

Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente

Gheorghe M. Borja^{a*}, Octavio T. Ramírez^a y Alvaro R. Lara^b

^a*Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Col. Chamilpa, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: gmbz@biosustain.dtu.dk*

^b*Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Del. Cuajimalpa, D.F., C.P. 05300, México*

RESUMEN

El empleo de vectores no virales (plásmidos) para fines terapéuticos está cobrando cada vez mayor importancia, como lo evidencia el creciente número de evaluaciones clínicas empleando dichos vectores. Este tipo de vectores contiene elementos para su replicación en el hospedero (bacteria) y elementos para expresar la proteína antigénica de interés. Esto permite estimar que en un futuro cercano la demanda de ADN plasmídico (ADNp) aumentará sustancialmente. La producción de ADNp se realiza empleando *Escherichia coli* (*E. coli*) en cultivos de alta densidad celular para maximizar el rendimiento volumétrico. En esta revisión se analizarán los recientes trabajos que se han realizado en cepas como en los vectores para incrementar el rendimiento en producción de ADN plasmídico además de facilitar la purificación.

Palabras clave: ADN plasmídico, Vacunas de ADN, Sobreflujo metabólico, *E. coli*, Cultivos en modo lote, Acetato

ABSTRACT

The use of non-viral vectors (plasmids) for therapeutic purposes is gaining increasing importance, as evidenced by the growing number of clinical evaluations using these vectors. Such vectors contain elements for replication in the host (bacteria) and elements for expressing the antigenic protein of interest. This allows us to estimate that in the near future the demand for plasmid DNA (pDNA) will substantially increase. pDNA production is carried out using *Escherichia coli* (*E. coli*) in high cell density cultures to maximize volumetric efficiency. In this review we analyze the recent work that has been done both in strains and in vectors to increase the production yield of plasmid DNA, in addition to facilitating purification.

Key words: Plasmid DNA, DNA vaccines, Overflow metabolism, *E. coli*, Batch cultivation, Acetate

INTRODUCCION

Las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) son plásmidos bacterianos contruidos para expresar una proteína seguida de una administración *in vivo* seguida de una transfección a las células objetivo. Estos plásmidos funcionan como un sistema de transporte para el gen, resultando en la producción *in situ* del antígeno (para las vacunas) o proteína terapéutica (para aplicaciones de terapia génica). Se ha demostrado que un plásmido que codifica dicha proteína viral puede provocar la inmunidad celular y humoral, así como la protección cruzada contra la exposición viral. Este tipo de tecnología se ha utilizado para las aplicaciones de gran alcance desde el laboratorio hasta emplearlo como herramienta en vacunas veterinarias aprobadas por la FDA, y se encuentra en desarrollo para una variedad de aplicaciones terapéuticas en humanos. Este artículo examinará las características de una vacuna de ADNp, ventajas de las vacunas de ADNp, vacunas aprobadas por las FDA y pruebas clínicas, cepas empleadas para la producción de vacunas de ADN, cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli* y purificación de ADNp

CARACTERÍSTICAS DE LAS VACUNAS DE ADNp

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos con capacidad para

autorreplicarse de forma controlada con ayuda de factores codificados en el ADN cromosómico del huésped y de forma coordinada con la división celular bacteriana (Lipps, 2008). En la mayoría de los casos son circulares, pudiendo variar en tamaño (<1-500 Kb) y en número de copias (1-500 copias/célula). La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos libres, esto es, cada nucleótido de cada hebra está unido de forma covalente al siguiente. A este tipo de plásmidos se les ha llamado ADN CCC (Covalently Closed Circular o isoforma circular relajada), aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas y fúngicas. Los plásmidos se mantienen en las poblaciones bacterianas a través de procesos de transferencia vertical y horizontal. Aunque se suele considerar material genético dispensable, la mayoría de los plásmidos proporcionan una gran variedad de fenotipos a sus huéspedes, reportándoles algún tipo de ventaja adaptativa. Ejemplos de ello pueden ser la capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencia a radiación, antibióticos o metales pesados. Así, los plásmidos pueden constituir entre un 1 y un 15% del genoma de muchas especies bacterianas (Holmes *et al.*, 1995) y representan vehículos portadores de genes que, dependiendo del número de copias del plásmido, se encuentran en dosis más

Artículos

elevadas que en el cromosoma, y además pueden dispersarse por transferencia genética horizontal.

El ADNp es utilizado de manera rutinaria en experimentos de laboratorio para la transferencia y modificación de información genética. Desde que se demostró que los plásmidos que codifican para una proteína viral pueden desencadenar una respuesta inmune o celular sin tener efectos secundarios como las vacunas tradicionales (Donnelly *et al.*, 2003) los plásmidos han cobrado una creciente relevancia como vector en terapia génica y vacunación basada en ADN. Los plásmidos usados para este fin están contruidos específicamente para codificar una proteína de interés, y son posteriormente administrados *in vivo* transfectando a las células de mamífero. Estos plásmidos están diseñados para

expresar un antígeno de interés resultando en una producción *in situ* del antígeno (para vacunas) o una proteína terapéutica (para aplicaciones en terapia génica). El ADNp usado en este fin debe de contener elementos para la replicación y selección en hospederos bacterianos y para la expresión del antígeno en células eucariotas (Figura 1), además de cumplir con ciertas características de calidad y seguridad. Los elementos requeridos para la replicación en bacterias incluyen un origen de replicación y secuencias como RNAI/RNII necesarias para la replicación, un gen de selección, necesario para la selección de transformantes exitosas en el hospedero bacteriano y generar una presión de selección para mantener una población predominante bacteriana que contiene el plásmido.

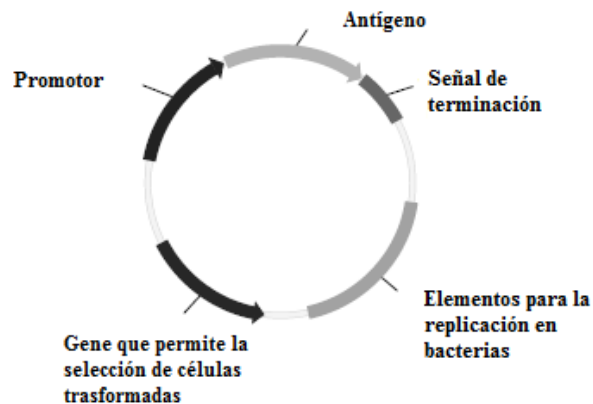


Fig. 1.- Elementos básicos de un vector para vacuna basada en ADN.

