



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN COMO VEHÍCULO PARA LA  
ADMINISTRACIÓN DE ANTÍGENOS VÍA MUCOSA

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M en C. SILVIA ANDREA MORENO MENDIETA

DIRECTOR DE TESIS  
DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DRA. CLARA ESPITIA PINZÓN  
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*La humanidad necesita gente práctica que haga su trabajo lo mejor posible sin olvidar el interés general. Pero también precisa de soñadores, para quienes perseguir el suyo sea algo tan apremiante que les resulte imposible preocuparse demasiado por sus beneficios materiales.*

*Marie Salomea Skłodowska*

*Ina*

# MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN COMO VEHÍCULO PARA LA ADMINISTRACIÓN DE ANTÍGENOS VÍA MUCOSA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas se realizó bajo la dirección de la Dra. Romina Rodríguez Sanoja en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán

Se reconoce la colaboración de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y de quien fuera su colaborador el Dr. Antonio Vallecillo quienes amablemente proporcionaron los templados para las construcciones utilizadas en este proyecto. También se reconoce su apoyo para la realización de los experimentos de cultivo celular de células de bazo llevados a cabo en su laboratorio.

Se reconoce la asesoría y apoyo de los Doctores Clara Espitia, Rogelio Hernández y Sergio Sánchez durante el desarrollo del trabajo doctoral.

Se reconoce la colaboración de la Bióloga Laura Escalante y de los Doctores Beatriz Ruiz y Daniel Guillén por su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT (211376). El proyecto también fue apoyado por CONACYT (131149) y por DGAPA-UNAM (209410 y 222113) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

- Presidente:** Dr. Sergio Sánchez Esquivel.  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IIB.
- Secretario:** Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.  
Departamento de Inmunología, IIB.
- Vocal:** Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo.  
Facultad de Medicina.
- Vocal:** Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán.  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, IIB.
- Vocal:** Dra. Leticia Moreno Fierros.  
Unidad de Biomedicina, FES Iztacala.

*Esta tesis está dedicada:*

*A mis adorados hijos Emiliano y Martín, porque con su existencia llenan mi vida de motivación, valor y felicidad infinitos. Ellos me inspiran a ser mejor en todo, todos los días de mi vida.*

*A mi amado esposo Augusto César, porque su amor incondicional, su fe en mí y su acompañamiento han sido pilar fundamental de mis logros.*

*A mi adorada madre Silvia Mendieta y a mi hermano Juan Víctor por todo su amor, su apoyo absoluto, su sacrificio estando separados.*

*A toda mi familia y amigos en Colombia, especialmente a mis suegros por creer en nosotros y apoyar generosamente este proyecto. Por todos sus esfuerzos y también por su sacrificio estando lejos.*

*A mi gran familia mexicana y a todos los que de alguna manera contribuyeron a la realización de este proyecto de vida.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a México, país de puertas abiertas, porque me ha permitido disfrutar de toda la belleza de su tierra y la bondad de su gente. Por su acogida generosa y su importante y valiosa contribución a mi formación como persona y como científica a través de instituciones como el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la UNAM. Por todos los amigos y familia que me ha brindado y por ser la cuna de mis adorados hijos.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de su alma máter, por los espacios para el libre pensamiento, el crecimiento intelectual, cultural, artístico y humano que me ha ofrecido. Por brindarme el espacio físico para concretar muchos sueños.

Agradezco a la Dra. Romina por la oportunidad que me brindó de formar parte de su grupo de investigación y por ofrecerme el espacio y los recursos para la realización de este trabajo. También agradezco su orientación y el tiempo dedicado para compartir conmigo sus conocimientos y experiencia.

A la Dra. Clara y al Dr. Rogelio por formar parte de mi comité tutorial y compartir conmigo su experiencia durante todos estos años. También por su orientación y buena disposición siempre para atender mis inquietudes.

Al Dr. Sergio por su apoyo profesional y siempre oportuno y a todos los miembros de su grupo de investigación por el espacio ofrecido para la retroalimentación académica.

A los miembros de mi jurado de examen Dr. Sergio Sánchez, Dra. Clara Espitia, Dra. Leticia Moreno, Dr. Mauricio Trujillo y Dr. Edgar Zenteno por sus valiosas observaciones sobre esta tesis y que contribuyeron a mejorar el manuscrito.

A todos los compañeros de laboratorio: Silvia, Caty, Daniel, Ana, Paola, Jocelyn, Laura, Benjamín, Ricardo, Oliver, Karina, Javier, a todos los que están y a los que ya se fueron, por convertirse en mi familia durante las largas jornadas de trabajo, por ofrecerme cada uno su amistad, su apoyo, su ejemplo y su experiencia. De todos he aprendido algo y con todos he vivido momentos inolvidables.

A mis queridos amigos Negrette Garay, por ser mi familia colombiana en México, por ser compañeros en esta travesía de perseguir un sueño lejos de nuestra tierra. Por su apoyo incondicional, porque compartiendo nuestros sueños de construir un mejor país y una mejor América Latina hemos fortalecido nuestros valores, nuestras convicciones y amistad.

A mis queridos amigos Antonio y Paula, por todo su apoyo y su cariño, también por enriquecer mi vida con su experiencia y sus conocimientos. A todos mis amigos y amigas y gran familia en México...Gracias!

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
 <b>CAPÍTULOS</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTEDECENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. MÓDULOS DE FIJACIÓN A CARBOHIDRATOS.....	3
2.2. DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN DE LA $\alpha$ -AMILASA DE <i>Lactobacillus amylovorus</i> .....	5
2.2.1. Caracterización.....	5
2.2.2. Aplicaciones.....	8
2.3. USO DE MICROPARTÍCULAS DE POLÍMEROS COMO VEHÍCULO DE ANTÍGENOS.....	9
2.3.1. Micropartículas de almidón.....	12
2.3.2. La proteína alfa cristalina (Acr) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> como modelo....	14
<b>3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
3.1. JUSTIFICACIÓN.....	19
3.2. HIPÓTESIS.....	19



<b>4. OBJETIVOS</b> .....	20
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
5.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CON EL DFA <sub>tag</sub> DERIVADO DEL DFA DE LA $\alpha$ -AMILASA DE <i>L. amylovorus</i> .....	21
5.1.1. Construcción de plásmidos.....	21
5.1.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante.....	22
5.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ADSORCIÓN DE LA PROTEÍNA Acr-DFA <sub>tag</sub> SOBRE GRÁNULOS DE ALMIDÓN INSOLUBLE.....	24
5.2.1. Ensayos cualitativos de adsorción.....	24
5.2.2. Ensayos cuantitativos de adsorción.....	25
5.3. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN CONDICIONES SIMULADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL.....	26
5.3.1. Pruebas de estabilidad en Fluido Gástrico Simulado (FGS).....	26
5.3.2. Pruebas de estabilidad en Fluido Intestinal Simulado (FIS).....	27
5.4. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOGÉNICO DEL SISTEMA.....	27
5.4.1. Pruebas de inmunización activa en ratones BALB/c.....	27
5.4.2. Toma de muestras y determinación de anticuerpos.....	29
5.4.3. Ensayos de estimulación <i>in vitro</i> de esplenocitos y producción de INF- $\gamma$ .....	30
5.4.3.1. Extracción de células totales de bazo.....	31
5.4.3.2. Cultivo y determinación de INF- $\gamma$ en sobrenadante.....	31
5.4.4. Análisis estadístico.....	32
<b>6. RESULTADOS</b> .....	33
6.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Acr-DFA <sub>tag</sub> .....	33
6.2. ENSAYOS DE ADSORCIÓN SOBRE ALMIDÓN INSOLUBLE.....	35
6.3. ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CONDICIONES SIMULADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL....	37

6.4. POTENCIAL INMUNOGÉNICO DEL SISTEMA ACARREADOR.....	40
6.4.1. Respuesta inmune humoral sistémica: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-Acr.....	41
6.4.2. Niveles séricos de Isotipos IgG anti-Acr.....	42
6.4.3. Producción de INF- $\gamma$ <i>in vitro</i> y en tracto respiratorio.....	44
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
8.1. CONCLUSIONES.....	54
8.2. PERSPECTIVAS.....	55
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
<b>Apéndice 1.</b> Adjuvants in tuberculosis vaccine development.....	87
<b>Apéndice 2.</b> The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification.....	98
<b>Apéndice 3.</b> A novel antigen-carrier system: The <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Acr protein carried by raw starch microparticles.....	107

## LISTA DE FIGURAS

Nro.		Página
2.1.	Representación esquemática de diferentes tipos de CBMs.....	4
2.2.	Esquema representativo de la estructura de la $\alpha$ -amilasa de <i>L.amylovorus</i> .....	6
2.3.	Afinidad de los módulos del DFA por el almidón, analizada por isotermas de adsorción.....	7
2.4.	Interacciones de un MFC26 con su sustrato.....	8
2.5.	Incidencia por Tuberculosis Pulmonar en México para el año 2011.....	15
2.6.	Mapa tridimensional de la proteína Acr1 de <i>M. tuberculosis</i> .....	18
5.1.	Protocolos de inmunización y esquemas de toma de muestras.....	29
6.1.	Ensayo de expresión de Acr-DFA <sub>tag</sub> utilizando IPTG como inductor.....	33
6.2.	Ensayo de expresión de Acr utilizando IPTG como inductor.....	34
6.3.	Purificación de Acr-DFA <sub>tag</sub> por cromatografía de afinidad a $\beta$ -ciclodextrina.....	35
6.4.	Purificación de Acr por cromatografía de afinidad a metal por tallo de His....	35
6.5.	Isotermas de adsorción de Acr-DFA <sub>tag</sub> sobre gránulos de almidón insoluble...	36
6.6.	Ensayo cualitativo de adsorción sobre almidón insoluble.....	36
6.7.	Cinética de degradación de Acr-DFA <sub>tag</sub> en FGS.....	39
6.8.	Cinética de degradación de Acr-DFA <sub>tag</sub> en FIS.....	40
6.9.	Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-Acr en ratones inmunizados.....	42
6.10.	Niveles séricos de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-Acr en ratones inmunizados.....	43
6.11.	INF- $\gamma$ liberado <i>in vitro</i> por esplenocitos de ratones inmunizados con la proteína recombinante Acr-DFA <sub>tag</sub> libre o inmovilizada.....	45
6.12.	INF- $\gamma$ en homogenizado de pulmón de ratones inmunizados con la proteína recombinante Acr-DFA <sub>tag</sub> libre o inmovilizada.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Nro.</b>		<b>Página</b>
2.1.	Micropartículas de polímeros como sistemas de liberación.....	10
2.2.	Características físico químicas del almidón de maíz y arroz.....	14
2.3.	Descripción de la proteína Acr.....	18
5.1.	Oligonucleótidos con el sitio de reconocimiento BamHI.....	22
5.2.	Distribución de tratamientos para el protocolo de inmunización activa.....	29
6.1.	Análisis <i>in silico</i> de Acr-DFA <sub>tag</sub> .....	38
6.2.	Radio IgG2a/IgG1.....	44

## LISTA DE ANEXOS

Nro.	Página
5.A. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN.....	65
5.B. PCR y PRUEBA DE GRADIENTE.....	72
5.C. OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pQAcr-DFA <sub>tag</sub> .....	73
5.D. INMOVILIZACIÓN DE $\beta$ -CICLODEXTRINA EN COLUMNA DE SEFAROSA.....	74
5.E. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE Acr-DFA <sub>tag</sub> POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A METAL.....	75
5.F. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA PRIMARIA.....	77
5.G. CURVAS ESTÁNDAR DE ANTICUERPOS.....	79
5.H. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD Y CONTEO CELULAR.....	82
6.A. SECUENCIA Y ALINEAMIENTO DE Acr-DFA <sub>tag</sub> .....	83
6.B. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE Acr-DFA <sub>tag</sub> SOBRE GRÁNULOS DE ALMIDÓN INSOLUBLE.....	85

---

---

## ABREVIATURAS

---

---

**ABTS:** Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

**Acr:** Alfa cristalina.

**BCG:** Bacilo Calmette Guérin.

**CBM:** Módulo de Fijación a Carbohidrato (del inglés Carbohydrate Binding Module).

**CD:** Célula dendrítica.

**CPA:** Célula presentadora de antígeno.

**DC:** Dominio Catalítico.

**DFA:** Dominio de Fijación al Almidón.

**DPBS:** Buffer fosfato salino Dulbecco (del inglés Dulbecco's phosphate-buffered saline).

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**FGS:** Fluido gástrico simulado.

**FIS:** Fluido intestinal simulado.

**GFP:** Proteína Verde Fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein).

**GH:** Glucósido hidrolasa.

**HES:** Hidroxietil almidón (del inglés hydroxyethylstarch).

**HSA:** Albúmina Sérica Humana (del inglés Human Serum Albumin).

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

**MALT:** Tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés mucosa associated lymphoid tissue)

**MDR-TB:** Tuberculosis Multidrogo-resistente (del inglés Multi-Drug-Resistant Tuberculosis).

**MFC:** Módulo de Fijación a Carbohidratos.

**OPD:** o-fenilendiamina dihidrocloruro (del inglés o-Phenylenediamine dihydrochloride).

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés pathogen-associated molecular patterns).

**PLG:** Acido poli láctido-co-glicólido.

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride)

**RI:** Región intermedia.

**RF:** Región flanqueante.

**RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

**sHsp:** Proteína de choque térmico pequeña (del inglés small heat shock protein).

**TB:** Tuberculosis.

**TBP:** Tuberculosis pulmonar.

---

---

## RESUMEN

---

---

La asociación de proteínas o péptidos con micropartículas de biopolímeros, es una estrategia para el transporte de antígenos hasta los sitios de procesamiento e inicio de la respuesta inmune en mucosas como la intestinal y la nasal. No sólo se puede estabilizar y retener la actividad biológica del péptido o proteína inmovilizada, sino que también se puede inducir respuesta inmune a nivel local y/o sistémico. Sin embargo, el proceso de inmovilización sobre micropartículas generalmente requiere la preparación del soporte y el uso de compuestos químicos no deseados y métodos complejos para favorecer la unión covalente del antígeno. En consecuencia, se pueden presentar preocupaciones relacionadas con la inocuidad y un incremento en los costos.

En el presente proyecto de tesis, se propone un sistema para la administración de antígenos vía mucosa, utilizando micropartículas de almidón crudo como acarreador y un Dominio de Fijación al Almidón (DFA<sub>tag</sub>) como tallo para la inmovilización no covalente de proteínas antigénicas. La utilidad del DFA<sub>tag</sub> como herramienta para la purificación de proteínas recombinantes y para la adsorción específica de proteínas sobre micropartículas de almidón ha sido demostrada por el grupo de investigación y ha permitido explorar nuevas aplicaciones biotecnológicas como la que se propone en este trabajo.

Para evaluar y demostrar la utilidad del sistema como vehículo para la administración de antígenos vía mucosas, primero se construyó la proteína recombinante Acr-DFA<sub>tag</sub>, constituida por el DFA<sub>tag</sub> y la proteína alfa cristalina (Acr) de *Mycobacterium tuberculosis*, un antígeno de la fase latente de la enfermedad. Dicha proteína se purificó por afinidad a  $\beta$ -ciclodextrina e inmovilizó y estabilizó sobre gránulos de almidón crudo para su posterior administración por vía oral e intranasal a ratones BALB/c sin el uso de adyuvantes. Los ensayos de inmunización revelaron que bajo un esquema de administración de dosis repetidas cada 21 días, la proteína recombinante tanto en su forma libre como inmovilizada en las



micropartículas de almidón fue capaz de llegar hasta los sitios de reconocimiento e inducción de la respuesta inmune en mucosas, pues fue posible detectar anticuerpos IgG antígeno específicos en el suero de ratones que recibieron el tratamiento por ambas vías. Por el contrario, animales que solo recibieron el antígeno Acr no tuvieron respuesta, indicando que por sí mismo dicho antígeno no es inmunogénico y que tanto la fusión como la inmovilización contribuyeron con su inmunogenicidad. En los sueros de los animales que recibieron la proteína inmovilizada también se pudo detectar un título mayor de anticuerpos IgG2a, revelando que el sistema de inmovilización favoreció la inducción de una respuesta de tipo celular como se pudo corroborar con los niveles de INF- $\gamma$  más altos detectados tanto en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos como en los homogenizados de pulmón de los animales inmunizados con la proteína inmovilizada en las micropartículas de almidón. Con estos resultados se demuestran el potencial inmunogénico y adyuvante del sistema y en consecuencia su utilidad como vehículo para la administración de antígenos vía mucosas. Junto con las ventajas derivadas de las propiedades del almidón (biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad) y del protocolo de inmovilización que no requiere la elaboración y/o funcionalización de las micropartículas, resaltamos su aplicabilidad en el campo de desarrollo de sistemas de transporte de antígenos y el diseño de vacunas de subunidades con propiedades adyuvantes y que puedan ser utilizadas en humanos.

---

---

## ABSTRACT

---

---

The association of proteins or peptides with microparticles of biopolymers is a strategy for carrying antigens to the sites of processing and initiation of the immune response in intestinal and nasal mucosae. Not only is possible to stabilize and retain the biological activity of the immobilized protein or peptide, but also is possible to induce immune responses to local and/or systemic level. However, the process of immobilization on microparticles generally requires the preparation of the matrix, and the use of undesirable chemicals and complex methods to promote the covalent attachment of the antigen. Consequently, there may be safety concerns and increased costs.

In this thesis project, a system for mucosal antigen administration using raw starch microparticles as carrier and a Starch Binding Domain (SBD<sub>tag</sub>) as tag for the non-covalent immobilization of antigenic proteins is proposed. The usefulness of SBD<sub>tag</sub> as a tool for recombinant protein purification and for specific protein adsorption on starch microparticles has been demonstrated by the research group and allowed to explore new biotechnological applications such as the one proposed in this work.

To evaluate and demonstrate the utility of the system as a vehicle for the mucosal administration of antigens, the Acr-SBD<sub>tag</sub> recombinant protein was constructed. This protein consisted of the SBD<sub>tag</sub> and the alpha crystalline protein (Acr) from *Mycobacterium tuberculosis*, an antigen of the latent phase of the disease. The protein was purified by affinity chromatography using  $\beta$ -cyclodextrin and was immobilized and stabilized on raw starch granules for subsequent administration by oral and intranasal routes to BALB/c mice without the use of adjuvants. The immunization studies revealed that under a scheme of consecutive doses each 21 days, the recombinant protein both in its free form and immobilized on starch microparticles was able to reach the sites of recognition and induction of immune responses in mucosae, thus was possible to detect antigen-specific IgG antibodies in the serum of mice that received the

treatment by both routes. By contrast, animals that only received the Acr antigen did not answer, indicating that this antigen itself is not immunogenic and that both fusion and immobilization contributed to its immunogenicity. In the sera of the animals receiving the immobilized protein a higher titer of IgG2a antibodies was also detected, revealing that the immobilization system favored the induction of a cellular response as corroborated with the higher levels of INF- $\gamma$  detected both in the culture supernatant of splenocytes and in lung homogenates of the mice immunized with the protein immobilized on starch microparticles. These results demonstrate the immunogenic and adjuvant potential of the system and therefore its usefulness as a vehicle for the mucosal administration of antigens. Along with the benefits derived from the starch properties (biocompatibility, biodegradability and safety) and the immobilization protocol that does not require the preparation and/or functionalization of microparticles, we highlight its applicability in the field of development of carrier systems and the design of subunit vaccines with adjuvant properties that can be used in humans.

---

---

# 1 INTRODUCCIÓN

---

---

Entre los Módulos de Fijación a Carbohidratos (CBMs por sus siglas en inglés) los Dominios de Fijación al Almidón (DFAs) tienen un enorme potencial de aplicación, ya que pueden ser usados como dominios auxiliares para la purificación e inmovilización de proteínas utilizando como matriz al almidón o sus análogos, cuyas excelentes propiedades físicas, abundancia y bajo costo resultan de interés para la industria y la investigación (Ji *et al.*, 2003; Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005a).

El potencial de un Dominio de Fijación al Almidón de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* (DFA<sub>tag</sub>) como tallo de afinidad para la inmovilización y purificación de proteínas se evaluó y demostró en trabajos previos en el laboratorio. Mediante interacciones hidrofóbicas estabilizadas por puentes de hidrógeno, este dominio permite la adsorción específica de cualquier proteína sobre gránulos de almidón insoluble. Los primeros estudios se hicieron fusionando la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) con el DFA<sub>tag</sub>, observándose que no se afectó el plegamiento del péptido fusionado y que además se confirmó la capacidad de adsorción de dicha proteína sobre los gránulos de almidón (Pérez, 2008). También se demostró que esta adsorción específica permite a su vez la purificación de proteínas fusionadas con el dominio, directamente sobre el almidón o sobre análogos estructurales como la  $\beta$ -ciclodextrina partiendo del extracto crudo bacteriano con excelentes rendimientos y grado de pureza (Guillén *et al.*, 2013).

Como consecuencia de estos hallazgos se buscaron proteínas antigénicas que al ser fusionadas con este dominio pudieran ser inmovilizadas y estabilizadas en el gránulo de almidón para que al ser administradas a un modelo animal vía oral e intranasal, pudieran atravesar las barreras de pH y proteasas del medio y así alcanzar los sitios de procesamiento e inicio de la respuesta inmune. De esta forma se busca evaluar el potencial de las

micropartículas de almidón como acarreador de proteínas antigénicas inmovilizadas con el DFA<sub>tag</sub> y ampliar así el espectro de aplicaciones biotecnológicas del domino.

Este sistema para el transporte de proteínas resulta ventajoso dado que no existen antecedentes directos del uso de gránulos de almidón insoluble como acarreador de antígenos. Las investigaciones existentes se han realizado con micropartículas de maltooligosacáridos acrilados para permitir la unión covalente de proteínas para inmunización oral (Wikingsson and Sjöholm, 2002; Rydell and Sjöholm, 2004). Los estudios mostraron que la adición de polímeros hacía más lenta la hidrólisis del almidón soluble y protegía al antígeno durante el trayecto por el tracto gastrointestinal. Incluso se demostró la efectividad de las micropartículas conjugadas como adyuvante (Sternman *et al.*, 2004; Sternman *et al.*, 2006). También se han utilizado microesferas de dextrano y mezclas de almidón/ácido poliacrílico en diferentes relaciones como vehículo de proteínas para inmunización, demostrándose la capacidad de las formulaciones para inducir respuesta sistémica de anticuerpos (Sajadi-Tabassi *et al.*, 2008; Coucke *et al.*, 2009). En todos los casos sin embargo, los protocolos de inmovilización son complejos, costosos y de inocuidad cuestionable puesto que las micropartículas requieren modificaciones químicas para permitir la unión covalente del antígeno y en consecuencia la adición de compuestos orgánicos no deseados para pruebas *in vivo*.

Esta tesis abarca la aplicación del DFA<sub>tag</sub> como tallo para la purificación de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*, en concreto de la proteína de choque térmico Acr. También evalúa la contribución de la inmovilización de la proteína frente a condiciones extremas de pH y presencia de proteasas y finalmente, explora la aplicación del DFA<sub>tag</sub> y las micropartículas de almidón crudo como vehículo para la administración de este antígeno vía mucosas. Parte de los resultados forman parte de la patente Mx/a/2012/005765 y se encuentran en la sección de apéndices en forma de artículos publicados en revistas especializadas, a los que se hace referencia en los capítulos de resultados y discusión.

---

# 2 ANTECEDENTES

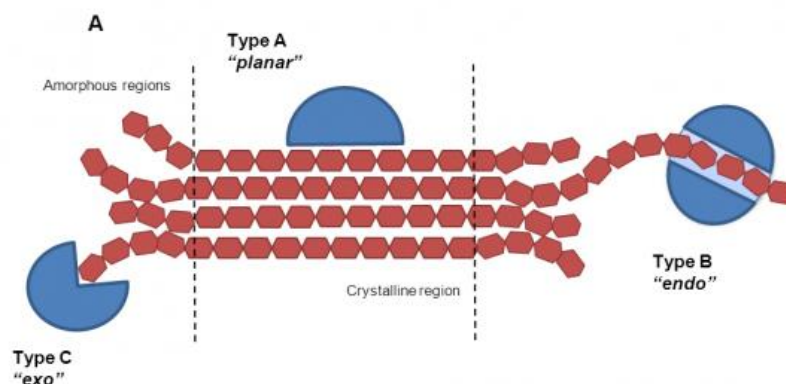
---

## 2.1. MÓDULOS DE FIJACIÓN A CARBOHIDRATOS

Los polisacáridos estructurales como la celulosa, la quitina y el almidón, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, están arreglados en estructuras insolubles que constituyen los principales componentes de plantas, hongos y otros organismos. Para la degradación y utilización de estos polisacáridos, los animales, plantas y microorganismos han evolucionado en la producción de toda una maquinaria de enzimas que los reconocen y degradan (Beckham *et al.*, 2014). Estos cocteles enzimáticos están compuestos principalmente de Glucósido Hidrolasas (GHs) con función coordinada y en ocasiones sinérgica para un eficiente rompimiento de los enlaces glucosídicos. Las GHs son enzimas multidominio (clasificadas en 133 familias de acuerdo a su secuencia aminoácida) que pueden contener, además del dominio catalítico, módulos no catalíticos como los dominios de reconocimiento y unión de carbohidratos (Cantarel *et al.*, 2009).

La estructura, función y los mecanismos de reconocimiento y unión por parte de estos Módulos de Fijación a Carbohidratos (CBMs por sus siglas en inglés), han sido motivo de estudio desde hace varios años (Boraston *et al.*, 1999; Shoseyov *et al.*, 2006). Los CBMs se han definido como módulos auxiliares de 40 a 200 aminoácidos que poseen un plegamiento discreto con actividad independiente de fijación a carbohidrato. No tienen actividad catalítica y por lo general se presentan como una secuencia contigua en los extremos amino o carboxilo terminal de enzimas multimodulares que degradan, modifican o crean enlaces glucosídicos. De forma excepcional pueden presentarse como parte de celulosomas o como dominios independientes (Boraston *et al.*, 2004).

Aunque la conformación estructural más común entre estos módulos es en barril  $\beta$ -sándwich, la topografía del sitio de interacción es realmente la determinante para la especificidad, en especial la ubicación de los aminoácidos aromáticos y la forma del sitio de unión que es especular al ligando. Es por esto que en base a su topología y ligando, se ha propuesto la clasificación de los CBMs en las familias A, B y C (figura 2.1). En la familia tipo A, el sitio de unión tiene una superficie hidrofóbica plana rica en aminoácidos aromáticos que reconoce los polisacáridos cristalinos, especialmente celulosa y quitina; en la tipo B (endo), el sitio de unión presenta un surco donde se acomodan las cadenas internas de 4 o más unidades de monosacáridos; y en la tipo C (exo), el sitio de unión reconoce mono, di y trisacáridos ubicados en los extremos del polisacárido en una interacción tipo lectina (Boraston *et al.*, 1999).



**Figura 2.1.** Representación esquemática de diferentes tipos de CBMs y su unión con las diferentes regiones de un polisacárido. Fuente: [http://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding\\_modules](http://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules)

Por otra parte, y de acuerdo a su secuencia aminoácida, los CBMs se clasifican en 69 familias. Con esta última clasificación, anotada en la base de datos CAZy, la cual está en constante actualización (Cantarel *et al.*, 2009), se espera no solo identificar nuevos módulos sino predecir los posibles plegamientos y especificidad de unión, identificar residuos críticos para la interacción y revelar relaciones evolutivas (Janeček *et al.*, 2011).

La ubicación, arreglo e incluso especificidad de los CBMs puede ser variable en la misma enzima o entre enzimas dando como resultado diversidad de funciones. Entre estas cabe resaltar su participación en la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima solubilizada, la disrupción de la estructura del polisacárido para aumentar la disponibilidad del sustrato y la unión de proteínas sobre la superficie celular (Guillén *et al.*, 2010). Esto sin dar menor importancia a su papel en el reconocimiento de polisacáridos de plantas y su

implicación como factores de patogenicidad y virulencia (Dumas *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2013).

## **2.2. DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN DE LA $\alpha$ -AMILASA DE *Lactobacillus amylovorus***

Entre los CBMs son de particular interés los Dominios de Fijación al Almidón (DFAs). Estos se encuentran presentes en cerca del 10% de las enzimas multidominio involucradas en el metabolismo del almidón tales como  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas, ciclodextrin-gluconotransferasas y glucoamilasas, ubicándose generalmente en el extremo carboxilo terminal (Svensson *et al.*, 1989).

Los DFAs se encuentran distribuidos, de acuerdo a su secuencia aminoácida en 11 familias de las 69 existentes de CBMs: CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48, CBM53, CBM58 y CBM69 (CAZy: [http://www.cazy.org/fam/acc\\_CBM.html](http://www.cazy.org/fam/acc_CBM.html)).

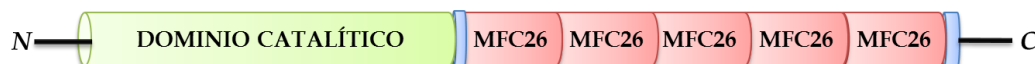
Dada la abundancia y versatilidad del almidón, las aplicaciones biotecnológicas que pueden tener estos dominios pueden ser variadas abarcando áreas como la industria farmacéutica, biomédica y alimentaria. En el presente trabajo, el modelo de estudio es un DFA derivado del DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*, una bacteria ácido láctica con capacidad amilolítica aislada de residuos de maíz para alimentar ganado (Nakamura, 1981). Este dominio resulta de especial interés pues presenta una estructura poco usual en comparación con dominios de unión de otras  $\alpha$ -amilasas (Giraud and Cuny, 1997) lo que ha llevado a su estudio y caracterización.

### **2.2.1. Caracterización**

*L. amylovorus* sintetiza una  $\alpha$ -amilasa que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 del almidón para liberar maltosa, dextrinas y oligosacáridos de longitud variable. El gen de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* codifica una proteína madura de 953 aminoácidos con un PM de 105 kDa. Esta proteína presenta dos dominios funcionales: un dominio catalítico (DC) en la región N-



terminal, que acorde a su secuencia aminoácida pertenece a la familia 13 de las glucósido hidrolasas, y un DFA en la región C-terminal formado por casi 500 aminoácidos organizados en 5 módulos idénticos en tándem (figura 2.2). Estos módulos están flanqueados por dos regiones (RFs) una de 35 nucleótidos en 5' y otra de 21 nucleótidos en 3' (Giraud and Cunny, 1997). A diferencia del DFA de las amilasas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus manihotivorans* que también poseen módulos repetidos (4 en vez de 5) el de *L. amylovorus* no presenta Regiones Intermedias (RIs) ricas en Ser, Gly o Thr entre módulos (Morlon-Guyot *et al.*, 2001). Este arreglo en tándem, no es usual, ya que el número máximo de módulos en tándem reportado en DFAs de amilasas es de dos. En consecuencia, se buscó caracterizar su funcionalidad y la contribución de cada módulo en el proceso de adsorción.



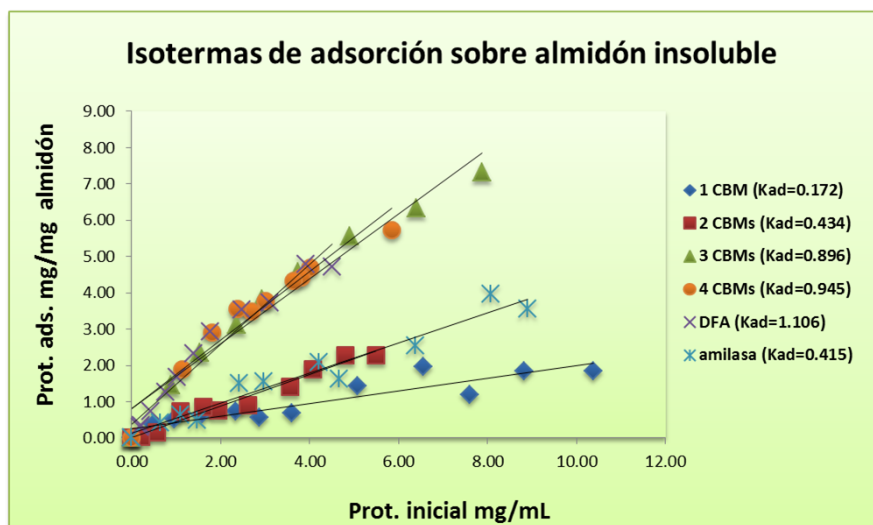
**Figura 2.2.** Esquema representativo de la estructura de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*.

Para esto, se realizaron varios estudios a fin de observar la relación estructura función. Los primeros se hicieron con clonas que codifican tanto para la forma entera (AmyA) como truncada (AmyA $\Delta$ ) de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*, demostrándose que las secuencias repetidas del extremo C-terminal constituyen el DFA, ya que se requieren para la unión al almidón insoluble y son indispensables para su hidrólisis (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000).

También se realizaron, estudios comparativos de los DFAs de las  $\alpha$ -amilasas de *L. plantarum* y *amylovorus* cuyos genes comparten más del 98% de identidad y cuya diferencia principal radica en el número de módulos en tándem presentes (4 en *L. plantarum* vs 5 en *L. amylovorus*). Se observó que la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* hidroliza 10 veces más almidón insoluble que la de *L. plantarum* aunque no hay diferencia entre la capacidad de ambas enzimas para degradar sustratos solubles (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005a).

Posteriormente y para buscar si en el proceso de adsorción participan los módulos como una unidad o por separado, se construyeron péptidos de uno, dos, tres, cuatro y cinco módulos aislados del dominio catalítico para realizar ensayos de adsorción con cada uno y comparar con la  $\alpha$ -amilasa completa. Se encontró que cada módulo puede unirse de forma independiente y que hay un incremento en la adsorción en función del número de módulos presentes. Sin embargo, el incremento en la adsorción conforme aumenta el número de

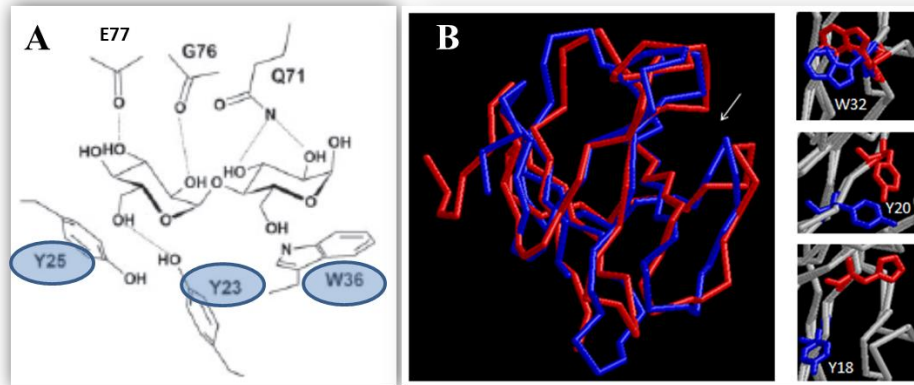
módulos no es lineal sugiriendo un efecto cooperativo subsecuente a la unión del primer módulo (figura 2.3). Incluso se observó que la amilasa completa no se une al sustrato con los 5 módulos, posiblemente debido a un impedimento estérico (Guillén *et al.*, 2007). En este contexto, la cantidad de proteína adsorbida no sólo depende de su concentración inicial sino de la cantidad de módulos involucrados y es directamente proporcional a la superficie del gránulo disponible.



**Figura 2.3.** Afinidad de los módulos del DFA por el almidón, analizada por isotermas de adsorción. Adaptada de Guillén *et al.*, 2007. Kad=Constante de adsorción.

Por su parte, los estudios estructurales de la interacción entre estos dominios y el sustrato se han llevado a cabo utilizando técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear (NMR por sus siglas en inglés) y la mutagénesis sitio-dirigida. En todos los casos se ha visto que los residuos aromáticos como el triptófano y la tirosina resultan críticos para la interacción, pues la unión con el sustrato está mediada principalmente por interacciones hidrofóbicas estabilizadas con puentes de hidrógeno (Boraston *et al.*, 2004). En el caso particular de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* y mediante análisis de mutagénesis sitio-dirigida, se identificaron tres aminoácidos (dos tirosinas y un triptófano) como esenciales para el reconocimiento y la unión. Las mutaciones en Y18L y Y20L disminuyeron la capacidad de unión del DFA, mientras que la mutación en W32L condujo a la pérdida total de afinidad con sustratos tanto lineales como ramificados (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2009). Este resultado está en concordancia con lo reportado por Boraston *et al.* (2006) quien encontró la presencia de un solo sitio de unión en el

DFA de la amilasa maltogénica de *Bacillus halodurans*; miembro de la familia CBM26, al igual que el DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* (ver figura 2.4).



**Figura 2.4.** Interacciones de un CBM26 con su sustrato. **A.** Esquema que representa la interacción de la amilasa de *Bacillus halodurans* con maltosa. En la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* dichos residuos corresponden a W32, Y18 y Y20. **B.** Comparación de la estructura tridimensional del CBM26 de *B. halodurans* (en rojo) y la estructura tridimensional del CBM26 de *L. amylovorus* (en azul) obtenida con el programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>). Fuente: Boraston *et al.*, 2006; Armenta, 2014).

### 2.2.2. Aplicaciones

Por sus características bioquímicas, y gracias a que permiten adsorber a los gránulos de almidón proteínas no relacionadas, los DFAs tienen enorme potencial como dominios auxiliares para la purificación e inmovilización de proteínas, para la fabricación de portadores de proteínas a base de almidón y la diversificación en la estructura de los polímeros de almidón (Ji *et al.*, 2003). En consecuencia, las aplicaciones pueden ser variadas incluyendo el desarrollo de kits de purificación o detección, biosensores, sistemas para el transporte de moléculas como péptidos o fármacos, rastreo *in vivo* de fusiones inmovilizadas, entre otras.

En el caso particular del DFA derivado del DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*, los estudios cinéticos y de adsorción realizados previamente demostraron que es posible controlar la adsorción de cualquier proteína al sustrato, ampliando las posibilidades para utilizar este dominio en aplicaciones que requieran la inmovilización de proteínas. La primera fusión de este DFA<sub>tag</sub> se hizo con la proteína verde fluorescente (GFP). Se demostró que la proteína recombinante GFP-DFA<sub>tag</sub> no sólo se podía purificar por cromatografía de afinidad a  $\beta$ -ciclodextrina (un análogo estructural del almidón) sino que también se podía inmovilizar en el

gránulo de almidón según se pudo observar en los ensayos de fluorescencia (Pérez, 2008). Con este primer resultado que demostró que es posible adsorber proteínas no relacionadas a los gránulos de almidón mediante el DFA<sub>tag</sub> y aparentemente sin afectar la funcionalidad de la proteína fusionada, se han buscado otras proteínas de interés en biomedicina para fusionar con este dominio. En concreto se han buscado proteínas antigénicas procedentes de diferentes microorganismos patógenos, para explorar así el potencial del almidón como acarreador de estos antígenos inmovilizados vía DFA<sub>tag</sub> hasta los sitios de reconocimiento y procesamiento antigénico en mucosa después de su administración por diferentes vías.

### **2.3. USO DE MICROPARTÍCULAS DE POLÍMEROS COMO VEHÍCULO DE ANTÍGENOS**

Los sistemas particulados como liposomas, micro y nano partículas han tenido un enorme impacto en un amplio rango de aplicaciones biomédicas. Además de ser utilizados en biosensores, como matriz para separación por afinidad, marcaje celular y cell sorting (Suri *et al.*, 2013), se usan especialmente para la liberación controlada y focalizada de moléculas terapéuticas como hormonas, agentes anti-inflamatorios, péptidos y antígenos.

Especialmente, se han realizado esfuerzos significativos para el mejoramiento y desarrollo de nuevos sistemas para el transporte de fármacos y antígenos (O'Hagan and Valiante, 2003; Zhao *et al.*, 2014). Debido a sus ventajas únicas como tamaño en el rango de micrones y amplia área superficial para su funcionalización y cargado de moléculas, las micropartículas han sido utilizadas ampliamente con este propósito (Tan *et al.*, 2010). Su tamaño, forma y material dependen del uso que tendrá la micropartícula y son parámetros cruciales que pueden modular significativamente su función, en especial cuando se usan como acarreadores de antígenos y fármacos pues pueden impactar en el reconocimiento y captura por parte de las células blanco del sistema inmune (Suri *et al.*, 2013). Se sabe que las micropartículas en el rango de 1 a 10  $\mu\text{m}$  promueven la presentación de antígenos al sistema inmune, facilitando su fagocitosis y presentación por parte de células especializadas conocidas como células presentadoras de antígeno (CPAs) con la consecuente activación de la respuesta inmune (Reddy *et al.*, 2006). Así mismo se sabe que las micropartículas fabricadas con materiales naturales y sintéticos como los poli láctido-co-glicólidos (PLGAs por sus siglas en

inglés) son bien toleradas. Desde hace muchos años estos materiales han sido los principales candidatos para la fabricación de micro o nano partículas utilizadas como sistemas de transporte y liberación de moléculas para uso en humanos. Debido a que los productos de su metabolismo, el ácido láctico y el ácido glicólico, pueden ser bien tolerados y eliminados por el organismo, estos materiales se han clasificado como biodegradables y biocompatibles (O'Hagan *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2010). En la tabla 2.1 se presentan los principales materiales utilizados para la fabricación de micropartículas, sus ventajas y usos generales. Sin embargo es importante mencionar que en todos los casos y sin importar el material, se requieren reacciones químicas como la acilación o la alquilación entre otras, para la funcionalización de las micropartículas y permitir así la inmovilización covalente de antígenos o moléculas, o se requieren compuestos químicos como la carbodiimida y el glutaraldeído entre otros para el entrecruzamiento o encapsulación (Datta *et al.*, 2014), lo que conlleva a gastos mayores, protocolos complejos de preparación y a preocupaciones concernientes con el impacto ambiental y la inocuidad.

**Tabla 2.1.** Micropartículas de polímeros como sistemas de liberación.

<b>MATERIALES NATURALES</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>USOS</b>
Quitósán	Polisacárido catiónico formado de unidades de glucosamina con enlaces $\beta$ (1→4). Obtenido por la deacetilación de la quitina, polímero presente en el exoesqueleto de insectos y crustáceos marinos.	-Biocompatibilidad -Biodegradabilidad -Abundancia de aminas primarias que lo hacen soluble en soluciones ácidas, lo que elimina el uso de químicos orgánicos durante su síntesis. -Mayor tiempo de residencia en mucosa.	-Liberación oral de antígenos y fármacos como la insulina. -Liberación de toxoides diftérico y tetánico. -Liberación de DNA y RNA.
Alginato	Copolímero no ramificado de ácido D-manurónico y L-gulurónico con enlaces $\beta$ (1→4) derivado de las algas marinas.	-Biocompatibilidad -Baja inmunogenicidad -Condiciones suaves de preparación sin el uso de solventes orgánicos. -Se pueden entrecruzar con cloruro de calcio y quitósán para mejorar el perfil de liberación.	-Microencapsulación de proteínas, drogas y células. -Liberación oral y nasal de antígenos.
Gelatina	Forma desnaturalizada del colágeno de origen animal.	-Excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad.	-Liberación prolongada de citotóxicos y antibióticos
Celulosa-Acetato-Butirato (CAB)	Homopolímero de unidades de glucosa con uniones $\beta$ (1→4) derivado de la celulosa.	-Biodegradabilidad -Ofrece amplia capacidad para modificaciones	-Liberación de citotóxicos. -Aplicaciones en

			farmacéutica, agricultura y cosmética.
Almidón modificado	Polisacárido de unidades de glucosa con puentes glucosídicos $\alpha$ (1→4) en la amilosa y $\alpha$ (1→6) en la amilopectina.	-Puede permitir el atrapamiento o unión covalente de la molécula de interés. -Biodegradabilidad. -Ninguna inmunogenicidad.	-Liberación de antígenos vía mucosas.
Dextrano	Homopolisacárido ramificado de glucosa sintetizado por bacterias ácido lácticas a partir de la sacarosa con enlaces $\alpha$ (1→6) entre glucosas y $\alpha$ (1→4) en las ramificaciones.	-Biocompatibilidad. -Biodegradabilidad. -Disponible en diferentes pesos moleculares. -Puede funcionalizarse fácilmente.	-Liberación de fármacos. -Liberación de antígenos vía mucosa.

