



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRODUCCIÓN DE pVAX1-NH36 EN *ESCHERICHIA*
COLI-DH5 α POR FERMENTACIÓN PERFUSIVA
CON ALIMENTACIÓN EXPONENCIAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

RODOLFO MUNGUÍA SOTO

DIRECTOR: ARMANDO TEJEDA MANSIR

Hermosillo, Sonora

Junio, 2017

Universidad de Sonora

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:

Rodolfo Munguía Soto

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

06/06/2017

Fecha

Anuarido Tajada M

(Nombre del sinodal)

Presidente

6/06/2017

Fecha

Rosa Ma. Montesinos C.

(Nombre del sinodal)

Secretario

06/06/2017

Fecha

Patricia Cabero S.

(Nombre del sinodal)

Vocal

Abraham Rogelio Martín García
Abraham R. Martí

06/06/2017

Fecha

Rodolfo Munguía Soto

(Nombre del sinodal)

Sinodal Externo



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

28 de junio de 2018

Por la presente se hace constar que el estudiante: **RODOLFO MUNGUIA SOTO**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería.

DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCIA
COORDINADOR
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

RESUMEN

ANTECEDENTES: La aplicación clínica de las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) está progresando y es esencial el desarrollo de bioprocesos económicos industriales para fabricar estas macromoléculas. Con el fin de contribuir a lograr este objetivo, este trabajo estudió mediante un enfoque teórico-experimental, un cultivo de perfusión alimentado exponencialmente (CPAE) para la producción de pVAX1-NH36 en *Escherichia coli* DH5 α para su aplicación como una vacuna específica.

RESULTADOS: El CPAE obtuvo un valor de productividad experimental de plásmido súperenrollado de 5,5 mg L⁻¹ h⁻¹, el cual, representa un aumento de 2,75 veces en este criterio de rendimiento. Se construyó un modelo matemático que estudia el desempeño del sistema. Un aspecto novedoso del estudio es el análisis de la influencia de parámetros del modelo sobre variables de salida seleccionadas y una proyección de escalamiento.

CONCLUSIONES: Este trabajo contribuye al diseño y optimización de CPAE para la producción eficiente de ADNp para uso terapéutico. La mayor productividad del bioproceso CPAE podría reducir tanto la inversión de capital como los costos operativos, y como resultado, ser atractivo económicamente en comparación con bioprocesos convencionales.

ABSTRACT

BACKGROUND: The clinical application of plasmid DNA (pDNA) vaccines is progressing and it is essential to develop industrial economic bioprocesses to manufacture these macromolecules. In order to contribute to achieving this goal, this work studied an exponential-fed perfusion (EFP) culture for the production of pVAX1-NH36 hosted in *Escherichia coli* DH5 α for application as specific vaccine using a theoretical–experimental approach.

RESULTS: The EFP fermentation obtained an experimental supercoiled plasmid productivity of 5.5 mg L⁻¹ h⁻¹, which represent a 2.75-fold increase in this performance criterion. A mathematical model that study the system performance was built. A novel aspect of the study is the analysis of the influence of individual model parameters on selected output variables and on scale-up.

CONCLUSIONS: This work contributes to the design and optimization of EFP cultures for the efficient production of pDNA for therapeutic use. The higher productivity of the EFP bioprocess might reduce both capital investment and operational costs and, as a result, be economically attractive compared with conventional bioprocess.

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
CAPÍTULO 1	13
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	13
1.1 Antecedentes	13
1.2 Planteamiento del Problema	14
1.3 Pregunta de Investigación.....	15
1.4 Objetivo General.....	15
1.5 Objetivos Específicos	15
1.6 Hipótesis	16
1.7 Justificación.....	16
CAPÍTULO 2	18
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Vacunas de ADNp	18
2.1.1. Administración de vacunas de ADNp	19
2.1.2. Dosis de vacunas de ADNp.....	19
2.1.3. Leishmaniasis y NH36	20
2.2 Plásmidos de ADN	20
2.2.1. Origen de replicación pUC.....	21
2.2.2. Producción de plásmidos.....	21
2.3 Cepa Hospedera	22
2.3.1. Escherichia coli.....	22
Carga metabólica	23
Sobreflujo metabólico.....	23
Energía de Mantenimiento.....	24

2.4 Condiciones de Crecimiento	25
2.4.1. Medio de cultivo.....	25
Fuente de carbono.....	25
Fuente de nitrógeno.....	26
Sales y minerales.....	26
2.4.2. Velocidad específica de crecimiento.....	27
2.4.3. Temperatura, oxígeno disuelto y pH.....	28
2.5 Estrategias de Crecimiento	28
2.5.1. Preparación de inóculo.....	29
2.5.2. Fermentación por lote.....	29
2.5.3. Fermentación por lote-alimentado.....	31
2.6 Operaciones Posteriores	33
CAPÍTULO 3	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Cepa Hospedera y Plásmido	34
3.2 Medio de Cultivo	34
3.3 Condiciones de Cultivo	35
3.3.1. Preparación de inóculo.....	35
3.3.2. Condiciones de operación del bioreactor.....	35
3.3.3. Perfusión alimentada exponencialmente.....	36
3.3.4. Cálculo de flujo de alimentación.....	37
3.4 Métodos Analíticos	39
3.4.1. Determinación de biomasa.....	39
3.4.2. Determinación de glicerol.....	39
3.4.3. Contenido de plásmido.....	39
3.4.4. Pureza y calidad del plásmido.....	40
3.5 Modelo Matemático de la Fermentación Perfusiva	41
3.5.1. Crecimiento celular.....	41
3.5.2. Consumo de sustrato.....	42
3.5.3. Formación de plásmido.....	42
CAPÍTULO 4	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 Perfusión Alimentada de Modo Exponencial	44

4.1.1. Crecimiento celular y consumo de sustrato.....	44
4.1.2. Rendimiento de plásmido	50
4.1.3. Comparación de productividad en fermentaciones a nivel laboratorio	52
4.1.4. Pureza y calidad de plásmido.....	53
4.2 Análisis del comportamiento del sistema	57
4.2.1. Parámetros del modelo utilizados en las simulaciones.....	57
4.2.2. Efecto de S_0 en la cinética del cultivo y en parámetros del sistema	58
4.2.3. Análisis teórico de la fermentación.....	61
Caso base	61
Efecto de la concentración inicial de sustrato en la alimentación.....	63
Efecto de la cantidad de inóculo	63
Proyección de escalamiento	64
Proyección a una velocidad específica de producción de plásmido mayor	64
CAPÍTULO 5.....	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
5.1 Conclusiones.....	66
5.2 Recomendaciones.....	67
CAPÍTULO 6.....	68
BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del sistema experimental de perfusión alimentada en modo exponencial.	36
Figura 2. Alrededores del sistema experimental de fermentación perfusiva donde se aplico el balance de masa de glicerol.....	37
Figura 3. Alrededores del sistema experimental de fermentación perfusiva donde se aplicaron los balances de masa de células.....	41
Figura 4. Cinética de biomasa y glicerol de la fermentación perfusiva A.	44
Figura 5. Cinética de biomasa y glicerol de la fermentación perfusiva B.	46
Figura 6. Cinética de biomasa y glicerol de la fermentación perfusiva C.	48
Figura 7. Cinética de plásmido en las perfusiones A, B y C.....	50
Figura 8. Imagen de electroforesis en gel agarosa de plásmido purificado del cultivo perfusivo A.	55
Figura 9. Imagen de electroforesis en gel agarosa de plásmido purificado del cultivo perfusivo C.	56
Figura 10. Efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la cinética del cultivo y parametros del sistema.....	60
Figura 11. Efecto de parametros del cultivo sobre el comportamiento del sistema. Caso base, aumento de S_F , aumento de X_0 y escalamiento.	62
Figura 12. Efecto de parametros del cultivo sobre el comportamiento del sistema. Aumento de r_P	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de datos sobre rendimiento de plásmido en fermentaciones A, B y C.....	51
Tabla 2. Comparación de productividad de plásmido en <i>E. coli DH5α</i> con estudios similares de fermentación a escala laboratorio.	53
Tabla 3. Datos de la relación de densidad óptica 260nm/280nm de las muestras de plásmido purificado, provenientes de las fermentaciones por perfusión con alimentación exponencial....	54
Tabla 4. Datos de entrada para el modelo de perfusión con alimentación exponencial. Parámetros de operación.....	57
Tabla 5. Datos de entrada para el modelo de perfusión con alimentación exponencial. Parámetros cinéticos.....	58

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo a este trabajo y por la beca de estudio y manutención al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Se reconoce el apoyo constante de la Universidad de Sonora, que durante mis estudios facilitó cualquier necesidad académica y de investigación. También por permitirme acceso al bien equipado laboratorio de bioprocesos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

Agradezco ampliamente a mi director de tesis, el Dr. Armando Tejeda Mansir, que con mucha sabiduría y paciencia me guio en este camino para culminar los estudios de posgrado.

También doy muchas gracias a la Dra. Rosa Ma. Montesinos Cisneros por su siempre atinada opinión y ayuda en los experimentos de éste trabajo.

Gracias a la Dra. Patricia Guerrero Germán, por su apoyo y soporte en las etapas posteriores del bioproceso y al acceso al laboratorio de biotecnología del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia.

Gracias a las personas que me ayudaron en la experimentación de este trabajo. Recuerdo con aprecio la muy útil ayuda y compañía de Adriana, Alonso, Aurora, Atenas, Cindy, Damaris, Diana, Iván, Lucy, Nidya y Yazmin.

Reconozco la ayuda formativa y de investigación a: Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García, Dr. Manuel Pérez Tello, Dr. Abraham Rogelio Martín García, Dr. Jesús Fernando Hinojosa Palafox, Dr. Víctor Manuel Sánchez Corrales, Dr. José Ronaldo Herrera Urbina, Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, Dr. Martín Antonio Encinas Romero, Dra. María Teresa Certucha Barragán, Dra. Esther Carrillo Pérez y Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Antecedentes

El interés en ADN plasmídico (ADNp) como biofarmacéutico se ha incrementado en los últimos años, especialmente después de la aprobación de las primeras vacunas de ADN (Han *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009a, b). Al compararse con las vacunas convencionales, las vacunas de ADNp presentan ciertas ventajas como estabilidad alta, eficacia a largo plazo y que no son infecciosas, ya que solo utilizan los antígenos requeridos para la inmunización (Lara *et al.*, 2012).

Con el fin de proporcionar suficiente material de ADNp para su uso en pruebas clínicas y en procesos en desarrollo, surge la necesidad de diseñar mejores procesos de producción de plásmidos. Estos procesos deben cumplir con los requisitos de las buenas prácticas de manufactura para transfección a largo plazo de ADNp para su aplicación como vacuna de ADN (Silva *et al.*, 2012).

La producción biotecnológica de plásmidos se divide en dos etapas: las etapas previas y las etapas posteriores. En las primeras, el ADN plasmídico es producido mediante fermentación con células modificadas genéticamente que hospedan el plásmido con el gen de interés. En las etapas posteriores el plásmido se recupera y purifica. La cepa de *Escherichia coli* es la más utilizada para la propagación de ADN plasmídico dado que es fácil de manipular, de modificar y es clasificada como un vehículo seguro para la propagación de muchos genes para trabajos con tecnología de ADN recombinante (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

Debido a que el rendimiento volumétrico del plásmido está relacionado directamente con la formación de biomasa, las estrategias de fermentación para la producción de ADNp se enfocan al aumento de la densidad celular final del cultivo (Fuentes *et al.*, 2013).

En fermentaciones a escala laboratorio generalmente se obtienen rendimientos volumétricos de plásmido menores a 250 mg/L (Prazeres, 2011). Sin embargo, según lo revisado por Gonçalves *et al.*, 2013, han sido reportados rendimientos del orden de 1000-2600 mg/L en fermentaciones preindustriales.

Recientemente, se han propuesto varios procesos de producción de plásmido, los cuales, en su mayoría, se basan en estrategias de fermentación por lote-alimentado (Silva *et al.*, 2012). A pesar de los altos rendimientos de plásmido obtenidos en estas fermentaciones, el impacto de estas estrategias sobre otros parámetros clave del proceso no se ha abordado detalladamente (Silva *et al.*, 2012). Un parámetro importante durante las fermentaciones es la fisiología de la célula hospedera, ya que los cambios en el estado fisiológico celular pueden reflejar alteraciones en la carga metabólica de la cepa (Silva *et al.*, 2012).

Un factor relevante en las fermentaciones para producir plásmidos es la velocidad específica de crecimiento, μ , de la bacteria hospedadora, que se ha demostrado ser inversamente proporcional al contenido de plásmido por célula y por tal motivo es un objetivo a controlar durante estos procesos (Lara *et al.*, 2012).

Se ha comprobado que fermentaciones que utilizan una velocidad específica de crecimiento reducida logran altos rendimientos de plásmido. En cambio, velocidades altas se han asociado con la formación de acetato, inestabilidad del plásmido y bajos porcentajes de plásmido súper-enrollado. Una velocidad específica reducida mitiga la inestabilidad del plásmido dando tiempo para que la replicación de éste se sincronice con la división celular (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

1.2 Planteamiento del Problema

La mayoría de los procesos para producir plásmidos reportados en los últimos años, son del modo lote-alimentado y utilizan una μ menor a la velocidad específica máxima de crecimiento de la cepa bacteriana μ_m .

En la mayoría de los estudios que aplican un esquema por lote-alimentado de forma exponencial, el objetivo es mantener la tasa de crecimiento alrededor de 0.12 a 0.15 h⁻¹. Esto puede ser el resultado de la práctica común para la producción de proteína recombinante por *E. coli* (por ejemplo, en estas tasas de crecimiento, el sobreflujo metabólico se evita de manera eficiente).

Si se quiere lograr un rendimiento máximo de ADNp, la velocidad de crecimiento objetivo podría ser tan baja como 0.05 h^{-1} , que no es práctico, ya que una tasa de crecimiento tan baja conduciría a tiempos de cultivo muy largos para alcanzar densidades celulares altas, afectando así, la productividad del proceso (Wunderlich *et al.*, 2014).

Una fermentación por lote alimentado no conserva un ambiente constante del medio de cultivo durante el crecimiento de *E. coli*, y es posible que las sustancias liberadas por la misma cepa afecten la fisiología y el metabolismo celular. Una estrategia alternativa para cultivos de producción de plásmidos es un cultivo perfusivo. Éste consiste en alimentar medio de cultivo al tanque de proceso, que puede ser de manera exponencial, y así controlar la velocidad de crecimiento al igual que un modo lote-alimentado. A diferencia de un proceso por lote-alimentado, un cultivo perfusivo permite la salida de medio gastado logrando mantener un ambiente más saludable y constante dentro del bioreactor donde se lleva a cabo la fermentación, lo cual podría permitir lograr mayores densidades celulares.

1.3 Pregunta de Investigación

¿Cuál es el efecto de la estrategia de fermentación perfusiva con alimentación exponencial de *Escherichia coli*-DH5 α sobre el rendimiento, productividad y calidad del plásmido pVAX1-NH36?

1.4 Objetivo General

Evaluar la producción por fermentación en modo perfusivo con alimentación exponencial de pVAX1-NH36 hospedado en *E. coli*-DH5 α , para analizar el efecto de esta estrategia de cultivo sobre el rendimiento, calidad y productividad del proceso.

1.5 Objetivos Específicos

- a. Establecer el sistema físico experimental utilizando un bioreactor y equipo de laboratorio para conducir la fermentación perfusiva con alimentación exponencial.

- b. Establecer los parámetros de operación considerando la capacidad de los equipos utilizados para conducir el cultivo perfusivo con alimentación exponencial.
- c. Producir el plásmido pVAX1-NH36 en *E. coli*-DH5 α mediante fermentaciones perfusivas con alimentación exponencial para obtener datos experimentales de rendimiento y productividad del producto.
- d. Analizar la cinética de crecimiento, de consumo de sustrato y formación de plásmido de cada corrida para obtener parámetros cinéticos y constantes de rendimiento del sistema.
- e. Simular el proceso perfusivo acoplando los modelos cinéticos de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de plásmido en plataforma Matlab para obtener un modelo que contribuya al análisis del efecto de parámetros de operación sobre el comportamiento del sistema.

1.6 Hipótesis

La estrategia de cultivo perfusivo de *E. coli* con alimentación exponencial mantiene un ambiente de cultivo sano que permite alcanzar mayor densidad celular y calidad de plásmido que las obtenidas mediante los modos de operación convencionales.

1.7 Justificación

Las vacunas de ADN consisten en la inyección directa de ADN a través de un plásmido o un vector de expresión. Este ADN codifica una proteína antigénica de interés, que inducirá la activación del sistema inmune.

Debido a la necesidad de nuevas alternativas de vacunación y a que se requieren cada vez más dosis de plásmidos para continuar con pruebas clínicas, se requieren procesos de producción que logren rendimientos altos de ADNp de calidad terapéutica.

Recientemente, se ha demostrado en modelos experimentales que el gen NH36 genera una respuesta adecuada inmune contra la Leishmaniasis, que es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania*. Esta enfermedad produce desde lesiones cutáneas simples

hasta diseminación visceral que causa severos daños y la muerte de no ser atendida. Esta enfermedad es endémica en 88 países y afecta a 12 millones de personas en el mundo, representando un grave problema de salud pública. Actualmente no se cuenta con una vacuna para su prevención y por consiguiente es necesario investigar el desarrollo de un proceso de producción de una vacuna para la Leishmaniasis.

Este trabajo de investigación está orientado al desarrollo de un proceso de producción de pVAX1-NH36 hospedado en *E. coli* mediante un CPAE. Los resultados del trabajo permitirán obtener conocimientos acerca del efecto este modo de operación sobre el rendimiento, productividad y calidad del plásmido.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vacunas de ADNp

Las vacunas de ADNp se basan en la inmunización con un plásmido conteniendo la información genética de uno o varios genes que codifican para proteínas inmunogénicas de un determinado patógeno. El plásmido actúa como un vector permitiendo la expresión en el interior de las células que son transfectadas y logrando la inmunización. La respuesta inmune generada, humoral y celular, prepara al individuo vacunado para contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su utilización de forma profiláctica constituye una herramienta a aplicar, sobre todo en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune, como las causadas por virus (Davis *et al.*, 1995).

Las vacunas de ADNp ofrecen muchas ventajas sobre los vectores virales, especialmente baja inmunogenicidad (permitiendo múltiples tratamientos), mejor seguridad y fácil manufactura, aunque baja eficiencia de transfección (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

Las vacunas de ADNp para uso humano están bajo investigación clínica en todo el mundo, incluyendo 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).

Las vacunas de ADN requieren una considerable cantidad de plásmido, el cual, debe ser homogéneo con respecto a su forma estructural y su secuencia de ADN. Ciertas condiciones de crecimiento pueden producir formas no superenrolladas de ADNp, lo que implica que la homogeneidad y la calidad del producto plasmídico estén en función de interacciones entre el hospedero, el plásmido y el ambiente de crecimiento. Por lo tanto, la elección de un protocolo de fermentación es crítica para minimizar contaminantes que requieran ser removidos en las etapas posteriores a la fermentación (Limonta, 2009).

Las vacunas de ADN solo han sido autorizadas en el sector veterinario, incluyendo una aplicación como terapia inmune para melanoma en perros, una vacuna para la prevención de la enfermedad del rhabdovirus en los peces y una vacuna del virus del Nilo Occidental para los caballos (Grunwald y Ulbert, 2015).

2.1.1. Administración de vacunas de ADNp

En relación al modo de administración de las vacunas de ADN, se han probado diversas rutas de inoculación del plásmido, entre ellas: intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intravenosa, oral, rectal, vaginal, intraorbital, intratraqueal e intranasal (Fynan *et al.*, 1993).

