

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



***Análisis y Diseño de Procesos para la
Purificación de DNA Plasmídico***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

Patricia Guerrero Germán

DIRECTOR

Dr. Armando Tejeda Mansir

Mexicali, B. C.

Enero 2009

RESUMEN

La terapia génica y vacunas basadas en DNA son técnicas promisorias para el tratamiento de enfermedades genéticas o adquiridas, así como para la prevención de enfermedades infecciosas. El éxito de estas técnicas utilizando DNA plasmídico (pDNA) como vector, depende del desarrollo de procesos de producción de pDNA a gran escala sustentables y, técnica y económicamente viables.

Los procesos de producción de plásmidos, en general, constan de las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido. La etapa limitante del proceso generalmente es la purificación debido a las estrictas especificaciones para este tipo de productos. Esta etapa consta frecuentemente de más de una operación cromatográfica, ya que son eficientes, reproducibles y completamente escalables, además son obligatorias de acuerdo a las guías de producción emitidas por las agencias reguladoras.

En esta investigación se realizaron estudios de modelación y simulación del proceso cromatográfico, tanto en sistemas por lotes como en columna. En ambos casos se utilizaron modelos de transporte para describir y analizar el comportamiento de cada sistema. El sistema de ecuaciones diferenciales del modelo de cada caso fue resuelto utilizando el método numérico de líneas (*MOL*) en una plataforma MATLAB. Con la finalidad de validar la solución numérica que se obtuvo en cada caso se utilizaron datos experimentales de la literatura como sistemas modelo. En la cromatografía por lotes el sistema modelo fue la adsorción de β -galactosidasa en anti- β

galactosidasa inmovilizada en partículas de sílice porosa, y en la cromatografía en columna se utilizó la adsorción por intercambio iónico de pCl-DNA en membranas. Se realizaron análisis paramétricos para estudiar la influencia de los principales parámetros de operación en ambos sistemas. Este enfoque resultó ser una forma útil para predecir el comportamiento de los procesos cromatográficos, así como para lograr un mejor entendimiento de los mecanismos fundamentales responsables de las bioseparaciones.

Parte esencial de esta investigación fue el desarrollo dos nuevos bioprocesos para la producción de pDNA, utilizando *E. coli*, como célula hospedera del plásmido pVAX1-LacZ, que fue propagada tanto a nivel matraz como a nivel de bioreactor utilizando medio de cultivo semisintético.

El primer bioproceso por cromatografía frontal de intercambio iónico en membranas (FAEMC por sus siglas en inglés) desarrollado utiliza sólo operaciones de membrana en las etapas de recuperación intermedia y purificación final. En la recuperación intermedia, la separación del DNA plasmídico del RNA en el lisado se efectuó por medio de una filtración de flujo tangencial en membrana hueca, en serie con una operación cromatográfica en membranas de intercambio iónico operando en modo frontal. La purificación final fue realizada por medio de una segunda operación de cromatografía en membranas de intercambio iónico también operada en modo frontal. A través de este proceso se logró incrementar 28 veces la pureza del plásmido en solución y remover más del 97 % del RNA presente en el lisado, incrementando la concentración de plásmido presente en el lisado inicial 1.3 veces.

El segundo bioproceso proceso FAEMC combinado con cromatografía de interacción hidrofóbica (FAEMC-HIC por sus siglas en inglés) se llevó a cabo utilizando operaciones de membrana en la recuperación intermedia y una operación de cromatografía de interacción hidrofóbica por elución en la purificación final. A través de este proceso se logró incrementar 30 veces la pureza del

plásmido en solución y remover más del 99 % del RNA presente en el lisado. Sin embargo, la concentración de DNA plasmídico que había en el lisado inicial disminuyó 3 veces.

Considerando los resultados obtenidos, se puede establecer que tanto el grado de purificación como la remoción de impurezas logrados mediante ambos procesos son similares. El bioproceso FAEMC ofrece las ventajas de no utilizar agentes precipitantes, que para la producción a gran escala resultan caros y problemáticos desde el punto de vista ambiental.

El uso de membranas ofrece muchos beneficios incluyendo que son desechables, mayor capacidad dinámica de adsorción y procesos linealmente escalables. Para incrementar la capacidad de producción, además del uso de membranas grandes, es posible el uso de unidades múltiples en una combinación de flujo en paralelo y en serie. Este enfoque puede permitir una pre-purificación eficiente para el pDNA en escala de kilogramos operando a altas velocidades de flujo.

ABSTRACT

The gene therapy and DNA vaccination are promising approaches for the treatment of genetic or acquired diseases and for the prevention infectious diseases. The success of these techniques of using plasmid DNA vector (pDNA), depends on the development of large scale pDNA production processes sustainable and, technical and economically viable.

In general, plasmid production processes include fermentation, primary recovery, intermediate recuperation and final purification stages. The bottle neck processes stage is the final purification due to the strict specifications for this product type. This stage often include more than one chromatographic operation, since they are efficient reproducible and complete scalable, furthermore they are required according to the production guides released by the regulatory agencies.

In this research, modeling and simulation studies of the chromatographic process were made in batch and column systems. Transport models were used to describe the performance of both systems. The system of differential equations of model for each case was solved using the numerical method of lines (*MOL*) in a MATLAB platform. The numerical solutions were validated using experimental data from literature. The adsorption of β -galactosidase onto anti β -galactosidase immobilized on porous silica was used as the batch model system. The frontal adsorption of pCI-DNA on ion-exchange membranes was used for the column studies.

Parametric analyses were made to show the influence of the main operation parameters on both processes. This approach was useful to predict the performance of the chromatography processes and to get better understanding of the fundamental mechanisms responsible for the bio-separations.

An essential achievement of this research was the development of two new bioprocesses for the production of pDNA, using *E. coli* as host of pVAX1-LacZ, cultured in shake flask and bioreactor using semisynthetic culture medium.

The first developed bioprocess (FAEMC) uses only membrane operations in the intermediate recovery and final purification stages. In the intermediate recovery, the separation of the pDNA from RNA in the lysate was conducted using hollow-fiber tangential flow filtration in series with an anion-exchange membrane column operating in frontal mode. The final purification stage was conducted using a second anion-exchange membrane column also operated in frontal mode. At the end of the processes plasmid purity was increased 28-fold and more than 97 % of de RNA in the lysate was removed.

The second bioprocess (FAEMC-HIC) was conducted using membrane operations in the intermediate recovery stage and a hydrophobic interaction chromatography operation in the final purification stage. At the end of the processes plasmid purity was increased 30-fold and more than 99 % of de RNA in the lysate was removed. However, pDNA concentration decreased 3 times.

In view of the above results, it may state that both purity degree and impurity removed were similar for the two processes. The bioprocesses FEAMC offers advantages since it does not uses precipitant agents, which are expensive and troublesome for the environment.

Membrane device offers many benefits, including disposability, an increased binding capacity and scale-up linearly. In order to increase production capacity in addition to using a larger membrane

device it is possible to use multiple units in a combination of parallel and series flow patterns. This approach may allow an efficient capture step for pDNA on the kilogram scale with high throughputs.

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad de Sonora* y a la *Universidad Autónoma de Baja California* por todo el apoyo otorgado en la realización de mis estudios, a través del *Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia*, y del *Instituto de Ingeniería*.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*, y a la *Dirección de Desarrollo Académico* de la *Universidad de Sonora*, por el apoyo convenido a través de la beca nacional.

A la *Dirección de Desarrollo Académico*, la *División de Ingeniería* y el *Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia*, de la *Universidad de Sonora*, por el apoyo brindado para la realización de la estancia de investigación en el *Instituto Superior Técnico*, en Lisboa, Portugal.

Al *Instituto Superior Técnico* de la *Universidad Técnica de Lisboa*, por el apoyo y facilidades otorgadas en la realización de una parte de la experimentación, en especial al Dr. D. Miguel F. Prazeres y a la asistencia técnica de Ana Gabriela Gomes.

Al *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*, *Departamento de Biotecnología y Bioingeniería*, en especial al Dr. Jaime Ortega López, por su disposición y apoyo en la realización de una parte de la investigación.

Deseo manifestar en forma especial, mi agradecimiento a mi Director de tesis, Dr. Armando Tejeda Mansir, de la *Universidad de Sonora*, por su apoyo, confianza, enseñanza y excelentes aportaciones, así como el tiempo dedicado en la dirección de mi investigación.

A la Dra. Rosa María Montesinos Cisneros, de la *Universidad de Sonora*, por su valiosa contribución, enseñanza y apoyo en la realización de mi investigación.

Al Dr. Roberto Guzmán, de la *Universidad de Arizona*, a la Dra. Nohemí Gámez Meza, de la *Universidad de Sonora*, la Dra. Mónica Carrillo Beltrán y la Dra. Gisela Montero Alpírez, de la *Universidad Autónoma de Baja California*, por sus valiosas observaciones y aportaciones dirigidas a mejorar este trabajo.

Al Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García, Jefe del *Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia* y Coordinador de Enlace del Programa de *Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MYDCI)*, Nodo UABC-USON, por todo el apoyo y facilidades otorgadas en las gestiones académicas y administrativas, desde la *Universidad de Sonora*, así como el apoyo administrativo del M.C. Jesús Leonel Servín y la Sra. Adela Corona.

Al Dr. Benjamín Valdez Salas, Director del *Instituto de Ingeniería* y a la Dra. Sara Ojeda Benítez, Coordinadora del *MYDCI*, por su disposición y apoyo en los trámites académicos y administrativos, desde *Universidad Autónoma de Baja California*, del mismo modo a la Sra. Dolores Delgadillo, por el apoyo administrativo.

También deseo agradecer a Onofre y Tere, su amistad en este camino recorrido. De igual forma a Glenda, Benjamín, Sergio, Ángel, Jazmín, Juan e Iracema, por hacerme gratos los momentos difíciles.

DEDICATORIA

*Por sobre todas las cosas doy Gracias a Dios,
que con su presencia, me ha dado
la fortaleza para llegar
al final de esta meta.*

*Con Amor
A Jesús Leobardo,
por su apoyo, confianza, comprensión
en todo momento, dentro y fuera de México.*

*A Patricia Jazmín y Juan Arturo, con Amor
por ser dos mágicas razones que
me impulsan a continuar en el camino.*

A mi mamá con Amor

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	<i>I</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>IV</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>VII</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>IX</i>
<i>ÍNDICE</i>	<i>X</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>XIII</i>
<i>LISTA DE TABLAS</i>	<i>XVIII</i>
<i>NOMENCLATURA</i>	<i>XIX</i>
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 OBJETIVOS	3
ANTECEDENTES	4
2.1 TERAPIA GÉNICA Y VACUNACIÓN	5
2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL DNA PLÁSMIDICO	7
2.3 PRODUCCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	13
2.3.1 Fermentación	13
2.3.2 Recuperación primaria	15
2.3.3 Recuperación Intermedia	17
2.3.4 Purificación final	19

2.4	SIMULACIÓN DE PROCESOS	24
2.4.1	Procesos de adsorción por lotes	26
2.4.2	Procesos cromatográficos en columna de membranas de intercambio iónico	26
MATERIALES Y MÉTODOS		28
3.1	MATERIALES	28
3.2	EQUIPO	30
3.3	SIMULACIÓN DE PROCESOS	32
3.3.1	Descripción del modelo de transporte de adsorción por lotes	32
3.3.2	Descripción del modelo de transporte de cromatografía en columna de membranas	35
3.3.3	Solución numérica de los modelos	39
3.4	PROCESO BASE DE PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDO	47
3.4.1	Fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α (pVAX1-LacZ)	48
3.4.2	Recuperación primaria	48
3.4.3	Recuperación intermedia	49
3.4.4	Purificación final	50
3.5	PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDO POR CROMATOGRAFÍA FRONTAL DE INTERCAMBIO IÓNICO EN MEMBRANAS	54
3.5.1	Fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α (pVAX1-LacZ)	54
3.5.2	Recuperación primaria	56
3.5.3	Recuperación intermedia	56
3.5.4	Purificación final	61
3.6	PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA	62
3.6.1	Fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α (pVAX1-LacZ), recuperación primaria y recuperación intermedia	63
3.6.2	Purificación final	63
3.7	ANÁLISIS DE MUESTRAS	65
3.7.1	Electroforesis en gel de agarosa	65
3.7.2	Pureza y concentración de plásmido por HIC-HPLC	66

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
4.1 SIMULACIÓN DE PROCESOS	68
4.1.1 Solución numérica del modelo de transporte de adsorción por lotes	68
4.1.2 Solución numérica del modelo de transporte de cromatografía en columna de membranas	74
4.2 PROCESO BASE DE PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDO	82
4.2.1 Fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α (pVAX1-LacZ)	82
4.2.2 Recuperación primaria	82
4.2.3 Recuperación intermedia	84
4.2.4 Purificación final	84
4.3 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDO POR CROMATOGRAFÍA FRONTAL DE INTERCAMBIO IÓNICO EN MEMBRANAS	87
4.3.1 Fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α (pVAX1-LacZ)	87
4.3.2 Recuperación primaria	90
4.3.3 Recuperación intermedia	91
4.3.4 Purificación final	103
4.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLÁSMIDO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA	107
4.4.1 Fermentación de <i>E. coli</i> DH5 α (pVAX1-LacZ), recuperación primaria y recuperación intermedia	107
4.4.2 Purificación final	107
 CONCLUSIONES	 110
 REFERENCIAS	 113
 ANEXO A	 124
 ANEXO B	 125
 ANEXO C	 127

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. (a) Gel de electroforesis en agarosa al 0.8 % experimental, línea 1: marcador Hyperladder 1; línea 2: una muestra de pVAX-LacZ (6 050 kb) purificado por el método base conteniendo tres isoformas. (b) esquema de las isoformas de pDNA, OC = circular abierto, L = lineal de longitud completa y SC = súperenrollado.	9
2. Micrografías de transmisión de electrones de multímeros de plásmidos: (A) Concatémeros dimérico y trimérico en la forma circular abierta; (B) Catenarios con una forma súperenrollada y una circular abierta; (C) Catenarios relajados y (D) concatémeros súperenrollados. Fuente Smith <i>et. al.</i> , (2007).	11
3. Mapa del plásmido comercial pVAX1-LacZ (6050 pares de bases), presentando las secuencias regulatorias y genes más importantes.	12
4. Proceso de producción genérico de pDNA.	14
5. Comparación de los sitios de adsorción en las partículas y membranas de intercambio iónico.	22
6. Modelo físico del sistema de cromatografía en un tanque agitado.	32
7. Sistema conceptual para el desarrollo del modelo: A) columna de membranas; B) reactor tipo tanque agitado (CSTR); C) reactor de flujo tapón (PFR).	36
8. Diagrama de la solución por el método de líneas (<i>MOL</i>) para los modelos de transporte en una plataforma MATLAB.	41
9. Diagrama de bloques del Proceso Base para la producción de plásmido. Adaptado de Diogo <i>et al.</i> , (2001).	47
10. Arreglo experimental de columnas cromatograficas empacadas con Phenyl Sepharose 6 fast flow, operadas por gravedad.	51

-
11. Proceso HIC para purificación de pDNA. *SAm* = sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl pH8. *Tris* = Tris 10 mM /HCl pH 8. 51
 12. Proceso SEC para purificación de pDNA. *SAm* = sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl pH 8. *Tris* = Tris 10 mM /HCl pH 8. 53
 13. Diagrama de bloques del Proceso FAEMC para la producción de plásmido. 54
 14. Fermentador de 3.5 litros Biostat MD. 55
 15. (a) cartucho de fibras huecas con membranas de polisulfona. (b) Sistema experimental (Midjet benchtop) para filtración de flujo tangencial. 57
 16. Diagrama de flujo del sistema de diafiltración de flujo tangencial. 57
 18. (a) Columna de Pharmacia Amersham Biosciences, empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q; (b) Columna de cromatografía de intercambio iónico conectada al sistema Äkta Purifier. 59
 17. Sistema Äkta Purifier acoplado a una computadora para registro y procesamiento de datos. 59
 19. Diagrama de bloques del Proceso FAEMC-HIC para la producción de Plásmido. 62
 20. Columna de interacción hidrofóbica, pre-empacada con 1 mL de resina Phenyl Sepharose 6 fast flow. 64
 21. (a) Cámara de electroforesis acoplada a la fuente de poder (b) Certificado del marcador de peso molecular Hyperladder 1 (HL1). 65
 22. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada lisado alcalino). 67
 23. Perfil de concentración de adsorción en lotes de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa inmovilizada en una matriz de sílice porosa. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (o) Datos experimentales (Arve y Liapis, 1987). (—) Solución MOL del modelo de transporte de cromatografía por lotes en una plataforma MATLAB. (- - -) Solución del modelo de parámetros agrupados. 69
 24. Perfil de concentración de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa inmovilizada en una matriz de sílice porosa. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (a) Perfiles de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (b) Perfiles de concentración adimensional de la proteína en el adsorbente. 70

- 25.** Influencia del diámetro de la partícula. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (a) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el seno del líquido. (b) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el adsorbente. (c) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (d) Ampliación de un área del perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (A) -40%, (B) -20%, (C) $d_p = 150 \mu\text{m}$, (D) +20%, (E) +40%. 72
- 26.** Influencia de la concentración inicial. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (a) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el seno del líquido. (b) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el adsorbente. (c) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (d) Ampliación de un área del perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (A) -40%, (B) -20%, (C) $c_0 = 0.0158 \text{ mg/mL}$, (D) +20%, (E) +40%. 73
- 27.** Efecto de la concentración de entrada en el sistema de BTCs obtenidos a flujo de $F = 0.13 \text{ mL/min}$: (a) $c_0 = 0.1 \text{ mg/mL}$, (b) $c_0 = 0.2 \text{ mg/mL}$, (c) $c_0 = 0.5 \text{ mg/mL}$. (\cdots , $---$, $-$) valores ajustados. 74
- 28.** Efecto del flujo en el sistema de BTCs obtenidos a la concentración de entrada de $c_0 = 0.1 \text{ mg/mL}$: (a) $F = 0.13 \text{ mL/min}$, (b) $F = 0.26 \text{ mL/min}$, (c) $F = 0.52 \text{ mL/min}$. (\cdots , $---$, $-$) valores ajustados. 75
- 29.** La influencia de la concentración de entrada de plásmido en el comportamiento de la curva de ruptura, se muestra la variación de la concentración adimensional de plásmido en el seno del líquido c/c_0 , y de la concentración adimensional de plásmido en la membrana, q/q_m , con la longitud de la columna adimensional, Z_L , y el tiempo real, t . (a1 y b1) $c_0 = 0.1 \text{ mg/mL}$, (a2 y b2) $c_0 = 0.2 \text{ mg/mL}$ y, (a3 y b3) $c_0 = 0.5 \text{ mg/mL}$. 80
- 30.** La influencia del flujo de entrada en el comportamiento de la curva de ruptura, se muestra la variación de la concentración adimensional de plásmido en el seno del líquido c/c_0 , y de la concentración adimensional de plásmido en la membrana, q/q_m , con la longitud de la columna adimensional, Z_L , y el tiempo real, t . (a1 y b1) $F = 0.13 \text{ mL/min}$, (a2 y b2) $F = 0.26 \text{ mL/min}$ y, (a3 y b3) $F = 0.52 \text{ mL/min}$. 81
- 31.** Análisis por electroforesis de muestras de pDNA purificado y lisado clarificado. OC = variante de pDNA circular abierto, SC = variante de pDNA súperenrollado. 84
- 32.** Análisis por electroforesis de muestras de pDNA purificado. OC = variante de pDNA circular abierto, SC = variante de pDNA súperenrollado. 85
- 33.** Cromatograma analítico HIC-HPLC de plásmido purificado por el Proceso Base. La muestra de pDNA fue diluida 1:5 en bufferTE. La línea punteada indica el porcentaje del buffer de elución. 86

