REVISIÓN

Producción de ADN plasmídico para la terapia génica y vacunas terapéuticas o preventivas en seres humanos: un reto para la industria farmacéutica

✉ Raysa Vázquez[1], José E Brito[1], Mariela Pérez[1], Ricardo Silva[2], Alina Seralena[2], Santiago Dueñas-Carrera[2], Maida C Frontela[3], Antonieta M Herrera[2]

[1]Desarrollo Biofarmacéutico
[2]División de Farmacéuticos
[3]Dirección de Control de Calidad
Dirección de Producción, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: 53-7-2718675; E-mail: raysa.vazquez@cigb.edu.cu

RESUMEN

En los últimos 10 años, la tecnología de la vacunación con ADN se ha desarrollado de manera vertiginosa, debido a que muchos investigadores la consideran una opción atractiva, sobre todo por ser relativamente sencilla y económica. En este trabajo se discuten los aspectos que pudieran ayudar al diseño de un proceso de producción eficiente de ADN plasmídico con calidad farmacéutica para su empleo en seres humanos. En el estudio se emplearon el plasmidio pIDKE2S (codificante para la proteína E2 del virus de la hepatitis C), el pADN-VEGF (codificante para el factor de crecimiento del endotelio vascular) y el pCGV (codificante para la proteína gumboro para la profilaxis de la enfermedad de Gumboro) en forma de vacuna de ADN.

Palabras clave: vacuna de ADN, plasmidio, purificación a gran escala

Biotecnología Aplicada 2005;22:246-250

ABSTRACT

Production of plasmid DNA for use in gene therapy and as therapeutic or preventive vaccines in humans: a challenge for the pharmaceutical industry. The DNA vaccine technology has had a rapid development in the last 10 years being considered as an attractive option because its relatively simple and economical way of achievement. Here, we discuss the issues related to the design of an efficient production process for pharmaceutical-grade plasmid DNA for human use, using as study cases the plasmid DNA pIDKE2S (encoding the Hepatitis C virus E2 protein) and the pADN-VEGF (encoding the vascular endothelial growth factor). And pharmaceutical-grade plasmid DNA CGV encoding for Gumboro antigens.

Key words: DNA vaccine, plasmid, large-scale purification

*I*ntroducción

El surgimiento de la terapia génica a finales de la década del setenta y el hallazgo que evidenció la factibilidad del empleo de ADN plasmídico para transfectar directamente células animales *in vivo* [1] a principio de los años noventa constituyeron el punto de partida para el desarrollo de una nueva tecnología: la inmunización con ADN desnudo.

En la actualidad esta tecnología se está desarrollando de manera rápida y amplia, en estudios preclínicos con modelos animales para la obtención de respuesta inmune protectora de tipo humoral y celular contra enfermedades de origen viral [2-6], bacteriano [7], tumoral [8-10] o parasitario [11], y tiene particular importancia en la inducción de linfocitos T citotóxicos (LTC) $CD8^+$ [2, 12, 13].

En esta investigación se ofrecen elementos que permiten evaluar hasta qué punto se podrá afrontar hoy el difícil reto de producir ADN plasmídico con los requerimientos exigidos por las autoridades reguladoras [14], para una vacuna basada en esta tecnología.

*A*lgunas características de la terapia y la vacunación con ADN

Con respecto a otras vacunas, la inmunización con ADN es una alternativa atractiva que posee entre sus principales ventajas potenciales:

· Es similar a las vacunas vivas atenuadas, pero sin riesgo de infección.

· Puede suministrarse en combinaciones de diversos inmunógenos en una misma preparación, lo que permite la inmunidad simultánea contra varias entidades o contra variantes de una misma entidad.

· Posee mayor estabilidad genética y térmica del ADN con respecto a las proteínas.

· Se pueden hacer nuevas vacunas con identidad genética en un tiempo más breve.

· Permite desarrollar vacunas contra agentes que no han crecido en cultivo.

· Es posible generar una respuesta inmune de larga duración y una mediada por linfocitos T auxiliadores $CD4^+$ (Ta).

· La respuesta inmune puede modularse mediante procedimientos relativamente sencillos.

· No existe interferencia por anticuerpos maternos.