MATERIALES SINTÉTICOS	DESCRIPCIÓN	VENTAJAS	USOS
Ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), copolímeros (PLGA)	Poliésteres alifáticos del ácido láctico y glicólico	-Resorbible. -Rápida cinética de degradación. -Biocompatibilidad. -Degradabilidad manejable en función de su composición.	-Liberación de ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. -Liberación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.
Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)	Polímero semicristalino de $\epsilon$ -caprolactona	-Biodegradabilidad. -Biocompatibilidad. -Alta permeabilidad. -No tóxico. -Cinética lenta de degradación.	-Encapsulación y liberación de antibióticos. -Liberación de antígenos y adyuvantes por vía oral. -Co-encapsulación de drogas lipofílicas e hidrofílicas.
Poli (ortho-ester) (POE)	Polímero de ortoésteres producto de la alquilación de los ácidos ortocarboxílicos.	-Biocompatibilidad. -Biodegradabilidad.	-Liberación de proteínas y ácidos nucleicos.

Adaptada de Campos *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2010; Suri *et al.*, 2013.

De forma general, además de las condiciones de biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad que debe tener un sistema de transporte y liberación basado en micropartículas, se espera que el sistema permita: 1. Aumentar la solubilidad y estabilidad de la molécula asociada, 2. La liberación o entrega controlada, dirigida y en algunos casos sostenida de la molécula evitando efectos secundarios adversos, 3. El uso de menores concentraciones del fármaco o el antígeno y 4. Mejorar su distribución y biodisponibilidad (Tan *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2013). En este contexto es difícil encontrar un sistema que reúna simultáneamente todos estos criterios y condiciones, por lo que sigue existiendo la necesidad de nuevos acarreadores biocompatibles y que puedan ser aprobados para su uso en humanos.

En especial se requieren portadores capaces de unirse fuertemente a los antígenos para administrar vía mucosa ya que deben penetrar las barreras del epitelio para alcanzar las células competentes ubicadas en mucosa y superar condiciones drásticas de pH y presencia de proteasas (Stertman *et al.*, 2006).

### **2.3.1. Micropartículas de almidón**

Desde hace algunos años se han preparado micropartículas a base de almidón soluble para el atrapamiento o conjugación de fármacos y antígenos administrados por diferentes vías (Rodrigues and Emeje, 2012). Debido a la naturaleza hidrofílica de este almidón, el método más común para preparar estas micropartículas para que sean resistentes a disolución en un ambiente fisiológico, es el entrecruzamiento de las cadenas de polisacárido (Campos *et al.*, 2013). La modificación química de los malto-oligosacáridos, por acilación o acrilación, permite la unión covalente de los antígenos para transportar. Así mismo y para inhibir o reducir la degradación enzimática ocurrida en el estómago y con el objetivo de garantizar la cantidad adecuada del agente terapéutico, las micropartículas de almidón se han combinado con otros polímeros como la poli-ε-caprolactona (Balmayor *et al.*, 2009). Se sabe que el almidón soluble es casi completamente degradado por las enzimas pancreáticas después de su ingestión oral, permitiendo así su absorción en el intestino delgado y que solo una pequeña parte de dicho almidón, conocida como almidón resistente, escapa a este proceso de digestión sufriendo fermentación bacteriana en el colon. Es por esto que las alternativas para disminuir la hidrólisis de las micropartículas hechas a base de maltooligosacáridos han permitido su utilización por diferentes vías como la oral, parenteral y nasal (Stertman *et al.*, 2004; Rodrigues and Emeje, 2012).

Administradas por vía oral, los autores han podido comprobar que las micropartículas modificadas protegen al antígeno en su trayecto por el tracto gastrointestinal, lo cual es esencial para la inducción de la respuesta inmune (Stertman *et al.*, 2006). Así mismo se han comprobado las propiedades adyuvantes de las micropartículas cuando se administran vía parenteral, pues son capaces de inducir una respuesta sistémica y local de anticuerpos e incluso pueden favorecer una respuesta de tipo celular (Rydell and Sjöholm, 2004). De forma

interesante, se ha visto que con el uso de este tipo de micropartículas como acarreador, dicha respuesta se puede modular dependiendo de la vía de administración y las dosis, concluyéndose que el perfil de la respuesta inmune obtenido está estrechamente ligado con estos factores (Stertman *et al.*, 2004).

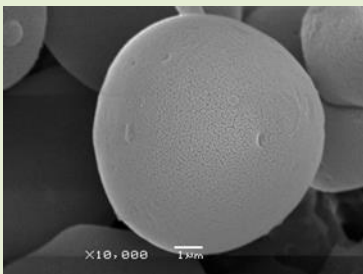
También se han utilizado para inmunización vía oral e intranasal micropartículas de dextrano y mezclas de almidón/ácido poliacrílico en diferentes relaciones, las cuales también favorecen la inducción de una respuesta sistémica de anticuerpos (Sajadi-Tabassi *et al.*, 2008; Coucke *et al.*, 2009).

Sin embargo, no existen antecedentes del uso de micropartículas que no hayan sido modificadas químicamente para permitir la adsorción de proteínas o antígenos para su posterior administración (en la tabla 2.2 se presentan algunas características fisicoquímicas del almidón utilizado en este proyecto). En este sentido, la utilización de un sistema de inmovilización no covalente sobre gránulos de almidón nativo, una matriz abundante, económica e inocua, que ya se encuentra en forma particulada y que permita la adsorción la administración de antígenos vía mucosa con la consecuente inducción de la respuesta inmune, resulta una alternativa con mucho potencial y beneficios. En el caso particular del presente estudio, se escogió una proteína de tuberculosis para evaluar el potencial del sistema constituido por el gránulo de almidón insoluble como matriz y el DFA<sub>tag</sub> como tallo de inmovilización, como vehículo para la administración de antígenos vía mucosas.

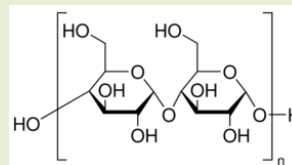


**Tabla 2.2.** Características físico químicas del almidón de maíz y arroz

**Almidón de Maíz**

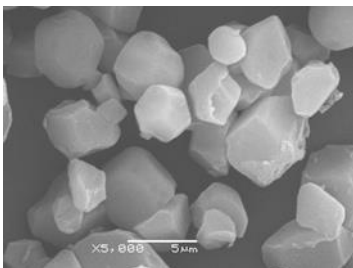


**Tipo:** Cereal  
**Forma:** Esférico o poliédrico  
**Tamaño:** 5-25  $\mu\text{m}$   
**Amilosa:** 22-32%  
**Amilopectina:** 68-78%

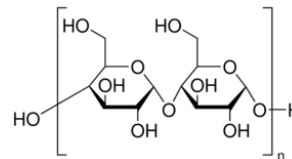


(Sigma-Aldrich S9679)

**Almidón de Arroz**



**Tipo:** Cereal  
**Forma:** Poliédrico  
**Tamaño:** 3-8  $\mu\text{m}$   
**Amilosa:** 5-28%  
**Amilopectina:** 72-95%

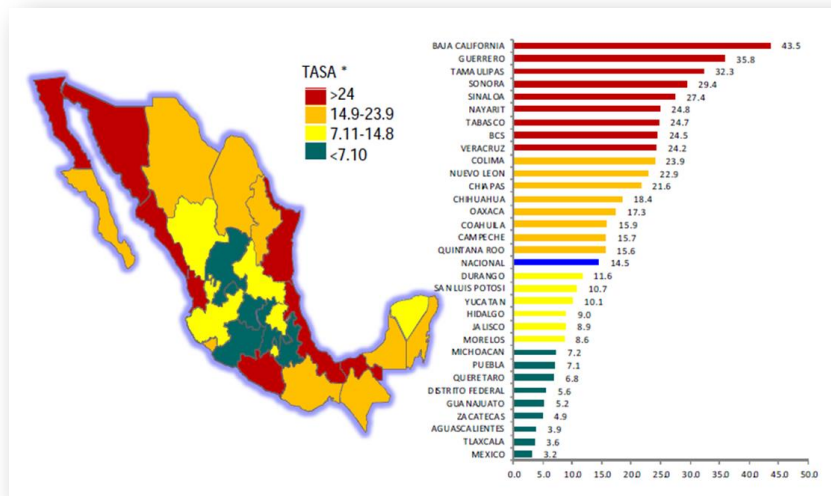


(Sigma-Aldrich S-7260)

**Generalidades:** Estructuralmente el almidón es una mezcla de los polímeros amilosa y amilopectina cuya proporción en el gránulo depende de su origen botánico. La amilosa es una molécula lineal de 200-2500 glucosas, unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4) con un peso molecular aproximado de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  Da, que posee una estructura tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice tiene seis moléculas de glucosa. La amilopectina por su parte es un polímero ramificado con peso molecular aproximado de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  Da y con enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos y ramificaciones en  $\alpha$ -(1,6) con longitudes promedio de 18 a 25 glucosas aproximadamente (Tester *et al.*, 2004). La cristalinidad está asociada exclusivamente con la amilopectina, mientras las regiones amorfas están representadas por la amilosa. La forma como se empaquetan en el gránulo también depende del origen botánico del almidón. La solubilidad está dada por las diferencias en el contenido de amilosa y lípidos de cada almidón así como el nivel de organización del gránulo (Singh *et al.*, 2003).

**2.3.2. La proteína alfa cristalina (Acr) de *Mycobacterium tuberculosis* como modelo**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*. De estos portadores latentes, alrededor del 5 al 10% desarrollará la enfermedad pulmonar, ocurriendo anualmente entre 2 y 3 millones de muertes y de 8 a 10 millones de nuevos casos de contagio. En México, según información preliminar de la Plataforma Única de Tuberculosis se registraron 19,697 casos de Tuberculosis de Todas las Formas en 2012, siendo la Tuberculosis Pulmonar (TBP) la forma más frecuente con 15,858 casos reportados y una tasa de incidencia de 14.5 por cada cien mil habitantes (Boletín Epidemiológico, Secretaría de Salud). La incidencia por estados para el año 2011 se presenta en la figura 2.5.



**Figura 2.5.** Incidencia por Tuberculosis Pulmonar en México para el año 2011. Fuente: Plataforma Única de Información, módulo de Tuberculosis, Secretaría de Salud.

La vacuna actual contra la tuberculosis (TB), el bacilo Calmette Guérin (BCG), cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, es una vacuna que protege contra las formas más severas de la enfermedad, incluyendo la TB miliar y extra pulmonar. Sin embargo, su nivel de protección contra la TBP en el adulto, es muy variable (de 0 a 80%) (Martín, 2005). Esta variabilidad en la protección conferida con la BCG, la exposición a micobacterias saprófitas, la presencia de otras enfermedades como la diabetes, la coinfección con VIH o la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multidrogo resistentes (MDR-TB), entre otros factores, marcan la importancia y urgencia en el desarrollo de nuevas vacunas que puedan ser utilizadas tanto en individuos sanos para prevenir la infección (vacuna profiláctica), como en individuos previamente expuestos para prevenir el desarrollo de la enfermedad, reforzando la inmunización previa con BCG (vacuna post-exposición) (Young and Dye, 2006).

Aunque no se conoce del todo la naturaleza de una respuesta inmune efectiva contra el bacilo tuberculoso en el humano, las estrategias de vacunación más efectivas en modelos animales, son aquellas capaces de estimular respuesta inmune de tipo celular, tanto CD4+ como CD8+ y la producción de citocinas asociadas a la respuesta celular Th1 (Hernández-Pando *et al.*, 1996). Como vacunas alternativas para alcanzar dicho nivel de protección, se han utilizado cepas recombinantes de BCG (Horwitz *et al.*, 2000; Castañón-Arreola *et al.*, 2005), vectores virales que sobre expresan antígenos de *M. tuberculosis* (McShane *et al.*, 2005) y vacunas de subunidades bien como proteínas recombinantes o como DNA desnudo, en todos los casos

con resultados promisorios (Hoft, 2008). En los últimos años incluso se han desarrollado vacunas de subunidades multiestado que combinan antígenos de expresión temprana y de latencia y que en modelo murino han demostrado ser eficaces para conferir protección antes y después de la exposición al bacilo (Aagaard *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011).

A diferencia de las vacunas vivas (BCG y recombinantes), las vacunas de subunidades son más seguras incluso para individuos inmunosuprimidos. Sin embargo, requieren de adyuvantes para reforzar su inmunogenicidad (Hogarth *et al.*, 2003). A este respecto, la principal limitante sigue siendo la insuficiente disponibilidad de adyuvantes, aprobados para uso en humanos. En el apéndice 1 se puede encontrar una revisión de los sistemas adyuvantes en tuberculosis (Moreno-Mendieta *et al.*, 2010).

Por otra parte, para patógenos cuya vía de ingreso al huésped es la mucosa oral o nasal, se están buscando vacunas que sean administradas por la misma ruta para que la respuesta inmune sea más efectiva. Para el caso particular de la tuberculosis, se puede tomar ventaja del hecho que la vacunación en mucosa oral puede inducir respuesta inmune protectora en la mucosa pulmonar (Adjary *et al.*, 2007; Badell *et al.*, 2009).

Para el desarrollo del presente estudio, se seleccionó la proteína alfa cristalina (Acr) de *M. tuberculosis* (tabla 2.3). Esta es una proteína de choque térmico, chaperona independiente de ATP de bajo peso molecular inducida por hipoxia (Rosenkrands *et al.*, 2002). También conocida como Hsp16.3, HspX, antígeno de 16-kDa, Rv2031c o Acr1, es una de las dos proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP por sus siglas en inglés) encontrada en *M. tuberculosis*. Estudios estructurales han revelado que esta proteína presenta un dominio central conservado de 90 aminoácidos aproximadamente, llamado dominio  $\alpha$ -cristalina y que en concordancia con las propiedades conocidas de las sHSP que forman estructuras oligoméricas necesarias para su función de chaperonas, ésta se organiza en un oligómero de 12 unidades (dodecámero tetraédrico) formado a partir de dímeros (ver figura 2.6) (Kennaway *et al.*, 2005). Al menos *in vitro* se ha comprobado que puede actuar como chaperona molecular, previniendo la agregación de otras proteínas (Chang *et al.*, 1996). Sin embargo, *in vivo* se presume que la actividad de chaperona pudiera estar cubierta mayoritariamente por la segunda proteína de choque térmico de *M. tuberculosis* (Acr2) mientras Acr1 está implicada en más de una función (Hu *et al.*, 2006).

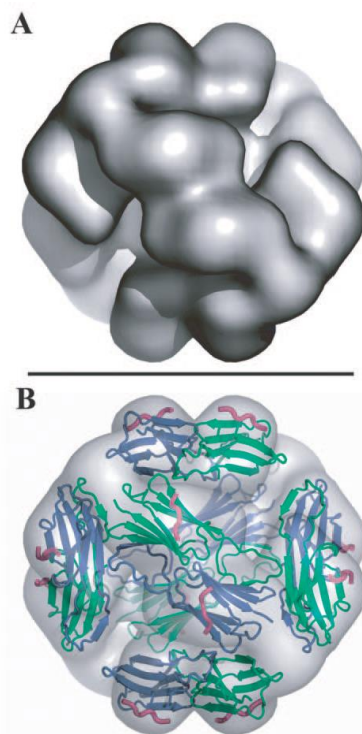
Su ubicación preferencial en la pared celular y la relación entre su presencia y un adelgazamiento de la pared del bacilo sugieren que estabiliza las estructuras celulares durante

largos períodos de tiempo permitiendo la supervivencia del bacilo tuberculoso en los granulomas con baja tensión de oxígeno (Cunningham and Spreadbury, 1998). También se ha observado que es importante principalmente en la fase extracelular del patógeno contribuyendo a la replicación durante la infección inicial y al crecimiento de la bacteria en el macrófago (Yuan *et al.*, 1998). En consecuencia, su papel más importante parece ser el mantenimiento de la viabilidad del bacilo a largo plazo y su adaptación al ambiente con la consecuente latencia de la enfermedad (Monahan *et al.*, 2001). Estas observaciones están en concordancia con los estudios de expresión en modelo murino y que han reportado que la expresión del gen *hspX* que codifica para Acr y otros 3 genes, y que forma parte del llamado regulón de dormancia (*devR/dosR*), se induce preferencialmente durante la infección crónica a diferencia de otros genes que codifican para antígenos presentes en la infección aguda (Shi *et al.*, 2003).

Como resultado de la asociación de esta proteína con la persistencia de la enfermedad, y la correlación entre los datos obtenidos experimentalmente y los análisis *in silico* del genoma de *M. tuberculosis* se ha propuesto como componente de vacunas de subunidades diseñadas para reemplazar o reforzar la protección conferida con BCG (Roupie *et al.*, 2007; Zvi *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2014). El hecho que el suero de pacientes con TB latente está enriquecido con anticuerpos que reconocen fuertemente esta proteína también demuestra su potencial uso para el diagnóstico diferencial (Demissie *et al.*, 2006). En los últimos años se ha utilizado en vacunas de subunidades multiestado en las que se fusiona con antígenos de fase aguda como Mtb10.4 (Niu *et al.*, 2011) o en las que se integra como parte de complejos inmunes fusionada con la proteína 85B y mezclada con anticuerpos monoclonales anti Acr y anti 85B (Pepponi *et al.*, 2013; Pepponi *et al.*, 2014). Recientemente incluso se obtuvo purificada de los lisados de micobacteria para probar su eficacia como vacuna profiláctica y como refuerzo de BCG demostrándose su eficacia protectora en ratones con tuberculosis (Taylor *et al.*, 2012).

Tabla 2.3. Descripción de la proteína Acr	
<b>Gen</b>	<i>hspX</i> . Número Rv: Rv2031c. Código GB: M76712.1. Ubicación: 2278.5 pb. Longitud: 435pb
<b>Producto</b>	Proteína de Choque Térmico HspX ó alfa cristalina ó antígeno de 14 kDa ó HSP16.3. Perteneciente a la familia HSP20 de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular. Código GB: CCP44804.1. PM: 16.22 kDa. PI: 4.75. Longitud: 144 aa.
<b>Ubicación</b>	Transmembranal en la membrana interna de la micobacteria. Predicción con el programa TransMembrane prediction using Hidden Markov Models (TMHMM).
<b>Secuencia</b>	MATTLPVQRHPRSLFPEFSELFAAFPSFAGLRPTFDTRLMRLEDEMKEGRYEV RAELPGVDPDKDVDIMVRDGLTIKAERTEQKDFDGRSEFAYGSFVRTVSLP VGADEDDIKATYDKGILTVSVAVSEGKPTKHIQIRSTN

Fuente: Base de datos TubercuList (<http://tuberculist.epfl.ch/>)



**Figura 2.6.** Mapa tridimensional de la proteína Acr1 de *M. tuberculosis*. **A.** Representación superficial a escala de 100 Å indicada por la barra negra. **B.** Modelo utilizando los dímeros. Fuente: Kennaway *et al.*, 2005.

---

---

# 3 JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

---

---

## 3.1. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la búsqueda de sistemas transportadores de antígenos con propiedades adyuvantes que puedan usarse en humanos sigue siendo una prioridad en el área de diseño y desarrollo de vacunas de subunidades, debido principalmente a las preocupaciones concernientes con la inocuidad.

El sistema de inmovilización mediado por el DFA<sub>tag</sub> y el uso del almidón como vehículo para la administración de antígenos vía mucosa, representan una alternativa con ventajas derivadas de las propiedades del almidón (biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad) y del protocolo de inmovilización que no requiere la elaboración y/o funcionalización de las micropartículas.

## 3.2. HIPÓTESIS

La proteína Acr de *M. tuberculosis* inmovilizada sobre micropartículas de almidón crudo mediante el DFA<sub>tag</sub>, será estabilizada y transportada hasta los sitios de inducción de la respuesta inmune en el tejido linfoide asociado a mucosas, después de su administración por vía oral y nasal, sin el uso de adyuvantes.

---

---

# 4 OBJETIVOS

---

---

## 4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial del sistema constituido por el Dominio de Fijación al Almidón de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* y micropartículas de almidón crudo como vehículo para la administración de antígenos de *M. tuberculosis* vía mucosa.

## 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la capacidad de adsorción de la proteína recombinante Acr-DFA<sub>tag</sub> sobre gránulos de almidón insoluble.
- Evaluar la contribución de la inmovilización en la estabilidad de la proteína en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- Determinar el potencial inmunogénico del sistema en modelo murino mediante la caracterización de la respuesta inmune obtenida después de la administración oral e intranasal de la proteína inmovilizada.

---

---

# 5

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

### 5.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE CON EL DFA<sub>tag</sub> DERIVADO DEL DFA DE LA $\alpha$ -AMILASA DE *L. amylovorus*

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH 5 $\alpha$  [*supE44*  $\Delta$ *lacU169*( $\Delta$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyr96* *thi-1* *relA1*] para el trabajo general de clonación. Las cepas *E. coli* M15 [pREP4] [*NalS* *strS* *rifS* *thi* *lac* *ara* *gal*<sup>+</sup> *mtlF* *recA*<sup>+</sup> *uvr*<sup>+</sup> *lon*<sup>+</sup> [pREP4 KanR] (Qiagen, Hilden, Germany) y *E. coli* BL21 (DE3) [*F*<sup>-</sup> *dcm* *ompT* *hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *gal*  $\lambda$ (DE3)] (Stratagene, La Jolla, CA) se utilizaron para la producción de la proteína recombinante y el control respectivamente. Las células se cultivaron en medio Luria–Bertani (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y kanamicina (25  $\mu$ g/mL) para M15 y con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) para BL21. Ambos antibióticos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

#### 5.1.1. Construcción de plásmidos

Los procedimientos moleculares utilizados en este trabajo se realizaron de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989), los protocolos se adjuntan en el anexo 5A. Se amplificó la región codificante de la proteína alfa cristalina (Acr) de *M. tuberculosis* (GB M76712) a partir del vector pCR4Topo-Acr construido por el Dr. Antonio Vallecillo del laboratorio de la Dra. Clara Espitia (Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas). Previamente, la presencia del inserto se verificó mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* y el ADN purificado fue enviado a secuenciación. El análisis de la secuencia se hizo mediante alineamiento múltiple con la secuencia teórica del antígeno y la secuencia del



producto de PCR recibido inicialmente. La secuencia obtenida fue sometida a Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Posteriormente, para lograr la completa liberación del fragmento se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos con la secuencia de reconocimiento BamHI (tabla 5.1).

<b>Tabla 5.1.</b> Oligonucleótidos con el sitio de reconocimiento BamHI	
➤	AcrFrw: 5'-GT <u>GGATCC</u> AATGGCCACCACCCTT-3'
➤	AcrRev: 5'-TAGTGT <u>GGATCC</u> ACTCGGATCT-3'

El fragmento amplificado según las condiciones establecidas mediante prueba de gradiente (anexo 5B), se purificó y ligó al vector pGEM-T-*Easy* (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se transformó por electroporación en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook *et al.*, 1989). La presencia y orientación del fragmento en la construcción obtenida (pG-Acr), se verificó por restricción y secuenciación (Laragen, Inc, Los Angeles, CA). El fragmento liberado con la enzima BamHI fue desfosforilado y clonado en el vector de expresión pQE31-DFA, construido previamente como se describe en Guillén *et al.* (2007). Este vector contiene los cinco módulos que constituyen el DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* en el extremo C-terminal y un tallo de His<sub>6</sub> en el extremo N-terminal que permite la purificación de la proteína por afinidad a metal (anexo 5C). La construcción obtenida (pQAcr-DFA<sub>tag</sub>), también se verificó por restricción y secuenciación (Laragen, Inc, Los Angeles, CA) y se transformó por electroporación y de acuerdo al vector en las cepas *E. coli* M15 o BL21 (DE3) para la expresión y producción de la proteína.

### 5.1.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante

Las células de *E. coli* con la construcción pQAcr-DFA<sub>tag</sub> se pre-inocularon en 10 mL de medio LB suplementado con los antibióticos según la cepa (Ap 100  $\mu$ g/mL y Kn 25  $\mu$ g/mL para M15 y con Ap 100  $\mu$ g/mL para BL21) a 29°C y 150 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) durante toda la noche. El inóculo se hizo al 1% en 1L de medio LB (en matraz Fernbach de 2L) suplementado con los mismos antibióticos y con glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1% para solubilizar la proteína (Sahdev *et al.*, 2008). Se incubó a 29°C y

100 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 unidades y se indujo con 1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 0.1 mM. Se continuó la incubación por 3 a 4 h y los cultivos resultantes se cosecharon por centrifugación a 14,000 x *g* por 10 min a 4°C. Los pellets se resuspendieron en aproximadamente 1/150 el volumen original del cultivo en buffer citrato-fosfato 25 mM, NaCl 500 mM pH 7.0 adicionado con inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1/1000,  $\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 10 mM y Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1%. Las células se rompieron por sonicación en 3 ciclos, cada ciclo con 3 pulsos de 10s a 60 Hz (Vibra-Cell™; Sonics & Materials, Inc) con un min de descanso entre cada pulso. Se centrifugó durante 20 min a 14,000 x *g* a 4°C se recuperó el sobrenadante y reservó. El pellet resultante se resuspendió en la mitad del buffer de lisis y se sonicó 20s a 60 Hz tres veces con 1 min de descanso entre cada pulso. Se juntó con el primer sobrenadante se mezcló y centrifugó durante 30 min a 21,700 x *g* a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró por 0.45 y 0.22  $\mu$ m (Merck Millipore). La proteína recombinante se purificó de los extractos clarificados mediante cromatografía de afinidad usando sefarosa (epoxy-activated Sepharose 6B column 16 x 35 mm) (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) acoplada a  $\beta$ -ciclodextrina (Vretblad, 1974) (preparada como se indica en el anexo 5D) y el sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Se lavó la columna con buffer de unión citrato-fosfato 25 mM, NaCl 500 mM pH 7.0 hasta que la absorbancia se mantuvo en cero durante dos horas. Posteriormente la proteína se eluyó con  $\beta$ -ciclodextrina 9 mg/mL (8mM) en el mismo buffer.

Debido a que el vector de expresión proporciona a la proteína recombinante un tallo de histidinas, la proteína también se purificó por cromatografía de afinidad a metal y la eficiencia de ambos métodos fue comparada. El protocolo de purificación por afinidad a metal se detalla en el anexo 5E.

Una vez obtenida la proteína pura, se dializó en buffer Citrato-Fosfato 10 mM, pH 7.0 y se midió la absorbancia a 280 nm para calcular la concentración con el coeficiente de extinción molar teórico de la proteína ( $\epsilon$ ) obtenido con el programa ProtParam (ExPASy) (anexo 5F.1). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), visualizadas por tinción con azul de Coomassie (Blakesley and Boezi, 1977) e identificadas por Western Blot con anticuerpo primario anti-His<sub>6</sub> (Roche, Basel, Switzerland) (1/10000) y anticuerpo secundario anti-Inmunoglobulina G de ratón marcado con fosfatasa alcalina

(1/10000) (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham Massachusetts, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente, se obtuvo la proteína control (Acr) a partir del cultivo e inducción de células BL21 DE3 con el plásmido pET-Acr (obtenido y donado por el laboratorio de la Dra. Clara Espitia). El preinóculo se hizo en medio LB suplementado con Ap 100µg/L y se incubó a 29°C y 150 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) durante toda la noche. El inóculo se hizo al 1% igualmente en medio LB suplementado con Ap 100 µg/L. Como estrategia para solubilizar la proteína, también se utilizó glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1% en el medio. Se incubó a 29°C y 100 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> aproximada de 0.6 unidades. El tiempo de inducción, también con IPTG 0.1 mM fue de 4 h. La cosecha y rompimiento de las células fue igual que para la proteína recombinante con el buffer de unión NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 25 mM, pH 8.0 suplementado con inhibidor de proteasas sin EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1/1000 y Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 1%. La proteína se purificó de los extractos clarificados mediante cromatografía de afinidad a metal por tallo de histidinas utilizando columnas HiTrap HP de 1 mL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) y el sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Se lavó la columna con buffer de unión hasta que la absorbancia se mantuvo en cero durante dos horas. Después, la proteína se eluyó con buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8.0. Se dializó y midió la absorbancia de la proteína a 280 nm y se calculó la concentración con el coeficiente de extinción molar teórico de la proteína ( $\epsilon$ ) obtenido con el programa ProtParam (ExPASy) (anexo 5F.2). Las fracciones obtenidas se visualizaron igual por SDS-PAGE y Western Blot.

## **5.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ADSORCIÓN DE LA PROTEÍNA Acr-DFA<sub>tag</sub> SOBRE GRÁNULOS DE ALMIDÓN INSOLUBLE**

### **5.2.1. Ensayos cualitativos de adsorción**

Para los ensayos cualitativos de adsorción, 10 µg de Acr-DFA<sub>tag</sub> dializada contra buffer citrato-fosfato 10 mM pH 7.0 se adicionaron a 0.1 y 1 mg de almidón de maíz o de arroz

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) previamente lavado y suspendido en buffer citrato-fosfato 10 mM, pH 7.0. La mezcla se incubó 24 horas a 4°C con agitación ligera (10 rpm) (Maxi Rotator LAB-LINE 4631) y se centrifugó a 15,400 x *g* por 5 min. Sobrenadantes y pellets lavados con el mismo buffer fueron analizados por Western Blot para verificar la completa adsorción de la proteína. Utilizando las mismas condiciones se hizo la inmovilización de 25, 50 y 100 µg de Acr-DFA<sub>tag</sub> adsorbida en 1 mg de almidón de arroz (previamente lavado y suspendido en el mismo buffer). Sobrenadantes, pellets y lavados con el mismo buffer fueron analizados por Western Blot para verificar la completa adsorción de las dosis utilizadas en los ensayos *in vivo*.

### 5.2.2. Ensayos cuantitativos de adsorción

Previo a los ensayos de adsorción la proteína pura se dializó extensamente contra buffer citrato-fosfato 10 mM pH 7.0. El ensayo cuantitativo de adsorción (isotermas) se realizó según el protocolo de Williamson *et al.*, 1992 con algunas modificaciones: Diferentes concentraciones de la proteína recombinante se adsorbieron en una suspensión de almidón de maíz (1%) en buffer citrato-fosfato 10 mM pH 7.0 a volumen final de 60 µL. La reacción se incubó a 4°C durante 30 min en agitación ligera (10 rpm) (Maxi Rotator LAB-LINE 4631) y se centrifugó a 15,400 rpm durante 5 min para separar las fases. En los sobrenadantes se midió la absorbancia a 280 nm y con el correspondiente coeficiente de extinción molar teórico de la proteína se calculó su concentración en la muestra. La proteína adsorbida se calculó restando la proteína del sobrenadante de la proteína inicial: (*Proteína Inicial* – *Proteína del Sobrenadante* = *Proteína Unida*) (Belshaw and Williamson, 1990). Como control, se utilizaron muestras de proteína sin almidón preparadas en el mismo volumen con el fin de discriminar adsorción al tubo o precipitación de la proteína (Abbot and Boraston, 2012). Las constantes de adsorción ( $K_{ad}$  en micromol por miligramo de almidón) se calcularon a partir de la pendiente obtenida con la adsorción inicial de la proteína pura. El ensayo se realizó por triplicado.

### 5.3. ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN CONDICIONES SIMULADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Los fluidos gástrico e intestinal simulados (FGS y FIS respectivamente) fueron preparados como se describe en la Farmacopea de los Estados Unidos (2004):

**FGS:** Pepsina (Sigma-Aldrich, P6887) 3.2 mg/mL (w/v), NaCl 30 mM, HCl 86 mM, pH 1.2. El ratio enzima/proteína fue de 320-450 unidades de pepsina/mg de proteína.

**FIS:** Pancreatina (Sigma-Aldrich, P1500) 10 mg/mL (w/v) (la cual incluye enzimas como amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa, aunque solo las actividades de amilasa, proteasa y lipasa están especificadas en la farmacopea),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M, NaOH 0.2 N, pH 7.5. Según las especificaciones del fabricante, la cantidad de pancreatina utilizada por mg de proteína inmovilizada debería digerir no menos de 2.5 veces su peso en caseína en 60 min.

Para la inmovilización, 20  $\mu\text{g}$  de Acr-DFA<sub>tag</sub> se adicionaron a 1 mg de almidón de maíz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suspendido en buffer citrato-fosfato 10 mM, pH 7.0. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante.

#### 5.3.1. Pruebas de Estabilidad en Fluido Gástrico Simulado (FGS)

Utilizando un ratio enzima/proteína 1/10 (w/w), tanto proteína libre como inmovilizada se adicionó al FGS equilibrado a 37°C. La incubación se realizó a la misma temperatura con agitación constante de 500 rpm (ThermoStat plus, Eppendorf). A diferentes intervalos de tiempo (1 a 20 min) la reacción se detuvo por neutralización con NaOH 1N a una concentración final de 160 mM (Fu *et al.*, 2002). Inmediatamente después de la solución de paro se adicionó buffer de carga 4X Laemmli SDS-PAGE (a una concentración final de 1X) y se calentó 3 min a 95°C. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot. La recuperación de la proteína y la extensión de la degradación fueron estimadas por la comparación visual de las intensidades de las bandas o la aparición de bandas de degradación.

Como control, proteína libre e inmovilizada se incubó en el fluido sin pepsina durante 30 min a 37°C y se trató de igual manera.

### **5.3.2. Pruebas de Estabilidad en Fluido Intestinal Simulado (FIS)**

De igual forma que en el FGS y conservando el ratio enzima proteína 1/10 (w/w), tanto proteína libre como inmovilizada se adicionó al FIS equilibrado a 37°C. La incubación se llevó a cabo a la misma temperatura con agitación constante de 500 rpm (ThermoStat plus, Eppendorf). A diferentes intervalos de tiempo (1 a 120 min), la reacción se detuvo con PMSF 200 mM y EDTA 0.5 M (a una concentración final de 2 mM para ambos) (Chen *et al.*, 1998). Inmediatamente después de la solución de paro se adicionó buffer de carga 4X Laemmli SDS-PAGE (a una concentración final de 1X) y se calentó 3 min a 95°C y se analizaron las muestras por SDS-PAGE y Western Blot. La recuperación de la proteína y la extensión de la degradación también se estimaron por la comparación visual de las intensidades de las bandas o la aparición de bandas de degradación. Como control, proteína libre e inmovilizada se incubó en el fluido sin pancreatina durante 30 min a 37°C y se trató de igual manera.

## **5.4. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOGÉNICO DEL SISTEMA**

### **5.4.1. Pruebas de inmunización activa en ratones BALB/c**

Para las pruebas de inmunización activa se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad y 15-18 g alojadas en cajas con 6 animales cada una, alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum*. Se siguieron los lineamientos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

La distribución de tratamientos se hizo considerando la dosis y vía de administración como puede observarse en la tabla 5.2. Para la vía de administración oral (*o.*) se utilizaron dosis de 50 y 100 µg de proteína y para la vía de administración intranasal (*i.n.*) 25 y 50 µg. Dichas concentraciones estandarizadas respecto al antígeno en la fusión, se adicionaron a 1 mg de almidón de arroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suspendido en buffer citrato-fosfato 10

mM, pH 7.0 y la mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Como control para confirmar la completa absorción de dichas concentraciones de proteína a las micropartículas de almidón, pellets, sobrenadantes y lavados fueron analizados por Western Blot.

Para la inmunización *o.* los ratones fueron alimentados con sonda intragástrica de acero y extremos romos (Feeding Needle 22GA Kent Scientific Corp) en tres días consecutivos (1-3). Cada dosis para administración oral contenía 50 o 100 µg de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> inmovilizada (en 1 mg de almidón de arroz) o libre en un volumen final de 100 µL. Las dosis de refuerzo se dieron en la misma manera los días 21-23 y 41-43.

Los ratones inmunizados por vía *i.n.* recibieron 25 o 50 µg de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> inmovilizada (en 1 mg de almidón de arroz) o libre en dos días consecutivos (1-2). Se administró la dosis gota a gota (utilizando micropipeta y sin necesidad de anestesia) en las fosas nasales en un volumen final de 20 µL (10 µL por fosa nasal). Las dosis de refuerzo se dieron en la misma manera en los días 21-22 y 41-42. Como la vía intranasal es más eficaz para inducir respuestas sistémicas y es menos agresiva con las proteínas (pH menos ácido y menos proteasas) (Vajdy y O'Hagan, 2001) sólo dos refuerzos y dosis más bajas se utilizaron por esta ruta.

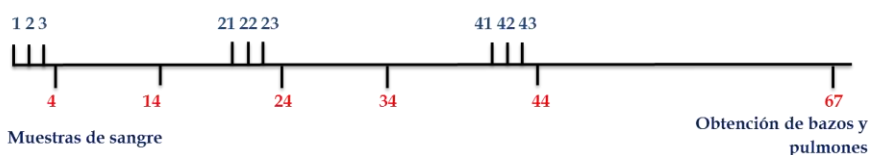
Como grupos control, se tuvieron animales que no recibieron ningún tratamiento (naïve o control negativo), animales que recibieron la proteína Acr (control positivo, inmunizados con 50 y 100 µg de Acr vía *o.* y con 25 y 50 µg de Acr vía *i.n.*) y animales que recibieron 1 mg de almidón también por ambas vías (control de vehículo). Los esquemas de inmunización (figura 5.1) se seleccionaron teniendo como base los esquemas de inmunización reportados por Wikingsson and Sjöholm, 2002; Gutierrez *et al.*, 2002; Rydell and Sjöholm, 2004 y Stertman *et al.*, 2004 y que consideran dosis consecutivas cada 21 días en función del vehículo (micropartículas) para promover su propiedad adyuvante por efecto de depósito.

Una semana antes de comenzar con el esquema de inmunización se tomaron muestras de sangre como control preinmune.

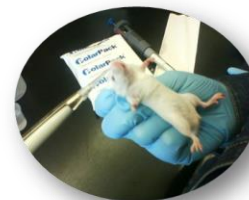
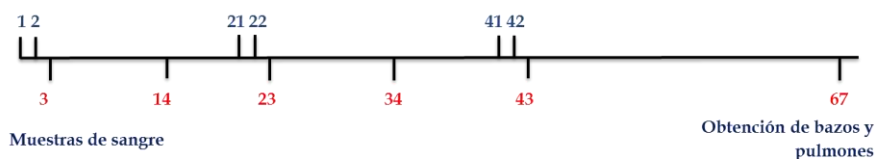
**Tabla 5.2. Distribución de tratamientos para el protocolo de inmunización activa.**

TRATAMIENTO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS (µg)
Proteína Acr-DFA <sub>tag</sub> libre	Oral	50
	Intranasal	25
Proteína Acr-DFA <sub>tag</sub> adsorbida en 1 mg de almidón	Oral	50
	Intranasal	25
		50
Proteína Acr	Oral	50
	Intranasal	25
Almidón	Oral	1 mg
	Intranasal	1 mg
Naïve	Sin tratamiento	

### Inmunización Oral



### Inmunización Intranasal



**Figura 5.1.** Protocolos de inmunización y esquemas de toma de muestras.

### 5.4.2. Toma de muestras y determinación de anticuerpos

Se tomaron muestras de sangre del plexo retro-orbital con microtubos heparinizados (previa anestesia con Sevorane), luego de la formación del coágulo se centrifugaron a 5,800 x g para separar los sueros que fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Tres semanas después de la última inmunización, los pulmones se colectaron después del sacrificio con pentobarbital (50 mg/kg) de acuerdo a la metodología reportada por Giri *et al.*, 2005. Los pulmones removidos fueron homogenizados en 1 mL de PBS 1x, clarificados



por centrifugación a 9,100 x g por 5 min a 4°C y se almacenaron a -20°C hasta la determinación de INF- $\gamma$  utilizando el Murine IFN- $\gamma$  ELISA Kit KMC4022 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante la prueba de ELISA se hizo la determinación de IgG, IgG1 e IgG2a en suero. Se siguió la metodología reportada en el *Current Protocols in Immunology* (1991), previa estandarización de la concentración de los reactantes. Brevemente, placas ELISA (Costar 3590 de 96 pozos) se sensibilizaron incubando durante toda la noche a 4 °C con 100  $\mu$ L/pozo de una solución de 2.5  $\mu$ g/mL de la proteína Acr pura en buffer carbonatos 50 mM, pH 9.6. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 0.1 M pH 7.4 con Tween-20 0,05 % (PBS - 5T) y se bloquearon durante 1 hora con PBS-5T con BSA 0.25 % (100 $\mu$ L/pozo) a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las placas se lavaron de nuevo, y se diluyeron las muestras de suero 1:1000 en PBS-5T. Se agregaron 100  $\mu$ L de cada muestra y se incubó toda la noche a 4°C. Nuevamente se hicieron 3 lavados con buffer PBS-5T y se agregaron los anticuerpos secundarios en una dilución 1:1000. Para la determinación de IgG, IgG1 e IgG2a se utilizaron anticuerpos anti-IgG de ratón acoplados a peroxidasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA G21040, A10551, A10685 respectivamente). Después de 1 hora de incubación a 37°C se lavaron las placas 3 veces con PBS-5T y se añadió el sustrato OPD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (200 $\mu$ L/pozo). Después de una incubación de 45 min en oscuridad se leyó la D.O.<sub>450nm</sub>.

Para calcular la concentración de anticuerpos se realizó una curva estándar con anticuerpos monoclonales de ratón de los isotipos IgG, IgG1 e IgG2a (anexo 5.G). Para el análisis de los datos y gráficas, la respuesta del suero preinmune de cada ratón se restó para controlar unión inespecífica a la placa. Así mismo la respuesta promedio de los ratones naïve se restó de las muestras para descartar respuesta no específica.

#### **5.4.3. Ensayos de estimulación *in vitro* de esplenocitos y producción de INF- $\gamma$**

Todos los procedimientos de extracción de células totales de bazo y cultivo se realizaron bajo las condiciones de asepsia y bioseguridad recomendadas para el trabajo de cultivo celular (Cell Culture Basics from GIBCO®, <https://www.youtube.com/watch?v=fjZ-MHV22w>). La metodología se estandarizó según lo reportado en el *Current Protocols in Cell Biology* (1998).