34. Curva de crecimiento celular la cepa de *E.coli* conteniendo pVAX1-LacZ. (•) Densidad óptica 600 nm datos experimentales; (—) Curva de crecimiento ajustada por la ecuación logística con $\mu = 0.74 \text{ h}^{-1}$ 87
35. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la fermentación, lisadas y clarificadas. OC = variante de pDNA circular abierto, SC = variante de pDNA súperenrollado. 89
36. Concentración de pDNA en las muestras de cultivo lisadas, estandarizadas utilizando un índice de masa de 30, tomadas durante la fermentación de *E.coli* conteniendo pVAX1-LacZ. Determinación hecha por HIC-HPLC. 89
37. Porcentaje de pureza de pDNA en las muestras de cultivo lisadas, estandarizadas utilizando un índice de masa de 30, tomadas durante la fermentación de *E.coli* conteniendo pVAX1-LacZ. Determinación hecha por HIC-HPLC. 90
38. Cromatogramas analíticos por HIC-HPLC de: (a) lisado clarificado diluido 1:5, de [pDNA] = $5.9 \mu\text{g/mL}$ y pureza 2.6 %; (b) retenido-1 diluido 1:5, de [pDNA] = $7.0 \mu\text{g/mL}$ y pureza 4.7 %. La línea punteada indica el porcentaje de buffer de elución. 92
39. Perfil de adsorción, lavado y elución en una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico, usando flujo de entrada de 0.5 mL/min de retenido-1 (1:5), con [pDNA] = $11.75 \mu\text{g/mL}$ y conductividad 2.3 mS/cm , corrida A. 94
40. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida A. 95
41. Efecto de la concentración de pDNA en la alimentación, sobre perfil de adsorción, lavado y elución. Alimentación de retenido-1: (a) [pDNA] = $11.75 \mu\text{g/mL}$, corrida B; (b) [pDNA] = $7.05 \mu\text{g/mL}$, corrida C. 96
42. Gel de electroforesis de los volúmenes colectados durante la corrida B. 97
43. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida C. 98
44. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 12.5 mL de solución de retenido-1 de concentración de pDNA de $7.05 \mu\text{g/mL}$, corrida D. 99
45. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida D. 100
46. Cromatogramas analíticos HIC-HPLC del retenido-1 alimentado durante la corrida D, diluido de concentración de pDNA de $7.0 \mu\text{g/mL}$, pureza 4.7 % y las fracciones de elución B5, B4, B3 y B2. 101
47. Perfiles de adsorción, lavado y elución en una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico usando un flujo de 0.5 mL/min de retenido-1 diluido 1:5 de concentración de pDNA de $7.05 \mu\text{g/mL}$, en las corridas D, E, F y G. 102

-
- 48.** Cromatogramas analíticos HIC-HPLC del retenido-1, diluido de concentración de pDNA $7.05 \mu\text{g/mL}$, pureza 4.69 % y retenido-2, sin diluir de concentración de pDNA de $5.84 \mu\text{g/mL}$, pureza 51 %. 103
- 49.** Perfiles de adsorción, lavado y elución obtenido en una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico, usando un flujo de 0.5 mL/min de solución de retenido-2 de concentración de pDNA de $5.84 \mu\text{g/mL}$, corrida *H*. 104
- 50.** Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida *H*. 105
- 51.** Cromatogramas analíticos HIC-HPLC de muestras de soluciones en las diferentes etapas del proceso de purificación por AEC: (a) lisado clarificado diluido, de $[\text{pDNA}] = 5.95 \mu\text{g/mL}$ y pureza 2.64 %; (b) retenido-1 diluido, de $[\text{pDNA}] = 7.05 \mu\text{g/mL}$ y pureza 4.69 %; (c) fracción B5 de elución en la pre-purificación, sin diluir de $[\text{pDNA}] = 5.88 \mu\text{g/mL}$ y pureza 21.87 %; (d) retenido-2 sin diluir, $[\text{pDNA}] = 5.84 \mu\text{g/mL}$ y pureza 51.00 % y (e) fracción de elución de purificación sin diluir, $[\text{pDNA}] = 8.03 \mu\text{g/mL}$ y pureza 73.45 %. La línea punteada indica el porcentaje de buffer de elución. 106
- 52.** Perfiles de lavado y elución obtenido en una columna pre-empacada con 1 mL de resina Phenyl Sepharose 6 fast flow usando un flujo de 0.5 mL/min de una solución de retenido-2 acondicionado con sulfato de amonio, de concentración de pDNA de $6.25 \mu\text{g/mL}$, corrida *I*. 108
- 53.** Gel de electroforesis de las muestras de volúmenes colectados durante la cromatografía por elución de 0.5 mL de solución de retenido-2 acondicionado con sulfato de amonio. 109
- BI.** Curva estándar para pVAX-LacZ. 126

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Composición típica de lisado de células bacterianas y características fisicoquímicas de los principales componentes. Adaptado de Diogo <i>et al.</i> , (2005), Prazeres y Ferrerira, (2004) y Stadler <i>et al.</i> , (2004).	16
2. Características de las técnicas cromatográficas más usada en purificación de plásmido. Adaptado de Diogo <i>et al.</i> (2005).	20
3. Valores de los parámetros utilizados en los estudios de simulación del sistema de adsorción de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa inmovilizada en sílice porosa (Arve y Liapis, 1987).	42
4. Valores de los parámetros utilizados en los estudios de simulación de cromatografía frontal de pCI DNA en una columna de membranas de intercambio iónico (Montesinos-Cisneros <i>et al.</i> , 2007).	45
5. Valores de los parámetros ajustados usados en la simulación de las curvas de ruptura.	76
6. Condiciones utilizadas en las corridas A, B, C, D, E, F y G de pre-purificación por FAEMC.	93
7. Condiciones utilizadas en la corrida H de purificación por AEC.	103

NOMENCLATURA

AC	Cromatografía de afinidad
AEC	Cromatografía de intercambio iónico
ATPS	Sistemas acuosos en dos fases
AU	Unidad de absorbancia
BTC	Curva de ruptura
c	Concentración de soluto en el seno del líquido
c_0	Concentración inicial de soluto en el seno del líquido
D	Diámetro de la membrana
Da	Daltons
D_{AB}	Difusividad molecular
D_{ax}	Coefficiente de dispersión axial
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
F	Flujo
FAEMC	Cromatografía frontal de intercambio iónico en membranas
gDNA	DNA genómico
HIC	Cromatografía por interacción hidrofóbica
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
k_{-1}	constante cinética de adsorción
k_{-1}	constante cinética de desorción
k_{o1}	Constante cinética agrupada
K_d	Constante de disociación
k_f	Coef. de transf. de masa en película
L	Longitud de la columna
L-pDNA	DNA plasmídico lineal
M	Molar
MOL	Método de líneas
NMWL	Límite nominal de peso molecular
OC-pDNA	DNA plasmídico circular abierto
pb	Pares de bases
pDNA	DNA plasmídico
PM	Peso molecular
q	Concentración del soluto en el adsorbente
q_m	Capacidad máxima del adsorbente
r	Distancia radial en la partícula

r_m	Radio de la partícula
RPLC	Cromatografía de fase reversa
SC-pDNA	DNA plasmídico superenrollado
SDC	Curva de dispersión del sistema
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
t	tiempo
TAE	Buffer Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM
TE	Buffer Tris 10 mM/HCl EDTA 1 mM
TFF	Filtración de flujo tangencial
UV	Ultravioleta
V	Volumen de solución inicial (en tanque agitado)
V	Volumen del lecho (en columna de membranas)
v	Volumen de absorbente (de lecho)
V_c	Volumen de cultivo
V_{CSTR}	Volumen CSTR
V_{ext}	Volumen exterior
V_i	Volumen de inóculo
V_{PFR}	Volumen PFR
V_{sis}	Volumen del sistema
vvm	Volumen de aire por volumen de medio
X	Concentración celular
X_∞	Concentración máxima de la biomasa
X_0	Concentración inicial de la biomasa
z	Distancia axial en la columna

Letras griegas

ε	Porosidad de la membrana
ε_i	Porosidad de partícula
ε_b	Volumen solución / Volumen total
μ	Velocidad específica de crecimiento
v	Velocidad intersticial
τ	Tiempo de residencia en el sistema de cromatografía

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

En años recientes la purificación de las moléculas de DNA plasmídico (pDNA de sus siglas en inglés) se ha convertido en un procedimiento común en laboratorios e industria. Inicialmente, como una herramienta de biología molecular, debido a la introducción y expansión de la tecnología de DNA recombinante, incrementando así la demanda de las técnicas para el aislamiento pDNA a escala laboratorio. Además, los desarrollos más recientes en investigaciones terapéuticas tales como el uso de la terapia génica y vacunas de DNA han fomentado el desarrollo de los procesos novedosos para la purificación de pDNA a gran escala (Diogo *et al.*, 2005; Stadler *et al.*, 2004; Prather *et al.*, 2003).

Las vacunas basadas en genes pueden producir inmunidad para enfermedades contagiosas para las cuales no existen vacunas aún, o su costo es muy elevado, como la malaria, hepatitis B, influenza y SIDA. Mientras que la terapia génica consiste en la introducción de uno o más genes funcionales, como una forma de prevención, tratamiento o cura de defectos genéticos tales como la hemofilia y la fibrosis quística, o enfermedades adquiridas como el cáncer, problemas vasculares

y desórdenes neurológicos (Stadler *et al.*, 2004). Se considera que las vacunas de esta nueva generación serán más baratas, fáciles de producir y administrar que las vacunas convencionales.

Para satisfacer las estrictas regulaciones clínicas de estos productos, el material debe estar disponible como solución homogénea de pDNA altamente purificado en forma circular cerrada covalentemente unida y súperenrollado (Diogo *et al.*, 2005).

El proceso de purificación del pDNA incluye, generalmente la etapa de cultivo de la célula hospedera, *Escherichia coli*, seguido por la lisis alcalina de la biomasa, continuando con las etapas de clarificación y concentración, (Freitas *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2008) y finalmente uno o varios pasos de la cromatografía para su purificación (Diogo *et al.*, 2005). Existen varios protocolos y kits comerciales para la purificación de plásmido a escala laboratorio. Sin embargo no son adecuados para purificación a gran escala, debido a que utilizan materiales tóxicos y/o procesos difíciles de escalar (Duarte *et al.*, 2007).

Un pre-requisito para el éxito de terapias basadas en el uso de pDNA es el desarrollo de procesos productivos genéricos y costo-efectivos (Freitas *et al.*, 2006; Stadler *et al.*, 2004). En la síntesis de procesos, las etapas de alta resolución como la cromatografía son consideradas esenciales para alcanzar los requerimientos de alta pureza para este tipo de productos. De las diferentes formas de cromatografía disponibles (Diogo *et al.*, 2005), la cromatografía de intercambio iónico puede considerarse de las más ampliamente utilizadas (Tiainen *et al.*, 2007) y la cromatografía por interacción hidrofóbica también se ha utilizado con éxito a escala laboratorio (Diogo *et al.*, 2001; 2000).

1.2 Justificación

Actualmente existe un interés real de investigar el desarrollo de los procesos de recuperación y purificación del pDNA por la demanda proyectada para sus aplicaciones terapéuticas y por la oportunidad que implica que más del 90% de los procesos en desarrollo se encuentran en las Fase I/II de pruebas clínicas de laboratorio.

1.3 Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es investigar los aspectos fundamentales y de aplicación de los procesos para la purificación de plásmido por medio de cromatografía de intercambio iónico (AEC de sus siglas en inglés) en columna de membranas perfusivas y cromatografía por interacción hidrofóbica (HIC de sus siglas en inglés).

Objetivos particulares

Los objetivos particulares de este trabajo son:

1. Realizar estudios de simulación y análisis paramétrico de sistemas de adsorción en lotes y cromatografía en columna mediante *Método de Líneas*, en una plataforma de *MATLAB*.
2. Establecer el Proceso Base determinado en la literatura, para la obtención de plásmido purificado a escala laboratorio.
3. Establecer un proceso para la producción de plásmido purificado por medio de cromatografía de intercambio iónico en columna de membranas perfusivas.
4. Establecer un proceso para la producción de plásmido purificado por medio de cromatografía por interacción hidrofóbica.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

El conocimiento completo del genoma humano, combinado con el entendimiento cada vez mayor del papel de varios genes relacionados a ciertas enfermedades, ha colocado a la terapia génica y la vacunación entre los avances biotecnológicos más inquietantes y prometedores (Manthorpe *et al.*, 2005; Prazeres y Ferrerira, 2004). Ambos métodos están basados en los mismos principios, en la introducción de genes en células humanas que codifican para una proteína ausente o defectuosa (en el caso de terapia génica) o para una proteína antigénica (en el caso de vacunas de DNA) (Duarte *et al.*, 2007; Kelly, 2003; Prazeres *et al.*, 2001).

La terapia génica se puede ver como una forma de producir proteínas usando las propias células del paciente como mini-biorreactores. La terapia génica promete substituir un gene faltante o defectuoso dentro de las células del paciente y complementar el organismo, con la producción de las proteínas que pueden prevenir o tratar la enfermedad (Manthorpe *et al.*, 2005; Prazeres y Ferrerira, 2004).

Los genes terapéuticos pueden ser transportados por varios tipos de vectores virales, sin embargo los vectores pDNA son considerados más seguros, simples de usar y fáciles de producir a gran escala (Prazeres *et al.*, 2001). Consecuentemente el uso de vectores pDNA en tratamientos preclínicos y clínicos de terapia génica y vacunas de DNA ha incrementado la necesidad de producción de grandes cantidades de pDNA, altamente puro, es decir con grado terapéutico o farmacéutico (Diogo *et al.*, 2005).

2.1 Terapia Génica y Vacunación

Por muchos años los virus inactivados fueron el vehículo ideal para transportar el material genético a las células, sin embargo los efectos secundarios como reacciones inmunogénicas y activación de oncogenes han puesto en discusión seriamente esta opción (Sun *et al.*, 2003).

En este contexto, los vectores no-virales han sido considerados una alternativa a los vectores virales desde los primeros estudios describiendo la inyección directa de DNA plásmidico (pDNA) en ratones, seguida por la expresión del gen asociado *in vivo* (Wolff *et al.*, 1990, Yang *et al.*, 1990). En 1993 fue demostrado por primera vez que los ratones inyectados con un pDNA que codificaba un antígeno viral podrían desarrollar las respuestas humorales y celulares (Ulmer *et al.*, 1993). Este descubrimiento encaminó al desarrollo de vacunas basadas en DNA.

Las vacunas basadas en DNA, aunque son más seguras y más fáciles de producir, carecen de la eficacia y la especificidad de sus contrapartes virales. Esto significa que para obtener el mismo efecto terapéutico, se requiere una gran cantidad de material genético para ser administrado al paciente, en el orden de varios miligramos por dosis (Duarte *et al.*, 2007, Listner *et al.*, 2006).

Como una forma de incrementar la eficiencia de la transfección, los plásmidos pueden usarse “desnudos” o asociados con agentes como lípidos catiónicos (lipofección), péptidos, dendrímeros, polímeros o a una superficie celular receptora (Sun *et al.*, 2006). La administración al paciente

puede hacerse por varios métodos físicos, tales como: a) inyección del DNA “desnudo”, el plásmido en una solución salina se inyecta directamente (intramuscular o intratumoral); b) pistola de genes, micropartículas de oro o tungsteno recubren el plásmido y se inyecta en la piel por medio de una corriente de helio de alta presión; c) co-adyuvación, el plásmido se combina con agentes de transfección que amplifican sus propiedades y se inyecta; d) electroporación o choque osmótico, acoplado a una corriente eléctrica se facilita la administración del plásmido directo a una abertura pequeña en las capas exteriores de la piel o mucosa (Schleef y Schmidt, 2004; Prazeres *et al.*, 2001; Mountain, 2000; Wagner, 1999; Ledley *et al.*, 1995).

2.2 Características Fisicoquímicas del DNA Plásmidico

Los plásmidos son biosintetizados por replicación autónoma de estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo DH5 α) hospedando el plásmido deseado. *E. coli* es una bacteria con una historia de uso seguro en la bio-industria como productora de muchas proteínas recombinantes. Las características peculiares de las moléculas de pDNA tales como su forma (no-globular y enrollada), flexibilidad y alto peso molecular causan problemas específicos para el desarrollo de procesos de producción del plásmido (Prazeres *et al.*, 1999; 2001).

Los plásmidos son moléculas de DNA de doble cadena, unidas covalentemente por puentes de hidrógeno, que pueden existir con diferentes conformaciones topológicas (Sinden, 1994). Son distintas del genoma bacterial normal y no esenciales para la sobrevivencia de la célula bajo condiciones no selectivas. Una sola célula bacterial podría replicar una sola copia (en el caso de plásmidos grandes) o más de 500 copias por célula (en el caso de plásmidos de alto número de copias como los miembros de la serie pUC) (Manthorpe *et al.*, 2005).

Cada cadena de una molécula de pDNA es un polímero lineal de desoxiribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Los grupos fosfato de la cadena están negativamente cargados a pH > 4 (Prazeres *et al.*, 2001). El giro de las dos cadenas antiparalelas de DNA alrededor una de otra y alrededor de un eje común origina la clásica estructura de doble hélice derecha, establecida por Watson-Crick. Esta doble hélice está constituida por los puentes de hidrógeno entre los pares de bases AT (Adenina – Tiamina) y GC (Guanidina – Citocina) y mínimamente por las fuerzas de empaquetamiento (Sinden, 1994). La terminación de las dos cadenas de DNA están unidas covalentemente, formando un anillo cerrado. Los grupos aromáticos de las bases nitrogenadas están empaquetados dentro de la doble hélice, lo cual provee un carácter hidrofóbico (Diogo *et*

al., 2000). Estas características del plásmido son importantes cuando se seleccionan las técnicas más apropiadas para promover su recuperación y purificación.