La FDA ha emitido la recomendación de que el ADNp, para ser empleado como

fármaco, debe encontrarse en forma superenrollada. Aunque dicha

recomendación no está plenamente justificada, se basa en estudios que han mostrado que dicha isoforma es más efectiva para la expresión del gene terapéutico en el paciente que la isoforma relajada o la lineal (Lahijani *et al.*, 1996; Prazeres *et al.*, 1999). Además la FDA sugiere que el contenido de ADNp de la isoforma superenrollada debe contener mínimo un 80% de esta isoforma, para reducir el riesgo de recombinación

inespecífica con el cromosoma del hospedero y/o la recombinación viral (Williams *et al.*, 2009; FDA, 2007). Además el contenido de ADN cromosomal del hospedero no debe de ser mayor a 10 ng por dosis de ADN de hospedero (Tabla 1). Por otro lado, la cantidad de RNA y proteínas no debe de exceder el 1% de las dosis empleadas (WHO, 2007; Lahijani *et al.*, 1996).

Tabla 1. Requisitos de pureza para vacunas de ADNp.

Análisis	Contenido del lisado bacteriano	Niveles de aceptables en el producto final	Tipo de prueba
DNA	21%	< 0.2 µg/mg ADNp	qPCR, HPLC
Endonucleasas			Identidad
RNA	21%	< 0.2 µg/mg ADNp	qPCR, HPLC
ADNp	3-5% ¹	>97% sc ADNp ²	CGE ³
Endotoxinas	3%	< 10 E.U/mg ADNp	Prueba LAL
HCP	55%	< 3 µg/mg ADNp	Prueba BCA
DNA genómico	3%	< 2 µg/mg ADNp	qPCR
Otros	15%	No considerado	No considerado

¹ (Stadler *et al.*, 2004)

² Recomendación por parte de la FDA es > 80%

³ Detección del ADN por absorbancia a 260 nm

Abreviaciones: qPCR= PCR cuantitativo; HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución; ADNp= ADN plasmídico; CGE= Electroforesis capilar en gel; LAL =Ensayo de lisado; HCP= proteínas del hospedero; BCA =Ensayo de ácido bicinconínico

VENTAJAS DEL EMPLEO DE VACUNAS DE ADN PLASMÍDICO.

Los productos de la vacunación con ADN se expresan directamente en el tejido blanco, representando esto una ventaja cuando se trabaja con antígenos de difícil obtención, con una pureza alta, o en concentraciones elevadas, evitando así los riesgos de la manipulación de grandes concentraciones de

patógenos y permitiendo seleccionar un objetivo específico, lo que no es posible con las vacunas clásicas (Fynan *et al.*, 1993) (Tabla 2). Además, se obtienen a un costo por debajo de las vacunas tradicionales, su producción es relativamente simple y la mayoría de los laboratorios están equipados para su producción en cantidades adecuadas para investigación, son de fácil

Artículos

administración y su conservación y el transporte se ve favorecido por su estabilidad a temperatura ambiente, lo que al mismo tiempo elimina el requerimiento de una cadena de frío, facilitando una mayor accesibilidad geográfica y permitiendo llevar

la vacunación hasta áreas remotas, debido a que el ADNp puede ser procesado como un precipitado seco y ser reconstituido con solo adicionar agua estéril previamente a la administración (Tabla 2) (Yokoyama *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998; Bahloul *et al.*, 1998).

Tabla 2.- Comparación de las características de las vacunas actualmente empleadas

Tipo de vacuna	Ventajas	Desventajas	Ejemplo
Atenuadas	Presenta un respuesta inmune completa.	Poco estables Reversión.	BCG
Muertas	Respuesta inmune parcial	No hay inmunidad celular Empleo de adyuvantes	Tifoidea
Subunidades	Se puede producir en gran escala.	Empleo de adyuvantes.	<i>Haemophilus influenza</i> B (Hib)
Toxoides	Respuesta humoral. Se puede producir en gran escala.	Posibles reacciones adversas.	Toxoide tetánico
Vacunas de ADNp	Presenta un respuesta inmune completa. Diseño simple. Costos de producción bajos. No hay necesidad de cadena fría.	Integración del plásmido. Mutagénesis.	Melanoma canino

Las vacunas de ácidos nucleídos ofrecen una alternativa simple para la generación de respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) a diferencia de otros métodos como la inmunización con péptidos, limitada a su aplicación por la diversidad genética de las poblaciones humanas o virus atenuados, los cuales su uso puede ser restringido por cuestiones de seguridad como por ejemplo el VIH. Otra ventaja de estas, es la posibilidad

de codificar múltiples secuencias antigénicas que incluyen algunos capaces de servir como inductores de determinados tipos de respuesta inmune (Tabla 2) (Donnelly *et al.*, 1994; Ouyang *et al.*, 2003; Shabaan *et al.*, 2003).

Una ventaja potencial de la vacunación con ADNp para diversas enfermedades virales es que mediante la expresión de proteínas virales "*in situ*" estas pueden tener

el mismo plegamiento, las mismas modificaciones transcripcionales y el mismo tipo de transporte intracelular ya que están siendo expresadas en células humanas (Deck *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Donnelly *et al.*, 1997)

VACUNAS APROBADAS POR LAS FDA Y PRUEBAS CLÍNICAS.

A la fecha, tres vacunas de ADNp han sido autorizadas para uso veterinario, y una cuarta “vacuna de ADNp” ha sido aprobada como terapia génica para cerdos (Tabla 3). Estas vacunas autorizadas incluyen: una para una enfermedad viral de salmón, una vacuna para enfermedad viral para equinos y una vacuna para el cáncer en perros, así como el factor liberador de la hormona crecimiento para cerdos. La eficacia de estas vacunas de ADNp y su aceptación como productos licenciados no solo aumenta la posibilidad de desarrollar plataformas tecnológicas para la investigación, desarrollo y producción de vacunas de ADNp para uso humano. La primera vacuna en aprobarse por la FDA fue la vacuna de ADNp contra el Virus del Oeste del Nilo (VON), autorizada en el 2005. Para demostrar su efectividad, primeramente se realizaron estudios clínicos en ratones (Kim *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2001), aves (Chattergoon *et al.*, 2000; Kilpatrick *et al.*, 2010) y finalmente en caballos (Kim *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2001). En el mismo año se autorizó la vacuna de

ADNp para el salmón de criadero del Atlántico para evitar la infección por el virus de necrosis hematopoyética (NHI). La capacidad protectora de la vacuna de ADNp es específica para la proteína que esta codificada (en comparación con otras proteínas) (tabla 2) (Anderson *et al.*, 1996; Corbeil *et al.*, 1999; Lorenzen *et al.*, 1990). En el año 2007, La FDA aprobó la tercera vacuna de ADNp que codifica para el melanoma canino. Esta vacuna de ADNp codifica para la tirosinasa humana. Se ha demostrado que esta vacuna genera una respuesta inmune completa contra la tirosinasa de perro (Bergman *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2006). El resultado de esta vacuna, tiene como consecuencia alargar la vida de los perros incluso con un cuadro clínico avanzado (Bergman *et al.*, 2003). El cuarto plásmido aprobado por la FDA, en el 2008, es un plásmido que codifica para el factor liberador de la hormona crecimiento (GHRH), aplicado a cerdos. El resultado de la inyección del plásmido en cerdos disminuye drásticamente la morbilidad de los lechones (Khan *et al.*, 2010). La aprobación de esta tecnología de suministro de genes demuestra la factibilidad del empleo de la vacunación con ADNp, después de estudios de seguridad preclínicos y clínicos. Esto sugiere que en un futuro inmediato se aprobarán más vacunas de ADNp para su uso veterinario y/o humano.