La inmunización puede llevarse a cabo por inyección con aguja (parenteral) o con el uso de pistola de genes. Este último método garantiza una mayor eficiencia, puesto que el ADN penetra al interior de las células, a diferencia de la inyección donde el ADN plasmídico queda en el medio intersticial y por tanto expuesto a la acción de nucleasas. Debido a lo anterior, se requieren dosis hasta 100 veces menores cuando se inmuniza con pistola de genes (Littel-van den Hurk *et al.*, 2000). Además, se ha empleado la micro-encapsulación del ADN, lo cual estimula la respuesta inmune tanto celular como humoral (Doria-Rose y Haigwood, 2003; Jilek, 2005).

2.1.2. Dosis de vacunas de ADNp

El número, tamaño y frecuencia de las dosis tienen efecto sobre la respuesta inmune de las vacunas de ADNp. Se ha observado que, si se trata de un gen muy inmunogénico, una sola dosis puede ser suficiente (Lodmell *et al.*, 2001). En general, se requiere de más de una inmunización para conferir una respuesta lo suficientemente fuerte como para ser protectora. Además, el intervalo entre las dosis aplicadas resulta crítico, y se ha probado que un incremento de este intervalo de inmunización produce un aumento de la respuesta inmune conferida por la vacuna de ADNp (Fuller *et al.*, 1997).

Los plásmidos son menos eficaces que los vectores virales en cuanto a su habilidad para generar una respuesta inmunológica, para entrar en las células y mantener un alto nivel de expresión transgénica (Gonçalves *et al.*, 2014). Varios estudios preclínicos y clínicos indican que las dosis en miligramos de ADNp pueden ser suficientes para generar la respuesta terapéutica deseada (Alton *et al.*, 1999).

En ratones, 100 µg inyectados de la vacuna de ADNp ó 1 µg con la pistola de genes es suficiente para inducir una respuesta inmune protectora para múltiples antígenos. Los animales de mayor tamaño requieren dosis mucho mayores por encima de 300 µg y hasta el orden de los miligramos. Las dosis dependen entre otros factores del tamaño del individuo que se vacuna, de la inmunogenicidad del antígeno empleado y de la eficiencia de transfección durante la administración (Doria-Rose y Haigwood, 2003).

2.1.3. Leishmaniasis y NH36

El gen NH36 codifica para la glicoproteína nucleósido hidrolasa que es expresada por gran parte de las especies del género *Leishmania*. Recientemente, modelos experimentales han demostrado que el gen NH36 genera una respuesta adecuada inmune contra la leishmaniasis, que es una enfermedad causada por protozoarios del genero *Leishmania*. Esta enfermedad es transmitida por mosquitos hematófagos. La leishmaniasis cutánea se caracteriza por lesiones crónicas en la piel y la leishmaniasis visceral involucra la infección del hígado, bazo o médula espinal, causando severos daños y hasta la muerte de no ser atendida. Esta enfermedad es endémica en 88 países y afecta a 12 millones de personas en el mundo, representando un problema grave de salud pública (Aguilar-Be *et al.*, 2005).

2.2 Plásmidos de ADN

Los plásmidos son moléculas de ADN de doble cadena, en el interior de la cadena se encuentran las bases nitrogenadas (Adenina-Timina y Guanina-Citosina) unidas entre sí por puentes de hidrógeno, lo cual le confiere un carácter hidrofóbico (Diogo *et al.*, 2005).

Los plásmidos están presentes en archaeobacterias, bacterias y en algunas eucariotas. Su tamaño varía desde 1 a 250 kilo pares de bases (Kpb) y se replican y transcriben independientemente del cromosoma. No son indispensables para la vida celular, pero contienen genes que le confieren a la célula ciertas ventajas selectivas como la resistencia a antibióticos. El descubrimiento de que el ADNp podría mediar la transferencia de genes y la expresión *in vivo* (Wolff *et al.*, 1990) inició la aparición de una nueva clase de agentes medicinales (Prazeres, 2011).

Los plásmidos existen en varias formas topológicas: lineal (L), circular abierta (OC) y súper-enrollada (SC) por sus siglas en inglés. La isoforma SC es la más común *in vivo* y se ha asociado con mayor eficacia en la transfección celular (Prazeres, 2008). Por otro lado, la forma lineal de los plásmidos no se utiliza con fines clínicos debido al riesgo que existe de algunos eventos recombinantes como la integración de estos en el ADN genómico (Smith, 2007).

Sobre una base de peso seco celular, se puede esperar que el contenido de plásmido en las células de *E. coli* varíe entre 0.5 y 5.0% (p/p), dependiendo del tipo de plásmido, cepa, condiciones de crecimiento, y fase de crecimiento (Prazeres, 2011).

2.2.1. Origen de replicación pUC

Los plásmidos que contienen un origen de replicación pUC contienen una única mutación de base (de guanina a adenina) inmediatamente antes de la secuencia de un elemento molecular que participa en el control de la replicación del plásmido. Este elemento, llamado ARNI, se une a un segundo elemento, ARNII, para reducir la tasa de replicación del plásmido. Cuando la temperatura de cultivo se aumenta (típicamente en el rango de 40-50 °C), la mutación de G a A, impide que ARNII se plegue normalmente, previniendo la unión eficaz de ARNI con ARNII, y por consiguiente se reduce la represión de la síntesis de ADNp (Lin-Chao *et al.*, 1992).

2.2.2. Producción de plásmidos

El objetivo cuando se diseña un bioproceso para producir plásmidos, es maximizar la productividad y el rendimiento de plásmido superenrollado. La optimización del rendimiento volumétrico permite obtener fermentaciones más pequeñas y económicas; y optimizar el rendimiento específico logra aumentar la calidad del plásmido en las etapas de purificación (Carnes, 2005; Duarte *et al.*, 2007).

La FDA reconoce que las isoformas circular abierta, lineal y otras, son menos efectivas terapéuticamente que el ADN superenrollado. Esas otras formas pueden dificultar la separación del plásmido superenrollado en las etapas de purificación, y por lo tanto los procesos deben ser optimizados para producir un alto porcentaje de plásmido superenrollado (Carnes, 2005).

La producción biotecnológica de plásmidos se divide en dos etapas: las etapas previas y las 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. Las etapas previas requieren materiales de alta calidad, especialmente de origen no animal. Recientemente, la mayoría de los esfuerzos para el desarrollo de estos procesos se han enfocado a las etapas posteriores, sin embargo, la calidad del producto final es determinada en las etapas previas (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

En cuanto a la producción de ADNp, el estrés metabólico de la cepa hospedera, así como la estabilidad del plásmido han sido identificados como dos de los parámetros clave que influyen en gran medida los rendimientos de plásmido (Silva *et al.*, 2012).

La optimización del diseño del plásmido, la selección de una cepa hospedera apropiada, la preparación del inóculo, las condiciones de crecimiento y la elección de una estrategia adecuada de fermentación, puede mejorar la productividad, el rendimiento, calidad del plásmido y el costo de producción.

2.3 Cepa Hospedera

El establecimiento de un proceso de producción ADNp comienza con la selección de una cepa hospedera, capaz de responder a los desafíos de operaciones previas y posteriores asociadas con la fabricación a gran escala. El principal reto para el cultivo celular es maximizar el rendimiento volumétrico y específico mientras se asegura la integridad de la secuencia del ADNp sintetizado y el predominio de la topología superenrollada del plásmido (Prazeres, 2011; Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

La elección de una cepa hospedera adecuada parece tener un impacto en el rendimiento del proceso, pero no en la calidad final del plásmido (Gonçalves *et al.*, 2014).

2.3.1. *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* es la más utilizada para la propagación de ADNp debido a las siguientes características: es el organismo vivo más estudiado genéticamente, es fácil de manipular, de modificar y es clasificada como un vehículo seguro para la propagación de muchos genes para trabajos con tecnología de ADN recombinante (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008). La cepa *E. Coli* DH5 α presenta varias mutaciones que tienen el efecto de incrementar el rendimiento y la productividad de plásmido (Fuentes *et al.*, 2013).

Carga metabólica

Un parámetro crítico en fermentaciones recombinantes es la fisiología de la célula hospedera, ya que cambios en el estado fisiológico celular puede reflejar alteraciones en la carga metabólica (Silva, 2012). Aunque el mantenimiento y la replicación del plásmido *per se* pueden imponer una carga metabólica de células de *E. coli*, hay otros factores relacionados con el ADNp que podrían aumentar esta carga (Ow *et al.*, 2006). Estos factores comprenden el uso de un alto número de copias de plásmido, el aumento de tamaño del vector, aumento de la síntesis de las proteínas codificadas por plásmidos, tales como proteínas de resistencia a antibióticos y la presencia de elementos adicionales en la columna vertebral del plásmido (Silva *et al.*, 2012). Esta "carga metabólica" relacionada con el plásmido se sabe que causa una disminución del crecimiento celular o viabilidad, pérdida de plásmido, baja productividad y mala calidad de los productos (Ow *et al.* 2006).

Sobreflujo metabólico

Bajo condiciones aeróbicas cuando la concentración de glucosa en el medio no es limitante, *E. coli* muestra una tasa alta de consumo de sustrato y una velocidad específica de crecimiento alta. En estas condiciones, *E. coli* secreta el ácido orgánico acetato (Han *et al.*, 1992). Este es el resultado de un desequilibrio metabólico, también conocido como sobreflujo metabólico, donde la velocidad de síntesis de acetil-coenzima A (AcCoA) supera la capacidad del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA por sus siglas en inglés) para consumir completamente este metabolito. Por lo tanto, la cantidad de AcCoA no consumida por el ciclo TCA es desviada en la vía fosfoacetilasa-acetato quinasa donde se sintetiza acetato (Delgado *et al.*, 1997).

La síntesis de acetato por *E. coli* ocurre generalmente como resultado de la necesidad celular de regenerar cofactores usados en la glucólisis y reciclar coenzima A. Para iniciar el ciclo del ácido tricarboxílico, el piruvato se convierte en acetil-coenzima A. El exceso de piruvato o acetil-coenzima A es convertido a acetato. En condiciones aeróbicas la producción de acetato ocurre cuando altas concentraciones de glucosa inhiben la respiración (Efecto Crabtree). Bajo estas condiciones, alrededor del 15% de la glucosa es transformada en acetato (Wolfe, 2005). En teoría, si la ruta de la pentosa fosfato es la vía principal para el catabolismo de la glucosa, los ciclos de la glucólisis y del ácido tricarboxílico son regulados y por lo tanto la producción de acetato se minimiza (Usui *et al.*, 2012).

Estudios recientes mostraron que, al acumularse gran cantidad de acetato, éste puede cruzar la membrana celular en forma protonada incluso a pH neutro. Este fenómeno puede disminuir el pH dentro de las células lo que resulta tóxico e inhibe la formación de biomasa (Luli y Strohl, 1990).

Gonçalves *et al.*, 2004; reportaron que la formación de acetato se incrementó con un aumento en la temperatura del proceso y que concuerda con alteraciones en genes de expresión y a la baja regulación del ciclo del ácido tricarboxílico a 42°C según Hasan and Shimizu, 2008.

La producción de acetato es un problema, ya que ésta, constituye la pérdida de la molécula precursora AcCoA. Además, el acetato es un ácido orgánico tóxico, cuya acumulación en medios de cultivo reduce la productividad (Shiloach *et al.*, 1996). Las soluciones a este problema involucran estrategias de alimentación de glucosa que mantengan una baja concentración de este azúcar en el medio de cultivo y también la generación de cepas mutantes con alteración en su capacidad de biosíntesis de acetato (Konstantinov *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1999).

Reducir la formación de acetato y mejorar la producción de nucleótidos son algunas de las estrategias que se utilizan para aumentar el rendimiento de ADNp. La eliminación de genes seleccionados, tales como *pykF*, *PykA*, *ackA-pta*, y *poxB*, han sido exploradas para reducir la formación de ácido acético en cepas de producción de plásmidos (Carnes *et al.*, 2011; Cunningham *et al.*, 2009a, b; Pablos *et al.*, 2011).

Fuentes *et al.*, 2013, señalan que no solo es importante una baja producción de acetato para el rendimiento celular, sino también un estado de energía celular adecuado y que el control de la replicación del plásmido es un proceso complejo influenciado por el estado fisiológico celular.

Energía de Mantenimiento.

Además de la energía utilizada para el crecimiento celular, los microorganismos necesitan energía adicional para mantener el gradiente de protones, la presión osmótica intracelular y el transporte de moléculas (Pirt *et al.*, 1982).

2.4 Condiciones de Crecimiento

Se ha demostrado que la estrategia de fermentación, las condiciones de operación, la composición del medio de cultivo y la fuente de carbono afecta el metabolismo de *E. coli* y por lo tanto estos aspectos se deben considerar en los procesos de producción de plásmidos (Gonçalves *et al.*, 2013).

2.4.1. Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo tiene un fuerte impacto sobre la calidad y el rendimiento, y por consiguiente el costo total de producción (Peterson y Brune, 2008). Los procesos de fermentación requieren de un medio balanceado que proporcione la cantidad adecuada de nutrientes para la energía, biomasa y mantenimiento celular. A la fecha, la mayoría de los esfuerzos en optimizar el medio de crecimiento se han enfocado a la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, los medios para la producción de plásmidos deberían mantener suficientes nucleótidos en las células y proveer energía para la replicación mientras se minimizan otras actividades celulares (Wolff *et al.*, 1990).

Los siguientes factores deberían ser considerados cuando se formula un medio de cultivo para la producción de plásmidos destinados para su uso como vacunas de ADNp: Efecto de los componentes sobre el rendimiento y calidad del plásmido, concentración celular, consistencia lote a lote e interferencias con las etapas de purificación y normas regulatorias (Carnes, 2005).

El diseño de un medio balanceado se basa en los requerimientos de energía y la composición elemental de las células. Típicamente, los requisitos nutricionales se aportan mediante un medio definido, semi-definido o complejo (Carnes y Williams, 2007). El medio de fermentación comúnmente contiene una fuente de carbono, una de nitrógeno, varias sales y elementos traza.

Fuente de carbono

La fuente de carbono provee energía, biomasa y es usualmente el nutriente limitante en los cultivos; por ende, se incluye en las más altas cantidades. Las fuentes de carbono más comunes en las fermentaciones para producción de plásmidos son glucosa y glicerol.

La glucosa es la fuente de carbono convencional, es económica y es metabolizada de modo muy eficiente por lo que brinda altos rendimientos celulares (Peterson y Brune, 2008). Sin embargo,

se sabe que altos niveles de glucosa causan producción indeseable de acetato debido al sobreflujo metabólico.

El glicerol también se utiliza como fuente de carbono en cultivos por lotes. Aunque, el coeficiente de rendimiento del glicerol ($Y_{X/Glicerol} = 0.4 \text{ g/g}$) es ligeramente más bajo que el de la glucosa ($Y_{X/Glucosa} = 0.5 \text{ g/g}$), el glicerol no provoca tanta excreción de acetato, y entonces puede ser utilizado en concentraciones más altas sin presentar inhibición. El glicerol también maneja velocidades específicas de crecimiento reducidas (Carnes, 2005).

Es bien conocido que el glicerol tiene la ventaja de reducir la formación de acetato y se está convirtiendo en una fuente de carbono atractiva y económica. Interesantemente, se ha logrado obtener altos rendimientos de plásmido con cepas de *E. coli* modificadas genéticamente y crecidas en ambas fuentes, glucosa y glicerol, mientras que para la cepa DH5 α se obtienen altos rendimientos de plásmido solo en glicerol (Gonçalves *et al.*, 2013). Por ejemplo, los estudios de Phue *et al.*, 2008, mostraron que DH5 α produce un bajo rendimiento (107 mg/L) de plásmido en glucosa comparado al crecer en glicerol (991 mg/L).

Fuente de nitrógeno

Los requerimientos de nitrógeno para la bacteria pueden ser otorgados por fuentes orgánicas o inorgánicas. Por ejemplo, sales de amonio se usan en medios mínimos. Medios semi-definidos proporcionan el nitrógeno parcial o completamente de componentes complejos como extractos de levadura, peptonas y/o casaminoácidos (Carnes, 2005).

Sales y minerales

Algunas sales y minerales son necesarios para el crecimiento de la bacteria, su metabolismo y las reacciones enzimáticas. El magnesio, fósforo, potasio y azufre son componentes típicos que se añaden al medio de cultivo. Fosfatos mono y dibásicos proveen potasio y fósforo, y también actúan como agentes buffer en ciertas proporciones. Sulfato heptahidratado de magnesio es comúnmente la fuente de magnesio y azufre. Reportes recientes han encontrado que concentraciones altas de sales de magnesio, como 80 mM de MgSO₄, dan excelentes resultados de homogeneidad de plásmido superenrollado (Danquah y Forde, 2007).

Otros minerales esenciales son el calcio, cobre, cobalto, hierro, manganeso, molibdeno y zinc. Estos se requieren en pequeñas cantidades y a menudo se añaden mediante una solución de

elementos traza, aunque estas se presenten como impurezas en la mayoría de los ingredientes (Carnes y Williams, 2007).

2.4.2. Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento μ de la cepa hospedera, es un objetivo a controlar durante los cultivos de producción de plásmidos ya que se ha demostrado que es inversamente proporcional al contenido de plásmido por célula (Lara *et al.*, 2012).

En la producción de plásmidos, los cultivos por lote alimentado obtienen valores de concentración celular de solo 40-80 de DO_{600} debido al uso de velocidades de crecimiento reducidas pero que son óptimas para la producción de plásmidos (Peterson y Brune, 2008).

El uso de una velocidad específica de crecimiento reducida es considerado como principio clave para obtener alta calidad y altos rendimientos de plásmido en las fermentaciones por lote alimentado. Velocidades altas de crecimiento se han asociado con la producción de acetato, inestabilidad del plásmido y más bajo porcentaje de superenrollamiento. Una velocidad de crecimiento reducida proporciona estabilidad ya que provee tiempo para que la replicación del plásmido se sincronice con la división celular (Carnes *et al.*, 2006).

El rendimiento relativamente alto de ADNp a bajas velocidades de dilución a menudo se atribuye a una estabilidad del plásmido superior, así como que la replicación del plásmido es favorecida sobre otras vías bioquímicas durante tasas de crecimiento reducidas (Prather *et al.*, 2003). Sin embargo, hay algunos otros reportes que muestran un aumento del contenido de ADNp cuando se aumenta la tasa de crecimiento (Seo and Bailey, 1985; Seo and Bailey, 1986; Zabriskie y Arcuri, 1986; Reinikainen y Virkajärvi, 1989).

Estudios de Fuentes *et al.*, 2013, apoyan la idea de que hay una distribución de flujo óptima para la síntesis de ADNp, y que ésta, puede ser alcanzada no necesariamente en tasas de crecimiento muy bajas. Las alteraciones celulares para el consumo de glucosa, ya sea mediante la inactivación de los importadores de este sustrato o estrategias de alimentación para limitar este nutriente, se han conocido por alterar los flujos del metabolismo central de carbono (Fuentes *et al.*, 2013). Experimentos de Silva *et al.*, 2012, mostraron que las tasas de crecimiento específicas más bajas no corresponden necesariamente a una mayor estabilidad del plásmido.

2.4.3. Temperatura, oxígeno disuelto y pH

Parámetros clave de la fermentación que tienen efecto sobre la calidad y el rendimiento del plásmido son la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH. El cultivo en un bioreactor permite controlar y monitorear estos parámetros.

La temperatura óptima de crecimiento para *E. coli* es 37°C. Sin embargo, bajas temperaturas (30°C - 37°C) pueden ser utilizadas en fermentaciones por lote para reducir la velocidad específica de crecimiento. Altas temperaturas (42°C) también pueden ser empleadas para inducir la amplificación de plásmidos con orígenes de replicación como pUC y pMM1 (Hamann *et al.*, 2000).

