; c) facilidad de modificar los antígenos codificados en los plásmidos; d) menor costo cuando se producen a gran escala; y e) vida media mayor, por lo que se consigue una mejor estabilidad en cuanto a la temperatura de almacenamiento y transporte, lo que permite prescindir de la cadena fría utilizada en las vacunas convencionales (Fig. 1) (Kutzler y Weiner, 2008; Li et al., 2012; Liu 2011; Pereira et al., 2014; Tregoning y Kinnear, 2014).

Hasta la fecha, las vacunas de ADNp solo han sido autorizadas en el sector veterinario (Grunwald & Ulbert, 2015). Esto contribuye a la validación de la tecnología de las vacunas de ADNp y promueve su uso en humanos. Las vacunas de ADNp para humanos están bajo investigación clínica en todo el mundo, incluidos los plásmidos que expresan antígenos del virus de la malaria, VIH, influenza, tuberculosis, Zika y Ébola (Abbink et al., 2016; Klug et al., 2012; Nakayama y Aruga, 2015).



**Figura 1.** Comparación de costo y facilidad de procesamiento de vacunas. Adaptado de (González-Valdez et al., 2013).

Se han propuesto diversas células hospederas para la producción de plásmidos, sin embargo, la bacteria Gram-negativa *E. coli* sigue siendo la más usada para este propósito. Esto debido a diversas ventajas presentadas por *E. coli* como son rápido crecimiento con alta densidad celular y requerimientos nutrimentales mínimos, resultando costos de manufactura bajos. Así mismo, esta bacteria se encuentra genéticamente bien caracterizada, además existe disponibilidad de un gran número de cepas mutantes mejoradas y vectores de clonación para su transformación (García-Rendón et al., 2018; Munguia-Soto et al., 2015; Silva et al., 2012; Williams et al., 2006).

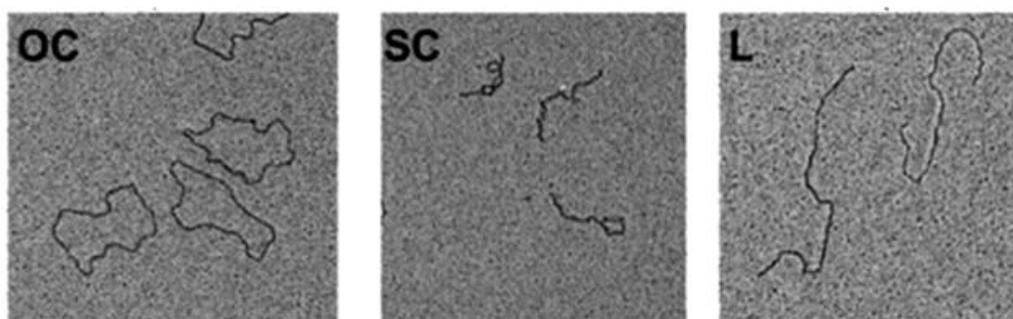
## 2.2 Plásmidos

Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de ADN de doble cadena, que se encuentran físicamente separadas y que se replican de manera independiente del ADN cromosómico de una célula, y, a diferencia de este, no contienen información genética necesaria para el crecimiento y multiplicación de la célula (Bennett, 2008; Primrose y Twyman, 2013).

A menudo, los genes transportados en plásmidos proporcionan ventajas genéticas a las bacterias, tales como resistencia a los antibióticos y resistencia a metales pesados tóxicos. Los plásmidos se encuentran naturalmente en una gran cantidad de bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucarióticos. Se presentan en una amplia gama de longitudes, variando aproximadamente desde 1 a 250 kilopares de bases (kb), conteniendo de 2 a 30 genes (Prescott et al., 2002; Primrose y Twyman, 2013; Williams y Kingston, 2011).

Los plásmidos se han utilizado como herramientas para clonar, transferir y manipular genes. Los que se utilizan experimentalmente para estos fines se denominan vectores. Se pueden insertar fragmentos de ADN o genes en un vector de plásmido, resultando un plásmido recombinante, el cual puede ser introducido en una bacteria por medio del proceso denominado transformación (Prescott et al., 2002; Williams y Kingston, 2011).

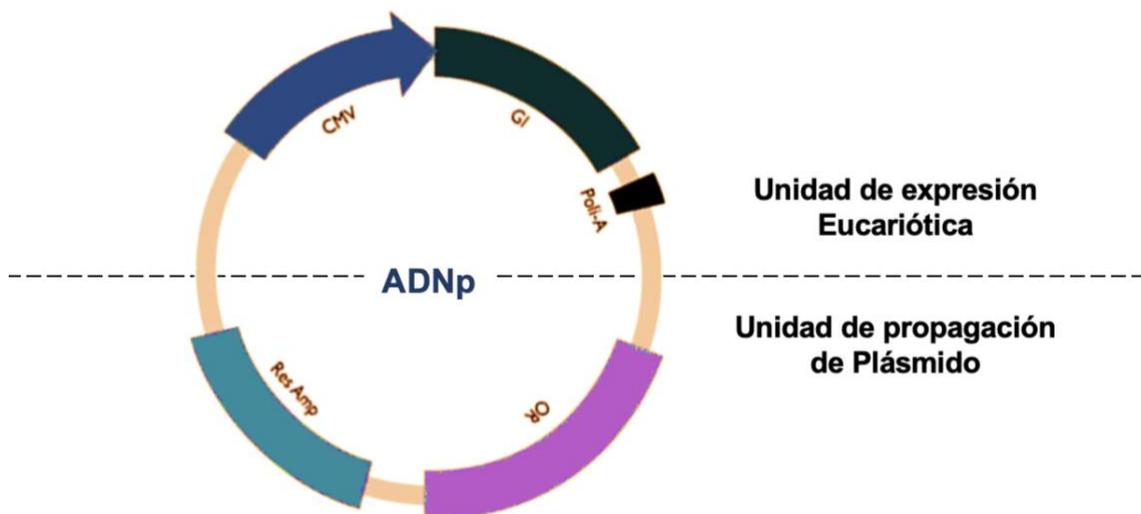
Los plásmidos existen en varias formas topológicas: lineal (L), circular abierta (OC) y superenrollada (SC) por sus siglas en inglés (Fig. 2). La forma superenrollada es la más común *in vivo* y se ha asociado con mayor eficacia en la transfección celular (Molloy et al., 2004; Prazeres, 2008). Las formas circular abierta y lineal del plásmido resultan de daño enzimático o deformación inducida a la forma superenrollada (Carnes y Williams, 2007).



**Figura 2.** Principales isoformas de los plásmidos: circular abierta (OC), superenrollado (SC) y lineal (L) (Prazeres, 2008).

Los plásmidos utilizados para vacunación poseen características básicas de los vectores desarrollados para una óptima expresión en células eucariotas como se muestra en la Figura 3 (Mota-Sánchez, 2009). La organización de los elementos genéticos de un ADNp terapéutico refleja su funcionalidad, fabricación en masa y uso clínico en el paciente. Por lo tanto, el plásmido típicamente contiene una "unidad de propagación de plásmido" responsable de su propagación en el huésped microbiano y una "unidad de expresión eucariótica" que impulsa la expresión del gen en las células del paciente (Hasson et al., 2015).

Las características esenciales para un vector plasmídico consisten en (a) un origen de replicación que permita un alto rendimiento de producción en la bacteria; (b) un gen de resistencia a antibiótico para conferir un crecimiento selectivo durante el cultivo bacteriano; (c) un fuerte promotor para la expresión del gen en células de mamíferos; y (d) una secuencia de terminación de poliadenilación para la estabilización del transcrito de ARNm (Ismail et al., 2012; Mota-Sánchez, 2009).



**Figura 3.** Representación esquemática de un vector plasmídico. El plásmido contiene una región con el promotor (CMV), el gen que codifica al antígeno de interés (GI), seguido de la señal de poliadenilación. El vector incluye el gen de resistencia a antibióticos (Res), en este ejemplo a la ampicilina (Amp) y el origen de replicación (OR) (Adaptado de Tejeda-Mansir et al., 2018).

### 2.2.1 Plásmido pVAX1-NH36

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias que es endémica en más de 88 países. La Organización Mundial de la Salud estima que existen más de 12 millones de casos actualmente, con una incidencia anual de más de 600 mil casos y 500 mil muertes. La distribución geográfica en México es amplia y afecta por lo menos a 17 estados. Esta enfermedad puede ser clasificada en leishmaniasis visceral, si involucra la infección del hígado, el bazo, la médula espinal e inmunosupresión, causando severos daños y hasta la muerte de no ser atendida, o en leishmaniasis cutánea que se caracteriza por lesiones crónicas en la piel (Aguilar-Be et al., 2005; Borja-Cabrera et al., 2012; Hernández-Flores et al., 2007; Rosado-Vallado et al., 2005).

La leishmaniasis ofrece en muchas maneras un caso de estudio único de vacuna, ya que es causada por varias especies diferentes altamente relacionadas, aumentando así la posibilidad de desarrollar una sola vacuna para proteger contra múltiples enfermedades y que se pueda usar tanto terapéutica como profilácticamente (Alvar et al., 2013).

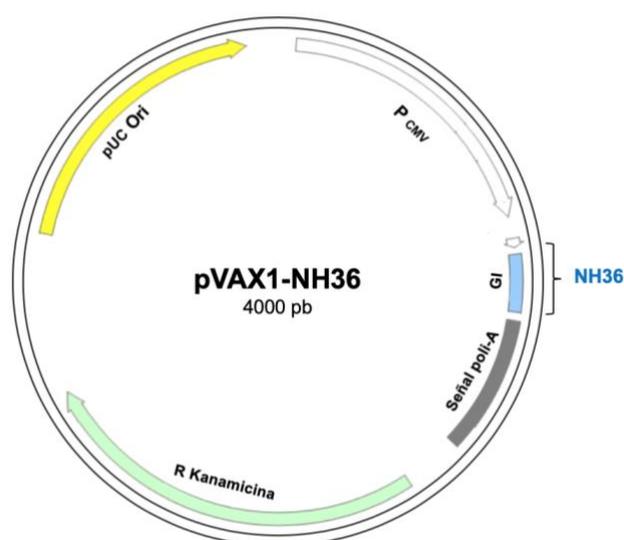
Sin embargo, a pesar del esfuerzo sustancial que se invierte en el desarrollo de una vacuna, actualmente no existe una vacuna autorizada contra la leishmaniasis humana. Para desarrollar una vacuna eficaz, es importante comprender los mecanismos de la respuesta inmune a la infección por *Leishmania* para que la vacuna pueda diseñarse para inducir una respuesta protectora en lugar de una que pueda resultar en la susceptibilidad al parásito (Dunning, 2009).

En la Tabla 2 se reportan los antígenos más prometedores para utilizarse los próximos años como vacunas de ADNp ya que han sido probados en modelos animales (Palatnik-de-Sousa, 2008). Ha sido demostrado que el antígeno NH36, del género *Leishmania*, genera una adecuada respuesta inmune contra la leishmaniasis (Hernández-Flores et al., 2007). Esta glicoproteína es una enzima vital para la división celular del parásito, ya que hidroliza el ADN foráneo liberando purinas y pirimidinas, que más tarde son utilizadas en la síntesis del propio ADN del parásito (Cui et al., 2001; Gamboa-León et al., 2006).

**Tabla 2.** Candidatos prometedores para vacunas de tercera generación (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Antígeno candidato	Modelo animal probado
LACK	Ratones y perros
LeIF, TSA, LmSTI1	Ratones, simios, humanos
H1	Ratones, simios
Cpa + CPb	Ratones, perros
KMP11	Ratones, hámsteres, perros
NH36	Ratones, perros

Para el desarrollo de vacunas de ADNp contra la leishmaniasis se ha utilizado el plásmido pVAX1-NH36, con un tamaño de 4000 pares de bases (pb) (Fig. 4), el cual porta el gen de aproximadamente 1000 pb que codifica para la glicoproteína nucleósido hidrolasa (NH36), expresada por la mayoría de las especies del género *Leishmania* (Aguilar-Be et al., 2005).



**Figura 4.** Esquema del plásmido pVAX1-NH36 (Modificado de Invitrogen).

Las vacunas de ADN pueden proporcionar una mejor protección contra *Leishmania* que las vacunas muertas o atenuadas, ya que pueden inducir la expresión de antígenos de *Leishmania*, de igual estructura proteica y antigenicidad (Encke et al., 1999). Además, los ADNp derivados de bacterias son naturalmente inmunogénicos, ya que sus esqueletos contienen motivos de citosina-fosfato-guanosina no metilados (CpG) que se ha demostrado que inducen fácilmente la expresión de citoquinas Th1 y mejoran las respuestas de células T CD8 (Garmory et al., 2003; Ivory y Chadee, 2004). Esta propiedad adyuvante es de gran utilidad para una vacuna de *Leishmania*, ya que estos motivos garantizarían la inducción de inmunidad mediada por células, que se sabe que confiere protección contra el parásito (Dunning, 2009).

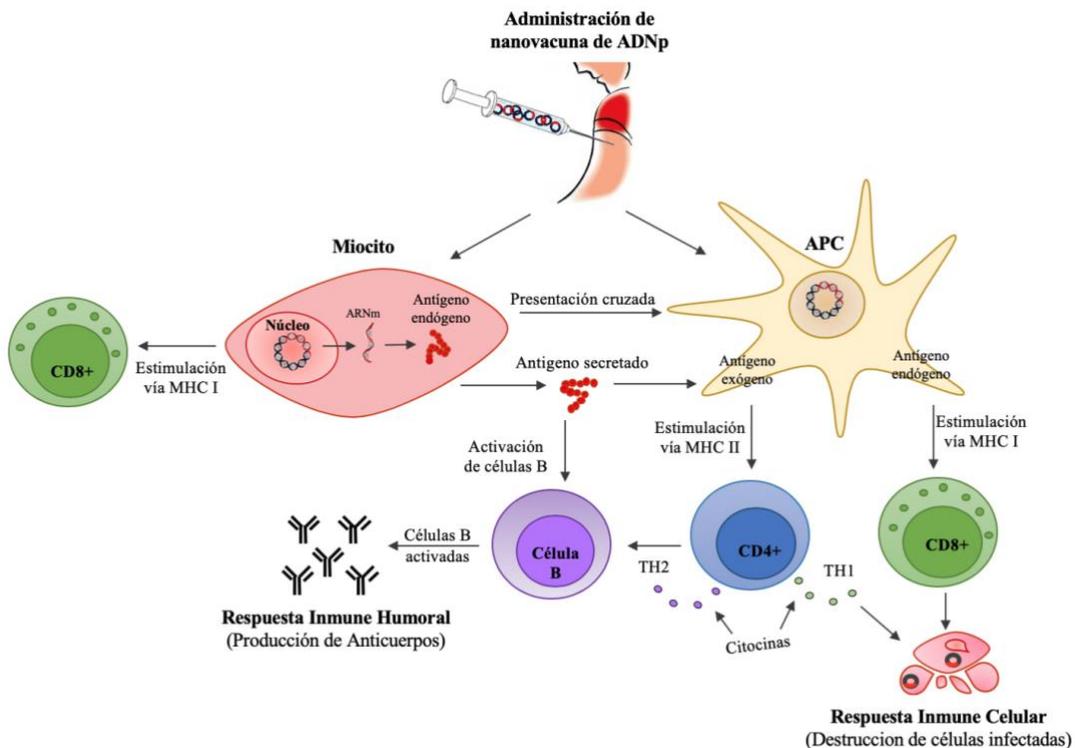
### **2.3 Respuesta inmune producida por las nanovacunas de ADNp**

Una vez que se administra el ADNp, los dos tipos principales de células que se transfectan son los miocitos (células musculares) y las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (DC) (Fig. 5) (Ingolotti et al., 2010). En cualquier caso, el vector plasmídico entra en la célula, se transloca al núcleo y se inicia la transcripción del inmunógeno utilizando la maquinaria celular del huésped. A esto le sigue la producción de proteínas en el citoplasma y la consiguiente formación de antígenos extraños como proteínas o como cadenas peptídicas (Ingolotti et al., 2010; Kutzler y Weiner, 2008).

Los antígenos proteicos sintetizados pueden ser secretados por los miocitos y activar las células B. Las células APC también pueden ser activadas por estos antígenos o por transfección plasmídica directa, y migran a los ganglios linfáticos drenantes donde se presentan los péptidos antigénicos sintetizados a las células CD4 + y CD8 + a través de los complejos de mayor de histocompatibilidad (MHC) II y MHC I, respectivamente. Como resultado, las respuestas de inmunización humoral y celular se obtienen a través de la activación de las células B y CD8 +, respectivamente (Ingolotti et al., 2010; Liu, 2011; Yang et al., 2014).

Existe evidencia que sugiere que las CD inmaduras pueden endocitar proteínas y residuos solubles de células transfectadas apoptóticas y expresar el código antigénico a

través de MHC clase I y / o MHC clase II después de diferenciarse en DC maduras. Por lo tanto, la vacunación con ADN puede resultar en la estimulación tanto de las poblaciones de células T CD4 como de las células T CD8. La capacidad única de DC para presentar antígenos extracelulares en el contexto de MHC clase I y MCH clase II se conoce como presentación cruzada; como resultado de este fenómeno, es probable que DC desempeñe un papel clave en la inducción humoral y celular. Inmunidad mediada tras la vacunación con ADNp. (Dunning, 2009; Kutzler y Weiner, 2008).



**Figura 5.** Mecanismo global de la respuesta inmune inducida por las vacunas de ADNp. Respuesta humoral y celular. Adaptado de (García-Rendón et al., 2018).

## 2.4 Producción de ADNp

El objetivo principal al diseñar un bioproceso para la producción de ADNp es maximizar la productividad (kg/L por año) y el rendimiento específico (kg/kg) de ADNp superenrollado. A través del diseño apropiado del vector, la selección de la cepa huésped, la optimización de las condiciones de crecimiento y la estrategia adecuada de

purificación; se pueden lograr mejoras en la productividad, el rendimiento y la calidad del plásmido y de los costos de producción (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

La producción biotecnológica de plásmidos se divide en etapas previas y etapas posteriores. En las primeras el ADNp es producido por células modificadas genéticamente que hospedan el plásmido con el gen de interés. En las etapas posteriores el plásmido se recupera y purifica (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

En la Figura 6 se muestran las operaciones utilizadas en la producción de plásmido para su uso en nanovacunas (Carnes y Williams, 2007). Los requerimientos a escala laboratorio de pequeñas cantidades de plásmido purificado puede ser satisfechos por el cultivo de *E. coli* en matraces agitados. Para mayores requerimientos se utilizan biorreactores controlados para aliviar las limitaciones del cultivo en matraces agitados. En particular, el uso de biorreactores con control de oxígeno disuelto y pH, permite incrementos significativos en la producción de biomasa, frecuentemente relacionada con un alto rendimiento de plásmido (Listner et al., 2006).

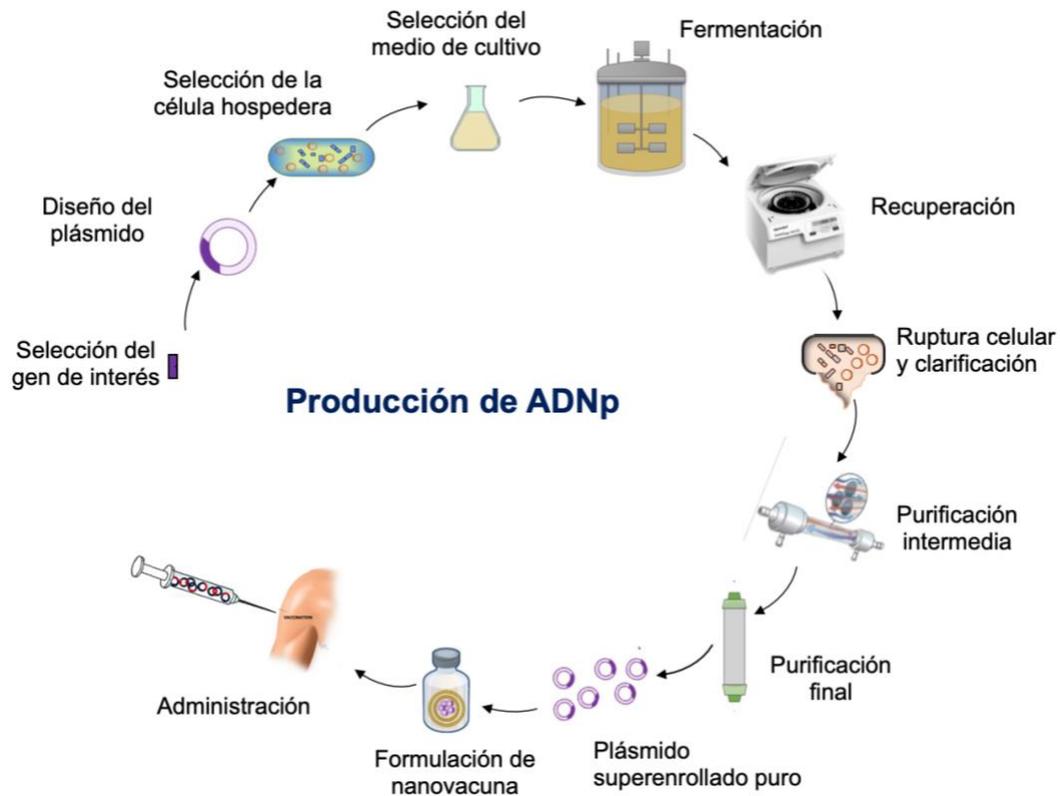
La producción de ADNp en *E. coli* depende de diversos factores, incluyendo las interacciones entre el huésped, el vector plasmídico y las condiciones de crecimiento, tales como los componentes del medio y estrategias de fermentación, así como las operaciones posteriores (Carnes y Williams, 2007; Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

#### **2.4.1 Condiciones de cultivo**

Los parámetros clave de rendimiento de los bioprocesos de producción de ADNp, además del diseño vectorial y la cepa huésped, dependen del diseño del medio de cultivo, las condiciones de crecimiento y la estrategia de purificación (Goncalves et al., 2014; Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008; Yang y Yang, 2012).