#### 5.4.3.1. Extracción de células totales de bazo

Tres semanas después de la última inmunización (día 67) los ratones fueron sacrificados y los bazos removidos asépticamente y procesados para la extracción de células totales según la metodología reportada por Giri *et al.*, 2005 con algunas modificaciones. Brevemente, para cada bazo se agregó 1 mL de medio RPMI-1640 sin complementar (Gibco, Carlsbad, CA, USA, USA) en una caja pequeña de Petri conteniendo una malla o separador celular de nylon de 70  $\mu\text{m}$  (BD). Sobre la malla se disgregó el bazo con el émbolo de una jeringa de 3 o 5 mL hasta quedar completamente homogenizado en el medio RPMI. El homogenizado se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL con 4 mL de medio RPMI sin complementar. Se centrifugó 5 min a 4°C y 400 x g y se decantó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de solución de lisis de eritrocitos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15M,  $\text{KHCO}_3$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mM pH 7.4), se mezcló suavemente con pipeta de 5 o 10 mL estéril y dejó incubando 5 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 10 mL de DPBS estéril ( $\text{NaCl}$  140 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM) y se centrifugó 5 min a 4°C y 400 x g. Se decantó el sobrenadante y resuspendieron las células en 3 mL de DPBS estéril con SFB 5% (Gibco, Carlsbad, CA, USA) (inactivado 30 min a 56°C) y se realizó el conteo de células con azul de tripano al 0.4% (anexo 5H). Una vez hecho el conteo se centrifugaron las células 5 min a 300 x g a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se agregó el medio de congelación al pellet celular (DMSO 10%, SFB 90%), lentamente gota a gota hasta completar el mililitro y alcanzar una densidad adecuada para su óptimo crecimiento en cultivo. La densidad estándar es de 1 a 1.5 millones de células/mL congeladas en alícuotas de 1 mL. Para congelar se sigue la cadena de frío 4°C, -20°C, -70°C.

#### 5.4.3.2. Cultivo y determinación de INF- $\gamma$ en sobrenadante

Para el cultivo se utilizaron  $2 \times 10^5$  células/pozo en placas de cultivo COSTAR 3599 de 96 pozos. Las células se descongelaron pasando de -70°C a baño de 37°C y se transfirieron a tubo Falcon de 15 mL. Se adicionaron 10 mL de medio RPMI-1640 complementado precalentado a 37 °C (SFB 10% inactivado 30 min a 56°C, HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aminoácidos no esenciales 1 mM (Gibco, Carlsbad, CA, U) y  $\beta$ - mercaptoethanol 50

$\mu\text{M}$  (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se centrifugó 5 min a  $8^{\circ}\text{C}$  y  $400 \times g$  y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 3 mL de DPBS/SFB 5% y se hizo de nuevo el conteo con azul de tripano 0.4%. Se centrifugó en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento con 10 mL de DPBS/SFB 5%. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI complementado a volumen final de 200  $\mu\text{L}$  para placas de 96 pozos.

En cada placa se adicionaron concentraciones diferentes (5, 10 y 20 $\mu\text{g}$ ) de las proteínas puras (Acr-DFA<sub>tag</sub> y Acr) en buffer PBS 0.1 M pH 7.4 a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  por pozo. En cada pozo el volumen final fue de 250 $\mu\text{L}$  (200  $\mu\text{L}$  de células y 50  $\mu\text{L}$  de proteína o mitógeno). Como mitógeno se utilizó Concanavalina A (ConA) a concentraciones de 2.5 y 5 $\mu\text{g}$ . Las células se incubaron con el mitógeno por 72 h y con el antígeno por 96 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad al 90%.

Pasado el tiempo de incubación se cosecharon las células en condiciones no estériles. Se centrifugó a  $400 \times g$ , 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes recuperados se distribuyeron en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para la determinación del INF- $\gamma$  secretado al medio después del estímulo *in vitro* se utilizó el Murine IFN- $\gamma$  ELISA Kit KMC4022 de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5.4.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  EEM. La concentración de anticuerpos específicos fue comparada entre grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0.05$ .

---

---

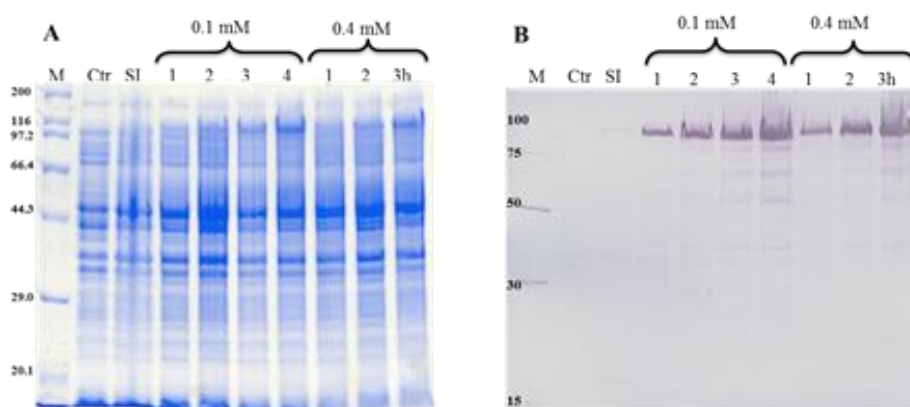
# 6 RESULTADOS

---

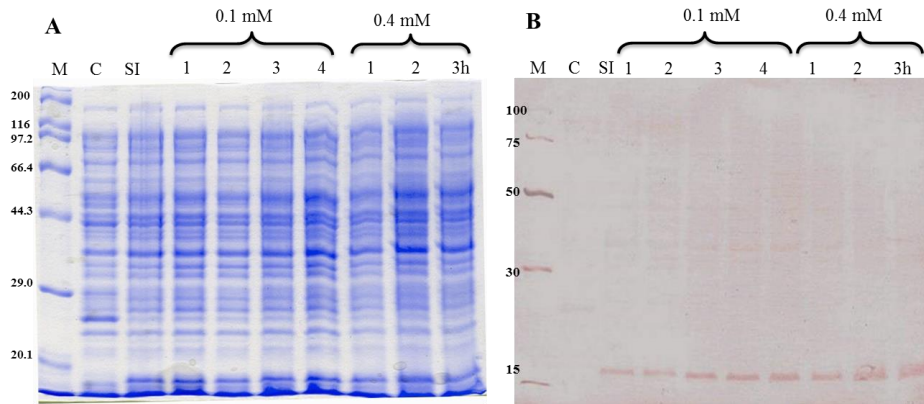
---

## 6.1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Acr-DFA<sub>tag</sub>

La región codificante de alfa cristalina (Acr) (GB M76712) se clonó en el en el vector pQE31-DFA<sub>tag</sub> cuyo análisis por secuenciación se presenta en el anexo 6A. En la figura 6.1 se presentan las condiciones evaluadas para la expresión de Acr-DFA<sub>tag</sub> en la cepa *E. coli* M15. Las condiciones seleccionadas para la posterior expresión de la proteína fueron una concentración de IPTG de 0.1 mM y un tiempo de incubación de 3 horas. En la figura 6.2 por su parte se presentan las condiciones evaluadas para la expresión de Acr en la cepa *E. coli* BL21 DE3. Las condiciones seleccionadas para la posterior expresión de la proteína fueron una concentración de IPTG de 0.1 mM y un tiempo de incubación de 4 horas.



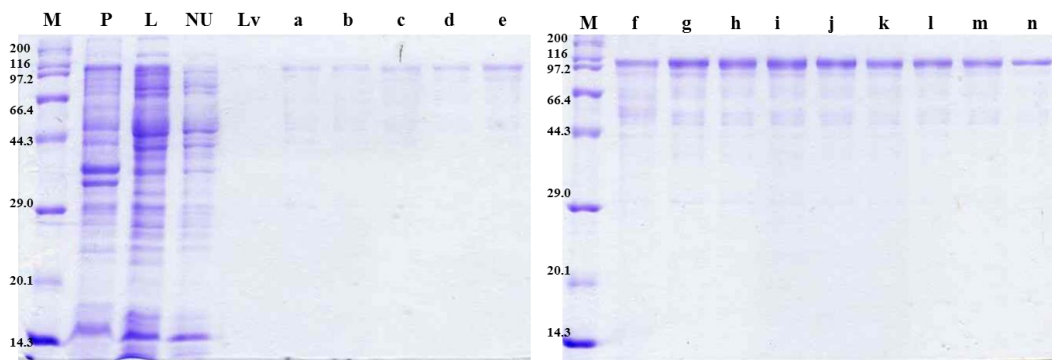
**Figura 6.1.** Ensayo de expresión de Acr-DFA<sub>tag</sub> utilizando IPTG como inductor. **A.** Gel SDS-PAGE al 12% (marcador de peso molecular: SDS-PAGE Broad Range Standard, BIO-RAD) **B.** Western-Blot de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> (marcador de peso molecular: 6xHis Protein Ladder QIAGEN) (C= Control *E. coli* M15 sin plásmido; SI= Control *E. coli* M15 con el plásmido pQAcr-DFA<sub>tag</sub> sin inductor).



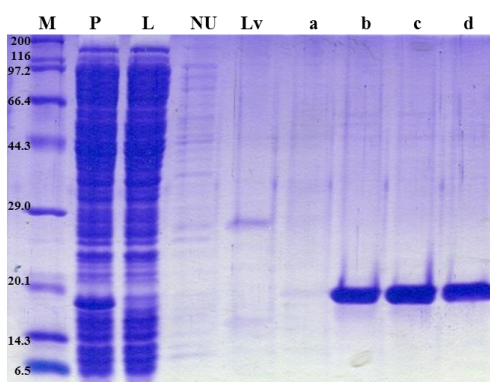
**Figura 6.2.** Ensayo de expresión de Acr utilizando IPTG como inductor. **A.** Gel SDS-PAGE al 12% (marcador de peso molecular: SDS-PAGE Broad Range Standard, BIO-RAD) **B.** Western-Blot de la proteína Acr (marcador de peso molecular: 6xHis Protein Ladder QIAGEN) (**C**= Control *E. coli* BL21 sin plásmido; **SI**= Control *E. coli* BL21 con el plásmido pET15b-Acr sin inductor).

En la figura 6.3 se observan las fracciones de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando sefarosa acoplada a  $\beta$ -ciclodextrina. La purificación de la proteína recombinante fue mejor utilizando al DFA<sub>tag</sub> como tallo de purificación que utilizando el tallo de histidinas que le confiere el vector a la construcción para la purificación por afinidad a metal (anexo 5D, apéndice 2). La presencia de bandas copurificadas en algunas fracciones es un fenómeno que se ha observado para proteínas que contienen el dominio y para el mismo DFA<sub>tag</sub>. La caracterización del fenómeno de proteólisis sufrido por estas proteínas y la búsqueda de las mejores condiciones para su manejo y almacenamiento es motivo de estudio en la actualidad. Los resultados y la discusión sobre las ventajas logísticas, de rendimiento y costo de la purificación mediada por el DFA<sub>tag</sub> se presentan con mayor detalle en el apéndice 2. El rendimiento de la proteína purificada fue de  $1.75 \pm 0.25$  g/L.

En la figura 6.4 se observan las fracciones de la proteína Acr purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando columna de níquel. Para ambas proteínas la adición de glicerol al 1% en el medio de cultivo resultó favorable para su obtención en la fracción soluble y sin la adición de agentes desnaturalizantes como la urea.



**Figura 6.3.** Purificación de Acr-DFA<sub>tag</sub> por cromatografía de afinidad a β-ciclodextrina. Gel SDS-PAGE al 12% (marcador de peso molecular: SDS-PAGE Broad Range Standard, BIO-RAD) **P**: pellet; **L**: lisado; **NU**: proteína no unida; **Lv**: lavado; **a-n**: fracciones.

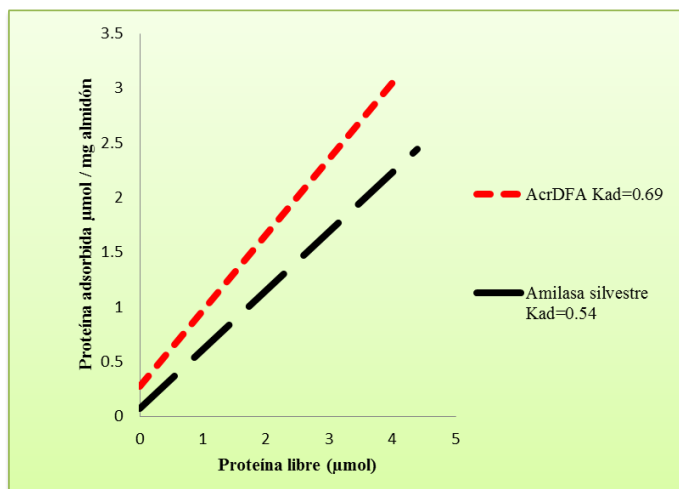


**Figura 6.4.** Purificación de Acr por cromatografía de afinidad a metal por tallo de His. Gel SDS-PAGE al 12% (marcador de peso molecular: SDS-PAGE Broad Range Standard, BIO-RAD) **P**: pellet; **L**: lisado; **NU**: proteína no unida; **Lv**: lavado; **a-d**: fracciones.

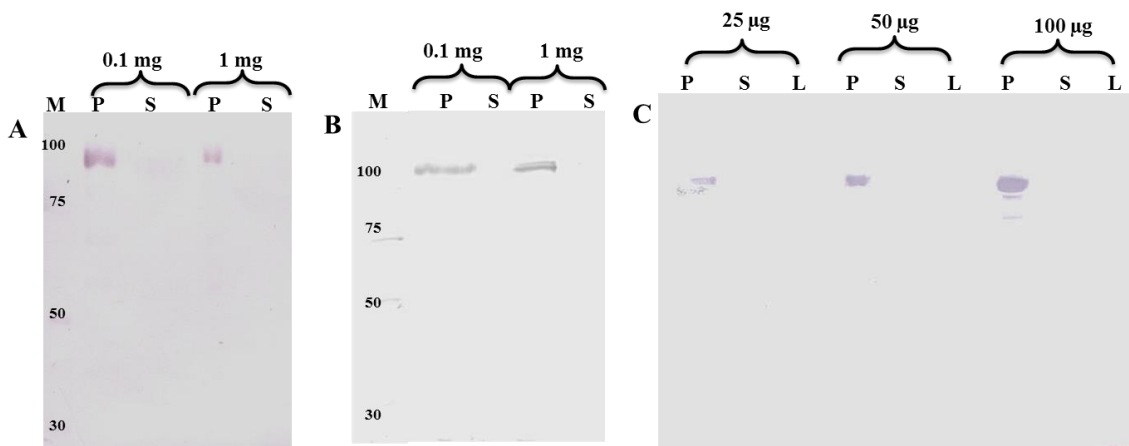
## 6.2. ENSAYOS DE ADSORCIÓN SOBRE ALMIDÓN INSOLUBLE

La afinidad de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> por el almidón se analizó mediante isoterma de adsorción (figura 6.5 anexo 6C). Las isotermas de adsorción lineales indican el equilibrio aparente entre la proteína presente en la fase sólida (proteína unida) y la proteína presente en la fase soluble (proteína no unida) a diferentes concentraciones de proteína. La constante de adsorción obtenida de la pendiente en la parte lineal de la isoterma fue de  $K_{ad} = 0.69 \mu\text{mol}/\text{mg}$  almidón. Esta capacidad de adsorción conferida por el DFA<sub>tag</sub> a la proteína Acr, también se observó con los ensayos cualitativos de adsorción sobre los gránulos de almidón insoluble tanto de maíz como de arroz y permitió la inmovilización de la proteína en las dosis

(estandarizadas respecto a Acr en la fusión) que fueron utilizadas para el experimento de inmunización (figura 6.6).



**Figura 6.5.** Isotermas de adsorción de Acr-DFA<sub>tag</sub> sobre gránulos de almidón insoluble de maíz. La curva se obtuvo graficando a la proteína adsorbida (fase sólida) contra la proteína añadida inicialmente (fase líquida) en el equilibrio. Ka= constante de adsorción.



**Figura 6.6.** Ensayo cualitativo de adsorción sobre almidón insoluble. Western Blot en los que se observa: **A.** 10 µg de Acr-DFA<sub>tag</sub> adsorbida en 0.1 y 1 mg de almidón de maíz. **B.** 10 µg de Acr-DFA<sub>tag</sub> adsorbida en 0.1 y 1 mg de almidón de arroz. **C.** 25, 50 y 100 µg de Acr-DFA<sub>tag</sub> adsorbida en 1 mg de almidón de arroz. (**P**= pellet; **S**= sobrenadante; **L**= lavado)

### 6.3. ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CONDICIONES SIMULADAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

Para determinar la contribución de la inmovilización no-covalente de Acr-DFA<sub>tag</sub> en la estabilidad frente a pH y proteasas, tanto la proteína libre como inmovilizada se sometió a incubación con fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). *In silico*, con el programa I-TASSER se realizó una predicción de la estructura tridimensional de Acr-DFA<sub>tag</sub> y con el programa ExPASy Peptide Cutter Tool una predicción de la digestión de la proteína por proteasas gastrointestinales (tabla 6.1). Según estas predicciones la proteína recombinante se pliega de manera tal que permite la exposición del fragmento correspondiente a Acr y la interacción del dominio con el almidón, al menos con los residuos aromáticos que quedan expuestos. Así mismo el análisis muestra que la proteína resulta un excelente sustrato para las enzimas digestivas (con probabilidades de corte entre el 80 y 100%) y que los tamaños de los péptidos generados son en general muy pequeños (entre 300 y 3000 Da) para ser visualizados en el gel.

En ambos fluidos, la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> inmovilizada resistió por más tiempo la degradación en comparación con la proteína libre. La proteína fusión libre se detectó en FGS hasta los 10 min (figura 6.7A y B) en comparación con la proteína adsorbida que fue detectada incluso a los 20 min (figura 6.7 C y D). En el gel SDS-PAGE para la proteína libre puede observarse una disminución del tamaño de la proteína a los 15 y 20 min lo que sugiere que por el efecto de las proteasas se va perdiendo el tallo de histidinas y el fragmento correspondiente a Acr por lo cual no es detectable en el Western Blot usando un anticuerpo anti 6xHis. Esto está en correspondencia con el análisis *in silico* que indica que la digestión proteolítica ocurre en dirección carboxilo terminal donde justamente se encuentran el tallo de histidinas y Acr por lo que esta degradación en el extremo C-terminal también ocurre para la proteína inmovilizada. Sin embargo, los residuos de tirosina que también son sustrato de las proteasas y en los cuales pueden estar incluidas las Y18 y Y20, también se encuentran en el dominio ubicado en el extremo N-terminal, pero al estar ocupados en la interacción con el almidón pueden evadir la digestión proteolítica.

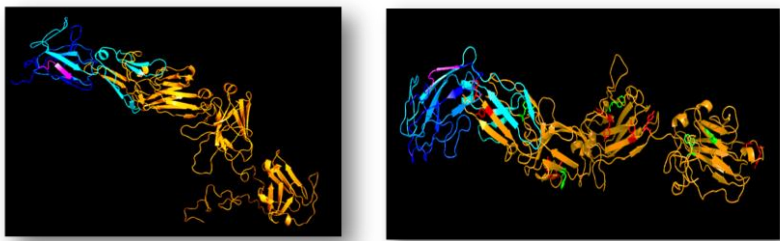
Dicho efecto estabilizante de la inmovilización puede verse en el gel SDS-PAGE en el que se observan dos bandas una del tamaño de la proteína completa (lo cual es deseable para los

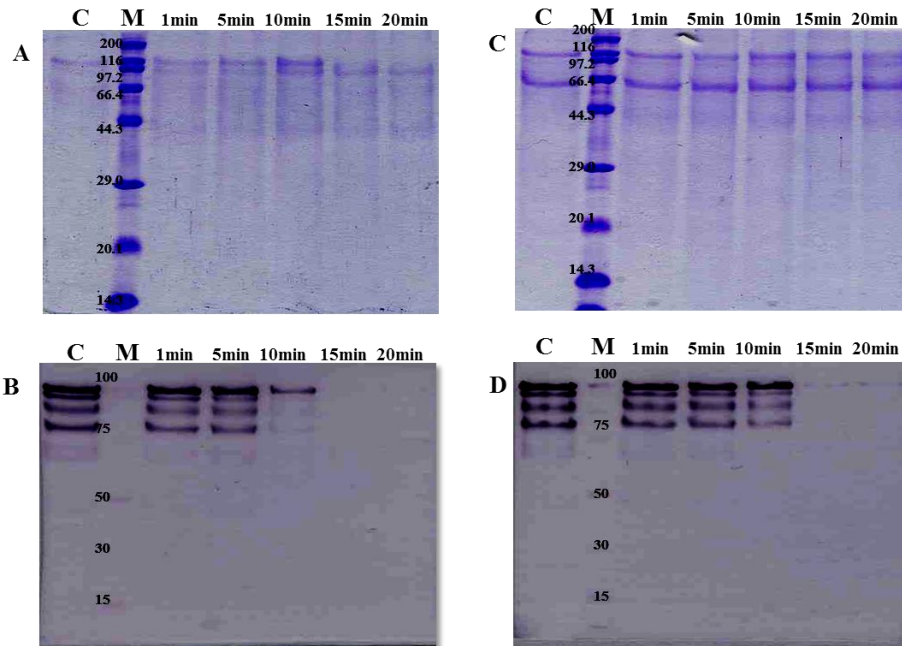


propósitos de inmunización) y otra con un peso aproximado de 66 kDa y que puede corresponder al DFA<sub>tag</sub> mostrando que más proteína puede permanecer unida al almidón por más tiempo.

Con el objetivo de discriminar el efecto del pH, tanto la proteína libre como la inmovilizada se incubaron en presencia del FGS sin la pepsina (pH 1.2). Después de 30 min de incubación a 37°C, tanto la proteína libre como la inmovilizada resistieron el pH, observándose el mismo patrón de bandas de degradación. Este resultado sugiere que el daño principal sufrido por la proteína ocurre por la acción de las proteasas.

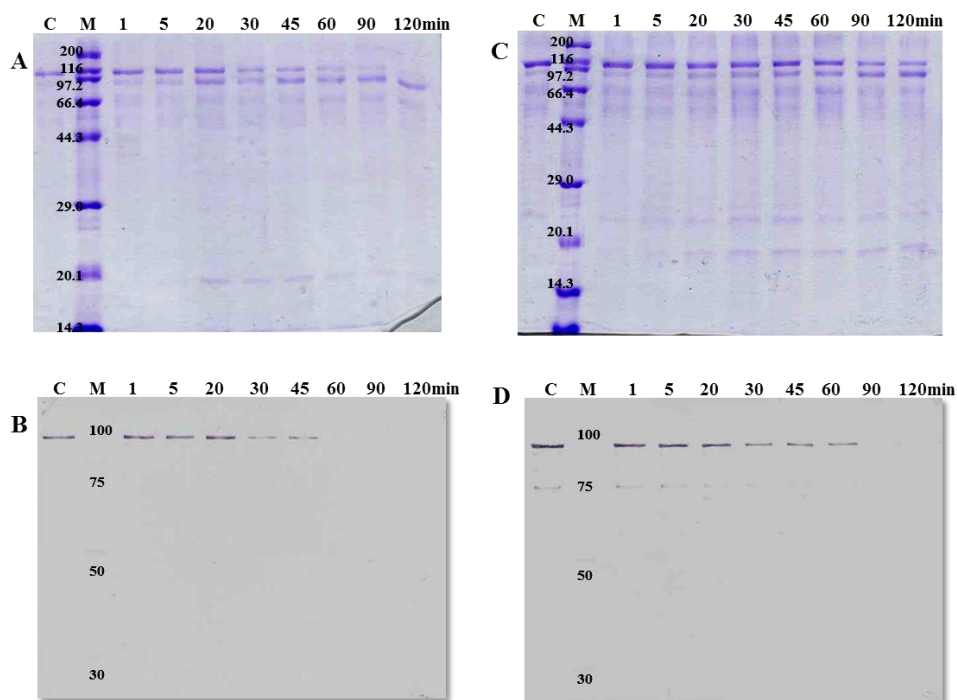
**Tabla 6.1.** Análisis *in silico* de Acr-DFA<sub>tag</sub>.

Proteína	Número teórico de cortes por las proteasas gastrointestinales			Composición en amino ácidos sustrato de las proteasas gastrointestinales
	Pepsina pH 1.3	Pancreatina pH 7.5		
		Quimiotripsina de baja especificidad	Tripsina	
Acr-DFA	93	109	63	Phe 29 (4.5%), Tyr 33 (5.1%), Arg 18 (2.8%), Lys 53 (8.3%)
Acr	23	29	17	Phe 9 (5.5%), Tyr 3 (1.8%), Arg 12 (7.4%), Lys 8 (4.9%)
DFA	70	87	47	Phe 20 (4.0%), Tyr 30 (6.0%), Arg 7 (1.4%), Lys 45 (9.0%)
<b>Estructura tridimensional de Acr-DFA<sub>tag</sub> obtenida con el programa I-TASSER.</b>		 <p>En magenta el 6xHis, en azul Acr y en amarillo el DFA<sub>tag</sub>. En rojo se marcan los aminoácidos aromáticos que intervienen en la unión al almidón: Y18 y Y20 y en verde los W32.</p>		



**Figura 6.7.** Cinética de degradación de Acr-DFA<sub>tag</sub> en FGS. 10 µg de la proteína incubada en presencia de pepsina y pH 1.2 analizada por SDS-PAGE al 12% (arriba) M: marcador de peso molecular SDS-PAGE Broad Range Standard, BIO-RAD y Western Blot (abajo) M: marcador de peso molecular 6xHis Protein Ladder QIAGEN. **A y B.** Proteína libre. **C y D.** Proteína inmovilizada en 1 mg de almidón de maíz. (C=10 µg de proteína incubada con el fluido a pH 1.2 sin la proteasa, durante 30 min).

Por su parte en FIS, la proteína libre ya no es detectada en el Western Blot después de los 45 min (figura 6.8A y B) en comparación con la proteína inmovilizada que alcanza a observarse hasta los 60 min (figura 6.8C y D). Como en el caso del FGS, la integridad de la proteína es afectada por la proteólisis en el sentido C-terminal, por lo que la pérdida del tallo de histidinas impide el reconocimiento de la proteína. Sin embargo, en los geles SDS-PAGE se pueden observar las diferencias en el patrón de bandas de degradación. En ambos casos se puede observar un fragmento de 20 kDa aproximadamente y que corresponde a Acr, y que permanece hasta los 45 min cuando es proteína libre y hasta los 120 min cuando está inmovilizada. Esto muestra la cinética retardada de degradación de la proteína inmovilizada con respecto a la proteína libre, ya que Acr continua liberándose de la micropartícula por más tiempo lo cual es deseable para efectos de la disponibilidad del antígeno.



**Figura 6.8.** Cinética de degradación de Acr-DFA<sub>tag</sub> en FIS. 10 µg de la proteína incubada en presencia de pancreatina y pH 7.5 analizada por SDS-PAGE al 12% (marcador de peso molecular SDS-PAGE Broad Range Standard, BIO-RAD) y Western Blot (marcador de peso molecular 6xHis Protein Ladder QIAGEN). **A y B.** Proteína libre. **C y D.** Proteína inmovilizada en 1 mg de almidón de maíz. (C=10 µg de proteína incubada con el fluido sin la proteasa durante 30 min).

De la misma forma y con el objetivo de discriminar el efecto del pH, la proteína libre e inmovilizada se incubó en presencia de FIS pero sin pancreatina (pH 7.5). Después de 30 min de incubación a 37°C, tanto la proteína libre como la inmovilizada resistieron el pH. Sugiriendo que el daño principal sufrido por la proteína ocurre por la acción de las proteasas.

#### 6.4. POTENCIAL INMUNOGÉNICO DEL SISTEMA ACARREADOR

Para evaluar si el sistema de inmovilización sobre las micropartículas de almidón permite la llegada de la proteína recombinante a los sitios de inducción de la respuesta inmune en mucosa, estimulando en consecuencia la producción de anticuerpos anti-Acr a nivel sistémico, se inmunizaron ratones BALB/c con la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> libre o adsorbida en 1 mg de almidón de arroz y con la proteína Acr como control positivo.

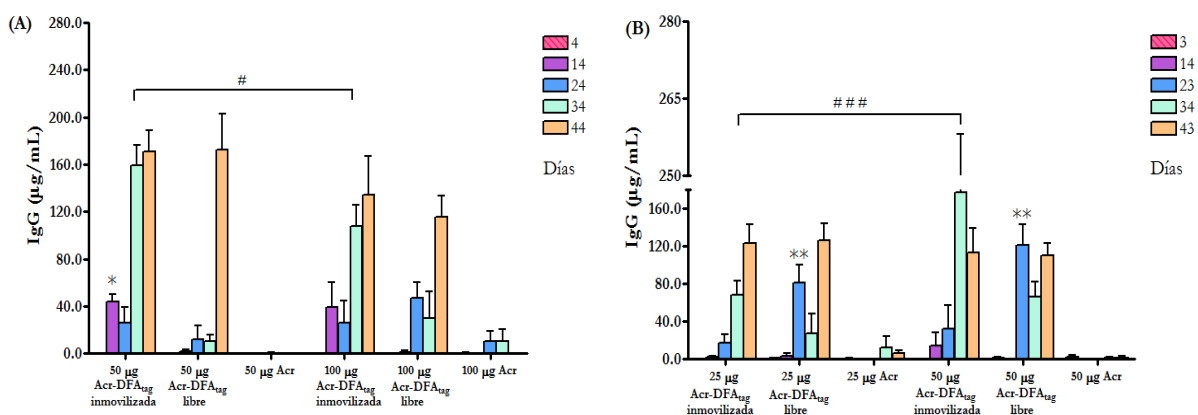
Utilizando un esquema de inmunización de dosis consecutivas y refuerzos cada 21 días sin el uso de adyuvantes, se evaluó el efecto de la dosis y vía (50 y 100 µg por vía *o.* y 25 y 50 µg vía *i.n.*) y el tratamiento (proteína fusión libre o adsorbida), en la inducción e intensidad de la respuesta inmune. Los ratones inmunizados con la proteína Acr en las mismas dosis por ambas vías sirvieron como control para discriminar el efecto tanto de la fusión como de la inmovilización en la inducción e intensidad de la respuesta. También se administró 1 mg de almidón de arroz por vía oral e intranasal como control de vehículo y se evaluó la respuesta inmune obtenida. Mediante la técnica de ELISA se determinaron los anticuerpos específicos de tipo IgG y subclases IgG1 e IgG2a en suero para ver la respuesta a nivel sistémico.

#### **6.4.1. Respuesta inmune humoral sistémica: Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-Acr**

El efecto de la fusión con el DFA<sub>tag</sub> y la inmovilización de la proteína recombinante sobre las micropartículas de almidón sobre la inducción de la respuesta inmune humoral sistémica hacia Acr se investigó, midiendo mediante la técnica de ELISA, los niveles de anticuerpos IgG anti Acr en el suero de los ratones inmunizados por ambas vías. La respuesta se comparó con aquella obtenida después de inmunizar con la proteína control (Acr). Como se esperaba no se detectaron anticuerpos específicos en el suero pre-inmune de los ratones, ni en el suero de los ratones que recibieron solo almidón, ni en el suero de los ratones naïve. Tampoco se observaron manifestaciones clínicas de toxicidad o reacciones adversas en los animales durante el protocolo experimental.

En los ratones inmunizados por vía *o.* con tres dosis consecutivas de 50 o 100 µg a intervalo de tres semanas, los anticuerpos anti Acr se detectaron primero en los grupos que recibieron la proteína inmovilizada con ambas dosis (día 14), alcanzando el nivel máximo el día 34. Este nivel se mantuvo hasta el final del esquema de inmunización (figura 6.9A). Esta observación sugiere el efecto adyuvante de la inmovilización, pues en contraste, la respuesta inducida con la proteína recombinante libre empezó más tarde alcanzando su nivel máximo el día 44. Como se observa en la figura, la inmunización sólo con Acr no indujo respuesta con 50 µg y muy poca respuesta con 100 µg, sugiriendo que tanto la fusión como la inmovilización favorecen el reconocimiento de Acr por parte del sistema inmune.

Por otra parte, en los ratones que recibieron dos dosis consecutivas de 25 o 50  $\mu\text{g}$  a intervalos de 3 semanas por vía *i.n.*, los anticuerpos anti Acr fueron más altos al día 23 en los grupos que recibieron la proteína recombinante libre en ambas dosis (figura 6.9B). Sin embargo, la respuesta no fue constante incrementando solo los días de la inmunización. Aunque los ratones que recibieron la proteína inmovilizada presentaron un título mayor en el día 34, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos al fin del esquema de inmunización. Estos resultados sugieren que el almidón puede ser un impedimento en el momento de la presentación antigénica en mucosa nasal. Al igual que en la inmunización vía *o.*, por vía *i.n.* la administración de Acr no indujo una respuesta sistémica de anticuerpos a ninguna dosis también indicando que la proteína sola puede estar actuando como hapteno y necesita ser transportada para ser reconocida por el sistema inmune.

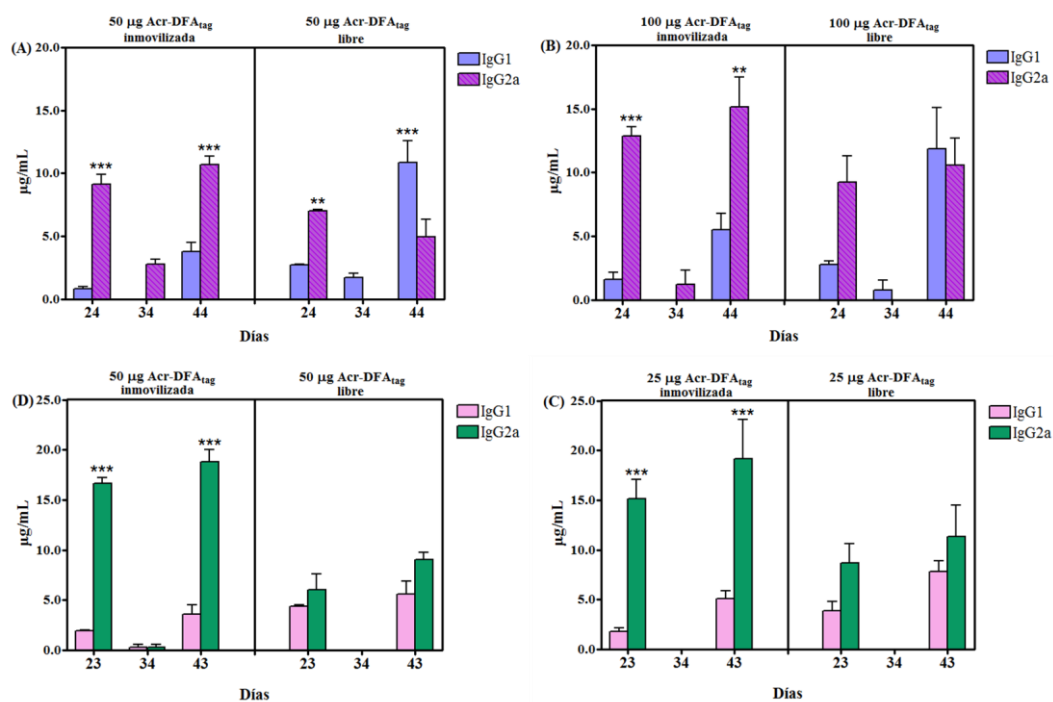


**Figura 6.9.** Niveles séricos de anticuerpos IgG anti-Acr en ratones inmunizados **A.** por vía oral y **B.** por vía intranasal con la proteína recombinante Acr-DFA<sub>tag</sub> libre o inmovilizada y la proteína control Acr. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (n=3). \*  $p < 0.05$  entre 50  $\mu\text{g}$  de la proteína Acr-SBD<sub>tag</sub> libre e inmovilizada, #  $p < 0.05$  entre 50 y 100  $\mu\text{g}$  of Acr-SBD<sub>tag</sub> inmovilizada, \*\* $p < 0.01$  entre la proteína libre e inmovilizada a las mismas dosis, ###  $p < 0.001$  entre 25 y 50  $\mu\text{g}$  of Acr-SBD<sub>tag</sub> inmovilizada.

#### 6.4.2. Niveles séricos de Isotipos IgG anti-Acr

Para determinar si la inmovilización sobre las micropartículas de almidón podría modular la respuesta inmune induciendo una respuesta de tipo celular (Th1) o humoral (Th2) hacia el antígeno relevante (Acr), se midieron mediante la técnica de ELISA los niveles de las subclases IgG1 e IgG2a, en el suero de ratones inmunizados por ambas vías. La respuesta sólo

se observó después de la segunda inmunización. Como en el caso de los niveles de IgG, la inmunización con Acr indujo una respuesta muy escasa o prácticamente nula de IgG1 e IgG2a. Como se muestra en la figura 6.12, los ratones inmunizados con la proteína inmovilizada presentaron niveles más altos de IgG2a mientras que los animales que recibieron la proteína libre mostraron una respuesta mixta Th1/Th2. En los animales inmunizados por vía *o.* (figuras 6.10A y B), la proteína inmovilizada a ambas dosis indujo niveles de IgG2a significativamente mayores que IgG1. De la misma forma, en los ratones inmunizados vía *i.n.* (figuras 6.10C y D), la proteína inmovilizada también indujo una respuesta IgG2a significativamente mayor que IgG1 pero solo en los días de inmunización. Por su parte, los ratones que recibieron la proteína libre presentaron una respuesta mixta Th1/Th2 de menor magnitud. Estos resultados en conjunto sugieren que la inmovilización sobre las micropartículas de almidón puede ser utilizada como una alternativa para modular o inducir una respuesta de tipo Th1 hacia la proteína inmovilizada. Este potencial también puede inferirse por el radio IgG2a/IgG1 obtenido con la administración de la proteína recombinante inmovilizada (tabla 6.2).



**Figura 6.10.** Niveles séricos de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-Acr en ratones inmunizados **A, B**, por vía oral y **C, D**, por vía intranasal con la proteína recombinante Acr-DFA<sub>tag</sub> libre o inmovilizada. Los valores representan la media ± EEM (n=3). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  entre IgG1 e IgG2a.

**Tabla 6.2.** Radio IgG2a/IgG1

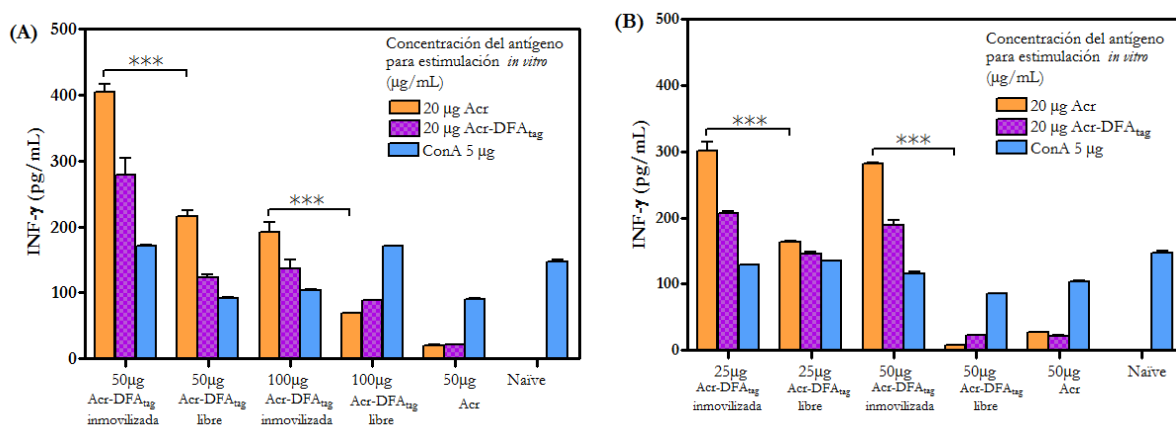
Grupo Inmunizado vía oral				
Días	50 µg Acr-DFA <sub>tag</sub>		100 µg Acr-DFA <sub>tag</sub>	
	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada	Libre
24	1.4	0.5	1.4	0.3
34	2.3	0.0	1.2	0.1
44	0.9	0.1	1.0	0.0
Grupo Inmunizado vía intranasal				
Días	25 µg Acr-DFA <sub>tag</sub>		50 µg Acr-DFA <sub>tag</sub>	
	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada	Libre
23	1.5	0.2	1.7	0.0
34	1.1	0.3	1.5	0.2
43	1.2	0.1	1.5	0.1

Cualquier radio mayor a 1 está asociado con una respuesta Th1 y cualquier radio menor a 1 está asociado con una respuesta Th2.

#### 6.4.3. Producción de INF- $\gamma$ *in vitro* y en tracto respiratorio

Para evaluar la contribución de la inmovilización en la inducción de una respuesta de tipo celular (Th1) y correlacionar con los niveles de IgG2a obtenidos en suero, los bazo de los ratones inmunizados se recuperaron 3 semanas después de la última inmunización y se cuantificó, mediante la técnica de ELISA en sándwich, el INF- $\gamma$  presente en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos con 20 µg de las proteínas Acr y Acr-DFA<sub>tag</sub> (figura 6.11). No se logró estimular la producción de INF- $\gamma$  con 5 y 10 µg de las proteínas. Los esplenocitos de todos los grupos liberaron INF- $\gamma$  en ausencia de estímulo antigénico como se puede observar por los niveles obtenidos con el mitógeno (Con A). No se observó producción de interferón antígeno-específico en los ratones naïve, mientras que el INF- $\gamma$  liberado por los esplenocitos de ratones inmunizados por ambas vías con la proteína recombinante aumentó después de la estimulación con el antígeno. Como se muestra en la figura 6.11A, los esplenocitos de los ratones inmunizados vía *o.* con 50 µg de la proteína inmovilizada produjeron los niveles más altos de interferón después de la estimulación con 20 µg de Acr. Aunque no se observaron diferencias en los niveles liberados por los esplenocitos de ratones inmunizados con 50 µg de la proteína libre y 100 µg de la proteína inmovilizada, hay una diferencia entre tratamientos (proteína libre o inmovilizada) a la misma dosis.

Por otra parte, como se muestra en la figura 6.11B, los esplenocitos de ratones inmunizados vía *i.n.* con 25 y 50  $\mu\text{g}$  de la proteína inmovilizada liberaron los niveles más altos de INF- $\gamma$  después de la estimulación con 20  $\mu\text{g}$  de Acr lo cual es consistente con los niveles de IgG2a obtenidos en suero. Cuando se estimuló con Acr-DFA<sub>tag</sub> la respuesta fue en todos los casos más baja, indicando que la inmunogenicidad es una principal contribución de Acr y no del DFA<sub>tag</sub>. La inmunización con 50  $\mu\text{g}$  de la proteína Acr indujo niveles más bajos de INF- $\gamma$  que la inmunización con la proteína recombinante libre e inmovilizada por ambas rutas, lo cual está en concordancia con la pobre respuesta de anticuerpos de los ratones que recibieron esta proteína.



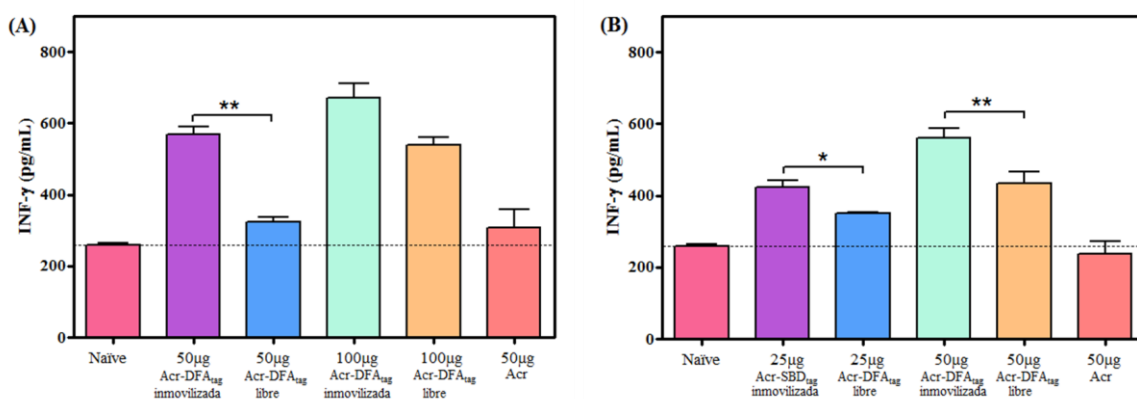
**Figura 6.11.** INF- $\gamma$  liberado *in vitro* por esplenocitos de ratones inmunizados con la proteína recombinante Acr-DFA<sub>tag</sub> libre o inmovilizada **A.** por vía oral y **B.** por vía intranasal. Los valores representan la media  $\pm$  EEM (n=3). \*\*\* $p < 0.001$  entre la proteína libre e inmovilizada a la misma dosis.