Tabla 3.- Características de las vacunas de ADNp aprobadas

Producto	Compañía	Fecha de licencia y país
West Nile innovator®	Center of Cancer disease	2005 EUA
Apex-IHN®	Novartis	2005 Canadá
Life Tide-SWS®	VGX Animal Health	2007 Australia
Vacuna de Melanoma canina®	Merial	2007 EUA

Actualmente no existe una vacuna de ADNp o terapia génica aprobada por la FDA. En recientes revisiones se han identificado más de 70 ensayos clínicos de ADNp (Kutzler y Weiner, 2008), de los cuales más de 60 ensayos clínicos fueron dirigidos contra el cáncer, dos de ellas estaban en la fase III de las pruebas clínicas. Sin embargo, hay numerosos estudios donde se han optimizado los vectores y la formulación de estos, esto nos permite saber que en un futuro cercano la demanda de ADNp se incrementará, lo cual se necesitarán procesos eficientes y efectivos para su producción (Carnes *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009; Liu, 2011; Kutzler y Weiner, 2008).

VECTORES MEJORADOS PARA MANTENER LA SEGURIDAD DE LAS VACUNAS DE ADNp

Un punto importante en la producción de vacunas de ADNp es mantener y asegurar la fidelidad de la secuencia del gen antigénico ya que será administrado en humanos (Lara *et al.*, 2012). La secuencia íntegra de un plásmido de ADNp debe de estar controlada

durante el proceso de producción debido al gran impacto que tiene en la calidad y rendimiento revisadas (Mairhofer y Lara, 2012). Modificaciones en las cepas y en el vector han sido empleadas en la producción del ADNp para asegurar que la secuencia y la estructura del plásmido se mantenga durante todo el proceso de producción. Actualmente la secuencia de la cepa de *E. coli* DH10B ha sido publicada (Durfee *et al.*, 2008) y demuestra que se necesita una reevaluación de las cepas productoras de ADNp. Por ejemplo, DH10B tiene una tasa de mutación 13.5 veces más alta que la cepa silvestre MG1655, esto se debe principalmente a las secuencias de inserción de transposición (SI). Cuando se comparó el genoma de la cepa MG1655 con las cepa DH10B, se encontró que DH10B tenía 5 copias adicionales de IS1A, IS1A son transposones que se sabe que se insertan en los vectores de ADNp (Chen y Yeh, 1997). Esta información es de suma relevancia para la producción de ADNp ya que la integridad del ADNp es fundamental para la vacunación. La contaminación del ADNp por

elementos móviles es un problema regulatorio muy importante a estudiar, ya que estos elementos pueden alterar las propiedades y la secuencia del vector de ADN.

Otro punto importante que puede afectar significativamente el diseño de la vacuna de ADNp, es que estos vectores incluyan un gen de resistencia a antibiótico.

En términos de la resistencia a los antibióticos, la FDA ha recomendado ampliamente que los antibióticos de origen β -lactámicos deben de ser evitados, debido a la contaminación residual en el producto final ya que puede causar una reacción alérgica en pacientes sensibles (Butler, 1996). Con este tipo de preocupaciones, el desarrollo de vectores de ADNp libres de genes resistentes a antibióticos es altamente deseado desde dos puntos de vista, el primero por el costo de producción y el segundo por la seguridad. Diversos grupos de investigación han reportado modificaciones en el vector, hospedero y ambos para desarrollar sistemas de selección alternativos. Estos avances han sido revisados recientemente (Vandermeulen *et al.*, 2011) algunos ejemplos claves se discutirán enseguida. Diversos grupos han elegido manipular genes esenciales de *E. coli* para asegurar eliminar las células libres de plásmido. Un grupo escogió el gen *dapD*, un gen esencial que codifica para la síntesis de Lisina (Cranenburgh *et al.*, 2001). El locus de *dapD* fue sustituido por el mismo gen de *dapD* bajo el control del promotor *lac*. Como consecuencia solo las células que contenían

el plásmido con el gen *lac* podían sobrevivir en el cultivo.

Un novedoso vector/hospedero se desarrolló por Soubrier y col. (1999) combinando la selección sin antibiótico que es dependiente de la replicación del hospedero. Este tipo de plásmidos, pCOR, contiene un origen de replicación R6K el cual requiere la proteína Pi codificada por el gene *pir*. En este sistema, el gene *pir* fue eliminado del plásmido e integrado al genoma de *E. coli*. El sistema dependiente del hospedero mejora el substancialmente la segregación del plásmido además de ser un sistema que no necesita de un gen de resistencia a antibiótico. Con este sistema se han alcanzado rendimientos de hasta 421mgADNp/L en cultivos alimentados de 7 L (Soubrier *et al.*, 2005). Los plásmidos pCOR representan hasta ahora los únicos vectores que no contienen el origen de replicación pCOIE1 para vectores de terapia génica y vacunas de ADNp.

CEPAS EMPLEADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE ADNp

La producción de plásmidos para vacunas de ADN se ha abordado desde diversos puntos, tales como el desarrollo de cepas (Okonkowski *et al.*, 2005), medios de cultivo (Okonkowski *et al.*, 2005); (O'Kennedy *et al.*, 2000; Wang, 2001), y estrategias de inducción por temperatura (Carnes *et al.*, 2006). La cepa seleccionada para la producción debe producir un alto número de copias del plásmido de interés, poseer alta

Artículos

estabilidad segregacional y mantener un alto nivel de superenrollamiento del plásmido. También debe tener una baja tasa de mutación y de intercambio de información genética con el plásmido.

El ADNp con fines terapéuticos es típicamente producido en cepas no

patógenas de *E. coli* derivadas de su progenitora *E. coli* K-12, como las cepas DH5 α (Carnes *et al.*, 2006). La Tabla 4 compara los genotipos relevantes empleados en la producción de ADNp

Tabla 4.- Cepas comúnmente reportadas para la producción de ADNp.