*P*urificación de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico a escala de laboratorio es una técnica que permite obtener ADN para ser usado en experimentos tan sensibles como la secuenciación, el mapeo génico y otros, en los que la pureza del material genético empleado es determinante. Estos procedimientos implican operaciones como

✉ Autor de correspondencia

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science 1990;247:1465-8.

2. Yankauckas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dwarki VJ, *et al*. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. DNA Cell Biol 1993;12:771-3.

3. Donnelly JJ, Martínez D, Jansen KU, Ellis RW, Montgomery DL, Liu MA. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. J Infect Dis 1996; 713:314-20.

4. Cardoso AI, Blixenkrone-Moller M, Fayolle J, Liu M, Buckland R, Wild TF. Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. Virology 1996; 225:293-9.

5. Bot A, Bot S, García-Sastre A, Bona C. DNA immunization of newborn mice with a plasmid-expressing nucleoprotein of influenza virus. Viral Immunol 1996;9: 207-10.

ultracentrifugación con gradiente de CsCl [15] y extracción líquido-líquido, concentración, precipitación como vía de concentración o purificación con solventes orgánicos [16]. Procesos como el método basado en la precipitación con polietilenglicol, aun cuando se han reportado para estudios de inmunización con ADN en animales [17], son de difícil escalado y conllevan operaciones abiertas, con pocas probabilidades de ser consideradas sanitarias.

Por ello, algunas de las principales compañías farmacéuticas y biotecnológicas del mundo, como Vical Inc. (Estados Unidos), Apollon Inc. (Estados Unidos) y Therexsys Ltd. (Reino Unido), y grupos de universidades tecnológicas como el *Centre for Bioprocess Engineering* (Universidad de Birmingham, Reino Unido), han trabajado en el establecimiento de procesos tecnológicos para la producción, a gran escala, de ADN plasmídico para uso terapéutico o como vacunas en seres humanos.

Para satisfacer el mercado potencial para una vacuna de ADN, es necesario disponer de un proceso de purificación a gran escala que sea reproducible, que cumpla con los requisitos exigidos por las instituciones reguladoras [14] y mediante el cual se obtenga una cantidad de ADN, estimada entre 10 y 500 mg por dosis, aunque en ocasiones se han usado hasta 5 mg por dosis en seres humanos [18, 19].

Requisitos de los vectores empleados en la terapia y la inmunización con ADN

Es indispensable que el plasmidio que se emplee para inmunizar sea totalmente secuenciado y caracterizado mediante análisis de restricción y electroforesis.

Los vectores construidos en nuestro laboratorio para la inmunización de seres humanos con ADN reúnen las características exigidas para estos fines, es decir, tienen un número elevado de copias en *Escherichia coli*, contienen el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pITCMVh), que es el más empleado debido a su fortaleza, promiscuidad y poca homología con secuencias de mamíferos, son suficientemente compactos, pues carecen de secuencias que no son imprescindibles para su funcionalidad y, por lo tanto, la posibilidad de que exista homología con el hospedero es mínima. Además, solo contienen origen de replicación en *E. coli* y presentan el gen que confiere resistencia a la kanamicina como marcador de selección en bacteria.

Especificaciones de calidad del producto

El proceso de producción de ADN para vacunas en seres humanos, debe diseñarse de manera que se obtenga un plasmidio con las especificaciones de calidad establecidas para este tipo de producto. La pureza, identidad, eficacia, potencia y seguridad son aspectos fundamentales que se deben tener en cuenta.

Al igual que en otros productos, la potencia y la seguridad se relacionan con la pureza, debido a que los contaminantes pueden inducir efectos no deseados o no específicos del producto.

Si bien algunos de estos requerimientos no pueden ser establecidos *a priori*, como las dosis y la ruta en que va debe aplicarse el ADN plasmídico, existen regulaciones que se deben observar y cumplir [14].

Los ensayos de actividad biológica se deben realizar con el objetivo de comparar, *in vitro*, el producto del gen producido por el vector de expresión con el producto natural. Si es posible, se debe disponer de un modelo animal que permita esta prueba *in vivo*.

El estudio de los contaminantes debe estar enfocado hacia la presencia de pirógenos, trazas de proteínas, ADN y ARN celulares, contaminación microbiana y otros [14].