Así mismo, para ver si la respuesta de tipo Th1 también estaba presente en pulmón, se cuantificó el INF- $\gamma$  presente en los homogenizados de pulmón de los ratones inmunizados. Como se muestra en la figura 6.12, los niveles de INF- $\gamma$  fueron mayores en los pulmones de los ratones inmunizados con la proteína recombinante en comparación con los ratones naïve e inmunizados solo con Acr ( $p < 0.001$ ). En los ratones inmunizados por vía *o.* (figura 6.12A) los niveles más altos de INF- $\gamma$  se detectaron en los pulmones de los ratones que recibieron 100  $\mu\text{g}$  de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> inmovilizada. Sin embargo diferencias entre tratamientos sólo se observaron con la dosis de 50  $\mu\text{g}$ . Los ratones que recibieron 100  $\mu\text{g}$  de la proteína libre también tuvieron altos niveles de INF- $\gamma$  en comparación con los animales naïve ( $p > 0.001$ ).



Estos resultados muestran que el 50% de la proteína inmovilizada puede ser tan eficiente como el 100% de la proteína libre para inducir la producción de interferón por esta ruta.

Por su parte, en los ratones inmunizados vía *i.n.* ambos tratamientos (proteína libre e inmovilizada) indujeron más INF- $\gamma$  que los ratones naïve (figura 6.12B). Sin embargo, al igual que en la inmunización *o.* la producción más alta se presentó cuando los ratones recibieron la proteína inmovilizada. Esta observación está en concordancia con la respuesta mixta Th1/Th2 mediada por la proteína recombinante libre.



**Figura 6.12.** INF- $\gamma$  en homogenizado de pulmón de ratones inmunizados con la proteína recombinante Acr-DFA<sub>tag</sub> libre o inmovilizada **A.** por vía oral y **B.** por vía intranasal. Los valores representan la media  $\pm$  EEM ( $n=3$ ). \*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  entre la proteína libre e inmovilizada. Las líneas horizontales punteadas representan los niveles de interferón correspondientes en los animales naïve.

---

---

# 7 DISCUSIÓN

---

---

Pese al progreso significativo en el área de diseño y desarrollo de vacunas de sub-unidades y adyuvantes, permanece el interés en la búsqueda de nuevos sistemas de transporte y liberación de antígenos que tengan propiedades adyuvantes y que puedan ser utilizados en humanos (O'Hagan and Valiante, 2003; Reed *et al.*, 2009). El uso de micropartículas hechas de biomateriales para alcanzar y estimular las células del sistema inmune representa una alternativa no tóxica con bastante potencial en esta área (Reddy *et al.*, 2006). Los sistemas microparticulados no sólo ofrecen la posibilidad de modular la respuesta inmune dependiendo de la dosis y vía de administración (Gutierrez *et al.* 2002) sino que también ofrecen una excelente alternativa para despertar respuestas a nivel sistémico y en mucosas (O' Hagan, 1998). Sin embargo, hasta el momento los esfuerzos se han enfocado en el desarrollo de sistemas de liberación complejos tales como micro y nano partículas de polímeros funcionalizados, liposomas, virosomas o complejos inmuno estimulantes (ISCOMS por sus siglas en inglés) entre otros (Zhao *et al.*, 2014), cuyo uso en humanos todavía es controversial.

En el presente trabajo se propone un sistema alternativo para la administración de antígenos que tenga propiedades adyuvantes, basado en el uso de CBMs y polímeros naturales. El objetivo principal fue determinar el potencial de un Dominio de Fijación al Almidón derivado del DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* (DFA<sub>tag</sub>) para inmovilizar antígenos de tuberculosis sobre micropartículas de almidón, permitiendo así su transporte hasta los sitios de inducción de la respuesta inmune en mucosa. A diferencia de otros trabajos que utilizan micropartículas de maltooligosacáridos modificadas químicamente para permitir la unión covalente de proteínas para inmunización oral (Wikingsson and Sjöholm, 2002; Rydell and Sjöholm, 2004) o con micropartículas de hidroxietil-almidón (HES por sus siglas en inglés) para encapsular a los antígenos (Balasse *et al.*, 2008), aquí se aprovecharon las propiedades del

almidón (abundancia, bajo costo, forma particulada, biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioadhesividad e inocuidad) como una matriz propicia para la purificación, inmovilización, estabilización y transporte de proteínas de *M. tuberculosis* inmovilizadas con el DFA<sub>tag</sub>, en concreto el antígeno Acr (publicaciones en apéndices 2 y 3).

Gracias a la interacción específica que tiene el dominio con la  $\beta$ -ciclodextrina que es un oligosacárido cíclico constituido por 7 unidades de glucosa y que es análogo estructural del almidón, la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> pudo purificarse a partir del lisado bacteriano con buen rendimiento y nivel de pureza (figura 6.3). Por su parte, la adsorción de la proteína por el almidón analizada en isotermas ( $K_{ad}= 0.69 \mu\text{mol/mg}$  de almidón), resultó comparable a la reportada para la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* ( $K_{ad}= 0.54$ ) y la  $\alpha$ -amilasa de *L. plantarum* ( $K_{ad}=0.67$ ) (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005b). De acuerdo a las constantes de adsorción, que describen la distribución en el equilibrio entre la proteína presente en la fase sólida (proteína unida) y la proteína en la fase líquida (proteína no unida) y presumiendo que la superficie de adsorción es homogénea y que no hay interacciones entre las moléculas adsorbentes, la fusión Acr-DFA<sub>tag</sub> se une al almidón tanto como la amilasa completa (figura 6.5). Por su parte, la ausencia de proteína en los sobrenadantes después de 24 horas de incubación sugiere un plegamiento de la proteína que permitió la interacción del DFA<sub>tag</sub> con el almidón (figura 6.6) y es tan estable como para permitir la permanencia de la proteína después del lavado del almidón.

También se demostró que dicha inmovilización confiere estabilidad en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, lo cual resulta importante para el transporte de proteínas antigénicas cuando van a ser administradas por vía oral. Se sabe que la mayoría de las proteínas sufren degradación en ambientes muy ácidos o muy alcalinos (por daños en puentes de hidrógeno y residuos aromáticos) en especial a altas temperaturas, en consecuencia y aunque las condiciones *in vivo* pueden no ser tan severas, son susceptibles a la hidrólisis gastrointestinal en los primeros 15 segundos. En este contexto, el efecto estabilizante obtenido con la inmovilización mediada por el DFA<sub>tag</sub> y medido como el retraso en la degradación de la proteína respecto a la proteína libre en las mismas condiciones, puede deberse a que con la inmovilización se disminuye la solubilidad de la proteína y se protege de la digestión proteolítica a los residuos hidrofóbicos involucrados en la interacción con el almidón. Aunque las interacciones no-covalentes son más débiles en comparación con las uniones covalentes, cuando están en mayor número pueden aumentar de forma importante la estabilidad de la

proteína en condiciones de pH, proteasas y temperatura extremas (Karshikoff, 2006), lo cual también es factible que ocurra con el DFA<sub>tag</sub> que está constituido por dominios repetidos, cada uno con su sitio de unión. Con este resultado se pudo predecir entonces la utilidad del sistema (constituido por el gránulo de almidón y el DFA<sub>tag</sub> como tallo de inmovilización) para la administración del antígeno Acr por vía oral. Sin embargo, era necesario comprobar que después de su administración por esta vía y por vía nasal la proteína fuera capaz de llegar hasta el tejido linfoide asociado a mucosas e inducir una respuesta.

En este trabajo, dicho potencial inmunogénico se demostró con los niveles de IgG obtenidos al inmunizar ratones BALB/c por vía oral e intranasal con la proteína recombinante (figura 6.9) bajo un esquema de dosis repetidas y sin adyuvantes. Se demostró que la fusión de Acr con el DFA<sub>tag</sub> y la posterior inmovilización de la proteína sobre las micropartículas de almidón contribuyeron a la inmunogenicidad de Acr que por sí sola y sin adyuvantes no indujo una respuesta específica de anticuerpos, al menos en las dosis y vías evaluadas. Este hallazgo está en concordancia con reportes recientes que indican que la proteína Acr producida en un sistema heterólogo no tiene las mismas propiedades inmunogénicas e incluso protectoras (dependientes de su plegamiento y función como chaperona) reportadas para la proteína obtenida a partir de lisados de micobacteria (Taylor *et al.*, 2012). En estudios recientes, se ha reportado la inmunogenicidad de Acr fusionada con otras proteínas antigénicas de fase aguda como Mtb10.4 (Niu *et al.*, 2011) o cuando forma parte de complejos inmunes fusionada con la proteína 85B y es mezclada con anticuerpos monoclonales anti Acr y anti 85B (Pepponi *et al.*, 2013; Pepponi *et al.*, 2014), fenómeno también observado en este estudio cuando se fusionó con el DFA<sub>tag</sub> y que corrobora el hecho que la proteína por sí sola no es capaz de estimular al sistema inmune.

Considerando que es posible modular la respuesta inmune en función de la naturaleza y dosis del antígeno, la ruta de administración, la presencia o no de adyuvantes y el esquema de inmunización, para el presente trabajo se seleccionó un esquema que pudiera favorecer el efecto adyuvante del sistema de inmovilización.

Los resultados obtenidos muestran que el inicio y tipo de respuesta se vieron afectados dependiendo del tratamiento (proteína libre o inmovilizada), la dosis y la ruta (figura 6.9). La inmunización oral con la proteína inmovilizada indujo una respuesta IgG más temprana y una respuesta IgG2a más fuerte, lo cual es consistente con resultados reportados para micropartículas de polímeros usadas para inmunización por esta vía (Elamanchili *et al.*, 2007).

Esta diferencia puede estar dada, como se observó en los ensayos de digestión en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, por la estabilidad conferida por la inmovilización en presencia de valores de pH extremos y proteasas, lo que en consecuencia permite que mayor cantidad de proteína alcance los sitios de inducción de la respuesta inmune ubicados en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT por sus siglas en inglés). Así mismo y dado que los adyuvantes deben potenciar la respuesta inmune así como garantizar los niveles adecuados de anticuerpos de afinidad suficiente e isotipos apropiados, para conferir protección contra los agentes infecciosos, el potencial efecto adyuvante de la inmovilización se observó con la inducción preferencial de anticuerpos IgG2a (figura 6.10). Esto coincide con lo reportado por algunos autores que utilizando micropartículas de almidón poliacriladas para inmunización oral demostraron que los refuerzos consecutivos pueden favorecer la inducción de anticuerpos Th1 dependientes (Wikingsson and Sjöholm, 2002).

Con respecto a la dosis, los ratones que recibieron la dosis más pequeña (50 µg) de Acr-DFA<sub>tag</sub> por vía oral alcanzaron niveles más altos de IgG que los ratones que recibieron 100 µg, indicando que cuando se inmoviliza la proteína, dosis más bajas son suficientes para despertar la respuesta inmune por esta vía. Se ha observado que con dosis altas de antígeno por vía oral, se puede presentar una falta de respuesta o anergia de las células T (Weiner et al., 2011). Sin embargo, se requiere una rigurosa caracterización de la respuesta por períodos de tiempo más largos para confirmar esta respuesta.

En los ratones que se inmunizaron por vía intranasal, las respuestas fueron similares entre dosis, pero los anticuerpos IgG se indujeron primero en los ratones que recibieron la proteína libre en un nivel apenas superior con 50 µg de la proteína. Este hallazgo sugiere que el almidón podría representar un impedimento en la mucosa nasal de los ratones y además muestra que la proteína libre puede resistir más en un ambiente más favorable con un pH menos ácido, bajo nivel de enzimas proteolíticas y una mayor irrigación. Sin embargo, y pese a que no se obtuvo un efecto estabilizante de las micropartículas por esta ruta, la inmovilización fue importante para la inducción preferencial de anticuerpos IgG2a (figura 6.10). Por lo tanto, una estandarización rigurosa de la cantidad de acarreador y proteína debe realizarse para futuras inmunizaciones por esta ruta y obtener la respuesta inmune deseada. Gutierrez *et al.* (2002) tampoco observaron una relación dosis-respuesta en la producción de anticuerpos IgG séricos inducidos después de la inmunización intranasal consecutiva de tres dosis de BSA microencapsulada en partículas de PLG en un rango de dosis de 50 a 200 µg, argumentando la

importancia de considerar las diferencias entre el epitelio nasal y los mecanismos de inducción de la respuesta inmune por esta ruta.

Finalmente, se determinaron los niveles de INF- $\gamma$  específico liberado por esplenocitos purificados de ratones inmunizados con la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> inmovilizada (figura 6.11) y los niveles en pulmón después de la inmunización (figura 6.12). Cuantificar esta citocina era importante ya que los anticuerpos de isotipo IgG2a están asociados con una respuesta tipo Th1, y esta respuesta a su vez es un requisito para la activación de los macrófagos y la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL) requeridos para la inmunidad protectora contra agentes infecciosos intracelulares, tales como *M. tuberculosis*. En concordancia con los niveles de IgG2a, los bazo de ratones inmunizados por ambas vías con la proteína inmovilizada liberaron una cantidad más alta de INF- $\gamma$  en comparación con los animales inmunizados con la proteína libre. Este hallazgo está de acuerdo con previos reportes. Stertman *et al.* (2004), evaluaron el efecto de la ruta de administración sobre la respuesta inmune de ratones inmunizados con micropartículas modificadas de almidón como adyuvante, observando que la administración consecutiva de estas partículas por vía oral puede cambiar el balance Th1/Th2 para incrementar el impacto de la respuesta Th1.

En los ratones inmunizados por vía intranasal, se pudo observar que el almidón puede ser un impedimento para favorecer respuesta IgG sistémica, pero su presencia fue importante para desviar la respuesta a Th1 como se vio por los niveles de IgG2a e INF- $\gamma$  obtenidos después de la inmunización con la proteína inmovilizada. Coucke *et al.* (2009), utilizando micropartículas de almidón acilado para la inmunización intranasal de conejos, también observaron una fuerte respuesta inmune concluyendo que las propiedades mucoadhesivas de los acarreadores hechos de polímeros son determinantes para modular la respuesta usando esta vía.

Como se observó en los homogenizados de pulmón, la inmovilización también favoreció la inducción de INF- $\gamma$ . Ratones inmunizados por ambas vías con la proteína inmovilizada presentaron niveles de INF- $\gamma$  específico en pulmón. Este hallazgo está en concordancia con acumulada evidencia que indica que el sistema inmune en mucosa nasal e intestinal comparte características inmunológicas que son diferentes de aquellas del sistema inmune sistémico lo cual puede ser explotado favorablemente para el diseño de vacunas administradas por estas vías (Kunisawa *et al.*, 2008). El resultado también coincide con reportes que indican, que después de su depósito en pulmón, antígenos solubles e inmovilizados

pueden despertar respuestas en los nódulos linfáticos de drenaje, pero todo indica que los sistemas particulados son más eficientes para inducir respuestas inmunes específicas en bazo (Eyles et al., 2003). Como se observa en las figuras 6.11 y 6.12, los niveles de INF- $\gamma$  en pulmón fueron mayores (400-600 pg/mL) que los niveles de INF- $\gamma$  en sobrenadantes de esplenocitos cultivados *in vitro* (300-400 pg/mL). También se observó que los niveles de INF- $\gamma$  obtenidos en los ratones inmunizados con la proteína libre y la proteína inmovilizada presentaron resultados contrarios en los esplenocitos y homogenizados de pulmón. Los bazos de los ratones que recibieron la dosis más baja de proteína inmovilizada por vía oral e intranasal fueron más eficientes para liberar el INF- $\gamma$  *in vitro*, mientras que *in vivo*, los ratones que recibieron las dosis más altas con la proteína inmovilizada produjeron los niveles más altos de la citocina. Este hallazgo, indicativo que la re-estimulación *in vitro* de células T de memoria del bazo no es predictiva de la estimulación *in vivo* de las células T de memoria de los pulmones, también ha sido observado por otros autores.

Todoroff *et al.* 2013 evaluando la inmunogenicidad del antígeno 85A administrado en pulmón y con tres adyuvantes diferentes, observaron la misma discrepancia, argumentando que después de la administración del antígeno, las células T activadas se movilizan rápidamente en el lumen de la vía aérea para producir el interferón, mientras que *in vitro* los linfocitos T son activados directamente por el antígeno. Por otra parte también se sabe que las células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs), tales como las células dendríticas (CDs) pueden activarse de forma diferente después de la inmunización por estas rutas, no sólo porque hay diferentes subsets de CDs dependiendo de su localización (Villadangos and Schnorrer, 2007), sino porque también pueden activarse de forma diferente cuando se usan biomateriales (Reddy *et al.*, 2006). Esto también explica por qué la ruta de administración, la composición y estructura del antígeno (si está o no asociado a un acarreador) puede afectar el tipo y magnitud de la respuesta.

El sistema acarreador utilizado en el presente trabajo está compuesto de almidón crudo insoluble sin modificaciones químicas o ligandos capaces de estimular la inmunidad innata, la cual a su vez contribuya a la inmunidad específica. Las propiedades inmunoestimulantes para glucanos con enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) se han reportado para carbohidratos derivados de plantas medicinales (Nair *et al.*, 2006) o para el glucógeno (Kakutani *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que estas propiedades son dependientes de factores como la estructura, el peso molecular y la solubilidad (Wismar, 2010). Por otra parte se sabe que los beta glucanos con

enlaces  $\beta$ -(1,3)-D- $\beta$ -(1,6) son las estructuras de carbohidratos mayormente reconocidas por parte de las células especializadas del sistema inmune innato (como macrófagos y CDs). Así mismo, carbohidratos como el dextrano, manano o quitina (Petrovsky and Cooper, 2011) y glucanos con fucosas, pueden unir receptores de carbohidratos (de tipo lectina principalmente) en dichas células, conduciendo a su activación y a las cascadas de señalización para la producción de respuesta inmune específica (Wismar, 2010).

Sin embargo, no existen reportes de propiedades inmunoestimulantes para el almidón soluble o insoluble, ni están caracterizados los receptores que pueden mediar su interacción con las células del sistema inmune cuando éste es administrado vía mucosas. Aun cuando las unidades estructurales (amilosa y amilopectina) podrían ser los ligandos de los receptores en macrófagos y CDs, faltan descripciones sobre cómo este fenómeno pudiera ocurrir en las mucosas en contacto directo con el gránulo. En este contexto, el efecto adyuvante que observamos con nuestro sistema puede explicarse, como para toda micropartícula, por el efecto de depósito y la habilidad para suministrar antígeno para su procesamiento a las CPAs. Se ha reportado que microesferas biodegradables con tamaños inferiores a 10 micras pueden ser fagocitadas por este tipo de células y además pueden prolongar la presentación *in vitro* de la proteína o péptido asociado (Audran *et al.*, 2003). En este contexto, las micropartículas que usamos en este trabajo tienen el tamaño adecuado (entre 4 y 5  $\mu\text{m}$ ) para ser internalizadas eficientemente por las CDs especializadas y en consecuencia permiten una presentación progresiva de las proteínas adsorbidas en el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT por sus siglas en inglés).

Este trabajo presenta evidencias de la utilidad del sistema de inmovilización no-covalente sobre micropartículas de almidón crudo, mediado por el DFA<sub>tag</sub>, como sistema para la administración de antígenos vía mucosa. Más investigación se justifica para caracterizar las propiedades adyuvantes del almidón, así como para probar su capacidad en la inducción de protección o capacidad reforzante. Finalmente y considerando que también se pudo observar la inmunogenicidad conferida por la fusión con el DFA<sub>tag</sub>, se justifica más investigación para caracterizar el potencial efecto adyuvante que tenga el dominio y explorar así futuras aplicaciones. Ahondar en este aspecto puede enriquecer y fortalecer la línea de investigación de las aplicaciones biomédicas del DFA<sub>tag</sub>.



---

---

# 8

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

---

### 8.1. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se demuestra la utilidad del sistema de inmovilización sobre micropartículas de almidón crudo utilizando al DFA<sub>tag</sub>, como plataforma para la administración de antígenos de tuberculosis vía mucosas.

La capacidad de adsorción al gránulo de almidón de la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> es similar a la capacidad de adsorción de la  $\alpha$ -amilasa silvestre, lo que permitió utilizar el proceso en aplicaciones como la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad con  $\beta$ -ciclodextrina.

También se observó que la inmovilización confirió más estabilidad a la proteína Acr-DFA<sub>tag</sub> frente a condiciones drásticas de pH y proteasas *in vitro*, lo cual permitió predecir la utilidad del sistema acarreador para administrar la proteína por vía oral.

El potencial inmunogénico del sistema (fusión e inmovilización) pudo comprobarse con el nivel de anticuerpos específicos detectados en suero después de administrar la proteína tanto libre como adsorbida, por vía oral e intranasal en un esquema de dosis repetidas y sin el uso de adyuvantes.

La rápida aparición de anticuerpos IgG hacia la proteína recombinante inmovilizada, así como la inducción preferencial de una respuesta inmune celular, evidenciada por los niveles séricos más altos de IgG2a y la producción de INF- $\gamma$  específico (liberado por células de bazo

estimuladas *in vitro* y detectado en homogenizados de pulmón), demuestran las propiedades adyuvantes de la inmovilización.

En este contexto y dado que no se utilizaron adyuvantes extras para potenciar la respuesta obtenida, se resalta la potencial aplicabilidad del sistema como acarreador y adyuvante en el área de desarrollo de vacunas de sub-unidades contra diversas enfermedades y aptas para su uso en humanos.

El sistema ofrece múltiples ventajas relacionadas con la simplicidad del protocolo de inmovilización (pues no se necesita preparar o funcionalizar la micropartícula), la inocuidad, el bajo costo y su aplicabilidad con un amplio rango de péptidos, proteínas o antígenos.

## **8.2. PERSPECTIVAS**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo proveen evidencia de la aplicabilidad del sistema de inmovilización en el área de diseño y desarrollo de sistemas acarreadores de antígeno con propiedades adyuvantes. Sin embargo, resulta importante ahondar en el conocimiento y caracterización de otros fenómenos tales como la inmunogenicidad conferida por el DFA<sub>tag</sub> y su posible actividad adyuvante, la eficacia del sistema para despertar respuesta inmune en mucosas, el sostenimiento en el tiempo de la respuesta inmune sistémica en función de dosis y vía de administración y los mecanismos moleculares por los cuales la micropartícula de almidón puede ejercer sus propiedades adyuvantes.

Al término del presente trabajo, experimentos *in vivo* se están realizando para probar la eficacia reforzante del sistema en animales vacunados previamente con BCG y retados con cepas virulenta e hipervirulenta de *M. tuberculosis*.

---

---

# 9 BIBLIOGRAFÍA

---

---

- Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, Schoolnik GK, Cassidy JP, Billeskov R and Andersen, P. **2011**. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nature Medicine*, 17:189-195.
- Abbott DW and Boraston AB. **2012**. Quantitative Approaches to The Analysis of Carbohydrate-Binding Module Function. In: *Methods in Enzymology*, Chapter 11. 510:211-231.
- Adjary S, Dobakhti F, Taghikhani M, Riazi-Rad F, Rafiei S and Rafiee-Tehrani M. **2007**. Oral administration of BCG encapsulated in alginate microspheres induces strong Th1 response in BALB/c mice. *Vaccine*, 25:4595-601.
- Armenta S. **2014**. Evolución de la especificidad y capacidad de adsorción de uno dominio de fijación al almidón. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM (en curso).
- Audran R, Petter K, Dannull J, Men Y, Scandelle E, Groettrup M, Gander B and Corradin G. **2003**. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages *in vitro*. *Vaccine*, 21:1250–1255.
- Badell E, Nicolle F, Clark S, Majlessi L, Boudou F, Martino A, et.al. **2009**. Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN- $\gamma$  producing T-cells. *Vaccine*, 27:28–37.
- Balasse E, Odot J, Gatouillat G, Andry MC and Madoulet C. **2008**. Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *Int. J. Pharm*, 353:131-138.
- Balmayor ER, Tuzlakoglu K, Azevedo HS and Reis RL. **2009**. Preparation and characterization of starch-poly-[epsilon]-caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 5:1035–1045.
- Beckham GT, Stålberg J, Knott BC, Himmel ME, Crowley MF, Sandgren M, Sørli M and Payne CM. **2014**. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Biotech*, 27:96-106.

- Belshaw NJ and Williamson G. **1990**. Production and purification of a granular-starch-binding domain of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. FEBS Lett, 269:350-353.
- Blakesley RW and Boezi JA. **1977**. A new staining technique for protein in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G-250. Anal. Biochem, 82:580–582.
- Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud. Número 11. Vol 29. Semana del 11 al 17 de marzo 2012.
- Boraston AB, McLean BW, Kormos JM, Alam M, Gilkes NR, Haynes CA, Tomme P, Kilburn DG and Warren RAJ. **1999**. Carbohydrate-binding modules: diversity of structure and function. In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering (Gilbert, H. J., Davies, G. J., Henrissat, B. and Svensson, B., eds.), pp. 202–211, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ and Davies G. **2004**. Carbohydrate-binding modules: fine tuning polysaccharide recognition. Biochem. J, 382:769-781.
- Boraston AB, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E and van Bueren AL. **2006**. A structural and functional analysis of  $\alpha$ -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. J. Biol. Chem, 281:587-98.
- Campos E, Branquinho J, Carreira AS, Carvalho A, Coimbra P, Ferreira P, and Gil MH. **2013**. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. Eur. Polym. J, 49:2005-2021.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. **2009**. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Res, 37:233–238
- Castañon-Arreola M, López-Vidal Y, Espitia-Pinzón C and Hernández-Pando R. **2005**. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), 85:115-26.
- Chen F, Kuziemko GM and Stevens RC. **1998**. Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. Infect. Immun, 66:2420-2425.
- Coucke D, Schotsaert M, Libert C, Pringles E, Vervaeet C, Foreman P, Saelens X and Remon JP. **2009**. Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. Vaccine, 27:1279-86.
- Cunningham AF and Spreadbury, CL. **1998**. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. J. Bacteriol, 180:801–808.

- Current Protocols in Cell Biology (1998) 1.3.1-1.3.10 Copyright © 1998 by John Wiley & Sons, Inc.
- Current Protocols in Immunology (1991) 2.1.1-2.1.22 Copyright © 1991 by John Wiley & Sons, Inc.
- Chang Z, Primm TP, Jakana J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, Gilbert HF, and Quiocho FA. **1996.** *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *J. Biol. Chem*, 271:7218–7223.
- Datta S, Christena LR and Rajaram YRS. **2013.** Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*, 3:1-9.
- Demissie A, Leyten E, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiafe P, Hill PC and Brookes R. **2006.** Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vacc. Immunol*, 13:179-186.
- Dumas B, Bottin A, Gaulin E and Esquerré-Tugayé MT. **2008.** Cellulose-binding domains: cellulose associated-defensive sensing partners? *Trends. Plant. Sci*, 13:160-164.
- Elamanchili P, Lutsiak CME, Hamdy S, Diwan M and Samuel J. **2007.** “Pathogen-mimicking” nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother*, 30:378–395.
- Eyles JE, Carpenter ZC, Alpar HO and Williamson ED. **2003.** Immunological aspects of polymer microsphere vaccine delivery systems. *J. Drug. Target*, 11:509-514.
- Fu T-J, Abbott UR and Hatzos C. **2002.** Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluids- A comparative study. *J. Agric. Food Chem*, 50:7154-7160.
- Giraud E and Cunny G. **1997.** Molecular characterization of the  $\alpha$ -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene*, 198:149–157.
- Gilbert HJ, Knox JP and Boraston AB. **2013.** Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 23:669-677.
- Giri PK, Sable SB, Verma I and Khuller GK. **2005.** Comparative evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization for development of mucosal vaccine against experimental tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 45:87-93.
- Guillén D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlon J, Ruiz B, Sánchez S and Rodríguez-Sanoja R. **2007.** Alpha-amylase starch binding domains: Cooperative effects of binding to

- starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Appl. Environ. Microbiol*, 73:3833-3837.
- Guillén D, Sánchez S and Rodríguez-Sanoja R. **2010**. Carbohydrate binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 85:1241-1249.
- Guillén D, Moreno-Mendieta S, Aguilera P, Sánchez S, Farres A and Rodríguez-Sanoja R. **2013**. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl. Environ. Microbiol*, 97:4141-4148.
- Gutierrez I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR and Pedraz JL. **2002**. Influence of dose and immunization route on the serum Ig G antibody response to BSA loaded PLGA microspheres. *Vaccine*, 20:2181-2190.
- Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM and Madrid MV. **1996**. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89:26-33.
- Hoft DF. **2008**. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet*, 372:164–175.
- Hogarth PJ, Jahans KJ, Hecker R, Hewinson RG and Chambers MA. **2003**. Evaluation of adjuvants for protein vaccines against tuberculosis in guinea pigs. *Vaccine*, 21:977–982.
- Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ and Maslesa-Galic S. **2000**. Recombinant bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *PNAS*, 97:13853–13858.
- Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG and Coates ARM. **2006**. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* -crystallin-like *hspX* gene caused increased bacterial growth *in vivo*. *Infect. Immun*, 74:861–868.
- Janeček S, Svensson B and MacGregor EA. **2011**. Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme Microbiol. Technol*, 49:429-440.
- Ji Q, Vincken JP, Suurs Luc CJM and Visser RGF. **2003**. Microbial starch-binding domains as tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Mol. Biol*, 51:789-801.
- Kakutani R, Adachi Y, Kajiura H, Takata H, Kurikia T Ohno N. **2007**. Relationship between structure and immunostimulating activity of enzymatically synthesized glycogen. *Carbohydr Res*, 342:2371–2379.

- Karshikoff A. **2006**. Non-covalent interactions in proteins. Imperial College Press. London, 333pp.
- Kennaway CK, Benesch JLP, Gohlke U, Wang L, Robinson CV, Orlova EV, Saibi HR and Keep NH. **2005**. Dodecameric structure of the small heat shock protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Chem. Biol, 280: 33419-33425.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. **2010**. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids Surf B: Biointerfaces, 75:1-18.
- Kunisawa J, Nochi T and Kiyono H. **2008**. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. Trends Immunol, 29:505-513.
- Laemmli UK. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680–685.
- Martín C. **2005**. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? Eur. Respir. J, 26:162-167.
- McShane H, Pathan AA, Sander CR, Goonetilleke NP, Fletcher HA and Hill AVS. **2005**. Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. Tuberculosis, 85:47–52.
- Monahan IM, Betts J, Banerjee DK and Butcher PD. **2001**. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. Microbiology, 147:459–471.
- Moreno-Mendieta SA, Rocha-Zavaleta L and Rodríguez-Sanoja R. **2010**. Adjuvants in tuberculosis vaccine development. FEMS Immunol Med Microbiol, 58: 75-84.
- Morlon-Guyot J, Mucciolo-Roux F, Rodríguez-Sanoja R and Guyot JP. **2001**. Characterization of the *L. manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene. DNA Sequence, 12:27–37.
- Nair PKR, Melnick SJ, Ramachandran R, Escalon E and Ramachandran C. **2006**. Mechanism of macrophage activation by (1,4)- $\alpha$ -D-glucan isolated from *Tinospora cordifolia*. Int Immunopharmacol, 6:1815-1824.
- Nakamura LK. **1981**. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch hydrolysing species from cattle waste-corn fermentations. Int. J. Syst. Bacteriol, 31:56-63.
- Niu H, Hu L, Li Q, Da Z, Wang B, Tang K, et.al. **2011**. Construction and evaluation of a multistage *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccine candidate Mtb 10.4-HspX. Vaccine, 29:9451-9458.
- O'Hagan DT. **1998**. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. Adv. Drug Deliv. Rev, 34:305-320.

- O'Hagan DT and Valiante NM. **2003**. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*, 2:727–735.
- O'Hagan DT, Singh M and Ulmer JV. **2006**. Microparticle-based technologies for vaccines. *Methods*, 40:10–19.
- Organización Mundial de la Salud: WHO Report **2009**: Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva: WHO; 2009.
- Patente MX/a/2012/005765. Dominio de fijación al almidón derivado y su uso en la inmovilización de proteínas recombinantes sobre almidón para purificación, estabilización y acarreador de antígenos y proteínas terapéuticas para inmunización en mucosas.
- Pepponi I, Stylianou E, van Dollewerd C, Reynolds G, et al., **2013**. Immune-complex mimics as a molecular platform for adjuvant-free vaccine delivery. *PLoS ONE* 8(4): e60855.oi:10.1371/journal.pone.0060855.
- Pepponi I, Diogo GR, Stylianou E, van Dollewerd C, et al., **2014**. Plant-derived recombinant immune complexes as self-adjuvanting TB immunogens for mucosal boosting of BCG. *Plant Biotechnol. J.* DOI: 10.1111/pbi.12185
- Pérez R. **2008**. Construcción de una proteína de fusión utilizando el DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* como tallo de purificación. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM.
- Petrovsky N and Cooper PD. **2011**. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccine*, 10:523-537.
- Reddy ST, Swartz MA and Hubbell JA. **2006**. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *TRENDS Immunol*, 27:573-579.
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN and Friede M. **2009**. New horizons in adjuvants for vaccine development. *TRENDS Immunol*, 30:23–32.
- Rodrigues A and Emeje M. **2012**. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydr. Polym*, 87:987–994.
- Rodríguez-Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N and Guyot JP. **2000**. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. *Appl. Environ. Microbiol*, 66:3350–3356.
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N and Sánchez S. **2005a**. Microbial starch-binding domain. *Curr. Opin. Microbiol*, 8:260–267.



- Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Guyot JP and Sánchez S. **2005b**. Starch binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases. *Appl. Environ. Microbiol*, 71:297–302.
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B, Sánchez S. **2009**. A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 36:341-346.
- Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry III CE and Andersen P. **2002**. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J. Bacteriol*, 184:3485-3491.
- Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, Lin MY, Franken K, et.al. **2007**. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect. Immun*, 75:941-949.
- Rydell N and Sjöholm I. **2004**. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. *Vaccine*, 22:1265–1274.
- Sahdev S, Khattar SK and Saini KS. **2008**. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem*, 307:249-264.
- Sajadi-Tabassi SA, Tafaghodi Mohsen and Reza Jaafari. **2008**. Induction of high antitoxin titers against tetanus toxoid in rabbits by intranasal immunization with dextran microspheres. *Int. J. Pharm*, 360:12-7.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. **1989**. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.
- Shi L, Jung YJ, Tyagi S, Gennaro ML and North RJ. **2003**. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 100:241–246.
- Shoseyov O, Shani Z and Levy I. **2006**. Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications. *Microbiol. Mol. Biol R*, 70:283-295.
- Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi NS and Gill BS. **2003**. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem*, 81:219-231.
- Singh S, Saraav I and Sharma S. **2014**. Immunogenic potential of latency associated antigens against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 32:712-716.
- Stertman L, Strindelius L and Sjöholm I. **2004**. Starch microparticles as an adjuvant in immunisation: effect of route of administration on the immune response in mice. *Vaccine*, 22:2863–2872.

- Stertman L, Lundgren E and Sjöholm I. **2006**. Starch microparticles as a vaccine adjuvant: Only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response. *Vaccine*, 24:3661-3668.
- Suri S, Ruan G, Winter J and Schmidt CE. **2013**. *Biomaterials Science (Third Edition)*. Chapter I.2.19. Microparticles and Nanoparticles, p 360-388.
- Svensson B, Jespersen H, Sierks MR and MacGregor EA. **1989**. Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch degrading enzymes. *Biochem J*, 264:309–311.
- Tan ML, Choong PEM and Dass CR. **2010**. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*, 31:184-193.
- Taylor JL, Wieczorek A, Keyser AR, Grover A, Flinkstrom R, Karls RK, Bielefeldt-Ohmann , Dobos KM and Izzo AA. **2012**. HspX-mediated protection against tuberculosis depends on its chaperoning of a mycobacterial molecule. *Immunol Cell Biol*, 90:945–954.
- Tester F, Karkalas J and Qi X. **2004**. Starch –composition, fine structure and architecture. *J Cereal Sci*, 39:151-165.
- Todoroff J, Lemaire MM, Fillee C, Jurion F, Renauld JC, Huygen K, et al., **2013**. Mucosal and systemic immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A following its co-delivery with CpG, MPLA or LTB to the lungs in mice. *PLoS One*. 8, e63344. doi: 10.1371/journal.pone.0063344.
- TubercuList (<http://tuberculist.epfl.ch/>). Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, and Cole ST. 2011. TubercuList - 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)*, 91:1-7.
- United States Pharmacopeia Convention Council of Experts. **2004**. Simulated gastric and intestinal fluids, TS. In: Board of Trustees, Editor, *The United States Pharmacopeia 27*, The National Formulary vol. 22, Rockville, MD, p. 2728.
- Vajdy M and O'Hagan DT. **2001**. Microparticles for intranasal immunization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51:127-141.
- Villadangos JA and Schnorrer P. **2007**. Intrinsic and cooperative antigen presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nature Rev. Immunol*, 7:543-555.
- Vretblad, P. **1974**. Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose- $\beta$ -amylase system. *FEBS Lett*, 47:86-89.
- Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. **2011**. Oral tolerance. *Immunol. Rev*, 241:241-259.

- Wikingsson L and Sjöholm I. **2002**. Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation, inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*, 20:3355–63.
- Williamson G, Belshaw NJ and Williamson MP. **1992**. O-Glycosylation in *Aspergillus glucoamylase* conformation and role in binding. *Biochem. J*, 282:423-428.
- Young D and Dye C. **2006**. The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell*, 124:683-687.
- Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu Y, Hickey MJ, Sherman DR and Barry III CE. **1998**. The 16-kDa  $\alpha$ -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *PNAS*, 95:9578–9583.
- Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao C, Milter N, Yu C. and Middelberg APJ. **2014**. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32:327-337.
- Zvi A, Ariel N, Fulkerson J, Sadoff JC, and Shafferman A. **2008**. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med Genomi*.

---

---

# 10

## ANEXOS

---

---

### ANEXO 5A. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ADN

#### 1. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PEQUEÑA ESCALA (MINI PREP)

1. Transferir el medio de cultivo (5 mL) a tubos Eppendorf de 1.5 mL y centrifugar a 12,000 x g 5 min a 4°C.
2. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 µL de solución I y mezclar vigorosamente en vórtex.
3. Agregar 200 µL de solución II, mezclar bien por inversión y agregar 150 µL de solución III. Mezclar el tubo gentilmente en el vórtex en posición invertida 10 segundos, reposar 3 a 5 min (trabajar en hielo).
4. Centrifugar a 12,000 x g 15 min a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo.
5. Adicionar al sobrenadante dos volúmenes de etanol absoluto, mezclar y dejar a -20°C por 30 min, centrifugar a 12,000 x g 15 min a 4°C.
6. Retirar el sobrenadante y limpiar el botón en 1 volumen de etanol al 70% hasta que se desprenda del fondo del tubo, centrifugar a 12,000 x g 15 min a 4°C.
7. Retirar el sobrenadante y dejar secar el botón a temperatura ambiente o a 37°C, resuspender el botón en 10 µL de solución TE (pH 8.0), conteniendo RNAsa (20 µg/mL), incubar a 55°C por 30 min.

## 2. LIMPIEZA DEL ADN PLASMÍDICO CON FENOL: CLOROFORMO

1. Diluir la muestra llevando a 500  $\mu\text{L}$  con agua mega pura estéril. Agregar proteinasa K 1/500 e incubar 1 hora a 55°C.
2. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de Fenol: Cloroformo (1:1), mezclar vigorosamente hasta la formación de una suspensión. Centrifugar 5 min a 15,400 x g.
3. Tomar la fase acuosa en un tubo Eppendorf nuevo y repetir los pasos 1 y 2.
4. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de Cloroformo: Isoamílico (24:1) y mezclar vigorosamente hasta formar una suspensión. Centrifugar 5 min a 15,400 x g.
5. Tomar la fase acuosa en un tubo nuevo y repetir los pasos 3 y 4.
6. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo y añadir 1/10 (50  $\mu\text{L}$ ) de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes (1 mL) de etanol absoluto, mezclar para homogenizar.
7. Dejar precipitar el ADN a -20°C durante 1 hora o a 4°C toda la noche. Centrifugar 15 min a 15,400 x g.
8. Retirar el sobrenadante y lavar el pellet con 250  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%, mezclar vigorosamente en vórtex. Centrifugar 15 min a 15,400 x g.
9. Retirar el etanol y secar al vacío (8 min en Speed Vac) 40°C o a temperatura ambiente toda la noche.
10. Resuspender en 200  $\mu\text{L}$  de agua mega pura estéril y medir la concentración de ADN a 260 nm (el cociente  $\text{ADN}_{260}/\text{Proteína}_{280}$  debe ser de 1.8-2.0).

## 3. DESFOSFORILACIÓN

### Calf Intestine Alkaline Phosphatase 1U/ $\mu\text{L}$ (Fermentas®)

#### Factor de conversión:

1  $\mu\text{g}$  de ADN lineal de 3kb contiene 1 pM de ADN 5' cantidad para la cual se recomiendan 0.05 U de CIAP

1. Disolver el ADN en agua libre de nucleasa

A partir de 20 ng/ $\mu\text{L}$ (0.2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) de vector de 6 kb 1 $\mu\text{g}$ – 6kb – 2 pM
--

0.2µg – 6kb – 0.4 pM para el cual se necesita 0.02 U de CIAP  
 Si para 1 pM de ADN se recomiendan 0.05 U de enzima, para 0.4 pM se requieren 0.02 U de Enzima

ADN	10 µL
Buffer 10X	2 µL
Agua	7.5 µL
Enzima	0.5 µL
Volumen final	20 µL

2. Incubar 30 min a 37°C
3. Inactivar la enzima 15 min a 85°C.
4. Precipitar el ADN: llevar a 50 µL con agua agregar 5 µL de CH<sub>3</sub>COONa 3M pH 5.2 y 10µL de EtOH absoluto.

#### 4. LIGACIÓN Y DIGESTIÓN

##### **Ligasa T4 (Promega)**

Une los grupos fosfato en 5' con los grupos hidroxilo en 3' de moléculas de ADN de doble cadena. Cada µg de plásmido es ligado con 4 unidades de ligasa T4 a una concentración de 3U/µL.

1. Obtener y purificar vector e inserto.
2. Calcular la relación vector inserto. Asumir siempre el 50% de recuperación tanto para el inserto como para el vector.

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector}} \times \text{radio molar } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

$$\frac{50 \text{ ng pGEM T-} \mathit{Easy} \times 0.432 \text{ kb } \mathit{Acr}}{3.015 \text{ kb pGEM T-} \mathit{Easy}} \times \frac{3}{1} = 21,5 \text{ ng}$$

3. Preparar la mezcla (no utilizar vórtex) e incubar toda la noche a 4°C o 3 h a temperatura ambiente. Incluir controles sin inserto y sin vector.
4. Inactivar la ligasa a 65°C por 10 min (se ha visto que este paso aumenta la eficiencia de transformación).

5. Transformar en la cepa de selección y sembrar en cajas con medio LB, el antibiótico de selección y el inductor e indicador (IPTG y X-Gal) para la  $\alpha$ -complementación (selección blanco/azul).
6. Picar las colonias blancas en busca del inserto, crecer en 5mL de LB con el antibiótico de selección, cosechar y extraer el ADN.
7. Digerir con las enzimas de restricción de selección.
8. Correr gel de agarosa al 0.8%.