La composición y preparación de los medios de cultivo puede afectar drásticamente la calidad y el rendimiento del plásmido, por lo tanto, el costo general de producción. El diseño de un medio equilibrado se basa en los requisitos de energía celular y la composición elemental. Por lo general, los requisitos nutricionales se satisfacen con un medio mínimo (definido), un medio semidefinido o un medio complejo (Carnes, 2005;

Prather et al., 2003). Una consideración importante en la composición del medio es la fuente de carbono, ya que puede afectar a la producción del ADNp (Islas-Lugo et al., 2016). Se ha reportado que *E. coli* DH5 $\alpha$  produce más ADNp en HCDC usando glicerol que usando glucosa. Por otra parte, el uso de glucosa aumenta el exceso de producción de acetato (Bohle y Ross, 2011; Phue et al., 2008).



**Figura 6.** Proceso de producción de plásmido para su uso en nanovacuna.

El uso de una tasa de crecimiento reducida es el principio unificador en fermentaciones de plásmidos de alta calidad y alto rendimiento. Las altas tasas de crecimiento se han asociado con la producción de acetato, la inestabilidad del plásmido y los porcentajes más bajos de plásmido superenrollado. Una tasa de crecimiento reducida alivia la inestabilidad del plásmido dependiente de la tasa de crecimiento al proporcionar tiempo para que la replicación del plásmido se sincronice con la división celular (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

### 2.4.2 Estrategia de fermentación

Las técnicas de cultivo celular de alta densidad han sido desarrolladas para mejorar la productividad del proceso de cultivo, para proporcionar ventajas como la reducción del volumen de cultivo, mejorar los procesos post-fermentación, disminución de los pasos de purificación, eliminación de etapas de concentración y por lo tanto reducción de costos de operación (Restaino et al., 2011).

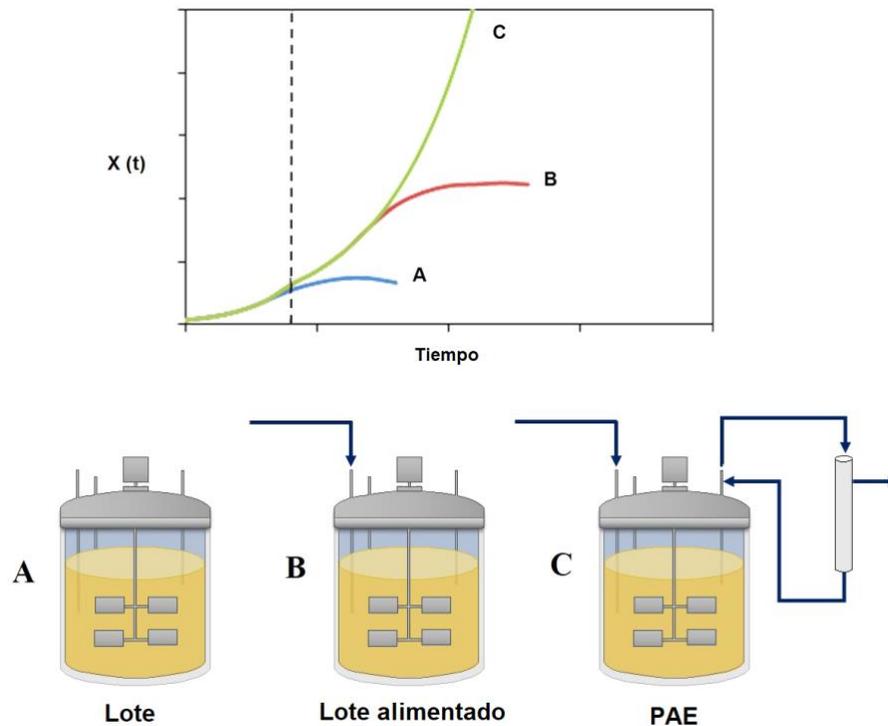
Una consideración importante durante el proceso de producción de ADNp es la configuración y la estrategia operativa del fermentador (Fig. 7). Se han utilizado biorreactores que operan en modo lote, lote alimentado y PAE (Cai et al., 2010; Goncalves et al., 2014; Islas-Lugo et al., 2016; Munguia-Soto et al., 2015).

La fermentación por lotes es un método de fermentación simple, en el que todos los nutrientes se proporcionan desde el principio y no se agregan durante el cultivo. Aunque las fermentaciones por lotes son generalmente simples y cortas, tienen desventajas fundamentales que resultan en rendimientos de ADNp limitados. Principalmente, la tasa de crecimiento en las fermentaciones discontinuas no se puede controlar directamente (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

En el cultivo por lote alimentado, los nutrientes se alimentan de forma continua o semicontinua, mientras que el efluente se elimina de forma discontinua. Este es el modo convencional de cultivos de alta densidad celular utilizado para producir vacunas de ADNp. Sin embargo, esta técnica está limitada por la acumulación de sustancias tóxicas, daño celular o mayor inestabilidad del plásmido (Silva et al., 2012; Williams et al. 2009). Se han reportado altos rendimientos de ADNp en el orden de 2100–2600 mg/L a gran escala utilizando el modo de alimentación discontinua (Goncalves et al., 2014; Williams, 2013). Esto representa una mejora significativa con respecto a los procesos de laboratorio estándar, sin embargo, es probable que todavía haya espacio considerable para que se realicen mejoras significativas en el proceso (Tejeda-Mansir et al., 2018).

Estas técnicas de fermentación discontinua o semicontinua presentan inconvenientes como la producción de inhibidores de crecimiento (Yakhchali et al., 2007). Está reportado que los principales productos solubles al fermentar *E. coli* son acetato, etanol, formiato,

lactato con cantidades pequeñas de succinato, productos gaseosos de hidrógeno y dióxido de carbono en mayor cantidad (Restaino et al., 2011). Estos productos podrían ser los causantes de la inhibición de crecimiento en los cultivos. Según algunos autores esta inhibición puede reducirse o evitarse mediante la alteración del medio de fermentación o la optimización de las estrategias de alimentación (Yakhchali et al., 2007).



**Figura 7.** Modos de fermentación para producción de ADNp (Adaptado de García-Rendón et al., 2018)

Recientemente, se ha desarrollado una nueva estrategia de cultivo para la producción de plásmidos combinando una estrategia de alimentación exponencial con un cultivo de perfusión (PAE) con modernos equipos de apoyo en cultivo celular, filtración y bombas de manejo de líquidos. En este modo de operación, se puede lograr un crecimiento celular exponencial y una tasa de crecimiento específico constante (Munguia-Soto et al., 2015). Los procesos de perfusión tienen una serie de ventajas sobre los procesos por lotes y por lote alimentado que pueden mejorar su rentabilidad.

Los cultivos PAE típicamente comprenden dos etapas de crecimiento: a) crecimiento exponencial en lote y b) crecimiento exponencial con un flujo de alimentación exponencial. El cultivo se inicia con una fase de crecimiento exponencial por lote, la alimentación exponencial de medio fresco del nutriente limitante comienza una vez que las células han consumido la cantidad inicial de sustrato. El medio gastado se retira continuamente, lo que permite la eliminación de componentes tóxicos. Las células son retenidas y se reciclan de nuevo al reactor mediante un dispositivo de retención celular (García-Rendón et al., 2017).

#### **2.4.3 Recuperación primaria**

La etapa de recuperación primaria de un proceso posterior incluye las operaciones de recolección celular, lisis celular y separación sólido-líquido. La recolección de células se realiza generalmente por centrifugación o filtración de la solución de fermentación para reducir el volumen total (Besnard et al., 2016). El método de lisis más utilizado (Bimboim y Doly, 1979) consiste en la desintegración celular con un pH alto (con hidróxido de sodio a pH ~ 12) en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio, con el cual se liberan altas cantidades de ADNp. Sin embargo, también se liberan contaminantes tales como ARN, ADN genómico (ADNg), endotoxinas y proteínas. La neutralización posterior con acetato de sodio ocasiona la precipitación de proteínas y el ADNg, mientras que el ADNp superenrollado se hibrida a partir de su estado de pH-desnaturalizado. El ADNg de gran peso molecular (~ 200 kb) no se puede hibridar adecuadamente, lo que da como resultado un genómico monocatenario. El precipitado es de naturaleza altamente gelatinosa, tiende a flocular y comúnmente se elimina por filtración (Prather et al., 2003).

#### **2.4.4 Recuperación intermedia**

El objetivo de la etapa de recuperación intermedia es concentrar la solución de ADNp y eliminar una gran fracción de impurezas (Freitas et al., 2009). Esta etapa generalmente se realiza por precipitación con agentes como isopropanol (S. S. Freitas, Santos, & Prazeres, 2006), polietilenglicol (PEG) y bromuro de cetil trimetil amonio (Hoare et al., 2005). El sobrenadante se elimina por filtración y el ADNp precipitado se resuspende y

se prepara para la purificación final utilizando operaciones adicionales, tales como precipitación y ultrafiltración a diafiltrado y se concentra la solución. Recientemente, se han reportado técnicas como la microfiltración y la ultrafiltración de flujo tangencial como operación de fraccionamiento molecular para esta etapa del proceso (Freitas et al., 2009; Manzano et al., 2015; Nunes et al., 2012).

#### **2.4.5 Purificación final**

La purificación del ADNp se realiza mediante técnicas cromatográficas. El propósito es eliminar contaminantes como el ADNg, ARN, proteínas, endotoxinas e isoformas de plásmidos, para obtener un producto de ADNp que cumpla con las especificaciones requeridas (Tabla 3). Este paso utiliza los modos de cromatografía de lecho fijo, como el intercambio aniónico, la interacción hidrófoba (HIC), la fase inversa, la adsorción tiorfílica, la exclusión por tamaño (SEC) y la afinidad. Los esquemas de purificación generalmente utilizan una combinación de estas técnicas (Diogo et al., 2005; Ferreira et al., 2015; Monteiro y Prazeres, 2014; Sousa, Prazeres et al., 2008). Se han utilizado otras técnicas para purificar el ADNp, como los adsorbedores de membrana, (Raiado-Pereira et al., 2013) y ultrafiltración de membrana (Borujeni et al., 2015; Nunes et al., 2014).

#### **2.5 Nanopartículas para administración de vacunas**

Los sistemas no virales basados en ADNp, ofrecen un número de ventajas potenciales, incluyendo la fabricación sencilla, alta estabilidad de almacenamiento, baja inmunogenicidad y toxicidad, y la capacidad de entregar cargas genéticas de mayor tamaño y de libre disposición. Sin embargo, el ADNp no entra en las células de manera eficiente debido a su gran tamaño, naturaleza hidrofílica, y grupos fosfatos cargados negativamente; además, son muy susceptibles a la degradación mediada por nucleasas durante el camino hacia la célula ( De La Vega et al., 2013; Grunwald y Ulbert, 2015). La mayoría de los protocolos de transferencia de genes en ensayos clínicos emplean sistemas de entrega virales. Estos generalmente son muy eficaces, pero su uso frecuentemente está asociado a problemas y preocupaciones de seguridad (Ow et al., 2006).

**Tabla 3.** Parámetros analíticos recomendados para el control en proceso y pruebas de ADNp para su uso a nivel farmacéutico.

Parámetro	Método	Especificaciones
Concentración de ADN	Absorción UV (260 nm)	Depende de las especificaciones del producto
Pureza General	Barrido UV (220-320 nm) ó $A_{260}/A_{280}$	>1.75
Contenido de ADNp SC	HPLC, EGA	>90% <sup>a</sup>
Apariencia	Inspección visual	Claro, incoloro
ADN genómico Residual	EGA, qPCR, Southern blot,	<1%
ARN residual	EGA, qPCR, ensayo de fluorescencia	Indetectable por EGA
Proteínas residuales	ELISA, BCA	<1%
Endotoxinas (LPS)	Ensayo LAL	1 EU/ mg ADNp <sup>b</sup>
Pureza (microorganismos)	Ensayo de esterilidad	<1 CFU

Actualmente, existe un amplio consenso de que las partículas por debajo de 200 nm permiten una transfección más eficiente que las partículas más grandes (Perera y Bernkop-Schnürch, 2012). Las NP definidas como dispersiones de partículas con un tamaño en el rango de 1 a 100 nm, y debido a su pequeño tamaño, pueden viajar dentro del sistema circulatorio y penetrar muchas barreras fisiológicas (Choi et al., 2014). Las NP imitan a los patógenos invasores por su estructura particulada y son absorbidas exitosamente por varios tipos de células del sistema inmunológico (Knuschke et al., 2014).

Además, las NP tienen ventaja sobre las micropartículas más grandes, ya que presentan una alta relación de área de superficie-volumen que permite la modificación de la superficie de la partícula con grupos funcionales para mejorar la respuesta al aumentar

la activación del sistema inmunitario innato (Knuschke et al., 2014; Werengowska-Ciećwierz et al., 2015).

### **2.5.1 Nanopartículas lipídicas para entrega de ADNp**

Se ha demostrado que las NP lipídicas poseen un potencial significativo como sistemas de administración de fármacos. El principal constituyente de las nanopartículas lipídicas (NPL) es el liposoma formado con bicapas de fosfolípidos. Como resultado, los liposomas tienen características biocompatibles que representan sus ventajas más importantes como portadores de fármacos: (1) tienen baja toxicidad y antigenicidad; (2) se pueden biodegradar y metabolizar *in vivo*, y (3) las propiedades liposomales, como la permeabilidad de la membrana, se pueden controlar en cierta medida. Cabe destacar que los liposomas pueden atrapar y proteger los ácidos nucleicos en el viaje hacia el sitio objetivo (Apostolopoulos, 2016; Hafner, Lovrić, Lakš, & Pepić, 2014; Wang, Rajala, & Rajala, 2015).

Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas con un compartimento acuoso interno. Se pueden preparar tres tipos diferentes de liposomas unilamelares: pequeños (20–50 nm), grandes (50–100 nm) o gigantes (10–100  $\mu\text{m}$ ) (Peetla, Stine, & Labhasetwar, 2009). Las vesículas unilamelares pequeñas son menos estables que sus contrapartes más grandes, debido a la alta curvatura y, por lo tanto, a la alta tensión superficial (Dawidczyk et al., 2014).

La encapsulación en NP lipídicas conduce a una mayor internalización, mayor eficiencia de transfección en general y la capacidad de aumentar la absorción a través de las superficies de la mucosa (Farris, Brown, Ramer-Tait, & Pannier, 2016). La introducción de ADNp libre de agentes extraños en el huésped sin ningún vector de recubrimiento protector, aumenta el potencial de una respuesta inmune inadecuada. En lugar de que el ADNp llegue a las células objetivo, se traduzca y produzca el antígeno necesario, el ADNp puede reconocerse como un antígeno en sí (Perrie et al., 2016). Los lípidos catiónicos son ampliamente utilizados y reconocidos como uno de los vectores de administración más prometedores para los ácidos nucleicos para protegerlos de ser digeridos por las nucleasas, facilitar el cruce de la membrana celular y el acceso al

citoplasma (De La Vega et al., 2013; Munye et al., 2015; Shah et al., 2015; Yang et al., 2014).

Los liposomas podrían modificarse para adaptarse a cualquier antígeno cambiando sus propiedades físicas tales como tamaño, carga superficial, composiciones de lípidos y direccionamiento; podrían imitar a los patógenos y ejercer potentes respuestas inmunitarias de larga duración. Además, los liposomas catiónicos podrían provocar la maduración de las células dendríticas (CD) e inducir una serie de citoquinas y quimiocinas. Algunos de ellos ya han entrado en ensayos clínicos (Shim et al., 2013; Yang et al., 2015).

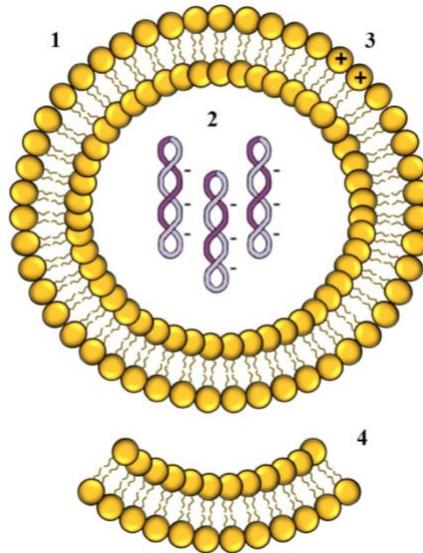
El mecanismo de asociación de los lípidos catiónicos con el ADNp está mediado por una variedad de interacciones físicas. El principal mecanismo de interacción entre los lípidos cargados positivamente y los fosfatos de ADN cargados negativamente es la interacción iónica, produciendo la formación de complejos de ADN o lipoplex. Estos complejos generalmente se formulan con una cantidad excesiva de carga positiva para mediar la interacción con las membranas celulares, que llevan una carga neta negativa (Büyükköröglü, Yazan, & Öner, 2015) Los liposomas basados en lípidos catiónicos pueden fusionarse fácilmente con la membrana celular, ya que ambos están hechos de una bicapa de fosfolípido (Fig. 8).

### **2.5.2 Toxicidad de las nanopartículas**

Debido a su tamaño, las NP pueden moverse a través de los sistemas circulatorio y linfático, y en última instancia a los tejidos y órganos del cuerpo. Estas partículas podrían inducir daño celular irreversible por estrés oxidativo y/o lesión de orgánulos (Choi et al., 2014). Las partículas catiónicas también interactúan con proteínas séricas, componentes de la matriz extracelular y células sanguíneas, lo que puede limitar su rendimiento *in vivo* debido a los efectos de agregación e inmovilización (Perera & Bernkop-Schnürch, 2012).

La determinación del perfil de seguridad y toxicidad clínicamente relevante de un sistema de nanopartículas puede ser extremadamente desafiante, ya que depende de una serie de factores como el tamaño de las nanopartículas, la forma, la estabilidad, la

composición química de la superficie, las propiedades electromagnéticas, así como las condiciones genéticas y existentes del individuo (Choi et al., 2014). Por lo tanto, el estudio de la toxicidad del NP es esencial y se han desarrollado sistemas *in vitro* y modelos *in vivo* para analizar la seguridad de las nanopartículas (Nandedkar, 2012).



**Figura 8.** Estructura de las nanopartículas de lípidos catiónicos. (1) Bicapa fluida, (2) ADNp encapsulado, (3) carga catiónica y (4) multilaminar. (Adaptado de (García-Rendón et al., 2018).

Las aplicaciones clínicas de los liposomas siguen siendo limitadas debido a la inestabilidad *in vivo*, la dificultad para generar formulaciones reproducibles, la producción a gran escala y un costo relativamente mayor. También es necesario abordar algunas cuestiones como el mecanismo de los lípidos catiónicos como adyuvantes y la interacción real entre lípidos y antígenos *in vivo*. Todo esto requiere una investigación profunda en la interconexión de lípidos y vacunas (Jun Yang et al., 2015).

## 2.6 Efectividad de las nanovacunas de ADNp

Varias vacunas de antígenos encapsulados en NP de lípidos han mostrado inducción de respuestas inmunes amplias y potentes. Las principales propiedades inmunoestimuladoras de las nanovacunas comprenden antigenicidad, adyuvancia,

respuestas inflamatorias y los mecanismos de captación celular (Zaman, Good, & Toth, 2013).

### **2.6.1 Antigenicidad de nanopartículas.**

La antigenicidad o inmunogenicidad es una característica que poseen una diversidad de moléculas que consiste en la inducción de una respuesta inmunitaria que puede ser celular o humoral. Esta última promueve la generación de anticuerpos específicos por las células B del organismo. La respuesta inmune a las nanovacunas puede involucrar anticuerpos inducidos por la propia nanopartícula y por el antígeno incorporado (Zaman et al., 2013).

### **2.6.2 Adyuvaticidad de nanopartículas.**

Un gran número de estudios han reportado NP como adyuvantes. En muchos de estos estudios, las NP indujeron respuestas inmunes similares o más altas que los adyuvantes que contienen aluminio, como el alumbre. Se sugiere que las NP pueden mejorar la captación de antígenos y/o estimular las células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés), como las DC. Las propiedades fisicoquímicas, como el tamaño de partícula, significan que las NP pequeñas pueden viajar más fácilmente a través de los sistemas linfáticos y acumularse en las DC residentes de los ganglios linfáticos. Inherentemente, las NP utilizadas en las formulaciones de vacunas tienden a ser de tamaño comparable a los patógenos reconocidos por el sistema inmunológico (Zaman et al., 2013).

Las NP pueden servir como fuente puntual para la retención y liberación de antígenos de manera sostenida, lo que se conoce como el efecto de almacén. Además, las NP también pueden diseñarse para mostrar la orientación repetitiva del antígeno en la superficie de las NP. Esta presentación multivalente del antígeno de superficie tiene el potencial de mejorar la activación del sistema inmunitario, un hecho que probablemente se haya adquirido a través de la evolución para reconocer la naturaleza repetitiva del antígeno de superficie en los patógenos (Zaman et al., 2013).

### 2.6.3 Respuesta inmune mediada por nanopartículas

Una respuesta inmune implica la secreción de citoquinas por las células del sistema inmunológico en respuesta a sustancias extrañas. Esto generalmente activa y recluta las células inmunes efectoras hacia la eliminación de la sustancia extraña. La actividad inmunoestimuladora inducida por muchas NP se debe a la producción de citoquinas inflamatorias. Se ha reportado que los liposomas catiónicos inducen la secreción de citoquinas y también aumentan la expresión de marcadores de superficie de DC importantes para las respuestas inflamatorias (Zaman et al., 2013).