Cepas de bacterias empleadas como hospederas

No existe un consenso acerca de las características fenotípicas o genotípicas de las cepas de bacterias más convenientes para la producción de ADN a gran escala.

Los criterios de selección de la cepa de *E. coli* como hospedero para la producción de plasmidio se basan, entre otros, en la gran estabilidad del plasmidio, su elevada densidad celular, la poca probabilidad de provocar modificaciones genéticas en la molécula plasmídica y su compatibilidad con los pasos de purificación posteriores. Entre las cepas más reportadas están *E. coli* K-12: TG 1, XL-1 Blue, JM109 DH 5a y DH 10B (GIBCO BRL).

En nuestro laboratorio se han obtenido los mejores resultados con la cepa *E. coli* DH 10B, crecida en un medio *Terrific Broth* (TB). Otros autores han reportado que la optimización de este paso, en el que está implicada la cepa hospedera, el plasmidio y el medio de crecimiento empleados en la fermentación, han mostrado resultados de hasta 50 mg de plasmidio por litro de cultivo [20, 21].

Sistema de bancos de células

El establecimiento de los bancos de células, tanto el primario como el de trabajo, es uno de los pasos más críticos en la producción de ADN plasmídico. El procedimiento para ello está bien fundamentado, ya que esta práctica no es exclusiva de este tipo de producción [22].

Los bancos de células primarios y de trabajo son cultivos microbiológicamente puros, únicos de células hospederas transformadas con el plasmidio. Estos cultivos se deben caracterizar con exhaustividad, escencialmente en cuanto a su viabilidad, pureza, estabilidad plasmídica, restricción y secuencia nucleotídica del gen. Las características cinéticas como la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación también es preciso tenerlas en cuenta. Los bancos se conservan a -70 °C o en nitrógeno líquido, con el empleo de glicerol o DMSO como crioprotector.

Algunas consideraciones acerca de las principales etapas del proceso de producción

En las principales etapas del proceso de producción de vacunas de ADN para seres humanos se usa como modelo:

· ADN plasmídico que contiene el gen que codifica para la proteína E2 del virus de la hepatitis C (pIDKE2S);

6. Hassett DE, Zhang J, Whitton JL. Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge. J Virol 1997;71: 7881-8.

7. Tanghe A, Lefevre P, Denis O, D'Souza S, Braibant M, Lozes E, *et al*. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. J Immunol 1999;162: 1113-9.

8. Chen L, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:110-4.

9. Hofland H, Huang L. Inhibition of human ovarian carcinoma cell proliferation by liposome-plasmid DNA complex. Biochem Biophys Res Com 1995;207:492-6.

10. Saito H. Induction of humoral and cellular anti-idiotypic immunity by intradermal injection of naked DNA encoding a human variable region gene sequence of an immunoglobulin heavy chain in B cell malignancy. Gene Therapy 1996;3:988-93.

11. Mor G, Klinman DM, Shapiro S, Hagiwara E, Sedegah M, Norman JA, *et al*. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. J Immunol 1995;155:2039-46.

12. Lowrie DB, Silva CL, Tascon RE. DNA vaccines against tuberculosis. Immunol Cell Biol 1997;75:591-4.

13. Denis O, Tanghe A, Palfliet K, Jurion F, Van den Berg T, Vanonckelen A, *et al*. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD^{4+} and CD^{8+} T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. Infection and immunity 1998;66:1527-33.

14. Guidlines for assuring the quality of DNA vaccines (final draft). US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA; 1997.

15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Purification of closed circular DNA by equilibrium centrifugation in CsCL ethidium bromide gradients. In: Molecular cloning 1. A Laboratory Manual. 2da. ed. Cold Sprig Harbor Laboratory Press; 1989.p.42-7.

16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Purification of plasmid DNA by precipitation with polyethylene glycol. In: Molecular cloning 1. A Laboratory Manual. 2da. ed. Cold Sprig Harbor Laboratory Press 1989. p.40-2.

17. Herrera AM, López-Campistrous AE, Román C, Sández B, Hayes O, Hechavarría M, *et al*. Use of plasmid DNA purified by PEG precipitation for *in vivo* transfection in mice. Minerva Biotec 1997;9:25-8.

18. Catarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandorason A, Sandstrom E, *et al*. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. Lancet 1998;351:1320-5.