Cepa	Genotipo	Fuente
B	LE392.23 [F' <i>lacIqZ::M15 proAB Tn10</i> (Tetr)]	ATCC33849
K-12	F' λ <i>ilvG rfb50 rph1</i>	ATCC33849
BL21	B λ <i>dcm ompT hsdS gal</i>	Stratagene
DH1	F' λ <i>supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 endA1 thi1</i>	ATCC33849
DH5α	F' 80 <i>lacZ M15 (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) phoA supE44 thi1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JM105	F- Δ (<i>lac proAB lacIq thi repSL endAI slcB15 hadR4 traD36 proAB</i>) Δ (ZM15)	Pharmacia
JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi1⁻ hsdR17(rk⁻mk⁺) supE44 relA1⁻ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>	Promega

Además de DH5 α , otras cepas como BL21 (Listner *et al.*, 2006), DH1 (Cooke *et al.*, 2004; Rozkov *et al.*, 2004) JM108 (Huber, 2005) SCS1-L (Singer *et al.*, 2009) o DH10B (Lahijani *et al.*, 1996) han sido reportadas para la producción de ADNp, debido a su fondo genético. En la Tabla 4 se presentan los genotipos relevantes de las cepas más reportadas para la producción de ADN plasmídico. Como se puede observar en la Tabla 4, varias de estas cepas son comerciales. Hasta el momento no existe una cepa que pueda ser catalogada como la mejor productora en general.

En un estudio reciente se evaluó la producción de ADNp y su superenrollamiento por 17 diferentes cepas de *E. coli* (Yau *et al.*, 2008). Se evaluó la producción de dos plásmidos, de diferente tamaño (5.8 y 6.9 kb). Los autores concluyeron que no es posible establecer una correlación directa entre el genotipo de las cepas estudiadas y el rendimiento y superenrollamiento del ADNp producido. Sin embargo, la cepa DH5 α consistentemente se encontró como una de las mejores productoras. Debido a esto y a que los valores de producción de ADNp más altos

reportados se han logrado con esta cepa (Carnes, 2009), la cepa DH5 α será usada para la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Hasta el momento, existen pocos ejemplos reportados sobre la modificación genética de *E. coli* para incrementar la cantidad de ADNp producido. Recientemente, el empleo de una cepa BL21 modificada, derivada de *E. coli* B, ha mostrado altos rendimientos como cepa de producción (Phue *et al.*, 2008).

Se ha reportado que al emplear una cepa BL21 $\Delta recA$ se logró una mayor producción de ADNp en comparación con la comercial DH5 α (Phue *et al.*, 2008). En las mismas condiciones, las cepas derivadas de BL21 presentaron menor acumulación de acetato y mejoraron la asimilación de glucosa. Cuando se empleó glicerol como fuente de carbono, el desempeño de BL21 $\Delta recA$ fue mejor que DH5 α en términos de rendimiento volumétrico. En contraste, no hubo una diferencia notable en el rendimiento específico.

Desde el punto de vista metabólico, la cepa B comparada con la K-12, produce menos acetato, incluso cuando el medio contiene altas concentraciones de glucosa. Este fenómeno se atribuye a que esta cepa tiene más activo el ciclo del glioxilato y consecuentemente las vías de oxidación del acetato están más activas (Phue *et al.*, 2005)

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la cepa VH33 (W3110 PTS $^-$ GalP $^+$) es capaz de producir más del doble de ADNp

que su cepa parental (W3110), y debido a su baja producción de acetato, alcanzó altas densidades celulares en modo lote (Soto, 2011).

Además de la menor producción de acetato, se ha hipotetizado que el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato incrementado en las cepas PTS $^-$ (Flores *et al.*, 2002) podría beneficiar la producción de bases nitrogenadas necesarias para la síntesis de ADN. Dicha hipótesis se vio reforzada cuando el flujo de carbono a través de la piruvato cinasa fue reducido al inactivar el gene *pykA* en VH33, lo que condujo a un incremento de casi el doble de la cantidad de ADNp producido por VH33 (Pablos *et al.*, 2012). Sin embargo, los rendimientos alcanzados por VH33 y VH33 *pykA* $^-$ son todavía inferiores a los alcanzados por cepas comerciales.

Por otro lado, Wunderlich y colaboradores (2013), evaluaron los parámetros cinéticos y estequiométricos durante la producción de ADNp. Se evaluó de la velocidad específica de las cepas VH33 y VH34 con su cepa parental W3110. Se evaluaron rangos de 0.02 a 0.25 h $^{-1}$. La cepa VH34 tiene una mutación adicional *pykA*, la cual condujo a un aumento significativo del rendimiento y la productividad del ADNp. Estos resultados fueron 60% superiores al de las cepas W3110 y VH33. Además los flujos metabólicos calculados mostraron diferencias principalmente en las reacciones catalizadas por la piruvato cinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Estos resultados obtenidos

son útiles para el diseño de cultivos y la producción de ADNp en *E. coli* (Wunderlich *et al.*, 2013).

CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD CELULAR DE *Escherichia coli*

Una forma de aumentar la productividad de los bioprocesos es aumentar al máximo la cantidad de biocatalizador (células) en el bioreactor. Los cultivos de alta densidad celular de *E. coli* llegan a concentraciones de biomasa (medida como peso seco) de al menos 40 g/L (aunque no existe una concentración universalmente aceptada para emplear el término de “alta densidad celular”). Para lograr esto, se deben añadir cantidades de glucosa (la fuente usual de carbono) mayores a 80 g/L. En el caso de *E. coli*, la cantidad de glucosa inicial rara vez excede los 20 g/L de glucosa, principalmente debido a la acumulación de metabolitos de desecho como el acetato, que tiene un impacto negativo en la fisiología microbiana. El acetato es producido por *E. coli* bajo condiciones aerobias debido al sobreflujo metabólico, definido como un desbalance de la vía glicolítica y la vía de los ácidos tricarbónicos (Eiteman y Altman, 2006). Una estrategia típica para evitar el sobreflujo metabólico y obtener altas densidades celulares es la operación del cultivo en modo lote alimentado, el cual consiste en una fase lote de corta duración seguida de una fase de alimentación de sustrato a una tasa tal que se evite el sobreflujo metabólico. La alimentación del sustrato puede manejarse

con un perfil constante o con incremento lineal. También puede operarse una tasa de alimentación con incremento exponencial, lo que permite además controlar la velocidad específica de crecimiento de las células y con ello mantener condiciones fisiológicas relativamente definidas (Pablos *et al.*, 2011).

El cultivo por lote alimentado es el modo de operación más usado en la industria. Posee la ventaja de que se evita el sobreflujo metabólico y debido a que la velocidad específica de crecimiento es reducida, la velocidad de consumo de oxígeno se disminuye también, lo que es relevante ya que la velocidad de transferencia de oxígeno de los bioreactores suele ser limitante para la obtención de altas densidades celulares de cultivos aerobios (Knabben *et al.*, 2010; Lara, 2011). Sin embargo, los cultivos por lote alimentado tienen una serie de desventajas: requieren de sistemas de control sofisticados e información fisiológica de la cepa que no siempre están disponibles en etapas tempranas de desarrollo del producto, la operación de cultivos alimentados a escala industrial usualmente resulta en gradientes espaciales de sustrato y oxígeno disuelto debido al mezclado ineficiente a escala industrial (De Anda *et al.*, 2006; Lara, 2011), además de que resultan considerablemente más largos, comparados a cultivos por lote (Lara *et al.*, 2009).