Algunos cultivos por lote-alimentado se combinan con la inducción térmica obteniendo una reducción de la tasa de crecimiento (Silva *et al.*, 2009), que puede lograr una velocidad mayor de replicación del plásmido. Se han reportado procesos para la producción de plásmidos, donde la producción de estos, se mantiene en niveles bajos en un inicio del proceso utilizando bajas temperaturas; esto, con fin de evitar problemas en el crecimiento celular. Y una vez que se alcanzan altas densidades celulares la producción de plásmidos es inducida por un cambio de temperatura (Hamann *et al.*, 2000). Por otro lado, la respuesta de choque térmico reduce el tiempo de operación del cultivo, debido al fuerte efecto fisiológico (Caspeta *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que el oxígeno juega un rol muy importante en la estabilidad del plásmido. Una simple caída en el porcentaje de oxígeno disuelto en el cultivo al 5 % de saturación con aire implica una pérdida rápida en la estabilidad del ADNp. Además, la formación de otras isoformas depende junto con el oxígeno de otros parámetros como la temperatura, pH, concentración del nutriente y la velocidad del crecimiento (Carnes y Williams, 2007).

El pH óptimo para el crecimiento de *E. coli* es 7 y es normalmente controlado en este valor en las fermentaciones. Sin embargo, crecimientos en medios ácidos (pH 6.2-6.8) y a 30°C han sido asociados con la producción incrementada de plásmidos ColE1 (Carnes, 2005).

2.5 Estrategias de Crecimiento

Los plásmidos son producidos mediante una fermentación de *E. coli* recombinante. Los objetivos principales de la fermentación son maximizar el rendimiento volumétrico del plásmido (kg/L), el

rendimiento específico del plásmido (kg/kg) y la productividad (kg/L-h). Un objetivo adicional, pero muy importante es obtener alta calidad de plásmido para su uso como vacuna de ADNp. Para muchos procesos de fermentación microbiana, la preparación del inóculo y el modo de fermentación pueden tener un claro impacto en el desarrollo del proceso en términos de productividad, rentabilidad y control del proceso (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

Las estrategias de fermentación utilizadas en institutos de investigación y en la pre-industria específicamente para la producción de ADNp utilizan diferentes medios de cultivo y cepas hospedadoras. Según lo resumido por Gonçalves *et al.*, 2014, diferentes reportes describen estrategias como cultivos por lote, continuos, por lote alimentado basado en un punto de referencia de oxígeno disuelto, por lote alimentado con alimentación constante y por lote alimentado con alimentación exponencial.

El efecto de la estrategia de fermentación en producción de plásmidos ha sido estudiado en varios aspectos. Mientras en el modo por lotes la velocidad de crecimiento no es controlada (crecimiento a velocidad máxima), en cultivos por lote alimentado la velocidad de crecimiento puede fijarse en un valor específico manipulando el modo de alimentación. El control de la velocidad de crecimiento durante la producción de ADNp puede resultar en altos valores de rendimiento y calidad del producto final (O’Kennedy *et al.*, 2003).

2.5.1. Preparación de inóculo

Tradicionalmente, el inóculo proviene de una fuente congelada, típicamente un vial que se expande sucesivamente y se transfiere en matraces agitados para incrementar su volumen. Existen esquemas de preparación de inóculos que incorporan una, dos o hasta tres etapas. Los análisis de estos esquemas mostraron que preparar el inóculo con una etapa, resulta una opción viable en muchas situaciones, especialmente si la concentración de células viables se mantiene por encima de 4.8×10^6 células viables/mL. Esto porque conlleva a reducir los pasos del proceso haciéndolo más factible (Okonkowski *et al.*, 2008).

2.5.2. Fermentación por lote

Un modo sencillo de fermentación, en el cual todos los nutrientes están en el cultivo desde el inicio, y en el cual no se añade ningún nutriente durante la fermentación, es llamado cultivo por lote o fermentación por lote. Estos cultivos en fermentadores controlados han incrementado el rendimiento volumétrico del plásmido.

La principal ventaja de la fermentación por lote es su simplicidad. Todos los nutrientes destinados para el crecimiento celular y a la producción de plásmidos se encuentran en el momento de la inoculación. El uso de un inóculo de 1-5% se recomienda para disminuir la fase lag del crecimiento. Durante la fase exponencial todos los nutrientes están en exceso, por lo que la velocidad específica de crecimiento será esencialmente la velocidad específica de crecimiento máxima, μ_{\max} , que puede predecirse con la cinética de Monod (Carnes, 2005). Con la demanda creciente de ADNp en pruebas clínicas (100 g o más), una fermentación en matraz con rendimientos típicos de 10-20 mg/L la hacen inviable (Peterson y Brune, 2008).

Se ha descrito que los cultivos por lotes permiten altas velocidades de crecimiento específicas y mayor acumulación de subproductos metabólicos tales como acetato, lo que podría conducir a una mayor inestabilidad del plásmido y a la reducción del crecimiento celular (Shene *et al.*, 2003).

En estudios de fermentaciones por lotes, los valores máximos de número de copias de plásmido se obtuvieron en la etapa final de la fermentación, específicamente, al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012).

Dependiendo de la cepa, el plásmido y el medio de cultivo, el rendimiento obtenido en fermentaciones por lote puede variar significativamente. Típicamente los rendimientos alcanzados mediante este modo de operación varían entre 3.5 y 50 mg/L (Wan, 1996).

Como se mencionó anteriormente, el uso de una velocidad específica de crecimiento reducida es deseable para la producción de plásmidos. En cultivos por lote la velocidad específica de crecimiento, μ , solo puede reducirse bajando la μ_{\max} . Esto se ha logrado a temperaturas bajas y usando glicerol en vez de glucosa (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

El glicerol puede usarse en mayores concentraciones que la glucosa sin provocar inhibición, alcanzando concentraciones celulares de 60-250 g/L en fermentaciones por lotes (Carnes y Williams, 2007). Respecto a la viabilidad celular en estos cultivos, el porcentaje de células sanas sufrió algunas alteraciones, pero se mantuvo aproximadamente en 90% (Silva *et al.*, 2012).

Para la producción de plásmidos en escala laboratorio, los cultivos de células hospedando plásmidos en matraces agitados es el método más sencillo, sin embargo, se alcanzan rendimientos muy bajos, comparados con una fermentación en biorreactor. En los cultivos en matraces, se presentan varios problemas como una transferencia de oxígeno pobre y la ausencia de poder controlar el pH que limitan el rendimiento del plásmido.

A pesar de ser sencillas y rápidas, las fermentaciones por lotes también presentan desventajas como inhibición por sustrato y precipitación de sales en medios con altas concentraciones de nutrientes. Además, la velocidad de crecimiento no puede ser controlada directamente, y esta cambia constantemente durante la fermentación, cesando cuando se agota un nutriente, o un subproducto metabólico como el acetato inhibe el crecimiento de las células (Huber *et al.*, 2005).

2.5.3. Fermentación por lote-alimentado

En general, en los cultivos por lote alimentado, los nutrientes son alimentados continua o semi-continuamente, mientras el efluente se remueve de manera discontinua. La fermentación por lote alimentado inicia con una fase por lote. Las células son inoculadas en un volumen inicial de medio de cultivo, conteniendo todos los nutrientes no limitantes y una concentración inicial del sustrato limitante. Una alimentación controlada del nutriente limitante da inicio una vez que las células consuman la cantidad inicial del sustrato (Tejeda-Mansir y Montesinos, 2008).

La fermentación por lote alimentado se ha utilizado para la producción de plásmidos. Estas fermentaciones alcanzan mejores rendimientos que las fermentaciones por lotes. En este modo de operación el sustrato se alimenta a una velocidad cercana a la que es consumido. La conversión de sustrato a biomasa es muy eficiente y la concentración de sustrato durante el proceso es aproximadamente cero por lo que no se alcanzan concentraciones inhibitorias por sustrato. El sobreflujo metabólico del exceso de sustrato se reduce y se evita la formación excesiva de acetato inhibitorio (Carnes y Williams, 2007).

Se han desarrollado varias estrategias de alimentación como la retroalimentación controlada, donde la entrada de nutriente se activa basándose en cambios en el porcentaje de oxígeno disuelto, pH, actividad metabólica, concentración celular o concentración de sustrato. También están las estrategias predeterminadas como son la alimentación constante y exponencial.

Una estrategia que ha resultado efectiva en fermentaciones de este tipo es la alimentación exponencial. Este método permite al cultivo crecer en una velocidad específica de crecimiento predeterminada (menor a μ_{\max}) sin la necesidad de un control por retroalimentación. Se ha descrito que, en fermentaciones por lote alimentado, se obtuvieron rendimientos de plásmido mayores cuando se utilizaron perfiles predeterminados de alimentación en comparación con los perfiles de alimentación basados en un control por retroalimentación usando parámetros tales como el pH o el oxígeno disuelto (Carnes *et al.* 2006).

En fermentaciones por lote-alimentado ocurren mayores fluctuaciones en la viabilidad celular que un cultivo por lote, debido al tiempo extendido del cultivo (Hewitt *et al.*, 1999).

Se han reportado métodos de fermentación por lote alimentado, donde, células de *E. coli* crecen a una temperatura baja durante la parte inicial de la fermentación para restringir la velocidad de crecimiento y después continuar el crecimiento a una temperatura elevada con la finalidad de acumular plásmido. El cambio de temperatura en una velocidad de crecimiento baja mejora el rendimiento y la pureza. Estos procesos empiezan a una temperatura de 30°C, donde la replicación del plásmido se mantiene en bajos niveles mientras se acumula biomasa eficientemente. Durante este periodo la μ es controlada en aproximadamente 0.12 h⁻¹ por una estrategia de alimentación exponencial. La inducción de acumulación del plásmido se logra cuando la densidad celular está en el rango de 25-60 de DO₆₀₀ y se aumenta la temperatura a 37°C o 42°C. Después se continúa con la alimentación exponencial por hasta 15 h más. Estos procesos pre-industriales han alcanzado rendimientos volumétricos en el rango de 1.5-2.1 g/L y rendimientos específicos tan altos como 43 mg/g (Carnes y Williams, 2006).

Según los resultados de Gonçalves *et al.*, 2014, para cultivos por lote alimentado, la mejor estrategia para producir plásmido con la cepa modificada GALG20 es alimentar medio con una concentración de glucosa de 175 g/L comparada con otras concentraciones de 750 g/L, 350 g/L y 250 g/L. Esta estrategia maximiza la producción de ADNp (141 mg/L) debido a que se produce una baja cantidad de acetato (7 g/L) y a que la fuente de carbono se agota totalmente al final del cultivo. Los autores comparan el rendimiento de plásmido y la producción de acetato de esta cepa con *E. coli* DH5 α . El rendimiento y la producción de acetato para *E. coli* DH5 α fueron 40 mg/L y 16 g/L respectivamente.

En algunos experimentos, la velocidad específica de crecimiento del cultivo durante la fase de alimentación resulta menor que la calculada (Gonçalves *et al.* 2014; Williams *et al.*, 2009). Gonçalves *et al.*, 2014; por ejemplo, obtuvieron 0.06 h⁻¹ en vez de 0.12 h⁻¹, y mencionan que podría deberse a que el flujo de carbono es dirigido hacia la síntesis de ADNp en lugar de solo a formación celular, especialmente después de un cambio de temperatura para amplificar la producción.

2.6 Operaciones Posteriores

Después de la fermentación, es necesario procesar la cosecha celular con operaciones posteriores. Éstas, consisten en una secuencia de operaciones unitarias diseñadas para liberar las moléculas de plásmido de ADN de la célula bacteriana y remover impurezas y contaminantes. Después de liberar el plásmido de las células, se utilizan varias operaciones unitarias para la recuperación y purificación del plásmido, buscando un mínimo de pérdidas que conlleven a un mayor rendimiento hasta obtener un nivel deseado de calidad y cumplir con especificaciones regulatorias (Prazeres *et al.*, 2007). Recientemente, estas operaciones han sido revisadas detalladamente (Ghanem *et al.*, 2013).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepa Hospedera y Plásmido

La bacteria *E. coli* DH5 α se utilizó como cepa hospedera, la cual se caracteriza principalmente por la mutación endA1 que previene la actividad de endonucleasas y por lo tanto la degradación del plásmido y la mutación recA la cual reduce la multimerización del plásmido (Bohle y Ross, 2011).

El plásmido pVAX1 de 2999 pares de bases (pb) contiene: El promotor/amplificador del Citomegalovirus humano (CMV), el cual permite un alto nivel de expresión de proteína recombinante; Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH por sus siglas en inglés), para un fin de transcripción adecuado y poliadenilación del ARN mensajero. El gen de resistencia a la kanamicina para selección del vector en *E. coli* y origen de replicación pUC para replicación de un alto número de copias y crecimiento en *E. coli* (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V26020>).

El gen NH36, candidato para vacuna de ADN contra la enfermedad Leishmaniasis, se insertó al plásmido pVAX1 para obtener el plásmido pVAX1-NH36 con un tamaño final de 4.0 kpb. *E. coli*-DH5 α transformada con la incorporación de pVAX1-NH36 se obtuvo del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) de la ciudad de México D. F., México.

3.2 Medio de Cultivo

Se utilizó un medio de cultivo definido con glicerol como nutriente limitante de acuerdo a lo reportado por Bohle y Ross, 2011. La composición del medio para la fase lote fue la siguiente: 13 g/L glicerol, 13.3 g/L KH₂PO₄, 4 g/L (NH₄)₂HPO₄, 1.7 g/L C₆H₈O₇·H₂O, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 9

mg/L clorhidrato de tiamina, 0.25 mg/L biotina, 1 g/L de solución de elementos traza (110.8 g/L de citrato de Fe (III)·H₂O, 2.5 g/L CoCl₂·6H₂O, 15 g/L MnCl₂·4H₂O, 1.5 g/L CuCl₂·2H₂O, 3 g/L H₃BO₃, 2.1 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 33.8 g/L Zn(CH₃COO)₂·2H₂O, 14.1 g/L EDTA-Na₂·2H₂O). La composición del medio de alimentación fue similar al medio para la fase lote, pero con 18 g/L glicerol.

3.3 Condiciones de Cultivo

3.3.1. Preparación de inóculo

Los cultivos siembra se prepararon agregando 7 mL de cultivo celular conservado en glicerol a 63 mL de medio de cultivo con 50 µg/mL de kanamicina. Estos se incubaron en matraz a 30°C y 260 rpm durante 8 h. Posteriormente, 7 mL de cultivo siembra se agregaron a medio fresco bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo de cultivo. Posteriormente, 60 mL de este último cultivo en matraz, se utilizó para inocular 540 mL de medio bajo las mismas condiciones de cultivo. Los 600 mL de cultivo (repartidos en tres matraces de 1 L) en fase exponencial fueron centrifugados a 4,000 rpm durante 10 minutos. El precipitado celular se resuspendió con 100 mL de sobrenadante y se utilizó para inocular las fermentaciones en el bioreactor.

3.3.2. Condiciones de operación del bioreactor

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un bioreactor tipo tanque agitado (Applikon®) equipado con el sistema ez-Control, el cual mide y controla pH, temperatura, oxígeno disuelto (OD), espuma, nivel y agitación. Durante los cultivos, el pH se controló en 6.8 ± 0.1 por la adición automática de solución de amonio al 12.5%. El punto de referencia para la temperatura se ajustó en 37 °C y se controló con un intercambiador de calor interno para enfriamiento y una chaqueta de calentamiento eléctrica sobre la pared del bioreactor.

El sensor de oxígeno disuelto se calibró a 0 % mediante burbujeo de gas nitrógeno y al 100 % saturando con flujo de aire siguiendo el procedimiento del fabricante. El cultivo fue aireado con 3.0 vvm (volumen de aire por minuto/volumen de medio) más un flujo de oxígeno puro de 0.6 mL/min. La presión de entrada de aire y oxígeno combinados, se ajustó a 15 psia. El OD se controló a 30% de saturación con aire mediante un control proporcional-integral-derivativo de

agitación. El rango de agitación utilizado durante la fermentación se estableció en 450- 900 rpm. El flujo de suplemento de oxígeno se incrementó según necesidades del sistema durante el resto del cultivo para mantener el 30% de OD reemplazando flujo de aire por O_2 . La espuma generada se controló mediante la adición automática de una solución de antiespumante 204 (Sigma-Aldrich) al 0.01%.

3.3.3. Perfusión alimentada exponencialmente

Los cultivos perfusivos se realizaron con uso del sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) KrosFlo Research Ili (Spectrum® Laboratories) equipado con el software KF COMM, que registra datos de flujo, presión de entrada, presión de retenido y presión transmembrana. El sistema FFT utilizó un módulo de membrana de fibras huecas modelo X3-500S-300-02N (Spectrum® Laboratories) como aparato de retención celular. Esta unidad de microfiltración es de polisulfona con un tamaño de 500 kDa, tiene un diámetro interno de 0.5 mm y un área superficial de 0.0145 m².

Un diagrama esquemático del sistema experimental de la fermentación perfusiva se muestra en la Figura 1. Los principales componentes del sistema son el bioreactor, el sistema de FFT KrosFlo con una bomba digital peristáltica marcada como P2, y una bomba digital peristáltica Masterflex® L/S (Cole-Parmer®) con dos cabezales etiquetados P1-A y P1-B. Estos cabezales se controlaron de modo simultáneo con el software de control WinLIN desde una computadora.

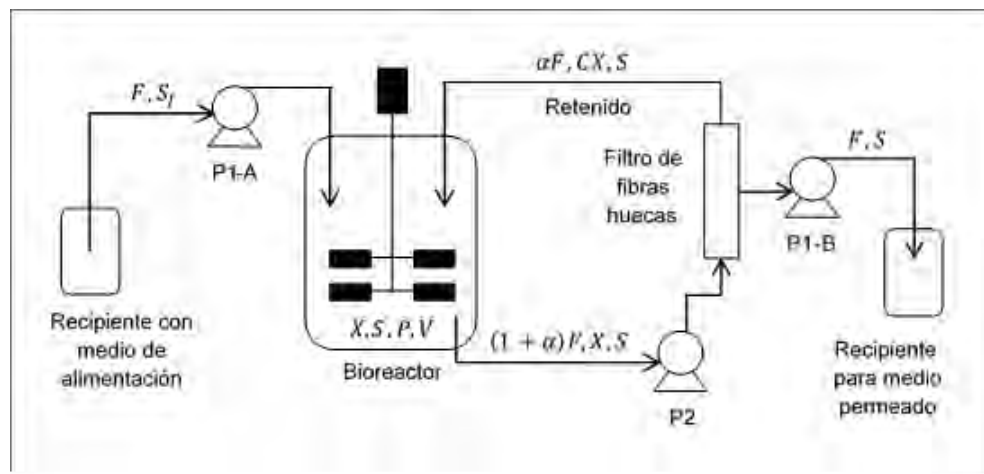


Figura 1. Diagrama del sistema experimental de perfusión alimentada en modo exponencial.

La bomba peristáltica P1-A añade medio de cultivo fresco al bioreactor. La bomba P2 lleva caldo desde el fermentador al módulo de microfiltración. Las células regresan al bioreactor a través de la línea de retenido mientras que la bomba P1-B envía el medio permeado hacia un recipiente de almacenamiento. F (L/h) es el flujo de alimentación de medio de cultivo, el cual, es igual al flujo de permeado; S_f (g/L) es la concentración de glicerol en el medio de alimentación; X (DO_{600}) y S (g/L) son la concentración de células y glicerol dentro del bioreactor, respectivamente; P (mg/L- DO_{600}) es el rendimiento específico del plásmido; V (L) es el volumen de medio en el bioreactor, α es un factor de flujo y C es un factor de concentración.

Las fermentaciones perfusivas se llevaron a cabo en modo por lote hasta antes de la fase estacionaria. Después, se inició la alimentación exponencial mediante el arranque de la bomba peristáltica P1 (Cabezal A y B), posterior al funcionamiento de la bomba P2 que manda caldo de cultivo desde el bioreactor hacia el módulo de fibras huecas a un flujo de 150 mL/min y regresa el flujo retenido hacia el bioreactor. La presión de entrada sobre el filtro se mantuvo en el rango de 5.0-12.0 psi. El flujo de permeado fue removido del módulo a la misma velocidad a la que se alimentó medio de cultivo, logrando así, mantener un volumen constante de medio en el fermentador mediante la bomba P1-B.