· ADN plasmídico que contiene el gen que codifica para el factor de crecimiento del endotelio vascular (pADN-VEGF);

· ADN plasmídico que contiene el gen que codifica para la proteína gumboro (pCGV).

Un proceso general para la producción incluye los pasos representados en el esquema de la figura 1.

El pIDKE2S (4 558 pb) [23] es un vector para la inmunización con ADN que codifica para la proteína E2 del virus de la hepatitis C (aa 384-717 de la poliproteína viral de un aislamiento del VHC en Cuba). Actualmente, en el mundo hay más de 170 millones de personas infectadas por el VHC y no existe una vacuna disponible contra este patógeno [24]. En particular, la proteína E2 del virus resulta un atractivo candidato vacunal, puesto que contiene abundantes epitopos de tipo humoral y celular y parece estar implicada en la interacción con el receptor celular del virus. La secuencia codificante para la E2 en el pIDKE2S se mantiene bajo el control de la unidad compuesta por el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (pITCMVh) y las señales de terminación de la transcripción y el procesamiento del ARNm, provenientes del virus de simios 40 (SV 40 SE/pA). Contiene, además, un origen de replicación en *E. coli* (ori) y el gen que le confiere la resistencia a la kanamicina.

Por su parte, el ADN plasmídico del factor de crecimiento del endotelio vascular se emplea para la terapia génica en el tratamiento de la cardiopatía isquémica y de la isquemia crítica de los miembros inferiores, padecimientos que constituyen un problema de salud a nivel mundial [25]. Esta es una proteína con actividad angiogénica. El pADN-VEGF es un vector (4 039 pb) para la inmunización con ADN, que expresa al gen que codifica para el VEGF bajo el control del pITCMVh (1-641) y las señales de terminación de la transcripción y el procesamiento del ARNm provenientes del virus 40 de simios (SV 40 726-1334). Contiene, además, un origen de replicación en *E. coli* (ori) pUC y el gen que le confiere resistencia a la kanamicina.

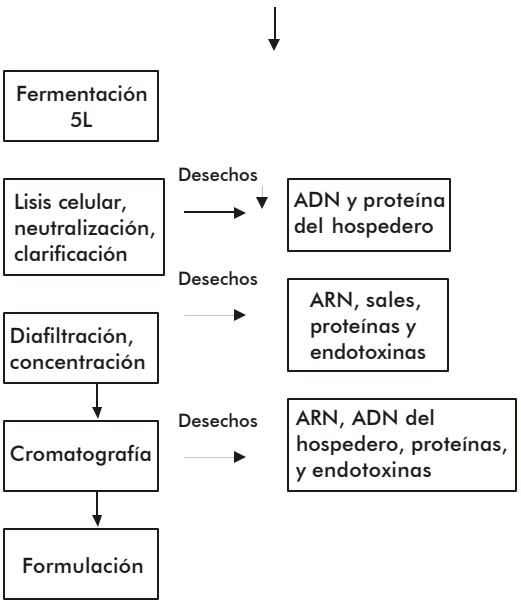

Figura 1. Proceso de purificación, a gran escala, del ADN plasmídico.

Como tercer modelo de estudio se escogió el plasmidio pCGV (3 600 pb), para la profilaxis de la enfermedad de Gumboro (se emplea en forma de vacuna de ADN). Esta es una afección ampliamente distribuida, que provoca niveles elevados de inmunosupresión en las aves, de ahí la importancia de su estudio para la avicultura. El plasmidio pCGV contiene el casete de expresión en células de mamíferos, el promotor de CMV, múltiples sitios de clonación, SV40, un origen de replicación pBR y el gen que le confiere resistencia a la ampicillina, una secuencia de poliadenilación y el fragmento de 688 pares de bases, Nco I-Sal I, proveniente del plasmidio pGC y que fue insertado en el sitio Xba I - Sal I del plasmidio pAEC-Δ2, donado por A. Herrera (CIGB, La Habana, 1999).