## 5. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

### 5.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

1. Sembrar por estría la cepa deseada en una placa Petri con medio LB. Si la cepa tiene un marcador de selección, preparar la placa de LB con el antibiótico correspondiente. Incubar a 37 °C toda la noche.
2. Tomar una colonia con un palillo estéril e inocularlo en 5-10 mL de medio LB. Si la cepa tiene un marcador de selección adicionar el antibiótico correspondiente. Si se parte del glicerol inocular al 1% tubos con 5 mL de medio LB.
3. Incubar toda la noche (12-16 h) a 37 °C en agitación constante de 200 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25).
4. Inocular 50 o 100 mL de medio LB en matraz de 250 mL diluyendo 1:50 el cultivo de toda la noche, colocarlo en incubación a 37 °C en agitación constante de 200 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) por 2-4 h. Este tiempo dependerá de la cepa, y para determinarlo es necesario realizar una cinética de crecimiento previamente para establecer la fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}}$  de 0.4 a 0.6 unidades); si es posible calcular la velocidad específica de crecimiento [ $SGR = \ln(DO_1/DO_0)/(t_1-t_0)$ ] y tomar el cultivo cuando este valor sea lo más alto posible.
5. Una vez transcurrido el tiempo designado, tomar el cultivo e introducirlo en hielo, girar el matraz en el hielo (cada 5-10 min por 4-5 ocasiones) para favorecer el enfriamiento lo más rápido y homogéneo posible. Y dejar el cultivo en esta condición al menos 1 hora o hasta 3-4 h.

6. Cosechar las células por centrifugación a 12,800 x g 15 min a 4°C.
7. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en un volumen original del cultivo en agua mega pura estéril y fría. Centrifugar a 12,800 x g, 15 min a 4°C.
8. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en medio volumen original del cultivo en agua mega pura estéril y fría. Centrifugar a 12,800 x g, 15 min a 4°C.
9. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 8 mL de glicerol frío al 10% preparado con agua mega pura. Centrifugar a 12,800 x g, 15 min a 4°C.
10. Por último, retirar el sobrenadante y resuspender el botón en un volumen de glicerol frío al 10% igual al volumen celular (1 mL aproximadamente). Preparar alícuotas de 50 µL en tubos Eppendorf enfriados en cama de hielo seco y etanol al 70%, almacenar a -70°C.

## 5.2. ELECTROTRANSFORMACIÓN

1. Preparar las placas de medio LB con el antibiótico indicado para el marcador de selección del plásmido a usar para transformar. Si es el caso adicionar el inductor e indicador (IPTG y X-Gal) para la  $\alpha$ -complementación (selección blanco/azul). Preincubar a 37 °C al igual que el medio SOC para recuperar las bacterias después del choque térmico.
2. Adicionar a 50 µL de células competentes 1 a 2 µL del ADN plasmidico o el volumen de la ligación e incubar en hielo por 1 minuto.
3. Colocar en una cubeta de electroporación fría y seca de 0.1 cm, la mezcla de ADN y células.
4. Depositar la cubeta en el electroporador dar un pulso de 1.25V y de inmediato adicionar 950µL de medio SOC a 37°C y resuspender con la micropipeta (se debe obtener una constante de tiempo de 4 - 5 ms y 12.5 kV/cm).
5. Transferir las células a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, incubar a 37°C en agitación continua por 1 hora.
6. Sembrar 50 a 100 µL de la muestra y diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 (llevando a volumen final de 100 µL) en palcas Petri con medio LB con el antibiótico marcador del plásmido y/o la cepa.



7. Incubar 12 a 16 h a 37°C. Nunca exceder las 20 h de incubación.

### 5.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES POR $\text{Ca}^{+2}$

1. Repetir los pasos 1 al 6 del protocolo para preparación de células electrocompetentes.
2. Retirar el sobrenadante y resuspender (1/2 a 1/3 del volumen del cultivo) el botón en una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  50 mM estéril. No hacer uso del vórtex o resuspender con la micropipeta y evitar la agitación violenta para no dañar las bacterias.
3. Cosechar las células centrifugando nuevamente a 12,800 x g, 15 min a 4°C.
4. Descartar el sobrenadante (solución de  $\text{CaCl}_2$ ) por decantación. Repetir una vez más el lavado en la solución fría de  $\text{CaCl}_2$  50 mM.
5. Centrifugar y resuspender el botón obtenido en 1/10 a 1/15 de volumen del cultivo en una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  50mM y 20 % de glicerol.
6. Hacer alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de esta suspensión bacteriana en los tubos enfriados previamente en cama de hielo seco y etanol al 70%. Almacenar a -70 °C hasta su uso.

### 5.4. TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO

1. Preparar las placas de Petri con medio LB con el antibiótico indicado para el marcador de selección del plásmido a usar para transformar. Si es el caso adicionar el inductor e indicador (IPTG y X-Gal) para la  $\alpha$ -complementación (selección blanco/azul). Preincubar a 37 °C al igual que el medio SOC para recuperar las bacterias después del choque térmico.
2. Tomar un vial con las células, descongelarlo en hielo (5-10 min) y adicionar el plásmido o la reacción de ligación (no es necesario inactivar la enzima) y mezclar moviendo la punta de la micropipeta en la suspensión bacteriana, evitar subir y bajar el volumen con la micropipeta.

3. Colocar en hielo inmediatamente. Se puede emplear un volumen del plásmido o reacción de ligación no mayor al 20 % de la suspensión bacteriana (para 200  $\mu\text{L}$  de bacterias se pueden usar 40  $\mu\text{L}$  del plásmido). Incubar por 25-30 min.
4. En un termobloque (ThermoStat plus, Eppendorf) o baño María equilibrado a 42  $^{\circ}\text{C}$  introducir el vial con la suspensión bacteriana y el plásmido por 50-60 s, sin agitar.
5. Volver a colocar el vial en el hielo por 1-2 min. Adicionar 600-800  $\mu\text{L}$  del medio SOC en condiciones de esterilidad. Incubar en agitación (ThermoStat plus, Eppendorf) a 37  $^{\circ}\text{C}$  por 45-60 min.
6. Una vez recuperadas las bacterias, tomar 25-100  $\mu\text{L}$  (plásmidos) o 50-200  $\mu\text{L}$  (reacciones de ligación) de la suspensión bacteriana transformada y dispersar en la superficie de la placa.
7. Incubar 12 a 16 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ . Nunca exceder las 20 h de incubación de placas con  $\beta$ -lactámicos (Ampicilina o Carbenicilina) para evitar la aparición de colonias satélites. Cuando se realiza  $\alpha$ - complementación es posible que a 37  $^{\circ}\text{C}$  todas las colonias sean blancas, para hacer evidente la presencia de colonias azules, colocar las placas a 4  $^{\circ}\text{C}$  por algunas horas.

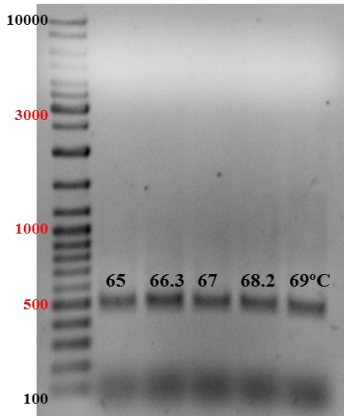
## ANEXO 5B. PCR y PRUEBA DE GRADIENTE

### PCR AmpliTaq®Gold DNA Polymerase (Invitrogen)

**Producto:** Acr. Tamaño de fragmento esperado 432 pb.

#### Mezcla de la Reacción:

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (μL)
Agua			74.4
Buffer	10X	1X	12.5
DMSO	10X	1X	12.5
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	7.5
Primer Frw	20 pM/μL	0.8 pM/μL	5.0
Primer Rev	20 pM/μL	0.8 pM/μL	5.0
Templete	50 ng/μL	50 ng/μL c/Rx	5.0
Enzima	5U/μL	1.25 U	0.6
<b>Volumen final para 5 reacciones</b>			<b>125 μL</b>



**Prueba de Gradiente.** Gel de agarosa al 0.8% donde se observa la amplificación del fragmento correspondiente al antígeno Acr de *M. tuberculosis* (432 pb). La temperatura final de alineamiento fue de 66.3°C.

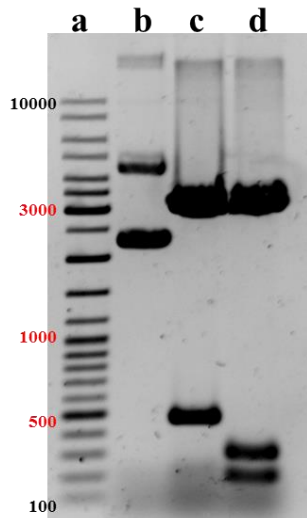
#### Rampa de Temperatura:

	Desnaturalización inicial	Ciclos				Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento		Extensión	
			Min	Max		
°C	94	94	65	72	72	72
Tiempo	5' (1X)	50''	45'' (30X)		45''	4' (1X)

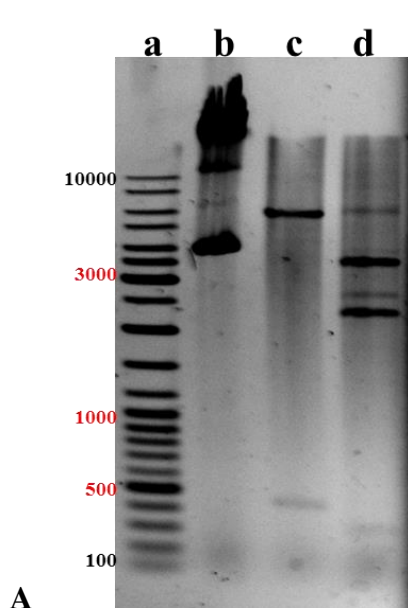
#### Gradiente de Temperatura:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
°C	65	65.7	66.3	67	67.6	68.2	68.8	69.4	70	70.7	71.3	72
Tubo	1		2	3		4	5					

## ANEXO 5C. OBTENCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pQAcr-DFA<sub>tag</sub>

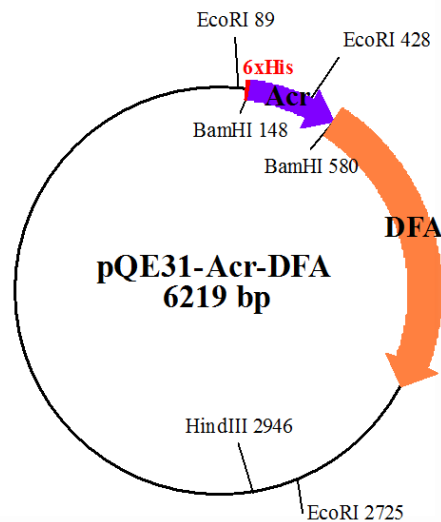


Gel de agarosa al 0.8% en el que se observa la ligación del fragmento Acr en el vector pGEM-T- *Easy* (plásmido pG-Acr). **a.** marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder Mix, Fermentas); **b.** plásmido cerrado; **c.** digestión con BamHI (432 pb); **d.** digestión con EcoRI (222 y 332 pb).



**A**

**B**



**A.** Gel de agarosa al 0.8% donde se observa el plásmido pQAcr-DFA<sub>tag</sub>. **a.** marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder Mix, Fermentas); **b.** plásmido cerrado; **c.** digestión con BamHI (432 pb); **d.** digestión con EcoRI (339, 2297 y 3583). **B.** Esquema del vector de expresión pQAcr-DFA<sub>tag</sub>.

## ANEXO 5D. INMOVILIZACIÓN DE $\beta$ -CICLODEXTRINA EN COLUMNA DE SEFAROSA

1. Suspender 4g de sefarosa Epoxy-activada 6B en 25 mL de agua destilada estéril y dejar en agitación por una hora a 4°C (utilizar tubo Falcon de 50 mL). No usar agitación magnética en ninguno de los casos.
2. Lavar en filtro del No. 3 (al vacío) con 400 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril.
3. Lavar el gel con 25 mL de NaOH 0.1N y eliminar el exceso de líquido.
4. Agregar 12 mL de una solución de NaOH 0.1N conteniendo  $\beta$ -ciclodextrina 30mM (pesar 0.408g de  $\beta$ -ciclodextrina). Siempre distribuir los volúmenes para lavar el filtro y evitar pérdidas. Agitar de 16 a 20 h a 45°C (colocar el tubo Falcon con la sefarosa en un recipiente con agua a 45°C y colocar en el horno de hibridación).
5. Lavar el exceso de ligando con el buffer de unión (NaOH 0.1N, 120 mL aproximadamente) y eliminar el exceso de líquido.
6. Bloquear los grupos activos restantes transfiriendo el gel a un buffer 1M de Etanolamina-HCl pH 8.0 (20 mL aproximadamente) y dejar incubando con agitación ligera a 45°C toda la noche.
7. Lavar con agua destilada (200 mL aproximadamente) y eliminar el exceso de líquido.
8. Agregar 200 mL de Glucosa al 2.5 % y dejar por lo menos 30 min en agitación.
9. Lavar tres veces el gel alternando pH con:
  - 100 mL buffer de acetatos 0.1 M pH 4.0; NaCl 0.5 M
  - 100 ml buffer de boratos 0.1 M pH 8.0; NaCl 0.5 M
10. Equilibrar el gel con buffer Citrato-fosfato 0.01 M, pH 5.0 (25 mL aproximadamente) y transferirlo a la columna.
11. Resuspender en el mismo buffer. En caso de no utilizar la sefarosa de inmediato utilizar buffer Citrato-fosfato 0.01 M pH 5.0 con NaCl 1 M (2.43 mL de ácido cítrico + 2.57 mL de fosfato dibásico de Na + 20 mL de NaCl 5 M + 75 mL de agua destilada).

**Lavado y almacenamiento:** Posterior al uso de la columna se repite el paso de tres lavados alternado pH con buffer de acetatos y de boratos. El gel se guarda en Citrato-fosfato con NaCl 1 M.

## ANEXO 5E. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE Acr-DFA<sub>tag</sub> POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A METAL

### Condiciones de cultivo e inducción:

- Preinóculo crecido a 29°C o.n, 150 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) en medio LB con Ap 100 µg/L y Kn 25 µg/mL.
- Inóculo al 1% en medio LB con Ap 100µg/L y Kn 25 µg/mL y glicerol al 1%
- Incubación a 29°C, 100 rpm (Incubadora New Brunswick Scientific G25) 12 h o hasta que la D.O.<sub>600nm</sub> alcance al menos 0.6 unidades
- Inducción con IPTG 0.1 mM durante 3 o 4 h
- Cosecha centrifugando a 14,000 x g durante 10 min a 4°C

### Obtención del lisado con la proteína soluble:

#### Soluciones necesarias:

- Buffer de lisis\* con: Inhibidor de proteasas 1/1000, β-mercaptoetanol 10 mM, Triton X-100 al 1%, lisozima 1mg/mL
- \*Para purificación por histidinas en buffer de unión con: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0.5 M e Imidazol 25 mM, pH 7.4.

### Procedimiento:

- Resuspender el pellet de 1L de medio en 6 mL del buffer de lisis
- Romper las células por sonicación: 3 pulsos de 10'' (60 Hz) tres veces con 1 min de descanso entre cada pulso.
- Centrifugar durante 20 min a 14,000 x g a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante y reservar.
- Resuspender el pellet en 3 mL de buffer de lisis y sonicar 3 pulsos de 20'' (60 Hz) tres veces con 1 min de descanso entre cada pulso.
- Juntar con el primer sobrenadante, mezclar y centrifugar durante 20 min a 21,700 x g a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante y filtrar por 0.45 y 0.22 µm.
- Agregar maltosa 15 mM al lisado antes de pasar por la columna.

### Purificación por Cromatografía de afinidad a metal por tallo de Histidinas

#### Soluciones necesarias:

- Buffer A (Unión): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 25 mM, pH 7.4.
- Buffer B (Elución): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 0.5 M, imidazol 250 mM, pH 7.4.

### Procedimiento:

- Para la purificación se emplea una columna HiTrap HP (GE, Healthcare), acoplada con níquel y equilibrada con el buffer de unión.
- La muestra clarificada se pasa por la columna empleando el equipo ÄKTA prime (GE Healthcare) a un flujo de 1 mL/min. La columna se lava exhaustivamente con el buffer de unión, las proteínas que no se unen a la columna se recuperan para su posterior

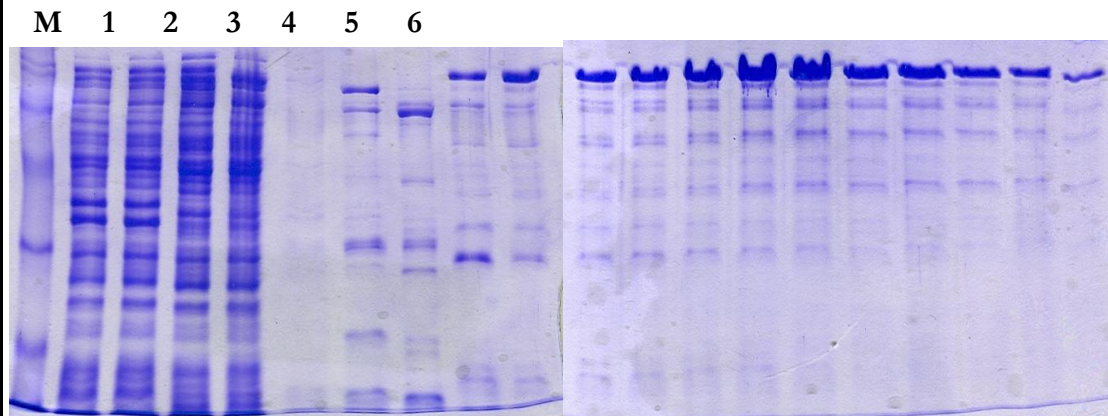
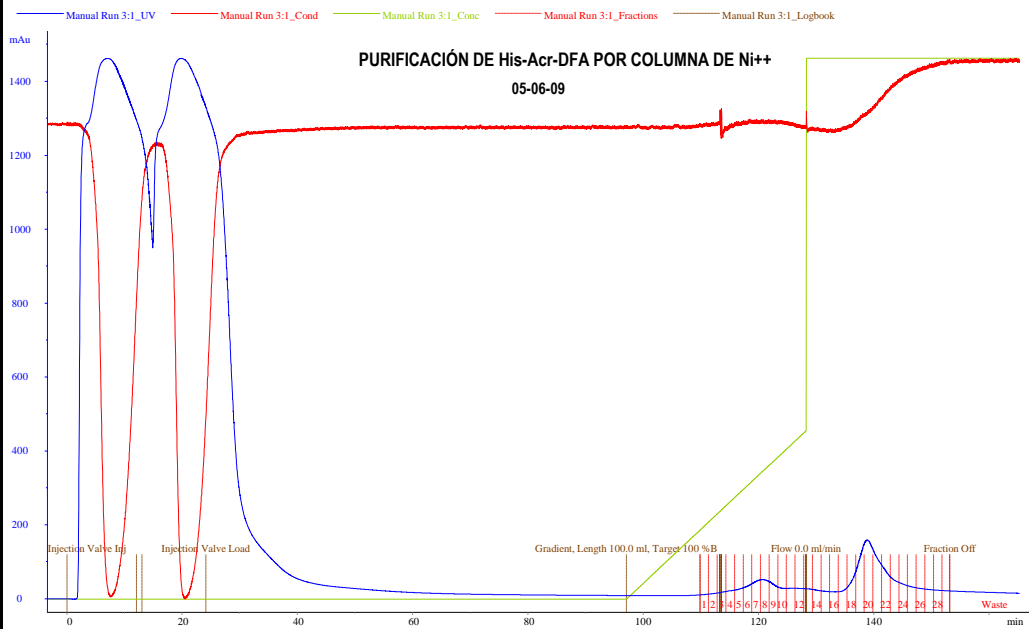
análisis. La proteína unida se eluye empleando un gradiente lineal de 0 a 100% con el buffer de elución a una velocidad de 1mL/min. Se colectan fracciones de 1 ml en tubos de ensayo.

- Las fracciones obtenidas se analizan por SDS-PAGE al 12%.
- Aquellas fracciones que contienen predominantemente a la proteína de interés se unen y se dializan contra el buffer Citrato-Fosfato 25 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.0

### Almacenamiento de la proteína:

A 4°C en el buffer de elución.

### Gel SDS-PAGE y Cromatograma



1= Sin inducir, 2=Inducido, 3=Lisado, 4=no unido, 5= lavado, 6 en adelante=fracciones

## ANEXO 5F. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA PRIMARIA

### 1. Acr-DFA<sub>tag</sub>

```

10      20      30      40      50      60
METRGS HHHH HHTDPMETAT TLPVQRHPRS LFPEFSELF A PPSFAGLRP TFDTRLMETR
      70      80      90      100     110     120
LEDEMETKEG RYEVRAELPG VDPDKVDIM ETVRDGLTI KAERTEQKDF DGRSEFAYGS
      130     140     150     160     170     180
FVRTVSLPVG ADEDDIKATY DKGILTVSVA VSEGKPTKHK IQIRVDPTSS SSTTTETKKV
      190     200     210     220     230 DFA → 240
YFEKPSSWGS RVYAYVYNKN TNKAITSAWP GKKMETTALG NDKYELDLDT DEDDSDLAVI
      250     260     270     280     290     300
FTDGTKQTPA ANEAGFTFTA DATYDQNGVV KKVYFEKPSW WGSRVYAYVY NKNTNKAITS
      310     320     330     340     350     360
AWPGKKMETT ALGNDKYELD LDTDEDDSDL AVIFTDGTKQ TPAANEAGFT FTADATYDQN
      370     380     390     400     410     420
GVVKKVYFEK PSSWGSRVYA YVYNKNTNKA ITSAWPGKKM ETTALGNDKY ELDLDTDEDD
      430     440     450     460     470     480
SDLAVIFTDG TKQTPAANEA GFTFTADATY DQNGVVKKVY FEKPSSWGSR VYAYVYNKNT
      490     500     510     520     530     540
NKAITSAWPG KKMETTALGN DKYELDLDTD EDDSDLAVIF TDGTKQTPAA NEAGFTFTAD
      550     560     570     580     590     600
ATYDQNGVVK KVYFEKPSW GSRVYAYVYN KNTNKAITSA WPGKKMETTA LGNDKYELDL
      610     620     630     640
DTDEDDSDLA VIFTDGTKQT PAANEAGFTF TADATYDQNG VV
    
```

<b>Number of AA:</b>	642
<b>MW:</b>	71359.2
<b>Theoretical pI:</b>	4.65

#### Atomic composition:

Carbon	C	3156
Hydrogen	H	4791
Nitrogen	N	819
Oxygen	O	1052
Sulfur	S	10

<b>Total # of (-)</b>	<b>charged residues</b>
<b>(Asp + Glu):</b>	109
<b>Total # of (+)</b>	<b>charged residues</b>
<b>(Arg + Lys):</b>	71
<b>Formula:</b>	

$C_{3156}H_{4791}N_{819}O_{1052}S_{10}$   
**Total number of atoms:** 9828

#### Amino acid composition:

Ala (A)	60	9.3%	Ile (I)	16	2.5%	Tyr (Y)	33	5.1%
Arg (R)	18	2.8%	Leu (L)	30	4.7%	Val (V)	42	6.5%
Asn (N)	30	4.7%	Lys (K)	53	8.3%	Pyl (O)	0	0.0%
Asp (D)	65	10.1%	Met (M)	10	1.6%	Sec (U)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%	Phe (F)	29	4.5%			
Gln (Q)	14	2.2%	Pro (P)	26	4.0%	(B)	0	0.0%
Glu (E)	44	6.9%	Ser (S)	38	5.9%	(Z)	0	0.0%
Gly (G)	40	6.2%	Thr (T)	76	11.8%	(X)	0	0.0%
His (H)	8	1.2%	Trp (W)	10	1.6%			

#### Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} cm^{-1}$ , at 280 nm measured in water.  
 Ext. coefficient 104170  
 Abs 0.1% (=1 g/l) 1.460, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

#### Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).  
 The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).  
 >20 hours (yeast, in vivo).  
 >10 hours (*Escherichia coli*, in vivo).

#### Instability index:

The instability index (II) is computed to be 26.60  
 This classifies the protein as stable.

**Aliphatic index:** 56.26      **Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.734



## 2. Acr

10 20 30 40 50 60  
METRGSHHHH HHTDPMETAT TLPVQRHPRS LFPEFSELEFA AFPSFAGLRP TFDTRLMETR  
70 80 90 100 110 120  
LEDEMETKEG RYEVRAELPG VDPDKVDIM ETVRDGQLTI KAERTEQKDF DGRSEFAYGS  
130 140 150 160  
FVRTVSLPVG ADEDDIKATY DKGILTVSVA VSEGKPTKHK IQI

**Number of amino acids:** 163

**Molecular weight:** 18487.5

**Theoretical pI:** 5.06

### Amino Acid composition:

Ala (A)	10	6.1%	Ile (I)	6	3.7%	Tyr (Y)	3	1.8%
Arg (R)	12	7.4%	Leu (L)	10	6.1%	Val (V)	11	6.7%
Asn (N)	0	0.0%	Lys (K)	8	4.9%	Pyl (O)	0	0.0%
Asp (D)	14	8.6%	Met (M)	5	3.1%	Sec (U)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%	Phe (F)	9	5.5%			
Gln (Q)	4	2.5%	Pro (P)	10	6.1%	(B)	0	0.0%
Glu (E)	18	11.0%	Ser (S)	9	5.5%	(Z)	0	0.0%
Gly (G)	10	6.1%	Thr (T)	16	9.8%	(X)	0	0.0%
His (H)	8	4.9%	Trp (W)	0	0.0%			

**Total number of negatively charged residues (Asp + Glu):** 32

**Total number of positively charged residues (Arg + Lys):** 20

### Atomic composition:

Carbon	C	809
Hydrogen	H	1261
Nitrogen	N	227
Oxygen	O	260
Sulfur	S	5

**Formula:** C<sub>809</sub>H<sub>1261</sub>N<sub>227</sub>O<sub>260</sub>S<sub>5</sub>

**Total number of atoms:** 2562

### Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 4470

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.242

### Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (*Escherichia coli*, in vivo).

### Instability index:

The instability index (II) is computed to be 33.55

This classifies the protein as stable.

**Aliphatic index:** 63.99

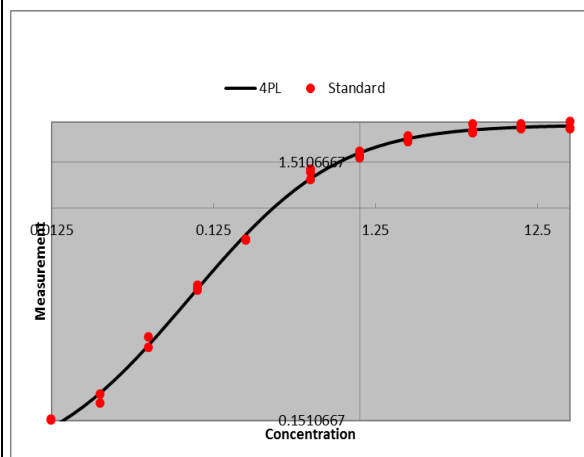
**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.707

**ANEXO 5G. CURVAS ESTÁNDAR DE ANTICUERPOS**  
**1. Curva estándar de IgG (stock de 1 mg/mL)**

µg/mL	20	10	5	2	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	Blank
<b>D.O.</b>	2.218	2.180	2.177	1.956	1.624	1.349	0.690	0.544	0.451	0.324	0.276	0.066
<b>450 nm</b>	2.103	2.091	2.058	1.866	1.660	1.474	0.819	0.564	0.379	0.251	0.212	0.058
	2.088	2.136	2.020	1.905	1.717	1.436	0.812	0.549	0.351	0.237	0.213	0.058

Conc.	Wells	Raw corrected	SEM	Backfit	Recovery %
20	A1	2.16	0.041	> Curve	-
	B1	2.04		7.187	35.94
	C1	2.03		5.928	29.64
10	A2	2.12	0.0258	> Curve	-
	B2	2.03		6.133	61.33
	C2	2.08		14.37	143.7
5	A3	2.12	0.0472	> Curve	-
	B3	2		4.349	86.98
	C3	1.96		3.284	65.69
2	A4	1.9	0.0261		115.4
	B4	1.81		1.608	80.41
	C4	1.84		1.855	92.76
1	A5	1.56	0.0272	0.8333	83.33
	B5	1.6		0.9044	90.44
	C5	1.66		1.039	103.9
0.5	A6	1.29	0.0371	0.484	96.79
	B6	1.41		0.6118	122.4
	C6	1.38		0.5687	113.7
0.2	A7	Flagged	0.0035	-	-
	B7	0.758		0.1857	92.87
	C7	0.751		0.1832	91.59
0.1	A8	0.483	0.0059	0.0982	98.19
	B8	0.503		0.1037	103.7
	C8	0.489		0.0998	99.77
0.05	A9	Flagged	0.0141	-	-
	B9	0.318		0.0552	110.4
	C9	0.29		0.0483	96.56
0.025	A10	Flagged	0.0074	-	-
	B10	0.191		0.0244	97.53
	C10	0.176		0.0208	83.34
0.0125	A11	Flagged	0.0008	-	-
	B11	0.151		0.0148	118
	C11	0.153		0.0151	121.1

**Curva Logística de 4 parámetros (4LP log-log)**



a	0.0972
b	1.137
c	0.347
d	2.104
MSE	0.0022
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9961</b>
SS	0.0628
SYX	0.0501

$$y = ((a-d)/1 + ((x/c)^b)) + d$$

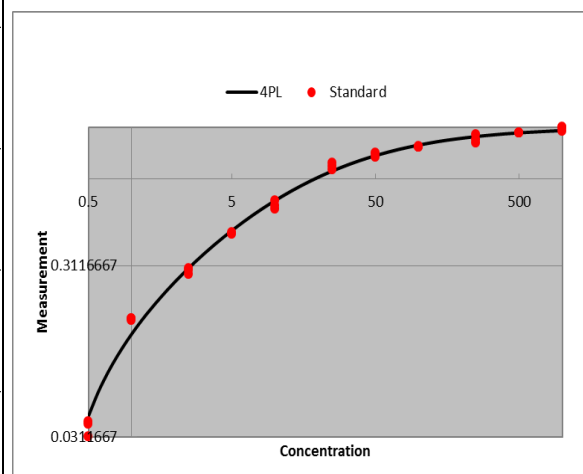
$$x = c * (((a-d)/(y-d)) - 1)^{(1/b)}$$

## 2. Curva estándar de IgG1 (stock de 100 µg/mL)

ng/mL	1000	500	250	100	50	25	10	5	2.5	1	0.5	Blank
D.O.	1.958	1.914	1.681	1.603	1.483	1.250	0.761	0.535	0.336	0.211	0.090	0.057
450	2.042	1.926	1.880	1.612	1.457	1.296	0.806	0.548	0.360	0.211	0.095	0.060
nm	2.065	1.917	1.769	1.604	1.408	1.191	0.729	0.472	0.352	0.208	0.097	0.057

Conc.	Wells	Raw corrected	SEM	Backfit	Recovery %
1000	A1	1.9	0.0326	755.1	75.51
	B1	1.98		5939	593.9
	C1	2.01		> Curve	-
500	A2	1.86	0.0037	468.6	93.72
	B2	1.87		527.5	105.5
	C2	1.86		480.1	96.02
250	A3	1.62	0.0576	117.8	47.13
	B3	1.82		350.7	140.3
	C3	1.71		176.4	70.54
100	A4	1.54	0.0027	87.46	87.46
	B4	1.55		90.24	90.24
	C4	1.55		87.75	87.75
50	A5	1.42	0.022	58.62	117.2
	B5	1.4		54.11	108.2
	C5	1.35		46.86	93.73
25	A6	1.19	0.0305	30.4	121.6
	B6	1.24		34.38	137.5
	C6	1.13		26.13	104.5
10	A7	0.703	0.0224	8.831	88.31
	B7	0.747		9.925	99.25
	C7	0.67		8.1	81
5	A8	0.477	0.0064	4.637	92.74
	B8	0.49		4.826	96.52
	C8	Flagged		-	-
2.5	A9	0.278	0.0069	2.254	90.15
	B9	0.302		2.489	99.55
	C9	0.293		2.404	96.16
1	A10	0.152	0.0011	1.196	119.6
	B10	0.153		1.198	119.8
	C10	0.149		1.174	117.4
0.5	A11	0.0312	0.0022	0.448	89.6
	B11	0.0371		0.4784	95.67
	C11	0.0383		0.4846	96.92

**Curva Logística de 4 parámetros (4LP log-log)**



a	-0.0906
b	0.7681
c	16.87
d	2.007
MSE	0.0026
R <sup>2</sup>	0.9946
SS	0.0819
SYX	0.0541

$$y = ((a-d)/1 + ((x/c)^b)) + d$$

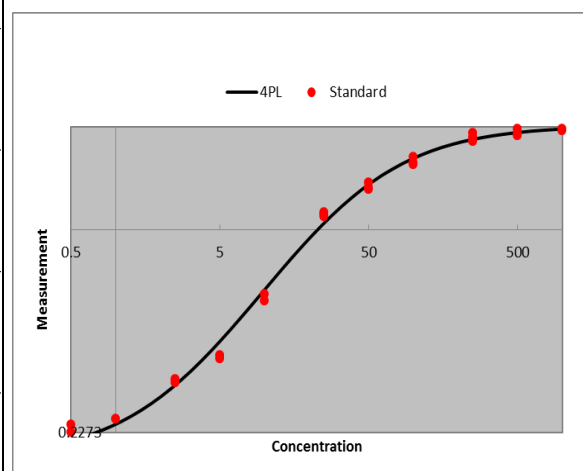
$$x = c * (((a-d)/(y-d)) - 1)^{(1/b)}$$

### 3. Curva estándar de IgG2a (stock de 100 µg/mL)

ng/mL	1000	500	250	100	50	25	10	5	2.5	1	0.5	Blank
D.O.	2.126	2.066	1.962	1.671	1.468	1.174	0.593	0.454	0.322	0.209	0.163	0.054
450 nm	2.178	2.139	2.081	1.755	1.414	1.155	0.647	0.444	0.390	0.339	0.294	0.052
nm	2.143	2.043	2.020	1.683	1.398	1.192	0.678	0.437	0.382	0.305	0.281	0.055

Conc.	Wells	Raw corrected	SEM	Backfit	Recovery %
1000	A1	2.07	0.0155	739.9	73.99
	B1	2.12		261.8	261.8
	C1	2.09		969.3	96.93
500	A2	2.01	0.0289	401.9	80.37
	B2	2.09		905.9	181.2
	C2	1.99		339.6	67.91
250	A3	1.91	0.0342	216.3	86.51
	B3	2.03		453.6	181.4
	C3	1.97		292.8	117.1
100	A4	1.62	0.0264	82.78	82.78
	B4	1.7		103.7	103.7
	C4	1.63		85.46	85.46
50	A5	1.41	0.0211	52.07	104.1
	B5	1.36		46.49	92.99
	C5	1.34		45.04	90.07
25	A6	1.12	0.0108	28.76	115
	B6	1.1		27.66	110.7
	C6	1.14		29.79	119.2
10	A7	Flagged	0.0153	-	-
	B7	0.594		8.58	85.8
	C7	0.624		9.389	93.89
5	A8	0.4	0.0048	4.093	81.85
	B8	0.391		3.893	77.86
	C8	Flagged		-	-
2.5	A9	Flagged	0.004	-	-
	B9	0.336		2.792	111.7
	C9	0.328		2.635	105.4
1	A10	Flagged	0	-	-
	B10	Flagged		-	-
	C10	0.251		1.177	117.7
0.5	A11	Flagged	0.0064	-	-
	B11	0.24		0.9697	193.9
	C11	0.227		0.7356	147.1

Curva Logística de 4 parámetros (4LP log-log)



a	0.1874
b	1.031
c	31.49
d	2.145
MSE	0.002
R <sup>2</sup>	0.9959
SS	0.0536
SYX	0.0483

$$y = ((a-d)/1 + ((x/c)^b)) + d$$

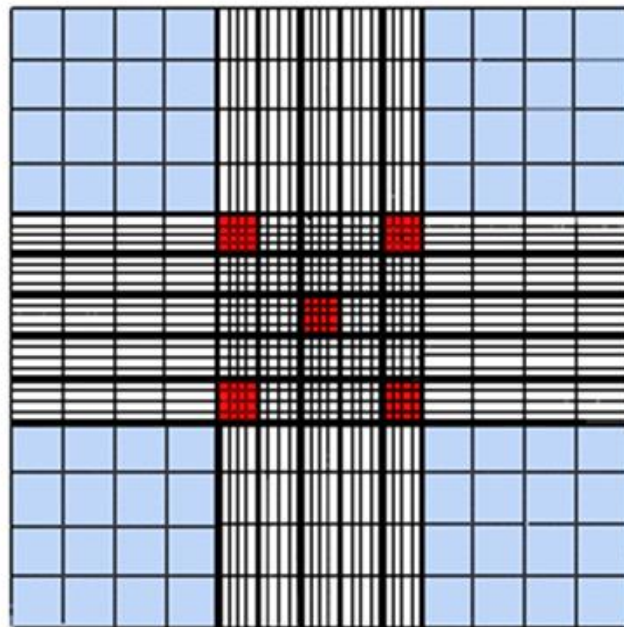
$$x = c * (((a-d)/(y-d)) - 1)^{(1/b)}$$

## ANEXO 5H. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD Y CONTEO CELULAR

**Fundamento:** La prueba de exclusión utilizando azul de Tripano es el método para evaluar la viabilidad celular. El colorante no puede penetrar en las células vivas que tengan íntegra su membrana, sin embargo pasa fácilmente a las células dañadas o muertas. En consecuencia, las células vivas se ven refringentes al microscopio mientras que las células muertas se ven azules.

**Conteo:** El conteo se realiza utilizando hemocitómetro o Cámara de Neubauer. Para el caso particular de las células de bazo el conteo se realiza en cinco cuadros del cuadrante central de cada retículo de la cámara. El total de células se promedia y se multiplica por los factores correspondientes para obtener el total de células/mL. Método tomado de: Hockfield S, Pintar S, et al., 1993. Selected Methods for Antibody and Nucleic Acid Probes. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 679 p.

Promedio  $\times$  Factor de la Cámara  $\times$  Cuadros que tenga el cuadrante central de la cámara  $\times$   
Factor de Dilución  $\times$  Volumen final



Retículo con cuadrante central de 25 cuadros y factor de la cámara de  $10^4$ . En rojo se señala el lugar de conteo de esplenocitos.