3.3.4. Cálculo de flujo de alimentación

Un balance de masa de glicerol en los alrededores del sistema experimental de fermentación perfusiva (marcado en línea de guiones en la Figura 2) puede ser escrito como la Ecuación (1).

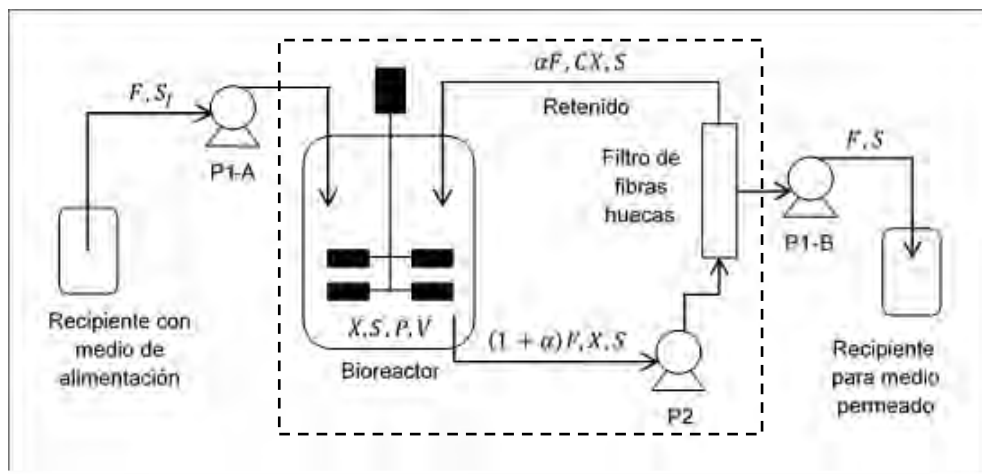


Figura 2. Alrededores del sistema experimental de fermentación perfusiva donde se aplicó el balance de masa de glicerol.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_f - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (1)$$

Donde $Y_{X/S}$ [DO₆₀₀/(g/L)] es el coeficiente de rendimiento de biomasa a partir de glicerol y μ (h⁻¹) es la velocidad específica de crecimiento.

El flujo inicial de alimentación de medio de cultivo, F_0 (L/h), a un tiempo t_b , que da inicio a la fase perfusiva, fue calculado considerando un estado cuasi-estacionario para la concentración de glicerol, es decir,

$$\frac{dS}{dt} = 0 \quad (2)$$

Bajo esta consideración (1) y (2) conducen a:

$$F_0 = \frac{\mu_P X_b V}{Y_{X/Sp}(S_f - S)} \quad (3)$$

Donde μ_P corresponde a la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹) deseada durante la fase perfusiva, X_b es la concentración de biomasa (DO₆₀₀) al final de la etapa por lote, $Y_{X/Sp}$ es el coeficiente de rendimiento de biomasa a partir de glicerol [DO₆₀₀/(g/L)] durante la fase perfusiva. Este coeficiente de rendimiento ($Y_{X/S}$) fue calculado para la fase lote como la pendiente de la función lineal obtenida de datos experimentales de concentración de biomasa (eje y) respecto a la concentración de glicerol respectiva (eje x) de una fermentación previa realizada en condiciones de crecimiento similares. Para la etapa de perfusión, se manejó un valor menor de $Y_{X/S}$ ($Y_{X/Sp} \approx 0.7$ DO₆₀₀/(g/L)) debido a experimentos previos tipo lote alimentado y reportes que mencionan que ese valor disminuye en la etapa de producción de plásmido (Gonçalves *et al.* 2014; Williams *et al.*, 2009).

El flujo de alimentación F dado por la Ecuación (4) se incrementó de manera exponencial de acuerdo a μ_P . Esta ecuación de flujo se utilizó para programar el funcionamiento de la bomba P1.

$$F = F_0 e^{\mu_P(t-t_b)} \quad (4)$$

Donde t (h) indica el tiempo transcurrido del cultivo completo.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1. Determinación de biomasa

Se tomaron muestras del cultivo en intervalos regulares de tiempo durante la fermentación. Dichas muestras se utilizaron al instante de su obtención para medir su concentración celular mediante densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2 (Perkin Elmer).

3.4.2. Determinación de glicerol

Se tomaron muestras para medir la concentración de glicerol en el medio de cultivo durante los mismos intervalos de tiempo que las muestras tomadas para medir concentración celular. Esta determinación se llevó a cabo con uso del “Reactivo para glicerol libre” de Sigma-Aldrich, USA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Ese reactivo utiliza reacciones enzimáticas acopladas que resultan en un incremento en la absorbancia a 540 nm que es directamente proporcional a la concentración de glicerol en la muestra.

3.4.3. Contenido de plásmido

Se tomaron muestras para determinar la cantidad del plásmido pVAX1-NH36 a diferentes tiempos de la fermentación con la misma masa celular (mismo índice de masa), específicamente de 4.0 DO_{600} -mL. El índice de masa se calcula mediante la Ecuación (5).

$$IM = (X)(V_M) \quad (5)$$

Donde IM (DO_{600} -mL) representa el índice de masa y V_M indica el volumen (mL) de la muestra destinada para el proceso de purificación.

Lo anterior permite el buen desempeño del kit de purificación utilizado, evitando sobrecarga en las columnas de purificación. El pellet celular obtenido al centrifugar cada muestra se procesa el Kit “Plasmid Spin Mini Prep” (Quiagen) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

En resumen, las células se lisan en medio alcalino, el lisado se clarifica, y este clarificado se pasa por una columna para obtener la solución de plásmido purificado. Este método logra una purificación de alta calidad de plásmido necesaria para la calidad de transfección y por lo tanto

los rendimientos obtenidos podrían ser menores comparados con otros métodos de preparación (Bohle y Ross, 2011).

La cuantificación de ADNp se realizó midiendo la densidad óptica a 260 nm (DO_{260}) a la solución de plásmido purificado en un espectrofotómetro marca NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Se consideró que un valor de DO_{260} igual a 1, corresponde a una concentración de plásmido (C_P) de 50 mg/L en la solución purificada medida.

El rendimiento volumétrico del plásmido (RV) en miligramos de plásmido por litro (mg/L) se calculó usando la Ecuación (6):

$$RV = \frac{(C_P)(V_P)}{V_M} \quad (6)$$

Donde V_P = Volumen de solución de plásmido purificado (mL).

El rendimiento específico del plásmido (RE) en miligramos de plásmido por litro por DO_{600} [$mg_P/(L-DO_{600})$] se calculó con la Ecuación (7).

$$RE = \frac{RV}{X} \quad (7)$$

3.4.4. Pureza y calidad del plásmido

La relación de densidad óptica 260 nm/280 nm se utilizó para determinar la pureza de la solución purificada de plásmido. Un valor entre 1.8-2.0 de esta relación corresponde a una solución de ADN de alta pureza. Un valor mayor a 1.6 corresponde a una pureza aceptable, y valores por debajo de 1.6 indican una posible contaminación por proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorban cerca de 280 nm. Por otro lado, un valor arriba de 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la solución.

Las muestras de solución de plásmido purificado se utilizaron en una electroforesis en gel agarosa para asegurar la eliminación completa de ARN y ADN cromosomal, también para analizar isoformas del plásmido y checar la calidad de pVAX1-NH36 superenrollado. Se utilizaron geles de agarosa al 1 % en una unidad de electroforesis de gel horizontal. El medio para correr los geles fue el buffer TAE (40 mmol/L Tris, 20 mmol/L ácido acético, 1.0 mmol/L EDTA, pH 8.0). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a 80 V durante 40 min en una unidad básica de

abastecimiento de energía marca PowerPac (Bio-Rad Laboratories). Los geles se tiñeron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio a 0.5 mg/mL y fueron fotografiados bajo luz ultravioleta para obtener una imagen de los resultados electroforéticos.

3.5 Modelo Matemático de la Fermentación Perfusiva

Para describir el proceso de fermentación matemáticamente, se realizaron balances de masa de células, glicerol y plásmido sobre alrededores de regiones en el sistema experimental. Las ecuaciones que describen el crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de plásmido se obtuvieron como se presenta a continuación.

3.5.1. Crecimiento celular

Un balance de masa celular alrededor del biorreactor (marcado con línea de guiones en la Figura 3) sin considerar mantenimiento o muerte se muestra en la Ecuación (8).

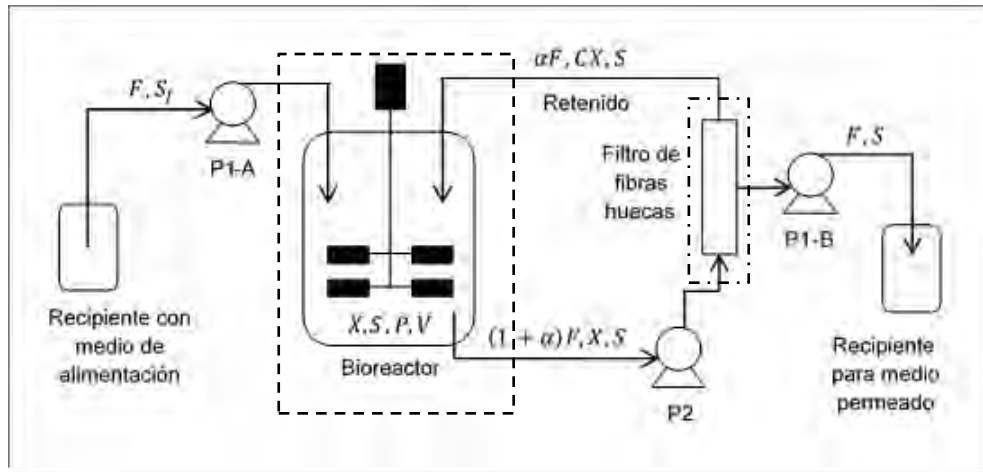


Figura 3. Alrededores del sistema experimental de fermentación perfusiva donde se aplicaron los balances de masa de células.

$$V \frac{dX}{dt} = \alpha FCX - (1 + \alpha)FX + \mu XV \quad (8)$$

Un balance de masa de células en el módulo de filtro de fibras huecas (señalado con línea de guiones y puntos en Figura 3), considerando que la masa celular que se deposita sobre la

membrana es prácticamente nula comparada con la masa en el fermentador, está dado por la Ecuación (9).

$$(1 + \alpha)FX = \alpha FCX \quad (9)$$

Combinando las Ecuaciones (8) y (9) se obtiene la Ecuación (10), la cual indica que la acumulación de células en el biorreactor solo se atribuye al crecimiento celular, similar a las fermentaciones por lote.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (10)$$

La velocidad específica de crecimiento (μ) se manejó por la conocida Ecuación (11) de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (11)$$

Donde μ_m es la velocidad específica de crecimiento máxima y K_s es la constante de saturación de *E. coli*.

3.5.2. Consumo de sustrato

El balance de masa de glicerol en los alrededores del sistema experimental de fermentación perfusiva (marcado en línea de guiones en Figura 2) está dado por la Ecuación (1) como se indicó en la sección 3.3.4 del presente trabajo.

3.5.3. Formación de plásmido

Un balance de masa de ADNp alrededor de una célula de densidad constante resulta en la Ecuación (12):

$$\frac{d(PV_C)}{dt} = \mu Y_{P/X} V_C \quad (12)$$

Donde P representa la concentración de plásmido dentro de la célula (g_P/g_C), V_C indica el volumen de la célula y $Y_{P/X}$ es el coeficiente de rendimiento plásmido a partir de biomasa. Este coeficiente de rendimiento se calculó como la pendiente de la función lineal obtenida de datos

experimentales de rendimiento volumétrico de plásmido (eje y) respecto a la concentración de biomasa que le corresponde (eje x).

Resolviendo la Ecuación (12) y considerando la Ecuación (13) que es válida si la densidad celular es constante se obtiene la Ecuación (14) que ha sido presentada también por otros autores (Carnes, 2005; Bohle y Ross, 2011):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{\rho V_C} \frac{d(\rho V_C)}{dt} = \frac{1}{V_C} \frac{dV_C}{dt} \quad (13)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu(Y_{P/X} - P) \quad (14)$$

Las ecuaciones (1), (10) y (14) junto con parámetros experimentales, de operación y de crecimiento de *E. coli* fueron resueltas en Matlab para modelar el proceso del CPAE para la producción de plásmidos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Perfusión Alimentada de Modo Exponencial

4.1.1. Crecimiento celular y consumo de sustrato

Se realizaron tres fermentaciones perfusivas con alimentación exponencial. Estos cultivos se nombraron como perfusión A, B y C. A continuación, se presentan las cinéticas de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato de estos experimentos.

La Figura 4 muestra resultados cinéticos de biomasa y glicerol para la fermentación perfusiva A.

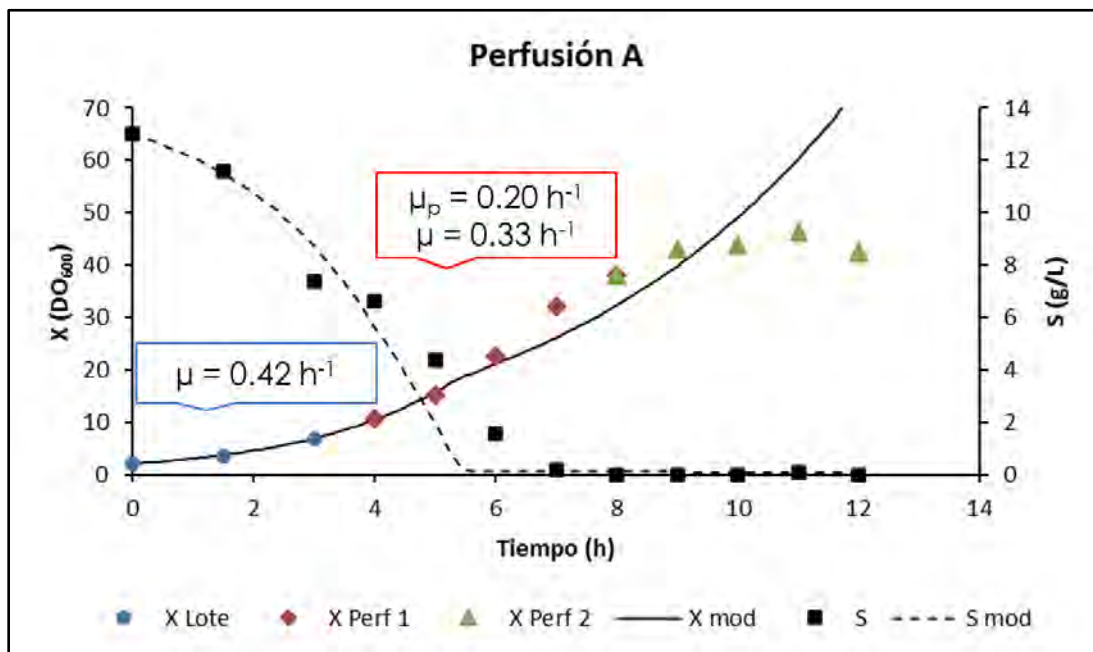


Figura 4. Cinética de biomasa y glicerol de la fermentación perfusiva A.

Cuadrados de color negro \blacksquare indican la concentración de glicerol en g/L, círculos de color azul \bullet , rombos de color rojo \blacklozenge y triángulos de color verde \blacktriangle , muestran la concentración experimental de biomasa en DO_{600} durante la etapa lote, etapa perfusiva 1 y etapa perfusiva 2 del cultivo, respectivamente. La línea continua y la línea punteada muestran resultados del modelo para la concentración de biomasa y glicerol, respectivamente.

Este cultivo inicio la fase lote con una concentración celular de 2.00 DO₆₀₀. En esta etapa se mantuvo una velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{\max}) de 0.42 h⁻¹ durante 4 h y se alcanzó una concentración al final de la etapa lote (X_B) o inicio de la etapa perfusiva de 10.54 DO₆₀₀. De acuerdo a la literatura, una velocidad específica de crecimiento reducida es recomendable para la producción de plásmido, valores de μ entre 0.10 y 0.25 h⁻¹ fueron reportados en cultivos por lote alimentado (Lara *et al.*, 2012; Peterson y Brune, 2008; Carnes *et al.*, 2006; Prather *et al.*, 2003).

En varias fermentaciones por lote alimentado, las μ del proceso resultaron ser menores a las esperadas (Gonçalves *et al.* 2014; Williams *et al.*, 2009) y una de las causas que mencionan los autores es una posible sobreestimación del coeficiente de rendimiento de biomasa por glicerol, Y_{XS} . En resultados previos de nuestro equipo de trabajo se encontró que ese coeficiente reduce su valor en la etapa por lote alimentado, que es cuando las células aumentan la producción de plásmido en fermentaciones operadas en este modo de operación. Por tal motivo en estos experimentos de fermentación perfusiva se utilizó un valor de Y_{XS} en la etapa perfusiva menor al de la etapa por lote.

En este cultivo perfusivo A, el flujo de alimentación inicial de medio concentrado (F_0) se calculó utilizando un coeficiente de rendimiento de células por glicerol en la etapa perfusiva (Y_{XSP}) de 0.70 DO₆₀₀/(g/L), menor al de la fase por lote (Y_{XSB}) de 1.16 DO₆₀₀/(g/L). También se utilizó una velocidad de crecimiento específica esperada, μ_P de 0.2 h⁻¹. En la fase perfusiva de esta fermentación se identificaron dos etapas con velocidades específicas diferentes. La etapa perfusiva 1 se presentó en el periodo de 4 – 8 h con una μ de 0.33 h⁻¹ alcanzando una concentración de células de 38.06 DO₆₀₀. Este resultado y la Ecuación (3) indica que posiblemente se subvaluó el valor de Y_{XSP} .

En la etapa perfusiva 2 que ocurrió entre 8 – 12 h se alcanzó una concentración máxima de 46.12 DO₆₀₀ a las 11 h. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento disminuyó significativamente durante esta etapa al compararse con la etapa perfusiva 1, dando fin al proceso de cultivo en una concentración celular de 42.46 DO₆₀₀. Este final inesperado del crecimiento celular se debió a problemas con el módulo de fibras huecas que se presentaron en este experimento de fermentación, ya que durante esas horas del proceso ocurrieron taponamientos de la membrana del módulo de microfiltración de flujo tangencial. Estos problemas se intentaron resolver usando retroflujo mientras se detenían las bombas P1-A y P1-B. Sin embargo, la fermentación se terminó a las 12 horas de proceso. Este problema se logró

evitar para las siguientes fermentaciones B y C cambiando a un módulo de microfiltración con mayor área superficial (de 0.0145 m² a 0.0610 m²).

También en la Figura 4, puede observarse de manera cualitativa un buen ajuste del modelo con los datos experimentales. Al promediar datos cinéticos de la fermentación A con otras dos fermentaciones con condiciones similares (no reportadas en este trabajo), la simulación muestra un buen ajuste con los datos experimentales con un error estándar de la regresión de 1.6% y 7.3% para la concentración del sustrato y las células, respectivamente.

La Figura 5 muestra los resultados cinéticos de crecimiento celular y consumo de sustrato para la fermentación perfusiva B.