Para la producción de los plasmidios pIDKE2S y pADN-VEGF se fermentaron 5 L durante 6 horas. Al inicio de la fase logarítmica, se cambió la temperatura de crecimiento del cultivo de 37 a 42 °C, lo que permitió incrementar los rendimientos de pADN. Esto se debe a que, aunque el número de copias de los plasmidios dentro de la célula está regulado negativamente, en los plasmidios pUC existe una mutación provocada por un cambio de una base G por una A [26], que ocasiona cambios conformacionales en la molécula ARN II, lo cual impide su unión al ARN I. La formación del complejo ARN I-ARN II imposibilita el inicio de la replicación del plasmidio a partir de su origen de replicación [27]. El efecto de esta mutación es un aumento anormal del número de copias de plasmidios por célula, mayor aun con el incremento de la temperatura de cultivo hasta 42 o 45 °C [27].

Las condiciones para la fermentación de las células que contienen pCGV fueron: 5 L de cultivo, 100 rpm, 0.5 vvm, pH igual a 8, 37 °C durante 6 h, hasta obtener una DO_{530} final igual a 10. El pH en los cultivos se controló con soluciones de H_3PO_4 (al 40%) y NaOH [40].

Lisis celular, procesamiento primario y concentración

La ruptura celular fue mediante la lisis alcalina, con el empleo de un agitador de paleta para lograr homogeneizar la muestra, ya que cuando se le añade la disolución amortiguadora de lisis (0.2 M NaOH-1% SDS) aumenta mucho la viscosidad. Además, fue necesario mantener el pH por debajo de 13, para evitar la hidrólisis del ADN y reducir el tiempo de la operación al máximo posible. A pesar de esas limitaciones, esta es una operación escalable y sanitaria muy asequible [21-23]. El parámetro del pH es crítico, ya que se ha reportado que los valores por encima de 12.5 provocan la desnaturalización irreversible del plasmidio [21, 24]. Luego de la ruptura, se realizó la neutralización con ácido acético y acetato de potasio, a una molaridad de 1.6 M y un valor de pH igual a 5. Posteriormente, para la eliminación del ADN celular desnaturalizado y de los restos de células rotas se realizó una filtración con el empleo de filtros miracloth (CALBIOCHEM, Alemania). Este paso permite prescindir de la cen-

19. Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase I safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. Vaccine 1999;17:2826-9.

20. Ayazi Shamlou, P. Scalable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA. Biotechnol & Appl Biochemistry;2003.

21. DoHHS. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals;1993.

22. Lahijani R, Hulley G, Soriano G, Horn NA, Marquet M. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. Hum Gene Ther 1996;16:1971-80.

23. Dueñas-Carrera S, Álvarez-Lajonchere L, Álvarez-Obregón JC, Pérez A, Acosta-Rivero N, Vázquez DM, Martínez G, Viña A, Pichardo D, Morales J. Enhancement of the immune response generated against the hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids. Biotechnol Appl Biochem 2002;35:205-12.

24. Inchauspe G, Feinstone S: Development of a hepatitis C virus vaccine. Clin Liver Dis 2003;7:243-59.

25. Ojalvo AG, Seralena A, Vázquez R, Montequín JF, Vispo NS, Silva R, ALdama A, Puchades Y, Sorell LT, López-Saura P, Alfonso MA, Simón R, Ali A, Seuc A, Herrera L. Therapeutic angiogenesis following intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor 121 in a dog model of hindlimb ischemia. Electronic J Biotechnol 2003;6:208-22.

26. Kendall D, Lye GJ, Levy MS. Purification of plasmid DNA by an Integrated Operation Comprising Tangential Flow Filtration and Nitrocellulose Adsorption. Biotechnology and Bioengineering 2002;79(7):817-22.

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

trifugación que prolongaría, innecesariamente, el tiempo de degradación al que está expuesto el ADN plasmídico por la acción de las nucleasas aún presentes en la preparación. Después se concentró y diafiltró con filtración tangencial, mediante cartuchos de fibra hueca de 0.1 μm, lo que facilitó la eliminación grosera de ARN, contaminante mayoritario de la preparación [26], así como de proteínas, sales y endotoxinas presentes en esta.

Purificación final y formulación

Para la obtención del ADN puro, se realizó una cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech, Suecia), para lograr la separación de proteínas y nucleasas contaminantes del ADN plasmídico. Con la adición de sales, como el NaCl, a una concentración de 0.7 M, a la solución de equilibrio, se logra reducir los enlaces inespecíficos a la matriz, lo que facilita la unión de la molécula de ADN, seguido por un lavado con la propia disolución. El ADN plasmídico es eluido a 1 M de NaCl en solución TE (tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8).