## ANEXO 6A. SECUENCIA Y ALINEAMIENTO DE Acr-DFA<sub>tag</sub>

### >Secuencia Teórica (En marco pQ-Acr-DFA)

```

ctcgagaaatcataaaaaatTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGAT
aacaatttcacacaggaattcattaagaggagaaattaactatgagaggatctcaccatcaccatcaccatac
gGaTccAATGGCCACCACCTTCCCGTTCAGCGCCACCCGCGGTCCCTCTTCCCGAGTTTTCTGAGCTGTTTC
GCGGCCTTCCCGTCATTTCGCCGACTCCGGCCACCTTCGACACCCGGTTGATGCGGCTGGAAGACGAGATGA
AAGAGGGGCGCTACGAGGTACGCGCGGAGCTTCCCGGGTTCGACCCCGACAAGGACGTCGACATTATGGTCCG
CGATGGTCAGCTGACCATCAAGCCGAGCGCACCAGCAGAAAGGACTTCGACGGTCGCTCGGAATTCGCGTAC
GGTTCCTTCGTTTCGACCGGTGTCGCTGCCGGTAGGTGCTGACGAGGACGACATTAAGGCCACTACGACAAGG
GCATTCTTACTGTGTCGGTGGCGGTTTTCGGAAGGGAAGCCAACCGAAAAGCACATTTCAGATCCGaGTg gatcc
aacaagcagcagcagtaacaacagaaactaaaaaggTTTTTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGA
gtttatgcctatgtttataataaaaaatcgaataaagctataacttcagcttggcctggcaaaaaatgaccg
ctttaggtaacgacaaatgaattggatctcgacactgatgaagatgactctgatttagctgttatctttac
cgatgggacaaagcaaacaccagcagctaataaggctggTTTTTACCTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAA
aatggtgtcgtaaaaaggTTTTTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTTATGCCTATGTTTATAATA
ataaaaaatcgaataaagctataaacttcagcttggcctggcaaaaaatgaccgctttaggtaacgacaaata
tgaattggatctcgacactgatgaagatgactctgatttagctgttatctttaccgatgggacaaagcaaac
ccagcagctaataaggctggTTTTTACCTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTGCTGATAAAAAGGTTT

```

### >pQAcr3-DFA Frw

```

NNTAGGGAGGGGAATAAACTATGAGAGGTCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCAATGGCCACCACCTT
CCCGTTCAGCGCCACCCGCGGTCCCTCATCCCGAGTTTTCTGAGCTGTTTCGCGGCCTTCCCGTCATTTCGCCG
GACTCCGGCCACCTTCGACACCCGGTTGATGCGGCTGGAAGACGAGATGAAAGAGGGGCGCTACGAGGTACG
CGCGGAGCTTCCCGGGTTCGACCCCGACAAGGACGTCGACATTATGGTCCGCGATGGTCAGCTGACCATCAAG
GCCGACCGCACCCGAGCAGAAGGACTCCGACGGTCGCTCGGAATTCGCGTACGGTTCCCTTCGTTTCGCACGGTGT
CGCTGCCGGTAGGTGCTGACGAGGACGACATTAAGGCCACCTACGACAAGGGCATTCTTACTGTGTCGGTGGC
GGTTTTCGGAAGGGAAGCCAACCGAAAAGCACATTTCAGATCCGATTGGATCCAACAAGCAGCAGCAGTACAACA
ACAGAACTAAAAAGGTTTTATTTTAAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTTATGCCTATGTTTATAATA
AAAAATCGAATAAAGCTATAACTTCAGCTTGGCCTGGCAAAAAAATGACCGCTTTAGGTAACGACGAATATGA
ATTGGATCTCGACACTGATGAAGATGACTCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCA
GCAGCTAATGAGGCTGGTTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTGCTGATAAAAAGGTTT
ATTTTAAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTTATGC

```

## CLUSTAL 2.0.10 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

```

Teórica          CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCA
AcrDFA          -----

Teórica          ATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATATGAGA
AcrDFA          -----NNTAGGGAGG-GGAATAAACTATGAGA
                  **  ***  *  **  *****

Teórica          GGATCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCAATGGCCACCACCTTCCCGTTCAGCGC
AcrDFA          GG-TCTCACCATCACCATCACCATACGGATCCAATGGCCACCACCTTCCCGTTCAGCGC
                  **  *****

Teórica          CACCCGCGGTCCCTCTTCCCGAGTTTTCTGAGCTGTTTCGCGGCCTTCCCGTCATTTCGCC
AcrDFA          CACCCGCGGTCCCTCATCCCGAGTTTTCTGAGCTGTTTCGCGGCCTTCCCGTCATTTCGCC
                  *****

```

Teórica  
AcrDFA  
GGACTCCGGCCCACCTTCGACACCCGGTTGATGCGGCTGGAAGACGAGATGAAAGAGGGG  
GGACTCCGGCCCACCTTCGACACCCGGTTGATGCGGCTGGAAGACGAGATGAAAGAGGGG  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
CGCTACGAGGTACGCGCGGAGCTTCCCGGGGTCGACCCCGACAAGGACGTCGACATTATG  
CGCTACGAGGTACGCGCGGAGCTTCCCGGGGTCGACCCCGACAAGGACGTCGACATTATG  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
GTCCGCGATGGTCAGCTGACCATCAAGGCCGAGCGCACCGAGCAGAAGGACTTCGACGGT  
GTCCGCGATGGTCAGCTGACCATCAAGGCCGAGCGCACCGAGCAGAAGGACTTCGACGGT  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
CGCTCGGAATTCGCGTACGGTTCCTTCGTTGCGACGGTGTGCTGCCGGTAGGTGCTGAC  
CGCTCGGAATTCGCGTACGGTTCCTTCGTTGCGACGGTGTGCTGCCGGTAGGTGCTGAC  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
GAGGACGACATTAAGGCCACCTACGACAAGGGCATTCTTACTGTGTGCGGTGGCGGTTTCG  
GAGGACGACATTAAGGCCACCTACGACAAGGGCATTCTTACTGTGTGCGGTGGCGGTTTCG  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
GAAGGGAAGCCAACCGAAAAGCACATTCAGATCCGAGTGGATCCAACAAGCAGCAGCAGT  
GAAGGGAAGCCAACCGAAAAGCACATTCAGATCCGAGTGGATCCAACAAGCAGCAGCAGT  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
ACAACAACAGAACTAAAAAGGTTTATTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTT  
ACAACAACAGAACTAAAAAGGTTTATTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTT  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
TATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAAAGCTATAACTTCAGCTTGGCCTGGCAAA  
TATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACGAATAAAGCTATAACTTCAGCTTGGCCTGGCAAA  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
AAAATGACCGCTTTAGGTAACGACAAATATGAATTGGATCTCGACACTGATGAAGATGAC  
AAAATGACCGCTTTAGGTAACGACAAATATGAATTGGATCTCGACACTGATGAAGATGAC  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
TCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCAGCAGCTAATGAGGCT  
TCTGATTTAGCTGTTATCTTTACCGATGGGACAAAGCAAACACCAGCAGCTAATGAGGCT  
\*\*\*\*\*

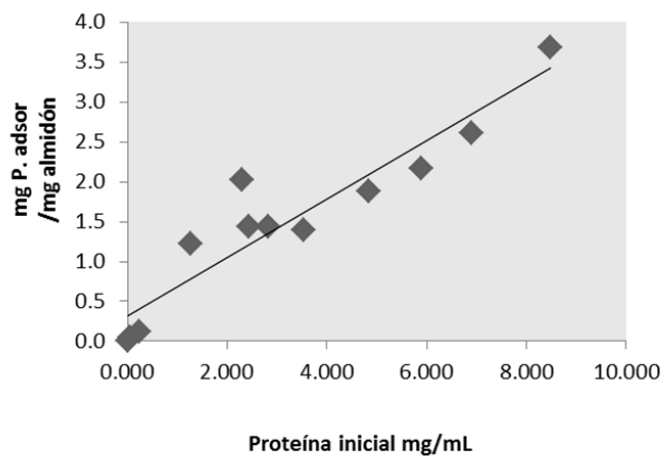
Teórica  
AcrDFA  
GGTTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTGTAATAAAAGGTTTAT  
GGTTTTACCTTTACGGCTGATGCCACTTATGATCAAAATGGTGTGTAATAAAAGGTTTAT  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
TTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGCCTATGTTTATAATAAAAAATACG  
TTTGAAAAGCCTTCAAGTTGGGGTAGTAGAGTTTATGC-----  
\*\*\*\*\*

Teórica  
AcrDFA  
AATAAAGCTATAACTTCAGCTTGGCCTGGCAAAAAAATGACCGCTTTAGGTAACGACAAA  
-----

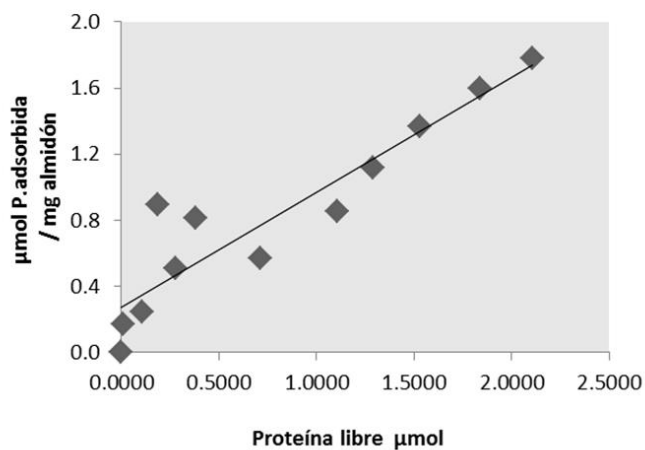
## ANEXO 6B. ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE Acr-DFA<sub>tag</sub> SOBRE GRÁNULOS DE ALMIDÓN INSOLUBLE

Po μg/μL	Pna μg/μL	Pa Po-Pna	μgPa/mg almidón
8.471	6.263	2.208	3.680
6.904	5.338	1.566	2.610
5.897	4.597	1.300	2.166
4.844	3.718	1.125	1.876
3.538	2.705	0.833	1.388
2.816	1.958	0.858	1.430
2.432	1.569	0.863	1.438
2.291	1.073	1.218	2.030
1.270	0.535	0.735	1.225
0.250	0.175	0.074	0.124
0.047	0.019	0.029	0.048
0.000	0.000	0.000	0.000



m (Kad)=	0.3678
r=	0.9375

Po μmol	Pna μmol	Pa Po-Pna	μmolPa/mg almidón
4.2455	2.1087	2.1367	1.7806
3.7535	1.8399	1.9135	1.5946
3.1715	1.5320	1.6395	1.3663
2.6315	1.2880	1.3436	1.1196
2.1275	1.1048	1.0228	0.8523
1.3980	0.7144	0.6836	0.5696
1.3596	0.3832	0.9764	0.8136
1.2624	0.1888	1.0736	0.8946
0.8916	0.2808	0.6108	0.5090
0.4020	0.1088	0.2932	0.2443
0.2184	0.0120	0.2064	0.1720
0.0000	0.0000	0.0000	0.0000



m (Kad)=	0.6947
r=	0.9263



---

---

## APÉNDICE 1.

---

---

## MINIREVIEW

## Adjuvants in tuberculosis vaccine development

Silvia A. Moreno-Mendieta, Leticia Rocha-Zavaleta & Romina Rodríguez-Sanoja

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México D.F., Mexico

**Correspondence:** Romina Rodríguez-Sanoja, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico  
Tel.: +52 55 56229191; fax: +52 55 56229288; e-mail: romina@biomedicas.unam.mx

Received 7 July 2009; revised 21 October 2009; accepted 28 October 2009.  
Final version published online 1 December 2009.

DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00629.x

Editor: Willem van Leeuwen

**Keywords:** tuberculosis; adjuvant; subunit vaccines.

### Introduction

According to the World Health Organization (WHO), one-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Among these latent carriers, around 5–10% will develop clinical tuberculosis, causing 2–3 million deaths and 8–10 million new infections per year (Young & Dye, 2006). In 2007, approximately 9.2 million new cases were reported. Of these, 1.3 million were HIV-positive cases, 1.1 million were reactivation cases and 500 000 cases were multidrug-resistant (MDR-tuberculosis) (WHO, 2009). To date, the only prophylactic available against *Mtb* is the Bacilli–Calmette–Guerin (BCG) vaccine, an attenuated *Mycobacterium bovis* strain that confers protection against several childhood forms of tuberculosis, but fails to prevent pulmonary tuberculosis in adults. Beyond vaccines such as BCG, which are administered before tuberculosis infection, one potential strategy to eliminate or control latent tuberculosis and prevent reactivation consists of postexposure vaccines (Andersen, 2007). In both cases, research efforts are directed towards conferring broad protection against disease and infection, especially by stimulating cellular immune responses involving CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells without

### Abstract

Tuberculosis remains a major public health problem around the world. Because the *Mycobacterium bovis* Bacilli–Calmette–Guerin (BCG) vaccine fails to protect adults from pulmonary tuberculosis, there is an urgent need for improved vaccine formulations. Unlike BCG, recombinant vaccines purified from bacterial expression vectors, as well as naked DNA, require an additional adjuvant. Recent improvements in our understanding of disease immunopathology, together with advances in biochemical and molecular techniques, have permitted the successful development of promising tuberculosis vaccine delivery and adjuvant combinations for human use. Here, we summarize the current state of adjuvant development and its impact on tuberculosis vaccine progress.

negative health consequences (Titball, 2008). Thanks to recombinant technology and a growing understanding of the immunopathology of tuberculosis, candidate subunit vaccines have been successfully developed. These vaccines are preferred because of their safety in both normal and immunocompromised patients, although their inherent lack of immunogenicity requires the use of adjuvants capable of inducing a protective T-cell response (Schijns, 2003). In order to be protective against *Mtb*, a candidate vaccine must elicit a specific cell-mediated response, both in immunocompetent and in immunocompromised individuals who are considered a high-risk population for tuberculosis. Consequently, the development of adjuvants to improve tuberculosis vaccines for human use remains a challenge and is equally important to subunit vaccine formulation as antigen discovery (Hoft, 2008). Here, we review the current state of adjuvant development and its impact on tuberculosis vaccine progress.

### Immune response to *Mtb*

Protective immune responses against *Mtb* are primarily mediated by the cellular immune system, involving innate

responses in which the major cellular components are neutrophils, macrophages, dendritic cells (DCs) and natural killer cells (NKs), and adaptive responses in which lymphocytes, mainly conventional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells, are the major effector cells. These cells produce T-helper type 1 (Th-1) cytokines [interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukin (IL)-2, IL-12] important for the activation of antimycobacterial activities of macrophages (Sable *et al.*, 2007). However, some unconventional T cells (CD4CD8  $\alpha\beta$  T-cells,  $\gamma\delta$  cells, NK 1.1) have also been implicated in protective immunity to tuberculosis through the recognition of nonprotein mycobacterial antigens including glycolipids (mycolic acids, phosphatidylinositol mannosides, lipoarabinomannan, etc.) and their presentation to a variety of CD1-restricted lymphocytes. These cells also activate antigen-presenting cells (APCs), boost the expression of major histocompatibility complexes (MHCs) and costimulatory molecules and amplify IL-12, IL-18 and IFN- $\gamma$  production (Doherty & Andersen, 2005).

Recently, the importance of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses to the generation of an effective vaccine against tuberculosis has also been recognized. Accumulating evidence indicates that the MHC-I pathway is critical to achieve protection (Orme, 2006). Studies with endogenous proteins, such as heat shock protein 65 (HSP65), have shown the superiority of these antigens to stimulate CTLs, which are able to either kill infected macrophages unable to eliminate the bacilli or kill the mycobacteria in the extracellular space directly (Lima *et al.*, 2004).

On the other hand, the role of Th-2 cytokines, such as IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, in protective immunity against *Mtb* remains unclear. It has been suggested that generation of a Th-2 response is associated with a greater risk of progression from *Mtb* infection to active disease by seriously undermining the efficacy of a Th-1 response to mycobacterial antigens (Doherty & Andersen, 2005). Some authors have also observed a relationship between the presence of concomitant parasite infections and exposure to environmental mycobacteria, with a systemic bias towards Th-2 responses that reduces the efficacy of BCG (Rook *et al.*, 2001).

### Tuberculosis vaccines and adjuvants

In this context, effective tuberculosis vaccine design is based on generating the cellular responses required to kill the bacteria and prevent establishment of infection (against infection and pulmonary disease) or to avoid reactivation or progression toward clinical tuberculosis in the case of latent patients. In the first case, the general strategy involves a prophylactic vaccine able to induce protective immunity, measured in terms of lymphocyte subsets expanded after immunization. In the second case, the strategy focuses on utilizing a postexposure vaccine to eliminate or contain

**Table 1.** Tuberculosis vaccines in clinical trials

Vaccines	Definition and stage of development
Live vaccines (mycobacterial)	<i>rBCG30</i> . Entered phase I trials in US during 2004, over expresses Ag85B <i>rBCG::AureC-Ilo+</i> . Urease deficient mutant, which expresses the Lysteriolysin O gene from <i>Listeria monocytogenes</i> <i>PanD-Leu</i> - . Auxotroph attenuated strain of <i>Mtb</i>
Live vaccines (nonmycobacterial)	MVA-Ag85A. Recombinant, replication deficient vaccinia virus, expressing Ag85A. Entered in Phase Ib clinical trials in 2005
Nonliving vaccines (subunit vaccines)	<i>Hybrid 1</i> . Fusion molecule comprised of ESAT-6 and Ag85B. Clinical trials 2004/2005. Proved with LTK63 and IC31 adjuvants <i>Mtb72F vaccine</i> . Entered in Phase I clinical trials in 2005. Comprised of the proteins Rv1196 inserted into the middle of putative serine protease Rv0125. Delivered in AS02 adjuvant <i>HyVac4</i> . Fusion protein comprised of TB10.4 and Ag85B. Delivered in IC31 adjuvant. Entered in Phase I clinical trials in 2007

Reproduced from Gupta *et al.* (2007); Andersen (2007).

latent tuberculosis and prevent reactivation (Sadoff & Hone, 2005; Sable *et al.*, 2007). Concerns regarding the use of postexposure vaccines and their adverse influences result from the fact that the infected lung has already undergone inflammation, tissue damage and remodelling responses (Orme, 2006). Thus, the effect of vaccination in sensitized and latently infected individuals is a minor concern for mycobacterial vaccines intended to replace BCG, but it is especially relevant for vaccines intended to be given as boosters to individuals already vaccinated with BCG. A vaccine that is safe in a naive recipient may have negative effects in one with pre-existing immunologic memory (Doherty, 2005). Table 1 shows several tuberculosis vaccine candidates that are currently in advanced stages of clinical trials. Of these, subunit tuberculosis vaccines have received special attention because, in spite of their poor immunogenicity, they exhibit a high degree of safety and their production can be standardized.

Currently, such tuberculosis subunit vaccines are prepared from recombinant proteins, purified from bacterial expression vectors or formulated as naked DNA, consisting of recombinant plasmids encoding *Mtb* antigens under the control of eukaryotic promoters (Doherty & Andersen, 2005; Hoft, 2008; Carstens, 2009). They can stimulate T-cell responses against key subunit antigens and are safe even in immunosuppressed individuals. Their main drawback is the limited availability of adjuvants approved for human use to boost their immunogenicity (Hogarth *et al.*, 2003; Mills, 2009). Box 1 provides a short description of adjuvants for human use that have been the result of many years of research and development, including oils and aluminium adjuvants, synthetic adjuvants, second-generation delivery-

**Box 1.** Adjuvants for human use or in late stage of clinical trials

Adjuvants from the Latin '*adjuvare*', or '*to help*', are molecules compounds or macromolecular complexes with carrier/depot or targeting functions and immunostimulant and/or immunomodulatory activities (Guy, 2007; Reed *et al.*, 2009).

**Mineral salts.** The most widely used adjuvants in human vaccines include aluminium hydroxide, aluminium phosphate and calcium gels (HogenEsch, 2002; Kenney *et al.*, 2002).

**Saponins.** *Quil-A* and its purified fraction QS-21 (Stimulon) are triterpene glycosides isolated from the aqueous extract of the bark of the South American tree *Quillaja saponaria* (Marciani *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009).

**Emulsions.** Mixture of two immiscible substances in two phases stabilized by one or several surfactants at the interface. Among the oil-in-water (O/W) emulsions are MF59 and Adjuvant Systems. MF59 contains Tween 80 and Span surfactants and the immunostimulant squalene. This emulsion is component of the Influenza vaccine FLUAD (Schulz *et al.*, 2008), and also has been tested with other viruses with promising results (Ansaldi *et al.*, 2008; Mosca *et al.*, 2008). Adjuvant Systems developed by GSK Biologicals are formulations of classical adjuvants mixed with immunomodulators adapted to the antigen (Garçon *et al.*, 2007). AS02A which contains monophosphoryl lipid A (MPL) and QS-21, has been tested with tuberculosis, cancer, malaria and some viruses (Skeiky *et al.*, 2004; Vandepapelière *et al.*, 2008). AS04 with MPL and alum, has successfully passed Phase II/III trials with vaccines against viral diseases, and is already on the market as a component of the Cervarix<sup>®</sup> vaccine (Schwarz, 2008). AS01B (a liposomal formulation) and AS03 (with  $\alpha$ -tocopherol, squalene and Tween 80) have been developed to induce a stronger T cell responses, especially CTL responses (Garçon *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2009).

**Particulate adjuvants.** Lipid-based structures, such as liposomes, archeosomes, immune-stimulating complexes (ISCOMs), biodegradable micro- or nanoparticles, virus-like particles (VLPs), and the AS04 adjuvant system, among others. They are used to deal with mucosal conditions as proteases, denaturation and dilution (Eriksson & Holmgren, 2002; Csaba *et al.*, 2008; Mallapragada & Narasimhan, 2008).

**Microbial natural and synthetic derivatives.** MPL and some derivatives isolated from *Salmonella minnesota* R595 lipopolysaccharide (Meraldi *et al.*, 2003; Lahiri *et al.*, 2008); ADP-ribosylating enterotoxins such as, cholera toxin (CT), heat-labile enterotoxin (LT) (Kenney *et al.*, 2002; Freytag & Clements, 2005), and some mutants like LTK63, with reduced toxicity but significant adjuvanticity (Eriksson & Holmgren, 2002; Eriksson *et al.*, 2004; Freytag & Clements, 2005). Among synthetic microbial adjuvants are the cytosine-phosphate-guanosine ODNs (CpG ODNs), synthetic ODNs containing immunostimulatory CpG motifs which stimulate APCs via TLR9 (Lahiri *et al.*, 2008; Krishnamachari & Salem, 2009; Mutwiri *et al.*, 2009; Vollmer & Krieg, 2009).

**Cytokines.** Delivered either in protein form or indirectly as DNA (Wang *et al.*, 2002; Mallapragada & Narasimhan, 2008). Candidates include granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-1, Th1-inducing cytokines such as IL-12, IL-18, GM-CSF, and some chemokines (Boyaka & McGhee, 2001).

depot systems and receptor-associated adjuvants (Ott & Van Nest, 2007).

Many of these adjuvants have been tested for their efficacy in tuberculosis vaccines, mostly in mouse models in combination with different antigens or fusion proteins. When used alone or in conjunction with BCG in a 'prime-boost' strategy or coadjuvanted with cytokines or other molecules, many of these vaccines have been shown to confer protective immunity (Lindblad *et al.*, 1997).

Secreted proteins, HSP, lipoproteins and putative phosphate transport receptors (PstS) have all been evaluated for subcutaneous, oral or intranasal priming vaccination, followed by intradermal or oral BCG vaccination (Doherty *et al.*, 2002; Hogarth *et al.*, 2003; Hoft, 2008). Likewise, emulsions (Haile *et al.*, 2004, 2005), microspheres (Ajday *et al.*, 2007), toxin derivatives (Takahashi *et al.*, 2006; Badell *et al.*, 2009), cationic lipids (D'Souza *et al.*, 2002) and oligodeoxynucleotides (Kamath *et al.*, 2008) have demonstrated efficacy in inducing strong T-cell responses with high titres of IFN- $\gamma$  and specific antibodies. Table 2 summarizes several studies evaluating the efficacy of different antigen/adjuvant combinations for tuberculosis vaccination.

Some of the mechanisms by which many of these adjuvants function are (1) generation of long-lasting antigen depots; (2) protection against antigen degradation and elimination; (3) distribution to specific cells; (4) antigen/adjuvant uptake; (5) enhancement of antigen presentation by DCs and (6) induction of CD8<sup>+</sup> CTL and/or CD4<sup>+</sup> Th-lymphocyte responses (Th-1 or Th-2) (The European Medicines Agency, 2005; Perrie *et al.*, 2008; Reed *et al.*, 2009).

As in any adjuvant design, it is important to consider a number of other factors, such as reduction in antigen titres, the number of immunizations required and efficacy in newborns, the elderly and immunocompromised individuals. Additionally, many potential vaccines consider antigen delivery to mucosal surfaces, an interesting approach to vaccines against pathogens that enter the human body via mucosal surfaces, such as *Mtb*. The risk of adverse side-effects, molecular stability and industrial constraints and costs must also be considered (Orme, 2006; Aguilar & Rodríguez, 2007).

## Trends in adjuvants development for tuberculosis vaccines

### Mucosal adjuvants

Most pathogens enter the human body via mucosal surfaces in contact with the surrounding environment, such as those in the nose, lungs and gastrointestinal tract. *Mtb* is usually transmitted via aerosols and establishes itself in the lungs. Thus, mucosal vaccination at this site can help to prevent pathogen entry and infection (Doherty *et al.*,

**Table 2.** Adjuvant formulations used in tuberculosis subunit vaccines

Type of adjuvant	Formulation and route of administration	References
Cationic lipids	Ag85A, Ag85B, PstS-3 in VC1052:DpyPE (intramuscular) or in GAP-DLRIE:DOPE (intranasal)	D'Souza <i>et al.</i> (2002)
	BCG lipid encapsulated (L-BCG) (oral)	Aldwell <i>et al.</i> (2006)
	ESAT-6 plus LANAC adjuvant (with TLR3 or TLR9 agonists) (intravenous; subcutaneous; intramuscular)	Zaks <i>et al.</i> (2006)
Micro or nanoparticles	DNA plasmid encoding eight HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes from <i>Mtb</i> formulated in chitosan nanoparticles (intramuscular and pulmonary)	Bivas-Benita <i>et al.</i> (2004)
	ESAT-6 encapsulated in PLA microspheres (intranasal).	Carpenter <i>et al.</i> (2005)
	BCG plus sodium alginate microspheres (subcutaneous)	Dobakhti <i>et al.</i> (2009)
Toxin derivatives	BCG and PstS-1 antigen plus CT (intranasal)	Falero-Díaz <i>et al.</i> (2000)
	Ag85B-ESAT-6 (H1) plus LTK63 (intranasal)	Dietrich <i>et al.</i> (2006)
CpG DNA	Ag MPT-51 plus CpG DNA (subcutaneous)	de Souza Silva <i>et al.</i> (2009)
Adjuvant Systems	Mtb72F in AS02A (intramuscular)	Brandt <i>et al.</i> (2004)
Cytokines	BCG plus AdGM-CSF (subcutaneous)	Wang <i>et al.</i> (2002)
	HSP65 plus IL-12 delivered by HVJ-liposome (intramuscular)	Okada <i>et al.</i> (2009)
Iscoms	Ag85B-ESAT-6 (H1) plus CTA1-DD/ISCOMs (intranasal)	Andersen <i>et al.</i> (2007)

VC1052:DpyPE, aminopropyl-dimethyl-myristolexyloxy-propanaminium bromide-diphytanoylphosphatidyl-ethanolamine; Vaxfectin; LANAC, liposome-Ag-nucleic acid complexes; GAP-DLRIE:DOPE, aminopropyl-dimethylbis-dodecyloxy-propanaminium bromide-dioleoylphosphatidyl-ethanolamine; PLA, poly-lactide acid; AdGM-CSF, adenoviral granulocyte macrophage-colony stimulating factor; CTA1-DD/ISCOMs, cholera toxin-derived fusion protein/immune-stimulating complexes; HVJ, haemagglutinating virus of Japan.

2002). In fact, traditional tuberculosis vaccine strategies involving intradermal immunization with inactivated BCG or subunits of the relevant virulence determinants of *Mtb* do not prevent these initial interactions. Once the pathogen crosses the mucosal surface and enters the host cell, the host–parasite relationship decidedly favours the bacterium (Källénus *et al.*, 2007). Taking advantage of the fact that vaccination at one inductive mucosal site can trigger immune responses at distant effector mucosal sites, oral tuberculosis vaccines have been developed, with promising results (Aldwell *et al.*, 2006; Ajdary *et al.*, 2007; Badell *et al.*, 2009). Nasal immunization has also been explored, as it is less likely to induce peripheral systemic tolerance, it is more effective than oral immunization at generating earlier and stronger mucosal immune responses and it often requires less antigen and fewer doses than parenteral immunization (Davis, 2001; Källénus *et al.*, 2007). However, the possibility of developing hypersensitivity responses to the vaccine and other technical problems remain disadvantages for pulmonary immunization (Bivas-Benita *et al.*, 2005).

As evaluated in mouse models, pulmonary mucosal protection involves a wide range of immune responses, including innate, cellular and humoral mechanisms, depending on the antigen type and adjuvant used. Antimicrobial peptides are secreted into the mucosal lumen, phagocytic cells and T and B lymphocytes are activated, and polymeric immunoglobulin A (IgA) and IgG are actively secreted across the epithelium. In most cases, the main effector mechanism at work is the secretion of antimicrobial or antitoxic local IgA (S-IgA) and associated mucosal immunologic memory (Källénus *et al.*, 2007).

Mucosal adjuvants for human use have been designed based on bacterial toxins (CT, LT) and their derivatives (CTA1-DD, LT-K63), synthetic CpG-containing DNA, ISCOMs and various cytokines and chemokines with the aim of inducing effective mucosal Th-1 and Th-2 responses (Eriksson *et al.*, 2004; Helgeby *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2007). For tuberculosis, the strongest Th-1-inducing compound identified to date is unmethylated mycobacterial DNA and the immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides derived from it. Some researchers have used synthetic CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants for nasal tuberculosis vaccines, resulting in vigorous Th-1 responses characterized by CTL activation and IFN- $\gamma$  secretion over the course of infection (Maeyama *et al.*, 2009).

Also, mucosal delivery systems designed to enhance the immune response following mucosal immunization have been evaluated for efficacy in tuberculosis vaccines (Bivas-Benita *et al.*, 2004; Freytag & Clements, 2005). Examples of these delivery systems include antigen-encapsulating microspheres, various liposome formulations, nanoparticles with surface-adsorbed agents, lipophilic ISCOMs and bacterial products with known adjuvant properties. Such systems enhance the binding, uptake and half-life of antigens and may help to target the vaccine to mucosal surfaces. In addition, based on their mucoadhesive properties, these viscosity-enhancing delivery systems have been designed to slow mucociliary clearance and prolong contact time between the vaccine compound and the nasal tissue (Sajadi-Tabassi *et al.*, 2008; Coucke *et al.*, 2009). This last concept is particularly important, because nonreplicating, and

especially nonparticulate, antigens applied to a mucosal surface must be adjuvanted to induce productive immunity rather than tolerance. Thus, a vaccine with an appropriate adjuvant can induce both mucosal and systemic immune responses, preventing not only infectious disease but also colonization of mucosal surfaces (Davis, 2001).

### Mycobacterial Toll-like receptor (TLR) ligands

At present, increasing knowledge of the innate immune system, including the identification of ligands and signalling pathways, is providing a new set of targets for the development of novel adjuvants (Schijns & Degen, 2007; Boog, 2008). Pathways specifically involved in the immune response against complex pathogens such as *Mtb* are mediated by receptors expressed on the surface of DCs and macrophages. Engagement of these receptors initiates intracellular signalling pathways, resulting in the activation of immune response genes, including those encoding MHC molecules, costimulatory molecules and inflammatory cytokines. One key receptor class is the TLR family, whose ligands are either presented on the surface of *Mtb* or secreted by the bacterium (Doherty & Andersen, 2005). Mycobacterial TLR ligands include triacylated and diacylated forms of p19, a lipoprotein recognized by TLR 2/1 and TLR 2/6 dimers, respectively. Meanwhile, lipoarabinomannan and phosphatidyl-*myo*-inositol mannoside are recognized by TLR2, while CpG-containing DNA is recognized by TLR9, which is exclusively present within endosomes and phagosomes. TLR4, the classical receptor for lipopolysaccharide on Gram-negative bacteria, has also been implicated as a sensor for an unidentified, heat-sensitive mycobacterial ligand (Quesniaux *et al.*, 2004; Lahiri *et al.*, 2008). Other important innate immune receptors are the cytosolic nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors or NOD-like receptors (NLRs), which are TLR-related proteins responsible for recognition of intracellular pathogens, including mycobacteria. NOD1 and NOD2 specifically bind diaminopimelic acid and the peptidoglycan breakdown product muramyl dipeptide, triggering the production of proinflammatory cytokines. This suggests a synergistic effect between NLRs and TLR2 in tuberculosis (Korbel *et al.*, 2008).

As mentioned earlier, both TLR and NLR ligands promote inflammation by triggering the release of chemokines and proinflammatory cytokines, expression of adhesion molecules and recruitment of macrophages, DCs and polymorphonuclear neutrophils (Korbel *et al.*, 2008). After antigen processing and expression of epitopes in an MHC-restricted manner, mature DCs can stimulate naive T cells to differentiate into effector cells. Depending on the ligand, the immune response may thus be skewed toward CTL

responses or toward a particular Th response (Boog, 2008). Based on increasing evidence for the contribution of CD1-restricted immune responses to protection against tuberculosis, CD1-restricted, nonproteinaceous ligands, such as glycolipids, are also being considered as potential candidates for new tuberculosis vaccines (Hamasur *et al.*, 2003).

In conclusion, mycobacterial ligands have great potential as adjuvants due to their ability to activate the innate immune response, ultimately leading to cellular and humoral responses against coadministered antigens (Mills, 2009). In this context, synthetic ligands capable of targeting TLRs more precisely and safely than pathogen-derived ligands are being designed (Guy, 2007). However, a great deal of work is still required, because the success of vaccination is related to the route of administration, the delivery method used and the APC population stimulated by the adjuvant. On the other hand, TLR overstimulation can also generate unwanted toxic effects, and so adjuvant dose and mechanism of action must be carefully considered and potential toxicities should be investigated and characterized (Boog, 2008).

### Promising preliminary formulations

Despite the limited number of adjuvant systems approved for clinical applications, several vaccine delivery and adjuvant combinations have been evaluated, resulting in promising preliminary formulations. Currently, four leading adjuvants for tuberculosis subunit vaccines are being investigated:

*CAF01* (LipoVac), developed by the Statens Serum Institute, is a novel tuberculosis vaccine adjuvant utilizing *N,N'*-dimethyl-*N,N'*-dioctadecylammonium (DDA) liposomes with the synthetic mycobacterial immunomodulator  $\alpha, \alpha'$ -trehalose 6,6'-dibehenate (TDB) inserted into the lipid bilayer. This adjuvant is formulated using a fusion molecule composed of two immunodominant, secreted proteins from *Mtb*, Ag85B and ESAT-6, a fusion known as Hybrid-1 (H1). In this system, DDA targets the vaccine antigen to APCs while TDB provides proinflammatory stimuli, triggering a Th-1 cytokine response via a TLR-independent pathway (Agger *et al.*, 2008). *CAF01* has proven to be highly efficacious, inducing cellular and humoral responses simultaneously in animal models more effectively than the single antigens administered alone. In addition to its priming activity, this vaccine has also been demonstrated to have a BCG booster effect (Doherty *et al.*, 2004; Davidsen *et al.*, 2005).

*AS01B*, developed by Corixa and GlaxoSmithKline Biologicals, contains the TLR4 ligand MPL and the saponin derivative QS-21 in a liposomal formulation including the fusion molecule *Mtb72F*. The *Mtb72F* antigen is comprised of the PPE family member Rv1196 inserted into the middle

of the putative serine protease Rv0125, which is thus present as two fragments (Mtb32C–Mtb39–Mtb32N) (Skeiky *et al.*, 2004). In the AS01B or AS02A formulations, this vaccine has also been demonstrated to have priming and BCG booster effects (Brandt *et al.*, 2004).

IC31, also developed by the Statens Serum Institute, consists of a vehicle combining the synthetic antimicrobial peptide KLKL<sub>5</sub>KLK, which actively loads APCs with antigen, and the immunostimulatory TLR9 ligand ODN1a, with the fusion proteins H1 and Ag85B–TB10.4 (Agger *et al.*, 2006; Lingnau *et al.*, 2007). This vaccine confers protective immunity in murine tuberculosis models and was recently shown to safely induce strong T-cell responses with a mixed Th-1/Th-2 cytokine profile in both neonates and adults (Kamath *et al.*, 2008).

CAF01, AS01B and IC31 are currently undergoing clinical Phase I/II trials. Mtb72F/AS01B is being tested in Lausanne, Switzerland, in individuals previously exposed to BCG or previously treated individuals currently infected with *Mtb*. H1 in IC31 and CAF01 are being tested in Leiden, the Netherlands, in purified protein derivative (PPD)-negative subjects. These adjuvants share the same basic combination of a delivery vehicle and a Th-1-skewing immunomodulator, conferring more potent protection against tuberculosis infection than single immunomodulators (CpG or MPL) or delivery vehicles lacking immunomodulators (liposomes or niosomes) (Agger *et al.*, 2006).

LTK63, a modified and detoxified heat-labile toxin derived from *E. coli*, has been combined with the fusion protein H1 for nasal immunization and has passed Phase I clinical trials (in London, UK, with PPD-negative subjects). A strong and sustained Th-1 response mediated by IFN- $\gamma$ -secreting CD4<sup>+</sup> T cells was observed, leading to long-lasting protection against tuberculosis and boosting prior BCG-induced immunity (Dietrich *et al.*, 2006; Badell *et al.*, 2009). Recently, LTK63 has also been shown to induce a marked increase in Ag85B-specific antibody titres, especially the IgG2b isotype (Palma *et al.*, 2008).

Modified Vaccinia Ankara (MVA) adenovirus, a recombinant-vector vaccine expressing the secreted mycobacterial antigens Ag85A and 85B, has been studied as a subunit vaccine, either as a prime vaccine or as a BCG-boosted vaccine (Williams *et al.*, 2005; Santosuosso *et al.*, 2006). Although this system has a potent adjuvant effect and can deliver vaccine antigens through mucosal tissues to induce strong T-cell stimulation, its drawbacks include increased reactogenicity and pre-existing immunity induced by exposure to natural antigens that are cross-reactive with vector components (McShane *et al.*, 2005; Hoft, 2008). Phase I/II clinical trials have been completed for MVA-Ag85A in Oxford, UK, and Gambia to assess vaccine safety, immunogenicity and dosage in individuals previously exposed to mycobacterial antigens.

## Final considerations

Tuberculosis vaccine development has been progressing empirically for many years. Currently, increased understanding of the immune system and the development of advanced delivery and adjuvant systems are enabling the design of improved prophylactic vaccines. As a result, in the last 10 years, the international research community has developed more than 200 tuberculosis vaccine candidates currently being tested in mouse, guinea-pig and human primate models. These approaches are aimed at achieving a more potent and prolonged immunological memory, a goal of great global importance, given the rise of MDR-tuberculosis worldwide and the poor efficacy of the BCG vaccine against adult pulmonary tuberculosis.

Despite a lack of relevant animal models that correlate with protection in humans and the lack of markers capable of demonstrating the efficacy of an antigen/adjuvant combination (needed for a faster acceptance of new adjuvants), promising vaccines from the Fifth Framework Program FP5 (Mtb72F/AS01B, H1 in IC31 and CAF01; MVA-Ag85A) have been developed and tested in preclinical and clinical trials, and the optimized formulations and adjuvant combinations have been produced using good manufacturing practices. Further improvement of these adjuvants through

### Box 2. Adjuvant/vaccine development, some guidance

- Preclinical and appropriate toxicology studies need to be designed to evaluate the risk assessment and safety profile of the adjuvant and adjuvant/vaccine combination in question. In addition to a deeper understanding of the basic biology of the immune response, knowledge of the genetic heterogeneity of the population is required to give rise to the concept of genetically determined individual responsiveness and susceptibility (Sesardic, 2006).
- Because the adjuvant is not the active ingredient in a vaccine and the action of the vaccine/adjuvant combination is the result of multiple factors, immune responses obtained with one antigen/adjuvant cannot be extrapolated to other antigens or even to the same combination given by different routes (Sesardic & Dobbelaer, 2004).
- A highly efficient and cost-effective method for comparison of adjuvants with a new antigen is to conduct multiple small-scale, Phase I comparative studies in humans with a new antigen, using adjuvants previously found to be safe when used with other antigens in human trials (Alving, 2002).
- Preclinical safety studies are necessary to identify possible causes of toxicity before undertaking clinical studies. Such studies might be designed to demonstrate the safety and efficacy of the vaccine components and the absence of immunotoxicity (Brennan & Dougan, 2005).
- The Aeras Global TB Vaccine Foundation is the most visible nonprofit organization currently working to take new tuberculosis vaccines from the preclinical stage through Phase III testing in humans. The newly created Vaccine Expert Groups (VEG) are in charge of compiling and updating currently available recommendations concerning adjuvants.

combination with other delivery systems or recently identified mycobacterial immunomodulators is underway in the context of FP7 (from 2007 to 2013).

It is clear that more research is required on adjuvants' effects on antigen presentation, APC activation, long-lived memory T-cell induction and Th-1/Th-2 cell polarization to avoid undesirable effects. Efforts directed toward the development of postexposure vaccines against latent tuberculosis are also needed. Thus, the development of new adjuvants and delivery methods is as important as the search for antigens that allow discrimination between latent and active disease. Also, special attention to several candidate nonprotein antigens (sulphoglycolipids, phosphoantigens, etc.) is required, due to their potential usefulness in subunit vaccines and/or adjuvants capable of stimulating CD1-restricted  $\gamma$ - $\delta$  or NKT cells. Only a multidisciplinary approach will allow an effective balance between risks and benefits in the selection of vaccine antigens, adjuvants and delivery systems, leading to new and improved vaccines against *Mtb*, one of the most devastating human pathogens. Box 2 summarizes some relevant recommendations to improve adjuvant development.