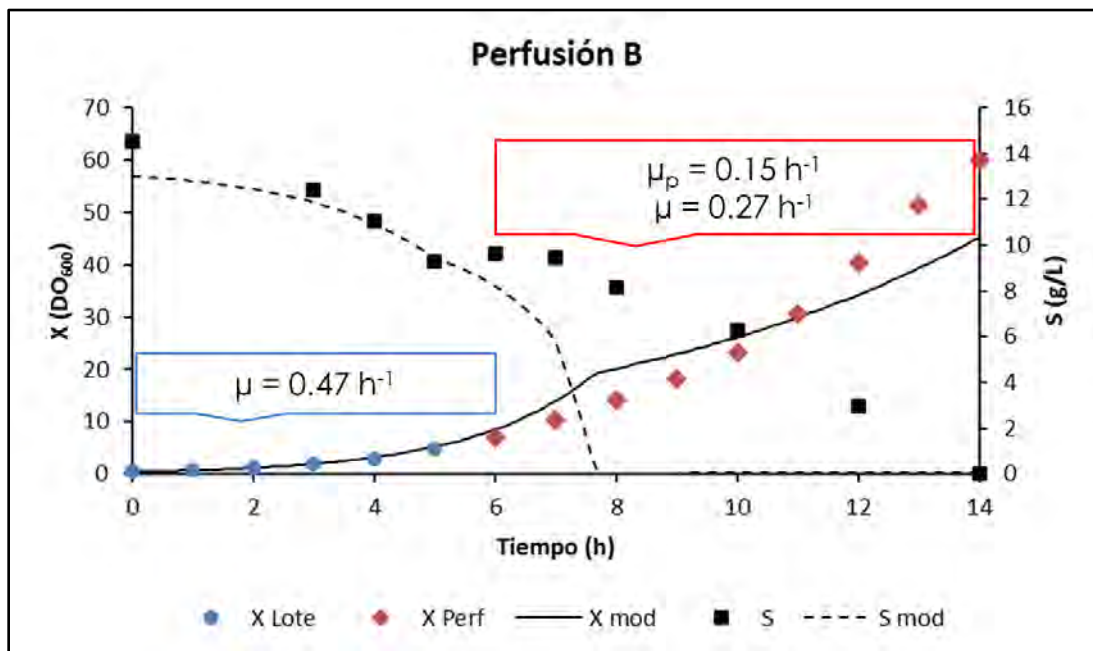


Figura 5. Cinética de biomasa y glicerol de la fermentación perfusiva B.

Cuadrados de color negro [■] indican la concentración de glicerol en g/L, círculos de color azul [●] y rombos de color rojo [◆] muestran la concentración de biomasa en DO₆₀₀ durante la etapa lote, y la etapa perfusiva del cultivo, respectivamente. La línea continua y la línea punteada muestran resultados del modelo para la concentración de biomasa y glicerol, respectivamente.

Este cultivo inicio la fase lote con una concentración celular de 0.43 DO₆₀₀. En esta etapa se mantuvo una velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) de 0.47 h⁻¹ durante 6 h y se alcanzó una concentración al final de la etapa lote (X_B) o inicial de la etapa perfusiva de 7.0 DO₆₀₀. En esta fermentación por perfusión B, el flujo de alimentación inicial de medio concentrado (F_0)

se calculó utilizando un coeficiente de rendimiento de células por glicerol en la etapa perfusiva (Y_{XSP}) de $0.70 \text{ DO}_{600}/(\text{g/L})$, menor al de la fase por lote (Y_{XSB}) de $1.16 \text{ DO}_{600}/(\text{g/L})$ de acuerdo a fermentaciones previas tipo lote alimentado del equipo de trabajo y la literatura (Gonçalves *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2009). En este caso se utilizó una μ_P de 0.15 h^{-1} .

En la fase de perfusión de esta fermentación B, solo se identificó una etapa a diferencia de la perfusión A. Esta etapa perfusiva se llevó a cabo durante el periodo de 6 - 14 h presentando una $\mu = 0.27 \text{ h}^{-1}$ y alcanzando una concentración de células de 60.03 DO_{600} . Estos resultados indican nuevamente una subvaloración del valor de Y_{XSP} . De acuerdo a la Figura 5, durante el periodo de 6 – 12 h de la fermentación la concentración de glicerol experimental no fue cercana a 0 g/L; a pesar de eso, la velocidad específica de crecimiento en la etapa perfusiva fue menor a μ_{max} . Este resultado podría ser debido a un error experimental en la determinación de glicerol.

En esta fermentación se utilizó un módulo de fibras huecas de mayor área superficial (0.0610 m^2) y así se logró evitar los problemas de taponamiento de la membrana que ocurrieron en la fermentación por perfusión A. Sin embargo, el cultivo termino su crecimiento exponencial dando fin al proceso a 60 DO_{600} aproximadamente. De acuerdo a las condiciones de la transferencia de masa de oxígeno se supone que este es el límite del sistema experimental.

El modelo se ajusta bien a los datos experimentales de biomasa y glicerol en las primeras 5 horas del cultivo, después, para el glicerol no hay buen ajuste debido al supuesto problema experimental mencionado. Y para la concentración celular hay un desajuste leve debido a las diferencias entre la velocidad específica de crecimiento experimental y la programada en la simulación.

La Figura 6 muestra los resultados cinéticos de crecimiento celular y consumo de sustrato para la fermentación perfusiva C.

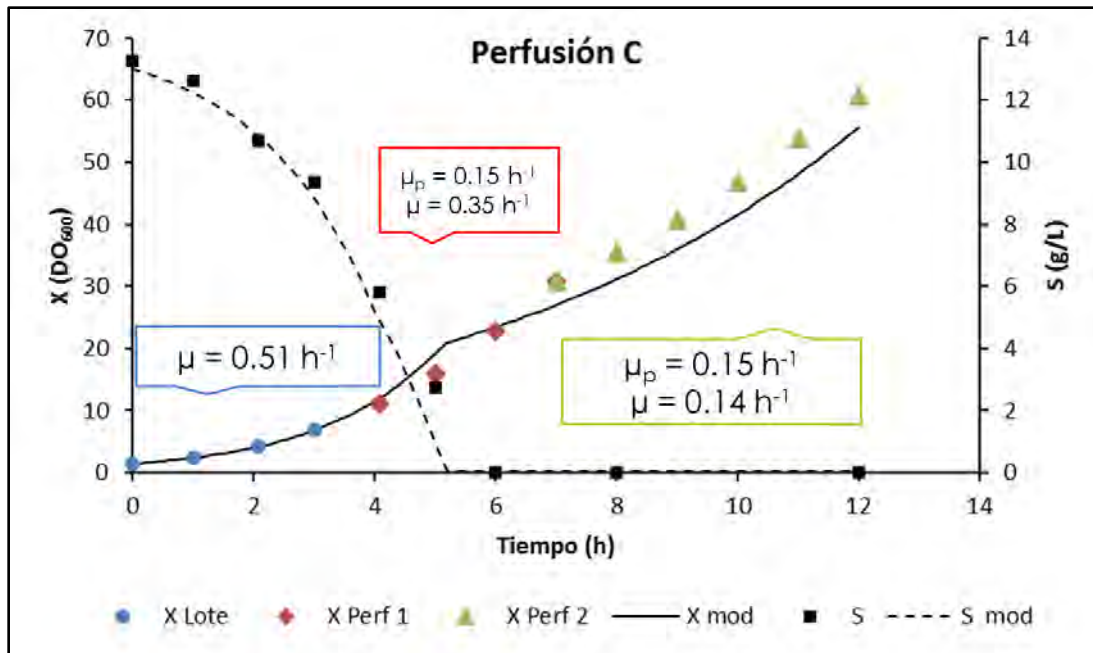


Figura 6. Cinética de biomasa y glicerol de la fermentación perfusiva C.

Cuadrados de color negro [■] indican la concentración de glicerol en g/L, Círculos de color azul [●], rombos de color rojo [◆] y triángulos de color verde [▲], muestran la concentración de biomasa en DO_{600} durante la etapa lote, etapa perfusiva 1 y etapa perfusiva 2 del cultivo, respectivamente. La línea continua y la línea punteada muestran resultados del modelo para la concentración de biomasa y glicerol, respectivamente.

Este cultivo inicio la fase lote con una concentración celular de $1.41 DO_{600}$. En esta etapa se mantuvo una velocidad específica de crecimiento máxima $\mu_{max} = 0.51 \text{ h}^{-1}$ durante 4 h y se alcanzó una concentración al final de la etapa lote (X_B) o inicio de la etapa perfusiva de $11.00 DO_{600}$. En esta fermentación por perfusión C, el flujo de alimentación inicial de medio concentrado (F_0) se calculó utilizando un coeficiente de rendimiento de células por glicerol en la etapa perfusiva (Y_{XSP}) de $0.70 DO_{600}/(g/L)$, menor al de la fase por lote (Y_{XSB}) de $1.30 DO_{600}/(g/L)$. También se utilizó una μ_p de 0.15 h^{-1} .

En la fase de perfusión con alimentación exponencial de esta fermentación se identifican dos etapas con velocidades específicas diferentes. La etapa perfusiva 1 se presentó en el periodo de 4 – 7 h con una μ de 0.35 h^{-1} y alcanzando una concentración de células de $30.80 DO_{600}$. Debido a la sospecha de la subvaloración del valor de Y_{XSP} en el cálculo del flujo inicial de medio de alimentación, se calculó el coeficiente de rendimiento Y_{XSP} para el cultivo en esta primera etapa perfusiva con ayuda de la medición de glicerol de las muestras obtenidas cada hora obteniendo un valor igual que Y_{XSB} . Entonces se realizó un ajuste en el cálculo del flujo de alimentación de medio concentrado, modificando el valor de Y_{XSP} al obtenido en el presente cultivo.

Posterior al ajuste del flujo de alimentación y considerando las condiciones en ese momento de la fermentación, se inició la etapa perfusiva 2 que ocurrió en el intervalo de 7 – 12 h con una μ de 0.14 h^{-1} y obteniendo una concentración máxima de 60.68 DO_{600} a las 12 h. Con dicho cambio de $Y_{XSP} = Y_{XSB}$ se logró que el cultivo crezca prácticamente a la μ esperada de 0.15 h^{-1} , confirmando que se subvaloró este dato en los cultivos perfusivos anteriores A y B.

Los resultados obtenidos de coeficiente de rendimiento (células/glicerol) en CPAE indican que en este nuevo modo de operación para la producción de ADNp se mantiene un ambiente más saludable para las células, ya que la relación de crecimiento celular respecto a la fuente de carbono consumido se mantiene igual en la etapa de producción del plásmido como en la fase inicial del cultivo en contraste con la estrategia por lote-alimentado donde Y_{XS} disminuye en la etapa de alimentación.

Lo que podría estar pasando en cultivos por lote alimentado es que el coeficiente de rendimiento de células por glicerol en esas etapas baje debido a que un porcentaje de células mueran y/o pierdan viabilidad. Por lo que el coeficiente de rendimiento Y_{XS} que se adapta a estos cultivos sea aparente, o sea que, en su cálculo, se consideran datos experimentales que incluyen células viables y no viables.

Según la Figura 6, la simulación representa de modo adecuado las etapas del cultivo ya que se puede observar que el modelo ajusta bien a los datos experimentales tanto para concentración de biomasa y glicerol.

La simulación de los modelos matemáticos que representan las fermentaciones realizadas en este trabajo apoyo para comprender, como cambios en la concentración de sustrato y producto influyen en el desarrollo del proceso. También ayudo a saber cómo ajustar la entrada de nutriente respecto al tiempo, su concentración y composición para obtener la respuesta deseada. Los conocimientos obtenidos del modelo resultaron útiles para el ajuste del proceso, reduciendo el número experimentos necesarios. Además, la comparación de los resultados experimentales con las predicciones del modelo ayuda a mejorar el modelo en sí (Julien y Whitford, 2007).

4.1.2. Rendimiento de plásmido

Los resultados cinéticos de plásmido durante las primeras doce horas de las perfusiones reportadas (A, B y C) se muestran en la Figura 7.

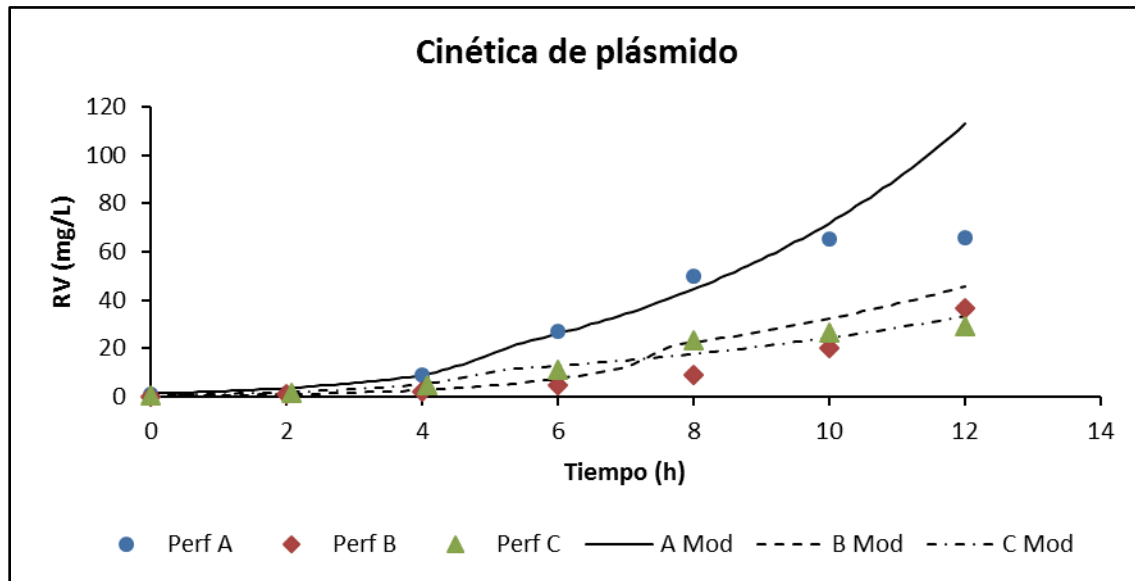


Figura 7. Cinética de plásmido en las perfusiones A, B y C.

Círculos de color azul [●], rombos de color rojo [◆] y triángulos de color verde [▲], muestran el rendimiento volumétrico de plásmido en el tiempo de los cultivos por perfusión alimentada en modo exponencial A, B y C, respectivamente. La línea continua, la línea de guiones y la línea de guiones-puntos muestran resultados del modelo para el rendimiento volumétrico de plásmido en las perfusiones A, B y C, respectivamente.

La producción de plásmido se vio favorecida en el cultivo perfusivo A, alcanzando un rendimiento volumétrico de 65.41 mg/L a las 10 h de fermentación. Debido al control de una velocidad de crecimiento reducida en la perfusión C, se esperaba un mayor rendimiento de plásmido. Sin embargo, en los cultivos B y C sólo se alcanzó un rendimiento de 30 mg/L aproximadamente.

El modelo muestra cualitativamente un buen ajuste con los datos experimentales de rendimiento de plásmido para las tres fermentaciones. El desfase del modelo con el experimento de la perfusión A es debido al problema que ocurrió con el crecimiento celular debido al taponamiento de la membrana mencionado en la sección anterior.

La Tabla 1 muestra un resumen de datos experimentales referentes a la producción de plásmido en los tres cultivos perfusivos realizados en este trabajo. Este resumen muestra datos de rendimiento volumétrico y rendimiento específico de plásmido a las doce horas de transcurrido

el proceso de fermentación. Se indica la μ en fase lote y en la etapa perfusiva para cada fermentación, esta última en función de μ_{\max} que corresponde. También se incluye el valor del coeficiente de rendimiento Y_{PX} obtenido con el cálculo de la pendiente de una recta ajustada a puntos de datos experimentales de RV en el eje y, y concentración celular en el eje x. Este coeficiente se calculó para las etapas lote y de perfusión de cada fermentación. Se reporta μ y Y_{PX} para las dos etapas perfusivas presentadas en la fermentación C.

Tabla 1. Resumen de datos sobre rendimiento de plásmido en fermentaciones A, B y C.

CULTIVO	RV (mg/L)	RE [mg/(L-DO ₆₀₀)]	μ_{\max} (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Y_{PX} [mg/(L-DO ₆₀₀)]	
					Lote	Perfusión
A	66.03	1.56	0.42	$0.79\mu_{\max}$	0.88	1.50 (↑ 70%)
B	36.48	0.90	0.47	$0.57\mu_{\max}$	0.61	0.99 (↑ 62%)
C	29.07	0.48	0.51	$0.69\mu_{\max}$	0.44	0.75 (↑ 70%)
				$0.27\mu_{\max}$		0.23 (↓ 48%)

La Tabla 1 muestra claramente que la fermentación A logra mayor rendimiento de plásmido que los otros cultivos perfusivos. Analizando los datos de esta tabla se observa que el coeficiente Y_{PX} es diferente en la etapa por lote de las tres fermentaciones a pesar de que crecen a μ_{\max} . Esto último se podría explicar debido a que la cepa se fue adaptando al medio de cultivo, enfocando su metabolismo hacia crecimiento celular, como se nota en el cambio de velocidad de crecimiento en fase lote (μ_{\max}) para los tres cultivos. Los valores de μ_{\max} (h⁻¹) para la fermentación A, B y C fueron 0.42, 0.47 y 0.51, respectivamente. Por lo tanto, esto puede explicar la disminución del valor de Y_{PX} para las tres fermentaciones en su fase lote.

En la etapa perfusiva 1 de la fermentación A, Y_{PX} aumento 70 % su valor respecto a la fase lote al mantenerse una velocidad del 79 % de μ_{\max} . En la etapa perfusiva de la fermentación B, Y_{PX} aumento 62 % su valor respecto a la fase lote al mantenerse una velocidad del 57 % de μ_{\max} . En la fermentación C, para la etapa perfusiva 1, Y_{PX} aumento 70 % su valor respecto a la fase lote al mantenerse una velocidad del 69 % de μ_{\max} y para la etapa perfusiva 2 Y_{PX} disminuyo 48 % su valor respecto a la fase lote al mantenerse una velocidad del 27 % de μ_{\max} .

De acuerdo a estos resultados, controlar la velocidad de crecimiento en un porcentaje entre 69-79 % de μ_{\max} es recomendable para obtener un valor mayor del coeficiente de rendimiento de plásmido a partir de biomasa. Sin embargo, pensando en la productividad del proceso el valor máximo del rango mencionado sería el ideal.

4.1.3. Comparación de productividad en fermentaciones a nivel laboratorio

Se han reportado rendimientos volumétricos y específicos de plásmido provenientes de diferentes estrategias de producción (Urthaler *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Ow *et al.*, 2009). El rendimiento del cultivo depende de varios factores como la cepa celular, el tamaño del plásmido, el medio de cultivo, la temperatura, modo de fermentación y escala del cultivo. Con la finalidad de intentar aislar el efecto del modo de operación, datos de productividad de plásmido reportados a escala laboratorio en fermentaciones por lote, lote alimentado y cultivos perfusivos usando *E. coli* DH5 α como cepa hospedera se presentan en la Tabla 2.

En este trabajo, se obtuvo un valor de productividad de 5.5 mg L⁻¹ h⁻¹ utilizando un medio definido, el cual representa un aumento de 2.75 veces la productividad cuando se compara con un resultado reciente para un proceso por lote alimentado a escala laboratorio usando *E. coli* DH5 α en medio complejo para producir un plásmido de 3.7 Kpb (Goncalves *et al.*, 2014).

Utilizando un enfoque de análisis económico marginal, ciertamente el beneficio del incremento en la productividad de plásmido en el sistema de CPAE debe exceder el incremento en los costos asociado con el equipo periférico adicional requerido en este sistema. La optimización y escalamiento de este nuevo modo de cultivo y accesibilidad a bombas modernas de filtración y manejo de líquidos podrían respaldar este objetivo.

Tabla 2. Comparación de productividad de plásmido en *E. coli DH5α* con estudios similares de fermentación a escala laboratorio.