Seguidamente, se llevó a cabo una cromatografía en filtración en gel Sephacryl S-1 000 (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia), cuyo diámetro de poro es aproximadamente 400 nm, equilibrada con solución salina de NaCl al 0.9%. Esta operación es lenta, de capacidad limitada, ya que para lograr una resolución adecuada, el volumen de muestra aplicada en la columna debe ser menor del 10% del volumen total de la resina. A pesar de esas limitaciones, con este tipo de cromatografía se puede obtener un recobrado del 50% aproximadamente, libre de pirógenos, de trazas de proteínas, de ADN cromosomal y de ARN. El ADN se obtuvo a una concentración óptima, acorde con la dosis que se debe emplear (0.5 a 1 mg/mL), y es la óptima para la terapia y la inmunización. Además, el ADN obtenido después del paso por la cromatografía de tamiz molecular, presenta más del 90% de su estructura en forma superenrollada, lo cual coincide con lo reportado para este tipo de producto y exhibe, además, los niveles de pureza requeridos para ser empleado en seres humanos y como vacuna [23].

Control de calidad

El proceso de producción establecido, además de ser reproducible, debe garantizar que el producto cumpla con las especificaciones de calidad vigentes.

Se afirma que lograr productos biológicos con calidad no consiste en certificar la calidad de estos, sino en validar el proceso de su producción.

Para controlar los bancos de células, tanto el maestro como el de trabajo, debe disponerse de métodos que confirmen la identidad de la bacteria hospedera, para poder comprobar sus características fenotípicas y genotípicas, el tiempo de duplicación, la confirmación de la morfología, las características metabólicas, el análisis de restricción y la secuencia de ADN, lo cual asegura la calidad y consistencia del producto que se obtiene [14, 20].

Para garantizar la calidad del ADN producido, se deben desarrollar métodos analíticos que demuestren su identidad, pureza, esterilidad y potencia.

La identidad del plasmidio se evaluó mediante un análisis de restricción y secuenciación (datos no mostrados). La concentración del ADN plasmídico se determinó por la absorbancia a 260 nm. Además, se calculó la relación ADN-proteína, la cual alcanzó valores iguales a 1.8 [20, 22, 29-33].

Otros contaminantes como el ADN genómico y el ARN, se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% [34]. La proteína contaminante se determinó por el método de BCA (ácido bicinconínico) [35].

El porcentaje de plasmidio en forma superenrollada en la preparación final constituye un punto importante. Los lotes finales se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, y se observó más del 90% del ADN en forma superenrollada (Figura 2). Esto se relaciona con la potencia del producto, ya que el ADN lineal es más susceptible a ser degradado *in vitro* por exonucleasas. Hasta hoy, varios reportes indican que este tiene un comportamiento similar *in vivo* [36-38]. Según estos ensayos, el ADN final cumple con las especificaciones de calidad del producto (Tabla 1).

Conclusiones

En la actualidad, la producción eficiente, a gran escala, de ADN plasmídico con calidad farmacéutica constituye un proceso que requiere experiencia y un nivel técnico elevado. No obstante, es posible establecer