Los plásmidos son moléculas grandes, comparadas con las proteínas, el peso molecular es igual al número de pares de bases multiplicado por 660 Da, que es peso molecular promedio de un par de bases. El tamaño varía en el rango de dos a cientos de kilopares de bases (kbp por sus siglas en inglés) (Schleef y Schmidt, 2004), en el caso de aplicaciones para terapia génica, los plásmidos son del orden de 4 a 20 kbp (Summers, 1996).

El eje de la hélice del pDNA puede estar enrollado en el espacio, formando una estructura de alto orden llamada pDNA superenrollado (SC-pDNA), (Summers, 1996), que es la estructura topológica más compacta y se supone que es más activa (Schleef y Schmidt, 2004).

Cuando se extrae el DNA plasmídico de un cultivo bacterial, y se aplican las operaciones para su purificación, habitualmente habrá una fracción de la población de pDNA de la forma no-súperenrollada o circular abierta (OC-pDNA), es la forma relajada sin superenrollamiento en la doble hélice (Prazeres *et al.*, 2001). Esta forma resulta cuando una cadena se rompe, causado naturalmente en el proceso de producción del plásmido dentro de la bacteria, o por mecanismos químicos (oxidación de radicales libres) o enzimáticos (acción de endonucleasas), mientras se procesa la biomasa y también por esfuerzos cortantes durante el proceso de purificación (Smith *et al.*, 2007; Schleef y Schmidt, 2004; Stadler *et al.*, 2004). El SC-pDNA es la isoforma más estable y efectiva en transfección celular que las otras, por lo que en una preparación de pDNA para aplicación terapéutica debe contener al menos el 95 % de pDNA superenrollado, comparado con el total (Prazeres y Ferrerira, 2004).

También pueden estar presentes en el lisado otras variantes del plásmido, tales como la lineal (L-pDNA), la desnaturalizada y los oligoméricos. El L-pDNA se genera cuando los enlaces fosfodiéster

de ambas cadenas se rompen (química o enzimáticamente) aproximadamente en la misma posición. Esta forma de longitud completa es indeseable para propósitos clínicos debido a que se han detectado riesgos de eventos de recombinación e integración dentro del DNA genómico (gDNA) (Smith, *et al.*, 2007).

En una preparación de pDNA que contiene las diferentes formas topológicas, todas tienen el mismo número de pares de bases (pb) o “longitud” de la molécula, pero dada su forma diferente, ocupan un volumen efectivo distinto, (Smith *et al.*, 2007; Stadler *et al.*, 2004) en consecuencia en el análisis por electroforesis en gel de agarosa, se observa que avanzan a través del gel a distinta velocidad, como se muestra en la Figura 1, siendo la forma de SC-pDNA más compacta, que avanza a mayor velocidad, siendo la forma lineal de longitud completa, la que indica el tamaño del plásmido (6 050 kb para el plásmido pVAX-LacZ).

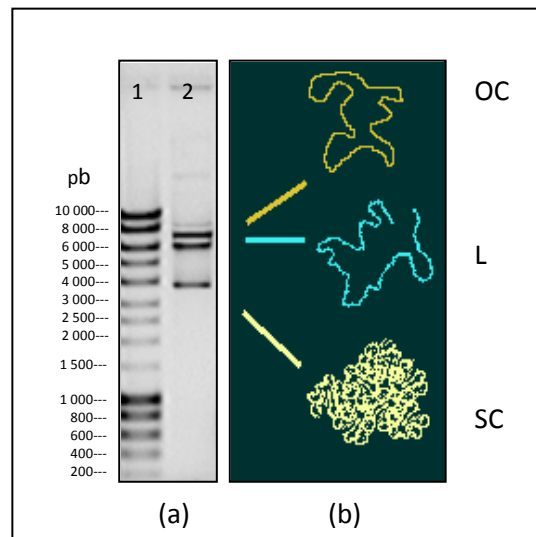


Figura 1. (a) Gel de electroforesis en agarosa al 0.8 % experimental, línea 1: marcador Hyperladder 1; línea 2: una muestra de pVAX-LacZ (6 050 kb) purificado por el método base conteniendo tres isoformas. (b) esquema de las isoformas de pDNA, OC = circular abierto, L = lineal de longitud completa y SC = súperenrollado.

El término de plásmido desnaturalizado, se refiere a conformaciones donde los puentes de hidrógeno entre las cadenas complementarias se han roto irreversiblemente, en ciertos lugares. Las condiciones ambientales (pH, fuerza iónica y temperatura entre otros) del proceso de extracción y purificación del pDNA provocan que las dos cadenas se separen a cadenas sencillas como un estado de desnaturalización. Para alcanzar la renaturalización se debe eliminar la condición de desnaturalización rápidamente, en caso contrario el daño es irreversible (Prazeres *et al.*, 2001).

El pDNA oligomérico es consecuencia de la recombinación de homólogos. Este proceso depende de la presencia de cierta secuencia recombinogénica en el pDNA y la existencia de una ruta de recombinación en la célula hospedera (Summers, 1996). Los oligómeros pueden existir como concatémeros y catenarios, que podrían estar presentes en preparaciones de lisado crudo (Smith, *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 1999). En consecuencia, cualquier método usado para evaluar la pureza del DNA plasmídico grado clínico, para propósitos de calidad y seguridad, debe enfocar la resolución no sólo a los topoisómeros usualmente presentes en el lisado, (circular abierto, lineal y súperenrollado) sino también al tamaño de ellos, debido a la presencia potencial de multímeros (Smith *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 1999). En la Figura 2 se muestran micrografías de transmisión de electrones de multímeros de plásmidos.

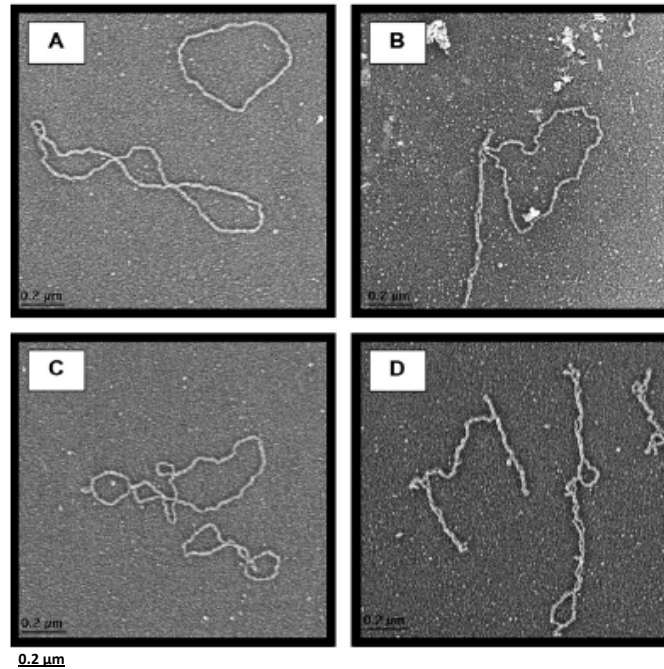


Figura 2. Micrografías de transmisión de electrones de multímeros de plásmidos: (A) Concatémeros dimérico y trimérico en la forma circular abierta; (B) Catenarios con una forma súperenrollada y una circular abierta; (C) Catenarios relajados y (D) concatémeros súperenrollados. Fuente Smith *et. al.*, (2007).

Los plásmidos para aplicaciones terapéuticas típicamente presentan: un origen de replicación procariótico para la amplificación y propagación del plásmido en la bacteria (p. ej. pUC), un promotor eucariótico fuerte que garantice altos niveles de transcripción del gen de interés en la célula eucariota (se han empleado exitosamente promotores virales como el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano CMV), sitios de múltiple clonaje inmediatamente después del promotor para insertar la secuencia de interés, gen reportero (por ejemplo LacZ), la proteína de interés (por ejemplo el gen patógeno), una secuencia de terminación de la transcripción y secuencia estabilizadora del RNA mensajero transcrito, dada por una cola de poliadenina (por ejemplo del gen que codifica para la hormona de crecimiento bovino BGH), un gen de resistencia a antibióticos (por ejemplo kan en el caso de kanamicina), como marcador de selección del vector

en las células de *E. coli* (Wolf *et al.*, 1990; Prather *et al.*, 2003), ejemplificado en la Figura 3, por el mapa del plásmido pVAX1-LacZ.

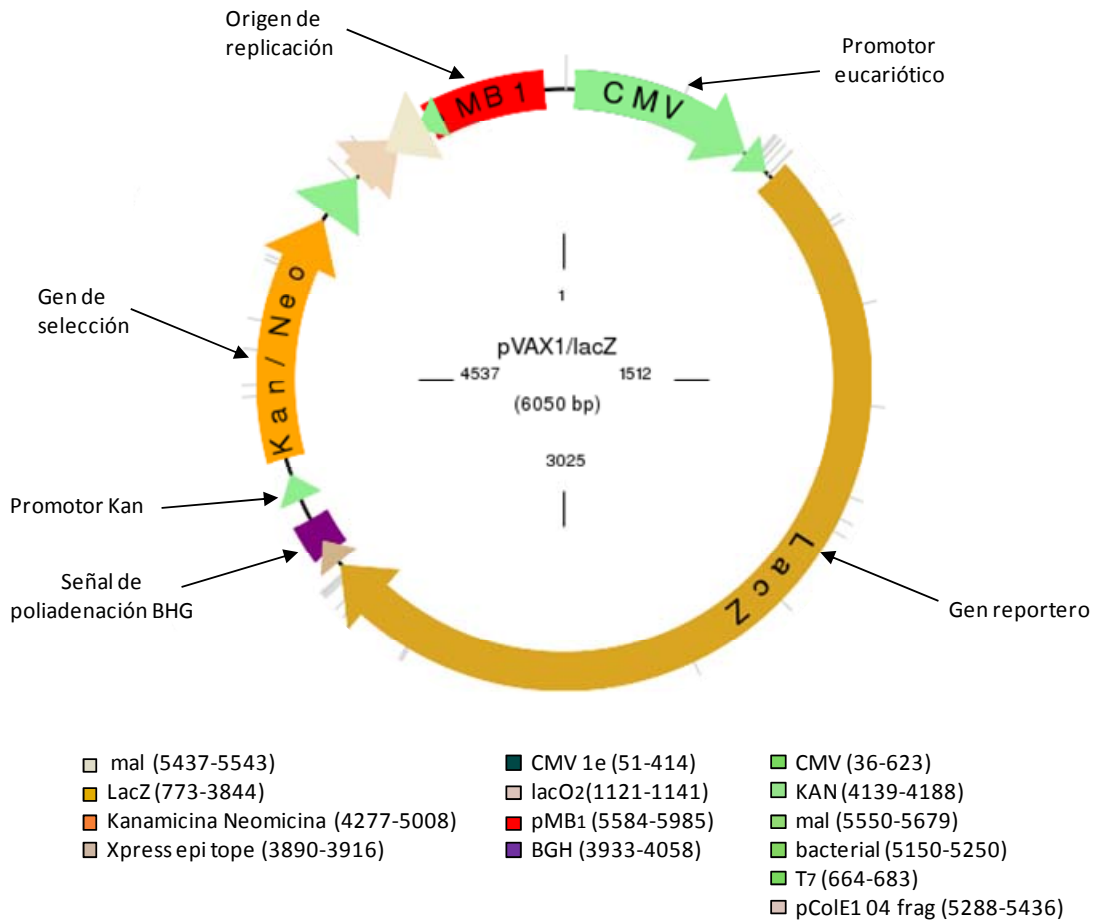


Figura 3. Mapa del plásmido comercial pVAX1-LacZ (6050 pares de bases), presentando las secuencias regulatorias y genes más importantes.

2.3 Producción de DNA Plasmídico

El proceso de producción del plásmido, en general, es una secuencia de las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido, como se muestra en la Figura 4.

2.3.1 Fermentación

En la etapa cultivo de células o fermentación, la elección del medio de cultivo (complejo, semi-definido o definido) y el modo de operación (por lotes o lotes alimentado), son factores importantes para mejorar la producción de plásmido (Prather *et al.*, 2003). Otros factores como el tiempo de fermentación también debe considerarse para minimizar el contenido de impurezas (Passarinha *et al.*, 2006). Generalmente en los procesos a escala laboratorio se usa un medio complejo obtenido comercialmente, como Luria Bertani (LB). Estos procesos se realizan por lo general en matraz debido a la simplicidad, aunque típicamente presentan bajo rendimiento de masa celular (1 a 7 g/L, peso seco) (Prather *et al.*, 2003).

Para la interpretación de crecimiento celular frecuentemente se utiliza el modelo logístico (Shuler y Kargi, 2001).

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu t})} \quad (1)$$

donde

$X(t)$ = concentración celular

X_0 = concentración inicial de la biomasa

X_∞ = concentración de la biomasa cuando $t \rightarrow \infty$

μ = velocidad específica de crecimiento

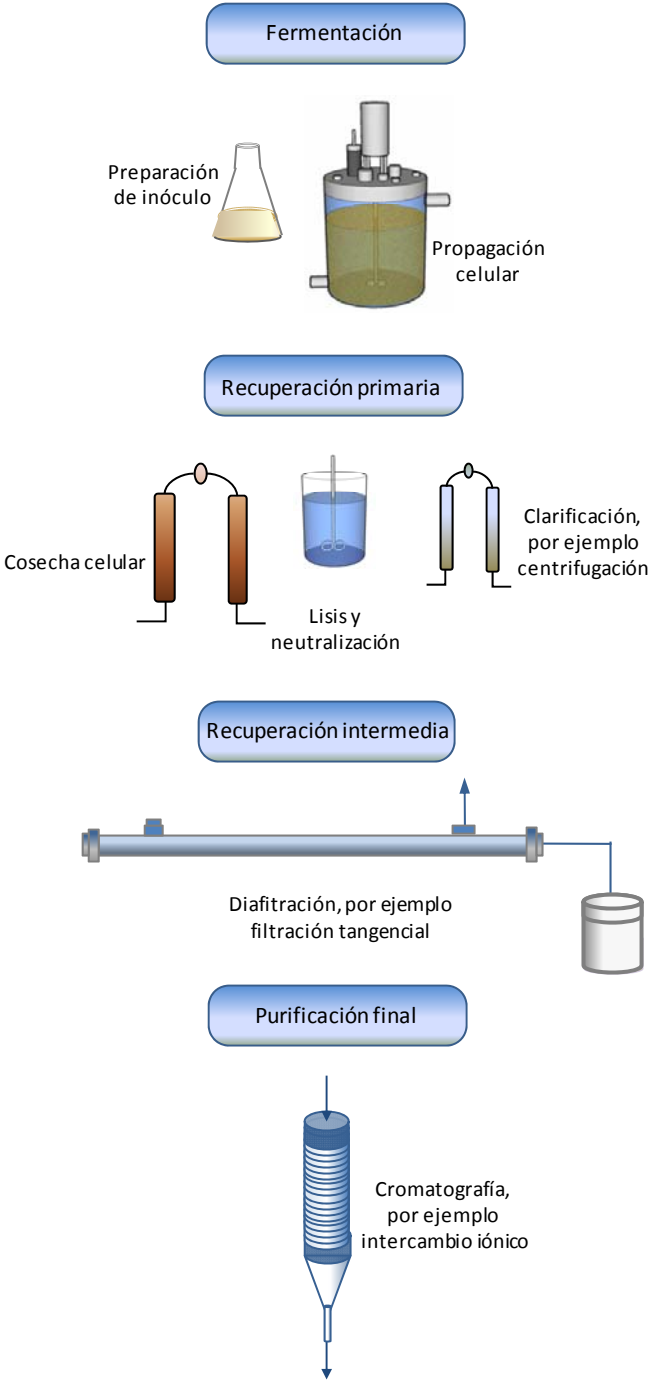


Figura 4. Proceso de producción genérico de pDNA.

2.3.2 Recuperación primaria

La etapa de recuperación primaria del proceso comprende las operaciones de cosecha celular, lisis, neutralización y clarificación. La cosecha celular, generalmente se realiza por centrifugación o microfiltración. Enseguida la biomasa se resuspende en un buffer adecuado para la siguiente operación (Prazeres *et al.*, 2001).

La lisis celular es una operación crucial del proceso (Meacle *et al.*, 2004; Prazeres *et al.*, 1999). En esta etapa se deben liberar altas cantidades de DNA plasmídico de las células hacia el seno de la solución para garantizar altos rendimientos. Sin embargo, otros componentes celulares también son liberados, como RNA, DNA genómico (gDNA) y proteínas, los cuales se deben eliminar en las etapas siguientes en el proceso.

Aunque se pueden usar varias técnicas en la ruptura de las células de *E. coli*, tales como sonicación, lisis térmica, molienda con partículas y homogenización, para liberar las moléculas de pDNA, el daño es generalmente significativo (Zhu *et al.*, 2005; Prazeres *et al.*, 1999; Carlson *et al.*, 1995). El método más ampliamente usado es la lisis alcalina, originalmente descrito por Birnboim y Doly, (1979). Esta consiste en la desintegración de las membranas celulares a un pH alto con un agente alcalino, (*v.g.* hidróxido de sodio, NaOH) en presencia de un detergente (*v.g.* dodecil sulfato de sodio, SDS).

El papel del detergente es solubilizar la membrana celular, eliminando las interacciones interfaciales no-covalentes entre proteínas y lípidos, lo que provoca la liberación de todos los componentes intracelulares y además promueve la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos. Dado que el pDNA se desnaturaliza durante la lisis, algo de SC-pDNA se convierte en formas alternativas (pDNA desnaturalizado, multimérico, circular abierto y lineal). También se puede causar la fragmentación del gDNA, durante la lisis, lo cual hace más difícil su remoción en

las etapas posteriores (Prather *et al.*, 2003). En esta operación al agregar la solución de lisis se debe mezclar, en forma de evitar gradientes de pH y procurando que éste no sea mayor de 12.5, ya que causaría la desnaturalización irreversible del plásmido (Prazeres *et al.*, 2001; 1998).

En la siguiente operación, la neutralización, el pH de la solución se reduce a cerca de 5.5 por la adición de una solución, (generalmente acetato de potasio 3.0 M, pH 5.0), lo que provoca la re-naturalización del plásmido y la formación de agregados de gDNA, así como la precipitación de los complejos proteínas-SDS y restos celulares (Meacle *et al.*, 2004). La lisis alcalina y la neutralización, generalmente se realizan en el mismo contenedor, secuencialmente, de 5 a a10 minutos cada operación.

La composición típica del lisado alcalino clarificado se muestra en la Tabla 1, es una solución compleja que contiene menos del 3% de pDNA, alta concentración de sal y pH alrededor de 5.5.