## References

- Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW *et al.* (2006) Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine* **24**: 5452–5460.
- Agger EM, Rosenkrands I, Hansen J *et al.* (2008) Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. *PLoS One* **3**: e3116 DOI: 10.1371/journal.pone.0003116.
- Aguilar JC & Rodríguez EG (2007) Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* **25**: 3752–3762.
- Ajdary S, Dobakhti F, Taghikhani M, Riazi-Rad F, Rafiei S & Rafiee-Tehrani M (2007) Oral administration of BCG encapsulated in alginate microspheres induces strong Th1 response in BALB/c mice. *Vaccine* **25**: 4595–4601.
- Aldwell FE, Cross ML, Fitzpatrick CE, Lambeth MR, de Lisle GW & Buddle BM (2006) Oral delivery of lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG extends survival of the bacillus *in vivo* and induces a long-term protective immune response against tuberculosis. *Vaccine* **24**: 2071–2078.
- Alving CR (2002) Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* **20**: S56–S64.
- Andersen CS, Dietrich J, Agger EM, Lycke NY, Lövgren K & Andersen P (2007) The combined CTA1-DD/ISCOMs vector is an effective intranasal adjuvant for boosting prior *Mycobacterium bovis* BCG immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **75**: 408–416.
- Andersen P (2007) Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol* **15**: 7–13.
- Ansaldi F, Bacilieri S, Durando P, Sticchi L, Valle L, Montomoli E, Icardi G, Gasparini R & Crovari P (2008) Cross-protection by MF59-adjuvanted influenza vaccine: neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibody activity against A(H3N2) drifted influenza viruses. *Vaccine* **26**: 1525–1529.
- Badell E, Nicolle F, Clark S *et al.* (2009) Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN- $\gamma$  producing T-cells. *Vaccine* **27**: 28–37.
- Bivas-Benita M, van Meijgaarden KE, Franken KL, Junginger HE, Borchard G, Ottenhoff TH & Geluk A (2004) Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A\*0201-restricted T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* **22**: 1609–1615.
- Bivas-Benita M, Ottenhoff TH, Junginger HE & Borchard G (2005) Pulmonary DNA vaccination: concepts, possibilities and perspectives. *J Control Release* **107**: 1–29.
- Boog CJP (2008) Principles of vaccination and possible development strategies for rational design. *Immunol Lett* **122**: 122–125.
- Boyaka PN & McGhee JR (2001) Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Adv Drug Deliver Rev* **51**: 71–79.
- Brandt L, Skeiky YA, Alderson MR *et al.* (2004) The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polypeptide Mtb72F in *M. tuberculosis* infected guinea pigs. *Infect Immun* **72**: 6622–6632.
- Brennan FR & Dougan G (2005) Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine* **23**: 3210–3222.
- Carpenter ZK, Williamson ED & Eyles JE (2005) Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu. *J Control Release* **104**: 67–77.
- Carstens MG (2009) Opportunities and challenges in vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* **36**: 605–608.
- Coucke D, Schotsaert M, Libert C, Pringels E, Vervaeke C, Foreman P, Saelens X & Remon JP (2009) Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine* **27**: 1279–1286.
- Csaba N, Garcia-Fuentes M & Alonso MJ (2008) Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliver Rev* **61**: 140–157.
- Davidsen J, Rosenkrands I, Christensen D, Vangala A, Kirby D, Perrie Y, Agger EM & Andersen P (2005) Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate) – a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. *Biochim Biophys Acta* **1718**: 22–31.
- Davis SS (2001) Nasal vaccines. *Adv Drug Deliver Rev* **51**: 21–42.
- de Souza Silva BD, da Silva EB, do Nascimento IP, Guerreiro dos Reis MC, Kipnis A & Junqueira-Kipnis AP (2009) MPT-51/



- CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* **27**: 4402–4407.
- Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG & Andersen P (2006) Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior Bacillus Calmette–Guerin immunity. *J Immunol* **177**: 6353–6360.
- Dobakhti F, Naghibi T, Taghikhani M, Ajdary S, Rafinejad A, Bayati K, Rafiei S & Refiee-Tehrani M (2009) Adjuvanticity effect of sodium alginate on subcutaneously injected BCG in BALB/c mice. *Microbes Infect* **11**: 296–301.
- Doherty TM (2005) Real world TB vaccines: clinical trials in TB-endemic regions. *Vaccine* **23**: 2109–2114.
- Doherty TM & Andersen P (2005) Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev* **18**: 687–702.
- Doherty TM, Olsen AW, van Pinxteren L & Adersen P (2002) Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **70**: 3111–3121.
- Doherty TM, Olsen AW, Weischenfeldt J et al. (2004) Comparative analysis of different vaccine constructs expressing defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **190**: 2146–2153.
- D'Souza S, Rosseels V, Denis O et al. (2002) Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infect Immun* **70**: 3681–3688.
- Eriksson AM, Schön KM & Lycke NY (2004) The cholera toxin-derived CTA1-DD vaccine adjuvant administered intranasally does not cause inflammation or accumulate in the nervous tissues. *J Immunol* **173**: 3310–3319.
- Eriksson K & Holmgren J (2002) Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol* **14**: 666–672.
- Falero-Díaz G, Challacombe S, Banerjee D, Douce G, Boyd A & Ivanyi J (2000) Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* **18**: 3223–3229.
- Freytag LC & Clements JD (2005) Mucosal adjuvants. *Vaccine* **23**: 1804–1813.
- Garçon N, Chomez P & Van Mechelen M (2007) GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines* **6**: 723–739.
- Gupta UD, Katoch VM & McMurray DN (2007) Current status of TB vaccines. *Vaccine* **25**: 3742–3751.
- Guy B (2007) The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* **5**: 505–517.
- Haile M, Schröder U, Hamasur B, Pawlowski A, Jaxmar T, Källenius G & Svenson SB (2004) Immunization with heat-killed *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guerin (BCG) in Eurocine™ L3 adjuvant protects against tuberculosis. *Vaccine* **22**: 1498–1508.
- Haile M, Hamasur B, Jaxmar T, Gavier-Widen D, Chambers MA, Sanchez B, Schröder U, Källenius G, Svenson SB & Pawlowski A (2005) Nasal boost with adjuvanted heat-killed BCG or arabinomannan–protein conjugate improves primary BCG-induced protection in C57BL/6 mice. *Tuberculosis* **85**: 107–114.
- Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schröder U, Williams A, Hatch G, Hall G, Marsh P, Källenius G & Svenson SB (2003) *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan–protein conjugates protect against tuberculosis. *Vaccine* **21**: 4081–4093.
- Helgeby A, Robson NC, Donachie AM, Beackock-Sharp H, Lövgren K, Schön K, Mowat A & Lycke NY (2006) The combined CTA1-DD/ISCOM adjuvant vector promotes priming of mucosal and systemic immunity to incorporated antigens by specific targeting of B Cells. *J Immunol* **176**: 3697–3706.
- Hoft DF (2008) Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet* **372**: 164–175.
- Hogarth PJ, Jahans KJ, Hecker R, Hewinson RG & Chambers MA (2003) Evaluation of adjuvants for protein vaccines against tuberculosis in guinea pigs. *Vaccine* **21**: 977–982.
- HogenEsch H (2002) Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* **20**: S34–S39.
- Källenius G, Pawlowski A, Brandtzaeg P & Svenson SB (2007) Should a new tuberculosis vaccine be administered intranasally? *Tuberculosis* **87**: 257–266.
- Kamath AT, Rochat A-F, Valenti MP, Agger EM, Lingnau K, Andersen P, Lambert P-H & Siegrist C-A (2008) Adult-like anti-mycobacterial T cell and *in vivo* dendritic cell responses following neonatal immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31<sup>®</sup> adjuvant. *PLoS One* **3**: e3683 DOI: 10.1371/journal.pone.0003683.
- Kenney RT, Rabinovich NR, Pichyangkul S, Price VL & Engers HD (2002) Meeting Report. 2nd meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing. World Health Organization–Organization Mondiale de la Santé Fondation Mérieux, Annecy, France, 5–7 June 2000. *Vaccine* **20**: 2155–2163.
- Korbel DS, Schneider BE & Schaible UE (2008) Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* **10**: 995–1004.
- Krishnamachari Y & Salem AK (2009) Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv Drug Deliver Rev* **61**: 205–217.
- Lahiri A, Das P & Chakravorty D (2008) Engagement of TLR signaling as adjuvant: towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine* **26**: 6777–6783.
- Lima KM, dos Santos SA, Rodrigues JM & Silva CL (2004) Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine* **22**: 2374–2379.
- Lindblad EB, Elhay MJ, Silva R, Appelberg R & Andersen P (1997) Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun* **65**: 623–629.
- Lingnau K, Riedl K & von Gabain A (2007) IC31 and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems. *Expert Rev Vaccines* **6**: 741–746.
- Maeyama J-C, Komiya T, Takahashi M, Isaka M, Goto N & Yamamoto S (2009) The mucosal adjuvanticity of the

- oligodeoxynucleotides containing a non-methylated CpG motif on BCG and diphtheria toxoid. *Vaccine* **27**: 1166–1173.
- Mallapragada SK & Narasimhan B (2008) Immunomodulatory biomaterials. *Int J Pharm* **364**: 265–271.
- Marciani DJ, Reynolds RC, Pathak AK, Finley-Woodman K & May RD (2003) Fractionation, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic Quillaja saponins derivative GPI-0100. *Vaccine* **21**: 3961–3971.
- McShane H, Pathan AA, Sander CR, Goonetilleke NP, Fletcher HA & Hill AVS (2005) Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis* **85**: 47–52.
- Meraldi V, Audran R, Romero JF, Brossard V, Bauer J, Lopez JA & Corradin G (2003) OM-174, a new adjuvant with a potential for human use, induces a protective response when administered with the synthetic C-terminal fragment 242–310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*. *Vaccine* **21**: 2485–2491.
- Mills KHG (2009) Designer adjuvants for enhancing the efficacy of infectious disease and cancer vaccines based on suppression of regulatory T cell induction. *Immunol Lett* **122**: 112–115.
- Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, O'Hagan D, Rappuoli R & De Gregorio E (2008) Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *P Natl Acad Sci USA* **105**: 10501–10506.
- Mutwiri G, Littel-van den Hurk SvD & Babiuk LA (2009) Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv Drug Deliver Rev* **61**: 226–232.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T *et al.* (2009) Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine* **27**: 3267–3270.
- Orme IM (2006) Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review. *Vaccine* **24**: 2–19.
- Ott G & Van Nest G (2007) Development of vaccine adjuvants: a historical perspective. *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems* (Singh M., ed), pp. 1–31. Wiley, Hoboken, NJ.
- Palma C, Iona E, Giannoni F, Pardini M, Brunori L, Fattorini L, Del Giudice G & Cassone A (2008) The LTK63 adjuvant improves protection conferred by Ag85B DNA-protein prime-boosting vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection by dampening IFN- $\gamma$  response. *Vaccine* **26**: 4237–4243.
- Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE & Bramwell VW (2008) Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm* **364**: 272–280.
- Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M *et al.* (2004) Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* **6**: 946–959.
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN & Friede M (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* **30**: 23–32.
- Rook GAW, Seah G & Ustianowski A (2001) *M. tuberculosis*: immunology and vaccination. *Eur Respir J* **17**: 537–557.
- Sable SB, Plikaytis BB & Shinnick TM (2007) Tuberculosis subunit vaccine development: impact of physicochemical properties of mycobacterial test antigens. *Vaccine* **25**: 1153–1566.
- Sadoff JC & Hone D (2005) The role of 'go no-go' decisions in TB vaccine development. *Microbes Infect* **7**: 899–904.
- Sajadi-Tabassi SA, Tafaghodi M & Reza Jaafari M (2008) Induction of high antitoxin titers against tetanus toxoid in rabbits by intranasal immunization with dextran microspheres. *Int J Pharm* **360**: 12–17.
- Sanders MT, Brown LE, Deliyannis G & Pearse MJ (2005) ISCOMTM-based vaccines: the second decade. *Immunol Cell Biol* **83**: 119–128.
- Santosuosso M, McCormick S, Zhang X, Zganiacz A & Xing Z (2006) Intranasal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances protection by parenteral *Mycobacterium bovis* BCG immunization against pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **74**: 4634–4643.
- Schijns VE & Degen WG (2007) Vaccine immunopotentiators of the future. *Clin Pharmacol Ther* **82**: 750–755.
- Schijns VEJC (2003) Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine* **21**: 829–831.
- Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J & Hennig R (2008) Safety of MF59<sup>TM</sup> adjuvant. *Vaccine* **26**: 3209–3222.
- Schwarz TF (2008) AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 vaccination: recent advances in cervical cancer prevention. *Expert Rev Vaccines* **7**: 1465–1473.
- Sesardic D (2006) Regulatory considerations on new adjuvants and delivery systems. *Vaccine* **24S2**: S2/86–S2/87.
- Sesardic D & Dobbelaer R (2004) European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. *Vaccine* **22**: 2452–2456.
- Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ *et al.* (2004) Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72E, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* **172**: 7618–7628.
- Sun HX, Xie Y & Ye YP (2009) Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* **27**: 1787–1796.
- Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigemori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N & Tsuji T (2006) Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to nasal killed-bacillus Calmette–Guerin in mice. *Vaccine* **24**: 3591–3598.
- The European Medicines Agency (2005) *Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004*. The European Medicines Agency, London. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/vwp/13471604en.pdf>
- Titball RW (2008) Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov Today* **13**: 596–600.

- Vandepapelière P, Hormans Y, Moris P et al. (2008) Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine* **26**: 1375–1386.
- Vollmer J & Krieg AM (2009) Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliver Rev* **61**: 195–204.
- Wang J, Zganiacz A & Xing Z (2002) Enhanced immunogenicity of BCG vaccine by using a viral-based GM-CSF transgene adjuvant formulation. *Vaccine* **20**: 2887–2898.
- Williams A, Goonetilleke NP, McShane H, Clark SO, Hatch G, Gilbert SC & Hill AVS (2005) Boosting with poxviruses enhances *Mycobacterium bovis* BCG efficacy against tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun* **73**: 3814–3816.
- World Health Organization (2009) *WHO Report 2009. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing*. WHO, Geneva.
- Young D & Dye C (2006) The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell* **124**: 683–687.
- Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C & Dow S (2006) Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* **176**: 7335–7345.

---

---

## APÉNDICE 2.

---

---

## The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification

D. Guillén · S. Moreno-Mendieta · P. Aguilera ·  
S. Sánchez · A. Farres · R. Rodríguez-Sanoja

Received: 28 December 2012 / Revised: 13 February 2013 / Accepted: 14 February 2013 / Published online: 16 March 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Recombinant protein purification with affinity tags is a widely employed technique. One of the most common tags used for protein purification is the histidine tag (His<sub>tag</sub>). In this work, we use a tandem starch-binding domain (SBD<sub>tag</sub>) as a tag for protein purification. Four proteins from different sources were fused to the SBD<sub>tag</sub>, and the resulting fusion proteins were purified by affinity chromatography using the His<sub>tag</sub> or the SBD<sub>tag</sub>. The results showed that the SBD<sub>tag</sub> is superior to the His<sub>tag</sub> for protein purification. The efficient adsorption of the fusion proteins to raw corn starch was also demonstrated, and two fusions were selected to test purification directly using raw starch from rice, corn, potato, and barley. The two fusion proteins were successfully recovered from crude bacterial extract using raw starch, thus demonstrating that the SBD<sub>tag</sub> can be used as an efficient affinity tag for recombinant protein purification on an inexpensive matrix.

**Keywords** Starch-binding domain · Purification tag · Affinity tag · Fusion protein · Protein immobilization

### Introduction

One of the major tasks in science and industry is the production of good quality proteins in large quantities for different purposes. Affinity tags are the most common and popular tools used for recombinant protein purification. These tags can be either proteins or short amino acid sequences that confer binding specificity generally to small ligands or another protein, such as an antibody, usually immobilized on a solid support.

The selection of an appropriate affinity tag depends on the intrinsic characteristics and the desired application of the protein of interest. In general, the use of tags for protein purification offers a series of advantages, including enrichment on purification by hundred-fold from crude extracts, the enhanced solubility of expressed protein, minimal effects on the tertiary structure, and biological activity of the fusion protein and applicability to a number of different proteins (Arnau et al. 2006). A list of common affinity tags including matrices and cost is provided in Table 1.

Affinity resins are generally expensive and consequently are not useful for large-scale protein purification. Tags such as the cellulose-binding domain and the chitin-binding domain use polysaccharides that are abundantly present in nature as purification matrices, which could permit the development of low-cost systems for recombinant protein purification (Liao et al. 2012; Wan et al. 2011; Terpe 2003). Both systems are currently used in commercial expression vectors, pET CBD vectors (Novagen) and Impact Kit vectors (NEB).

Another carbohydrate-binding domain with remarkable characteristics as a purification tag is the starch-binding domain (SBD). This domain is usually present in enzymes with starch-modifying activities, in which it promotes

---

D. Guillén · S. Moreno-Mendieta · P. Aguilera · S. Sánchez ·  
R. Rodríguez-Sanoja (✉)  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México, México, Distrito Federal 04510, México  
e-mail: romina@biomedicas.unam.mx

D. Guillén  
Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
Distrito Federal 04510, México

S. Moreno-Mendieta  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
Distrito Federal 04510, México

A. Farres  
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de  
Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
Distrito Federal 04510, México

**Table 1** Affinity tags employed in fusion protein purification and their general use conditions

Tag	Size (aa)	Affinity Matrix	Elution	Cost (USD/mLg)	Supplier
His-tag	6–10	Ni <sup>2+</sup> -NTA	Imidazole, low pH	5,496/500 mL	SIGMA
Glutathione S-transferase	201	GST-sepharose	Reduced glutathione	1,251/50 mL	SIGMA
Streptag II	8	Strep-Tactin-Sepharose	Desthiobiotin	15,924/1,000 mL	IBA
Maltose binding protein	396	Amylose	Maltose	661/1,000 mL	NEB
FLAG	8	mAb-Matrix	EDTA, Flag peptide	612/mL	SIGMA
c-myc	11	mAb-Matrix	Low pH, c-myc peptide	561/mL	SIGMA
Calmodulin binding peptide	26	Calmodulin	EGTA	671/10 mL	SIGMA
Chitin-binding domain	51	Chitin	Thiol induced self cleavage	288/100 mL	NEB
Cellulose-binding domain	107–158	Cellulose	Ethylene glycol, low ionic strength	336/1,000 g	SIGMA

attachment to the substrate and increases substrate concentration at the active site of the enzyme (Rodríguez-Sanoja et al. 2005a). The SBD could be used in fusion protein technology as a tag for purification or immobilization on raw starch, starch derivatives, or starch analogs. In addition, the natural availability of starch and its chemical properties, e.g., that it is naturally particulate, inert, and approved for pharmaceutical and human uses, makes it an attractive, low-cost matrix for biotechnological procedures.

In this work, we used a tandem starch-binding domain as a tag for fusion protein purification (SBD<sub>tag</sub>). We generated four recombinant proteins using green fluorescent protein (GFP),  $\alpha$ -crystalline from *Mycobacterium tuberculosis* (Acr), tetanus toxin fragment C (Tc) and *Entamoeba histolytica* Cys-rich protein (CR) fused to the SBD<sub>tag</sub>. We then, developed a protein purification system to isolate the fusion proteins using affinity chromatography with an immobilized starch analog. Furthermore, raw starches from different sources were tested as purification matrices, and the feasibility of the system in comparison with the popular His<sub>tag</sub> system was analyzed.

## Materials and methods

### Microbial strains and media

*Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  [*supE44 recA1 endA1 gyr96 thi-1 relA1  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17*] was used as cloning host, and *E. coli* strain BL-21(DE3) [*F<sup>-</sup>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  $\lambda$ (DE3 (lacI lacUV5-T7gene1ind1 sam7 nin5))*] was used for protein production. All strains were grown in LB medium (1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, and 1 % NaCl) supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL) when necessary for plasmid maintenance.

### Construction of plasmids

All DNA manipulations were performed using standard protocols (Sambrook et al. 1989). To construct the fusion

proteins, the green fluorescent protein (*gfp*; from *Renilla reniformis* GB DJ381359.1),  $\alpha$ -crystalline protein (*acr*; from *M. tuberculosis* GBM76712), tetanus toxin fragment C (*tc*; from *Clostridium tetani* GBM12739), and cysteine-rich protein (*cr*; from *E. histolytica* GB XM644379) genes were amplified by polymerase chain reaction to add *Bam*HI sites to each gene.

Templates for amplifications were as follows: for *gfp*, pIRES-hrGFP-1 (Stratagene); for *acr*, pCR4 Topo-Acr (kindly donated by Dr. Espitia, C—not published); for *cr* gene, pED-CREHP (donated by Dr. Carrero, JC) (Carrero 1998), and for *tc*, pBR327+FragBC+COOH (donated by M.S. Munguía, ME) (Osuna 1989). The amplified fragments were purified from a 1 % agarose gel, ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions, and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  by electroporation (Sambrook et al. 1989).

The obtained pGEM-T-easy constructs were digested with *Bam*HI, and the released fragments were purified and ligated to the *Bam*HI-digested pQE31-SBD<sub>tag</sub>. The vector pQE31-SBD<sub>tag</sub> is derived from vector pQE31 (QIAGEN), which carries a sequence encoding a His<sub>tag</sub> that allows the identification and purification of the fusion protein using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and a tandem of SBD for purification by affinity chromatography to starch. The gene fusions were verified by sequencing (Laragen, Inc.).

### Gene expression

Constructs were electrotransformed into *E. coli* BL21(DE3) for protein expression. The strains were grown in LB medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL) and 1 % glycerol in the specific case of AcrSBD expression. Cells were grown for 12 h at 29 °C (O.D.<sub>600</sub>  $\approx$  0.5–0.6). Protein expression was induced by the addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside to a final concentration of 0.1 mM, and the incubation was continued at 29 °C for 3–8 h. Cells were harvested (8,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C) and washed in

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at pH 7.4 before lysis. The obtained proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) and identified by Western blotting with a primary anti-His antibody (Roche) and a secondary anti-mouse immunoglobulin G antibody labeled with alkaline phosphatase (Perkin-Elmer Life Sciences), according to the manufacturer's instructions.

#### Protein purification using the His<sub>tag</sub>

For fusion protein purification, the *E. coli* pellet was resuspended to 1/100 of the original culture volume of a buffer containing 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM imidazole, and 1 % Triton X-100 at pH 7.4, with protease cocktail inhibitor (SIGMA). Cells were disrupted by sonication, and the collected supernatant (15,000 rpm for 30 min at 4 °C) was filtered through a 0.22 μm pore membrane. The fusion proteins were purified through affinity adsorption on immobilized metal affinity chromatography (HisTrap<sup>TM</sup> HP column) using an AKTA Prime system (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocols.

#### Protein purification using SBD<sub>tag</sub>

The *E. coli* pellet was resuspended to 1/100 of the original culture volume in a buffer containing 25 mM citrate-phosphate, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, and 1 % Triton X-100 at pH 7.0, including protease cocktail inhibitor (SIGMA) and 20 mM maltose. The cells were disrupted as described for the His<sub>tag</sub> purification above. Proteins were purified using an AKTA Prime system (GE Healthcare) by affinity chromatography to a β-cyclodextrin-epoxy-activated Sepharose 6B column (16×35 mm), as previously described (Vretblad 1974). After exhaustive washes with 25 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0, the bound protein was eluted with 8 mM β-cyclodextrin in the same buffer at a flow rate of 1 mL/min for 40 min.

#### Binding assay

Before the binding assays, the proteins were extensively dialyzed against 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0, and protein purity was assessed by SDS-PAGE (Laemmli 1970). Various amounts of protein were added to a prewashed raw corn starch suspension (final concentration, 1 %) in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0, to a final volume of 60 μL. As a control, equal number of samples, without starch, were prepared to determine the protein concentration after treatment. The samples with and without starch were incubated at 4 °C for 30 min with gentle shaking (10 rpm) and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. To calculate the total amount of protein bound, the protein

concentration in the supernatant of the samples with starch (unbound protein) was subtracted from the total protein in the supernatant of the samples without starch (Belshaw and Williamson 1990).

The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm with the theoretical molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) obtained with the software ProtParam (ExPASy). The  $\epsilon$  values used were as follows: GFPSBD<sub>tag</sub>, 125,725 L/molcm; for AcrSBD<sub>tag</sub>, 104,170 L/molcm; for CRSBD<sub>tag</sub>, 129,610 L/molcm; and TcSBD<sub>tag</sub>, 192,410 L/molcm. The binding parameters ( $K_{ad}$  [in milliliters per milligram of starch]) were calculated from the slopes obtained from the linear adsorption curve constructed using at least 10 initial concentrations of purified enzyme (GraphPad Prism 4).

#### Purification using raw starch

Two fusion proteins, CRSBD<sub>tag</sub> and TcSBD<sub>tag</sub>, were used to test the suitability of raw starch matrices for purification. Suspensions of corn starch, rice starch, potato starch (SIGMA), and barley starch (Olvera et al. 2012) were prepared by washing three times with cold water and once with 25 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0 (binding buffer); after which, the starch was resuspended in the same buffer.

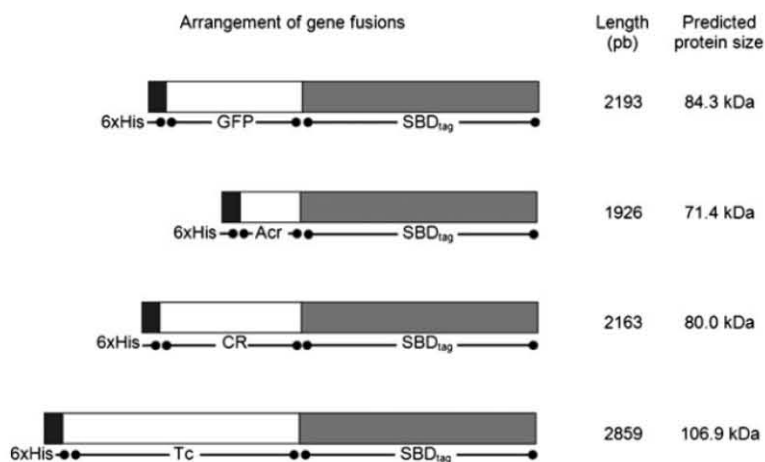
*E. coli* extracts were obtained as described above for purification with the SBD<sub>tag</sub>, and 10 mg of barley, potato, rice, or corn starch were added. The mixture was incubated at 4 °C for 2 h with gentle shaking (10 rpm) and centrifuged at 5,000 rpm for 3 min. The starch pellet was washed four times with 10 volumes of binding buffer, and the fusion protein was then eluted with two washes of 1/2 volume of 8 mM β-cyclodextrin in the same buffer. Proteins were analyzed by SDS-PAGE (Laemmli 1970).

#### Fusion protein quantification

ELISA assays were developed according to the manufacturer's instructions (QIAGEN) with slight modifications to obtain a more precise measurement of the concentration of the fusion protein in bacterial extracts and recovered eluates. Briefly, a curve with serial concentrations of purified fusion protein was elaborated and used to coat 96-well microplates in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6. Serial dilutions of *E. coli* extract and eluate samples were added to the plate in the same buffer and incubated overnight at 4 °C. The plate was then washed three times with PBS-0.05 % Tween. This wash was repeated after blocking and antibody incubation. Nonspecific binding to the plate was minimized by blocking the wells with 3 % skim milk (DIFCO) in PBS-Tween at 37 °C for 30 min.

The coated plate was then incubated 2 h at 37 °C with anti-His antibody diluted 1:1,000 (GeneTex). Then, the plate

**Fig. 1** Schematic representation of the fusion constructs. The SBD<sub>tag</sub> is located at the C-terminus of recombinant proteins and the His-tag at the N-terminus



was washed and incubated for 2 h at 37 °C with goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase diluted 1:1,000 (Invitrogen). After washing, the developing solution (SIGMA *FAST* OPD tablets, SIGMA) was added to the plates and incubated for 30 min at room temperature. Plates were read at 450 nm in a Multiskan FC (Thermo Scientific). The concentrations of unknown samples were interpolated based on the optical density values obtained from the standard curve.

## Results

### Construction and production of fusion proteins

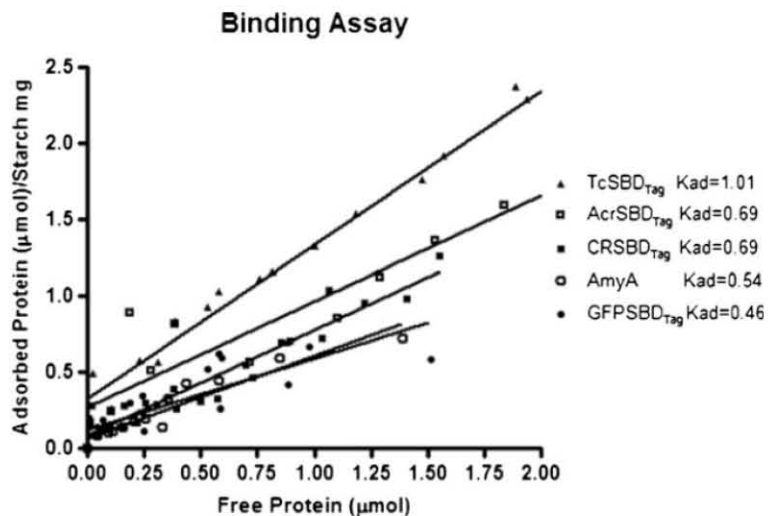
Four proteins from different sources were selected to test the efficiency of the SBD<sub>tag</sub> vs the His<sub>tag</sub>. To compare the purification capability of each tag, dual affinity tagged

versions of each protein were constructed, rendering the construct 6xHis-Protein-SBD<sub>tag</sub>. The encoded proteins were named GFPSBD<sub>tag</sub>, AcrSBD<sub>tag</sub>, CRSBD<sub>tag</sub>, and TcSBD<sub>tag</sub>; each one has different molecular weight (80–107 kDa) (Fig. 1), all of them were produced in the soluble phase and worked under native conditions.

### Adsorption assay

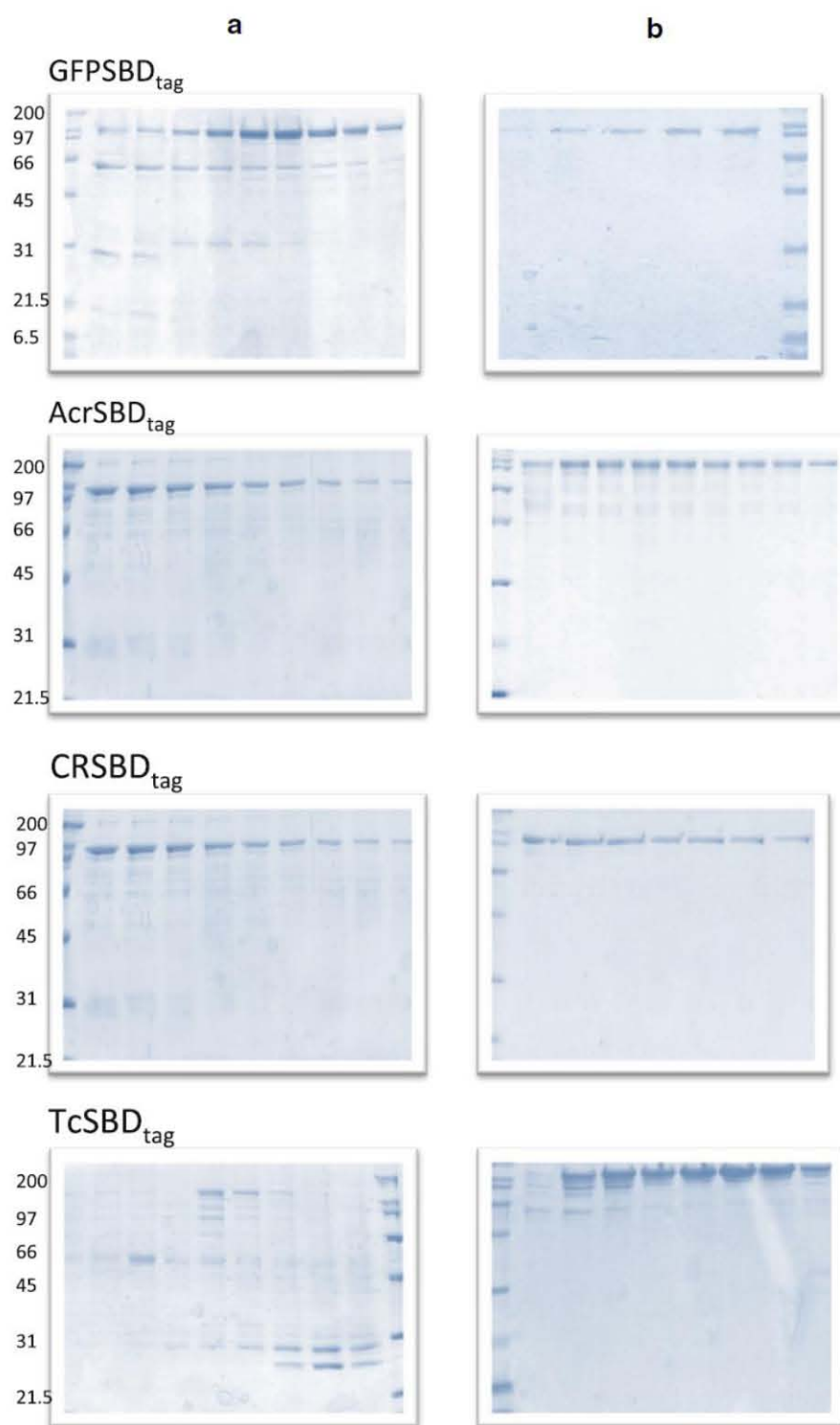
The affinity of the fusion proteins for corn starch was compared to that of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase (Rodríguez-Sanoja et al. 2005b). Figure 2 shows the obtained adsorption isotherms for each fusion. The linear adsorption isotherms indicate the apparent equilibrium between the protein present in the solid phase (bound protein) and the protein in the soluble phase (unbound protein) at different protein concentrations. Adsorption constants ( $K_{ad}$ ) were calculated from the slopes obtained from the linear

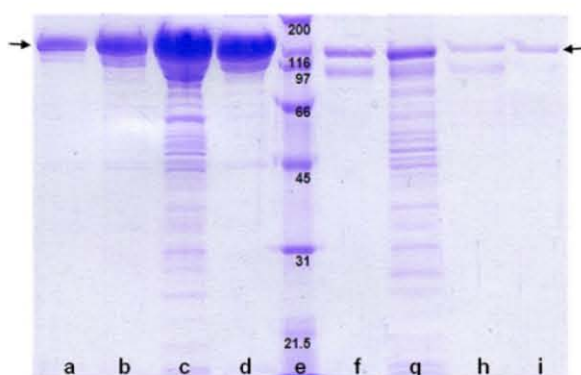
**Fig. 2** Adsorption isotherms for fusion proteins and wild type amylase (*AmyA*) considering free protein (unbound) after equilibrium. The  $K_{ad}$  describes the partitioning of the protein between the solid and liquid phases at low surface coverage





**Fig. 3** Purification of the fusion proteins, indicated with *arrows*. **a** Proteins eluted from a His<sub>6</sub>-tag/Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity column. **b** Proteins eluted from a β-cyclodextrin affinity column





**Fig. 4** Fusion protein elution from raw starch, indicated with *arrow*. **a** TcSBD<sub>tag</sub> from barley starch, **b** TcSBD<sub>tag</sub> from potato starch, **c** TcSBD<sub>tag</sub> from rice starch, **d** TcSBD<sub>tag</sub> from corn starch, **e** Molecular weight marker (Broad-Range Bio-Rad), **f** CRSBD<sub>tag</sub> from corn starch, **g** CRSBD<sub>tag</sub> from rice starch, **h** CRSBD<sub>tag</sub> from potato starch, and **i** CRSBD<sub>tag</sub> from barley starch

adsorption using at least 10 initial concentrations of purified enzyme (Chen et al. 1995).

#### Purification by affinity chromatography

The two tested tags employ different modes of interaction with the affinity resin, but both can be eluted from the resin by competition. The histidine tag is one of the most widely used tags for recombinant protein purification (Structural Genomics Consortium 2008). The purification principle is based on the affinity that short histidine sequences present for transition metal ions ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$ ) immobilized in a solid support.

A sepharose column containing complexed  $\beta$ -cyclodextrin was prepared for protein purification using the SBD<sub>tag</sub> as an affinity tag.  $\beta$ -cyclodextrin is a cyclic molecule composed of seven glucoses that mimics the structure of amylose, a helical polysaccharide that is present in the starch granule. The SBD<sub>tag</sub> has capacity to bind immobilized  $\beta$ -cyclodextrin; in this way, the fusion proteins were purified from the *E. coli* extracts. Maltose was added to decrease the possible

**Table 3** Cost comparison based on the quantity of support needed to obtain 1 mg of fusion protein

Protein	Support	Cost (USD)	\$/protein mg
TcDFA	$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	\$5,496/0.5 L	12.1
	Corn Starch	\$74/5Kg	<0.0001
	Rice Starch	\$62/Kg	<0.0005
	Potato Starch	\$90/Kg	<0.0005
CRDFA	$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	\$5,496/0.5 L	11.32
	Corn Starch	\$74/5Kg	<0.0005
	Rice Starch	\$62/Kg	<0.001
	Potato Starch	\$90/Kg	<0.001

nonspecific binding of contaminant proteins. The eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE, and the His<sub>tag</sub> purification and the SBD<sub>tag</sub> purification were compared (Fig. 3). In all cases, the purification was better when using the SBD as affinity tag.

#### Purification using raw starch

To test the convenience of using starch as a purification matrix, two fusion proteins (TcSBD<sub>tag</sub> and CRSBD<sub>tag</sub>) were purified by adding starch from different sources, including corn, rice, potato, and barley, to the *E. coli* extracts containing the fusion proteins. The eluted fusion protein (Fig. 4) was quantified, and the results were compared with those of the affinity chromatography purification (Table 2).

All the starches tested were able to retain the fusion proteins from the crude bacterial extract for their posterior elution with a yield at least of 70 %. TcSBD<sub>tag</sub> was recovered well using three starches (corn, rice, and potato), while the best results for CRSBD<sub>tag</sub> were obtained with corn and rice. These results are in concordance with the data obtained from the adsorption assays, which showed that TcSBD<sub>tag</sub> was better adsorbed to the starch granule than was CRSBD<sub>tag</sub>.

For both fusion proteins, barley starch showed the lowest recovery rates but also the fewest co-purifying bands. Conversely, rice starch presented a good recovery rate (above 85 %) but also more unwanted bands than the other

**Table 2** The recovery rates of fusion proteins purified by  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (His<sub>tag</sub>),  $\beta$ -cyclodextrin (SBD<sub>tag</sub>) affinity chromatography or using raw starch from different sources

% Protein Recovery	% Protein Recovery					
	$\text{Ni}^{2+}$ -NTA	$\beta$ -cyclodextrin	Corn Starch	Rice Starch	Potato Starch	Barley Starch
TcSBD <sub>tag</sub>	28±7.3 %	90.7±1.8 %	95.5±4.5	86.6±1.7	90.8±5.7	73.7±2.4
CRSBD <sub>tag</sub>	81±5.8 %	86.1±4.9 %	99.5±4.4	99.0±3.3	77.2±1.6	70.1±1.0

The recovery rate is defined as (eluted fusion protein/total fusion protein in *E. coli* lysates)×100. Numbers are the average of two independent experiments

starches. The better compromise between yield and purity was obtained with raw corn starch.

## Discussion

Granular starch adsorption assays showed that the starch-binding capacity was conferred to all proteins fused to the SBD<sub>tag</sub> (Fig. 2). The comparison of the isotherms and the  $K_{ad}$  values obtained for the fusions with those of  $\alpha$ -amylase indicates that the adsorption of the different fusion proteins to the starch granule is as effective as the adsorption of  $\alpha$ -amylase, except for the TcSBD<sub>tag</sub> fusion, which exhibited even stronger adsorption to the starch granule. Although the reason for this phenomenon is not clear, it is possible that an unspecific TcSBD<sub>tag</sub>–carbohydrate interaction takes place; likely due to the reported affinity of tetanus toxin fragment C for carbohydrates such as galactose or lactose (Emsley et al. 2000).

The comparison of the His<sub>tag</sub> and SBD<sub>tag</sub> purifications is shown in Fig. 3. The degree of purification was higher for the SBD<sub>tag</sub> fusion proteins than for the fusions purified through the His<sub>tag</sub> in all cases. Among the SBD<sub>tag</sub> fusions, the best purified protein was CRSBD<sub>tag</sub>, while AcrSBD<sub>tag</sub> was the protein that presented the most co-eluting bands. In the case of His<sub>tag</sub> fusions, the best results were observed with CRSBD<sub>tag</sub>, while TcSBD<sub>tag</sub> presented the most co-purified bands. In this particular case, the fusion protein could not be acceptably purified, regardless of the different IMAC conditions used (e.g., buffer imidazole concentration or flow rate). It is possible that the His<sub>tag</sub> is not well exposed in TcSBD<sub>tag</sub> and thus could not interact with the metal ions in the resin. A second explanation is that the size of TcSBD<sub>tag</sub> affects the binding of the tag to the resin. In that case, a larger poly-histidine sequence could facilitate the fusion protein purification since purification efficiency can be dependent on His<sub>tag</sub> length (Terpe 2003), as well as the inherent properties of the target protein.

In contrast with the His<sub>tag</sub> system, TcSBD<sub>tag</sub> was successfully purified using the  $\beta$ -cyclodextrin/SBD<sub>tag</sub> affinity system. Western blot analysis of co-purified bands revealed that they are different size products of the TcSBD<sub>tag</sub> protein (data not shown).

To exploit the carbohydrate affinity conferred by the SBD<sub>tag</sub>, the fusion proteins were subjected to purification via raw starch. Starch is a glucose polysaccharide that is usually found as insoluble granules and is highly abundant in nature. For this reason, compared with available commercial resins, starch represents an inexpensive matrix for fusion protein purification.

Starches from four different sources, barley, corn, potato, and rice, were tested as purification matrices. The starches from barley, corn, and potato were able to retain the fusion

proteins, allowing extensive washing and good elution yields. The selected fusion proteins (TcSBD<sub>tag</sub> and CRSBD<sub>tag</sub>) were well separated from a complex protein mixture, i.e., *E. coli* lysate (Fig. 4). In the specific case of rice starch, the fusion proteins were also adsorbed but eluted with unwanted contaminant proteins. This phenomenon could be related to the nature and minor size of the rice starch granule ( $\approx 4 \mu\text{m}$ ), which tends to form a condensed pellet that is more difficult to disperse in solution and therefore to wash, while barley ( $\approx 27 \mu\text{m}$ ) and potato (up to  $100 \mu\text{m}$ ) starches have a larger granule size and are more easily dispersed in solution.

Of all the systems tested, the best protein recovery with the least contamination was obtained with the  $\beta$ -cyclodextrin column, which allowed  $\geq 90\%$  recovery of the two fusion proteins. Similar results were obtained with raw starch, with efficiencies from 70 to 99% (Table 2). A previous study had tested a fusion between the GFP and a SBD from *Rhizopus oryzae*. The authors reported that 45–55% of protein was recovered from corn starch when it is added directly to the protein solution (Lin et al. 2009). The use of a tandem SBD system clearly improves protein recovery (70–99.5%) (Guillen et al. 2007).

The His<sub>tag</sub> is one of the most commonly employed tags for recombinant protein purification and has been successfully used for the purification of many proteins, although some proteins can only be partially purified with this tag (Lichty et al. 2005). For all the fusion proteins tested here, purification with the SBD<sub>tag</sub> was always more effective than purification with the His tag at three levels, the degree of protein recovery, the minimal presence of co-purified proteins, and also in the purification costs associated with each support. Table 3 shows the purification cost for 1 mg of fusion protein depending on the chosen support. Thus, this system is as effective as other tag systems, but unlike these more expensive systems, the price of raw starch makes the SBD<sub>tag</sub> system suitable for protein purification for both everyday laboratory work and large-scale production.

**Acknowledgment** D. Guillén, S. Moreno-Mendieta, and P. Aguilera were supported by personal grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México. This work is supported by UNAM-DGAPA grants IN209410-3, IN222113, and CONACyT grant 131149. We thank Beatriz Ruiz, Laura Escalante, and María Elena Munguía for technical assistance.

## References

- Amau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 48:1–13
- Belshaw NJ, Williamson G (1990) Production and purification of a granular-starch-binding domain of glucoamylase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Lett* 269:350–353

- Carrero SJC (1998) Inmunización oral on antígenos de *Entamoeba histolytica* clonados a través de anticuerpos IgA secretores. Tesis de doctorado en IBB, UNAM
- Chen L, Coutinho PM, Nikolov Z, Ford C (1995) Deletion analysis of the starch-binding domain of *Aspergillus* glucoamylase. *Protein Eng* 8:1049–1055
- Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW (2000) The structures of the HC fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J Biol Chem* 275:8889–8894
- Guillen D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlon J, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2007) Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Appl Environ Microbiol* 73:3833–3837
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Liao H, Myung S, Zhang Y-HP (2012) One-step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1109–1117
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 41:98–105
- Lin S-C, Lin IP, Chou W-I, Hsieh C-A, Liu S-H, Huang R-Y, Sheu C-C, Chang MD-T (2009) CBM21 starch-binding domain: a new purification tag for recombinant protein engineering. *Protein Expr Purif* 65:261–266
- Olvera CF, Rodríguez-Sanoja R, Prieto GF, Román GAD (2012) Caracterización física y química proximal de paja, grano y almidón de cebada de la variedad esmeralda. *Bio/Technol* 16:9–20
- Osuna J (1989) Aislamiento de un fragmento inmunogénico de toxina tetánica. Tesis de maestría en IBB, UNAM
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Sanchez S (2005a) Microbial starch binding domains. *Curr Opin Microbiol* 8:260–267
- Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Guyot JP, Sanchez S (2005b) The starch binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases. *Appl Environ Microbiol* 71:297–302
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Michigan
- Structural Genomics Consortium AeFdB, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural Genomics Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative and SPINE2-Complexes (2008) Protein production and purification. *Nat Meth* 5:135–146
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523–533
- Vretblad P (1974) Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography VIA their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose-beta-amylase system. *FEBS Lett* 47:86–89
- Wan W, Wang D, Gao X, Hong J (2011) Expression of family 3 cellulose-binding module (CBM3) as an affinity tag for recombinant proteins in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:789–798

---

---

## APÉNDICE 3.

---

---



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## A novel antigen-carrier system: The *Mycobacterium tuberculosis* Acr protein carried by raw starch microparticles



Moreno-Mendieta S.A.<sup>a,b</sup>, Guillén D.<sup>a,c</sup>, Espitia C.<sup>a</sup>, Hernández-Pando R.<sup>d</sup>, Sanchez S.<sup>a</sup>, Rodríguez-Sanoja R.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P.70228, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

<sup>b</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P.70228, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

<sup>c</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P.70228, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

<sup>d</sup> Servicio de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Delegación Tlalpan, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 February 2014

Received in revised form 23 June 2014

Accepted 24 July 2014

Available online 2 August 2014

## Keywords:

Starch microparticles  
Starch Binding Domain tag  
Mucosal immunization  
Microparticle vaccines  
Protein delivery

## ABSTRACT

Microparticles have been used as promising carriers for in vivo vaccine delivery. However, the processes for immobilizing peptides or proteins on microparticles usually require the use of undesirable compounds and complex protocols. In this work, we propose a new immobilization and delivery system with raw starch microparticles and a starch binding domain (SBD) tag fusion protein. The heat shock protein alpha crystallin from *Mycobacterium tuberculosis* was used as model. The immunogenicity of the system was investigated in BALB/c mice inoculated with purified Acr-SBD<sub>tag</sub> protein (pAcr-SBD<sub>tag</sub>) and starch immobilized Acr-SBD<sub>tag</sub> protein (μAcr-SBD<sub>tag</sub>) by oral and intranasal routes. We demonstrated mucosal immunization with the μAcr-SBD<sub>tag</sub> protein induced systemic antibodies that were predominantly immunoglobulin G2a (IgG2a). An analysis of the cytokines from spleen cells and lung homogenates revealed that loaded microparticles induced the secretion of interferon-γ (INF-γ), suggesting an adjuvant effect from the immobilization. The immune responses induced by immobilized protein were primarily affected by the route of administration. These results demonstrate that the system exhibits the necessary characteristics to improve antigen release and presentation to antigen presenting cells (APCs) in the mucosae. Because no extra adjuvants were used, we posit that the system may be suitable for delivery and presentation to the field of subunit vaccine development.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The association of proteins or peptides with polymeric microparticulated systems is a successful strategy to carry and deliver antigens in the mucosae. Not only do the systems retain activity and prevent enzymatic degradation, but they also induce strong immune responses against many antigens such as protein subunits, peptides or naked DNA, which are poorly immunogenic when administered without adjuvants (Perrie et al., 2008).

Biocompatible polyester, in the form of poly-lactide-co-glycolide (PLG) microparticles, is the most commonly used to adsorb or encapsulate a variety of agents. This material has been used in humans for many years as resorbable suture material and as a controlled release and delivery system

(Elamanchili et al., 2004; Waeckerle-Men and Groettrup, 2005). These microparticles are used to induce enhanced responses, especially for cases in which strong compartmentalized immune responses are needed (Csaba et al., 2008; Malyala et al., 2009). Similarly, chitosan (Amidi et al., 2007) or polyacryl starch microparticles (Heritage et al., 1996; Wikingsson and Sjöholm, 2002), which are theoretically biodegradable and have mucoadhesive properties, have shown adjuvant potential and favored the induction of enhanced immune responses in mucosal tissues (Rydell and Sjöholm, 2005; Balasse et al., 2008). However, regardless of the support material, a chemical process and the cross-linking of organic compounds are usually necessary for allowing covalent interactions between the support and the protein or peptide of interest, which is a process that can affect the protein during preparation (van de Weert et al., 2000).