### 2.6.4 Mecanismo de la transfección celular

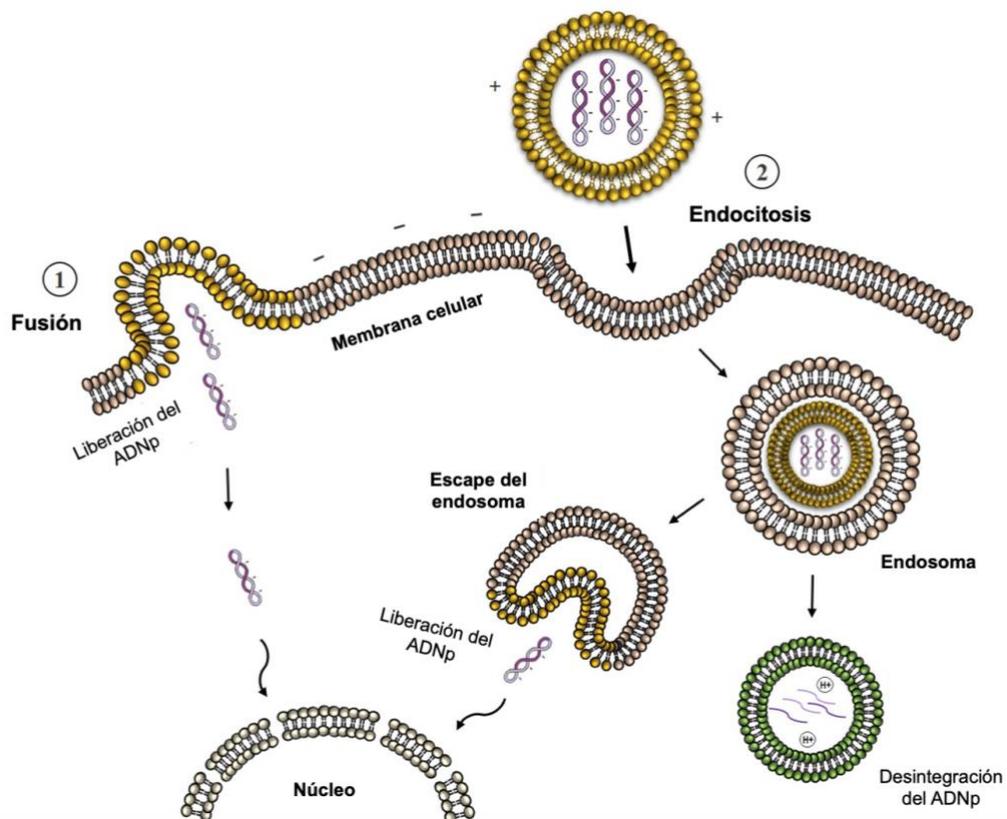
Las DC y los macrófagos son APC especializadas para captar y procesar el antígeno, y con frecuencia son objetivos en el diseño de vacunas. La comprensión de los mecanismos de captación e interacciones con las NP es, por lo tanto, muy importante para el desarrollo de vacunas de NP eficaces (Zhao et al., 2014).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* del contacto de las NP con las células han demostrado que la principal interacción de los liposomas con las células es la simple adsorción o la posterior endocitosis. La fusión con la membrana de la célula plasmática mediante la inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con la liberación simultánea del contenido liposomal en el citoplasma, es muy rara (Akbarzadeh et al., 2013) (Fig. 9). En general, las NP tienen un tamaño similar a los patógenos y pueden ser absorbidas de manera eficiente por las APC para la inducción de la respuesta inmune. Las DC en particular, captan partículas del tamaño de un virus, mientras que los macrófagos captan preferentemente partículas más grandes (Zhao et al., 2014).

La carga superficial también juega un papel importante en la inducción de la respuesta inmune. La captación de NP catiónicas por APC es mayor debido a las interacciones electrostáticas con las membranas de células aniónicas. Para aumentar la persistencia de las NP en el cuerpo, la superficie de las NP puede modificarse mediante la inclusión de polímeros hidrofílicos como el polietilén-glicol (PEG). Se ha reportado que el beneficio

principal en la preparación de partículas funcionalizadas con PEG mejora la biodisponibilidad sistémica a largo plazo de los NP (Zaman et al., 2013).

La dinámica de la internalización del ADNp por células se ha evaluado mediante células activadas por fluorescencia, utilizando el ensayo de luciferasa mediante citometría de flujo y microscopía confocal de barrido (Balbino et al., 2015; Barrán-Berdón, Yélamos, Malfois, Aicart, & Junquera, 2014; Munye et al., 2015; Tang et al., 2012; Witzigmann et al., 2015). La PCR en tiempo real también se ha utilizado para determinar la cantidad de plásmido en células de ovario de hámster chino después de la transfección (De La Vega et al., 2013).



**Figura 9.** Mecanismos de transfección de las nanovacunas lipídicas. (1) Fusión y (2) endocitosis. (Adaptado de García-Rendon et. al, 2018) Capitulo Elsevier.

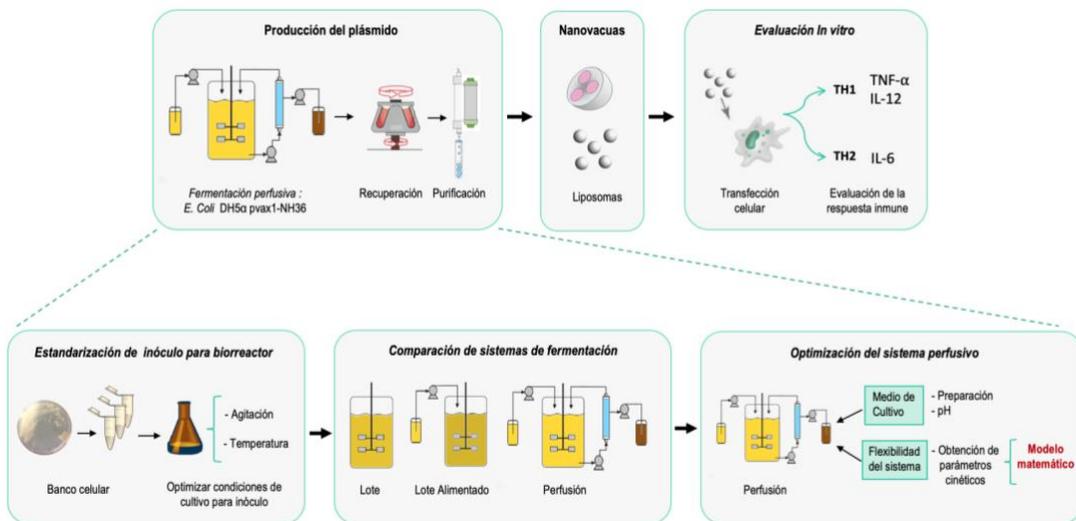
La eficacia de la transfección también se ha evaluado mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia, aplicando en experimentos de citometría de flujo (Barrán-

Berdón et al., 2014). Para estos tipos de estudios el ADNp se marca con Cy5. (Munye et al., 2015).

## CAPÍTULO 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación comprende la producción del plásmido pVAX-NH36 (fermentación, recuperación y purificación), la elaboración de las nanovacunas y la evaluación transfectiva e inmunológica producida por estas (Fig. 10).



**Figura 10.** Esquema general de la metodología empleada en la presente investigación.

El estudio de la producción del pVAX-NH36 consistió en: i) estandarización del inóculo para el biorreactor, ii) evaluación del comportamiento de diversas técnicas de fermentación (lote y lote alimentado) con respecto a la fermentación perfusiva y, iii) optimización del sistema de fermentación PAE, respecto al medio de cultivo y su flexibilidad. Los parámetros obtenidos durante la experimentación se utilizaron en estudios de simulación en una plataforma MATLAB con modelos cinéticos de los sistemas de fermentación.

### 3.1 Materiales y equipo

#### 3.1.1 Materiales

Todos los reactivos utilizados en la presente investigación son de grado analítico y fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, USA, excepto cuando se especifique lo contrario.

**Cepa bacteriana y plásmido.** La bacteria utilizada en este estudio fue *E. coli* DH5 $\alpha$  la cual contiene el plásmido pVAX1-NH36 con un tamaño de 4,000 pb, conteniendo un gen de resistencia a la kanamicina para propósitos de selección. La cepa fue proporcionada por el Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del CINVESTAV-IPN.

**Medio de cultivo de *E. coli*.** Para el cultivo de la cepa portadora del plásmido, se empleó un medio definido enriquecido con glicerol o glucosa de acuerdo con el sistema a evaluar, conteniendo kanamicina a una concentración de 50  $\mu$ g/L y con un pH=6.8. La composición del medio de cultivo se muestra en la Tabla 3 y la correspondiente de las soluciones trazas empleadas se muestran en la Tabla 4. La solución de vitaminas se tomó de un stock que contiene 0.2 g/L de biotina y 4.5 g/L de tiamina esterilizadas con un microfiltro de 0.22  $\mu$ m.

**Tinción Gram.** En el análisis de filamentación celular del cultivo de *E. coli* se empleó cristal violeta, lugol, alcohol, acetona y safranina.

**Determinación de sustrato.** Para determinar la concentración de sustrato a lo largo de las fermentaciones se utilizó el kit Free glicerol reagent para glicerol y el kit Glucose (GO) assay para glucosa.

**Análisis de plásmido.** En la purificación del plásmido se utilizó el kit GenElute™ HP Select Plasmid Gigaprep Kit. Para el análisis de pureza de la solución de plásmido se realizó una electroforesis utilizando el buffer TAE (Tris 40 mM, CH<sub>3</sub>COOH 20 mM, EDTA 1 mM, pH=7.6), agarosa al 0.8% (p/v) (Biorad, USA), azul de bromofenol 6X (Biorad, USA), y bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/ml. También se hizo uso del marcador Supercoiled DNA Ladder, de Invitrogen®.

**Tabla 3.** Componentes del medio definido utilizado en el cultivo *E. coli*.

Componente	Concentración
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.30 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.00 g/L
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	1.90 g/L
Citrato férrico	0.11 g/L
Solución traza 1	1.00 mL/L
Solución traza 2	1.00 mL/L
Solución traza 3	1.00 mL/L
Solución traza 4	1.00 mL/L
Fuente de carbono	13.00 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.20 g/L
Solución de biotina	1.00 mL/L
Solución de tiamina	1.00 mL/L
Solución de kanamicina	1.00 mL/L

**Marcaje y encapsulación del plásmido.** La localización del plásmido intracelularmente se llevó a cabo mediante su marcaje con el kit Label IT tracker Intracellular Nucleic Acid Localization Kit (Mirus, USA) con el fluorocromo Cy5. En la preparación de las nanovacunas se utilizó el kit Liposome Kit: Lipid mixtures for the preparation of liposomes, y cloroformo.

**Línea celular pruebas *in vitro*.** En los ensayos *In vitro* de las nanovacunas se utilizó la línea celular inmortal RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™, USA), la cual es proveniente de macrófagos murinos y es usada en pruebas de transfección celular.

**Tabla 4.** Composición de soluciones trazas (1000X).

Solución	Componente	Concentración (g/L)
1	EDTANa2-salt.2H <sub>2</sub> O	28.2
2	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5.0
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	30.0
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.0
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.0
3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.2
4	Zn (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	67.6

**Medio de cultivo para RAW 264.7.** En el cultivo de la línea celular se utilizó el medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-alto en glucosa), con un pH=7.3. La composición del medio de cultivo se muestra en la Tabla 5.

**Ensayos *in vitro*.** Para la evaluación de la respuesta inmune se utilizaron los kits: Mouse IL-6 ELISA MAX™ Deluxe, Mouse TNF-α ELISA MAX™ Deluxe y Mouse IL-12 (p70) ELISA MAX™ Deluxe (Biolegend, USA). También se hizo uso del vector pVAX1, de Invitrogen®.

### 3.1.2 Equipo

**Cultivos de *E. coli*.** Para la preparación de inóculos se utilizó una incubadora con agitación (Orbital 1575 de VWR International®, USA). En las fermentaciones a nivel biorreactor se utilizó un fermentador de 3.0 L marca Applikon equipado con un software de control ez-control. Durante las fermentaciones se controló la temperatura mediante una chaqueta de calentamiento eléctrica y un intercambiador de calor. En el caso del sistema PAE el biorreactor se acopló a un sistema de ultrafiltración (KrosFlo Resesearch II TFF System, USA).

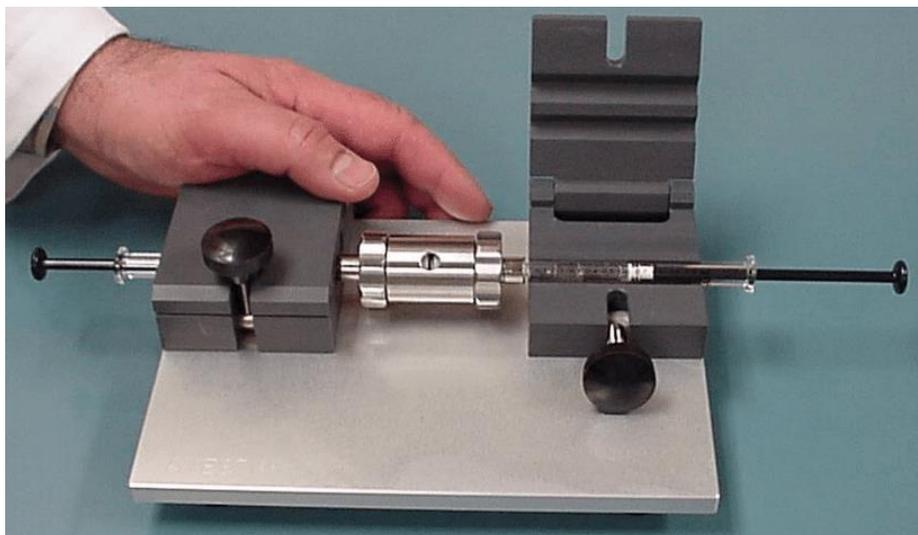
**Tabla 5.** Componentes del medio DMEM utilizado en los ensayos *in vitro*.

Componente	Concentración
DMEM-alto en glucosa	13.370 g/L
L-arginina HCl	0.116 g/L
L-asparagina anhidro	0.036 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	2.000 g/L
Piruvato de sodio	10.000 mL/L
L-glutamina	7.500 mL/L
Penicilina	10.000 mL/L
Suero fetal bovino	100.000 mL/L

En la determinación de la densidad óptica de los cultivos y las concentraciones de glicerol y glucosa, se utilizó un espectrofotómetro VWR UV-1600PC, USA. Las tinciones Gram realizadas fueron observadas en un microscopio óptico Leica ATC 2000. En la centrifugación de las muestras se utilizó la centrifuga Biofuge Stratos, (Thermo Fisher Scientific, USA).

**Análisis de plásmido.** En la estimación de la concentración de plásmido se utilizó un cromatógrafo alta resolución (HPLC) Akta Purifier 10UPC (GE Healthcare, USA). En el análisis y documentación del plásmido se utilizó una cámara de electroforesis (Biorad, USA), una fuente de voltaje (PowerPac™ Basic Biorad, USA) y un fotodocumentador (UVP MultiDoc-it Darkroom).

**Encapsulación del plásmido.** La fabricación de los liposomas se efectuó mediante el extrusor LiposoFast Liposome Factory (Sigma-Aldrich, USA) con membranas de policarbonato con un poro de 100 nm. Para medir los parámetros de tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z de los liposomas, se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK).



**Figura 11.** Extrusor Liposome Fast Factory utilizado, Sigma Aldrich.

**Ensayos *in vitro*.** Para el cultivo de la línea celular RAW 264.7 se utilizó un gabinete de bioseguridad Purifier Logic Class II, Type A2 Biosafety Cabinet (Labconco, USA) y una incubadora de CO<sub>2</sub> Isotemp (Fisher Scientific, USA). La visualización de del plásmido transfectado se realizó en el citómetro BD Accuri C6 plus (BD Biosciences, USA). Para la determinación de evaluación de la respuesta inmune se utilizó un lector de placas de Elisa Multiskan EX (ThermoScientific, USA).

### 3.2 Producción del pVAX-NH36

Para estudiar el proceso de fermentación perfusiva para la producción del plásmido pVAX1-NH36 hospedado en *E. coli* DH5 $\alpha$ , se procedió a estandarizar el inóculo, comparar el sistema PAE con las técnicas de cultivo convencionales: lote y lote alimentado y optimizar el sistema de fermentación PAE.

#### 3.2.1 Estandarización de inóculo

Para estandarizar la preparación del inóculo se generó un banco de células de la cepa de *E. coli* antes mencionada y se investigó el efecto de la agitación y temperatura en el procedimiento. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

**Banco.** Se realizó un cultivo en placa con agar y medio definido durante 2 días a 37 °C. Se eligió una colonia aislada y definida y se cultivó en 30 mL de medio definido durante 12 h. Posteriormente las células se almacenaron en microtubos de 1.5 mL con glicerol al 25% en congelación a -40 °C.

**Agitación.** Se compararon velocidades de agitación de 260, 350 y 400 rpm, en matraces de 1.0 L con 100 mL de cultivo durante 12 h a 37 °C. También se comparó el comportamiento de un matraz Erlenmeyer de 1.0 L y un frasco Pyrex de 500 mL, ambos con el 10% de volumen de medio de cultivo. Se colocaron los recipientes en una incubadora con agitación a 37 °C y 350 rpm durante 12 h, y se tomaron muestras a diferentes tiempos para la determinación de densidad óptica del cultivo y concentración de plásmido.

**Temperatura.** Se realizaron estudios de cultivo *de E. coli* a temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C, 30°C con cambio a 42 °C, y 37 °C con cambio a 42 °C, de manera independiente y se tomaron muestras a diferentes tiempos para la determinación de densidad óptica del cultivo, tinción Gram, concentración de plásmido y análisis de pureza mediante electroforesis en gel de agarosa. El cambio de temperatura se realizó a mitad de la fase exponencial.

### 3.2.2 Comparación de sistemas de fermentación

Una vez determinada las condiciones óptimas del inóculo para las fermentaciones en biorreactor, se procedió a comparar el sistema PAE con las técnicas de cultivo convencionales: lote y lote alimentado. En todas las fermentaciones en biorreactor las condiciones generales fueron las mismas.

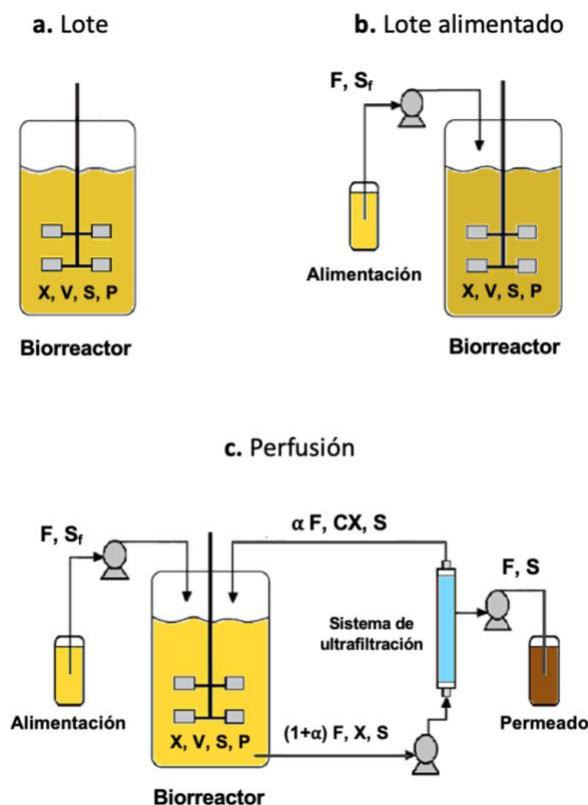
**Preparación y operación del biorreactor.** Antes de iniciar una fermentación se calibra el sensor de pH y oxígeno del biorreactor. Posteriormente se procede a su esterilización en autoclave junto con la solución de sales del medio de cultivo. Una vez finalizada la esterilización, cuando la solución de sales alcanza una temperatura de aproximadamente 40°C, se agregan y mezclan de manera estéril el resto de los componentes del medio de cultivo por medio de una bomba peristáltica.

A nivel biorreactor, se utilizó un volumen de operación de 1.0 L. Antes de la inoculación, se agregó antiespumante C a una concentración de 100  $\mu\text{L/L}$ . Durante la fermentación se controló la temperatura a 37 °C. El oxígeno disuelto se controló mediante burbujeo de aire y agitación a 30% de saturación. Mediante adición peristáltica de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28% se mantuvo un pH de  $6.65 \pm 0.05$  a lo largo del cultivo (sin dejar que llegara a 6.8). Todos los cultivos se iniciaron con una  $\text{DO}_{600}=1.0$  proveniente de los cultivos a nivel matraz en etapa exponencial. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para la determinación de densidad óptica del cultivo, concentración de plásmido y análisis de pureza.

**Fermentación en lote.** Esta estrategia de crecimiento (Fig. 12 a) se llevó a cabo en las condiciones ya mencionadas y con una concentración inicial de sustrato de 13 g/L de glicerol. El experimento se terminó una vez agotado el sustrato y fue realizado por triplicado.

**Fermentación en lote alimentado.** Este modo de crecimiento (Fig. 12 b) se desarrolló en dos etapas. En la primera etapa el cultivo inició en forma de lote hasta que el sustrato inicial de 13 g/L de glicerol se agotó. Al finalizar esta fase, se inició la etapa de lote alimentado exponencialmente con medio con 18 g/L de glicerol. La tasa de alimentación se programó para mantener una *velocidad específica* de crecimiento de  $\mu_f = 0.25 \text{ h}^{-1}$ . El experimento finalizó una vez que se alimentó el 40% del volumen inicial (hasta 1.4 L) y fue realizado por triplicado.

**Fermentación PAE.** Esta estrategia de crecimiento (Fig. 12 c) también fue desarrollada en dos etapas. En la primera etapa el cultivo inició en forma de lote hasta que el sustrato inicial de 13 g/L de glicerol se agotó. Al finalizar este período, se empezó la etapa PAE utilizando medio con 18 g/L de glicerol. Durante la etapa perfusiva la tasa de alimentación se programó para mantener una velocidad específica de crecimiento de  $\mu_p = 0.25 \text{ h}^{-1}$ . El flujo de entrada y salida al biorreactor se mantuvo igual mediante la acción de una bomba peristáltica de doble cabezal, manteniendo así un volumen constante en el biorreactor. El flujo de salida se obtuvo del permeado derivado de una ultrafiltración tangencial, recirculando las células al biorreactor.