Tabla 1. Composición típica de lisado de células bacterianas y características fisicoquímicas de los principales componentes. Adaptado de Diogo *et al.*, (2005), Prazeres y Ferrerira, (2004) y Stadler *et al.*, (2004).

Molécula	Especies diferentes por célula	Contenido en el lisado (%) en peso seco	Peso molecular (PM) (kDa)	Observaciones
Ácidos nucleicos				
pDNA	1	< 3	3.3 – 13.2 X 10 ^{3b}	Polianiónico, cadena doble
RNA		21	28 – 1 000	Polianiónico, cadena sencilla
tRNA	40		28	
rRNA	3		500 – 1 000	
mRNA	400 – 800		660 – 990	
gDNA	1 ^a	3	2.8 X 10 ⁶	Polianiónico, altamente fragmentado, cadena doble o sencilla
Proteínas	1 100	55	8 – 200	Anionica, cationica, neutra, hidrofóbica, hidrofílica
Endotoxinas		3	10	Aniónica, parte lípidica
Iones y moléculas pequeñas	800 - 2000	15	< 1	

^a Las células de *E. coli* en crecimiento rápido tienen, en promedio, 4 moléculas de gDNA.

^b Moléculas de pDNA con tamaño promedio de 5 a 20 kbp.

Durante la operación de lisis alcalina, deben estar bajo control tres parámetros: a) el mezclado, que deberá ser homogéneo para evitar valores locales extremos de pH; b) el manejo del lisado, debe ser suavemente para evitar la fragmentación de gDNA y c) el tiempo de contacto a pH alto, el cual puede afectar la cantidad y calidad de pDNA (Meacle *et al.*, 2004). Para sobrellevar estas limitaciones, se ha reportado recientemente la operación en modo continuo, en la cual se evita el uso de agentes tóxicos o derivados de animales y es fácil de escalar (Urthler *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007).

Las operaciones como centrifugación, filtración (Theodossiou *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 1995) y flotación (Theodossiou *et al.*, 1999) se han usado solas o combinadas para remover los sólidos del lisado. Aunque la centrifugación es ampliamente usada a escala laboratorio, (Diogo *et al.*, 2000a), ya que ahorra tiempo y previene la degradación del plásmido por las nucleasas que se encuentran en el lisado celular, no es una operación muy atractiva por el alto esfuerzo de corte generado, y puede ser difícil sedimentar los flóculos de baja densidad aún con tiempo prolongado a altas velocidades. También se ha reportado el uso de filtración en cuatro capas de tela para remover el precipitado de la lisis alcalina, seguida de una microfiltración en filtro de papel analítico para remover las partículas pequeñas (Prazeres *et al.*, 1998).

2.3.3 Recuperación Intermedia

El objetivo de la etapa de recuperación intermedia del proceso es reducir el contenido de sales del lisado clarificado y concentrar la solución de pDNA, además eliminar algunas impurezas.

La reducción de volumen o concentración, generalmente se acompaña de precipitación con agentes como isopropanol (Freitas *et al.*, 2006; Diogo *et al.*, 2001; 2000a) o polietilenglicol (PEG) (Trindade *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 1995). También se pueden utilizar técnicas más escalables como

filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) para desalinizar y reducir el volumen (Eon-Duval *et al.*, 2004; Prazeres y Ferrerira, 2004).

Después de la reducción de volumen de la solución conteniendo el plásmido, todavía permanecen grandes cantidades de impurezas, siendo necesarios operaciones adicionales en el proceso. Una técnica común es remover el gDNA, proteínas, endotoxinas y RNA con un paso adicional de precipitación, usando sales aglutinantes como sulfato de amonio (Freitas *et al.*, 2006; Diogo *et al.*, 2000), acetato de amonio (Zhang *et al.*, 2003), cloruro de calcio (Tseng *et al.*, 2004; Eon-Duval *et al.*, 2003; Bhikhabhai, 2002) o citrato de sodio (Freitas *et al.*, 2008).

Los sistemas acuosos en dos fases (ATPS por sus siglas en inglés) también han surgido como una alternativa de recuperación, porque es un proceso potencialmente robusto, fácil de escalar y económicamente viable, que combina dos etapas (concentración y purificación) en una sola operación. La extracción de plásmido usando ATPS se ha desarrollado usando sistemas formados por PEG/sa (Rahimpour *et al.*, 2006; Trindade *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2004). La remoción de impurezas de un lisado alcalino, usando ATPS es notoria, 98 % de remoción de proteínas y 68 % de remoción de proteínas en un sistema PEG600/(NH₄)₂SO₄ en la relación de fases óptima y condición de lisado cargado (Trindade *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2008).

También se ha aplicado la TFF en las etapas de recuperación de plásmido, pre-purificación y concentración (Eon-Duval *et al.*, 2004, 2003a; Kendall *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2000). Las investigaciones mencionadas coinciden que la TFF es escalable, reproducible, de bajo costo y no implica el uso de agentes precipitantes, que son las principales ventajas desde el punto de vista de producción a gran escala. El uso de la TFF con membranas de polisulfona con tamaño de corte de 1 000 y 500 kDa han reportado que remueven más del 90 % de RNA y 95% de proteína de lisados clarificados obtenidos después una lisis alcalina extendida (24 h) (Khan *et al.*, 2000). La lisis

extendida produce una disminución significativa en el tamaño total y cantidad de RNA, el cuál es fácilmente removido en la corriente de permeado, mientras el plásmido es retenido.

2.3.4 Purificación final

Las técnicas cromatográficas se utilizan, en general, para realizar la purificación final, ya que se conoce que son eficientes, reproducibles y completamente escalables en el contexto de purificación de plásmidos. Su papel es remover impurezas como RNA, fragmentos de gDNA, endotoxinas y variantes de plásmido no-SC, que son similares al SC-pDNA.

El proceso debe generar un producto pDNA que cumpla con las especificaciones de calidad recomendadas por las agencias reguladoras, como son la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA por sus siglas en inglés). Las especificaciones del DNA plasmídico para aplicaciones terapéuticas son las siguientes: apariencia clara (sin color); proteínas no detectable, $< 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ por el ensayo de Ácido Bicinónico, (BCA, por sus siglas en inglés); RNA no detectable por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%; gDNA $< 5 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ de pDNA, por el ensayo de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y endotoxinas $< 0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ pDNA, por el ensayo para detectar endotoxinas asociadas con bacterias gram-negativas, (LAL, *Limulus Amebocyte Lysate*) (Prazeres *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 1995). Asimismo, más del 95% del pDNA deberá estar en forma súperenrollada ya que ésta isoforma es más efectiva para la expresión del gen de interés (Smith *et al.*, 2007; Schleef y Schmidt, 2004; Prazeres *et al.*, 2001). Particularmente, es importante la remoción de endotoxinas de la solución, ya que pueden producir síntomas como el del síndrome de choque tóxico si están presente en cantidades nocivas en las dosis aplicadas (Stadler *et al.*, 2004).

Las modalidades cromatográficas tales como exclusión por tamaño (SEC) (Li L. *et al.*, 2007; Ferrerira *et al.*, 1997), intercambio aniónico (AEC) (Zhang *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 1999; Prazeres *et al.*, 1998), interacción hidrofóbica (HIC) (Diogo *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005), fase reversa (RPLC) (Ferrerira *et al.*, 2000) y afinidad (AC) (Ghose *et al.*, 2004; Schluep y Cooney 1998), se utilizan solas o combinadas para la purificación de DNA plasmídico. Cada una de estas modalidades de la cromatografía presenta ventajas y desventajas, y para hacer una buena elección para un proceso específico se debe tomar en consideración sus principales características (Tabla 2) y la integración de ellas al proceso de purificación específico.

Tabla 2. Características de las técnicas cromatográficas más usada en purificación de plásmido. Adaptado de Diogo *et al.* (2005).

	Fuerza de separación	Molécula capturada	Condición de recuperación	Etapa del proceso	Selectividad por SC-pDNA
AEC	electrostática	pDNA	Alta concentración de sal	Recuperación intermedia o después de pre-purificación	+++
HIC	Hidrofóbica	RNA y Endotoxinas	Alta concentración de sal aglutinante	después de pre-purificación	+
AC	Secuencia de nucleótidos	pDNA	Baja concentración de sal, pH alcalino	Después de desalar el lisado	++
SEC	Diferencia de tamaño	Depende de la aplicación		Acabado, intercambio de buffer	++

Abreviaturas: AEC = Cromatografía de intercambio iónico; HIC = Cromatografía de interacción hidrofóbica; AC = Cromatografía de afinidad; SEC = Cromatografía de exclusión de tamaño.

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la interacción entre los grupos fosfato del DNA, cargados negativamente y los ligandos de la matriz del adsorbente, cargados positivamente, que constituye la fase estacionaria. Después de la adsorción se usa un gradiente de sal para desplazar los diferentes ácidos nucleicos, los cuales eluyen incrementando la carga neta, en función de la longitud de la cadena y conformación (Stadler *et al.*, 2004; Grunwald y Shields, 2001). La forma y tamaño de las moléculas juegan un papel importante, ya que en algunas matrices de intercambio iónico, la forma más compacta súperenrollada, que tiene una alta densidad de carga, eluye después que la forma circular abierta, la cual tiene menor densidad de carga total (Prazeres *et al.*, 2001; 1998).

Los plásmidos son moléculas muy grandes ($PM > 3 \times 10^6$, diámetro hidrodinámico de 200 nm) que no pueden penetrar en los poros de la mayoría de las matrices cromatográficas de intercambio iónico comerciales (partículas de diámetro de poro < 200 nm), originalmente diseñadas para la separación de proteínas. Esto significa que sólo la superficie externa y una capa delgada están disponibles para adsorber, por lo que el fenómeno sólo ocurre en la superficie (Stadler *et al.*, 2004; Enders *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2000a; Ljunglöf *et al.*, 1999). Esto representa una limitación en el proceso cromatográfico con partículas de intercambio iónico, que presentan únicamente poros difusivos (Fig. 5) (Ljunglöf *et al.*, 1999; Prazeres *et al.*, 1998).

En investigaciones realizadas por Teeters *et al.*, (2003) se reportan capacidades de membranas perfusivas de un orden de magnitud mayor que las capacidades típicas reportadas para plásmidos en partículas porosas. La cromatografía de membranas basada en el uso de poros perfusivos (poros de 800 a 1000 nm), permite el flujo convectivo del soluto al sitio de adsorción, en consecuencia disminuye el tiempo de residencia en la columna y se obtiene una mayor productividad en los procesos (Fig. 5) (Montesinos-Cisneros *et al.*, 2007; Enders *et al.*, 2003; Teeters *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). La cromatografía de intercambio iónico se ha utilizado

para capturar pDNA de lisado crudo o de soluciones conteniendo pDNA obtenido después de la pre-purificación en operaciones como TFF, ATPS o HIC (Eon-Duval *et al.*, 2004).

La cromatografía de interacción hidrofóbica, generalmente, se aplica como una operación de remoción de impurezas, aprovechando el hecho de que las mayores impurezas como el RNA y gDNA son más hidrofóbicas que el pDNA (Diogo *et al.*, 2005). La HIC se beneficia de la alta hidrofobicidad de las cadenas sencillas de los ácidos nucleicos que muestran una alta exposición de las bases aromáticas comparada con los ácidos nucleicos de doble cadena. Las moléculas de plásmido de doble cadena tienen las bases hidrofóbicas empaçadas dentro de la hélice, por lo que la interacción con el soporte hidrofóbico es mínimo (Diogo *et al.*, 2000). Dado que las soluciones alimentadas a una columna de interacción hidrofóbica deben acondicionarse con alta concentración de sal, este tipo de cromatografía es especialmente conveniente si se aplica después de las etapas de precipitación con sulfato de amonio (Diogo *et al.*, 2000, 2000a) o después de la extracción PEG/sal en los ATPS (Trindade *et al.*, 2005).

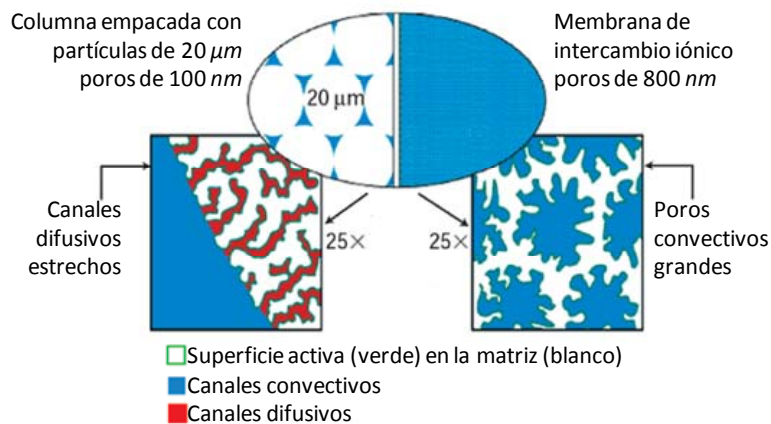


Figura 5. Comparación de los sitios de adsorción en las partículas y membranas de intercambio iónico.

La cromatografía de afinidad se basa en el reconocimiento de una estructura particular en la molécula de plásmido por un ligando inmovilizado a una matriz disponible basada en la formación de la hélice triple o interacción proteína-DNA. La formación de hélice triple entre un oligonucleótido inmovilizado a una secuencia específica insertada en el plásmido, se ha reportado como un método altamente específico, sin embargo está limitada por la formación lenta del enlace (Schluep y Cooney, 1998). En estudios más recientes, se investiga la interacción del pDNA con una matriz de agarosa-histidina basada en interacción hidrofóbica y de pseudo-afinidad, como una estrategia para capturar específicamente SC-pDNA de lisados de *E. coli* parcialmente purificados (Sousa *et al.*, 2006, 2005).

2.4 Simulación de Procesos

Cuando se aplica una operación cromatográfica a un sistema nuevo, o cuando se escala el proceso, es común desarrollar numerosos experimentos y con frecuencia los productos son valiosos y se encuentran en pequeñas cantidades (Montesinos *et al.*, 2005a). Esto hace importante el poder predecir el funcionamiento del proceso por medio de una modelación matemática y simulación por computadora para reducir al mínimo el número de los experimentos requeridos. El desarrollo de modelos matemáticos para describir el comportamiento de estas operaciones, es un enfoque que puede ayudar a desarrollar modelos realistas basados en principios físicos y químico (Tejeda *et al.*, 2001).

Gran parte de la información necesaria para evaluar el comportamiento de los procesos cromatográficos, está contenida en las curvas típicas de concentración de soluto vs tiempo. Estas curvas pueden ser utilizadas para determinar: 1) la capacidad del adsorbente que ha sido utilizado, 2) la cantidad de soluto que no se adsorbe al final de la operación y 3) el tiempo de proceso. Un modelo matemático que pueda ser utilizado para predecir apropiadamente este comportamiento dinámico, proporciona una forma práctica de obviar muchos experimentos para el diseño y escalamiento de procesos de adsorción (Tejeda *et al.*, 1995).

Los balances de masa, energía y momento en un proceso cromatográfico producen ecuaciones diferenciales parciales (EDP) que generalmente describen las variaciones en el tiempo y espacio, que suceden por varias razones, como por ejemplo, condiciones de mezclado no ideal, reacciones, difusión y convección en la transferencia de masa y/o calor. Muchos de estos procesos son sistemas de parámetros distribuidos, es decir, sistemas en los cuales las variables de estado dependen de varias variables independientes (como tiempo y espacio) y se describen por un

sistema de ecuaciones diferenciales parciales (EDPs) (Wouwer *et al.*, 2004). Tales ecuaciones pueden ser lineales, con una solución analítica disponible.

Sin embargo muchos EDPs son sistemas de ecuaciones no-lineales y requieren una simulación numérica para su solución. Uno de los métodos más populares para resolver EDPs es el *Método de Líneas* (*MOL* por siglas en inglés). La solución *MOL* procede en dos etapas básicas (asumiendo que el espacio y el tiempo son las dos variables independientes bajo consideración): *i*) primero las derivadas parciales son aproximadas en su variable espacial, usando métodos de diferencia finita, elemento o volumen finito; *ii*) el sistema resultante de ecuaciones semidiscretas (discretas en el espacio y continuas en el tiempo) se integra con respecto al tiempo (Wouwer *et al.*, 2004). *MOL* es un método nuevo que utiliza algoritmos robustos para la solución de ecuaciones diferenciales ordinarias de tipo duro (*stiff*), de valor inicial (Wouwer *et al.*, 2004; Schiesser y Silebi, 1997).

En la solución *MOL* se utiliza una malla espacial para representar el valor de las variables dependientes, es decir, $f(x, t)$ y $f'(x, t)$, con respecto a la variable de posición. El éxito de la solución *MOL* se origina en la disponibilidad de integradores de tiempo eficientes para resolver un rango amplio de problemas, incluyendo ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs). Esta metodología también puede ser empleada para resolver sistemas mezclados de ecuaciones algebraicas (EAs) y EDOs, llamados sistemas de ecuaciones algebraicas-diferenciales (EADs) (Wouwer *et al.*, 2004).

Muchas de las ecuaciones de transporte son similares en estructura, incluso para modelos con dos o tres dimensiones en el espacio. Este es el caso de los modelos de los procesos de adsorción por lotes y en columna, de tal manera que pueden resolverse en una forma similar en una plataforma de MATLAB, usando la solución *MOL*.

Tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial, se utiliza la adsorción por lotes y en columnas de lecho fijo. Para llevar a cabo una operación cromatográfica.

2.4.1 Procesos de adsorción por lotes

El formato convencional de las separaciones cromatográficas es una columna empacada con un adsorbente poroso. Sin embargo, en algunos casos, puede ser conveniente el desarrollo de una etapa de adsorción en operación por lotes usando tanques bien agitados, por ejemplo, cuando se purifican lisados crudos, para evitar taponamientos en la columna (Sridhar, 1996; Persson *et al.*, 2005; Tscheliessniga *et al.*, 2005).

Existen varios trabajos reportados sobre la modelación y simulación de procesos de adsorción por lotes. Chase, (1984) usó un modelo simplificado conocido como modelo de parámetros agrupados. Arnold *et al.*, (1985) derivaron un modelo de transporte, asumiendo que la difusión en el poro es la resistencia controlante del proceso y presentaron su solución analítica. Arve y Liapis, (1987) consideraron que la adsorción de un soluto sobre la superficie del adsorbente desde el seno del líquido, involucra tres pasos que contribuye a la transferencia de masa: difusión en la película, difusión en el poro y cinética de reacción. Hortsman y Chase, (1989) utilizaron el modelo de dos resistencias con la suposición de una reacción infinitamente rápida. La solución numérica se obtuvo por diferencias finitas usando una aproximación de segundo orden para las derivadas espaciales. Sin embargo como mencionan los autores, el método es impráctico para resolver sistemas más complejos. Se requiere el uso de métodos numéricos avanzados para resolver este tipo de modelos.