An advantageous strategy to immobilized peptides or proteins on polymeric raw substrates without the need for covalent binding is to use systems comprising carbohydrate binding

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56229191/88.

E-mail address: [romina@biomedicas.unam.mx](mailto:romina@biomedicas.unam.mx) (R. Rodríguez-Sanoja).

modules (CBMs) (Nilsson et al., 1997). These systems permit the simultaneous purification and immobilization of recombinant proteins fused with the selected affinity tag, and they offer significant benefits for the research and pharmaceutical industry because immobilization can be performed on abundant and cheap matrices that are already in particulate form. In this work, we use a Starch Binding Domain as a tag to attach a fusion protein on raw starch microparticles and for its later mucosal administration. This SBD has been successfully used as an affinity tag for the adsorption of several proteins to raw starch and for protein purification by affinity chromatography (Guillén et al., 2013). Even in previous studies, a potential was demonstrated for using this non-covalent binding system to confer stability to recombinant immobilized proteins under harsh conditions, such as those of the gastrointestinal tract (Moreno-Mendieta et al., 2014, submitted).

The carrier and adjuvant potential of the SBD<sub>tag</sub>-starch microparticle system was tested by using the protein alpha crystallin (Acr) from *Mycobacterium tuberculosis*. Acr (also called Acr1, HspX, Hsp16.3, or Rv2031c) is a heat shock protein and an ATP-independent chaperone of low molecular weight that is induced by hypoxia (Rosenkrands et al., 2002). It is important in the extracellular phase of the pathogen and contributes to replication during the initial infection and growth of mycobacteria in the macrophage (Yuan et al., 1998). However, the most important role of this protein seems to be the viability maintenance of long-term bacilli survival and adaptation to the environment during latent infection (Monahan et al., 2001). The possibility of using this protein as a component in subunit vaccines that were designed to replace or reinforce protection with BCG was documented some years ago (Roupié et al., 2007; Zvi et al., 2008) and recently mentioned (Singh et al., 2013). Its participation in the lag phase, the fact that the serum of patients with latent tuberculosis is enriched with antibodies that strongly recognize this protein (Demissie et al., 2006), and its recent use in multistage subunit vaccines (Niu et al., 2011) or immune complexes (Pepponi et al., 2013) demonstrate its potential in differential diagnosis and as a vaccine component.

Here, we used BALB/c mice to evaluate the ability of starch microparticles to facilitate Acr-SBD<sub>tag</sub> protein uptake, transport and presentation after oral (o.) and intranasal (i.n.) immunization without the need for extra adjuvants. We tested the capacity of the

loaded microparticles ( $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub>) to enhance the antibody response against Acr protein and its efficiency in inducing interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. The production of AcrSBD<sub>tag</sub> and Acr proteins

The plasmid pQAc-SBD<sub>tag</sub> that expressed the fusion protein was constructed and produced as previously described. In brief, the alpha crystallin coding region from *M. tuberculosis* (GB M76712) was PCR-amplified from a pCR4Topo-Acr template, which was kindly donated by Dr. C. Espitia, using synthetic oligonucleotide primers containing the *Bam*HI sequence. The amplified fragment was purified and ligated to the pGEM-T-Easy vector following the manufacturer's instructions and then transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  by electroporation (Sambrook et al., 1989). The resulting pG-Acr construct was verified by PCR and sequencing (Laragen, Inc., Los Angeles, CA). The fragment released by digestion was cloned into the pQE31-SBD<sub>tag</sub> vector containing a His<sub>6</sub> tag at the N-terminus and the SBD<sub>tag</sub> at the C-terminus. The recombinant Acr-SBD<sub>tag</sub> protein was purified from the clarified extracts by affinity chromatography using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) and a  $\beta$ -cyclodextrin-epoxy-activated Sepharose 6B column (16 by 35 mm) (Guillén et al., 2013).

To obtain Acr protein as a control, the pET-Acr vector (Dr. C. Espitia), was used to express 6xHis-tagged-Acr protein under the control of the phage T7 promoter. The vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA), and clones of the strain were grown at 29 °C in LB medium with 1% glycerol supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/mL). Protein expression was induced by the addition of IPTG (0.1 mM). The resulting cultures were harvested after 4 h, the cells were disrupted, and the recombinant protein was purified from the clarified extracts by metal affinity chromatography using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) and a HisTrap<sup>TM</sup> 15HP column. The proteins concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm with the theoretical molar extinction coefficients (Acr-SBD<sub>tag</sub>  $\epsilon$  = 104170 L/mol cm; Acr  $\epsilon$  = 4470 L/mol cm) obtained for each protein with the software ProtParam (ExpASY). Purity of proteins was analyzed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

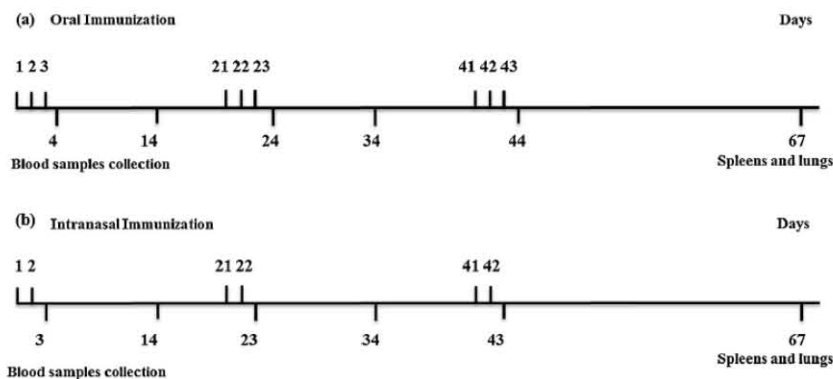


Fig. 1. Immunization protocols and sample collection schemes. The schemes of consecutive doses were performed without the use of adjuvants. Each dose for oral administration contained 50 or 100  $\mu$ g of immobilized or free Acr-SBD<sub>tag</sub>. Booster doses were given in the same manner on days 21–23 and 41–43. Mice immunized intranasally received 25 or 50  $\mu$ g of immobilized or free Acr-SBD<sub>tag</sub> protein in two consecutive days (1–2). Booster doses were given in the same manner on days 21–22 and 41–42. Control mice were treated under the same immunization protocols. Positive control mice were administered with Acr protein at the same doses. Mice administered with 1 mg of starch microparticles were used as carrier control and untreated mice were used as negative controls. Pre-immune or negative serum was obtained from mice before immunization.

## 2.2. Starch immobilization and preparation of the doses

Before its immobilization, purified Acr-SBD<sub>tag</sub> protein was extensively dialyzed against 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0. Protein doses were standardized to Acr. For oral immunization, 50 and 100 µg of protein were added to 1 mg of pre-washed raw rice starch (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0. For intranasal immunization, 25 and 50 µg of protein were also added to 1 mg of rice starch using the same buffer. The mixtures were incubated overnight at 4 °C with gentle shaking (10 rpm) and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Washed pellets were resuspended in 10 mM citrate-phosphate buffer, pH 7.0 at final volumes of 20 µL for *i.n.* immunizations and 100 µL for *o.* immunizations.

To verify that all the protein doses were absorbed on the starch microparticles, the supernatants, the washing buffer and the starch pellets were analyzed by WB using a primary anti-His6 antibody and a secondary alkaline phosphatase-labeled anti-mouse immunoglobulin G antibody.

## 2.3. Immunization protocol and samples collection

Female BALB/c mice (6–8 weeks old; weighing 15–18 g) were housed in groups of 6 in a conventional animal maintenance facility under controlled temperature, humidity and light/dark cycle conditions. The animals were given ad libitum access to food and water. All experiments were conducted according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee at the Biomedical Research Institute of UNAM.

The immune response was evaluated in groups immunized with purified Acr-SBD<sub>tag</sub> protein (pAcr-SBD<sub>tag</sub>) and with starch immobilized Acr-SBD<sub>tag</sub> protein (µAcr-SBD<sub>tag</sub>) by *o.* and *i.n.* routes, and the results were compared with those obtained in control groups that were immunized with the same doses of Acr purified protein (positive control) with no-treatment or naïve mice (negative control) or in mice treated only with starch (vehicle).

No extra adjuvants were used for immunization. Mice were immunized with consecutive doses at three-week intervals as seen in Fig. 1. The immunization schemes were chosen to favor the adjuvant effect that polymeric microparticles can have when administered via mucosae (Wikingson and Sjöholm, 2002; Gutierrez et al., 2002; Rydell and Sjöholm, 2005).

Mice were fed by oral gavage using a blunt-ended steel syringe (22GA Feeding Needle Kent Scientific Corp.) on three consecutive days (1–3). Each dose for oral administration contained 50 or 100 µg of immobilized or free Acr-SBD<sub>tag</sub> protein in a final volume of 100 µL. Booster doses were given in the same manner on days 21–23 and 41–43. Mice immunized intranasally received 25 or 50 µg of immobilized or free Acr-SBD<sub>tag</sub> protein in two consecutive days (1–2). The doses were administered dropwise to the external nares of the mice using a micropipette (no anesthesia was necessary) in a final volume of 20 µL (10 µL per nostril). Booster doses were given in the same manner on days 21–22 and 41–42. As intranasal route is more efficient to induce systemic responses and is less aggressive with proteins (Vajdy and O'Hagan, 2001) only two boosters and lower doses were chosen for this route. Control mice were treated under the same immunization protocols. Positive control mice were administered with Acr protein at the same doses. Mice administered with 1 mg of starch microparticles were used as carrier control and untreated mice were used as negative controls.

Blood samples were collected from the orbital plexus with heparinized microtubes, and sera were collected after centrifugation for 6 min at 4 °C and 8000 rpm. Sera were kept at –20 °C or lower until analyzed for specific antibodies.

Three weeks after the last immunization, the mice were anesthetized with an *i.p.* injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg), and their lungs and spleens were aseptically removed to quantify the INF-γ levels in lung homogenates and the supernatant of *in vitro* stimulated splenocytes.

The spleens were processed to obtain total cells. In brief, the spleens were homogenized in RPMI-1640 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and passed through a cell strainer with 70 µm nylon mesh (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), and the red blood cells were lysed by hypotonic shock with 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl buffer, pH 7.4. The cells were washed and resuspended in 1 mM DPBS pH 7.4 supplemented with 5% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco, Carlsbad, CA, USA), and the total number of cells and percent viability were determined using a hemocytometer cell counter and Trypan Blue exclusion.

## 2.4. Evaluation of antibody responses

Serum concentrations of specific IgG, IgG1 and IgG2a anti-Acr antibodies elicited by immunization with µAcr-SBD<sub>tag</sub>, pAcr-SBD<sub>tag</sub> or Acr proteins were measured by ELISA using Acr as the coating antigen. In brief, ELISA plates (Costar 3590 96 well) were coated overnight at 4 °C with 100 µL of a 2.5 µg/mL solution of purified Acr protein in coating carbonate buffer (50 mM pH 9.6) per well. The plates were then washed three times with 0.1 M PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween-20 (PBS-5T) and blocked for 1 h with 100 µL 0.25% BSA in PBS-5T at room temperature. The plates were washed again, the serum samples were diluted 1:1000 in PBS-5T, and 100 µL of each sample was added to each well of the coated ELISA plates. Each plate contained control wells with pre-immune sera, 0.1 M PBS pH 7.4 and positive immune sera, and they were incubated *o.n.* at 4 °C and washed three times with PBS-5T. Horseradish peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was diluted 1:1000 in PBS-5T and added to each well (100 µL per well). The plates were washed three times after 1 h of incubation at 37 °C. Substrate was added (OPD 200 µL per well) and the OD<sub>450</sub> determined. A standard curve of monoclonal mouse IgG, IgG1, or IgG2a was used as a measurement of antibody concentration. The response from preimmune serum of each mouse was subtracted to control for nonspecific binding of serum to the plate. The mean value of naïve control mice sera was also subtracted from test sample values to control for nonspecific reactivity.

## 2.5. *In vitro* INF-γ production by whole splenocytes

Total suspension cells were cultured in 96-well tissue culture plates (Costar, 3599) at  $2 \times 10^5$  cells per well in 200 µL of RPMI-1640 supplemented with 10% heat inactivated FCS (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 25 mM HEPES (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 1 mM non-essential amino acids solution (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 50 µM β-mercaptoethanol (Bio-Rad Hercules, CA, USA) in the presence or absence of purified Acr or Acr-SBD<sub>tag</sub> proteins (20 µg/mL) prepared in 50 µL of 0.1 M PBS pH 7.4. Concanavalin A (CoA) (5 µg/mL) was used as a positive control for this assay. The cells were incubated 72 h with mitogen and 96 h with protein at 37 °C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> and 90% humidity. After this time, the cell culture media from treated or control splenocytes were harvested in eppendorf tubes and then centrifuged for 5 min at 4 °C and 1500 rpm. Supernatants were aliquoted and stored at –70 °C for the cytokine assay. The INF-γ was assessed using a murine INF-γ ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as recommended by the manufacturer.



## 2.6. INF- $\gamma$ production in lung homogenates

Lungs removed three weeks after the last immunization were homogenized in 1 mL of PBS 0.1 M pH 7.4, clarified by centrifugation for 5 min at 4 °C and 10,000 rpm and kept at –20 °C until IFN- $\gamma$  analysis. The IFN- $\gamma$  was assessed using a murine IFN- $\gamma$  ELISA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as recommended by the manufacturer.

## 2.7. Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The serum levels of specific antibodies were compared among groups using analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni post-test. Differences were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. The immunogenicity potential of the starch based carrier system: the specific anti-Acr IgG response

The effect of the SBD<sub>tag</sub> fusion and the immobilization of Acr-SBD<sub>tag</sub> protein on the induction of the humoral immune response against Acr were investigated determining the specific IgG antibodies in the sera of BALB/c mice that were *o.* and *i.n.* immunized. The response was compared with that obtained after immunization with Acr control protein. As expected, no specific antibodies were detected in pre-immune sera, in the sera of mice that received only starch, or in the sera of naïve mice. No clinical manifestations of toxicity or other reactions were observed in the mice after their immunizations.

In mice that were *o.* immunized with three consecutive doses of 50 or 100  $\mu$ g at each 3 week interval, anti-Acr antibodies first became detectable in the groups that received formulations with  $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub> protein at both doses (14 day), reaching the maximum level on the 34 day. This level was maintained until the end of the immunization experiment (Fig. 2a). These observations suggest an adjuvant effect of the immobilization. The response that was induced with pAcr-SBD<sub>tag</sub> protein started later, with a maximum level at 44 days. Immunization with Acr protein did not induce any immune response with 50  $\mu$ g, and there was a very poor response with 100  $\mu$ g, suggesting that the fusion and immobilization caused Acr to be recognizable by the immune system.

In mice that received two consecutive doses of 25 or 50  $\mu$ g at each 3 week interval by *i.n.* route, anti-Acr antibodies were higher

at day 23 in the groups that received formulations with pAcr-SBD<sub>tag</sub> protein at both doses (Fig. 2b). However, the response was only observed immediately after the immunization. Although the animals that received immobilized protein had a stronger response at day 34, there were no significant differences between treatments at the end of the immunization scheme. These results suggest that starch can be a hindrance at the time of antigen presentation in the nasal mucosa. As observed in the *o.* immunization route, the *i.n.* administration of Acr did not induce a systemic immune response at any dose, also indicating that the Acr protein would have acted as a hapten and a carrier was needed for its recognition.

### 3.2. The mediated Th response: IgG isotypes

To determine whether immobilizing proteins on particles could modulate the response that induced Th1 or Th2 mediated immunity, the levels of IgG1 and IgG2a subclasses were measured for groups immunized by *o.* and *i.n.* routes. The responses were only detected after the second immunization. As in the IgG levels, immunizing with Acr induced poor or null IgG1 and IgG2a antibodies. As shown in Fig. 3, mice immunized with the  $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub> protein had higher levels of IgG2a, and mice that received pAcr-SBD<sub>tag</sub> protein showed a mixed Th1/Th2 response. In mice that were *o.* immunized (Fig. 3a and b), immobilized proteins at both doses induced IgG2a levels significantly higher than IgG1 levels. Additionally, in mice that were *i.n.* immunized (Fig. 3c and d), the immobilized protein treatment induced an IgG2a response that was significantly higher than that of IgG1 but only on immunization days. Mice receiving pAcr-SBD<sub>tag</sub> protein showed a mixed Th1/Th2 response of a lower magnitude. These results together suggest that the immobilization on starch microparticles can be used as an alternative for triggering or inducing a Th1-type response against the fused protein. This potential could also be inferred by the positive IgG2a/IgG1 ratio obtained with the administration of Acr-SBD<sub>tag</sub> immobilized protein (data not shown).

### 3.3. Specific INF- $\gamma$ responses after *in vitro* antigenic stimulation and in the respiratory tract

To evaluate how immobilization contributed to the induction of a Th1 mediated response and to correlate the response with the resulting IgG2a levels, splenocytes were recovered 3 weeks after the last immunization and INF- $\gamma$  was quantified by a sandwich ELISA in supernatants collected from treated or control splenocytes cultured with Acr or Acr-SBD<sub>tag</sub> proteins (Fig. 4). Splenocytes from all of the

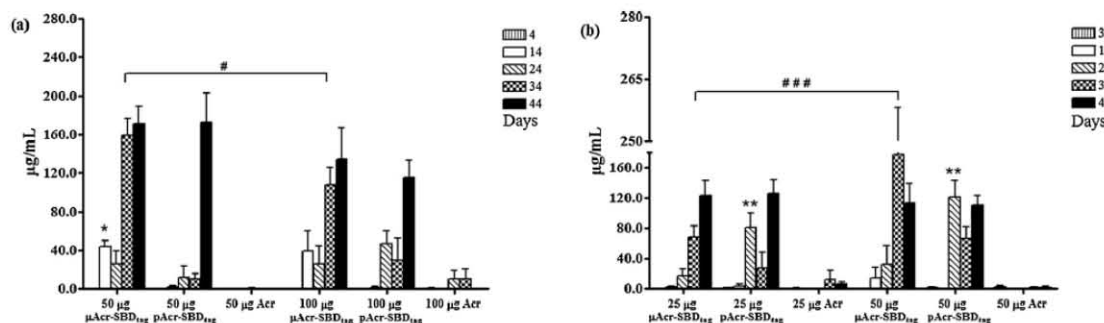


Fig. 2. Induction of the specific IgG anti-Acr antibodies in the sera of mice immunized (a) orally and (b) intranasally. Sera obtained from mice immunized with Acr-SBD<sub>tag</sub> immobilized ( $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub>), in solution Acr-SBD<sub>tag</sub> (pAcr-SBD<sub>tag</sub>) or Acr recombinant proteins were tested by ELISA against Acr. Values represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$  between 50  $\mu$ g of immobilized and free Acr-SBD<sub>tag</sub> protein, # $p < 0.05$  between 50 and 100  $\mu$ g of  $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub>, \*\* $p < 0.01$  between immobilized and free Acr-SBD<sub>tag</sub> protein at same doses, ### $p < 0.001$  between 25 and 50  $\mu$ g of  $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub>.

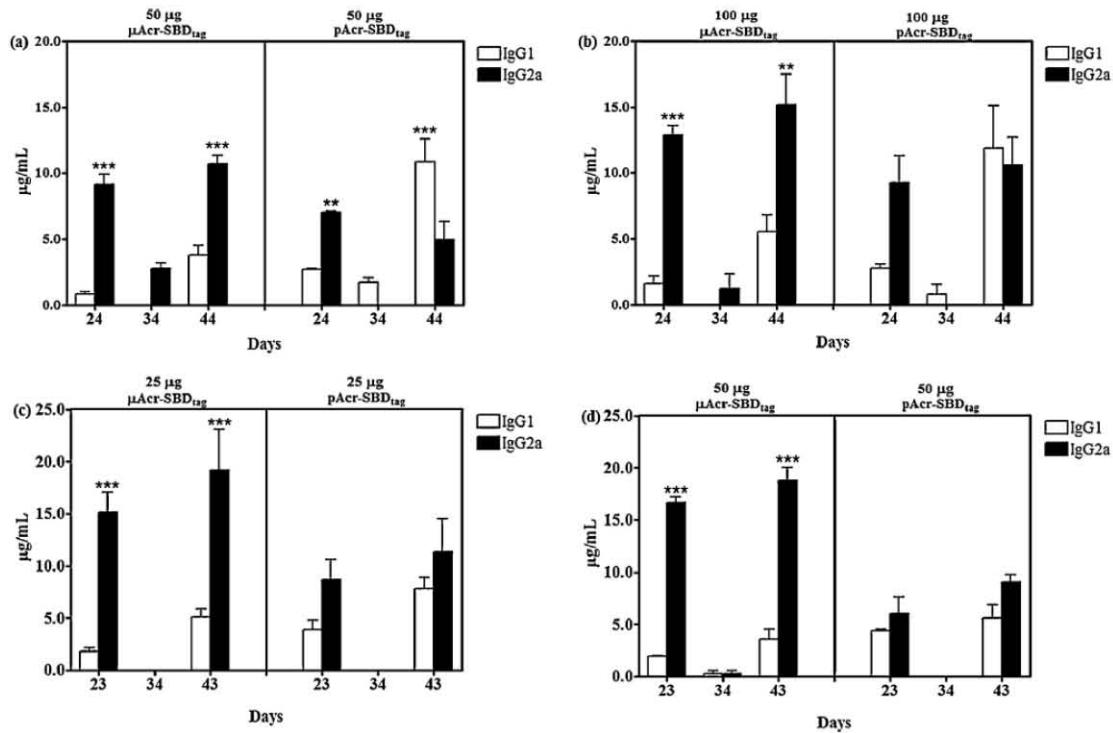


Fig. 3. Induction of specific IgG1 and IgG2a isotypes in the sera of mice immunized (a, b) orally and (c, d) intranasally. Sera obtained from mice immunized with immobilized ( $\mu\text{AcR-SBD}_{\text{tag}}$ ) or free purified ( $\text{pAcR-SBD}_{\text{tag}}$ ) recombinant proteins were tested by ELISA against Acr. Values represent the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  between IgG1 and IgG2a levels.

groups released INF- $\gamma$  in the absence of antigen stimulation, as inferred by the levels obtained with mitogen. No antigen-specific INF- $\gamma$  release was observed in non-immunized mice. The INF- $\gamma$  produced by splenocytes from *o.* and *i.n.* immunized mice increased upon antigen stimulation. As shown in Fig. 4a, splenocytes from mice that were *o.* immunized with 50  $\mu\text{g}$  of  $\mu\text{AcR-SBD}_{\text{tag}}$  released the highest levels of INF- $\gamma$  upon stimulation with 20  $\mu\text{g}$  of Acr. Although there were no observed differences in the levels released by splenocytes from mice immunized with 50  $\mu\text{g}$  of  $\text{pAcR-SBD}_{\text{tag}}$  protein and 100  $\mu\text{g}$  of  $\mu\text{AcR-SBD}_{\text{tag}}$  protein, there is a difference between the treatments (free or immobilized) at the same dose. By

contrast, as shown in Fig. 4b, the splenocytes from mice that were *i.n.* immunized with 25 and 50  $\mu\text{g}$  of  $\mu\text{AcR-SBD}_{\text{tag}}$  released the highest levels of INF- $\gamma$  upon stimulation with 20  $\mu\text{g}$  of Acr which is also consistent with their IgG2a levels. In both groups (*o.* and *i.n.* immunized), a lower response was obtained upon stimulation with  $\text{AcR-SBD}_{\text{tag}}$ , indicating that immunogenicity is a primary contribution of Acr and not of  $\text{SBD}_{\text{tag}}$ . The immunization with the recombinant free or immobilized protein by both routes also induced the release of higher INF- $\gamma$  levels than immunization with 50  $\mu\text{g}$  Acr which is consistent with the poor or null antibody response of mice receiving this protein.

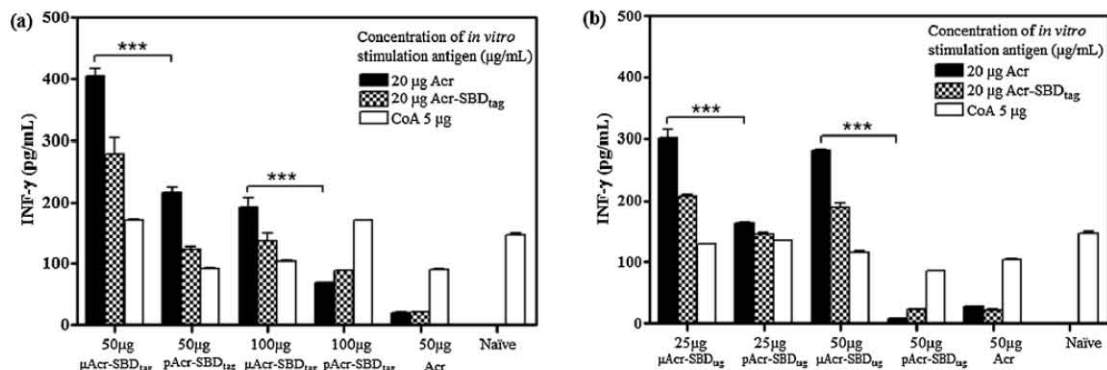


Fig. 4. Induction and release of Acr-specific cytokine INF- $\gamma$  from splenocytes isolated from mice immunized with  $\text{AcRSBD}_{\text{tag}}$  protein, immobilized ( $\mu\text{AcRSBD}_{\text{tag}}$ ) or in solution ( $\text{pAcRSBD}_{\text{tag}}$ ), after in vitro stimulation as described in Section 2. Levels of INF- $\gamma$  were assayed by ELISA. (a) Orally immunized mice; (b) intranasally immunized mice. Values represent the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). \*\*\* $p < 0.001$  between immobilized and free protein at the same dose.

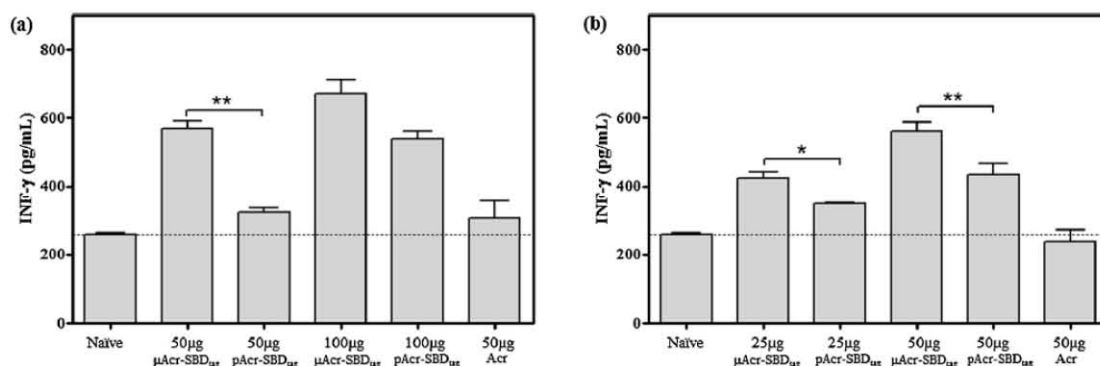


Fig. 5. Induction and release Acr-specific INF- $\gamma$  in lung homogenates from mice immunized with AcrSBD<sub>tag</sub> protein, immobilized ( $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub>) or in solution (pAcrSBD<sub>tag</sub>) as described in Section 2. Levels of INF- $\gamma$  were assayed by ELISA. (a) Orally immunized mice; (b) intranasally immunized mice. Values represent the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  between immobilized and free protein. Broken horizontal lines represent the corresponding levels in the control animals.

In addition, to find if this Th1 mediated response was present in the lungs after *o.* or *i.n.* immunization with free or immobilized protein, the lung homogenates of treated mice were analyzed for INF- $\gamma$  production. As shown in Fig. 5, the INF- $\gamma$  levels were higher in the lungs of immunized mice with the recombinant protein in comparison with naïve mice and those immunized only with Acr ( $p < 0.001$ ). In orally immunized mice (Fig. 5a), the highest levels were detected in the lungs of mice receiving 100  $\mu$ g of  $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub> protein, but differences between treatments with free or immobilized protein were only observed with 50  $\mu$ g dose. Mice receiving 100  $\mu$ g of pAcr-SBD<sub>tag</sub> protein also had high levels of INF- $\gamma$  compared with the control animals ( $p > 0.001$ ). These results show that lower immobilized protein doses can be as effective as the highest dose of free protein at inducing the INF- $\gamma$  production through this route. Intranasally immunized mice (Fig. 5b) also had higher responses when receiving the immobilized protein, although both treatments (free and immobilized) induced higher INF- $\gamma$  levels compared with the naïve mice. This observation was in accordance with the mixed Th1/Th2 response mediated by free protein.

#### 4. Discussion

Despite significant progress in the field of subunit vaccines and adjuvant development, the design and improvement of carrier and delivery systems that also have adjuvant properties and that can in turn be appropriately formulated for use in humans is growing in importance and interest (O'Hagan and Valiante, 2003). The use of microparticles made of biomaterials for immune-cell targeting represents a potential non-toxic alternative adjuvant technology (Reddy et al., 2006). Microparticulated systems not only offer the possibility of modulating the immune response on the basis of the dose and route of administration (Gutierrez et al., 2002), but they also offer an excellent alternative to trigger systemic and mucosal immune responses (O'Hagan, 1998). However, the attention to date has focused on the development of complex delivery systems, such as functionalized polymeric particles, liposomes, virosomes or immune stimulating complexes (ISCOMs), among others (Zhao et al., 2014), whose potential use in humans is still controversial. Here, we propose a good alternative to developing antigen carrier systems with adjuvant properties based on the use of CBMs and natural polymers (in particular, using the SBD<sub>tag</sub> and starch as the matrix (patent application)). In previous studies, we demonstrated that the system of immobilization on starch microparticles using the SBD<sub>tag</sub> conferred a specific starch adsorption capacity (Guillén et al., 2013) and stability in simulated gastrointestinal conditions

to several proteins (Moreno-Mendieta et al., 2014, submitted). In this work, we demonstrated the immunogenicity potential of the system with IgG levels obtained after the immunization of BALB/c mice by *o.* or *i.n.* routes with the recombinant protein (Fig. 2). Considering that it is possible to modulate the immune response as a function of antigen nature and dose, route of administration, presence of adjuvants and the immunization schedule, we choose a scheme that could favor the adjuvant effect of the immobilization system (starch-fusion protein) and its possible immunomodulatory effect. Under this immunization protocol and conditions, we disclosed that the fusion of Acr to the SBD<sub>tag</sub> and the immobilization of recombinant Acr-SBD<sub>tag</sub> protein on starch microparticles improve the immunogenicity of the Acr protein. We showed that the beginning and type of immune response were affected depending on the treatment (non-immobilized or immobilized) dose and route (Figs. 2 and 3). Oral immunization with immobilized protein led to the induction of earlier IgG and stronger IgG2a responses, which is consistent with results reported for polymer microparticles used in immunization (Elamanchili et al., 2007).

As we previously observed, immobilization onto raw starch stabilizes proteins under gastrointestinal conditions (Moreno-Mendieta et al., 2014, submitted) and this contribution in stability can in consequence allows the protein to reach the sites of immune response induction (located in the gut associated lymphoid tissue (GALT)) and ensure more protein for presentation. Considering that adjuvants should elicit cell-mediated immune responses as well as adequate levels of antibodies of sufficient affinity and of appropriate isotypes, to confer protection against the infectious agent, the adjuvant effect of the immobilization was also observed with the preferential induction of IgG2a (Fig. 3a and b). Some authors have reported that the use of polyacryl starch microparticles for *o.* immunization with consecutive boosters can increase the induction of Th1-dependent antibodies (Wikingson and Sjöholm, 2002). With respect to the doses, mice that received a smaller dose (50  $\mu$ g) of  $\mu$ Acr-SBD<sub>tag</sub> protein by *o.* route reached higher levels of IgG than mice that received 100  $\mu$ g, indicating that when immobilizing the protein, lower doses could be required to evoke the immune response by this route. It has been observed that with high-dose of antigen by oral route, unresponsiveness of T-cell or anergy may be presented (Weiner et al., 2011). However, a rigorous characterization of the response for longer periods of time is necessary to confirm the origin of this response.

In mice that were intranasally immunized, the responses were similar between doses, but IgG antibodies were first induced in mice that received the free protein at just a little higher with 50  $\mu$ g.

This finding suggests the starch could be a hindrance in the nasal mucosae of mice and shows that free protein can resist in a more favorable environment with less acidic pH, lower level of proteolytic enzymes and higher irrigation. However, despite that no stabilizing effect of the microparticles was observed by this route, the immobilization was important for the induction of the IgG2a antibodies (Fig. 3c and d). Therefore, a rigorous standardization of the amount of carrier and protein must be performed to immunize by this route to obtain the desired response. Gutierrez et al. (2002), did not observe a dose/response relation in the serum IgG antibodies that were elicited after three consecutive *i.n.* administrations of BSA microencapsulated in PLG particles at a dosing range from 50 to 200  $\mu$ g. The authors argued for the importance of considering differences between the nasal epithelium and the mechanisms of induction for the immune response by this route.

Finally, we also investigated the levels of specific INF- $\gamma$  released from splenocytes that were purified from  $\mu$ Ac-SBD<sub>tag</sub> immunized mice (Fig. 4) and the levels in lungs after immunization (Fig. 5). It was important to quantify this cytokine because the IgG2a subclass is associated with a Th1 type response and, in turn, a requisite for macrophage activation and cytotoxic T lymphocyte (CTL) production required for protective immunity against intracellular infectious agents, such as *M. tuberculosis*. Consistent with the levels of IgG2a, the spleens of mice immunized by both routes with immobilized protein released a higher amount of INF- $\gamma$  in comparison with those of animals that were immunized with the free protein. This finding is in accordance with previous reports. Stertman et al. (2004) evaluated the effect of the administration route on the immune response of mice that were immunized with modified starch microparticles as an adjuvant, and they also observed that the consecutive administration of these particles by the *o.* route can change the Th1/Th2 balance to increase the impact of the Th1 response. In *i.n.* immunized mice, we observed that starch can be a hindrance that affects the IgG systemic response, but its presence was important to bias a Th1 response, as observed in the IgG2a and INF- $\gamma$  levels obtained after immunizing with immobilized protein. Coucke et al. (2009) used spray-dried starch powders for the *i.n.* immunization of rabbits, and they also obtained strong immune responses, concluding that the mucoadhesive properties of these polymer carriers are essential for modulating the response by using this route. As we could see in the lungs, the immobilization also favored the induction of specific INF- $\gamma$ , both locally and distant to the site of immunization; thus, mice that were orally immunized with immobilized protein had specific induced INF- $\gamma$  levels in their lungs. This finding is consistent with accumulated evidence that respiratory and intestinal immune systems share common mucosae-associated immunological features that are different from those of the systemic immune system, and they can be favorably exploited to design vaccines to administer by these routes (Kunisawa et al., 2008). The finding also coincides with reports indicating that, following lung deposition, both soluble and immobilized antigens can evoke immunological responses in the draining lymph node, but it appears that only microparticulated systems administered by this route significantly induce specific immunological responses in the spleen (Eyles et al., 2003).

As seen in Figs. 3 and 4, the INF- $\gamma$  levels in lungs were slightly higher than the levels of INF- $\gamma$  in supernatants of spleen cells cultured *in vitro*, and also it is observed that the INF- $\gamma$  production from immobilized and free protein immunized mice had contrary results in splenocytes and lung homogenates. Spleens of mice that received the lower doses of  $\mu$ Ac-SBD<sub>tag</sub> by *o.* and *i.n.* routes were more effective to release INF- $\gamma$  *in vitro*, while *in vivo*, the mice that received the higher doses with immobilized protein produced the higher levels of INF- $\gamma$ . This finding, indicative that *in vitro*

restimulation of memory T cells in the spleen is not predictive of *in vivo* stimulation of memory T cells in the lungs, has also been observed by other authors. Todoroff et al. (2013) when evaluating the immunogenicity of the 85A antigen (Ag85A) from *Mycobacterium tuberculosis* with three different mucosal adjuvants administered in lungs, observed the same discrepancy, arguing that following airway deposition of Ag85A, the activated T cells are rapidly mobilized into the airway lumen and recruited T cells produce the INF- $\gamma$ , while *in vitro* T lymphocytes are activated by antigen directly. Also it is known that professional antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells (DCs) may be activated in a different manner following immunization by these routes, not only because there are different subsets of DCs depending on their localization (Villadangos and Schnorrer, 2007) but also because these specialized cells can be differentially activated if biomaterials are used (Reddy et al., 2006).

Because our carrier system is composed of raw starch without chemical modifications or ligands capable of stimulating innate immunity, which in turn contributes to specific immunity, and does not have immune functions as those reported for some carbohydrate-based adjuvants as dextran, mannan or chitin (Petrovsky and Cooper, 2011), the adjuvant effect can be explained, as for other particulate systems, by the antigen-depot effect and by the ability to target antigens for processing by APCs (Audran et al., 2003). The microparticles we used had an appropriate size (between 4 and 5  $\mu$ m) to be efficiently internalized by specialized DCs and consequently evoked immune responses by *o.* and *i.n.* routes. Although starch based microparticles have already been used as antigen delivery systems and as immunization adjuvant by the routes evaluated here, this work represents the first approach using non-covalent immobilization on raw starch microparticles. The simplicity of the immobilization system and the results obtained here justify additional research about its potential applicability as an antigen carrier system and adjuvant and for testing its efficiency in inducing protection. As we also observed the immunogenicity conferred by the fusion with the SBD<sub>tag</sub>, further research is also necessary and justifiable to characterize its adjuvant potential and in consequence to explore novel applications.

## 5. Conclusions

The results demonstrated the potential usefulness of the immobilization system on raw starch microparticles using the SBD<sub>tag</sub> as a carrier and delivery platform. The faster appearance of the IgG response to the recombinant immobilized protein and the preferential induction of IgG2a antibodies indicate the potential adjuvant effect of the system that can be exploited and modulated depending on the antigen or protein fused to the SBD<sub>tag</sub> and the route of administration. Given this finding, and because no extra adjuvants were used, we note its potential utility for the development of subunit vaccines and delivery systems to be used in humans. In addition to its easier preparation, the system offers many advantages related to low-toxicity, low costs and industrial applicability with a broad range of peptides, proteins, antigens or drugs to generate useful subunit vaccines against several diseases.

## Acknowledgments

This work was part of the doctoral thesis of Moreno-Mendieta S. A. in the PhD. Biomedical Sciences program at UNAM and is part of her doctoral dissertation. Moreno-Mendieta S.A. and Guillen D. are indebted to CONACYT (México) for doctoral scholarship 211376 and 177039, respectively. The project was supported by DGAPA UNAM grants 209410, 222113 and Conacyt grant 131149. The authors thank Dr. Antonio Vallecillo for professional support, Biol. Laura Escalante and M.Sc. Beatriz Ruiz for technical assistance.

## References

- Amidi, M., et al., 2007. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, 25, 144–153.
- Audran, R., et al., 2003. Encapsulation of peptides in biodegradable microspheres prolongs their MHC class-I presentation by dendritic cells and macrophages in vitro. *Vaccine*, 21, 1250–1255.
- Balasse, E., et al., 2008. Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *Int. J. Pharm.* 353, 131–138.
- Coucke, D., et al., 2009. Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine*, 27, 1279–1286.
- Csaba, N., et al., 2008. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv. Drug. Del. Rev.* 61, 140–157.
- Demissie, A., et al., 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vacc. Immunol.* 13, 179–186.
- Elamanchili, P., et al., 2004. Characterisation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine*, 22, 2406–2412.
- Elamanchili, P., et al., 2007. Pathogen-mimicking nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother.* 30, 378–395.
- Eyles, J.E., et al., 2003. Immunological aspects of polymer microsphere vaccine delivery systems. *J. Drug Target*, 11, 509–514.
- Guillén, D., et al., 2013. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4141–4148.
- Gutierrez, I., et al., 2002. Influence of dose and immunization route on the serum IgG antibody response to BSA loaded PLGA microspheres. *Vaccine*, 20, 2181–2190.
- Heritage, P.L., et al., 1996. Novel polymer grafted starch microparticles for mucosal delivery of vaccines. *Immunology*, 88, 162–168.
- Kunisawa, J., et al., 2008. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol.* 29, 505–513.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Malyala, P., et al., 2009. Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Adv. Drug Del. Rev.* 61, 218–225.
- Monahan, I.M., et al., 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology*, 147, 459–471.
- Moreno-Mendieta, S.A., et al., 2014. Gastrointestinal stability of proteins immobilized on raw starch microparticles. (submitted for publication).
- Nilsson, J., et al., 1997. Affinity fusion strategies for detection purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Express. Pur.* 11, 1–16.
- Niu, H., et al., 2011. Construction and evaluation of a multistage *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccine candidate Mtb 10.4-HspX. *Vaccine*, 29, 9451–9458.
- O'Hagan, D.T., 1998. Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34, 305–320.
- O'Hagan, D.T., Valiante, N.M., 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 727–735.
- Pepponi, I., et al., 2013. Immune-complex mimics as a molecular platform for adjuvant-free vaccine delivery. *PLoS One*, 8, e60855. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060855.
- Perrie, Y., et al., 2008. Vaccine adjuvant systems enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int. J. Pharm.* 364, 272–280.
- Petrovsky, N., Cooper, P.D., 2011. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev. Vaccines*, 10, 523–537.
- Reddy, S.T., et al., 2006. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 27, 574–579.
- Rosenkrands, I., et al., 2002. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J. Bacteriol.* 184, 3485–3491.
- Roupie, V., et al., 2007. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect. Immun.* 75, 941–949.
- Rydell, N., Sjöholm, I., 2005. Mucosal vaccination against diphtheria using starch microparticles as adjuvant for cross-reacting material (CRM197) of diphtheria toxin. *Vaccine*, 23, 2775–2783.
- Sambrook, J., et al., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1626.
- Singh, S., et al., 2013. Immunogenic potential of latency associated antigens against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.065.
- Stertman, L., et al., 2004. Starch microparticles as an adjuvant in immunisation: effect of route of administration on the immune response in mice. *Vaccine*, 22, 2863–2872.
- Todoroff, J., et al., 2013. Mucosal and systemic immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A following its co-delivery with CpG, MPLA or LTB to the lungs in mice. *PLoS One*, 8, e63344. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063344.
- van de Weert, M., et al., 2000. Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm. Res.* 17, 1159–1167.
- Vajdy, M., O'Hagan, D.T., 2001. Microparticles for intranasal immunization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51, 127–141.
- Villadangos, J.A., Schnorrer, P., 2007. Intrinsic and cooperative antigen presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Rev. Immunol.* 7, 543–555.
- Waeckerle-Men, Y., Groettrup, M., 2005. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 10, 475–482.
- Weiner, H.L., et al., 2011. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 241, 241–259.
- Wikingsson, L.D., Sjöholm, I., 2002. Polyacryl starch microparticles as adjuvant in oral immunisation inducing mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine*, 20, 3355–3363.
- Yuan, Y., et al., 1998. The 16-kDa a-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *PNAS* 95, 9578–9583.
- Zhao, L., et al., 2014. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32, 327–337.
- Zvi, A., et al., 2008. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med. Genom.* 1, 18. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-1-18.