**Figura 12.** Esquema de los sistemas de fermentación utilizados para el cultivo de *E. coli* a nivel biorreactor.

### 3.2.3 Optimización del sistema PAE

**Medio.** La preparación del medio de cultivo es esencial para la optimización del sistema de fermentación PAE. Se investigó la forma de evitar la precipitación de sales la cual afecta el comportamiento del sistema de cultivo. Además, se evaluó la flexibilidad para utilizar distintas fuentes de carbono (glicerol y glucosa).

Se realizaron distintas modificaciones en la preparación del medio de cultivo (apoyadas en la comunicación personal con el Dr. Anton Ross del Department of Pharmaceutical Biotechnology, Fraunhofer Institute for Toxicology and Experimental Medicine (ITEM), Braunschweig, Germany), para evitar la precipitación de sales, tales modificaciones fueron:

*Preparación de sales.* Esterilizar por separado en autoclave una solución conteniendo las sales  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  y citrato férrico (Tabla 2), sin soluciones traza.

*Preparación de soluciones traza.* Preparar en solución ácida de HCl 2.0 M la solución 1000x de la Tabla 3. Esterilizar mediante filtración 0.2  $\mu\text{m}$  y guardar a 4°C.

*Cambio de pH.* Disminuir el pH a 6.6 evitando que suba a pH= 6.8.

*MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.* Disminuir la concentración de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y esterilizar en solución por separado en autoclave. Ya que la combinación de amonio, Mg y fosfato conduce a la precipitación de una sal insoluble.

**Flexibilidad del sistema PAE.** Se evaluó la flexibilidad del sistema PAE utilizando como sustrato limitante glicerol o glucosa. Los parámetros cinéticos de cada sistema se obtuvieron previamente mediante experimentos por lote. Los cultivos se desarrollaron conforme a las condiciones descritas anteriormente.

### 3.2.4 Análisis de muestras

**Cinética de crecimiento.** Se tomaron muestras a diferentes tiempos en todos los cultivos y se midieron a una longitud de onda de 600 nm con el fin de llevar a cabo el monitoreo del crecimiento.

**Determinación de glicerol y glucosa.** En los cultivos a nivel biorreactor se determinó la concentración de glicerol o glucosa de cada muestra en un espectrofotómetro UV/VIS a una absorbancia de 540 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante de los kits utilizados.

**Purificación del plásmido.** Las muestras de plásmido de todos los cultivos fueron purificadas mediante un kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de pasar la muestra lisada a la columna de purificación se tomó una muestra para determinar la concentración de ADNp por HPLC.

**Concentración de plásmido.** Las muestras de lisados fueron analizadas por HPLC en una columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC). La columna se equilibró con una

solución 1.5 M de sulfato de amonio. Posteriormente, se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de muestra diluida (100  $\mu\text{L}$  de muestra + 400 $\mu\text{L}$  de la solución buffer) al automuestreador.

**Pureza del plásmido.** Tanto las muestras en buffer de lisis como las muestras purificadas se analizaron mediante electroforesis con un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1x a un voltaje de 60 v durante 120 min. Los resultados se observaron en un fotodocumentador.

### 3.3 Marco teórico

Se utilizaron modelos matemáticos para describir la cinética de los cultivos y la velocidad de alimentación, que se obtuvieron mediante balances de masa de carbono, que implicaron el crecimiento de células bacterianas, consumo de sustrato y la formación de plásmidos. Estos modelos fueron validados mediante simulación asistida por computadora y usados para predecir el rendimiento del sistema. Las ecuaciones respectivas se presentan en la Tabla 6.

La tasa de crecimiento  $\mu$  se describió mediante la bien conocida ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (1)$$

donde  $\mu_m$  es la tasa de crecimiento específica máxima y  $K_s$  es el coeficiente de saturación de *E. coli*.

**Cálculo para alimentación de entrada.** La velocidad de alimentación inicial  $F_0$ , fue determinada para llevar a cabo la fase de alimentación exponencial considerando una concentración constante de sustrato. Resolviendo la ecuación de consumo de sustrato de lote alimentado y perfusión para  $F_0$  en el tiempo  $t_b$  (fin de la fase lote) se tiene:

$$F_0 = \frac{\mu_e X_0 V}{Y_{X/S_p} (S_f - S_{bf})} \quad (2)$$

donde  $\mu_e$  es el crecimiento específico deseado durante la fase exponencial,  $X_0$  y  $S_{bf}$  son concentraciones de biomasa y sustrato al final de la fase lote,  $Y_{X/S_p}$  es el coeficiente de

rendimiento de biomasa de glucosa durante la fase exponencial. La velocidad inicial de alimentación  $F_0$ , aumenta exponencialmente acorde al crecimiento específico deseado según la siguiente ecuación:

$$F = F_0 e^{\mu_p(t-t_b)} \quad (3)$$

donde  $t$  indica el tiempo transcurrido de toda la fermentación.

**Tabla 6.** Ecuaciones utilizadas en la solución y ajuste de los modelos matemáticos.

	Lote	Lote alimentado	Perfusión
Crecimiento celular	$\frac{dX}{dt} = \mu X$	$\frac{dX}{dt} = \mu X V$	$\frac{dX}{dt} = \mu X$
Consumo de sustrato	$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}}$	$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_f - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}}$	
Producción de plásmido	$\frac{dP}{dt} = \mu (Y_{P/X} - P)$		

**Solución de los modelos.** En la solución y ajuste de los modelos a los datos experimentales se utilizaron programas que fueron resueltos en MATLAB (Fig. 13). Para cada fermentación se utilizó un programa principal diferente. Cada modelo que consiste en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) acopladas que se resolvió mediante el algoritmo siguiente:

1. Integración de las ecuaciones diferenciales para un conjunto de valores específicos de los parámetros que incluyen las condiciones iniciales y de operación, así como los parámetros de ajuste de partida, para obtener los valores calculados de las variables dependientes a los mismos tiempos de los datos experimentales. El

programa principal **funfermen.m** contiene estos parámetros, los datos experimentales y los intervalos de tiempo para la integración.

2. Cálculo de la suma de las diferencias al cuadrado de los valores de variables dependientes obtenidas con el modelo y las de los datos experimentales. La función **SumSqr** realiza este cálculo y regresa un escalar, el cual contiene la suma de las diferencias. Para lo cual hace uso de la función de integración **ODE45** para obtener los valores calculados de las variables dependientes.
3. Aplicación de un programa de optimización el cual modifica los valores de los parámetros de ajuste a fin de obtener el valor mínimo de la suma de los residuos al cuadrado. Esto se realiza con la función **fminsearch** (una función de optimización propia de MATLAB) que es llamada del programa principal. Esta función es llamada una vez que se ha calculado la suma de los residuos al cuadrado.



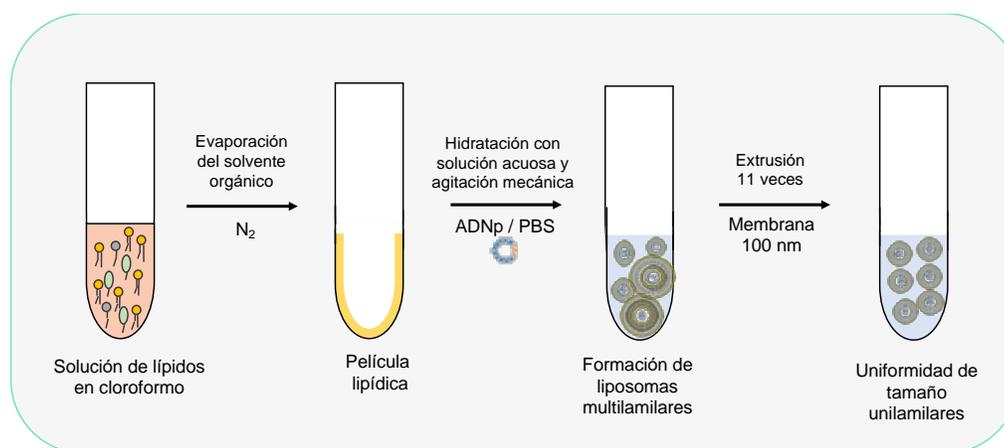
**Figura 13.** Esquema de organización del programa de MATLAB.

### 3.4 Preparación y caracterización de nanovacunas

El plásmido purificado obtenido se marcó con un tinte fluorescente mediante un kit comercial y se encapsuló en nanopartículas lipídicas, ajustando su tamaño mediante una operación de extrusión. Una vez obtenidas se determinaron sus principales características físicas.

#### 3.4.1 Preparación

En la preparación de las nanovacunas se utilizó un kit el cual contiene una mezcla liofilizada 90  $\mu\text{M}$  de los lípidos L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, colesterol y estearilamina; dicha mezcla es utilizada para preparar liposomas catiónicos a una relación de 5 $\mu\text{g}$  ADNp/ $\mu\text{M}$  de lípido, mediante el método de hidratación de lípidos que describe a continuación (Fig. 14):



**Figura 14.** Preparación de nanovacunas por el método de hidratación de lípidos.

1. Reconstituir el vial liofilizado del kit con 10 mL de cloroformo.
2. Tomar 222  $\mu\text{L}$  de la mezcla de lípidos a temperatura ambiente y agregar a un tubo de ensayo de vidrio.
3. Bajo atmósfera de nitrógeno y girando el tubo, evaporar el cloroformo para dejar una capa delgada del lípido.
4. Rehidratar la capa lipídica con 1.0 mL de una solución de plásmido de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS (pH=7.4).

5. Agitar la mezcla con vortex manual por 2 minutos e incubar por 15 minutos a 37°C, y agitar nuevamente por vortex durante 5 minutos.
6. Almacenar a 4°C toda la noche. Al día siguiente proceder a la extrusión de la muestra, haciéndola pasar 11 veces a través de la membrana de 100 nm del extrusor (Fig. 15).

### 3.4.2 Caracterización

El tamaño (diámetro hidrodinámico), el índice de polidispersidad (distribución de tamaños) y el potencial Z (carga superficial) de los liposomas fueron determinados en el equipo Nano Zetasizer Malvern. Este analizador utiliza el método de la dispersión dinámica de luz para obtener una distribución de tamaños de las partículas en una suspensión y dispersión de luz electroforética.

### 3.4.3 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) determinó mediante la fórmula siguiente:

$$EE\% = \frac{\text{masa de ADNp inicial} - \text{masa de ADNp en solución}}{\text{masa de ADNp inicial}} \times 100\%$$

Se determinó la masa de plásmido antes y después de la encapsulación en el líquido de la suspensión mediante HPLC-HIC. Además, se analizaron las muestras de la suspensión en gel de electroforesis.

### 3.5 Evaluación *in vitro* de las nanovacunas

Los ensayos *in vitro* se realizaron utilizando un banco de la línea celular RAW 264.7. Inicialmente, se descongeló vial de la ATCC y se cultivó en una botella de 25 cm<sup>2</sup> de área con 10 mL de medio DMEM-alto en glucosa en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 4 días. La viabilidad y concentración celular fue determinada mediante la cámara de Neubauer. Posteriormente, las células se almacenaron en crioviales a -96°C hasta su uso.

En los estudios iniciales, se probaron diferentes densidades celulares de RAW 264.7 ( $1-4 \times 10^4$ ) en placas de 96 pozos por 72 h y se verificó su viabilidad. Para los ensayos subsecuentes se seleccionó la densidad celular de 30,000 células/pozo en un volumen de 200  $\mu$ L de medio.

### 3.1.1 Evaluación de la internalización celular

Para el ensayo de internalización celular del plásmido en la célula huésped fue verificada sólo en las muestras pVAX1, ADNp desnudo y nanovacuna. Dichos plásmidos fueron marcados con el fluorocromo Cy5 con fines de localización. Para el ensayo, las células RAW 264.7 fueron cultivadas en una botella de 25  $\text{cm}^2$  con 10 mL de medio DMEM-alto en glucosa en una incubadora con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 4 días. Posteriormente se calculó la densidad celular para proceder al ensayo en placas de 96 pozos, en el cual se agregaron 300 ng del plásmido correspondiente, se incubaron por 48 h y se analizaron por citometría de flujo.

La eficiencia de transfección se expresó como el porcentaje de células transfectadas contra todas las células contadas. Para el análisis de citometría de flujo las células fueron desprendidas de la placa de cultivo mediante pipeteo inverso. La viabilidad celular se evaluó en comparación con las células del control negativo.

Durante las pruebas *in vitro* se evaluaron distintos controles y muestras.

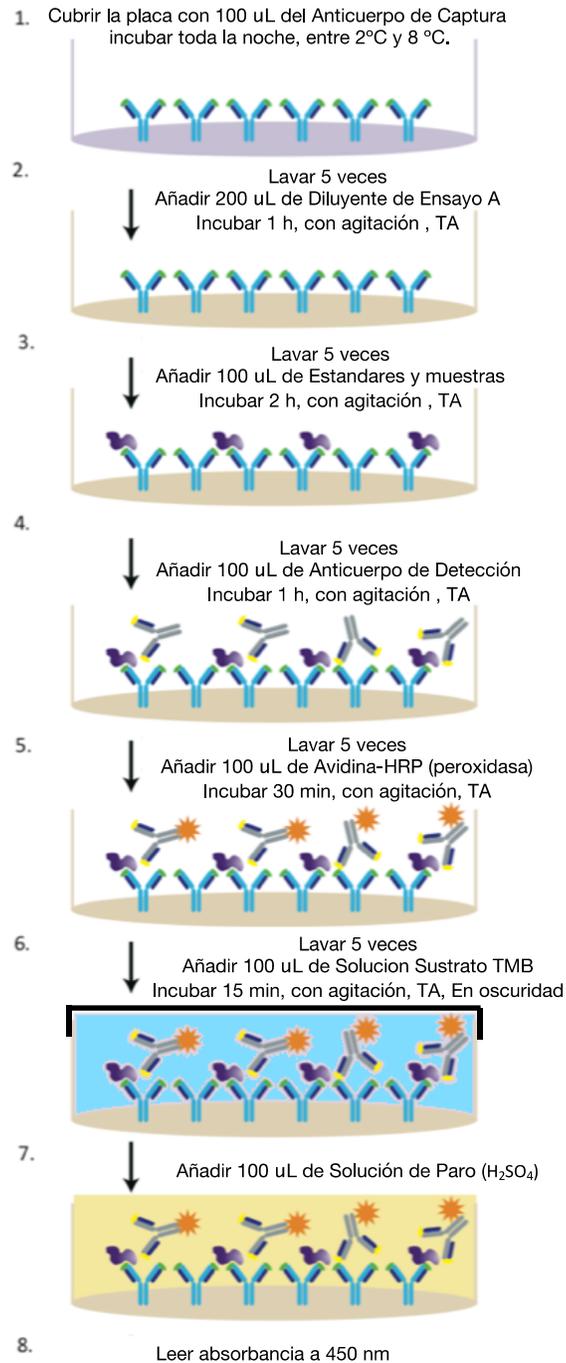
1. Control negativo. Células RAW 264.7 si ningún estímulo añadido.
2. Control positivo. Células RAW 264.7 con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de lipopolisacárido.
3. Muestra de pVAX1. Células RAW 264.7 con 300 ng del vector pVAX1, sin el gen NH36.
4. Muestra de ADNp desnudo. Células RAW 264.7 con 300 ng de pVAX-NH36, sin encapsular.
5. Muestra de nanovacuna. Células RAW 264.7 con 300 ng de pVAX1-NH36 encapsulado, suponiendo una EE de 100%.
6. Muestra de liposomas vacíos. Células RAW 264.7 con 30  $\mu\text{L}$  de solución de liposomas (misma concentración de lípidos que en muestra anterior).

### 3.1.2 Evaluación de la respuesta inmune.

En la evaluación de la respuesta inmune producida por la administración del plásmido se determinó la concentración de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ . En el ensayo las células RAW 264.7 fueron cultivadas en una botella de 25 cm<sup>2</sup> con 10 mL de medio DMEM-alto en glucosa en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 4 días. Posteriormente se calculó la densidad celular para proceder al ensayo en placas de 96 pozos, en el cual las células se incuban por 2 h para luego agregar los estímulos correspondientes.

Una vez agregados los estímulos a las células, se incubaron en las condiciones descritas anteriormente por un tiempo de 36-48 h. Transcurrido ese tiempo se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -96°C hasta su análisis.

En la Figura 15 se muestra el protocolo general del kit de Elisa seguido para la determinación de las citocinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.



**Figura 15.** Protocolo para ELISA adaptado de biolengd. TA. Temperatura ambiente, TMB. 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados de la presente investigación sobre la producción del pVAX-NH36, la preparación de las nanovacunas y la evaluación de su funcionamiento *in vitro*.

#### 4.1 Producción del plásmido

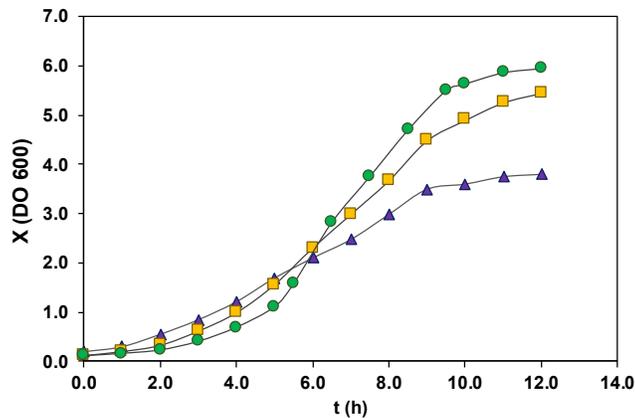
Para establecer un sistema robusto y optimizado de producción del pVAX-NH36 se procedió a estandarizar el inóculo, comparar el sistema PAE con los sistemas convencionales de lote y lote alimentado; y a optimizar a nivel biorreactor el sistema PAE.

##### 4.1.1 Estandarización de inóculo

Con el fin de favorecer la reproducibilidad de los experimentos realizados en la presente investigación se creó un banco celular de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  NH36. Para dicho propósito fue importante que el inóculo procediera de un cultivo en placa ya que favorece la estabilidad segregacional del plásmido.

Los datos experimentales de crecimiento celular a nivel matraz obtenidos en los cultivos a velocidades de agitación de 260, 350 y 400 rpm, se muestran en las Figura 16. La densidad óptica máxima obtenida en cada experimento fue de 3.80 a 260 rpm, 5.45 a 350 rpm y 5.95 a 400 rpm. Para los experimentos posteriores se eligió la velocidad de 350 rpm ya que permitió un mayor crecimiento bacteriano sin llegar a la velocidad máxima del equipo. Este comportamiento obedece a que, a una velocidad de agitación mayor se produce una mayor oxigenación del cultivo. Traduciéndose en mayores

rendimientos de biomasa y producto, debido a que la generación de energía es mayor que bajo condiciones anaerobias. Además, bajo condiciones anaerobias la fuente de carbono es oxidada sólo parcialmente por *E. coli*, lo que conlleva a la acumulación de subproductos de fermentación ácido–mixta, que resultan tóxicos y limitan el crecimiento (Lara, 2011).

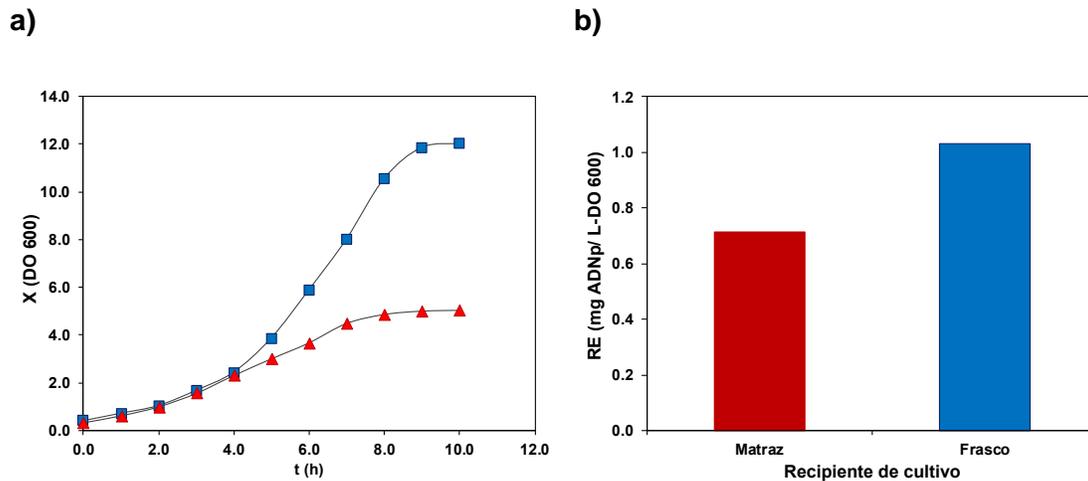


**Figura 16.** Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de *E. coli*. Agitación (▲) 260 rpm, (■) 350 rpm y (●) 400 rpm.

Durante los estudios de estandarización del inóculo se observó que el crecimiento celular de *E. coli* se veía favorecido al utilizar como recipiente de cultivo un frasco de 500 mL. Los datos experimentales de crecimiento celular y producción de plásmido obtenidos en los cultivos en matraz de 1.0 L y frasco de 500 mL, se muestran en las Figura 17. La densidad óptica máxima obtenida en cada experimento fue de 5.05 en matraz y 12.00 OD<sub>600</sub> en frasco (Fig. 17a). El rendimiento máximo de plásmido alcanzado fue de 0.714 mg/(L-OD<sub>600</sub>) en matraz y 1.030 mg/(mL-OD<sub>600</sub>) (Fig. 17b). Este resultado se puede explicar debido a que la relación de áreas de transferencia de oxígeno fue de frasco/matraz de 1.5 veces y a la mayor turbulencia observada en los frascos.