2.4.2 Procesos cromatográficos en columna de membranas de intercambio iónico

El formato convencional para las separaciones en membrana de intercambio iónico es una columna operada en modo frontal (también llamada de lecho fijo). En este modo de operación se involucran 4 etapas: adsorción, lavado, elución y regeneración. Después de la etapa de adsorción, el material no adsorbido es lavado con buffer de adsorción, y posteriormente los solutos

adsorbidos son eluidos. La recuperación generalmente se efectúa cambiando la fuerza iónica del buffer (Montesinos *et al.*, 2005a). El criterio clave de funcionamiento para un proceso de adsorción frontal son la forma de la curva de ruptura (BTC de sus siglas en inglés) y el tiempo de residencia en la etapa de adsorción (Liapis 1989; Arnold *et al.*, 1985).

Las columnas con membranas de intercambio iónico pueden operarse en modo convectivo, lo cual puede reducir significativamente las limitaciones de difusión encontradas en procesos comerciales usando partículas. Además de las aplicaciones a escala laboratorio, también se han reportado varios sistemas modulares de membranas adsorbentes para una escala técnica en procesos farmacéuticos (Fischer-Frühholz, 2005; Zhang *et al.*, 2003; Demmer y Nussbaumer, 1999).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presentan los materiales, equipos y la metodología utilizados en la presente investigación. Se describen los modelos de transporte utilizados en los estudios de simulación en sistemas por lotes y en columna. Particularmente, se presentan las metodologías asociadas a los procesos para la producción de plásmido pVAX1-LacZ a partir de la célula hospedera *E. coli*: el proceso base o de laboratorio, el proceso por cromatografía frontal de intercambio iónico en membranas (FAEMC por sus siglas en inglés) y el proceso combinado de FAEMC con cromatografía de interacción hidrofóbica (FAEMC-HIC por sus siglas en inglés). Adicionalmente se describen las metodologías para el análisis de las muestras obtenidas en las diferentes etapas de la experimentación.

3.1 Materiales

Como cepa hospedera del plásmido pVAX1-LacZ (6050 bp) se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α , proporcionada por el Instituto Técnico de Lisboa. Para la preparación del medio de cultivo se utilizó triptona y extracto de levadura de BD (Franklin Lakes, NJ, EUA) y glucosa de Sigma (St. Louis,

MO. EUA). En los cultivos en matraz se usó medio de cultivo Luria Bertani (LB) de Sigma (St. Louis, MO. EUA).

En los procesos purificación de plásmido mediante cromatografía de interacción hidrofóbica y de exclusión por tamaño (Proceso base), se utilizaron columnas empacadas con gel de Phenyl Sepharosa 6 fast flow de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). En los estudios de cromatografía por intercambio iónico, se utilizaron membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals (Mich. EUA) con un tamaño de poro nominal de 800 *nm*, las cuales se cortaron a 0.5 cm de diámetro, (igual al diámetro interior de la columna), se acondicionaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se utilizaron una vez en cada estudio.

En la preparación de buffers, se empleó tris-(hidroximetil)aminometano (Tris) (PM 121.14) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (PM 292.25), de Panreac Química (Barcelona, España), sulfato de amonio (PM 132.14) de Scharlau (Barcelona, España). Todos los buffers fueron filtrados a vacío a través de un microfiltro Gelman Science (Mich. EUA) de 0.45 μm y se desgasificaron antes de su uso. Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

En los análisis por electroforesis se usó agarosa de Hoefer HE99X (Uppsala, Suecia) y como marcador de peso molecular HyperLadder 1 (HL1) de Bioline (Randolph, MA. USA). La purificación de plásmido control se realizó utilizando un kit High Pure Plasmid Isolation de Roche (Manheim, Alemania).

3.2 Equipo

En los cultivos en matraz de *E. Coli* DH5 α conteniendo el plásmido pVAX1-LacZ, se utilizó una incubadora Orbital shaker incubator de Shel Lab, (Orlando, Fl., USA). En la producción de la cepa en fermentador se utilizó un biorreactor de 3.5 litros, Biostat MD Fermenter de B. Braun Biotech, (Melsungen, Alemania). La densidad óptica de las muestras de cultivo se determinó a 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi (San José, Ca., USA). En la cosecha de biomasa se utilizó una centrifuga Sorvall RC 6 (Milford, Ma, USA). La clarificación de lisado se hizo en la centrifuga Sorvall RC 6 y filtrando a vacío con una unidad de filtrado y microfiltro Gelman Science (Mich. EUA) de 0.45 μ m. En la etapa de purificación de plásmido en el Proceso base, se usó una columna cromatográfica Econo Pac de Bio-Rad (Ca., USA).

El lisado clarificado se diafiltró en una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) utilizando un cartucho con dos fibras huecas de polisulfona de 1 mm de diámetro interior, 30 cm de largo y 300 kDa de tamaño de corte molecular de GE Healthcare, (Suecia), acoplado a una bomba peristáltica MidJet Benchtop System, de GE Healthcare, (Suecia). Se midió la conductividad de las muestras de lisado retenido apropiadamente diluidas, con un conductímetro PCE-CM 41.

En los estudios de cromatografía de intercambio iónico (AEC) se usó una columna (0.5 \times 5 cm) de Pharmacia Amersham Biosciences, empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q. En la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se utilizó una columna (0.7 \times 2.5 cm) de GE Healthcare (Suecia) pre-empacada con 1 mL de resina Phenyl Sepharosa 6 fast flow (high substitution).

El plásmido fue cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) Source 15 PHE (fenil-poliestireno) (0.46 \times 10 cm) de GE Healthcare, (Suecia). Todos los experimentos cromatográficos se realizaron en un

sistema Äkta Purifier FPLC de GE Healthcare (Suecia) provisto con el software Unicorn 5.10 para registro y procesamiento de datos.

Las muestras colectadas durante el proceso fueron analizadas en una cámara de electroforesis horizontal en gel de agarosa, acoplada a una fuente de poder EPS 500/400 de Pharmacia Amersham Biosciences. Los geles obtenidos en los estudios fueron visualizados utilizando luz UV en un sistema de registro de imagen Strategene Eagle Eye II de Stratagene (La Jolla, Ca, EUA). Las muestras conteniendo plásmido en solución en sulfato de amonio fueron desalinizadas centrifugando en unidades de Microcon Centrifugal Filter (10 000 NMWL) obtenidos de Millipore (Bedford, Ma, EUA), en una Centrifuga 5417 C de Eppendor (Ham., Alemania).

3.3 Simulación de Procesos

En esta sección se describen los modelos de adsorción por lotes y de cromatografía en columna de membranas, así como la solución numérica implementada para los estudios de simulación realizados en este trabajo.

3.3.1 Descripción del modelo de transporte de adsorción por lotes

En la simulación del comportamiento de la adsorción en procesos por lotes, se utilizó un modelo de transporte que considera tres resistencias consecutivas a una separación de equilibrio ideal: resistencia en la película externa del adsorbente, difusión interna en los poros del adsorbente y cinética de adsorción finita. El modelo se basa en la adsorción isotérmica de un soluto sobre partículas esféricas de adsorbente de radio promedio, r_m , y porosidad, ε_i . Se supone que la operación se conduce en un tanque bien agitado con un volumen de sistema V_s y con una razón de volumen de líquido a volumen de sistema, ε_b . El volumen de líquido externo a la matriz de adsorbente es $V = \varepsilon_b V_s$ y el volumen de adsorbente es $v = (1 - \varepsilon_b) V_s$. La concentración inicial y transiente de la biomolécula en el seno del líquido son c_o y $c(t)$, respectivamente. La concentración de la biomolécula en el líquido de los poros y en la superficie del adsorbente son c_i y q_i , respectivamente (Fig. 6).

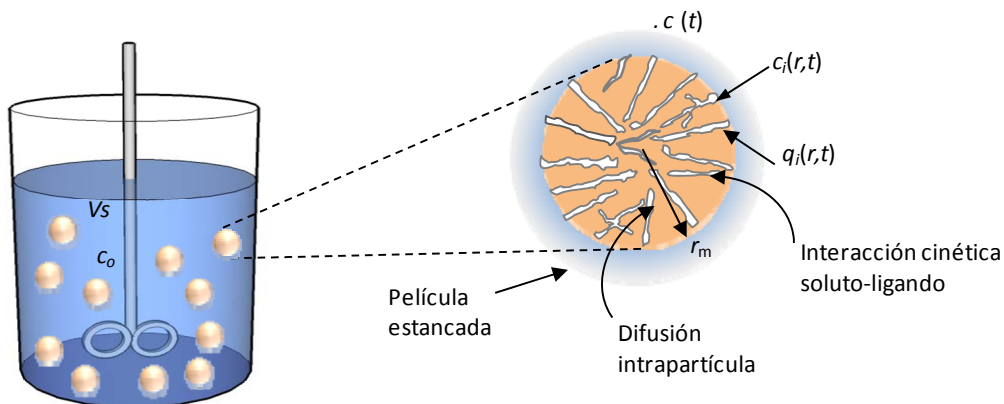


Figura 6. Modelo físico del sistema de cromatografía en un tanque agitado.

Se considera que el movimiento de soluto involucra su transporte interfacial desde el seno del líquido hasta la superficie del adsorbente a través de una película estancada que rodea al adsorbente caracterizada por un coeficiente de transferencia de masa, k_f , la difusión efectiva dentro del líquido del poro del adsorbente descrita por un coeficiente, D_i , y el paso de adsorción del soluto en los sitios activos sobre la superficie del adsorbente. La velocidad de adsorción intrínseca puede ser descrita por diferentes tipos de modelos. En este trabajo se utiliza un modelo de adsorción-desorción tipo Langmuir. Generalmente se supone que la difusión en la superficie puede ser despreciable en los procesos de cromatografía, debido a la fuerte interacción entre el ligando y el soluto, que se desarrolla en estos sistemas (Liapis, 1989).

Debido al equilibrio no lineal que caracteriza a la cromatografía, el comportamiento de la adsorción se describe más apropiadamente mediante teorías cinéticas. Este enfoque ingenieril para la obtención de modelos, involucra el uso de ecuaciones de conservación, leyes de equilibrio en interfases y leyes cinéticas de transporte y adsorción, conjuntamente con condiciones iniciales y de frontera.

La descripción del cambio de concentración de la biomolécula con el tiempo, se puede derivar mediante un balance de soluto en el seno del líquido,

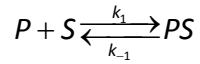
$$\frac{dc}{dt} = \frac{3}{r_m} \left(\frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \right) k_f (c - c_i) \Big|_{r=r_m} \quad (2)$$

El cambio de concentración de soluto en el líquido de los poros del adsorbente puede obtenerse mediante un balance de soluto en la partícula:

$$\varepsilon_i \frac{\partial c_i}{\partial t} + (1 - \varepsilon_i) \frac{\partial q_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_i \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) \quad (3)$$

Generalmente se utilizan modelos simplificados para describir las complejas interacciones entre el soluto y el adsorbente (Hortsmann y Chase, 1989; Arnold *et al.*, 1985; Chase, 1984). En estos

modelos se utiliza una expresión cinética reversible de segundo orden, donde se supone que el soluto interacciona en forma monovalente con el adsorbente,



donde: P es el soluto en la solución, S es el sitio de adsorción y PS es el complejo soluto-ligando.

La velocidad de adsorción de este tipo de interacción se representa frecuentemente por la expresión de Langmuir,

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 c_i (q_m - q_i) - k_{-1} q_i \quad (4)$$

donde: q_m es la capacidad máxima de adsorción del adsorbente; k_1 y k_{-1} son las constantes cinéticas de adsorción y desorción, respectivamente.

Al inicio de la operación la concentración de la biomolécula en el seno del líquido es c_0 y el sistema se encuentra libre de soluto, por tanto se utilizan las condiciones iniciales siguientes:

$$\text{en } t = 0, \quad c = c_0 \quad (5)$$

$$\text{en } t = 0, \quad c_i = 0, \quad 0 \leq r \leq r_m \quad (6)$$

$$\text{en } t = 0, \quad q_i = 0, \quad 0 \leq r \leq r_m \quad (7)$$

Debido a la simetría de la partícula, se considera la condición de frontera siguiente:

$$\text{en } r = 0, \quad \left. \frac{\partial c_i}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad t > 0 \quad (8)$$

Mediante un balance de soluto en la boca de un poro de la partícula, se obtiene una segunda condición de frontera,

$$\text{en } r = r_m \quad k_f (c - c_i) \Big|_{r=r_m} = \varepsilon_i D_i \left. \frac{\partial c_i}{\partial r} \right|_{r=r_m} \quad t > 0 \quad (9)$$

3.3.1.1 Modelo de parámetros agrupados

El modelo de parámetros agrupados (Skidmore *et al.*, 1990) utiliza un enfoque empírico sencillo para describir el proceso de adsorción, donde se supone que todos los procesos que limitan la velocidad de adsorción del soluto pueden ser representados por constantes cinéticas. En este enfoque, la velocidad de transferencia de masa de soluto al adsorbente es descrita por la ec. (4).

En un proceso de cromatografía en un tanque bien agitado, la concentración de soluto en solución a un cierto tiempo, t , está dada por la siguiente solución analítica del modelo:

$$\frac{c}{c_0} = 1 - \left(\frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b c_0} \right) \left(\frac{(b+a) \left[1 - \exp \left(-\frac{2a(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b} k_{a1} t \right) \right]}{\left(\frac{b+a}{b-a} \right) - \exp \left(-\frac{2a(1-\varepsilon_b)}{\varepsilon_b} k_{a1} t \right)} \right) \quad (10)$$

donde:

$$a^2 = b^2 - \left[\frac{c_0 \varepsilon_b}{(1 - \varepsilon_b)} \right] q_{ma} \quad (11)$$

$$b = \frac{1}{2} \left[\frac{c_0 \varepsilon_b}{(1 - \varepsilon_b)} + q_{ma} + \frac{K_d \varepsilon_b}{(1 - \varepsilon_b)} \right] \quad (12)$$

3.3.2 Descripción del modelo de transporte de cromatografía en columna de membranas

Para describir el comportamiento de la cromatografía en sistemas de columna de membrana (Fig. 7) se usa con frecuencia un método simple, que involucra el acoplamiento en serie del sistema de la curva de ruptura (BTC) y el sistema de la curva de dispersión (SDC de sus siglas en inglés) (Yang y Etzel, 2003; Yang *et al.*, 1999; Sarfert y Etzel, 1997). En este análisis la concentración de la alimentación de pDNA es c_0 , en el sistema la solución tiene una concentración transitoria, $c(z,t)$ y

una velocidad de flujo intersticial constante v , a través de la columna, con longitud L y porosidad del lecho ε . La concentración del pDNA adsorbido en la fase sólida es $q(z,t)$. La dispersión convectiva de Fick en la columna se caracteriza por el coeficiente de dispersión axial, D_{ax} . Para describir el sistema cinético se utiliza el modelo de adsorción y desorción de tipo Langmuir con k_1 y k_{-1} constantes cinéticas de adsorción y desorción respectivamente, y q_m es la capacidad máxima de adsorción del adsorbente.

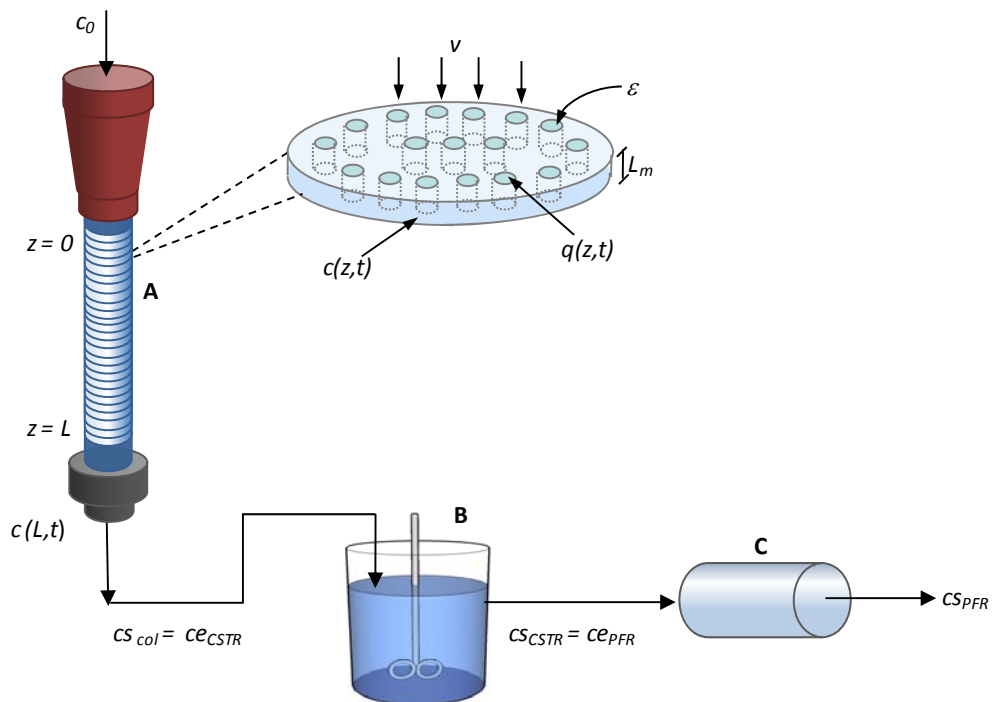


Figura 7. Sistema conceptual para el desarrollo del modelo: A) columna de membranas; B) reactor tipo tanque agitado (CSTR); C) reactor de flujo tapón (PFR).