Por otro lado, se realizaron modificaciones genéticas en una cepa de *E. coli* con un sistema alterno de transporte de glucosa (VH33), con la finalidad de

incrementar la producción de ADNp. De las diferentes alternativas estudiadas, la inactivación combinada de los genes *recA*, *nupG* y *deoR* incrementaron a más del doble (4.22 mg/g) el contenido específico de ADNp en la cepa triple mutante, comparada con VH33 (Borja *et al.*, 2012). La cepa triple mutante VH33 $\Delta(nupG\ deoR\ recA)$ retuvo además la ventaja de poseer un muy bajo sobreflujo metabólico. Ello permitió cultivarla exitosamente en modo lote empleando 100 g/L de glucosa, con lo que fue posible obtener más de 180 mg/L de ADNp, más del doble de lo producido por una cepa comercial bajo las mismas condiciones (Borja *et al.*, 2012). Esto resulta una aportación particularmente valiosa para acelerar el desarrollo de productos basados en ADNp desde etapas tempranas, en los que la aplicación de métodos sofisticados de cultivo como el lote alimentado no siempre están disponibles.

INCREMENTO DEL CONTENIDO ESPECIFICO DE ADNp POR CAMBIO DE TEMPERATURA

La tasa de calentamiento es un parámetro importante en los bioprocesos inducidos térmicamente (Caspeta *et al.*, 2009), ya que al evaluar la inducción por temperatura en la producción de proteína recombinante en cultivos de *E. coli* BL21 con incremento de temperatura de 30 a 42 °C a tasas de calentamiento de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, típicas de fermentadores de 0.1, 5, 20 y 100 m³, respectivamente, han

probado su efectividad como herramienta de bioproceso.

Los vectores de ADNp son derivados del plásmido pUC, estos últimos difieren de los plásmidos pBR322 en la secuencia de RNAI. La secuencia consiste en una mutación puntual de A/G, teniendo como resultado la diferencia de la estructura secundaria de RNAII, esta mutación permite incrementar el número de copias del plásmido de 20 a 50 en cultivos de *E. coli* a 37 °C (Lin-Chao *et al.*, 1992). Con esta construcción se ha demostrado que el número de copias de plásmido incrementa un orden de magnitud al hacer cultivos a 42 °C (Miki *et al.*, 1987).

Estudios realizados en cultivos de alta densidad operados en lote alimentado, con un cambio de temperatura de 35 a 42 °C, con tasas de calentamiento de 0, 0.025, 0.05, 0.10 y 0.25 °C/min, que pueden tener lugar durante el calentamiento en reactores de gran escala. Estudios realizados por Jaén y col. (2013) con tasas de calentamiento entre 0 y 0.10 °C/min permitieron incrementar el rendimiento específico y la productividad de ADNp hasta 79 y 250%, respectivamente, siendo la mejor condición de calentamiento 0.05 °C/min, en la que el rendimiento específico de ADNp fue de 9.29 ± 0.59 mg/g, la productividad de 0.56 ± 0.06 mg/g-h y el contenido de plásmido superenrollado de $80 \pm 5\%$.

PURIFICACIÓN

El material de partida después de la cosecha y la lisis alcalina de la fermentación

bacteriana es una mezcla compleja donde el ADN plasmídico puede constituir hasta el 5% del contenido nucleico total de la célula (Birnboim y Doly, 1979). El ADNp producido en *E. coli* presenta tres isoformas diferentes, tales como la lineal, la circular abierta (OC) y la superenrollada (SC). En la forma superenrollada (SC) ambas hebras están cerradas y el plásmido exhibe una estructura compacta. Si una cadena se rompe, el enrollamiento es perdido y el plásmido se presenta en forma circular, abierta y relajada. La isoforma lineal son aquellas cadenas que se rompen al mismo tiempo y en la misma posición. Otras isoformas, aunque menos comunes son los oligómeros (Horn *et al.*, 1995). En general se supone que la eficacia de la expresión de genes es dependiente principalmente de la isoforma de plásmido superenrollado. Esta última es de gran interés ya que la FDA recomienda que para las vacunas de ADNp debe de contener más del 80 % de la isoforma superenrollada (SC) (Tabla 1). Por esta razón, otras isoformas deben mantenerse al mínimo (Przybycien *et al.*, 2004). Por lo tanto, los procesos de purificación de ADN plasmídico deben ser diseñados con el fin de evitar otras isoformas. El principal contaminante durante la purificación de plásmido ADN es ARN, pero la calidad del producto final también depende de ADN genómico, endotoxinas y proteínas del hospedero (Tabla 1). El análisis incluye comúnmente la medición de niveles de trazas de estos contaminantes, que establece altas exigencias en los métodos de

análisis, cuando el tiempo y el costo es un factor importante.

Por otra parte, cualquier material para ser utilizado para aplicaciones médicas debe ser producido bajo buenas prácticas de fabricación (GMP) procedimientos compatibles (Yi *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005; Diogo *et al.*, 2005) para satisfacer los estrictos requisitos de pureza de acuerdo con los organismos regulatorios (Kutzler y Weiner, 2008; Prud'homme, 2005). Esto también puede requerir el uso de las especificaciones aprobadas, tales como los descritos en la Farmacopea Europea (Yi *et al.*, 2005). Una lista de los requisitos reglamentarios actuales para aplicaciones médicas ADNp se muestra en la Tabla 1. La herramienta principal y central para la purificación del ADNp ha sido la cromatografía, a continuación se revisaran los aspectos más importantes de purificación de ADNp.