Con el fin de mejorar el número de copias de plásmidos en células de *E. coli*, se han descrito varios enfoques. Entre estas estrategias se incluye el uso de un cambio de temperatura (Aaron E. Carnes, Hodgson, & Williams, 2006). Los datos experimentales de crecimiento celular y producción de plásmido obtenidos en los cultivos a distintas

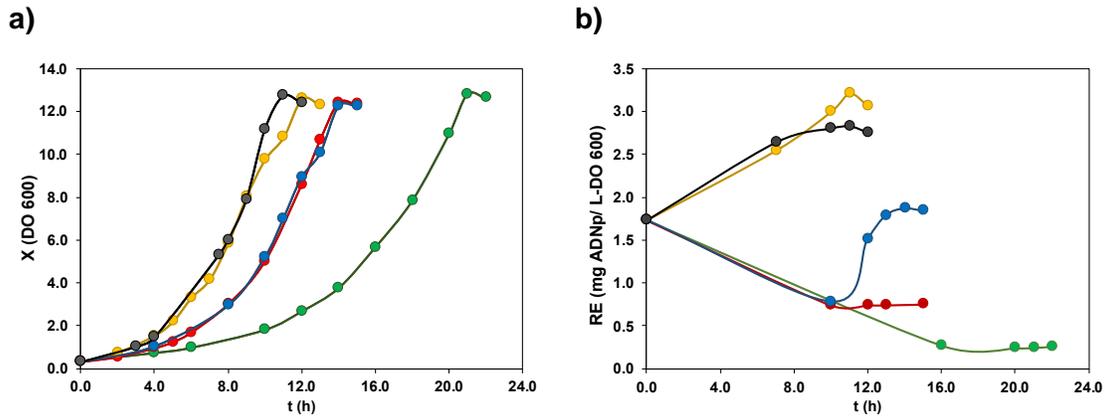
temperaturas se muestran en la Figura 18. Puede observarse en la Figura 18a que la velocidad de crecimiento se incrementa conforme la temperatura de incubación aumenta; sin mostrar un efecto apreciable en los cultivos con escalones de temperatura. La densidad óptica máxima obtenida en los experimentos fue de 12-13  $OD_{600}$ .



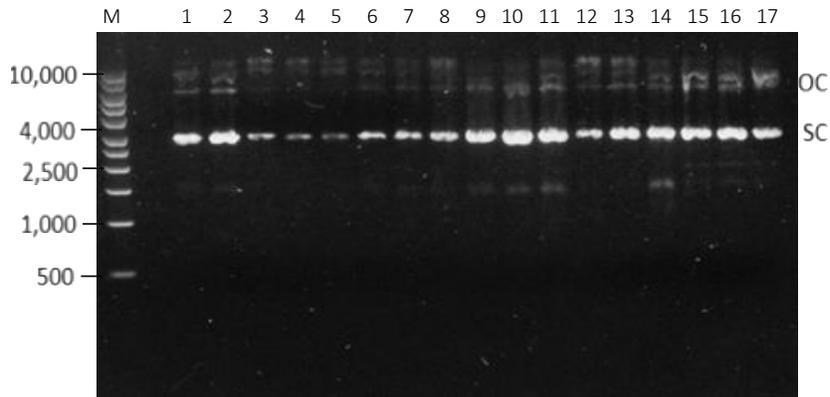
**Figura 17.** Efecto de la oxigenación del cultivo sobre el crecimiento y rendimiento de plásmido en *E. coli* DH5 $\alpha$ . a) Crecimiento celular y b) rendimiento final de plásmido. Matraz 1 L (▲) y frasco de 500 mL (●).

El rendimiento específico de plásmido aumentó conforme la temperatura de incubación y fue mayor en las temperaturas de 37 °C (Fig. 18b). Además, se incrementó sensiblemente con el escalón de temperatura de 30 a 42 °C. Observándose que el mayor rendimiento fue de 3.2 mg/(L- $OD_{600}$ ). Este comportamiento puede ser explicado debido a que el plásmido pVAX1 contiene el origen de replicación pUC, los cuales son sensibles a la temperatura, aumentando el número de copias a temperaturas de 42 °C (Aaron E. Carnes et al., 2006).

En la Figura 19 se muestran las imágenes de los análisis electroforéticos de las muestras de los cultivos a distintas temperaturas. Estos resultados corroboran la influencia de la temperatura sobre la cinética de producción de plásmido anteriormente discutidos.



**Figura 18.** Efecto de la temperatura del cultivo sobre el crecimiento y producción de plásmido en *E. coli* DH5α. a) crecimiento celular. b) Rendimiento específico de plásmido. Temperaturas: (-●-) 25°C, (-●-) 30°C, (-●-) 37°C, (-●-) 37-42°C y (-●-) 30-42°C



**Figura 19.** Efecto de la temperatura y tiempo de cultivo sobre la producción de plásmido en *E. coli* DH5α. Gel de electroforesis de muestras en buffer de lisis tomadas a diferentes tiempos. (M) marcador. Carriles 1 y 2, inóculo tiempo 0 h. Carriles 3, 4, 5, temperatura 25 °C: tiempos 16, 20 y 22 h. Carriles 6, 7 y 8, temperatura 30°C: tiempos 10, 12 y 14 h. Carriles 9, 10 y 11, Temperatura 37°C: 7, 10 y 12 h. Carriles 11, 12 y 13, temperatura 30-42 °C: tiempos 10, 12 y 14 h. Carriles 15, 16 y 17, temperatura 37-42 °C: tiempos 7, 10 y 11 h.

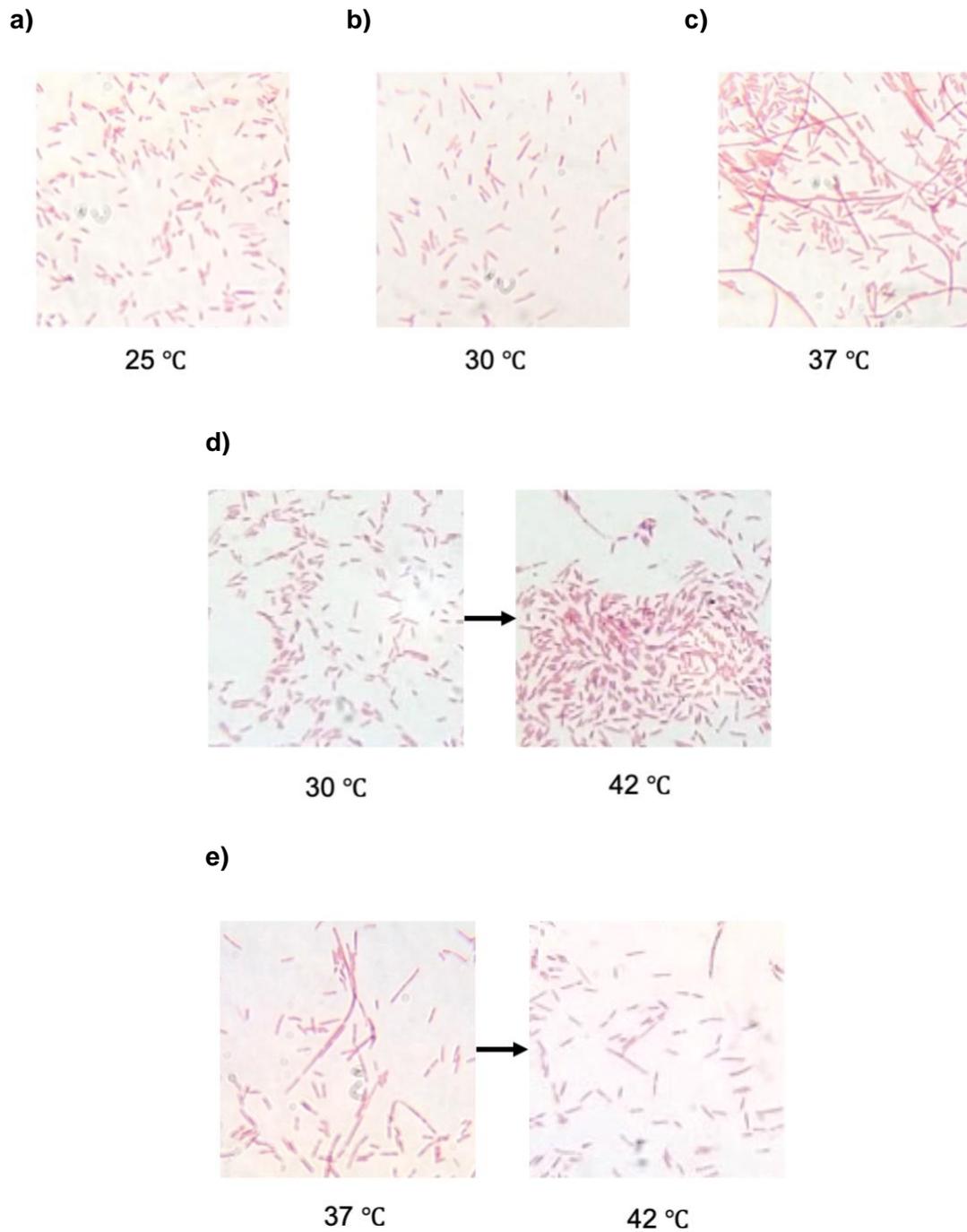
El crecimiento de *E. coli* en respuesta al aumento de estrés, a menudo conduce a la filamentación celular (la célula continúa su ciclo celular sin división citoplasmática) y el cese del crecimiento. Este fenómeno se ha descrito que se produce tanto en la producción de proteínas recombinantes como en procesos de producción de ADNp. Por lo tanto, uno de los primeros parámetros que deben evaluarse a lo largo de todos los procesos de fermentación de *E. coli* es la morfología celular (Silva et. al., 2011).

Para corroborar dicho factor las imágenes obtenidas por microscopia óptica de la tinción Gram de muestras de *E. coli* obtenidas al final de las fermentaciones a diferentes temperaturas se muestran en la Figura 20. Sólo en el cultivo con temperatura constante de 37 °C se observa filamentación (Fig. 20c). En el cultivo con el escalón de temperatura de 30 a 42 °C no se observan cambios de morfología (Fig. 20 d). Mientras que en el cultivo con el escalón de 37 a 42 °C se puede apreciar que la filamentación no se acentúa con el cambio (Fig. 20e). Esto sugiere que la filamentación celular es un fenómeno que se presenta preferentemente a 37 °C que es la temperatura óptima de crecimiento de *E. coli*, observándose además que la producción de plásmido no se ve afectada por este fenómeno.

#### 4.1.2 Comparación de sistemas de fermentación

Con el fin de comparar los sistemas convencionales de fermentación con el sistema PAE se realizaron cultivos en lote y lote alimentado. Los datos experimentales de crecimiento celular y consumo de sustrato de los cultivos en lote, lote alimentado y PAE se muestran en la Figura 21. La densidad óptica máxima obtenida en cada experimento fue de 12.0 en lote, 30.0 en lote alimentado y 41.0  $DO_{600}$  en el sistema PAE. El rendimiento máximo de plásmido alcanzado fue de 2.02 mg/(L- $OD_{600}$ ) en lote, 3.22 mg/(L- $OD_{600}$ ) en lote alimentado y 3.67 mg/(mL- $OD_{600}$ ) en el sistema PAE (Tabla 6). Los resultados de la simulación presentaron un buen ajuste a los resultados experimentales con una  $r^2=0.99$  tanto para la concentración de masa como para concentración de sustrato en todos los sistemas de fermentación. Cabe mencionar que dicho ajuste en el caso de los cultivos lote alimentado y PAE se realizó sólo hasta las 10 h ya que se presentaron problemas de precipitación de sales, lo que limitó el crecimiento de los cultivos.

En las gráficas de la cinética celular (Fig. 22) se observa como un cultivo perfusivo permite obtener no solo densidades celulares mayores en comparación con los sistemas convencionales de lote y lote alimentado, si no también mayores rendimientos de plásmido. En la Figura 23 se muestran las imágenes de los análisis electroforéticos de las muestras de las distintas técnicas de fermentación, donde se observa que con las tres técnicas se obtiene preferentemente plásmido superenrollado.



**Figura 20.** Microscopía óptica de tinción Gram de células de *E. coli* a diferentes temperaturas. a)25 °C, b)30 °C, c) 37 °C, d) escalón 30 a 42 °C y e) escalón 37 a 42 °C.

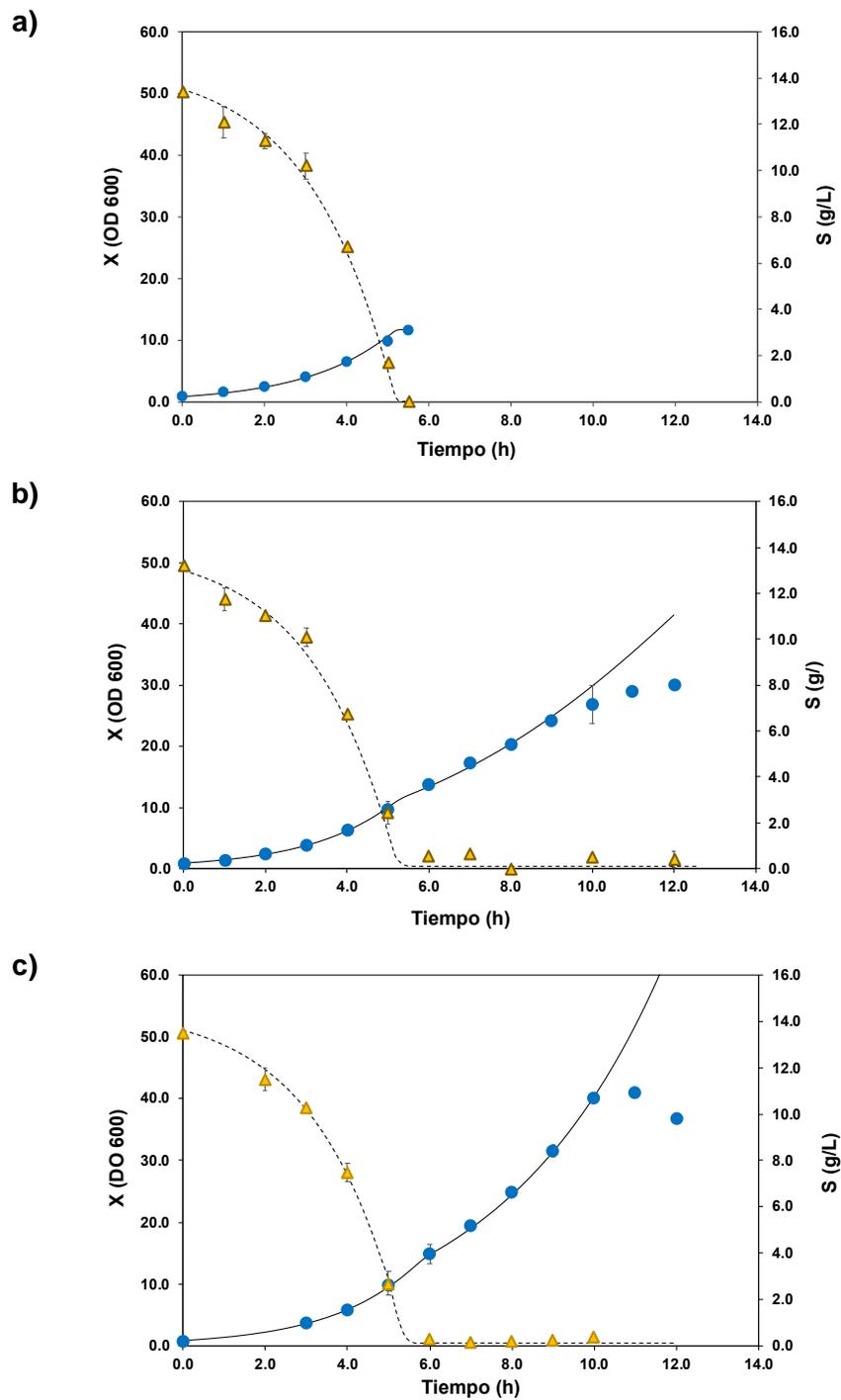
En la figura 23 se muestra la comparación de los medios de cultivo obtenidos al final de cada técnica de fermentación. En el cultivo por lote se observa un ligero oscurecimiento del medio de cultivo, mientras que en el cultivo de lote alimentado este fenómeno es más pronunciado. Se puede observar como el color del medio final se encuentra más claro en el sistema PAE y el permeado es totalmente oscuro. Este resultado se puede explicar debido a que en la técnica de fermentación PAE permite un sistema de recambio continuo de medio de cultivo, lo que permite la eliminación de metabolitos que resultan tóxicos y limitan el crecimiento; este recambio permite un ambiente de crecimiento favorable para el cultivo microbiano y permite el crecimiento a una velocidad controlada.

#### **4.1.3 Optimización del sistema PAE**

##### ***4.1.3.1. Preparación de medio de cultivo.***

La preparación del medio de cultivo es un punto crítico en la fermentación ya que de este paso depende el crecimiento de las células. En esta investigación se optimizó el modo de preparación del medio para evitar la precipitación de sales, observadas en laboratorio durante el transcurso de la investigación. La forma de preparación del medio de cultivo para evitar precipitación de sales se realiza de la forma siguiente:

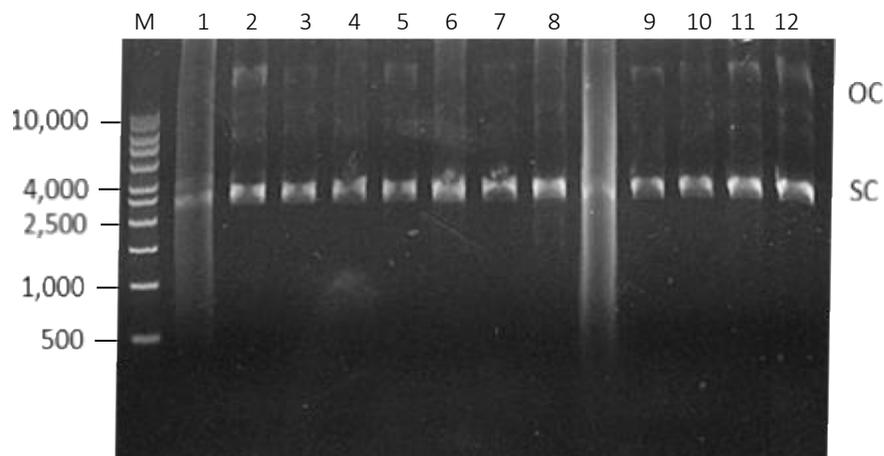
1. Disolver una por una las sales  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en ese orden en aproximadamente el 50 % del volumen final de cultivo.
2. Agregar a la solución anterior 2 mL de una solución de citrato férrico 500X.
3. Ajustar el pH cuidadosamente a 6.6 utilizando una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28%. Se debe evitar que el pH llegue a 6.7, ya que es un factor crítico en la precipitación de sales.
4. Aforar la solución anterior al 70% del volumen final del medio de cultivo y esterilizar en autoclave.
5. Disolver en agua la fuente de carbono (glucosa o glicerol) en 10% del volumen final del medio y esterilizar.



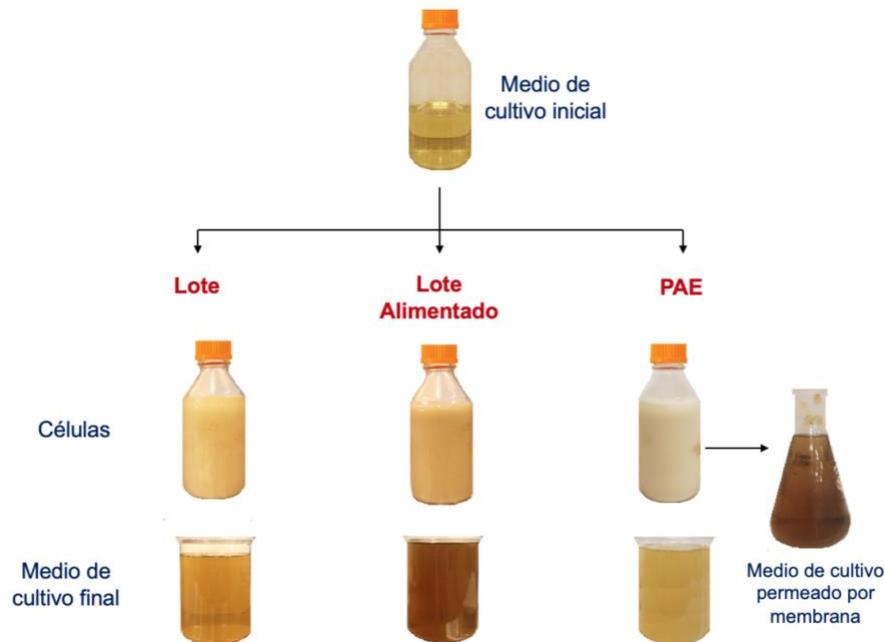
**Figura 21.** Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato de los sistemas de fermentación. a) lote, b) lote alimentado y c) PAE. Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas solidas). Concentración de biomasa (●), Concentración de sustrato (▲).

**Tabla 6.** Rendimientos finales de plásmido en la comparación de sistemas de fermentación.

Fermentación	X	RV	RE
	DO 600	mg ADNp/L	mg ADNp/(L-DO <sub>600</sub> )
<b>Lote</b>	11.60	23.45	2.02
<b>Lote Alimentado</b>	30.00	96.45	3.22
<b>PAE</b>	41.00	150.52	3.67



**Figura 22.** Comparación de producción de plásmido en los sistemas de fermentación *E. coli* DH5 $\alpha$ . Gel de electroforesis de muestras de plásmido en buffer de lisis. (M) marcador, (1) placa, (2) Vial, (3) inóculo, (4) lote t=0 h, (5) lote t=6 h, (6) lote alimentado t=0 h, (7) lote alimentado t=5 h, (8) lote alimentado t=12 h, (9) perfusión t=0 h, (10) perfusión t=5 h, (11) perfusión t=11 h, (12) perfusión t=12 h.