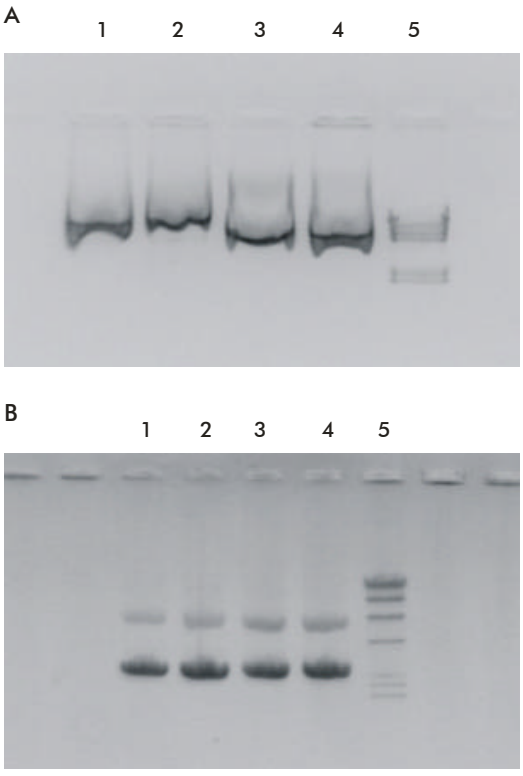

Figura 2. A: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los lotes finales de material puro. Carril 1 corresponde a 1 μg del pIDKE2S (lote 1); carril 2 corresponde a 1 μg del pIDKE2S (lote 2); carril 3 corresponde a 1 μg del pADN-VEGF (lote 1); carril 4 corresponde a 1 μg del pADN-VEGF; carril 5 corresponde a Lambda Hind III, marcador de peso molecular. B: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los lotes finales de material puro del plasmidio pCGV. Carril 1 corresponde a 1 μg/lote 1; carril 2 corresponde a 1 μg/lote 2; carril 3 corresponde a 1 μg/lote 3; carril 4 corresponde a 1 μg/ lote 4, carril 5 corresponde a Hind III, marcador de peso molecular.

28. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res 1979;7:1513-23.

29. Horn NA, Meek JA, Budahazi G, Marquet M. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. Hum Gene Ther 1995;6:565-73.

30. Ferreira GN, Cabral JM, Prazeres DM. Development of process flow sheets for the purification of supercoiled plasmids for gene therapy applications. Biotechnology Prog 1999;4:725-31.

31. Prazeres DM, Schluep T, Cooney C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. J Chromatogr A 1998; 806:31-45.

32. Braas G, Searle P, Slater N, Lyddiatt A. Strategies for the isolation and purification of retroviral vectors for gene therapy. Bioseparation 1996;6:211-28.

33. Caplen NJ, Gao X, Hayes P, Elaswarapu R, Fisher G, Kinrade E, *et al*. Gene therapy for cystic fibrosis in human by liposome-mediated DNA transfer: the production of resources and the regulatory process 1994;1:139-47.

una tecnología rentable, con resultados satisfactorios y reproducibles, que cumpla los requisitos exigidos por las instituciones reguladoras.

En los tres casos estudiados se obtuvo un rendimiento promedio por lote de 120 mg, libre de contaminantes inespecíficos.

El proceso de obtención de ADN establecido para uso terapéutico y vacunas cumple las regulaciones establecidas para este tipo de producto (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados promedio de cuatro lotes de plasmidio obtenidos.

Etapas	pVEGF	pIDKE2S	pGumboro
Recobrado	150±0.12 mg/lote	110±0.11 mg/lote	123±0.12 mg/lote
Pureza	≥ 90% ADN superenrollado	≥ 90% ADN superenrollado	≥ 90% ADN superenrollado
Proteína	No se detecta	No se detecta	No se detecta
Pirógeno	Satisfactorio	Satisfactorio	Satisfactorio
Esterilidad	No se detecta crecimiento de colonias	No se detecta crecimiento de colonias	No se detecta crecimiento de colonias
ADN cromosomal	No se detecta	No se detecta	No se detecta
Identidad	4 039 pb	4 558 pb	3 600 pb
Residuo de solventes orgánicos (Etanol absoluto)	40 ppm	40 ppm	40 ppm
Características organolépticas	No se observan partículas en la muestra	No se observan partículas en la muestra	No se observan partículas en la muestra
pH	6.6	6.6	6.6

Agradecimientos

A las subdirecciones de Desarrollo, Investigaciones Biomédicas, Control Analítico, y el Bioterio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, en especial a Ivonne Perera Pérez y Madeline Paneque Zayas, por su aporte en la obtención de los resultados de esta investigación.

34. Sambrook J, *et al*. Molecular Cloning: A laboratory Handbook, CSH Press;1989.

35. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bi-cinchoninic acid. Anal Biochem 1985; 150:76-85.

36. Marquet M, Horn NA, Meek JA. Process development for the manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy. Biopharm 1995;8:26-37.

37. Lahijani R, Duhon M, Lusby E, Betita H, Marquet M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. Hum Gene Ther 1998; 9:1173-80.

38. Weintraub H, Cheng PF, Conrad K. Expression of transfected DNA depends on DNA topology. Cell 1986;46:115-22.

Recibido en diciembre de 2004. Aprobado en marzo de 2005.