Purificación por cromatografía de ADNp

La cromatografía es un método bien caracterizado y bien establecido para la purificación de proteínas en la industria farmacéutica y considera el método con la resolución y reproducibilidad más alta (Przybycien *et al.*, 2004). Por lo tanto, es una de las técnicas que ha sido ampliamente exploradas en sistemas de purificación de ADNp. Varias características físico-químicas (Tabla 5) de ya sea el ADNp o de sus impurezas (Tabla 1), puede ser explotado a través de interacciones selectivas con

Artículos

cromatografía sólida. Propiedades tales como el tamaño, carga, hidrofobicidad, conformación y accesibilidad de los grupos moleculares han sido estudiadas. Una extensa revisión de la matrices

cromatográficas actualmente disponibles para la separación de ADN plasmídico se le ha dado por Diogo y col. (2005). (Diogo *et al.*, 2005)

Tabla 5.- Comparación de las propiedades físico químicas de las proteínas y los plásmidos. Adaptado de Urthaler *et al.*, 2005

Característica	Proteínas	ADN plasmídico
Precusores	Amino ácidos	Ácidos nucleicos
Peso molecular	10^3 - 10^5	10^6 - 10^7
Radio de Stokes	5 nm	100-300 nm
Carga	Depende de pI/pH	negativa
Coeficiente de difusión	Media-alta	Baja
Viscosidad	Baja	Alta
Esfuerzo de corte	Baja	Alta

El tamaño de los plásmidos tiene una influencia en l

Cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de intercambio iónico (AEXC) es el método más utilizado para la captura primaria de ADNp con más de 81% de las patentes dentro de los métodos de purificación de ADN (Ghose *et al.*, 2004). AEXC explora las interacciones electrostáticas entre el plásmido cargado negativamente y la resina de fase estacionaria, grupos cargados positivamente, tales como aminos cuaternarios. La principal limitación de esta técnica es la co-purificación de polímeros iónicos de estructura similar y de carga del ADNp, tales como ADN genómico, endotoxinas y RNA (Wicks *et al.*, 1995). Por lo tanto, las etapas de purificación

adicionales son necesarias, el aumento de los costos operativos (Tabla 5). Otras desventajas de cromatografía AEX son la baja capacidad relativa para el ADNp, y su elución en grandes sales tampones. No obstante, algunas resinas de AEXC, se ha demostrado que son altamente selectivas para la isoforma superenrollada de ADNp (que tienen mayor densidad de carga) (Prazeres *et al.*, 1998). Este es uno de las principales ventajas de esta técnica. La eliminación eficaz de ARN (aunque por lo general con el pre-tratamiento del lisado con RNasa), y oligonucleótidos algunas proteínas son las otras principales ventajas de este método cromatográfico (Diogo *et al.*, 2005).

Cromatografía de exclusión por tamaño

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) explora las diferencias de tamaño hidrodinámico del plásmido y sus impurezas en lugar del proceso de adsorción con el fin de purificar la molécula objetivo. Para lograr una buena separación entre dos especies, se requiere que las dos moléculas difieran en tamaño por 2 veces, de otro modo la co-elución de las dos especies obtenidas es limitada (Li *et al.*, 2007). Con este tipo de herramienta se pueden eliminar las impurezas, tales como ARN y proteínas descritas en la Tabla 5 (Bywater *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2007). Por lo tanto, las principales desventajas de este enfoque son los co-elución de impurezas con un tamaño similar al ADNp, la limitada ampliación de la escala de producción; y los altos factores de dilución que puedan resultar desventajosos, en términos de proceso (Diogo *et al.*, 2005). Por lo tanto, se aplica SEC más a menudo en las etapas posteriores del proceso de purificación de ADNp para la etapa de formulación.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se ha utilizado para purificar ADNp (Diogo *et al.*, 2005; Diogo *et al.*, 1999; Trindade *et al.*, 2005) HIC hace uso de la naturaleza más hidrofóbica de los ácidos individuales, impurezas nucleicas de cadena (ARN, desnaturizado ADNc y ADNp desnaturizado) y endotoxinas para retardar

el flujo de estas impurezas a través de una columna de cromatografía con un soporte hidrófobo (por ejemplo, fenilo, octilo), por consiguiente, que el ADN superenrollado se eluye en el flujo a través de la columna (Ghose *et al.*, 2004). Además, HIC necesita una alta concentración de sales para promover la unión, por lo que puede ser más convenientemente empleado después de la cromatografía de intercambio iónico, o cuando el plásmido tiene un alto contenido de sales. A pesar de las capacidades de unión del plásmido a resinas de HIC, el rendimiento obtenido es de hasta un 95% (Diogo *et al.*, 2000). La principal limitación de la técnica es que requiere altas concentraciones de sal (por ejemplo, 1.5 a 2.5 M sulfato de amonio) y ADNp se eluye en tampón de alta concentración de sal. Además, ADNp tiene que ser pre-precipitado a partir del lisado utilizando isopropanol (con limitando la utilización a gran escala), seguido por su solubilización en alta concentración de sal antes de cargarlos en la columna, aumentando el tiempo de operación y los costos (Diogo *et al.*, 2005). Varias patentes han sido emitidas con HIC para la purificación de ADNp (Sousa *et al.*, 2008).

La cromatografía de afinidad

Por último, la captura por afinidad de ADN plasmídico funciona con base a su función biológica o estructura química. Este tipo de herramienta cromatográfica ha sido desarrollado recientemente y está ganando más interés en el mundo académico. Sin

embargo, todavía no existe una literatura ampliamente disponible. En la actualidad se han desarrollado fundamentalmente dos enfoques relevantes para la recuperación de alta afinidad de ADNp: 1) Triple hélice, ADN vinculante a proteínas y las interacciones de aminoácidos (Sousa *et al.*, 2008). La afinidad de triple hélice (THAC) se basa en la interacción específica de secuencia de un oligonucleótido pirimidina con ADNp (Wils *et al.*, 1997; Schluep y Cooney, 1998; Prazeres *et al.*, 1998). La unión se produce a través de la surco mayor del ADN y a través de la formación de enlaces de hidrógeno de Hoogsteen. La cinética de unión es generalmente lenta (puede ser necesario > 1h) y requiere un pH ácido con el fin de que el complejo de unión sea estable. A pesar de que esta técnica puede diferenciar el ADNp por su secuencia en un solo paso, los rendimientos de recuperación son bajos (mejor rendimiento ~ 50% (Wils *et al.*, 1997). Sin embargo, se logró un avance significativo en la eliminación de la ADNg, ARN (Tabla 1). La primera demostración de la utilización de proteínas de unión a ADN como ligandos de afinidad en una purificación cromatográfica ADNp fue realizado por Woodgate *et al.*, (2008). Finalmente, la cromatografía de afinidad de amino-ácido de ADN ha sido explorado por el uso histidina (Sousa *et al.*, 2006) o arginina (Sousa *et al.*, 2009) ligandos de aminoácidos (Woodgate *et al.*, 2002). Normalmente se conoce como pseudo ligandos de afinidad, estos dos aminoácidos se han inmovilizado en un soporte de

cromatografía y se puede diferenciar entre las isoformas superenrollada (SC) y abierto (SO) ADNp circular se forma en un paso de operación. La eliminación de ADNg y endotoxinas se realizaron dentro de los niveles aceptables y no se encontraron restos de proteínas además no se detectó ARN en la muestra de elución. Sin embargo, estos ligandos han demostrado que tienen rendimientos relativamente bajos y la interacción entre el ADNp y el aminoácido es depende de la composición de la base, lo que puede poner en peligro el futuro de purificación proceso con diferentes plásmidos (Sousa *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Esta revisión describe una amplia gama de soluciones tanto en cepas de *E. coli*, vectores empleados y las operaciones de separación enfrentan la producción de plásmido de ADNp para la terapia génica y vacunas de ADN. Debido a que estas tecnologías evolucionan rápidamente, es probable que continúe un impacto positivo en la forma de producir el ADNp. Sin embargo, existen otro tipo de opciones interesantes para la ingeniería de cepas y vectores que aún no se han abordado. Por ejemplo, una estrategia potencial para el aumento de rendimiento de ADNp es posible que al incrementar el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato sea benéfico para aumentar el contenido específico de ADNp. Esto podría lograrse mediante la

sobreexpresión del gene que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*).