**Figura 23.** Comparación de medios de cultivo en los sistemas de fermentación *E. coli* DH5 $\alpha$ .

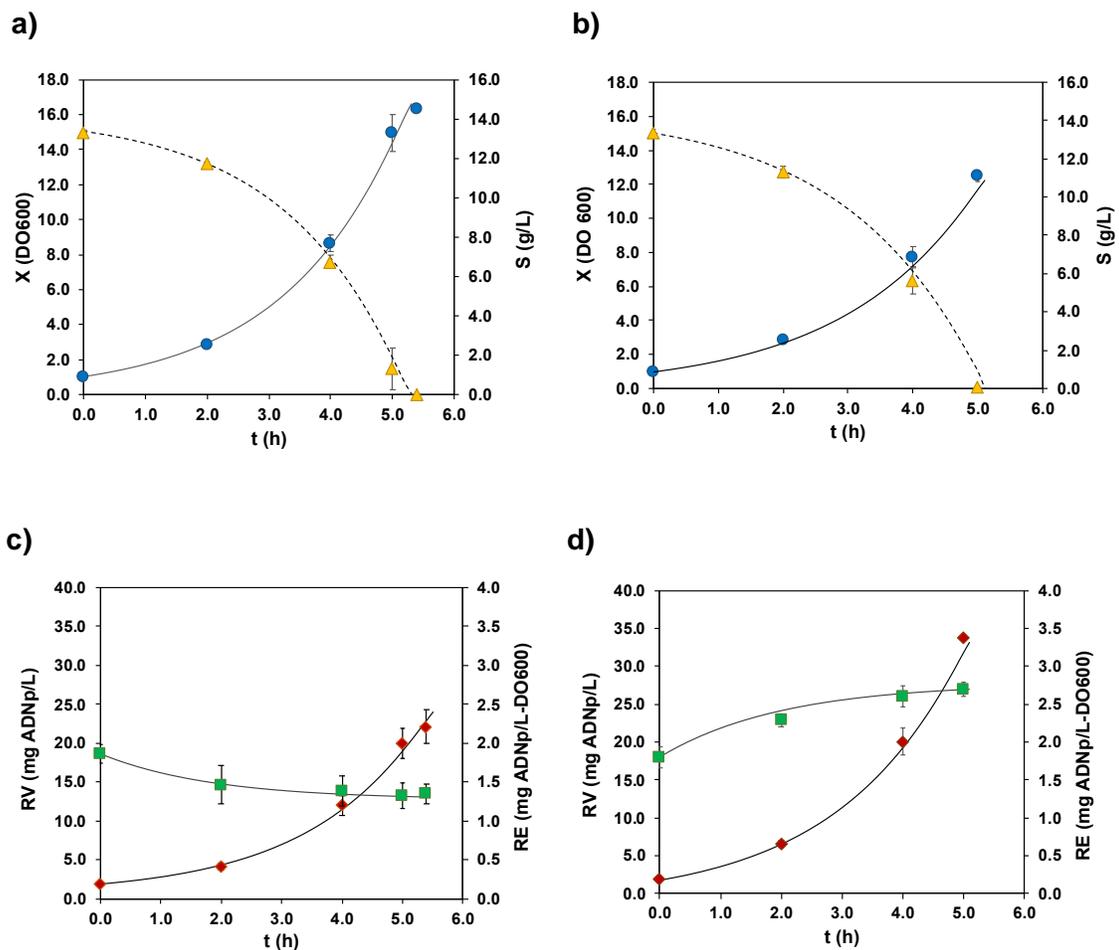
6. Disolver en agua el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 10% del volumen final del medio y esterilizar.
7. Una vez a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad, a la solución de sales se le agrega 1 g/L de cada una de las soluciones traza (disolviendo una por una), en el orden en el que aparecen en la Tabla 1. Estas soluciones se esterilizan previamente mediante filtración 0.22  $\mu\text{m}$ .
8. Agregar la fuente de carbono, la solución de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , las vitaminas (esterilizadas por filtración) y el antibiótico.

Todos los ajustes realizados en la preparación del medio de cultivo evitaron adecuadamente la precipitación de sales en el sistema.

#### **4.1.3.2. Flexibilidad del sistema PAE.**

Se evaluó la flexibilidad del sistema PAE para trabajar con distintas fuentes de carbono. Primeramente, se establecieron los parámetros de operación del sistema mediante

cultivos en lote. Las Figuras 24a y 24b muestran la cinética de crecimiento y consumo de sustrato de los cultivos en lote con glucosa y glicerol, respectivamente. El cultivo con glucosa duró 5.5 h y se obtuvo una densidad celular máxima de 16.36 OD<sub>600</sub> (Fig. 24a). El cultivo con glicerol duró 5.0 h y se obtuvo una densidad celular máxima de 12.50 OD<sub>600</sub> (Fig. 24b). Los resultados de la simulación presentaron un buen ajuste a los resultados experimentales con una  $r^2=0.99$  tanto para la concentración de masa como para concentración de sustrato.



**Figura 24.** Cinética de las fermentaciones en lote. Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato a) glucosa y b) glicerol. Media experimental de concentración con DS de [●] células y [▲] sustrato. Cinética de formación de plásmidos usando c) glucosa y d) glicerol. Media experimental con SD de [♦] RV y [■] RE. Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas sólidas).

La cinética de formación de plásmido expresada como rendimiento volumétrico y rendimiento específico en los cultivos en lote con glucosa y glicerol se muestran en la Figura 24c y 24d, respectivamente. En el experimento por lote de glucosa (Fig. 24c), el rendimiento específico de plásmido (RE) fue de 1.35 mg/(L-OD600) y el rendimiento volumétrico (RV) fue de 22.10 mg/L. El rendimiento específico del plásmido disminuyó a medida que la tasa de crecimiento celular aumentó debido a un efecto de dilución, que es una de las limitaciones de los cultivos por lote para la producción de plásmidos. Sin embargo, el rendimiento volumétrico aumentó debido al efecto cuantitativo del crecimiento celular. En los experimentos por lote de glicerol (Fig. 24d), el RE final fue de 2.70 mg/(L-OD600) y el RV fue de 33.75 mg/L. El rendimiento específico del plásmido aumentó durante el cultivo debido a una menor tasa de crecimiento específico. En todos los experimentos por lotes, los modelos presentaron un ajuste adecuado a los datos cinéticos con  $r^2 \geq 0.97$  para el rendimiento volumétrico y específico del plásmido. Los parámetros operativos y cinéticos correspondientes se muestran en la Tabla 7.

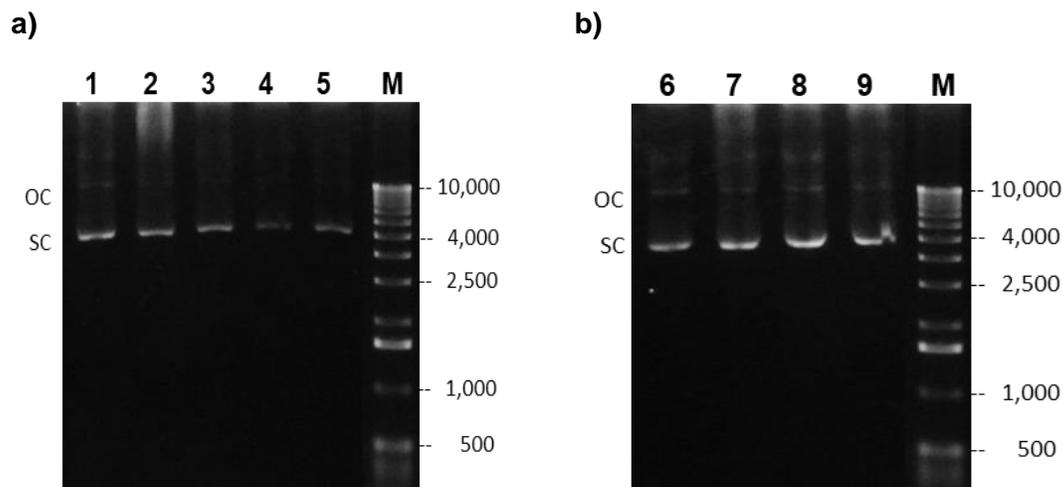
**Tabla 7.** Parámetros cinéticos obtenidos de las fermentaciones por lote.

Símbolo	Glucosa	Glicerol	Unidades	Descripción
$X_0$	1.00	1.00	OD <sub>600</sub>	Concentración inicial de biomasa
$X_{bf}$	16.36	12.50	OD <sub>600</sub>	Concentración final de biomasa
$S_0$	13.30	13.40	g/L	Concentración inicial de sustrato
$\mu_m$	0.55	0.50	1/h	Velocidad de crecimiento máxima
$Y_{x/s}$	1.16	0.86	OD <sub>600</sub> -L/g	Coeficiente de rendimiento (biomasa/glucosa)

Los rendimientos específicos y volumétricos del plásmido dependen del sistema biológico utilizado y de las condiciones de cultivo. Se han reportado recientemente cultivos en biorreactores a escala de laboratorio que utilizan *E. coli* DH5 $\alpha$  y diversos enfoques de fermentación (García-Rendón et al., 2017). En este estudio se obtuvo una productividad alta de 4.00 y 6.75 mg de ADNp/(L-h) en modo lote para la glucosa y el glicerol, respectivamente. Este cultivo a corto plazo permite el mantenimiento del

contenido de plásmido celular sin una dilución significativa, como se ve en las Figuras 24c y 24d, pero a largo plazo el uso de este enfoque conlleva a costos operativos más altos.

Las imágenes de electroforesis en gel de agarosa (Fig. 25) de las muestras tomadas durante los cultivos por lotes para glucosa o glicerol mostraron predominantemente ADNp SC con pequeñas cantidades de ADNp de OC. Cuando se usa glucosa (Fig. 25a), el contenido de plásmido disminuye a medida que avanza el tiempo de fermentación, como se determinó en el análisis HIC-HPLC y se discutió anteriormente. Sin embargo, el contenido de plásmido (Fig. 56b) aumentó en el cultivo con glicerol, debido a una menor tasa de crecimiento específico.

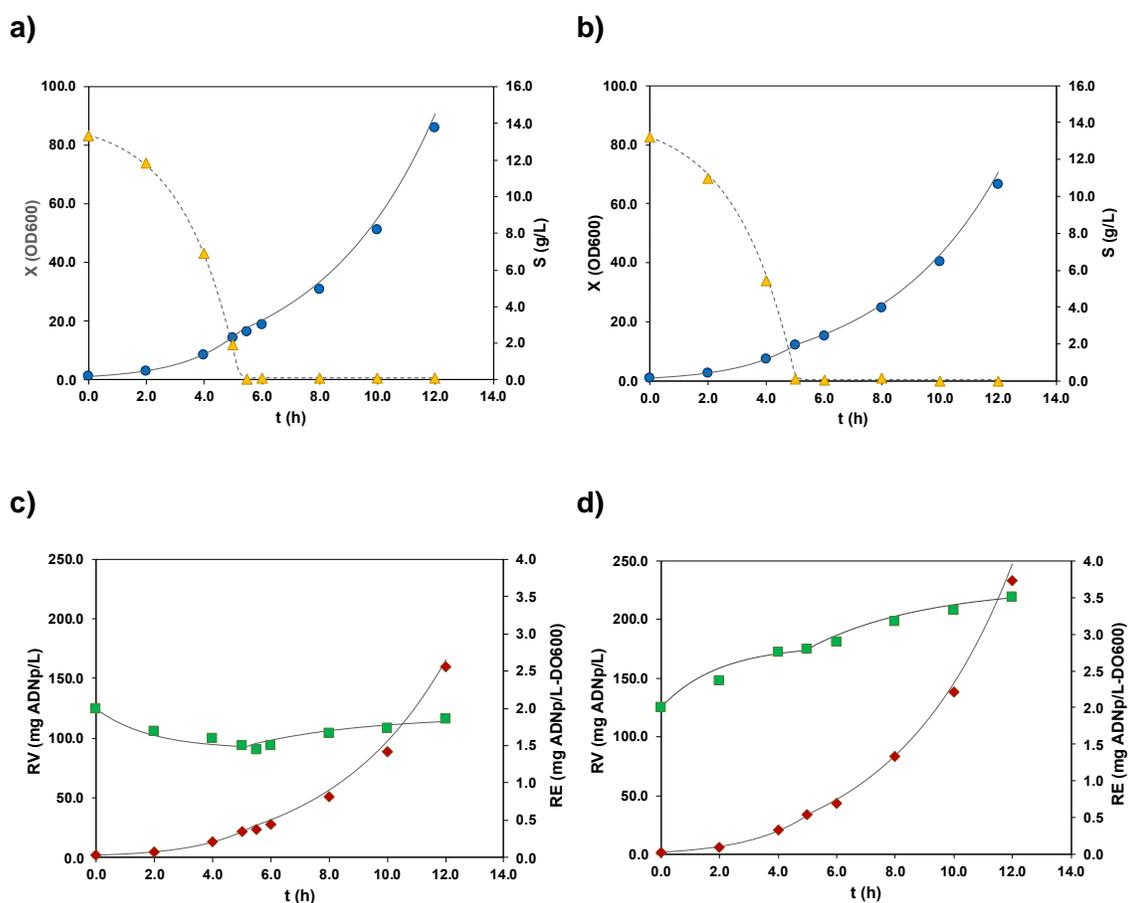


**Figura 25.** Electroforesis en gel de agarosa de lisados celulares de las fermentaciones por lote. a) Glucosa: Líneas 1-5 corresponden a los tiempos 0, 2, 4, 5 y 5.5 h respectivamente y b) glicerol: Líneas 6-9 corresponden a los tiempos 0, 2, 4 y 5 h respectivamente. (M) marcador de peso molecular, (OC) circular abierto ADNp, (SC) superenrollado ADNp.

Utilizando los parámetros cinéticos experimentales obtenidos en los cultivos por lotes, se diseñaron y llevaron a cabo los cultivos PAE. Las Figuras 26a y 27b muestran la cinética de crecimiento y consumo de sustrato correspondientes a los cultivos en PAE con glucosa y glicerol, respectivamente.

La fase en lote del experimento con glucosa (Fig. 26a) se ejecutó durante 5.5 h donde creció a  $\mu_{max}$ . Este período fue seguido por una fase PAE donde se inició una estrategia

de alimentación durante 6.5 h, para lograr una  $\mu_p = 0.25 \text{ h}^{-1}$  constante, que permitiera aumentar el rendimiento específico del plásmido. La concentración final de biomasa obtenida fue de 86.0 OD<sub>600</sub>. Análogamente, la fase lote y de alimentación exponencial del experimento con glicerol (Figura 26b) duraron 5.0 y 7.0 h respectivamente. Se obtuvo una densidad celular máxima de 66.5 OD<sub>600</sub> al final del experimento. En ambos experimentos del sistema PAE, el modelo presentó un ajuste adecuado a los datos cinéticos, alcanzando  $r^2 = 0.99$ . La concentración final de biomasa usando glucosa fue 31% más alta que con glicerol.



**Figura 26.** Cinética de las fermentaciones del sistema PAE. Cinética de crecimiento celular y consumo de sustrato a) glucosa y b) glicerol. Media experimental de concentración con DS de [●] células y [▲] sustrato. Cinética de formación de plásmidos usando c) glucosa y d) glicerol. Media experimental con SD de [◆] RV y [■] RE. Datos experimentales (símbolos) y valores obtenidos por el modelo (líneas sólidas).

La cinética de la producción de plásmidos determinada por HIC-HPLC en los cultivos PAE se muestra en las Figuras 26c y 26d. En el experimento PAE de glucosa (Fig. 26c), el RE fue de 1.86 mg/(L-OD600) y el RV fue de 160.00 mg/L. El RE de plásmido disminuye durante la fase lote debido a un efecto de dilución. Una vez que comienza la fase PAE, el RE comienza a aumentar, ya que el efecto de dilución del plásmido se minimiza. Sin embargo, el rendimiento volumétrico aumenta debido al efecto cuantitativo del crecimiento celular. En el experimento PAE de glicerol (Fig. 26d), el RE de plásmido final fue de 3.5 mg/(L-OD600) y el RV fue de 233.0 mg/L. El RE de plásmido aumenta en las fases de lote y PAE debido a la menor tasa de crecimiento específica obtenida. En ambos experimentos de PAE, el modelo presentó un ajuste adecuado a los datos cinéticos con  $r^2 \geq 0.95$ . Los parámetros operativos y cinéticos correspondientes se muestran en la Tabla 8.

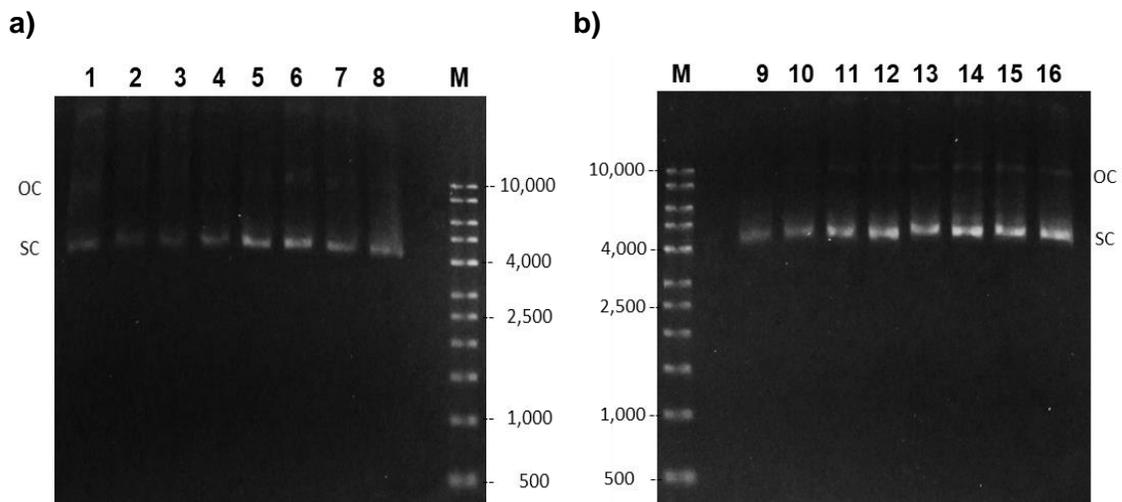
**Tabla 8.** Datos de entrada para el modelo PAE. Parámetros cinéticos y de operación.

Símbolo	Glucosa	Glicerol	Unidades	Descripción
$K_s$	0.10	0.10	g/L	Constante de saturación
$X_m$	86.00	66.50	OD <sub>600</sub>	Máxima concentración de biomasa
$P_0$	2.00	2.00	mg/(L-OD <sub>600</sub> )	Rendimiento específico inicial de plásmido
$V$	1.00	1.00	L	Volumen de operación del biorreactor
$\mu_p$	0.25	0.25	1/h	Velocidad máxima de crecimiento
$S_f$	18.00	18.00	g/L	Concentración de sustrato en medio de alimentación
$VD$	3.00	3.00	L	Total de volumen alimentado
$Y_{P/Xb}$	1.44	2.85	mg/(L-OD <sub>600</sub> )	Coefficiente de rendimiento en fase lote (plásmido/biomasa).
$Y_{P/Xp}$	1.90	3.65	mg/(L-OD <sub>600</sub> )	Coefficiente de rendimiento en fase PAE (plásmido/biomasa)

Las productividades del plásmido fueron 13.33 y 19.40 mg/(L-h) para la glucosa y el glicerol, respectivamente. Esto representa un aumento de 1 a 3 veces con respecto a

los cultivos alimentados por lotes reportados previamente a escala piloto y de laboratorio utilizando *E. coli* DH5 $\alpha$  (Carnes, 2005; Carnes y Williams, 2014). La viabilidad económica de los cultivos PAE requiere que el incremento en los ingresos que se espera por una mayor productividad del plásmido supere los gastos adicionales relacionados con las bombas y los filtros necesarios para el sistema.

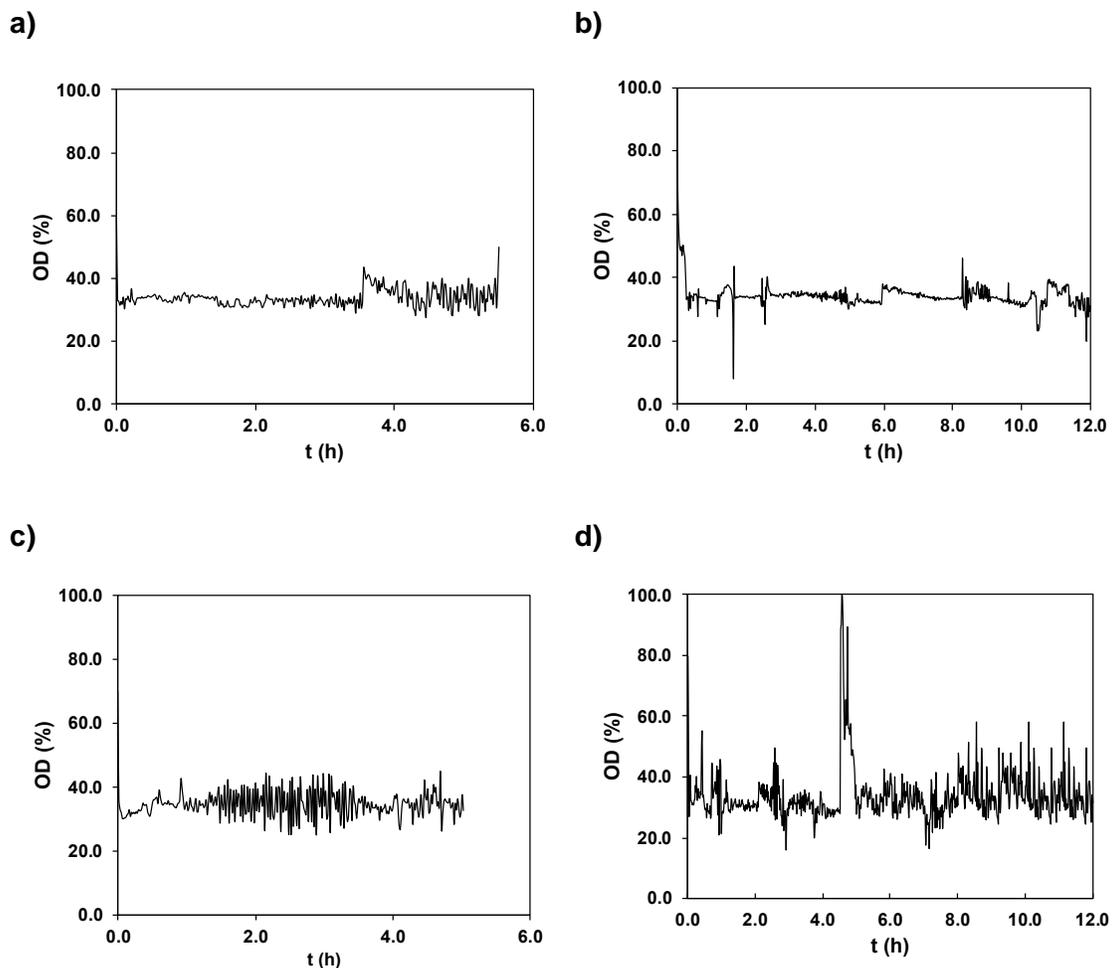
Las imágenes de electroforesis en gel de agarosa de las muestras tomadas durante los cultivos PAE mostraron predominantemente ADNp de SC con pequeñas cantidades de ADNp de OC (Fig. 27). Con glucosa (Fig. 27a), el contenido de plásmido disminuyó a medida que avanzaba el tiempo de fermentación durante la fase en lote, luego aumentó durante la fase PAE (basado en el análisis HIC-HPLC y discutido anteriormente). La imagen correspondiente para el cultivo de glicerol (Figura 27b) mostró un aumento constante del contenido de plásmido durante toda la fermentación.