Estrategia de fermentación, Tipo, Volumen de trabajo, Temperatura, Medio de cultivo, Plásmido, Cepa.	Rendimiento volumétrico Rendimiento específico Duración del cultivo	Productividad	Referencia
Lote, Fermentador, 1.8 L, 37°C, Medio Complejo, pVAX1-lacZ (6.05 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	28.0 mg L ⁻¹ 5.3 mg g ⁻¹ 20 h	1.40 mg L ⁻¹ h ⁻¹	Lopes <i>et al.</i> , 2015
Lote, Fermentador, 1.0 L, 37°C, Medio definido, pVAX1-NH36 (4 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	16.6 mg L ⁻¹ 1.30 mg g ⁻¹ 11 h	1.51 mg L ⁻¹ h ⁻¹	Munguía-Soto <i>et al.</i> , 2015
Lote alimentado, Fermentador, 1.1 L, 30°C - 42°C, Medio Complejo, pVAX1GFP (3.7 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	40.1 mg L ⁻¹ 4.3 mg g ⁻¹ 20 h	2.0 mg L ⁻¹ h ⁻¹	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Lote alimentado, Fermentador, 5.0 L, 37 °C, Medio Complejo, pSVb (6.9 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	25.6 mg L ⁻¹ 7.57 mg g ⁻¹ 25 h	1.02 mg L ⁻¹ h ⁻¹	O'Kennedy <i>et al.</i> , 2003
Perfusión alimentada en modo exponencial, Fermentador, 1.0 L, 37°C, Medio definido, pVAX1-NH36 (4 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	36.5 mg L ⁻¹ 1.8 mg g ⁻¹ 12 h	3.0 mg L ⁻¹ h ⁻¹	García-Rendón <i>et al.</i> , 2016 Tesis (Fermentación B)
Perfusión alimentada en modo exponencial, Fermentador, 1.0 L, 37°C, Medio definido, pVAX1-NH36 (4 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	33.0 mg L ⁻¹ 1.07 mg g ⁻¹ 12.5 h	2.67 mg L ⁻¹ h ⁻¹	García-Rendón <i>et al.</i> , 2016 Tesis (Fermentación C)
Perfusión alimentada en modo exponencial, Fermentador, 1.0 L, 37°C, Medio definido, pVAX1-NH36 (4 Kpb), <i>E. coli</i> DH5α.	66.0 mg L ⁻¹ 3.11 mg g ⁻¹ 12 h	5.5 mg L ⁻¹ h ⁻¹	Tesis (Fermentación A)

4.1.4. Pureza y calidad de plásmido

La relación de densidad óptica 260nm/280nm se utilizó para determinar la pureza de la solución purificada de plásmido. Además, se aplicó una electroforesis de gel agarosa para asegurar la eliminación completa de ARN y ADN cromosomal. Los resultados electroforéticos también sirvieron para analizar isoformas del plásmido y así checar la calidad de pVAX1-NH36.

La Tabla 3 muestra los datos de la relación de densidad óptica 260nm/280nm obtenidas en las soluciones de plásmido obtenidas de las fermentaciones realizadas en este trabajo.

Tabla 3. Datos de la relación de densidad óptica 260nm/280nm de las muestras de plásmido purificado, provenientes de las fermentaciones por perfusión con alimentación exponencial.

Tiempo (h)	DO 260/280		
	Cultivo A	Cultivo B	Cultivo C
0	1.87	2.78	1.70
2	1.91	1.77	1.68
4	1.95	2.05	1.70
6	1.96	1.77	1.64
8	1.91	1.91	1.74
10	1.89	1.77	1.78
12	1.87	1.93	1.76

Se observa en los datos tabulados que en las tres fermentaciones predominan valores dentro o muy cerca del rango de pureza ideal (1.8 – 2.0) para uso como vacuna de ADN plasmídico. En promedio, se obtuvo 1.91, 2.0 y 1.71 para las muestras de las fermentaciones A, B y C, respectivamente.

El análisis de calidad del plásmido producido durante estas fermentaciones, se determinó cualitativamente por medio de electroforesis en gel agarosa. Mediante este experimento se pueden observar diferentes isoformas del plásmido, siendo la forma súperenrollada, la adecuada para su uso como vacuna de ADN.

La Figura 8 muestra la fotografía del resultado electroforético de las muestras de plásmido purificado obtenidas en la fermentación A. En la parte superior, de color amarillo, se indica el número del carril en donde se depositaron las muestras. En este gel de agarosa, propio de la electroforesis de la fermentación A, se cargaron los pozos de los carriles 1 y 8 con marcador de peso molecular para plásmido en forma súperenrollada, con un rango de tamaño entre 2067 – 12210 pares de bases.

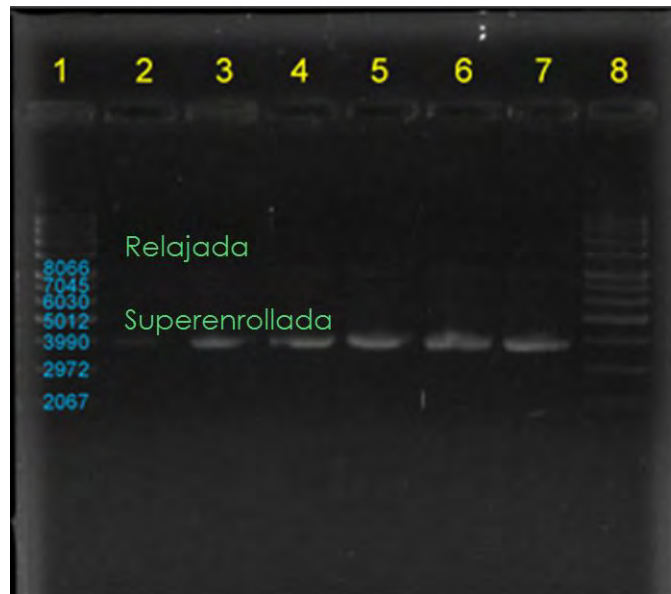


Figura 8. Imagen de electroforesis en gel agarosa de plásmido purificado del cultivo perfusivo A.

En la parte superior, de color amarillo, se indica el número del carril en donde se depositaron las muestras. En la parte lateral izquierda, sobre la columna del carril 1 se indica el tamaño en pares de bases de ADN superenrollado.

En esta imagen, se muestra sobre el carril uno, el tamaño que corresponde a cada línea de plásmido de ADN superenrollado que recorrió el gel durante este experimento. En los carriles 2 – 7 se cargaron muestras de plásmido purificado correspondientes a 0, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de tiempo de cultivo. Como se puede observar en la imagen del gel, dominan bandas intensas de ADN superenrollado que representan a pVAX1-NH36 de tamaño de 4000 pb.

Se logra observar de modo muy tenue bandas de ADN con un tamaño de 8066 pb. Estas bandas representan formas relajadas del plásmido que migran más lento que la forma superenrollada en la electroforesis, y por tal motivo, éstas isoformas no deseadas pueden verse en el gel en un tamaño aparentemente mucho mayor. De modo cualitativo, se observa que la preparación de plásmido en este experimento es de alta calidad ya que se obtuvo un alto porcentaje de plásmido en forma superenrollada.

La Figura 9 muestra la fotografía del resultado electroforético de las muestras de plásmido purificado obtenidas en la fermentación C. En la parte superior, de color amarillo, se indica el número del carril en donde se depositaron las muestras.



Figura 9. Imagen de electroforesis en gel agarosa de plásmido purificado del cultivo perfusivo C.

En la parte superior, de color amarillo, se indica el número del carril en donde se depositaron las muestras. En la parte lateral izquierda, sobre la columna del carril 1 se indica el tamaño en pares de bases de ADN súperenrollado.

En este gel de agarosa, propio de la electroforesis de la fermentación C, se cargaron el pozo de los carriles 1 y 10 con marcador de peso molecular para plásmido en forma súperenrollada, con un rango de tamaño entre 2067 – 12210 pares de bases. En esta imagen, se muestra sobre el carril uno, el tamaño que corresponde a cada línea de plásmido de ADN súperenrollado que recorrió el gel durante este experimento. En el carril 11 no se agregó ninguna muestra, para usarlo como carril control. En los carriles 2 – 9 se cargaron muestras de plásmido purificado correspondiente a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 12.5 horas de tiempo de cultivo. Como se puede observar en el gel, sobre los carriles dominan bandas intensas de ADN súperenrollado que representan a pVAX1-NH36 de tamaño de 4000 pb.

De modo similar que en el gel de electroforesis del cultivo perfusivo A, para la fermentación C, también se observan bandas muy tenues de plásmido relajado, indicando que la preparación de plásmido en este experimento es de alta calidad al obtener un porcentaje alto de plásmido súperenrollado.

4.2 Análisis del comportamiento del sistema

El sistema de ecuaciones diferenciales que describen el crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de plásmido fue resuelto en plataforma MATLAB y la solución numérica obtenida se comparó con resultados experimentales como se mostró en secciones anteriores. Además, se adaptó el modelo obtenido ($X_m = 60 \text{ DO}_{600}$) para realizar un análisis del comportamiento del sistema donde se observó el efecto de S_0 en la cinética del cultivo, el efecto de la concentración inicial de sustrato en la alimentación, el efecto de la cantidad de inóculo, una proyección de escalamiento y una proyección a una velocidad específica de producción de plásmido mayor.

4.2.1. Parámetros del modelo utilizados en las simulaciones.

En las Tablas 4 y Tabla 5 se muestran los parámetros utilizados para resolver el modelo cinético del sistema como condiciones de operación, datos experimentales y datos cinéticos del crecimiento de *E. coli*.

Tabla 4. Datos de entrada para el modelo de perfusión con alimentación exponencial.
Parámetros de operación

Tipo de parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Descripción
Operación	X_0	1.5	DO_{600}	Concentración inicial de biomasa en el biorreactor.
	S_0	13	g/L	Concentración inicial de glicerol en el biorreactor.
	P_0	0.53	(mg/L)/ DO_{600}	Rendimiento específico inicial de plásmido.
	μ_P	0.2	1/h	Velocidad específica de plásmido, predeterminada para la fase perfusiva.
	V	1	L	Volumen del medio de cultivo en el bioreactor.
	S_F	18	g/L	Concentración de glicerol en el medio de alimentación.
	X_m	60	DO_{600}	Concentración máxima de biomasa en el biorreactor.

Tabla 5. Datos de entrada para el modelo de perfusión con alimentación exponencial. Parámetros cinéticos.

Tipo de parámetro	Símbolo	Valor	Unidades	Descripción
<i>E. coli</i>	K_S	0.1	g/L	Constante de saturación de <i>Escherichia coli</i> .
	μ_m	0.51	1/h	Velocidad específica de crecimiento máxima.
Experimental	$Y_{X/S}$	1.3	$DO_{600}/(g/L)$	Coefficiente de rendimiento de biomasa a partir de glicerol.
	$Y_{P/Xb}$	0.44	$(mg/L)/DO_{600}$	Coefficiente de rendimiento de plásmido a partir de biomasa en etapa por lote.
	$Y_{P/Xp}$	0.64		Coefficiente de rendimiento de plásmido a partir de biomasa en etapa perfusiva.

4.2.2. Efecto de S_0 en la cinética del cultivo y en parámetros del sistema

En los CPAE, la concentración inicial de sustrato en la etapa lote, S_0 , influye de manera importante sobre el comportamiento del sistema. Se realizaron estudios de simulación del proceso de fermentación para investigar este efecto de S_0 sobre la cinética de crecimiento en el CPAE. A diferencia de los cultivos por lote y por lote-alimentado, en CPAE la acumulación de productos de desecho es baja y el sistema está limitado sólo por la capacidad de transferencia de masa de oxígeno del bioreactor (considerando que hay todos los demás nutrientes disponibles). De acuerdo a la capacidad del cultivo perfusivo con el equipo utilizado, la densidad celular máxima se fijó en 60 de DO_{600} durante la simulación.

Los resultados del análisis para la variación de S_0 sobre la cinética y parámetros del sistema como son μ , F y el volumen total alimentado al sistema (V_D), se muestran en la Figura 10. La primera observación básica del análisis es que el tiempo para iniciar la fase perfusiva del cultivo (duración de etapa lote), es decir, obtener una concentración de $S = 0.065 \text{ g L}^{-1}$ que corresponde a una $\mu_P = 0.2 \text{ h}^{-1}$ depende de la concentración inicial del sustrato en la fase lote (Figura 10 a). A medida que aumenta la concentración inicial de sustrato en el bioreactor, incrementa la duración

de la etapa lote y el tiempo total del cultivo para alcanzar una concentración celular de 60 DO_{600} disminuye. Por lo tanto, la concentración de sustrato inicial en el sistema determina la proporción entre la duración de la etapa lote y el tiempo total del proceso. Ambos son parámetros de diseño importantes, ya que la duración de la etapa lote determina la productividad del sistema y la duración total del cultivo tiene un impacto sobre el objetivo del proceso perfusivo.

El valor del coeficiente de rendimiento de plásmido ($Y_{P/X}$) en un cultivo perfusivo durante la fase lote es más bajo que el coeficiente que se presenta con la velocidad de crecimiento óptima durante la etapa de perfusión con alimentación exponencial. Por lo tanto, es importante considerar la duración de la etapa lote antes del inicio de la etapa perfusiva. En el caso de que no exista etapa lote, la velocidad de crecimiento de ADNp óptima se presentaría en todo el proceso de fermentación alcanzando el máximo contenido de plásmido por célula. Al incrementar la duración de la etapa lote se reduce el contenido de plásmido por célula, pero también se reduce la duración del cultivo que conlleva al aumento de la productividad. Por lo tanto, es necesario analizar la relación entre la productividad del plásmido y la proporción de tiempo de las etapas lote y perfusiva.

También se observa en la Figura 10 b que cuando la concentración inicial de sustrato en el bioreactor aumenta, la velocidad específica de crecimiento máxima se mantiene por más tiempo hasta que decrece al valor deseado para la producción de plásmido, en este caso $\mu_P = 0.2 \text{ h}^{-1}$.

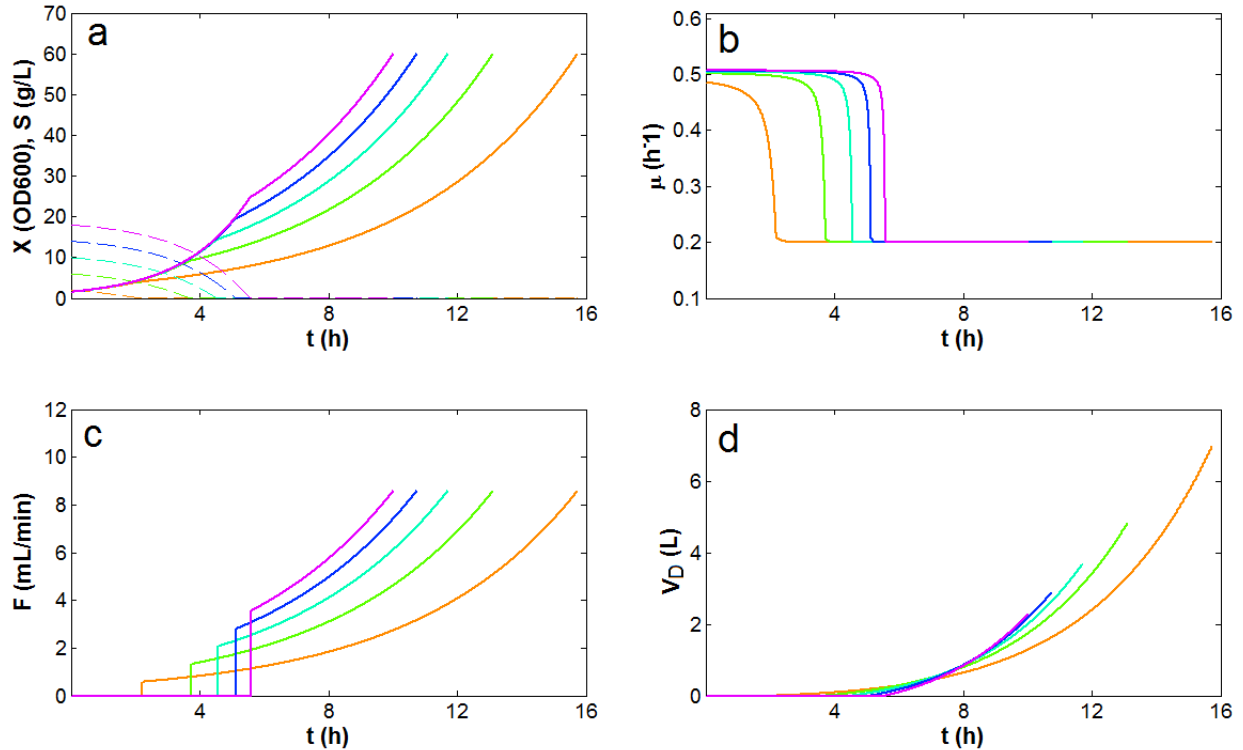


Figura 10. Efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la cinética del cultivo y parámetros del sistema.

(a) Cinética del cultivo, [—] Densidad celular, [---] Concentración de sustrato; (b) velocidad específica de crecimiento; (c) flujo de alimentación; (d) volumen alimentado (V_D). Color naranja, verde, azul cielo, azul y púrpura representan concentración de sustrato inicial S_0 de 2, 6, 10, 14 y 18 g L⁻¹, respectivamente.

Se puede observar en la Figura 10 c, un perfil de flujo de alimentación más corto e iniciando con un valor de F_0 mayor a medida que la concentración inicial de sustrato aumenta. Esto debido a que la fase de perfusión inicia a valores de densidad celular mayores y se requiere mayor cantidad de nutriente para mantener la velocidad deseada. Sin embargo, el funcionamiento de las bombas y el sistema de FFT trabajaría menor tiempo al aumentar S_0 . El flujo de alimentación y la concentración celular son consideraciones de diseño importantes para la membrana de fibras huecas del sistema de filtración de flujo tangencial. Un flujo de alimentación más alto implica un área de filtración más grande y concentraciones celulares más altas implican velocidades de flujo cruzado mayores. Según la Figura 10 c, el sistema de filtración requerido es independiente de S_0 , ya que, aunque se inicie con un flujo menor en el caso de baja S_0 , el flujo aumentara para mantener la concentración celular al final del cultivo.

El volumen total alimentado al sistema (V_D) disminuye a medida que aumenta la concentración inicial de sustrato como se muestra en la Figura 10 d. De este modo, se tiene que el intercambio

de volumen de medio con el sistema sea más bajo. Además, el proceso de diafiltración comienza con un contenido más alto de metabolitos que puede afectar la salud del cultivo.

Durante la fase de perfusión la concentración de sustrato en el bioreactor se mantiene constante para controlar la velocidad específica de crecimiento, esto, considerando la entrada de sustrato en el medio de alimentación y su salida mediante el retiro de volumen de permeado. Esto podría ser una consideración de diseño importante en los CPAE debido a las pérdidas de sustrato.

4.2.3. Análisis teórico de la fermentación

Se realizó un análisis teórico al comparar un caso base de fermentación perfusiva con cuatro estrategias de cultivo: (1) Aumento del doble de la concentración de sustrato en el medio de alimentación ($S_F = 36 \text{ g L}^{-1}$); (2) aumento del doble en la concentración celular inicial ($X_0 = 3.0 \text{ DO}_{600}$); proyección de aumento de escala y (4) proyección de una velocidad específica de producción de plásmido más alta.

En todos los casos, la fase de perfusión dio inicio cuando la concentración de sustrato en el bioreactor alcanzó un valor de $S = 0.065 \text{ g L}^{-1}$ correspondiente a una velocidad específica de crecimiento específica $\mu_P = 0.2 \text{ h}^{-1}$.

En este análisis se determinaron la duración total del cultivo (h), la duración de la fase lote (h), la productividad del sistema ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la relación de diafiltración (V_D/V) definida como volumen alimentado por volumen de operación del bioreactor y las pérdidas de sustrato (g L^{-1}), todo en función de la concentración inicial del sustrato S_0 .

Caso base

El CPAE se simuló usando los parámetros de operación y cinéticos mostrados en las Tabla 4 y Tabla 5, considerando éste como el caso base del estudio.

Se puede observar en el caso base que a medida que aumenta la concentración inicial de sustrato S_0 en el bioreactor (en el intervalo de estudio) el tiempo total del cultivo disminuye, el tiempo de la fase lote aumenta, la relación de diafiltración disminuye, las pérdidas de sustrato disminuyen y la productividad del sistema aumenta (Figura 11 a).