Otro factor importante en la producción de ADNp es el número de copias del plásmido se modula utilizando factores externos tales como la temperatura (Carnes *et al.* 2006). En un reciente estudio, Goncalves *et al.*, (2012) señalaron que los resultados publicados por Caspeta *et al.*, (2009) son aplicables a la producción de ADNp con termo inducción, sin embargo es necesario profundizar en este campo de estudio. Lo que sugiere que la termoinducción del ADNp puede ser una herramienta de proceso bastante atractiva, en términos de rendimientos.

En general, los esfuerzos de ingeniería celular y los vectores descritos en esta revisión demuestran la mejora de los procesos que pueden resultar de la evaluación de las tecnologías existentes y la consideración de las preocupaciones del proceso durante la fase de investigación básica de desarrollo de productos. Si bien gran parte de la infraestructura es similar tanto para la proteína recombinante y la producción ADNp, hay muchos temas que son específicos de un producto final de ADN plásmido, y estos temas se han abordado en muchos aspectos originales e innovadores. A medida que nuevas cepas, ingeniería y vectores siguen caracterizándose y ganando una mayor aceptación, la aplicación de estas tecnologías tiene un gran potencial para dar lugar a procesos más productivos en la producción de vacunas de ADNp.

REFERENCIAS

- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J & Leong JA (1996) Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5(2): 114-122.
- Bahloul C, Jacob Y, Tordo N & Perrin P (1998) DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssa viruses. *Vaccine* 16(4): 417-425.
- Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, Wulderk M, Jeffers Y, Sadelain M, Hohenhaus AE, Segal N, Gregor P, Engelhorn M, Riviere I, Houghton AN & Wolchokm JD (2003) Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin. Cancer Res.* 9(4): 1284-1290.
- Borja GM, Meza-Mora E, Barron B, Gosset G, Ramirez OT & Lara AR (2012) Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb. Cell Fact.* 11: 132.
- Bywater M, Bywater R & Hellman L (1983) A novel chromatographic procedure for purification of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 132(1): 219-224.
- Carnes AE, Hodgson CP, Luke JM, Vincent JM & Williams JA (2009) Plasmid DNA production combining antibiotic-free

- selection, inducible high yield fermentation, and novel autolytic purification. *Biotechnol. Bioeng.* 104(3): 505-515.
- Carnes AE, Hodgson CP & Williams JA (2006) Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 45(Pt 3): 155-166.
- Carnes AE, Williams JA & Hodgson CP (2009) Improved *E. coli* plasmid DNA production. *World Patent Application* WO2009025690.
- Caspeta L, Flores N, Perez NO, Bolivar F & Ramirez OT (2009) The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol. Bioeng.* 102(2).
- Cooke JR., McKie EA, Ward JM & Keshavarz-Moore E (2004) Impact of intrinsic DNA structure on processing of plasmids for gene therapy and DNA vaccines *J. Biotechnol.* 114(3): 239-254.
- Corbeil S, Lapatra SE, Anderson ED, Jones J, Vincent B, Hsu YL & Kurath G (1999) Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 39(1): 29-36.
- Cranenburgh RM, Hanak JA, Williams SG & Sherratt DJ (2001) *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic. Acids. Res.* 29(5): E26.
- Chattergoon MA, Kim JJ, Yang JS, Robinson TM, Lee DJ, Dentchev T, Wilson DM, Ayyavoo V & Weiner DB (2000) Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat. Biotechnol.* 18(9): 974-979.
- Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, Bowen R & Bunning ML (2001) West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* 75(9): 4040-4047.
- De Anda R, Lara AR, Hernandez V, Hernandez-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F & Ramirez OT (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8(3): 281-290.
- Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA & Ulmer JB (1997) Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 15(1): 71-78.
- Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA, Martins SA, Ferreira GN & Prazeres DM (2000)

Artículos

- Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol. Bioeng.* 68(5): 576-583.
- Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA & Prazeres DM (1999) Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography. *Anal. Biochem.* 275(1): 122-124.
- Diogo MM, Queiroz JA & Prazeres DM (2005) Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A* 1069(1): 3-22.
- Donnelly J, Berry K & Ulmer JB (2003) Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33(5-6): 457-467.
- Donnelly JJ, Ulmer JB & Liu MA (1994) Immunization with DNA. *J. Immunol. Methods* 176(2): 145-152.
- Donnelly JJ, Ulmer JB & Liu MA (1997) DNA vaccines. *Life. Sci.* 60(3): 163-172.
- Durfee. T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csorgo B, Posfai G, Weinstock GM & Blattner FR (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* 190(7): 2597-2606.
- FDA (2007) Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. *US Food and Drug Administration.*
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA & Bolivar F (2002) Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ^{13}C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* 4(2): 124-137.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC & Robinson HL (1993) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90(24): 11478-11482.
- Ghose S, Forde GM & Slater NK (2004) Affinity adsorption of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.* 20(3): 841-850.
- Holmes ML, Pfeifer F & Dyall-Smith ML (1995) Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene* 153(1): 117-121.
- Horn NA, Meek JA, Budahazi G & Marquet M (1995) Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum. Gene. Ther.* 6(5): 565-573.
- Huber H, Pacher C, Necina R, Kollmann F & Reinisch C (2005) Method for producing plasmid DNA on a manufacturing scale by fermentation of the *Escherichia coli* K-12 strain JM108. In *World Patent Application*. Vol. WO2005098002.
- Khan AS, Bodles-Brakhop AM, Fiorotto ML & Draghia-Akli R (2010) Effects of maternal plasmid GHRH treatment on offspring growth. *Vaccine* 28(8): 1905-1910.
- Kilpatrick AM, Dupuis AP, Chang GJ & Kramer LD (2010) DNA vaccination of American robins (*Turdus migratorius*)