**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa de lisados celulares de las fermentaciones PAE. a) Glucosa: Líneas 1-8 corresponden a los tiempos 0, 4, 5, 5.5, 6, 8, 10 y 12 h respectivamente y b) glicerol: Líneas 9-16 corresponden a los tiempos 0, 4, 5, 6, 8, 10 y 12 h respectivamente. (M) marcador de peso molecular, (OC) circular abierto ADNp, (SC) superenrollado ADNp.

Las gráficas de control de oxígeno para los experimentos en lote y PAE se muestran en la Figura 28. En el curso de los cultivos de glucosa (Figs. 28a y 28b), el comportamiento del OD (oxígeno disuelto) fue más estable que en los cultivos que utilizan glicerol (Figs. 28c y 28d). Este comportamiento también fue más estable que las variaciones de OD observadas en los cultivos reportados anteriormente (Carnes et al., 2006).

En los cultivos aeróbicos de *E. coli* que utilizan glucosa como sustrato, el rendimiento de la biomasa basado en oxígeno ( $Y_{X/O_2}$ ) es mayor que el parámetro respectivo para glicerol (De Almeida et al., 2010; Hempfling y Mainzer, 1975). Esto implica una menor velocidad de consumo de oxígeno (OUR) en cultivos limitados en glucosa que en glicerol; y conduce a un efecto sinérgico, ya que en el cultivo requiere menor aireación y, por consiguiente, menos adición de antiespumante. Bajo estas condiciones, se obtiene un mejor control de oxígeno y una mayor velocidad de transferencia (OTR), debido a que los antiespumantes que contienen aceite de silicona reducen la OTR incluso a bajas concentraciones (Koch et al. 1995; Morao et al., 1999).



**Figure 28.** Control de oxígeno disuelto. Experimentos usando glucosa a) Lote y b) PAE. Experimentos usando glicerol c) Lote y d) PAE.

EL antiespumante tiene una fuerte influencia en la señal de  $pO_2$ . La adición de pulsos de antiespumante provoca fuertes cambios en la señal de  $pO_2$  que interfieren con la herramienta de detección y, por lo tanto, da lugar a resultados erróneos. Se ha reportado que la adición continua de antiespumante en muy baja concentración puede ser una solución. El uso masivo de antiespumante conduce a una señal de  $pO_2$  muy inestable y oscilante y deteriora la velocidad de transferencia de oxígeno (Mounir et al. , 2013)

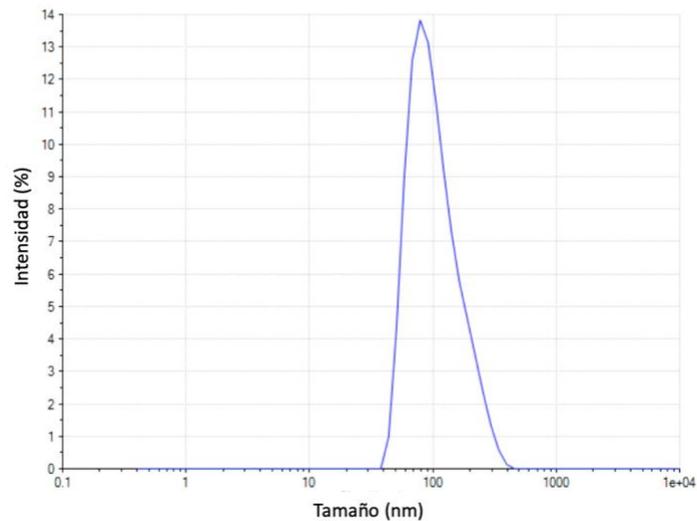
#### **4.2 Preparación y caracterización de la nanovacuna**

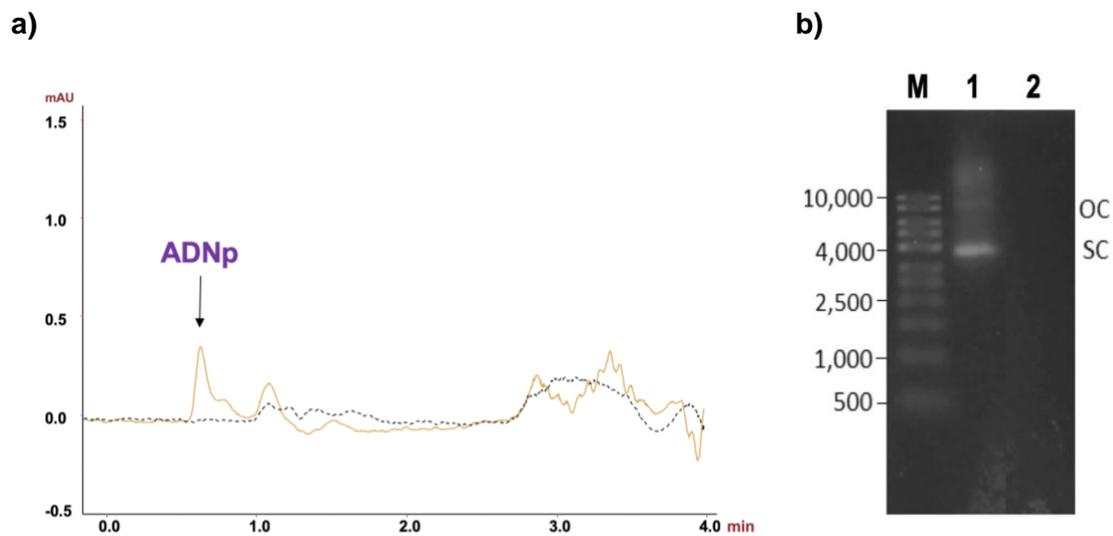
El plásmido procedente de las fermentaciones fue purificado obteniéndose un valor de pureza  $A_{260}/A_{280}$  de 1.86. Posteriormente fue marcado para su seguimiento intracelular con el fluorocromo Cy5 y se procedió a su encapsulación en nanopartículas lipídicas. Los valores de tamaño, índice de polidispersidad (IPD) y potencial Z (PZ) de las nanopartículas se muestran en la Tabla 9. El tamaño promedio de las nanovacunas fue de 119.36 nm lo cual se encuentra en el rango recomendado para su uso (Landesman-Milo & Peer, 2012). El IPD correspondiente fue de 0.141 que sugiere una muestra monodispersa con baja desviación estándar (Paul C. Hiemenz, 1997) (Fig. 29). El PZ de las nanovacunas fue de 17.10. Esta carga es el efecto neto de la carga positiva del grupo amino y la carga negativa del pDNA. La carga neta positiva favorece que la nanovacuna se asocie con la membrana celular (Rasouljanboroujeni et al., 2017).

En la Figura 30 se muestra los resultados de la cromatografía HPLC-HIC de muestras de solución de plásmido purificado (antes de la encapsulación) y encapsulado. Puede observarse en la Figura 30a que la eficiencia de encapsulación fue de prácticamente 100%. Este resultado se corroboró en los estudios de electroforesis (Fig. 30b)

**Tabla 9.** Caracterización de las nanovacunas.

Muestra	Tamaño (nm)	IPD	PZ (mV)
ADNp	-	-	-11.90±2.7
Liposoma	190.46±10.5	0.310±0.023	30.16±1.0
Nanovacuna	119.36±1.5	0.141±0.016	17.10±1.2

**Figura 29.** Análisis de distribución de tamaño por dispersión dinámica de la luz. El análisis de distribución de tamaño de partícula reveló que el tamaño de partícula era de aproximadamente de 119 nm.



**Figura 30.** Encapsulación del plásmido en nanopartículas lipídicas. a) Cromatograma del ADNp desnudo (línea sólida) y encapsulado (línea punteada). b) Electroforesis en gel de agarosa de ADNp (1) desnudo y (2) encapsulado. (M) Marcador, (SC) superenrollado y (OC) circular abierto.

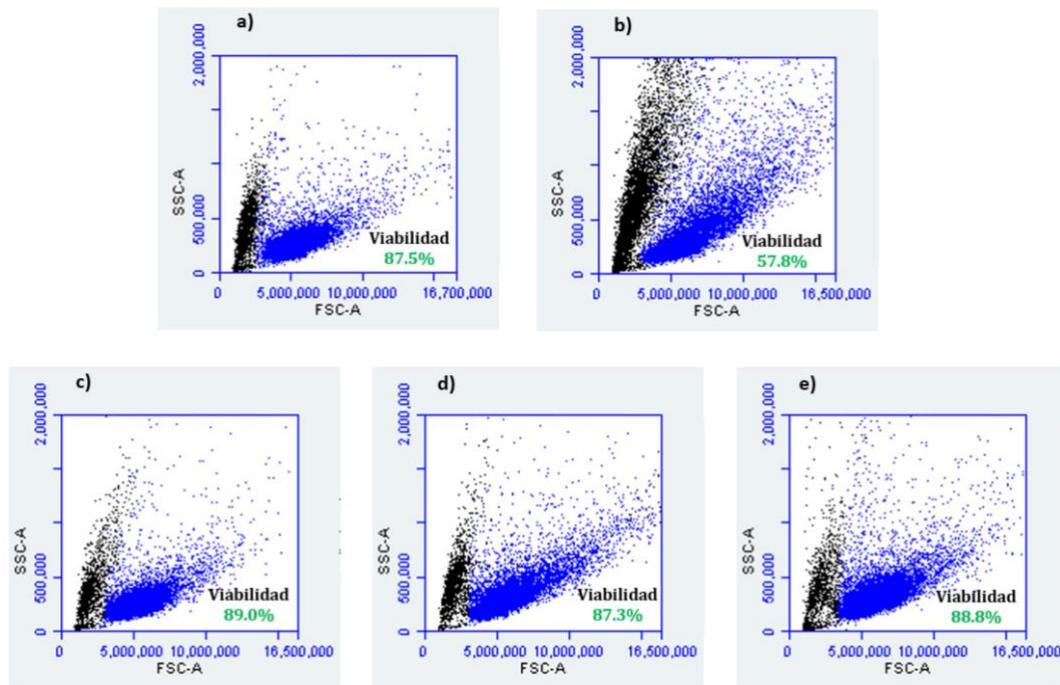
### 4.3 Evaluación *in vitro* de las nanovacunas

#### 4.3.1 Evaluación de la internalización celular

Se utilizó la citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular y la internalización de las nanovacunas en las células RAW 264.7. Los resultados citométricos de los estudios de viabilidad de las células RAW 264.7 a las 48 h de cultivo se pueden apreciar en la Figura 31. El porcentaje de células viables se conserva en todos los casos en un rango de 87 a 89% excepto en las células con liposomas vacíos que es de 57.8 % (Fig. 31b). La máxima viabilidad depende del manejo de las muestras para hacer las mediciones citométricas.

Se ha visto que las interacciones electrostáticas entre los liposomas cargados positivamente y las membranas celulares de las células huésped cargadas negativamente facilitan la internalización celular (Frohlisch, 2012; Kelly et al., 2011). Desafortunadamente, los liposomas catiónicos pueden causar citotoxicidad que limita su seguridad para uso clínico (Lv et al., 2006). Se cree que una de las razones de la toxicidad de los liposomas catiónicos es la interacción de los lípidos catiónicos con las

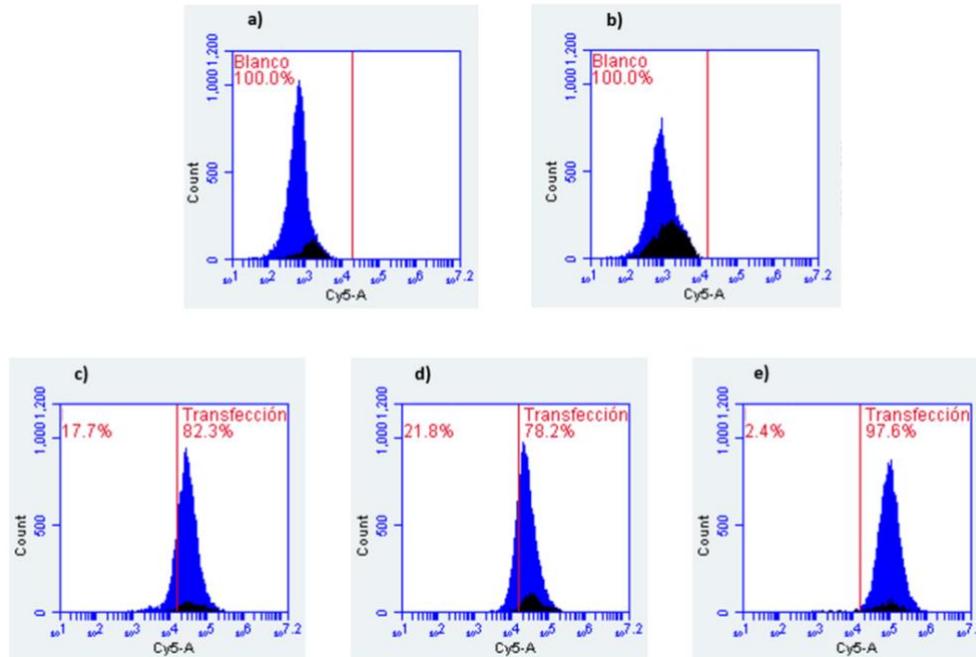
membranas de organelos celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que en los macrófagos RAW264.7, los liposomas catiónicos que contienen estearilamina inducen apoptosis a través de vías mitocondriales que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) (Takano et al., 2003). Lo anterior puede explicar la baja viabilidad observada en la muestra con liposomas catiónicos vacíos, ya que presentaban un PZ mayor que el resto de las muestras, lo que sugiera la existencia de un PZ óptimo para la preparación de las nanovaunas.



**Figura 31.** Ensayo de viabilidad celular mediante citometría de flujo. a) células control, b) liposomas vacíos, c) vector pVAX, d) pVAX-NH36 y e) nanovacuna. (puntos azules) células viables y (puntos negros) células muertas).

Los resultados citométricos del ensayo de internalización celular se muestran en la Figura 32. Se puede observar la ausencia de fluorescencia en las células control (Fig. 32 a) y en las células con liposomas vacíos (Fig. 32b.). Por otra parte, el vector pVAX1 (Fig. 32c) el plásmido desnudo PVAX1-NH36 (Fig. 32d) y la nanovacuna (Fig. 32e) son internalizados por las células RAW 264.7 bajo las condiciones de este estudio. La eficiencia de transfección a las 48 h fue de 82.3%, 78.2% y 97.6%, respectivamente, lo

que sugiere que la encapsulación del plásmido en la nanovacuna favorece la transfección celular. Ha sido reportado que los liposomas catiónicos son internalizados eficientemente por la complementariedad de carga con la membrana celular, como se discutió anteriormente (Frohlisch, 2012; Kelly et al., 2011).



**Figura 32.** Ensayo de internalización celular mediante citometría de flujo. a) células control, b) liposomas vacíos, c) vector pVAX1, d) pVAX1-NH36 y e) nanovacuna. (azul) células viables y (negros) células muertas.

#### 4.3.2 Evaluación de la respuesta inmune de la nanovacuna

La evaluación de la respuesta inmune producida por la administración de las nanovacunas en células RAW 264.7 se llevó a cabo analizando los sobrenadantes del cultivo después de 48 h en cada caso. En la Figura 33 se muestran los resultados del análisis de cuantificación de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  evaluadas *in vitro* mediante ELISA. Se puede observar que sólo el plásmido desnudo provoca una producción marcada de IL-6 (Fig. 33a), lo que sugiere que el plásmido desnudo favorece una respuesta humoral. En el caso de enfermedades parasitarias es preferente la respuesta inmune celular para la efectiva eliminación de la infección.

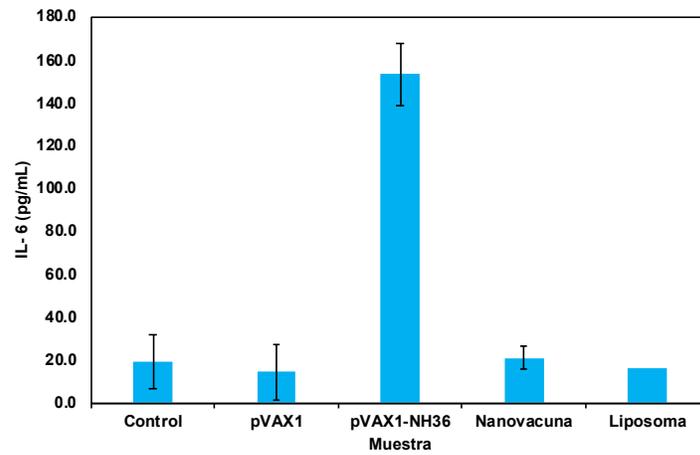
En la cuantificación de la producción de TNF- $\alpha$  (Fig. 33b) se observa que todos los agentes producen una mayor cantidad de esta citocina. Lo que sugiere una condición favorable para una respuesta inmune celular.

El hecho que la producción de TNF $\alpha$  de la nanovacuna sea 2.2 veces mayor que la del control es relevante para la investigación, dado que es importante tomar en cuenta que los estudios fueron realizados *in vitro*, y bajo estas condiciones el plásmido desnudo no está sujeto a barreras que existen en condiciones *in vivo* que le restarían efectividad.

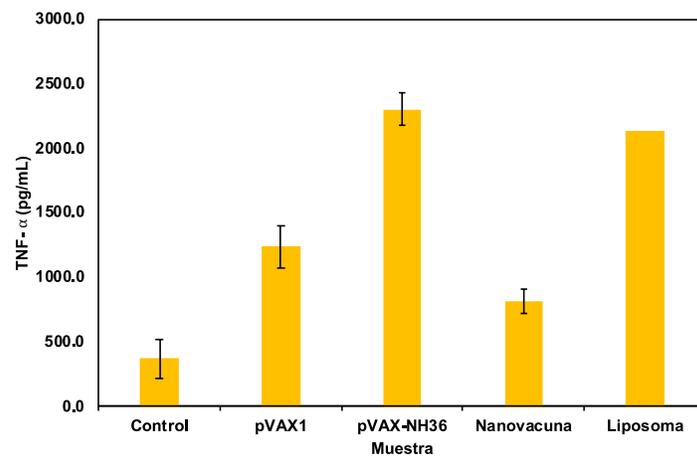
En relación liposomas catiónicos se ha demostrado que son más propensos a inducir una reacción inmune y efectos adyuvantes en contraste con los liposomas aniónicos o neutros. Los liposomas catiónicos pueden promover la respuesta proinflamatoria y la expresión de citoquinas de TH<sub>1</sub> (como la TNF- $\alpha$ ) (Landesman-Milo y Peer, 2012). Asimismo, se ha reportado que el tamaño de partícula es un factor importante para determinar el tipo de inmunidad inducida.

Lo anterior sugiere que la nanovacuna induce un perfil de citosinas adecuado para la inducción de una respuesta inmune celular pertinente para la enfermedad parasitario leishmaniasis. Sin embargo, se requiere realizar estudios *in vivo*, optimizar el tamaño y carga de las nanovacunas para una mejorar su comportamiento.

a)



b)



**Figura 33.** Análisis de citocinas producidas por la administración *in vitro* de la nanovacuna. a) citocina IL-6 y b) citocina TNF- $\alpha$ .

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Esta investigación permitió desarrollar un proceso para la producción de una nanovacuna contra leishmaniasis utilizando pVAX-NH36 encapsulado en nanopartículas lipídicas catiónicas. Parte importante de este desarrollo es el establecimiento de un método estandarizado para la preparación de inóculos. La comparación de la operación en modo de cultivo por lote, por lote alimentado y PAE, sugiere que el cultivo PAE ofrece ventajas ya que se logra mejor rendimiento específico y volumétrico de pVAX-NH36. Para la optimización del sistema PAE se establecieron detalladamente los pasos para la preparación del medio de cultivo definido utilizado. Además, se demostró la flexibilidad del sistema para la utilización de glucosa o glicerol como fuentes carbono. Se encontró una mayor productividad de los cultivos de PAE en comparación con los bioprocesos convencionales que utilizan estas fuentes de sustrato. El cultivo PAE con glicerol presentó una mayor productividad del plásmido, pero representa un mayor costo operacional que los cultivos de PAE con glucosa. Por otro lado, la demanda y el control de oxígeno fueron mejores durante la fermentación de la glucosa. Estos resultados sugieren el uso de glicerol durante la fase de lote para minimizar la dilución del plásmido y glucosa durante la fase PAE. Los parámetros cinéticos obtenidos en los cultivos por lotes se utilizaron para reproducir los cultivos de PAE. El modelo de estos cultivos presentó un adecuado ajuste a los datos cinéticos.