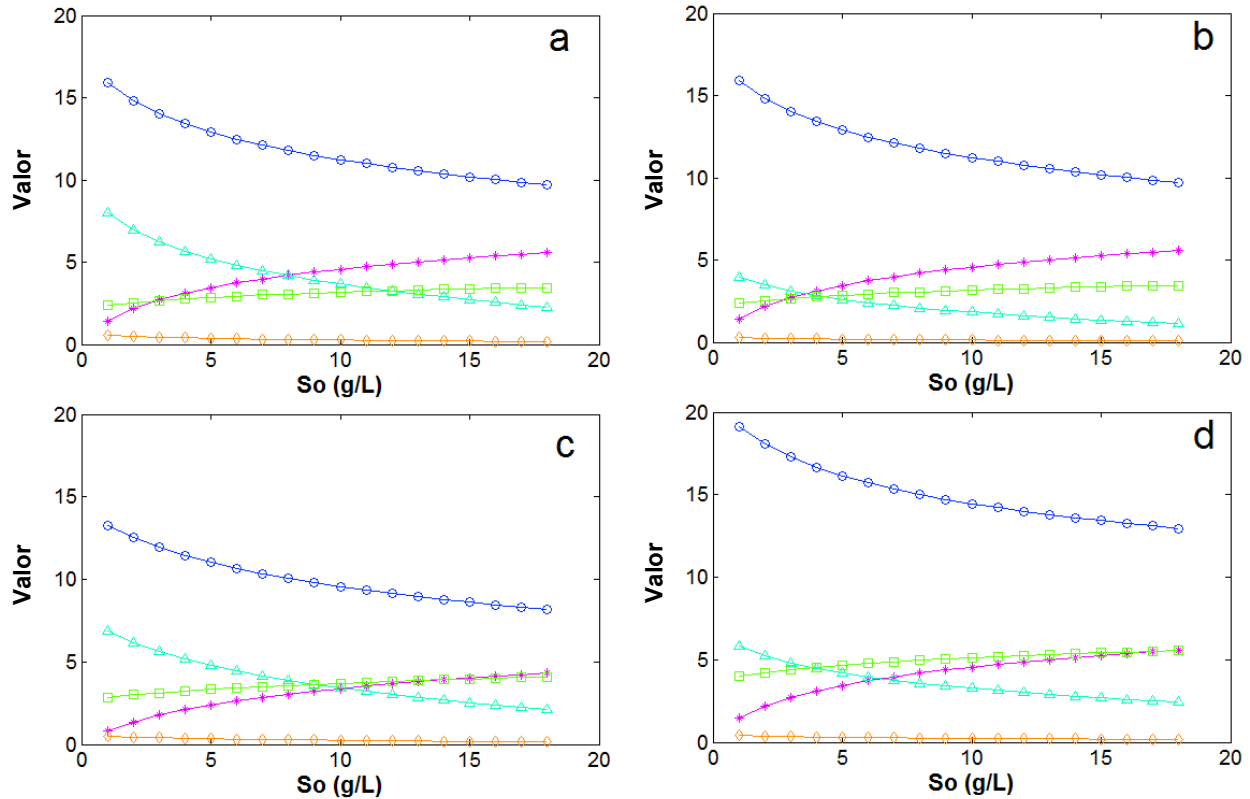


Figura 11. Efecto de parámetros del cultivo sobre el comportamiento del sistema. Caso base, aumento de S_F , aumento de X_0 y escalamiento.

(a) Caso base; (b) Concentración de sustrato en el medio de alimentación ($S_F = 36 \text{ g L}^{-1}$); (c) Concentración celular inicial ($X_0 = 3.0 \text{ DO}_{600}$); y (d) escalamiento ($V = 10 \text{ L}$ y $S_F = 60 \text{ g L}^{-1}$). [○] Duración total del cultivo (h), [*] duración de fase lote (h), [□] productividad ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), [Δ] relación de diafiltración (V_D/V) y [◇] pérdidas de sustrato (g L^{-1}).

Entonces, cuando disminuye el tiempo de etapa perfusiva menos volumen es alimentado al sistema obteniendo una diafiltración del sistema más baja. El proceso de diafiltración es esencial debido a que hay evidencia de producción de impurezas inhibitoras del crecimiento como el acetato en cultivos de *E. coli* de alta densidad incluso cuando se utiliza glicerol como única fuente de carbono (Lopes *et al.*, 2014).

En el caso limitante en el que la velocidad de diafiltración es mucho mayor que la velocidad de producción de impurezas, r_i , la variación de la concentración de impurezas (C_I) (cuando $r_i \approx 0$) en la fase perfusiva está dada por

$$V \frac{dC_I}{dt} = -FC_I = -\frac{dV_D}{dt} C_I \quad (15)$$

Resolviendo la ecuación diferencial (15) se obtiene (van Reis y Zydney., 2007)

$$\frac{c_I}{C_{I_0}} = e^{\left(\frac{-V_D}{V}\right)} \quad (15)$$

Donde C_{I_0} es la concentración de impurezas al principio de la fase de perfusión. Un valor de la relación de diafiltración $\left(\frac{V_D}{V}\right) = 3$ reduciría la concentración inicial de impurezas en un 95% que en nuestra experiencia es un valor de relación de diafiltración saludable para el proceso de fermentación (Munguía-Soto *et al.*, 2015).

Efecto de la concentración inicial de sustrato en la alimentación

Considerando una concentración en el medio de alimentación $S_F = 36 \text{ g L}^{-1}$ (doble), los únicos cambios observados en comparación al caso base son una disminución del 50 % en la relación de diafiltración y en los perfiles de pérdidas de sustrato (Figura 11 b). Al aumentar la concentración de sustrato en la alimentación, el volumen del medio permeado que debe ser retirado del sistema disminuye y por lo tanto el área del equipo de retención celular requerido también disminuye. También disminuye la relación de diafiltración al aumentar S_F . Por lo tanto, el límite superior para la concentración en el medio de alimentación es la solubilidad y el límite inferior depende de la relación de diafiltración saludable que se requiera en el proceso.

Efecto de la cantidad de inóculo

Se puede observar en la Figura 11 c que cuando la concentración celular inicial se elevó a $X_0 = 3.0 \text{ DO}_{600}$ (doble) el perfil del tiempo total del cultivo disminuyó alrededor del 20 % y la productividad del plásmido incremento aproximadamente 15 %. Además la relación de lavado y las pérdidas de sustrato disminuyen ligeramente principalmente en la región $S_0 < 5 \text{ g L}^{-1}$. Esta estrategia de cultivo (aumentar la cantidad de inóculo) mejora el desempeño del proceso, pero también afecta los costos de operación y capital (como en la preparación del inóculo).

Proyección de escalamiento

El escalamiento de biorreactores se logra generalmente con un incremento de volumen y de la velocidad de transferencia de masa de oxígeno. En consecuencia, esto podría lograr un mejor rendimiento del sistema.

Una evaluación de este comportamiento ayudará a evaluar el alcance de la fermentación con alimentación exponencial. Se realizó una proyección del sistema a una escala pre-industrial con volumen de operación de 10 L y una densidad celular factible de 120 DO₆₀₀ (Goncalves *et al.*, 2014), también utilizando *E. coli*-DH5 α y un tamaño de plásmido como el de pVAX1-NH36.

La proyección del escalamiento se realizó usando una concentración de sustrato en el medio de alimentación $S_F = 60 \text{ g L}^{-1}$ y una densidad celular final de 120 DO₆₀₀ (doble). La Figura 11 d muestra que, a pesar de este incremento en densidad óptica, la productividad de plásmido del sistema incremento solo 60% en promedio, principalmente porque el tiempo total del cultivo aumento 21% en promedio. Este incremento de tiempo es necesario para elevar la concentración de células de 60 a 120 DO₆₀₀. También se puede observar en la Figura 11 d, que la relación de diafiltración y las pérdidas de sustrato son menores que en el caso base.

Proyección a una velocidad específica de producción de plásmido mayor

La velocidad específica de producción de plásmido, r_P , se ha identificado como un objetivo clave para la optimización del proceso (Bohle y Ross., 2011). Se realizó un análisis “que pasa si” para evaluar el rendimiento del sistema en un escenario alternativo con r_P mayor ($r_P = \mu Y_{P/X} = 0.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}_{600}^{-1} \text{ h}^{-1}$ según Bohle y Ross., 2011). Como lo muestra la Figura 13, el máximo valor de productividad de plásmido se alcanza a la concentración inicial de sustrato $S_0 = 8 \text{ g L}^{-1}$. En este punto, la proporción de la etapa lote es 40% implicando que la reducción del contenido de plásmido en la fase lote se compensa por la reducción del tiempo de cultivo. Estos resultados y los del caso base apoyan también la importancia de r_P en el diseño óptimo y funcionamiento de los sistemas de perfusión.

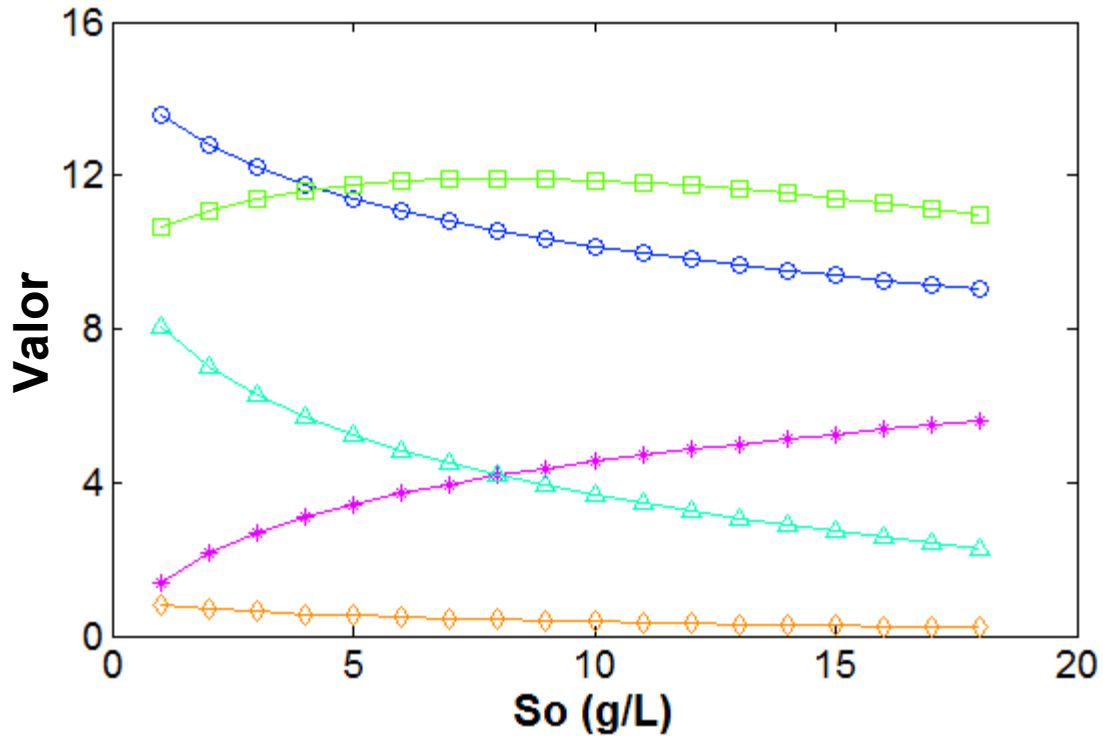


Figura 12. Efecto de parámetros del cultivo sobre el comportamiento del sistema. Aumento de r_P .

Caso base con $r_P = 0.6$ ($\text{mg L}^{-1} \text{DO}_{600}^{-1} \text{h}^{-1}$). [○] Duración total del cultivo (h), [*] duración de fase lote (h), [□] productividad ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$), [Δ] relación de diafiltración (V_D/V) y [◇] pérdidas de sustrato (g L^{-1}).

La Figura 12 muestra también que solo se pierde 0.4 g L^{-1} del sustrato alimentado en el permeado y que la relación de diafiltración es de 4 en el punto de máxima productividad. Como se ha descrito anteriormente, esta es una relación de diafiltración recomendable, un aumento adicional en la concentración inicial de sustrato podría causar que la diafiltración sea insuficiente y afecte entonces al objetivo del CPAE.

El rendimiento global del sistema de los CPAE depende de su capacidad de transferencia de masa, ya que hay una acumulación ligera de productos de desecho o daños celulares que podrían limitar el crecimiento (Munguía-Soto *et al.*, 2015). Además, en este sistema de fermentación la velocidad específica de crecimiento óptima puede ser mayor que en los cultivos por lote alimentado mejorando así la productividad del proceso. La productividad alta que se obtiene en CPAE podrían compensar tanto la inversión de capital y los costos de operación y por lo tanto ser atractiva económicamente al compararse con los bioprocesos convencionales.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se estableció un CPAE para la producción de pVAX1-NH36 hospedado en *E. coli* DH5 α usando un bioreactor tipo tanque, un equipo de filtración de flujo tangencial y bombas para entrada y salida de medio de cultivo configuradas para dar un flujo creciente que mantenga una velocidad específica de crecimiento deseada.

Estudios cinéticos de los CPAE en este trabajo mostraron que esta estrategia de cultivo logro obtener densidades celulares altas ($X \approx 60 \text{ DO}_{600}$), y mantener la velocidad de crecimiento constante. La obtención de la misma relación de crecimiento celular respecto a la fuente de carbono consumido (Y_{XS}) en la etapa de producción del plásmido como en la fase inicial del cultivo respalda el hecho que los CPAE mantienen un ambiente más saludable para las células, en contraste con la estrategia por lote-alimentado.

Resultados experimentales soportan la idea que los CPAE maximizan la producción de plásmido al crecer a un 70-80% de μ_m , durante la etapa perfusiva. Los rendimientos de plásmido obtenidos son comparados con los reportados en cultivos por lote alimentado que utilizan la misma cepa y escala. Sin embargo, la productividad que se obtuvo con esta nueva estrategia fue más del doble al compararse con un resultado reciente de fermentación por lote alimentado en condiciones similares.

Mediante esta técnica de CPAE se logró obtener plásmido de alta pureza ($A_{260}/A_{280} = 1.7 - 2$) y de calidad terapéutica (95% de forma súperenrollada) resaltando la importancia de esta estrategia sobre su efecto positivo en la fisiología celular y la calidad del producto.

Se desarrolló un modelo matemático que describe el comportamiento del sistema. Los resultados de la simulación muestran un buen ajuste con los datos experimentales. Con la simulación se

observó que la concentración inicial de glicerol en el medio de cultivo determina la proporción de etapas (lote – perfusión) y el volumen alimentado al sistema.

De acuerdo a un análisis teórico del CPAE, una estrategia a seguir para mejorar el desempeño del sistema implica el uso de una concentración inicial celular alta, una concentración inicial de sustrato que maximice la productividad y una concentración de sustrato alta en la alimentación que minimice las pérdidas de sustrato, pero que logre una relación de diafiltración saludable para el proceso.

El beneficio del incremento en la productividad de plásmido en el sistema de perfusión con alimentación exponencial debería exceder el incremento en los costos asociado con el equipo periférico adicional requerido en este sistema. La optimización y escalamiento de este nuevo modo de cultivo y accesibilidad a bombas modernas de filtración y manejo de líquidos podrían respaldar este objetivo.

5.2 Recomendaciones

Estudiar la velocidad óptima de la producción del plásmido pVAX1-NH36 en *E. coli* DH5 α en un CPAE.

Estudiar el efecto del uso de una cepa adaptada y otra no adaptada al medio de cultivo sobre el rendimiento, productividad y calidad del plásmido.

Medir impurezas en el CPAE a fin de conocer el nivel de impurezas que tolera el sistema para su buen desempeño.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

Abbink, P.; Larocca, R. A.; De La Barrera, R. A.; Bricault, C. A.; Moseley, E. T.; Boyd, M.; Kirilova, M.; Li, Z.; Ng'ang'a, D.; Nanayakkara, O.; Nityanandam, R.; Mercado, N. B.; Borducchi, E. N.; Agarwal, A.; Brinkman, A. L.; Cabral, C.; Chandrashekar, A.; Giglio, P. B.; Jetton, D.; Jimenez, J.; Lee, B. C.; Mojta, S.; Molloy, K.; Shetty, M.; Neubauer, G. H.; Stephenson, K. E.; Peron, J. P. S.; Zanotto, P. M. d. A.; Misamore, J.; Finneyfrock, B.; Lewis, M. G.; Alter, G.; Modjarrad, K.; Jarman, R. G.; Eckels, K. H.; Michael, N. L.; Thomas, S. J. and Barouch, D. H. Protective Efficacy of Multiple Vaccine Platforms Against Zika Virus Challenge in Rhesus Monkeys. *Science*. **2016**, 353 (6304), 1129-1132.

Aguilar-Be, S. Z. R.; Paraguai S. E.; Borja-Cabrera, G. P.; Rosado-Vallado, M.; García-Miss, M. R.; Palatnik, C. B.; Dumonteil, E. Cross Protective Efficacy of a Prophylactic *Leishmania Donovanii* DNA Vaccine Against Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis. *Infect. Immun.* **2005**, 73 (2), 812-819.

Alton, E. W., Stern, M.; Farley, R.; *et al.* Cationic Lipid-Mediated CFTR Gene Transfer to the Lungs and Nose of Patients with Cystic Fibrosis: A Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Lancet*, **1999**, 353, 947-954.

Bohle, K.; Ross, A. Plasmid DNA Production for Pharmaceutical Use: Role of Specific Growth Rate and Impact on Process Design. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108, 2099-2106.

Bondioli, P.; Della, L. An Alternative Spectrophotometric Method for the Determination of Free Glycerol in Biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, 107, 153-157.

Carnes, A. E. Fermentation Design for the Manufacture of Therapeutic Plasmid DNA. *Bioprocess Int.* **2005**, 2-7.

Carnes, A. E.; Hodgson, C. P.; Williams, J. A. Inducible *Escherichia Coli* Fermentation for Increased Plasmid DNA Production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2006**, 45 (3), 155-166.

Carnes, A. E.; Luke, J. M.; Vincent, J. M.; Shukar, A.; Anderson, S.; Hodgson, C. P.; Williams, J. A. Plasmid DNA Fermentation Strain and Process-Specific Effects on Vector Yield, Quality, and Transgene Expression. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108* (2), 354-363.

Carnes, A. E.; Williams, J. A. Plasmid DNA Manufacturing Technology. *Recent. Pat. Biotechnol.* **2007**, *2* (1), 1-16.

Carnes, A. E.; Williams, J. A. WO06023546 2006.

Caspeta, L.; Flores, N.; Pérez, N. O.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. 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.* **2009**, *102*, 468-482.

Cunningham, D. S.; Koepsel, R. R.; Atai, M. M.; Domach, M. M.; Factors Affecting Plasmid Production in *Escherichia Coli* From a Resource Allocation Standpoint. *Microb. Cell. Fact.* **2009a**, *8*, 1-27.

Cunningham, D. S.; Liu, Z.; Domagalski, N.; Koepsel, R. R.; Atai, M. M.; Domach, M. M. Pyruvate Kinase-Deficient *Escherichia Coli* Exhibits Increased Plasmid Copy Number and Cyclic AMP Levels. *J. Bacteriol.* **2009b**, *191* (9), 3041-3049.

Danquah, M. K.; Forde, G. M. Growth Medium Selection and Its Economic Impact on Plasmid DNA Production. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *104* (6), 490-497.

Davis, H. L.; Whalen, R. G. DNA-Based Immunization. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* **1995**, *5*, 368-387.

Delgado, J.; Liao, J. C. Inverse Flux Analysis for Reduction of Acetate Excretion in *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 361-367.

Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; Prazeres D., M. F. Chromatography of Plasmid DNA. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1069*, 3-22.

Doria-Rose, N. A.; Haigwood, N. L. DNA Vaccines Strategies: Candidates for Immune Modulation and Immunization Regimes. *Methods.* **2003**, *31*: 207-216.