Artículos

- against West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10(4): 377-380.
- Kim TW, Hung CF, Zheng M, Boyd DA, He L, Pai SI & Wu TC (2004) A DNA vaccine co-expressing antigen and an anti-apoptotic molecule further enhances the antigen-specific CD8⁺ T-cell immune response. *J. Biomed. Sci.* 11(4): 493-499.
- Knabben I, Regestein L, Marquering F, Steinbusch S, Lara AR & Buchs J (2010) High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J. Biotechnol.* 150(1): 73-79.
- Kutzler MA & Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 9(10): 776-788.
- Lahijani R, Hulley G, Soriano G, Horn NA & Marquet M (1996) High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum. Gene Ther.* 7(16): 1971-1980.
- Lara AR (2011) Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 10(2): 209-223.
- Lara AR, Ramirez OT & Wunderlich M (2012) Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Methods. Mol. Biol.* 824: 271-303.
- Lara AR, Taymaz-Nikerel H, Mashego MR, van Gulik, WM, Heijnen JJ, Ramirez OT & van Winden WA (2009) Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 104(6): 1153-1161.
- Lee SW, Cho JH, Lee KJ & Sung YC (1998) Hepatitis C virus envelope DNA-based immunization elicits humoral and cellular immune responses. *Mol. Cells.* 8(4): 444-451.
- Li LZ, Liu Y, Sun MS & Shao YM (2007) Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* 1139(2): 228-235.
- Liao JC, Gregor P, Wolchok JD, Orlandi F, Craft D, Leung C, Houghton AN & Bergman PJ (2006) Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer. Immun.* 6: 8.
- Lin-Chao S, Chen WT & Wong TT (1992) High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol. Microbiol.* 6(22): 3385-3393.
- Lipps G (2008) Plasmids: Current Research and Future Trends. *Caister Academic Press.*
- Listner K, Bentley L, Okonkowski J, Kistler C, Wnek R, Caparoni A, Junker B, Robinson D, Salmon P & Chartrain M (2006) Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnol. Prog.* 22(5): 1335-1345.
- Liu MA (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 239(1): 62-84.

Artículos

- Liu MA, McClements W, Ulmer JB, Shiver J & Donnelly J (1997) Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15(8): 909-912.
- Lorenzen N, Olesen NJ & Jorgensen PE (1990) Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 3): 561-567.
- Miki T, Yasukochi T, Nagatani H, Furuno M, Orita T, Yamada H, Imoto T & Horiuchi T, (1987) Construction of a plasmid vector for the regulatable high-level expression of eucaryotic genes in *Escherichia coli* an application to overproduction of chicken lysozyme. *Prot. Eng.* 1(4): 327-332.
- O'Kennedy RD, Baldwin C & Keshavarz-Moore E (2000) Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J. Biotechnol.* 76(2-3): 175-183.
- Okonkowski J, Kizer-Bentley L, Listner K, Robinson D & Chartrain M (2005) Development of a robust, versatile, and scalable inoculum train for the production of a DNA vaccine. *Biotechnol. Prog.* 21(4): 1038-1047.
- Ouyang L, Yi X, Zeng X, Zhou J, Wang Q & McReynolds L (2003) Partial protection induced by phage library-selected peptides mimicking epitopes of *Schistosoma japonicum*. *Chin. Med. J. (Engl)* 116(1): 138-141.
- Pablos TE, Soto R, Meza E, Le Borgne S, Gosset G, Ramírez OT & Lara AR (2012) Enhanced production plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *J. Biotechnol.* 158: 211-214.
- Phue JN, Lee SJ, Trinh L & Shiloach J (2008) Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). *Biotechnol. Bioeng.* 101(4): 831-836.
- Phue JN, Noronha SB, Hattacharyya R, Wolfe AJ & Shiloach J (2005) Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnol. Bioeng.* 90(7): 805-820.
- Prazeres DM, Ferreira GN, Monteiro GA, Cooney CL & Cabral JM (1999) Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends. Biotechnol.* 17(4): 169-174.
- Prazeres DM, Schlupe T & Cooney C (1998) Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 806(1): 31-45.
- Prud'homme GJ (2005) DNA vaccination against tumors. *J. Gene. Med.* 7(1): 3-17.
- Przybycien TM, Pujar NS & Steele LM (2004) Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(5): 469-478.
- Rozkov A, Avignone-Rossa CA, Ertl PF, Jones P, O'Kennedy RD, Smith JJ, Dale

- JW & Bushell ME (2004) Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol. Bioeng.* 88(7): 909-915.
- Schluep T & Cooney CL (1998) Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucleic. Acids. Res.* 26(19): 4524-4528.
- Shabaan AM, Mohamed MM, Abdallah MS, Ibrahim HM & Karim AM (2003) Cloning and characterization of a *Schistosoma mansoni* 1H and 30S clones as two tegumental vaccine candidate antigens. *Acta. Biochim. Pol.* 50(1): 269-278.
- Singer A, Eiteman MA & Altman E (2009) DNA plasmid production in different host strains of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(4): 521-530.
- Soto R, Caspeta L, Barrón BL, Gosset G, Ramírez OT & Lara AR (2011) High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA vaccine production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem. Eng. J.* 56(3): 165-171.
- Soubrier F, Laborderie B & Cameron B (2005) Improvement of pCOR plasmid copy number for pharmaceutical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66(6): 683-688.
- Sousa F, Freitas S, Azzoni AR, Prazeres DM & Queiroz J (2006) Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 45(Pt 3): 131-140.
- Sousa F, Prazeres DM & Queiroz JA (2008) Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol.* 26(9): 518-525.
- Sousa F, Prazeres DM & Queiroz JA (2009) Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomed. Chromatogr.* 23(2): 160-165.
- Stadler J, Lemmens R & Nyhammar T (2004) Plasmid DNA purification. *J. Gene. Med.* 6 Suppl 1: S54-66.
- Trindade IP, Diogo MM, Prazeres DM & Marcos JC (2005) Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1082(2): 176-184.
- Vandermeulen G, Marie C, Scherman D & Preat V (2011) New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol. Ther.* 19(11): 1942-1949.
- Wang Z, Le GW, Shi YH & Wegrzyn G (2001) Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochem.* 36: 1085-1093.
- WHO (2007) Annex 1: Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. *World Health Organization Technical Report Series* No 941.

Artículos

- Wicks IP, Howell ML, Hancock T, Kohsaka H, Olee T & Carson DA (1995) Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA: implications for animal models and human gene therapy. *Hum. Gene. Ther.* 6(3): 317-323.
- Wils P, Escriou V, Warnery A, Lacroix F, Lagneaux D, Ollivier M, Crouzet J, Mayaux JF & Scherman D (1997) Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene. Ther.* 4(4): 323-330.
- Williams JA, Carnes AE & Hodgson CP (2009) Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.* 27(4): 353-370.
- Woodgate J, Palfrey D, Nagel DA, Hine AV & SlaterNK (2002) Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol. Bioeng.* 79(4): 450-456.
- Yau SY, Keshavarz-Moore E & Ward J (2008) Host strain influences on supercoiled plasmid DNA production in *Escherichia coli*: Implications for efficient design of large-scale processes. *Biotechnol. Bioeng.* 101(3): 529-544.
- Yi Y, Hahm SH & Lee KH (2005) Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr. Gene. Ther.* 5(1): 25-35.
- Yokoyama M, Zhang J & Whitton JL (1995) DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 69(4): 2684-2688.