3.3.2.1 Modelo de la curva de ruptura (BTC)

La adsorción de pDNA en columna fue descrita usando el modelo de cromatografía en membrana (Sarfert y Etzel, 1997; Liu y Fried, 1994; Suen y Etzel, 1992), el cual está constituido por el balance de masa en la fase líquida y la expresión cinética de tipo Langmuir,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - v \frac{\partial c}{\partial z} - \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\partial t} \quad (13)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_1 c (q_m - q) - k_{-1} q \quad (14)$$

Dado que la membrana se encuentra libre de soluto al inicio de la operación, las condiciones iniciales son:

$$\text{en } t = 0, \quad c = 0, \quad 0 \leq z \leq L \quad (15)$$

$$\text{en } t = 0, \quad q = 0, \quad 0 \leq z \leq L \quad (16)$$

Se usan las condiciones de frontera de Danckwerts (Danckwerts, 1953) para considerar la dispersión en la superficie de la membrana (entrada de la columna) y mezclado completo solo por convección a la salida de la columna, de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$\text{en } z = 0, \quad \varepsilon v c - \varepsilon D_{ax} \frac{\partial c}{\partial z} = \varepsilon v c_0, \quad t > 0 \quad (17)$$

$$\text{en } z = L, \quad \frac{\partial c}{\partial z} = 0, \quad t > 0 \quad (18)$$

3.3.2.2 Modelo del sistema de dispersión (SDC)

El modelo SDC se utilizó para describir los efectos de flujo no ideal, como mezclado y volumen muerto. El modelo explica el sistema de flujo completo, de esta forma el volumen del sistema V_{sis} requiere, además del volumen de la porosidad de la membrana εV , el volumen externo V_{ext} que consiste del volumen de tubería, conexiones, distribuidor de flujo y celda de detección de UV. Para

describir el comportamiento del flujo en el sistema se usa una combinación en serie de un reactor tipo tanque agitado (*CSTR* de sus siglas en inglés) y un reactor tipo tapón (*PFR* de sus siglas en inglés):

$$V_{sis} = \varepsilon V + V_{ext} = V_{CSTR} + V_{PFR} \quad (19)$$

donde V_{CSTR} es el volumen del *CSTR* V_{PFR} es el volumen del *PFR*.

El balance de masa en el *CSTR* produce:

$$\frac{dc_{CSTR}}{dt} = \frac{F}{V_{CSTR}} (ce_{CSTR} - cs_{CSTR}) \quad (20)$$

donde F representa el flujo volumétrico en el *CSTR*, ce_{CSTR} y cs_{CSTR} son las concentraciones de entrada y salida al *CSTR*, respectivamente. La ce_{CSTR} , es igual a la concentración a la salida de la columna, c . Al inicio de la operación se tiene la siguiente condición:

$$\text{en } t=0, \quad cs_{CSTR} = 0 \quad (21)$$

El tiempo de retardo (t_{ret}) en la respuesta a la salida de la columna está representado por el modelo del *PFR*:

$$cs_{PFR} = 0 \quad t \leq t_{ret} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} cs_{CSTR}(t) &= ce_{PFR}(t) \\ ce_{PFR}(t) &= cs_{PFR}(t) \quad t > t_{ret} \end{aligned} \quad (23)$$

donde ce_{PFR} y cs_{PFR} son las concentraciones a la entrada y salida del *PRF*. La cs_{PFR} representa la concentración a la salida del sistema, y t_{ret} el tiempo de retardo.

$$t_{ret} = \frac{V_{PFR} - \varepsilon V}{F} \quad (24)$$

3.3.3 Solución numérica de los modelos

La solución numérica de los modelos de transporte de adsorción por lotes y de cromatografía en columna de membranas, se obtuvo por el *Método de Líneas (MOL)* y la discretización se hizo por el método de diferencia finita. Se aproximó una solución del sistema de EDP por iteraciones, usando un integrador de la plataforma MATLAB (v.7.1), de acuerdo al diagrama de bloques mostrado en la Figura 8.

En el programa principal llamado, MOD, se incorporaron el sistema de datos de entrada, el dominio espacial, el integrador de MATLAB, *ode15s* y la salida de soluciones.

El sistema de EDP del modelo de transporte (en lotes o columna) se puede visualizar como un problema de valores en la frontera de la forma:

$$\mathbf{x}_t = \mathbf{f}(t, \mathbf{z}, \mathbf{x}, \mathbf{x}_z, \mathbf{x}_{zz}) \quad \mathbf{z} \in D, \quad t > 0 \quad (25)$$

$$\mathbf{0} = \mathbf{b}(t, \mathbf{z}, \mathbf{x}, \mathbf{x}_z) \quad \mathbf{z} \in S, \quad t > 0 \quad (26)$$

$$\mathbf{x}(t=0, z) = \mathbf{x}_0(z) \quad \mathbf{z} \in D \cup S, \quad t=0 \quad (27)$$

donde: \mathbf{x} es el vector de las variables dependientes (concentración), $\mathbf{z} = [z_1]^T$ es el vector de las variables independientes espaciales y t es la variable independiente temporal. Las derivadas parciales se describen mediante notación de subíndice, es decir, $\mathbf{x}_t = \partial \mathbf{x} / \partial t$, $\mathbf{x}_z = \partial \mathbf{x} / \partial z$, $\mathbf{x}_{zz} = \partial^2 \mathbf{x} / \partial z^2$.

Las ecs. (25 – 27) representan un sistema de EDP definidas en un dominio espacial D , sus condiciones frontera asociadas definidas en la superficie límite S de D , y las condiciones iniciales definidas en el dominio espacial completo. La solución *MOL* se realizó en dos etapas en serie: discretización espacial e integración.

Discretización espacial: las derivadas espaciales en las ecs. (25) y (27) fueron reemplazadas por aproximaciones de diferencia finita, de tal forma que las ecs. (25 – 27) se transformaron en sistemas de EADs:

$$\bar{\mathbf{x}}_r = \bar{\mathbf{f}}(t, \bar{\mathbf{x}}) \quad (28)$$

$$0 = \bar{\mathbf{b}}(t, \bar{\mathbf{x}}) \quad (29)$$

$$\bar{\mathbf{x}}(t=0) = \bar{\mathbf{x}}_0 \quad (30)$$

donde: $\bar{\mathbf{x}}$ es un vector de variables dependientes discretizadas (los valores de \mathbf{x} en una malla espacial cubriendo el dominio $D \cup S$) y $\bar{\mathbf{f}}$ y $\bar{\mathbf{b}}$ son los vectores de las funciones no lineales aproximadas a las ecuaciones originales (25) y (27) respectivamente.

Integración: el sistema resultante de ecuaciones semidiscretas, ecs. (28 – 30) se integró en el tiempo usando un integrador de EADs (Wouwer *et al.*, 2004). Dado que el problema es del tipo rígido, es necesario utilizar un integrador apropiado, por lo que seleccionó para esta simulación el integrador *ode15s* de MATLAB. El código *ode15s* es un integrador de tamaño de paso y orden variable. Está basado en fórmulas de diferenciación numérica y calcula la solución en cada intervalo de tiempo (Ashino *et al.*, 2000; Shampine *et al.*, 1999; Shampine y Reichelt, 1997).

La función MOD_ODE (Fig. 8) produce el sistema de EADs, llamando a las funciones dss004 y dss044 para calcular la primera y segunda derivadas espaciales ($\partial c_i / \partial r$ y $\partial^2 c_i / \partial r^2$ en el caso de adsorción por lotes, o $\partial c / \partial z$ y $\partial^2 c / \partial z^2$ en el caso de cromatografía en columna de membranas) usando aproximaciones por diferencia finita centrada de cinco puntos, cuarto orden (Ask *et al.*, 2006; Silebi y Schiesser, 1992). El resultado de EADs se organiza en matrices dispersas. El integrador *ode15s* calcula la solución en cada intervalo de tiempo. Este integrador llama a la función MOD_ODE repetidas veces durante el cálculo de la solución por integración numérica.

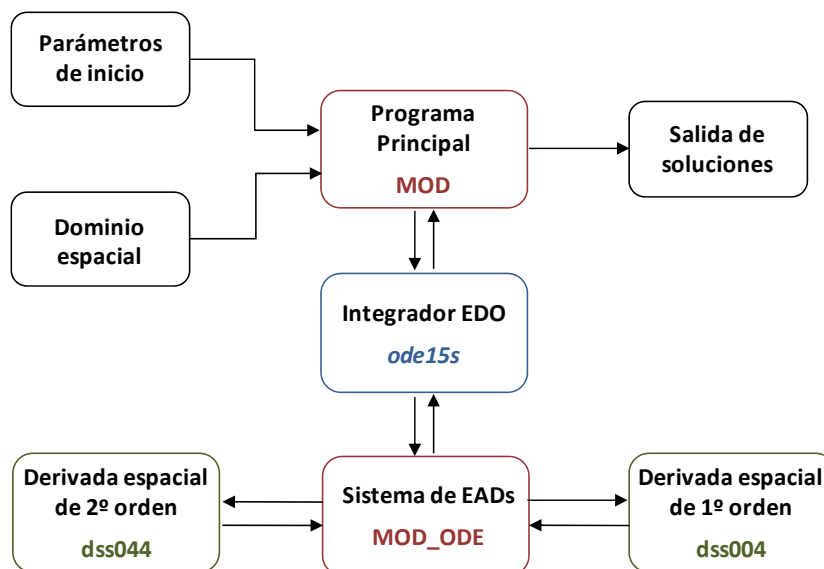


Figura 8. Diagrama de la solución por el método de líneas (MOL) para los modelos de transporte en una plataforma MATLAB.

3.3.3.1 Solución del modelo de transporte de adsorción por lotes

Como sistema modelo se utilizaron datos experimentales de la literatura que describen la adsorción de β -galactosidasa en anti- β -galactosidasa inmovilizada en partículas de sílice porosa (Arve y Liapis, 1987). El modelo de transporte, dado por las ecs. (2 – 9) fue resuelto utilizando el método de líneas (MOL) por medio de la secuencia descrita en la Figura 8, en una plataforma MATLAB, en una computadora personal con procesador Pentium®4. Los valores de los parámetros utilizados para conducir los estudios de la simulación se presentan en la Tabla 3. Esta solución fue comparada con la solución analítica del modelo de parámetros agrupados por lotes, dado por las ecs. (10 – 12) y con los datos experimentales.

En la solución numérica del modelo, la partícula adsorbente se subdividió, se discretizó, usando un número n de puntos en la malla de 10 a 100, con los parámetros del integrador *ode15s* de MATLAB, ajustados a $AbsTol = 10^{-6}$ y $RelTol = 10^{-3}$. Se hizo un análisis de malla para comparar las

diferentes soluciones. No se observó una diferencia significativa al incrementar los puntos de discretización. La solución resultante con 50 nodos se encontró robusta y estable numéricamente.

Tabla 3. Valores de los parámetros utilizados en los estudios de simulación del sistema de adsorción de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa inmovilizada en sílice porosa (Arve y Liapis, 1987).

Parámetro	Valor
Conc. inicial de proteína en el tanque	$c_o = 0.0158 \text{ mg/mL}$
Capacidad de adsorción máxima	$q_{ma} = 2.2 \text{ mg/mL}$ de adsorbente
Porosidad de partícula	$\varepsilon_i = 0.5$
Capacidad de adsorción máxima	$q_m = 4.4 \text{ mg/mL}$ de sólido
Constante de desorción de equilibrio	$K_d = 0.00022 \text{ mg/mL}$
Constante cinética agrupada	$k_{a1} = 0.0055 \text{ mL/mg} - s$
Constante de adsorción intrínseca	$k_1 = 0.0235 \text{ mL/mg} - s$
Radio de la partícula	$r_m = 75 \mu\text{m}$
Coef. de transf. de masa en película	$k_f = 5.84 \times 10^{-6} \text{ m/s}$
Difusividad de proteína en el poro	$D_i = 6.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$
Volumen de solución inicial	$V = 100 \text{ mL}$
Volumen de adsorbente añadido	$v = 1.5 \text{ mL}$
Volumen solución / Volumen total	$\varepsilon_b = 100/101.5$

Estimación de parámetros. Los parámetros que caracterizan el equilibrio del sistema: la capacidad máxima de adsorción, q_m y la constante de disociación de equilibrio, $K_d = k_{-1}/k_1$, pueden ser estimadas a partir de datos del sistema de adsorción por lotes en equilibrio. El parámetro cinético k_1 puede ser calculado de datos dinámicos obtenidos en sistemas por lotes o en columnas (Horstmann y Chase, 1989; Chase, 1984).

La difusividad efectiva D_i puede estimarse mediante experimentos de adsorción en lotes o en columna de acuerdo a los procedimientos detallados reportados en la literatura (Liapis, 1990). Este parámetro también ha sido estimado en forma precisa utilizando modelos generados para adsorbentes de estructura porosa obtenidos mediante la teoría de redes. Esta teoría representa en forma apropiada la naturaleza discreta de las estructuras porosas de los medios

cromatográficos y sirve para describir la difusión restringida en el poro y efectos de adsorción dinámica dentro de la partícula por convección y difusión (Meyers *et al.*, 2001, 2001a). En algunos trabajos la difusividad efectiva dentro del poro ha sido estimada combinando el método experimental de la microscopía laser de escaneo confocal con los modelos matemáticos de cromatografía (Ljunglöf *et al.*, 1999, 1998).

La difusividad molecular de la β -galactosidasa en solución acuosa, D_{AB} puede estimarse usando la siguiente ecuación semi-empírica (Guichon *et al.*, 1994).

$$D_{AB} = 9.4 \times 10^{-15} \frac{T}{\mu(M_A)^{\frac{1}{3}}} \quad (31)$$

donde M_A es el peso molecular promedio de la sustancia A. Tomando 464,000 g/mol como peso molecular promedio de la β -galactosidasa, la temperatura absoluta, $T = 298 \text{ }^\circ K$, y la viscosidad del liquido, $\mu = 1 \times 10^{-3} \text{ kg/m-s}$, el valor del coeficiente de difusión molecular es $D_{AB} = 3.62 \times 10^{-11} \text{ m}^2/s$. La difusividad efectiva en el poro está dada por la relación entre la difusividad molecular y la tortuosidad. De acuerdo a Arve y Liapis (1987) la tortuosidad experimental del sistema es 5.23, de esta forma $D_i = 6.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2/s$.

La correlación usada para estimar el coeficiente de transferencia de masa en la película líquida, k_f , de proteína en partículas adsorbentes en experimentos en tanque agitado puede ser estimada mediante correlaciones empíricas (Geankoplis, 1998):

$$k_f = \frac{2D_{AB}}{d_p} + 0.31 \left(\frac{\mu}{\rho_c D_{AB}} \right)^{\frac{2}{3}} \left(\frac{\Delta\rho \mu g}{\rho_c^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (32)$$

donde $\rho_c = 1000 \text{ Kg/m}^3$ es la densidad del agua, $\Delta\rho = 402 \text{ Kg/m}^3$ es la diferencia de densidad entre la partícula adsorbente y el líquido y $g = 9.8 \text{ m/s}^2$ es la aceleración de la gravedad. Para un

diámetro de partícula $d_p = 150 \times 10^{-6} m$, el valor del coeficiente de transferencia de masa es $k_f = 5.84 \times 10^{-6} m/s$.

Análisis paramétrico. Para describir en forma más detallada cómo la solución del modelo de transporte es útil para considerar las variaciones en las condiciones de operación, se desarrolló un análisis paramétrico.

3.3.3.2 Solución del modelo de transporte de cromatografía en columna de membranas

Como sistema modelo se utilizaron los datos experimentales obtenidos por Montesinos-Cisneros *et al.*, (2007), describiendo la cromatografía frontal de pCI DNA en una columna de membranas de intercambio iónico. El modelo de transporte para la cromatografía en columna de membranas, dado por las ecs. (13 – 18) y (20 – 23) fue resuelto utilizando el método de líneas (*MOL*) por medio de la secuencia descrita en la Figura 8, en una plataforma MATLAB, en una computadora personal con procesador Pentium®4. Los valores de los parámetros físicos y de proceso para realizar los estudios de simulación se presentan en la Tabla 4. Esta solución fue comparada con los datos experimentales.

En la solución *MOL*, la columna fue discretizada en n número de nodos de 101 a 1001, con los parámetros del integrador *ode15s* de MATLAB, ajustados a $AbsTol = 10^{-8}$ y $RelTol = 10^{-5}$. Se hizo un análisis de malla para comparar la forma de la curva de ruptura (BTC) usando diferente número de nodos de discretización. Se observó un significativo incremento en la dispersión de la curva cuando se disminuyó el número de puntos de discretización. La solución resultante con 401 nodos se encontró robusta y estable numéricamente.

Estimación de parámetros. La estimación de los parámetros q_m , K_d y k_1 del modelo de cromatografía en columna de membranas presentado en las ecs. (13 – 18) y (20 – 23) se hizo en un modo iterativo. En cada iteración el modelo de columna de membranas se resolvió usando un

conjunto de parámetros estimados y la salida se comparó con los datos experimentales, por medio de la suma de los cuadrados residuales. Sólo la región para $c/c_0 < 0.8$ de cada BTC se seleccionó para comparar el modelo de columna con membranas con los datos experimentales.

Tabla 4. Valores de los parámetros utilizados en los estudios de simulación de cromatografía frontal de pCl DNA en una columna de membranas de intercambio iónico (Montesinos-Cisneros et al., 2007).

Parámetro	Valor
Conc. de entrada de pCl-DNA	$c_0 = 0.1, 0.2$ y 0.5 mg/mL
Capacidad de adsorción máxima	$q_m = 16.19$ mg/mL
Constante de equilibrio experimental	$K_d = 0.11$ mg/mL
Constante de vel. de adsorción	$k_1 = 0.5$ mL/mg – s
Flujo	$F = 0.13, 0.26$ y 0.32 mL/min
Velocidad intersticial x 10^2	$v = 1.58, 3.15, 6.3$ cm/s
Porosidad de membrana	$\varepsilon = 0.7$
Longitud de la columna	$L = 0.45$ cm
Diámetro de la membrana	$D = 0.5$ cm
Volumen de lecho	$v = 0.088$ mL
Coefficiente de dispersión axial estimado	$D_{ax} = 4.56 \times 10^{-8}$ cm ² /s
Tiempo de residencia en el sistema de cromatografía	$\tau = 3 - 12$ min
Volumen PFR	$0.75 - 0.90$ mL
Volumen CSTR	$0.6 - 0.90$ mL

La función para ser minimizada usando la rutina de optimización Nelder-Mead simplex es:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (C_{exp\ i} - C_{sim\ i})^2}{n - K} \quad (33)$$

En la ecuación anterior $C_{exp\ i}$ y $C_{sim\ i}$ son los valores de la concentración adimensional de pDNA, experimentales y simulados en el tiempo i ; n es el número de datos en el experimento y K es el número de parámetros estimado. Al final de cada iteración, los parámetros optimizados son alimentados a las ecuaciones del modelo, el cual se resuelve otra vez. Este algoritmo iterativo se termina cuando se obtiene el conjunto de parámetros globales óptimos. La característica de

“global” de los parámetros se prueba empezando este algoritmo con diferentes valores de los parámetros iniciales y alcanzando el mismo conjunto óptimo (Avci *et al.*, 2000).

Considerando que en el sistema de membranas el coeficiente de dispersión axial puede ser aproximado por la difusividad del soluto (Suen y Etzel, 1992), este coeficiente se estimó usando la correlación de He-Niemeyer (He y Niemeyer, 2003),

$$D_{AB} = \frac{6.85 \times 10^{-8} T}{\mu \sqrt{M^{1/3} R_g}} \quad (34)$$

donde μ es la viscosidad en cp; T la temperatura en $^{\circ}\text{K}$; $M = 660 \times N$ el peso molecular en g/mol y $R_g = 1.59 \times 10^{-5} \text{ cm}$ el radio de giro (Montesinos-Cisneros *et al.*, 2007). El coeficiente de dispersión axial fue $D_{ax} = 4.56 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/s$.