- Duarte, S; Fortes, A; Prazeres, D; Marcos, J. Preparation of Plasmid DNA Polyplexes from Alkaline Lysates by Two-Step Aqueous Extraction Process. *J. Chromatogr.* **2007**, *1164* (1-2), 105-112.
- Fuentes, L. G.; Lara, A. R.; Martínez, L. M.; Ramírez, O. T.; Martínez, A.; Bolívar, F. Gosset, G. Modification of Glucose Import Capacity in *Escherichia Coli*: Physiologic Consequences and Utility for Improving DNA Vaccine Production. *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12* (42).
- Fuller, D. H.; Corb, M. M.; Barnett, S.; Steimer, K.; Haynes, J. R. Enhancement of Immunodeficiency Virus-Specific Immune Responses in DNA-Immunized Rhesus Macaques. *Vaccine.* **1997**, *15*, 924-926.
- Fynan, E. F.; Webster, R. G.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Santoro, J. C.; Robinson, H. L. DNA Vaccines: Protective Immunizations by Parental, Mucosal and Gene-Gun Inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 11478-11482.
- Ghanem, A., Healey, R. and Adly, F. G. Current Trends in Separation of Plasmid DNA Vaccines: A Review. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, *760*, 1-15.
- Gonçalves G. A. L.; Prazeres D., M. F.; Monteiro G. A.; Prather, K. L. J. De Novo Creation of MG1655-Derived E. Coli Strains Specifically Designed for Plasmid DNA Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 611–620
- Goncalves, G. A. L.; Prather K. L. J.; Monteiro G. A.; Carnes A. E.; Prazeres D, M. F. Plasmid DNA Production with *Escherichia coli* GALG20, a pgi-gene knockout Strain: Fermentation Strategies and Impact on Downstream Processing. *J. Biotechnol.* **2014**, *186*, 119–127
- Grunwald, T. and Ulbert, S. 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.
- Hamann, C. W.; Nielsen, J.; Ingerslev, E. WO0028048 2000.
- Han, K. H.; Lim, C.; Hong, J. Acetic Acid Formation in *Escherichia Coli* Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 663-671.
- Han, Y.; Liu, S.; Ho, J. Using DNA as a Drug-Bioprocessing and Delivery Strategies. *Chem. Eng. Res. Des.* **2009**, *87*, 343-348.

Hasan, C. M. M.; Shimizu, K. Effect of Temperature Up-Shift on Fermentation and Metabolic Characteristics in View of Gene Expressions in *Escherichia Coli*. *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 1-13.

Hewitt, C. J.; Nebe-von, C. G.; Nienow, A. W.; McFarlane, C. M. The Use of Multi-Parameter Flow Cytometry to Compare the Physiological Response of *Escherichia Coli* W3110 to Glucose Limitation During Batch, Fed-Batch and Continuous Culture Cultivations. *J. Biotechnol.* **1999**, *75* (2-3), 251-264.

Invitrogen, Life Technology Corporation Web Site. PÁGINA WEB pVAX1™ Catalog no. V260-20 Version C. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pvax1_man.pdf. Published November 11, 2010. Revision date March 2, 2012. Accessed October 10, 2013.

Jilek, S.; Merkle, H. P.; Walter, E. DNA-Loaded Biodegradable Microparticles as Vaccine Delivery Systems and their Interaction with Dendritic Cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *3* (53), 377-390.

Julien, C.; Whitford, W. Bioreactor Monitoring, Modeling, and Simulation. *Bioprocess Int.* **2007**, *5*, 10-17.

Klug, B., Reinhardt, J. and Robertson, J. Current Status of Regulations for DNA Vaccines. In: Gene Vaccines, Josef Thalhamer, Richard Weiss and Sandra Scheiblhofer Eds. NewYork, **2012**, 285-295.

Konstantinov, K.; Kishimoto, M.; Seki, T; Yoshida, T. A Balanced DO-Stat and Its Application to the Control of Acetic Acid Excretion by Recombinant *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 750-758.

Lara, A. R.; Ramírez, O. T.; Wunderlich, M. Plasmid DNA Production for Therapeutic Applications. Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, Third Edition, Methods in Molecular Biology. **2012**, *824*, 271-303 DOI 10.1007/978-1-61779-433-9_14.

Limonta, M. High-Cell-Density Culture to Produce Plasmid DNA for Gene Therapy in *E. coli*. *Bio Pharm.* **2009**, *22* (7).

Lin-Chao, S.; Chen, W.; Wong, T. High Copy Number of the pUC Plasmid Results from a Rom/Rop-Suppressible Point Mutation in RNAll. *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 3385-3393.

Littel-van, D.; Gerdts, V.; Loehr, B. I.; Pontarollo, R.; Rankin, R.; Uwiera, R.; Babiuk, L. A. Recent Advances in the Use of DNA Vaccines for the Treatment of Diseases of Farmed Animals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *43*, 13-28.

Lodmell, D. L.; Parnell, M. J.; Bailey, J. R.; Ewalt, L. C.; Nalón, C. A. One-Time Gene Gun or Intramuscular Rabies DNA Vaccination of Non-Human Primates: Comparison of Neutralizing Antibody Responses and Protection Against Rabies Virus 1 Year After Vaccination. *Vaccine.* **2001**, *20*, 838-844.

Lopes, M. B.; Goncalves, G. A. L.; Felicio-Silva, D., Prather, K. L.J. Monteir, G.A.; Prazeres D., M. F. In situ NIR Spectroscopy Monitoring of Plasmid Production Processes: Effect of Producing Strain, Medium Composition and the Cultivation Strategy. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 255-261.

Lopes, M. B.; Martins, G.; Calado, C. R. C, Kinetic Modeling of Plasmid Bioproduction in *Escherichia coli* DH5 Alpha Cultures Over Different Carbon-Source Compositions. *J. Biotechnol.* **2014**, *186*, 38-48.

Luli, G. W.; Strohl, W. R. Comparison of Growth, Acetate Production and Acetate Inhibition of *Escherichia Coli* Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 1004-1011.

Munguía-Soto, R.; García-Rendón, A.; Garibay-Escobar, A., Guerrero-Germán, P.; Tejeda-Mansir, A. Segregated Growth Kinetics of *E. coli* DH5 α -NH36 in Exponential-Fed Perfusion Culture for pDNA Vaccines Production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2015**, *62*, 796-805.

Nakayama, Y. and Aruga, A. Comparison of Current Regulatory Status for Gene-Based Vaccines in the U.S., Europe and Japan. *Vaccines.* **2015**, *3* (1), 186-202.

O'Kennedy, R.D.; Ward, J. M.; Keshavarz-Moore, E. Effects of Fermentation Strategy on the Characteristics of Plasmid DNA Production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2003**, *37*, 83-90

Okonkowski, J.; Kizer-Bentley, L.; Listner, K.; Robinson, D.; Chartrain, M. Development of a Robust, Versatile, and Scalable Inoculum Train for the Production of DNA Vaccine. *Biotechnol Prog.* **2005**, *4* (21), 1038-1047.

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 Microb. Technol.* **2006**, 39 (3), 391-398

Ow, D. S-W.; Yap, M. G-S.; Oh, S. K-W. Enhancement of Plasmid DNA Yields During Fed-Batch Culture of a fruR-knockout *Escherichia coli* Strain. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2009**, 52, 53-59.

Pablos, T. E.; Soto, R.; Mora E. M.; Le Borgne, S.; Ramirez, O. T.; Gosset, G.; Lara, A. R. Enhanced Production of Plasmid DNA by Engineered *Escherichia Coli* Strains. *J. Biotechnol.* **2011**, 158, 201-212.

Peterson, M; Brune, B. Maximizing Yields of Plasmid DNA Process - High Cell Density Processes Can Produce High Yields Without Compromising Quality. *Biopharm. Int.* **2008**, 16.

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 α). *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 101, 831-836.

Pirt, S. J. Maintenance Energy: A General Model for Energy-Limited and Energy Sufficient Growth, *Archiv. Microbiol.* **1982**, 133, 300-302.

Prather, K. L. J.; Sager, K. S.; Murphy, J.; Chartrain, M. Industrial Scale Production of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy: Plasmid Design, Production, and Purification. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 33, 865-883.

Prazeres D., M. F. Plasmid Biopharmaceuticals: Basics, Applications, and Manufacturing. 2011, ISBN: 978-0-470-23292-7

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. *Biotechnol Annu Rev.* **2001**, 7, 1-30.

Reinikainen, P. and Virkajärvi, I. *Escherichia Coli* Growth and Plasmid Copy Numbers in Continuous Cultures. *Biotechnol. Lett.* **1989**, 11, 225-230.

Seo, J. and Bailey, J. E. Continuous Cultivation of Recombinant *Escherichia Coli*: Existence of an Optimum Dilution Rate for Maximum Plasmid and Gene Product Concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **1986**, 28, 1590-1594.

- Seo, J. and Bailey, J. E. Effects of Recombinant Plasmid Content on Growth Properties and Cloned Gene Product Formation in *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, 27, 1668-1674.
- Shene, C.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Study of Recombinant Microorganism Populations Characterized by Their Plasmid Content per Cell Using a Segregated Model. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2003**, 25 (6), 333-340.
- Shiloach, J.; Kaufman, J.; Guillard, A.S.; Fass, R. Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth, and Recombinant Protein Production by *Escherichia Coli* BL21 (λDE3) and *Escherichia Coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 49, 421-428.
- Silva, F.; Lourenco, O.; Maia, C.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. C. Impact of Plasmid Induction Strategy on Overall Plasmid DNA Yield and *E. Coli* Physiology Using Flow Cytometry and Real-Time PCR. *Process Biochem.* **2011**, 46 (1), 174-181.
- Silva, F.; Passarinha, L.; Sousa, F.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. C. Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 19, 1408-1414.
- Silva, F.; Queiroz J. A.; Domingues F. C. Plasmid DNA Fermentation Strategies: Influence on Plasmid Stability and Cell Physiology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93, 2571–2580.
- Smith, C.; De Prince, R.; Dackor, J.; Weigl, D.; Griffith, J.; Persmark, M. Separation of Topological Forms of Plasmid DNA by Anionexchange HPLC: Shifts in Elution Order of Linear DNA. *J. Chromatogr. B.* **2007**, 854 (1-2), 121-127.
- Tejeda-Mansir, A. and Montesinos, R. M. Upstream Processing of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy Applications. *Recent Pat. Biotechnol.* **2008**, 2, 156-172.
- Urthaler, J.; Schuchnigg, H.; Garidel, P.; Huber, H. Industrial Manufacturing of Plasmid-DNA Products for Gene Vaccination and Therapy. *Gene Vaccines.* **2012**, 1, 311-330.
- Usui, Y.; Hirasawa, T.; Furusawa, C.; Shirai, T.; Yamamoto, N.; Mori, H.; Shimizu, H. Investigating the Effects of Perturbations to Pgi and Eno Gene Expression on Central Carbon Metabolism in *Escherichia Coli* Using C-13 Metabolic Flux Analysis. *Microb. Cell Fact.* **2012**, 11, 87.
- van Reis, R.; Zydney, A. Bioprocess Membrane Technology. *J. Memb. Sci.* **2007**, 297, 16-50.
- Wan, N. C.; Goodrick, J. C. US005487986 1996.

Wiley Online Library: <http://onlinelibrary.wiley.com/>

Williams, J. A.; Carnes A. E.; Hodgson, C. P. Plasmid DNA Vaccine Vector Design: Impact on Efficacy, Safety and Upstream Production. *Biotechnol. Adv.* **2009a**, 27 (4), 353-370.

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. *Biotechnol. Bioeng.* **2009b**, 103 (6), 1129-1143.

Wolfe, A. J. The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 69, 12-50.

Wolff, A. J.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A. Direct Gene Transfer Into Mouse Muscle in Vivo. *Science.* **1990**, 247, 1465-1468.

Wunderlich, M.; Taymaz-Nikerel, H. Gosset, G.; Ramírez, O. T.; Lara, A. R. Effect of Growth Rate on Plasmid DNA Production and Metabolic Performance of Engineered *Escherichia Coli* Strains. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, 117 (3), 336-342.

Yang, Y. T.; San, K.Y.; Bennett, G. N. Metabolic Flux Analysis of *E. Coli* Deficient in the Acetate Production Pathway and Expressing the *B. Subtilis* Acetolactate Synthase. *Metab. Eng.* **1999**, 1, 26-34.

Zabriskie, D. W. and Arcuri, E. J. Factors Influencing Productivity of Fermentations Employing Recombinant Microorganisms. *Enzyme. Microb. Technol.* **1986**, 8, 706-717.

ANEXOS

Artículos publicados

Segregated growth kinetics of *Escherichia coli* DH5 α -NH36 in exponential-fed perfusion culture for pDNA vaccine production

Rodolfo Munguía-Soto¹
Aurora García-Randón¹
Adriana Garibay-Escobar²
Patricia Guerrero-Germán²
Armando Tajeda-Mansir^{4*}

¹Posgrado en Ciencias de la Ingeniería, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

²Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

³Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

⁴Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

Abstract

The clinical demand of plasmid DNA (pDNA) has been increasing constantly. An exponential-fed perfusion (EFP) culture is a new mode for plasmid production for clinical trials and commercialization. However, the culture conditions may lead to cell filamentation and growth cessation. In this study, the variation of the physiological state and the plasmid contents of *Escherichia coli* DH5 α hosting pVAX1-NH36 in an EFP culture for application as a Leishmaniasis vaccine was investigated. The culture performance was monitored using flow cytometry (FC) and real-time quantitative PCR. The FC studies showed a high viability of cell population and a constant distribution of complexity and size. A high homogeneity of pDNA (~95 % of supercoiled) was obtained,

which might be attributed to a better culture environment. The obtained plasmid specific and volumetric yields of 1.8 mg/g dwt and 38.5 mg/L represent typical values for laboratory-scale plasmid production in a defined medium. A segregated kinetic model of the perfusion system was developed and fitted to the experimental data ($R^2 > 0.96$). A practical conclusion of this work is that a space-time yield analysis of a bioprocess requires a viability evaluation. This new strategy of culture operation might help in the efficient production of pDNA for therapeutic use. © 2014 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 62, Number 8, Pages 795–805, 2015

Keywords: exponential fed, growth kinetics, perfusion culture, plasmid DNA

Abbreviations: C , concentration factor; C_p , plasmid extrinsic concentration; F , culture medium feed rate; F_0 , initial feed rate; k , specific first-order kinetic rates; P , specific plasmid yield; λ , fraction rates; R , formation kinetic of species i ; S , glycerol concentrations inside the bioreactor; S_0 , initial glycerol concentration in bioreactor for the EFP phase; S_L , glycerol concentration in the feed medium; S_0 , initial glycerol concentration in bioreactor; t , elapsed time of the entire fermentation; t_0 , initial time of EFP phase or final time of batch phase; V , bioreactor culture volume; X , cell concentration inside the bioreactor; X_0 , dead cells concentration; X_0 , biomass concentration of species i ; X_{0i} , damaged cells concentration; X_0 , biomass concentration at the end of the batch phase; X_0 , viable cells concentration; $Y_{P/X}$, yield coefficient for the batch phase (biomass/glycerol); $Y_{P/X}$, yield coefficient for the EFP phase (biomass/glycerol); α , flow rate factor; μ , specific growth rate; μ_{EFP} , pseudo-steady specific growth rate during EFP phase.

*Address for correspondence: Dr. Armando Tajeda-Mansir, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Blvd.

1. Introduction

The clinical application of plasmid DNA (pDNA) is progressing, and commercial availability for vaccination and gene therapy purposes is approaching toward reality [1, 2]. DNA vaccines allow foreign genes to be transiently expressed in transfected cells, mimicking intracellular pathogenic infection and triggering both humoral and cellular immune responses [3]. Besides simplicity in manipulation and rapid manufacture process,

Luis Enciner y Rivasles, Col. Centro, Hermosillo, CP 83000, Sonora, México. Tel.: +52 662 212 19 95; Fax: +52 662 212 32 71; e-mail: atajeda@guajocan.uson.mx

Received 17 September 2014; accepted 23 December 2014

DOI: 10.1002/abab.1339

Published online 26 August 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

Research Article



Received: 9 February 2016

Revised: 15 April 2016

Accepted article published: 22 April 2016

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/ctb.5011

Performance analysis of exponential-fed perfusion cultures for pDNA vaccines production

Aurora García-Rendón,^a Rodolfo Munguía-Soto,^a Rosa M. Montesinos-Cisneros,^b Roberto Guzman^c and Armando Tejeda-Mansir^{d*}

Abstract

BACKGROUND: The clinical application of plasmid DNA (pDNA) vaccines is progressing and it is essential to develop industrial bioprocesses to economically manufacture these macromolecules. In order to contribute to achieving this goal, in this work an exponential-fed perfusion (EFP) culture for the production of pVAX1-NH36 hostad in *Escherichia coli* DH5 α for application as specific vaccine was investigated using a theoretical–experimental approach.

RESULTS: An experimental plasmid productivity of 3.0 mg L⁻¹ h⁻¹ was obtained, which represent a 1.5-fold increase in the performance criteria. A mathematical model to investigate the system performance was built and validated. A novel aspect of the study is the analysis of the influence of individual model parameters on selected output variables and on scale-up.

CONCLUSIONS: This work contributes to the design and optimization of EFP cultures for the efficient production of pDNA for therapeutic use. The higher productivity of the EFP bioprocess might reduce both capital investment and operational costs and as a result be economically attractive compared with conventional bioprocess.

© 2016 Society of Chemical Industry

Keywords: perfusion cultures; pDNA vaccines; cell-growth modeling; performance analysis

INTRODUCTION

Plasmid DNA (pDNA) vaccine is a promising technology that allows foreign genes to be transiently expressed in transfected cells, mimicking intracellular pathogenic infection and triggering both humoral and cellular immune responses. Beside simplicity in manipulation and rapid manufacturing process, pDNA-based vaccines have inherent features that make them promising vaccine candidates in a variety of diseases.¹ The clinical application of pDNA vaccines is progressing² and it is essential to devise industrial processes whereby pDNA can be economically manufactured.³ However, comprehensive process knowledge is essential and – in terms of Process Analytical Technologies – even requested by regulatory agencies.⁴

Leishmaniasis is an endemic disease mainly in very poor countries, and affects 200 million people worldwide.⁵ The development of a cheap and safe leishmaniasis pDNA vaccine may be the appropriate alternative for these economies.⁶ Leishmaniasis is caused by a protozoan parasite transmitted to humans by a sandfly bite. Clinical manifestations range from self-healing cutaneous lesions to fatal visceral disease. The NH36 gene is one of the most promising candidates for a pDNA vaccine against leishmaniasis since it has already been tested in several animal models.^{7,8}

Escherichia coli K-12 strains are by far the most frequently used host strains for pDNA propagation since they are classified as biologically safe vehicles.⁹ Some *E. coli* lines such DH5 α have been found to be consistently higher producing pDNA in high cell density processes growing in glycerol.¹⁰

The primary goal when designing a bioprocess for pDNA production is to maximize both productivity (kg L⁻¹ yr⁻¹) and specific yield (mg g⁻¹) of supercoiled plasmid.¹¹ Performance of industrial microorganisms as cell factories usually requires careful manipulation of process conditions, or strain improvement.¹² The establishment of a high yield and high quality pDNA production process can be affected by growth rate, plasmid size and other cultivation conditions.^{13,14}

It is generally accepted that the plasmid content in *E. coli* is inversely proportional to its growth rate. The use of reduced growth rate is the unifying principle in high quality and high yield plasmid fermentations. High growth rates have been associated with plasmid instability and lower percentages of supercoiled

* Correspondence to: A. Tejeda-Mansir, Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Luis Encinas y Rosales, Col. Centro Hermosillo, Sonora, México, CP 63000. E-mail: atejedamansir@uason.mx

^a Science and Engineering Graduate Program, University of Sonora, Luis Encinas y Rosales, Col. Centro Hermosillo, Sonora, México CP 63000

^b Department of Mathematics, University of Sonora, Luis Encinas y Rosales, Col. Centro Hermosillo, Sonora, México CP 63000

^c Department of Chemical and Environmental Engineering, University of Arizona, 1801 E. University Street, Tucson, AZ 85721

^d Department of Scientific and Technological Research, University of Sonora, Luis Encinas y Rosales, Col. Centro Hermosillo, Sonora, México CP 63000