Se logró encapsular plásmido en liposomas catiónicos obteniéndose partículas de tamaño y monodispersidad adecuados para su uso en vacunación. Los estudios realizados sobre la eficiencia de encapsulación muestran que el sistema permite encapsular el plásmido de manera muy eficiente, lo cual es un factor de gran importancia para la viabilidad del proceso. La nanovacuna tuvo un mayor porcentaje de transfección que el plásmido desnudo, y no mostro citotoxicidad significativa. La nanovacuna indujo

un perfil de citocinas adecuado para la promoción de una respuesta inmune celular la cual es favorable en el tratamiento contra leishmaniasis.

Se recomienda analizar el comportamiento del sistema PAE combinando glicerol como fuente de carbono en la fase lote y glucosa en la fase PAE. Además, prolongar el tiempo de cultivo para tratar de incrementar el rendimiento volumétrico de plásmido. Con relación al proceso de encapsulamiento, se recomienda estudiar carga superficial y diámetro óptimo de la nanovacuna para una mejor inducción de la respuesta inmune. Además, realizar estudios de toxicidad y estabilidad en muestras fisiológicas humanas.

La investigación realizada proporciona el conocimiento fundamental para el diseño a escala de un bioproceso para la producción de vacunas de tercera generación, promover estudios clínicos y su eventual transferencia tecnológica.

## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

- Abbink, P., Larocca, R. A., De La Barrera, R. A., Bricault, C. A., Moseley, E. T., Boyd, M., Barouch, D. H. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science (New York, N.Y.)*, **2016**, 353(6304), 1129–1132.
- Acuna, J., Hewitt, M., Johnston, R., Kirkland, D., Shikibu, T., & Zhang, D. Modeling perfusion processes in biopharmaceutical production. *BioProcess International*, **2011**, 9(2), 52–58.
- Aguilar-Be, I., da Silva Zardo, R., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G. P., Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., Dumonteil, E. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **2005**, 73(2), 812–819.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ... Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **2003**, 8(1), 1–8.
- Alvar, J., Croft, S. L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S., & Reed, S. G. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, **2013**, 31(Suppl 2):B244–B249.
- Apostolopoulos, V. Vaccine Delivery Methods into the Future. *Vaccines*, **2016**, 4(2), 9.
- Balbino, T. A., Correa, G. S. C., Favaro, M. T. P., Toledo, M. A. S., Azzoni, A. R., & de la Torre, L. G. Physicochemical and in vitro evaluation of cationic liposome, hyaluronic acid and plasmid DNA as pseudo-ternary complexes for gene delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2015**, 484, 262–270.

- Barrán-Berdón, A. L., Yélamos, B., Malfois, M., Aicart, E., & Junquera, E. Ca<sup>2+</sup>-mediated anionic lipid-plasmid DNA lipoplexes. Electrochemical, structural, and biochemical studies. *Langmuir.*, **2014**, 30(39), 11704–11713.
- Bennett, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology.*, **2008**, 153 Suppl, S347-57.
- Besnard, L., Fabre, V., Fettig, M., Gousseinov, E., Kawakami, Y., Laroudie, N., Pattnaik, P. Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices. *Biotechnology Advances.*, **2016**, 34(1), 1–13.
- Bimboim, H. C., & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.*, **1979**, 7(6), 1513–1523.
- Bohle, K., & Ross, A. Plasmid DNA production for pharmaceutical use: role of specific growth rate and impact on process design. *Biotechnology and Bioengineering.*, **2011**, 108(9), 2099–2106.
- Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. B., Nico, D., Gravino, A. E., Manna, L., Palatnik, M., & Palatnik-de-Sousa, C. B. The Leishmune®'s Nucleoside hydrolase DNA vaccine as an aid in immunotherapy of canine visceral leishmaniasis. *Procedia in Vaccinology.*, **2012**, 6, 64–73.
- Borujeni, E. E., Li, Y., & Zydney, A. L. Application of periodic backpulsing to reduce membrane fouling during ultrafiltration of plasmid DNA. *Journal of Membrane Science.*, **2015**, 473, 102–108.
- Büyükköröglü, G., Yazan, E. Y., & Öner, A. F. Preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing DOTAPR ® for DNA delivery. *Turkish Journal of Chemistry.*, **2015**, 14(6):381-7.
- Cai, Y., Rodriguez, S., Rameswaran, R., Draghia-Akli, R., Juba, R. J., & Hebel, H. Production of pharmaceutical-grade plasmids at high concentration and high supercoiled percentage. *Vaccine.*, **2010**, 28(8), 2046–2052.

- Carnes, A. E. Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *BioProcess Int.*, **2005**, 3(9), 36–44.
- Carnes, A. E., Hodgson, C. P., & Williams, J. A. Inducible Escherichia coli fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnology and Applied Biochemistry.*, **2006**, 45(3), 155.
- Carnes, A. E., & Williams, J. A. Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent Patents on Biotechnology.*, **2007**, 1(2), 151–166.
- Choi, Y. S., Lee, M. Y., David, A. E., & Park, Y. S. Nanoparticles for gene delivery: Therapeutic and toxic effects. *Molecular and Cellular Toxicology.*, **2014**, 10(1), 1-8.
- Cui, L., Rajasekariah, G. R., & Martin, S. K. A nonspecific nucleoside hydrolase from Leishmania donovani: Implications for purine salvage by the parasite. *Gene.*, **2001**, 280(1–2), 153–162.
- Dawidczyk, C. M., Kim, C., Park, J. H., Russell, L. M., Lee, K. H., Pomper, M. G., & Searson, P. C. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *Journal of Controlled Release.*, **2014**, 187, 133–144.
- De La Vega, J., Ter Braak, B., Azzoni, A. R., Monteiro, G. A., & Prazeres, D. M. F. (2013). Impact of Plasmid Quality on Lipoplex-Mediated Transfection. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, **2013**, 102(11), 3932–3941.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., & Prazeres, D. M. F. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A.*, **2005**, 1069, pp. 3–22.
- Dunning, N. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, **2009**, 2(1), 73–82.
- Encke, J., zu Putlitz, J., & Wands, J. R. DNA vaccines. *Intervirology.*, **1999**, 42(2–3), 117–124.

- Farris, E., Brown, D. M., Ramer-Tait, A. E., & Pannier, A. K. Micro- and nanoparticulates for DNA vaccine delivery. *Experimental Biology and Medicine.*, **2016**, 241(9), 919–929.
- Ferraro, B., Morrow, M. P., Hutnick, N. A., Shin, T. H., Lucke, C. E., & Weiner, D. B. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, **2011**, 53(3), 296–302.
- Forde, G. M. Rapid-response vaccines--does DNA offer a solution?. *Nature Biotechnology.*, **2005**, 23(9), 1059–1062.
- Freitas, S., Canário, S., Santos, J. A. L., & Prazeres, D. M. F. Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnology Journal.*, **2009**, 4(2), 265–278.
- Freitas, S. S., Santos, J. A. L., & Prazeres, D. M. F. Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnology Progress.*, **2006**, 22(4), 1179–1186.
- Gamboa-León, R., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Myashiro, L. M., Pinheiro, R. O., ... Palatnik-de-Sousa, C. B. Immunotherapy against visceral leishmaniasis with the nucleoside hydrolase-DNA vaccine of *Leishmania donovani*. *Vaccine.*, **2006**, 24(22), 4863–4873.
- García-Rendón, A., Garibay-Escobar, A., Guzmán, R., & Tejeda-Mansir, A. Plasmid-DNA lipid nanovaccines: An innovative approach for a better world health. En *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting.*, **2018**. (pp. 231–267).
- Goncalves, G. A. L., Prather, K. L. J. J., Monteiro, G. A., Carnes, A. E., Prazeres, D. M. F. F., Gonçalves, G. A. L. Prazeres, D. M. F. F. Plasmid DNA production with *Escherichia coli* GALG20, a *pgi*-gene knockout strain: fermentation strategies and impact on downstream processing. *Journal of Biotechnology.*, **2014**, 186, 119–127.

- González-Valdez, J., Aguilar-Yáñez, J. M., Benavides, J., & Rito-Palomares, M. DNA based vaccines offer improved vaccination supply for the developing world. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.*, **2013**, 88(6), 979–982.
- Grunwald, T., & Ulbert, S. (2015). Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clin Exp Vaccine Res.*, **2015**, 4(1), 1–10.
- Hafner, A., Lovrić, J., Lakö, G. P., & Pepić, I. Nanotherapeutics in the EU: An overview on current state and future directions. *International Journal of Nanomedicine.*, **2014**, 19(9), 1005-23.
- Hasson, S. S. A. A., Al-Busaidi, J. K. Z., & Sallam, T. A. The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.*, **2015**, 5(5), 344–353.
- Hernández-Flores, J. de J., Morales-Aguirre, J. J., & Zamora-Chávez, A. Leishmaniasis visceral tratada con anfotericina B. *Boletín médico del Hospital Infantil de México.*, **2007**, 64, 43–48.
- Hoare, M., Levy, M. S., Bracewell, D. G., Doig, S. D., Kong, S., Titchener-Hooker, N., Dunnill, P. Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m<sup>3</sup>fermentation scale for an influenza pandemic. *Biotechnology Progress.* **2005.**, 21(6):1577-92.
- Ingolotti, M., Kawalekar, O., Shedlock, D. J., Muthumani, K., & Weiner, D. B. DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Review of Vaccines.* **2010**, 9(7):747-63.
- Islas-Lugo, F., Vega-Estrada, J., Alvis, C. A., Ortega-Lopez, J., & Del Carmen Montes-Horcasitas, M. Developing strategies to increase plasmid DNA production in Escherichia coli DH5alpha using batch culture. *Journal of Biotechnology.*, **2016**, 233, 66–73.

- Ismail, R., Allaudin, Z. N., & Lila, M. A. M. Scaling-up recombinant plasmid DNA for clinical trial: Current concern, solution and status. *Vaccine.*, **2012**, 30(41):5914-20.
- Ivory, C., & Chadee, K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy.*, **2004**, 2(1), 17.
- Klug, B., Reinhardt, J., & Robertson, J. Current Status of Regulations for DNA Vaccines BT - Gene Vaccines. En J. Thalhamer, R. Weiss, & S. Scheiblhofer (Eds.) **2012**, (pp. 285–295).
- Knuschke, T., Epple, M., & Westendorf, A. M. The type of adjuvant strongly influences the T-cell response during nanoparticle-based immunization. *Human Vaccines and Immunotherapeutics.*, **2014**, 10(1), 2840–2845.
- Kutzler, M. A., & Weiner, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews. Genetics.*, **2008**, 9(10), 776–788.
- Landesman-Milo, D., & Peer, D. Altering the immune response with lipid-based nanoparticles. *Journal of Controlled Release.* **2012**, 161(2):600-8.
- Lee, C. W., Gu, M. B., & Chang, H. N. High-density culture of Escherichia coli carrying recombinant plasmid in a membrane cell recycle fermenter. *Enzyme and Microbial Technology.*, **1989**, 11(1), 49–54.
- Li, L., Saade, F., & Petrovsky, N. (2012). The future of human DNA vaccines. *Journal of biotechnology.*, **2012**, 162(2–3), 171–182.
- Listner, K., Bentley, L. K., & Chartrain, M. A Simple Method for the Production of Plasmid DNA in Bioreactors BT - DNA Vaccines: Methods and Protocols. En W. M. Saltzman, H. Shen, & J. L. Brandsma (Eds.). Totowa, NJ: Humana Press., **2006**, (pp. 295–309).
- Liu, M. A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews.*, **2011**, 239(1), 62–84.
- Manzano, I., Guerrero-German, P., Montesinos-Cisneros, R. M., & Tejeda-Mansir, A.

- Plasmid DNA pre-purification by tangential flow filtration. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.*, **2015**, 29(3), 586–591.
- Misra, S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *The Journal of the Association of Physicians of India.*, **2013**, 61(2), 127–133.
- Molloy, M. J., Hall, V. S., Bailey, S. I., Griffin, K. J., Faulkner, J., & Uden, M. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. *Nucleic Acids Research.* **2004**, 32(16): e129.
- Monteiro, G. A., & Prazeres, D. M. F. Plasmid Biopharmaceuticals. *Microbiology Spectrum*, **2014**, 2(6).
- Mota-Sánchez, J. Vacunas de ADN: Inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Publica de Mexico.*, **2009**, 51(SUPPL.3), s463–s469.
- Munguía-Soto, R., García-Rendón, A., Garibay-Escobar, A., Guerrero-Germán, P., Tejeda-Mansir, A., Munguia-Soto, R., Tejeda-Mansir, A. Segregated growth kinetics of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -NH36 in exponential-fed perfusion culture for pDNA vaccine production. *Biotechnology and Applied Biochemistry.*, **2015**, 62(6), 795–805.
- Munye, M. M., Ravi, J., Tagalakis, A. D., McCarthy, D., Ryadnov, M. G., & Hart, S. L. Role of liposome and peptide in the synergistic enhancement of transfection with a lipopolyplex vector. *Scientific Reports.*, **2015**, 5, 9292.
- Nakayama, Y., & Aruga, A. Comparison of Current Regulatory Status for Gene-Based Vaccines in the U.S., Europe and Japan. (D. M. Harper, Ed.), *Vaccines.*, **2015**, 3(1): 186–202.
- Nunes, J. C., Morão, A. M., Nunes, C., Pessoa de Amorim, M. T., Escobar, I. C., & Queiroz, J. A. Plasmid DNA recovery from fermentation broths by a combined process of micro- and ultrafiltration: Modeling and application. *Journal of Membrane Science.*, **2012**, 415–416, 24–35.

- Nunes, J. C., Pessoa de Amorim, M. T., Escobar, I. C., Queiroz, J. A., & Morão, A. M. Plasmid DNA/RNA separation by ultrafiltration: Modeling and application study. *Journal of Membrane Science.*, **2014**, *463*, 1–10.
- Obon, J. M., Maiquez, J. R., Canovas, M., Kleber, H. P., & Iborra, J. L. High-density *Escherichia coli* cultures for continuous L(-)-carnitine production. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **1999**, *51*(6), 760–764.
- Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K. W., & Yap, M. G. S. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.*, **2006**, *39*(3), 391–398.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.*, **2008**, *26*(14):1709-24.
- Paul C. Hiemenz, R. R. Principles of Colloid and Surface Chemistry, Third Edition, **1997**, p229-236.
- Peetla, C., Stine, A., & Labhasetwar, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery. En *Molecular Pharmaceutics.*, **2009**, (Vol. 6, pp. 1264–1276).
- Pereira, V. B., Zurita-Turk, M., Saraiva, T. D. L., Castro, C. P. De, Souza, B. M., Agresti, P. M., Miyoshi, A. DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World Journal of Vaccines.*, **2014**, *4*(2), 50–71.
- Perera, G., & Bernkop-Schnürch, A. (2012). Pharmaceutical Non-Viral Formulations for Gene Vaccines. En J. Thalhamer, R. Weiss, & S. Scheiblhofer (Eds.), *Gene Vaccines.*, **2012**, (pp. 109–125).
- Perrie, Y., Crofts, F., Devitt, A., Griffiths, H. R., Kastner, E., & Nadella, V. Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **2016**, *99*(Pt A):85-96.

- Phue, J.-N., Lee, S. J., Trinh, L., & Shiloach, J. Modified Escherichia coli B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with Escherichia coli K (DH5 $\alpha$ ). *Biotechnology and Bioengineering.*, **2008**, 101(4), 831–836.
- Prather, K. J., Sagar, S., Murphy, J., & Chartrain, M. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: Plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology.*, **2003**, 33, (7), 865-883.
- Prazeres, D. M. F. Prediction of diffusion coefficients of plasmids. *Biotechnology and Bioengineering.*, **2008**, 99(4), 1040–1044.
- Prazeres, D. M. F., Monteiro, G. A., Ferreira, G. N. M., Diogo, M. M., Ribeiro, S. C., & Cabral, J. M. S. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology Annual Review.* **2001**, S1387-2656(01)07031-4
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. *Microbiology*. McGraw-Hill., **2002.**, p247-255
- Primrose, S. B., & Twyman, R. *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. Wiley., **2013**, p55-59.
- Raiado-Pereira, L., Prazeres, D. M. F., & Mateus, M. Impact of plasmid size on the purification of model plasmid DNA vaccines by phenyl membrane adsorbers. *Journal of Chromatography A.*, **2013**, 1315, 145–151.
- Restaino, O. F., Cimini, D., De Rosa, M., Catapano, A., De Rosa, M., & Schiraldi, C. High cell density cultivation of Escherichia coli K4 in a microfiltration bioreactor: a step towards improvement of chondroitin precursor production. *Microbial Cell Factories.*, **2011**, 10(1), 10.
- Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., Del Rosario García-Miss, M., & Dumonteil, E. Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against Leishmania mexicana. *Vaccine.*, **2005**, 23(46–47), 5372–5379.

- Sbarciog, M., Saraiva, I., & Vande Wouwer, A. Accelerating animal cell growth in perfusion mode by multivariable control: Simulation studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering.*, **2013**, 36(5), 517–530.
- Schmitt, L., Espina, J., Falck, T., & Wang, D. Biosensor Communication Technology and Standards. En *Handbook of Biomedical Telemetry.*, **2014**, (pp. 330–367).
- Shah, M. A. A., Ali, Z., Ahmad, R., Qadri, I., Fatima, K., & He, N. (2015). DNA Mediated Vaccines Delivery Through Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.*, **2015**, 15(1), 41–53.
- Shim, G., Kim, M. G., Park, J. Y., & Oh, Y. K. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.*, **2013**, 8(2), 71–78.
- Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances.*, **2012**, 30(3):691-708.
- Sousa, F., Prazeres, D. M. F., & Queiroz, J. A. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnology.*, **2008**, 26(9):518-25.
- Sousa, F., Prazeres, D. M. F., & Queiroz, J. A. Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomedical Chromatography.*, **2009**, 23(2), 160–165.
- T.D., N. Nanotechnology a path to nanovaccine. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **2012**, 3(2), P290–P303.
- Tang, J., Chen, J. Y., Liu, J., Luo, M., Wang, Y. J., Wei, X. W., ... Zheng, Y. Calcium phosphate embedded PLGA nanoparticles: A promising gene delivery vector with high gene loading and transfection efficiency. *International Journal of Pharmaceutics.*, **2012**, 431(1–2), 210–221.

- Tejeda-Mansir, A., García-Rendón, A., & Guerrero-Germán, P. Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.*, **2018**, 1–23.
- Tejeda-Mansir, A., & Montesinos, R. M. Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Patents on Biotechnology.*, **2008**, 2(3), 156–172.
- Tregoning, J. S., & Kinnear, E. Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases. *Microbiology Spectrum.*, **2014**, 2(6).
- Ureña-Búrquez, L. A., García-Rendón, A., Rochín-Wong, S., & Tejeda-Mansir, A. Preparation and characterization of a nanovaccine of pVAX1-NH36 for leishmaniasis. *Fuel.*, **2019**, 235, 1077–1082.
- Wang, Y., Rajala, A., & Rajala, R. V. S. Lipid nanoparticles for ocular gene delivery. *Journal of Functional Biomaterials.*, **2015**, 6(2):379-94.
- Werengowska-Ciećwierz, K., Wiśniewski, M., Terzyk, A. P., & Furmaniak, S. The chemistry of bioconjugation in nanoparticles-based drug delivery system. *Advances in Condensed Matter Physics.*, **2015**, (1):1-27.
- Williams, J. A. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. *Vaccines.*, **2013**, 1(3): 225–249.
- Williams, J. A., Luke, J., Johnson, L., & Hodgson, C. (2006). pDNAVACCultra vector family: high throughput intracellular targeting DNA vaccine plasmids. *Vaccine.*, **2006**, 24(21), 4671–4676.
- Williams, J. A., Luke, J., Langtry, S., Anderson, S., Hodgson, C. P., & Carnes, A. E. Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering.*, **2009**, 103(6), 1129–1143.

- Williams, P. D., & Kingston, P. A. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease. *Cardiovascular Research.*, **2011**, 91(4), 565–576.
- Witzigmann, D., Wu, D., Schenk, S. H., Balasubramanian, V., Meier, W., & Huwyler, J. Biocompatible polymer-peptide hybrid-based DNA nanoparticles for gene delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces.*, **2015**, 7(19), 10446–10456.
- Yakhchali, B., Karami, A., Aflaki, E., & Ahmadi, A. Plasmid DNA production for genetic immunization in fed-batch fermentation with feed back controls based on dissolved oxygen (DO) and pH. *Journal of Sciences.*, **2007**, 18(2), 129–133.
- Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C.-F. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.*, **2014**, 10(11), 3153–3164.
- Yang, J., Li, Y., Jin, S., Xu, J., Wang, P. C., Liang, X. J., & Zhang, X. Engineered biomaterials for development of nucleic acid vaccines. *Biomaterials Research.*, **2015**, 19:5.
- Yang, J., & Yang, Y. Plasmid size can affect the ability of Escherichia coli to produce high-quality plasmids. *Biotechnology Letters.*, **2012**, 34(11), 2017–2022.
- Zagato, E., Vermeulen, L., Dewitte, H., Van Imschoot, G., Vandenbroucke, R. E., Demeester, J., ... Braeckmans, K. Quantifying the Average Number of Nucleic Acid Therapeutics per Nanocarrier by Single Particle Tracking Microscopy. *Molecular Pharmaceutics.*, **2018**, 15(3), 1142–1149.
- Zaman, M., Good, M. F., & Toth, I. Nanovaccines and their mode of action. *Methods.*, **2013**, 60(3), 226–231.
- Zeng, A. P., & Deckwer, W. D. Model simulation and analysis of perfusion culture of mammalian cells at high cell density. *Biotechnology Progress.*, **1999**, 15(3), 373–382.

Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.*, **2014**, 32(3):327-37.