Una vez que los valores de los parámetros que caracterizan los mecanismos de transferencia de masa y de adsorción en el sistema han sido determinados, los modelos matemáticos correspondientes pueden ser utilizados para predecir y estudiar el comportamiento dinámico del sistema bajo diferentes condiciones de diseño y operación.

3.4 Proceso Base de Producción de Plásmido

En esta sección se describe el proceso base establecido previamente (Diogo *et al.*, 2001) para producir plásmido purificado (Fig. 9). El plásmido obtenido por medio de este proceso se usó la preparación de muestras para construir la curva estándar para pVAX-LacZ. El proceso consta de las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido.

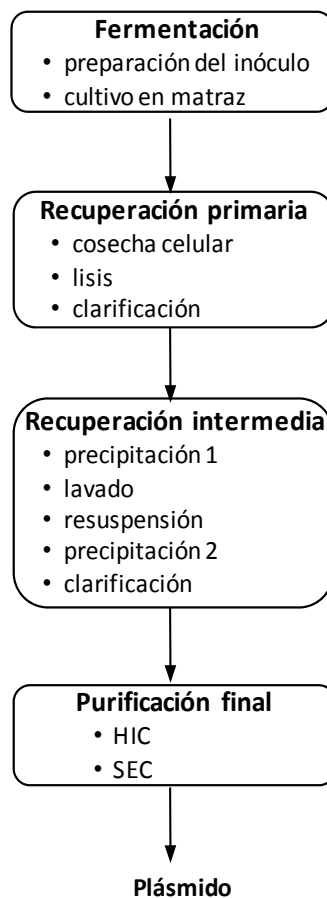


Figura 9. Diagrama de bloques del Proceso Base para la producción de plásmido. Adaptado de Diogo *et al.*, (2001).

3.4.1 Fermentación de *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ)

La etapa de fermentación del proceso base comprende las operaciones de preparación de inóculo y cultivo en matraz.

Preparación del inóculo. Se prepararon 30 mL de medio de cultivo LB de concentración 20 g/L en matraces de 100 mL, que se sometieron a esterilización a 120 °C por 20 min. Al medio se añadieron 30 μ L de una solución de kanamicina de 30 mg/mL, previamente filtrada con un filtro de jeringa estéril 0.2 μ m. El medio fue inoculado utilizando un vial con 100 μ L (80 μ L de cultivo + 20 μ L de glicerol, congelado a -80°C) de *E. coli* DH5 α conteniendo pVAX1-LacZ. El cultivo se realizó en la incubadora a temperatura de 37 °C y agitación de 250 rpm, de 6 a 8 h, hasta alcanzar una densidad óptica, de aproximadamente 1.2 ($DO_{600} \approx 1.2$), a 600 nm.

Cultivo en matraz. La obtención de la biomasa se realizó mediante cultivos en matraces de 2 L con 250 mL de medio LB estéril (20 g/L). Se calculó el volumen de inóculo (V_i) necesario para que al inicio del cultivo el índice de masa fuera de 25 ($DO_{600} \times V_i = 25$). El volumen de inóculo se centrifugó a 4500 g por 2 min, para obtener el pellet de células. Para iniciar el crecimiento celular, se añadieron al medio de cultivo el pellet de células y 250 μ L de una solución kanamicina de 30 mg/mL, previamente filtrada. El cultivo se desarrolló en una incubadora a 37 °C y 250 rpm, por un período de 12 a 14 h, hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 3.8$.

3.4.2 Recuperación primaria

La recuperación primaria en el proceso base comprende las operaciones de cosecha celular, lisis y clarificación.

Cosecha celular. Al finalizar el cultivo las células fueron cosechadas a 3500 g, 4 °C por 20 min, en una centrifuga Sorvall RC 6 equipada con rotor SLA 3000.

Lisis. La biomasa cosechada de 250 *mL* de cultivo, se resuspendió en 8 *mL* de buffer Tris 25 mM, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM, pH 8.0 (proporción 32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cultivo). Para realizar la lisis alcalina se agregó un volumen igual de buffer de lisis (NaOH 0.2 M y 1% SDS). Posteriormente se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se neutralizó el lisado con 8 *mL* de una solución de acetato de potasio 3.0 M a pH 5.5 y 4 °C (32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cultivo), se agita suavemente y se incubó en hielo por 10 minutos.

Clarificación. El lisado conteniendo el plásmido fue clarificado mediante la remoción del precipitado formado durante la etapa de lisis (restos celulares, DNA genómico y proteínas) por centrifugación a 12 000 g por 30 min, a 4 °C en una centrifuga Sorvall equipada con rotor SS 34, en 2 pasos. Para control del proceso se toman muestras de cultivo lisado para su análisis por electroforesis para determinar las condiciones del plásmido contenido en el lisado clarificado.

3.4.3 Recuperación intermedia

La etapa de recuperación intermedia consta de las operaciones de precipitación 1, lavado, resuspensión, precipitación 2 y clarificación.

Precipitación 1. Para iniciar la purificación del plásmido el lisado clarificado se mezcló con isopropanol en proporción 0.7 (v/v), se incubó por 2 h a -20 °C. El precipitado formado se recuperó por centrifugación en una centrifuga Sorvall RC 6 equipada con rotor SS 34 a 12 000 g por 15 min a 4 °C.

Lavado. Al pellet obtenido se le adicionaron 2 *mL* (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cultivo) de etanol al 70% (v/v) y posteriormente se centrifugó a 12 000 g por 15 min a 4 °C.

Resuspensión. El pellet fue secado al aire durante 5 a 10 min invertido sobre papel. Una vez seco se resuspendió en 500 μL (2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cultivo) de buffer Tris 10 mM/HCl pH 8.0.

Precipitación 2. El plásmido se pre-purificó a partir de la solución anterior, mediante la adición de 0.16 g de sulfato de amonio sólido, para alcanzar en la solución una concentración 2.5 M. Se homogenizó bien y se dejó reposar en hielo por 15 min.

Clarificación. Se remueven las impurezas precipitadas mediante centrifugación a 12 000 g por 15 min, a 4 °C en una Centrifuga 5417 C de Eppendor para obtener una solución concentrada de plásmido.

3.4.4 Purificación final

La etapa de purificación final del proceso base comprende las operaciones cromatográficas de interacción hidrofóbica (HIC) y de exclusión por tamaño (SEC).

Purificación HIC. En la purificación del plásmido se utilizó una columna cromatográfica Econo Pac desechable, de 20 mL fue empacada con 10 mL Phenyl Sepharose 6 fast flow (Fig. 10). Los pasos de la operación de la columna se muestran en la Figura 11. Inicialmente, se equilibró la columna por flujo por gravedad con 20 mL de una solución de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl, pH 8. Seguidamente, se cargó directamente a la columna 0.5 mL de solución concentrada de plásmido. Después de que la solución alimentada entró a la columna, se hizo una elución isocrática con 3 mL una solución de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl pH 8. Después de descartar el primer volumen eluido de 3 mL, se adicionan 2 mL de la solución de sulfato de amonio, colectándose simultáneamente este mismo volumen con el plásmido purificado. Después de la elución de las especies no adsorbidas (pDNA), se redujo la fuerza iónica del buffer pasando 20 mL de solución Tris 10 mM /HCl, pH 8.0 para eluir las especies retenidas. Finalmente la columna se reequilibró con 20 mL de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl pH 8.



Figura 10. Arreglo experimental de columnas cromatograficas empacadas con Phenyl Sepharose 6 fast flow, operadas por gravedad.

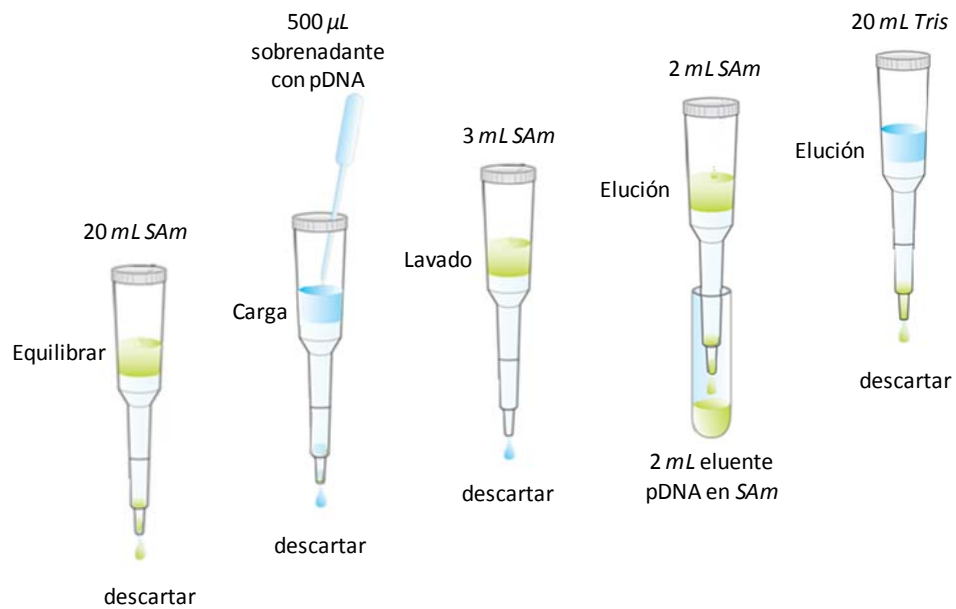


Figura 11. Proceso HIC para purificación de pDNA. *SAm* = sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl pH8. *Tris* = Tris 10 mM /HCl pH 8.

Purificación SEC. La fracción de 2 *mL* colectada en la purificación por HIC conteniendo el plásmido en buffer salino, fue desalada en una columna cromatográfica de exclusión por tamaño (SEC). En la Figura 12 se describen pasos que comprenden esta operación. Inicialmente la columna cromatográfica Econo Pac de 20 *mL* utilizada, fue empacada con 10 *mL* Phenyl Sepharose 6 fast flow y equilibrada por flujo por gravedad con 20 *mL* de Tris 10 mM/HCl pH 8.0. A continuación se cargó directamente a la columna los 2 *mL* de la solución de plásmido y se descarta el volumen eluido. Seguidamente, se efectuó una elución isocrática con 1.5 *mL* de una solución Tris 10 mM/HCl pH 8. Las especies de mayor peso molecular fueron excluidas de los poros de la matriz y se descartó el primer volumen eluido de 1.5 *mL*. Para recolectar el plásmido purificado, se alimentaron a la columna 3 *mL* de buffer Tris 10 mM/HCl para eluir y colectar la fracción conteniendo pDNA (3 *mL*). Para eluir las especies de menor peso molecular contenidas aún en la columna, se alimentaron 20 *mL* de buffer Tris. Finalmente se reequilibra la columna con 20 *mL* de buffer Tris 10 mM/HCl.

Para almacenar las columnas HIC y SEC temporalmente, se lavaron con 2 volúmenes de una solución NaOH 1.0 M, seguido de 3 volúmenes de agua destilada y 2 volúmenes de etanol al 70%. Se guardan en etanol al 20%. Para su uso de nuevo se lavan con 5 volúmenes de agua destilada.

Con el propósito de establecer un patrón de comparación del plásmido purificado por el método base, se preparó un estándar de plásmido purificado usando un kit comercial, (High Pure Plasmid Isolation), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

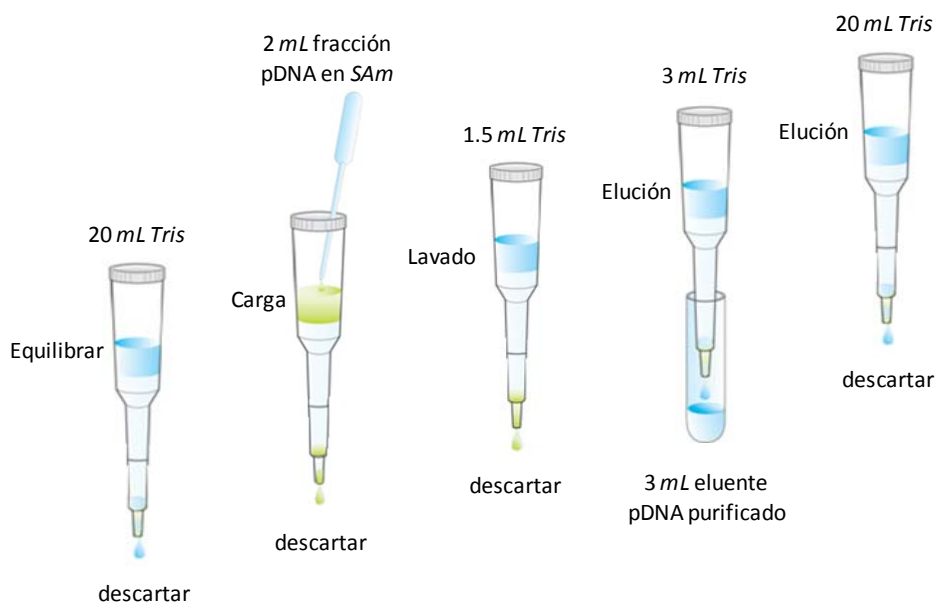


Figura 12. Proceso SEC para purificación de pDNA. *SAm* = sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl pH 8. *Tris* = Tris 10 mM /HCl pH 8.

3.5 Proceso de Producción de Plásmido por Cromatografía Frontal de Intercambio Iónico en Membranas

El proceso de producción de plásmido por Cromatografía Frontal de Intercambio Iónico en Membranas (FAEMC) se desarrolló de acuerdo a la Figura 13. El proceso consta de las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido.

3.5.1 Fermentación de *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ)

La etapa de fermentación del proceso comprende las operaciones de preparación del inóculo y propagación celular.

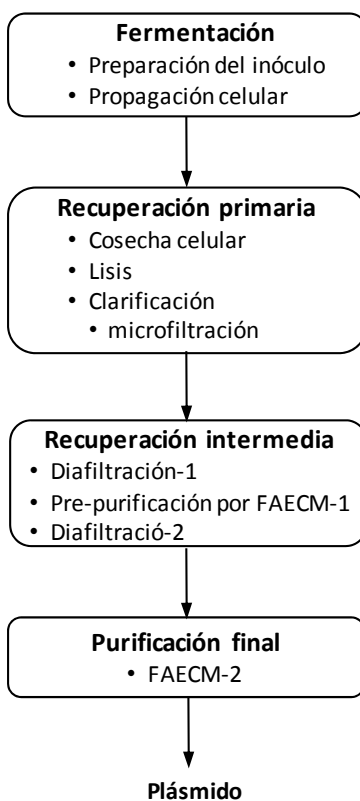


Figura 13. Diagrama de bloques del Proceso FAEMC para la producción de plásmido.

Propagación celular. Esta operación se realizó en un fermentador de 3.5 L (Fig. 14), con 2 L de medio complejo (1% triptona, 2% extracto de levadura, 1% cloruro de sodio y 2% glucosa monohidratada) esterilizado en el fermentador a 120°C por 20 min. Antes de inocular el medio se le añadieron 2 mL de una solución de kanamicina de 30 mg/mL. La inoculación se realizó con 200 mL de cultivo en matraz de *E. coli* DH5 α conteniendo pVAX1-LacZ en un medio similar, incubado de 10 a 12 h, con DO₆₀₀ de aproximadamente 3. La fermentación se realizó a 37°C. El oxígeno disuelto se mantuvo al 30% (2.04 mg/L) utilizando una agitación de 650 rpm y una aireación 1.5 vvm. El pH se mantuvo a un valor de 7 mediante la adición controlada de soluciones de NaOH 1.0 N y H₂SO₄ 1.0 N.

Para dar seguimiento al crecimiento celular y efectuar determinaciones de contenido plasmídico se tomaron muestras al inicio y a cada hora durante la fermentación, a las cuales se les determinó su DO₆₀₀.



Figura 14. Fermentador de 3.5 litros Biostat MD.

Para determinar la concentración y pureza de plásmido, las muestras fueron sometidas a un proceso de lisis y clarificación. Se calculó el volumen de cultivo (V_c) necesario para el índice de masa fuera de 25 ($DO_{600} \times V_c = 25$), para obtener la misma masa celular en cada una de las

muestras (Passarinha *et al.*, 2006). Las muestras de lisado clarificado fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa para visualizar el estado del plásmido y por HIC-HPLC (Diogo *et al.*, 2003).

Una muestra de la fermentación a las 24 h con $DO_{600} = 8.32$ fue purificada utilizando un kit comercial, (High Pure Plasmid Isolation) para visualizar el estado del plásmido purificado proveniente de la fermentación.

3.5.2 Recuperación primaria

La etapa de recuperación primaria del proceso comprende las operaciones de cosecha celular, lisis y clarificación. Estas se realizaron conforme al procedimiento para el proceso base, sólo que en la operación de clarificación del lisado alcalino, además de centrifugación, también se usó un paso adicional de microfiltración. El lisado se diluyó con buffer Tris 10 mM/EDTA 1 mM/HCl, pH 8.0 (buffer TE) en relación de 1:2 y se hizo pasar por un filtro de $0.45 \mu m$ a vacío para eliminar partículas en suspensión remanentes.

3.5.3 Recuperación intermedia

La etapa de recuperación intermedia consta de la operación de diafiltración-1, pre-purificación por AEC en membranas y diafiltración-2.

Diafiltración-1. Esta operación se realizó en una membrana de fibra hueca por filtración de flujo tangencial (TFF), usando el buffer TE para el lavado, operado en modo de diafiltración para desalinizar el lisado. El sistema experimental utilizado se presenta en la Figura 15. La parte central del sistema es la unidad de filtración de membranas de fibras huecas (Fig. 15a). El sistema integrado consta, además la membrana, de una bomba peristáltica y un sistema de medición de presión. Este sistema se utiliza para monitorear la presión de los flujos mediante transductores conectados a una unidad digital (Fig. 15b). Antes de operar el sistema se verificó el

comportamiento hidrodinámico, utilizando buffer TE como fluido de prueba. El diagrama de flujo del sistema de diafiltración TFF se muestra en la Figura 16.

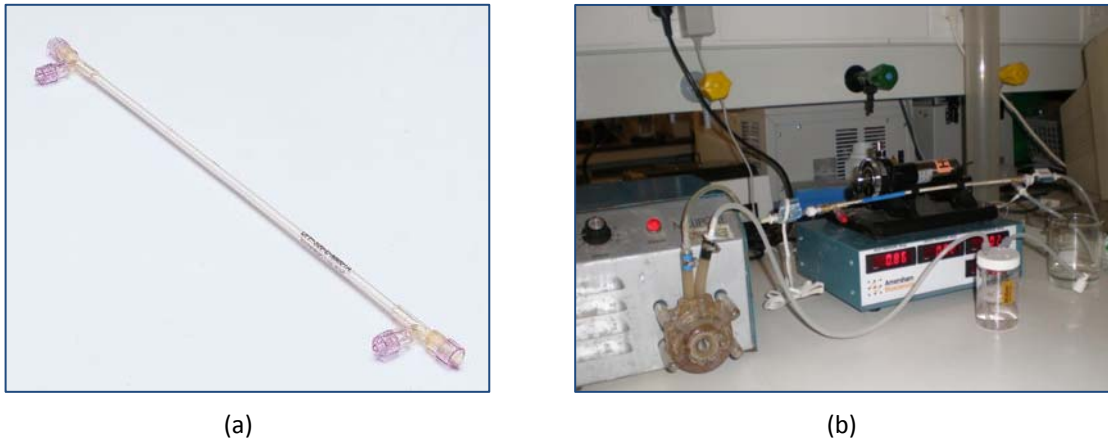


Figura 15. (a) cartucho de fibras huecas con membranas de polisulfona. (b) Sistema experimental (Midjet benchtop) para filtración de flujo tangencial.

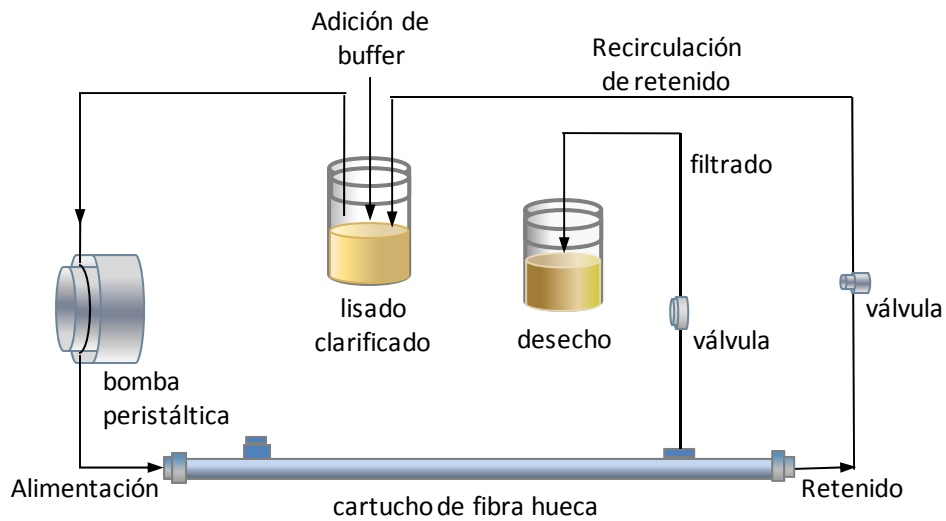


Figura 16. Diagrama de flujo del sistema de diafiltración de flujo tangencial.

Para preparar la solución llamada retenido-1, se conectó la línea de entrada y salida del sistema a un recipiente conteniendo 33 mL de lisado y un volumen de buffer TE. Se puso en marcha la bomba de alimentación, manteniendo el flujo de recirculación a 30 mL/min en promedio, mediante el control de la válvula de recirculación, de tal manera que la presión de entrada y salida de lisado fue de 50 a 150 kPa. Una vez que el volumen del lisado concentrado se redujo a 33 mL, se agregó un volumen de buffer TE igual al volumen de filtrado colectado (33 mL) y se empezó un ciclo de diafiltración. La operación se continuó repitiendo 3 veces más el ciclo de diafiltración, y finalmente se concentró hasta un volumen de 26.0 mL (1.27 veces). Como control del proceso se midió la conductividad del lisado retenido al final de cada ciclo.

El sistema se lavó corriendo 2 L de agua destilada y con recirculación de una solución de NaOH 0.2 M por 1 h. Finalmente para remover el NaOH se lavó con 2 L de agua destilada, y después se recirculó etanol al 20% para guardar la membrana.

Pre-purificación. Todos los estudios cromatográficos del presente trabajo se realizaron en un sistema Äkta Purifier de GE Healthcare equipado con un software Unicorn 5.1 para el registro y procesamiento de datos (Fig. 17). La corriente de salida de la columna cromatográfica fue monitoreada continuamente para determinar su conductividad y absorbancia a 260 nm (UV).

En los experimentos de cromatografía por intercambio iónico se usó una columna (0.5 × 5 cm) de Pharmacia Amersham Biosciences, Figura 18a, empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q, acondicionadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Anexo A).

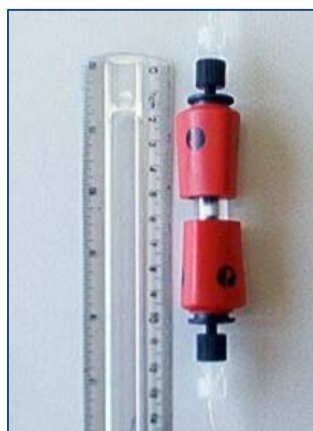
Antes de iniciar una corrida se verificó el correcto funcionamiento del sistema hidráulico y se conectó al sistema la columna empacada en buffer de adsorción, Tris 10 mM/EDTA 1 mM/HCl, pH 8.0, (buffer TE), Figura 18b.

Operando el sistema en modo manual, se llenaron las líneas que corresponden a los buffers de adsorción y de elución. El buffer de elución utilizado fue una solución de NaCl 2.0 M en buffer TE.

Para acondicionar la columna, se alimentó buffer de adsorción a un flujo a 0.5 mL/min por un periodo aproximado de 10 min (10 volúmenes de lecho, VL), hasta obtener valores de absorbancia, conductividad y presión constantes. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.



Figura 17. Sistema Äkta Purifier acoplado a una computadora para registro y procesamiento de datos.



(a)



(b)

Figura 18. (a) Columna de Pharmacia Amersham Biosciences, empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q; (b) Columna de cromatografía de intercambio iónico conectada al sistema Äkta Purifier.

La solución obtenida en la operación de diafiltración-1 (retenido-1), se pre-purificó mediante cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico (FAEMC-1) en la columna conectada al sistema Äkta Purifier. Al inicio de cada corrida, durante la fase de adsorción, se alimentó el retenido-1 con flujo de 0.5 mL/min por un periodo entre 10 y 30 min. Una vez transcurrido este periodo, durante la fase de lavado, se alimentó a la columna una solución de NaCl 0.6 M en TE. Al terminar esta fase se realizó la elución de la columna incrementando la salinidad del buffer de 0.6 a 2.0 M, de acuerdo al programa previamente seleccionado.

Se realizaron 7 corridas (A, B, C, D, E, F y G), las tres primeras con el propósito de estudiar el tiempo de lavado y el gradiente de elución. Durante los estudios cromatográficos se colectaron muestras de 1.5 mL de la solución de salida de la columna durante las fases de adsorción, lavado y elución, y se analizaron por electroforesis. Con base a estos resultados, se seleccionó el programa para la pre-purificación por cromatografía frontal.

La corrida D se realizó para probar el programa seleccionado. Las tres restantes (corridas E, F y G) se realizaron a las mismas condiciones de la corrida D, con el propósito de producir más volumen de elución utilizando el programa seleccionado, también analizadas electroforéticamente. En estos estudios el volumen de las fracciones colectadas en la elución se redujo a 1 mL. El volumen total de las muestras seleccionadas fue 16 mL, y se utilizó para realizar las siguientes operaciones del proceso. De las fracciones seleccionadas de la corrida D se tomaron muestra de 200 µL para su análisis por HIC-HPLC.

Diafiltración-2. Con el propósito de acondicionar la solución pre-purificada para la etapa de purificación final, se sometió a un proceso de diafiltración por TFF siguiendo el protocolo descrito en la diafiltración-1. A la operación se le dio seguimiento midiendo la conductividad del retenido. Para alcanzar la conductividad del buffer TE se emplearon 4 volúmenes de buffer TE (64 mL). Al

final de este periodo la solución se concentró 1.6 veces (10 *mL*). Se hizo el análisis electroforético y por HIC-HPLC del volumen retenido-2.

3.5.4 Purificación final

La etapa de purificación final del plásmido, se realizó mediante cromatografía frontal en membranas de intercambio iónico (FAEMC-2). Para realizar la purificación final de plásmido, se utilizaron 5 *mL* de la solución de retenido-2. Este volumen fue alimentado en modo frontal a una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico, a un flujo de 0.5 *mL*/min, utilizando el programa seleccionado en los estudios de pre-purificación. Durante la corrida se colectaron muestras a la salida de la columna de 1.5 *mL* en las fases de adsorción y lavado y de 0.5 *mL* en la fase de elución. Estas muestras se analizaron por electroforesis. De la fase de elución se seleccionaron 2 fracciones, de las cuales se tomaron 200 μ L para su análisis HIC-HPLC.

3.6 Proceso de Producción de Plásmido por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

La producción de plásmido por el proceso combinado de FAEMC con cromatografía de interacción hidrofóbica (FAEMC-HIC) se desarrolló de acuerdo al diagrama de la Figura 19. El proceso consta de las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido.

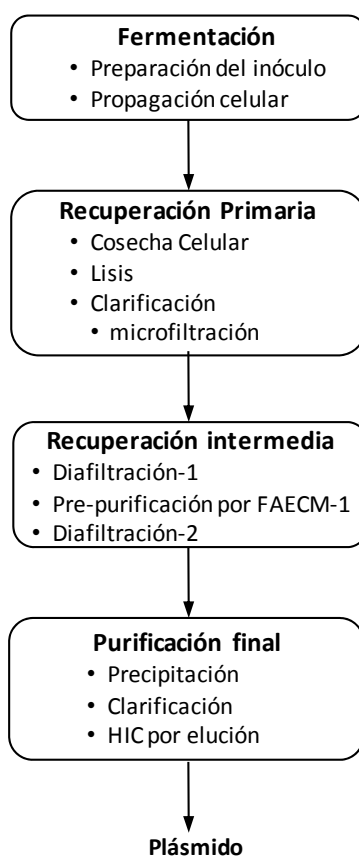


Figura 19. Diagrama de bloques del Proceso FAEMC-HIC para la producción de Plásmido.

3.6.1 Fermentación de *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ), recuperación primaria y recuperación intermedia

En este proceso, las etapas de fermentación, recuperación primaria y recuperación intermedia son iguales a las del proceso anteriormente descrito.

3.6.2 Purificación final

La etapa de purificación final en este proceso consta de las operaciones de precipitación, clarificación y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) por elución.

Precipitación. Esta operación se realizó para eliminar parte del gDNA, endotoxinas y proteínas en la muestra conteniendo plásmido (retenido-2), así como para su acondicionamiento para la operación HIC. A 5 mL de retenido-2 se les adicionó sulfato de amonio sólido hasta obtener una concentración de 1.5 M y se incubó en hielo por 15 min.

Clarificación. El precipitado formado fue removido por centrifugación a 7 000 g por 5 min a 10°C en unidades de microconos UF de Millipore, con membrana de 10 kDa en Centrifuga 5417 C de Eppendorf.

Cromatografía por elución en HIC. En la cromatografía por elución de interacción hidrofóbica se utilizó una columna (0.7 \times 2.5 cm) de GE Healthcare pre-empacada con 1 mL de resina Phenyl Sepharose 6 fast flow conectada al sistema Äkta Purifier (Fig. 20).

La columna se equilibró previamente con 20 mL de buffer de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM, pH 8, utilizando un flujo de 0.5 mL/min. Se utilizó 1 mL del sobrenadante obtenido en la operación de clarificación (retenido-2 acondicionado), que fue cargado a la columna, utilizando un loop de 0.5 mL. Una vez cargada la muestra, se lava la columna con buffer de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM, pH 8, para recuperar el plásmido. Después del lavado, se realizó una elución isocrática alimentando buffer Tris 10 mM, pH 8, para eluir las impurezas. Durante el estudio se

colectaron muestras de 0.5 *mL* de la solución a la salida de la columna. Estas muestras se analizaron por electroforesis así como por HIC-HPLC.



Figura 20. Columna de interacción hidrofóbica, pre-empacada con 1 *mL* de resina Phenyl Sepharose 6 fast flow.

3.7 Análisis de Muestras

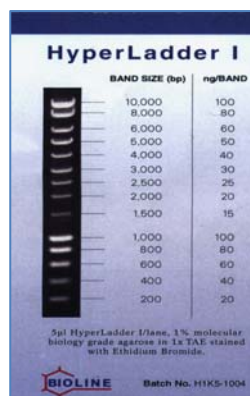
3.7.1 Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de solución conteniendo plásmido se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8%, Figura 21a. El buffer utilizado fue Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM a pH 8 (buffer TAE), como marcador de peso molecular se usó Hyperladder 1 de Bioline, Figura 21b. Los geles se corrieron por 3 h aproximadamente a 60 V, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fueron visualizados bajo luz UV en un sistema de registro de imagen Stratagene Eagle Eye II.

Las muestras conteniendo plásmido en solución con sulfato de amonio se desalaron antes de analizarse en gel de electroforesis. Se utilizaron unidades de microconos UF de Millipore, con membrana de 10 kDa y centrifugando a 3000 rpm por 15 min, a 4 °C en Centrifuga 5417 C de Eppendor.



(a)



(b)

Figura 21. (a) Cámara de electroforesis acoplada a la fuente de poder (b) Certificado del marcador de peso molecular Hyperladder 1 (HL1).

3.7.2 Pureza y concentración de plásmido por HIC-HPLC

La concentración y pureza del plásmido en las muestras obtenidas en las diferentes etapas de los procesos se determinaron HIC-HPLC de acuerdo a la metodología propuesta por Diogo *et al.*, (2003). Se utilizó una columna HIC Source 15 PHE de 0.46 x 10 cm se acoplada sistema Äkta Purifier. Inicialmente la columna se equilibró con una solución de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM/HCl, pH 8. Se inyectó un volumen de 30 μ L de muestra diluida en el buffer de equilibrio. Después de la inyección de la muestra, la columna fue eluída por 1.4 min con el mismo buffer de equilibrio a un flujo de 1 mL/min. Todas las isoformas de pDNA (superenrollado, circular abierto y lineal) los cuales son las especies no adsorbidas, eluyen como un solo pico. Una vez que se obtiene este pico la concentración de sulfato de amonio es disminuida a cero, eluyendo la columna con buffer Tris 10 mM/HCL, pH 8, durante los siguientes 0.9 min, para eluir las especies adsorbidas. Después de este período la concentración de sulfato de amonio fue incrementada al valor inicial para re-equilibrar la columna y eluir el RNA, durante los siguientes 5.5 min. En los cromatogramas de muestras de lisados, en general, se obtuvieron 4 picos como se muestra en la Figura 22: el pico a los 0.68 min corresponde a pDNA total; el pico a los 3.58 min corresponde a RNA de alto peso molecular y gDNA y los otros picos (1.28 y 1.75 min) se atribuyen a RNA de bajo peso molecular y proteínas remanentes, de acuerdo al estudio hecho por Diogo *et al.*, (2003). La concentración de pDNA en una muestra se determinó por medio de la ec. 36 (Anexo B), asociando el área del pico de pDNA.

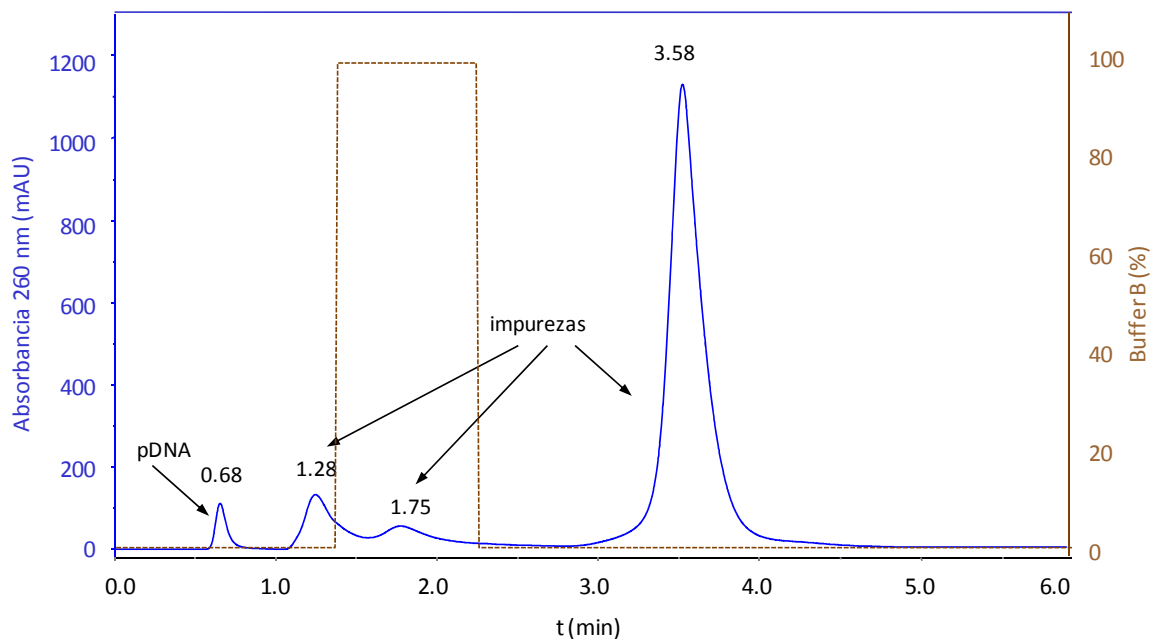


Figura 22. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada lisado alcalino).

El grado de pureza HIC-HPLC del plásmido en una muestra, se definió como la razón porcentual del área del pico de plásmido, entre la suma de las áreas de todos los picos en el cromatograma (Diogo *et al.* 2003). El área total en los cromatogramas de las muestras se corrigió restando el área total de los correspondientes blancos (buffers), preparados igual que las muestras. Es decir, el blanco se prepara de acuerdo al origen de la muestra, *v.g.* lisis, muestras de salida de columna y pDNA purificado. El factor de purificación en una cierta etapa de proceso se calculó con la relación de grado pureza después y antes de esa etapa (Ferrerira *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los estudios de simulación en sistemas por lotes y en columna. Así como de la producción de plásmido pVAX1-LacZ a partir de la célula hospedera *E. coli*, por medio del proceso base o de laboratorio, el proceso FEAMC y el proceso FAEMC-HIC.

4.1 Simulación de Procesos

En esta sección se presentan los resultados de la solución numérica de los modelos de transporte de adsorción por lotes y de cromatografía en columna de membranas, obtenidos por el método de líneas (*MOL*) implementado en una plataforma MATLAB (v.7.1).

4.1.1 Solución numérica del modelo de transporte de adsorción por lotes

La solución *MOL* del modelo de transporte de adsorción por lotes de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa, fue comparada con la solución analítica del modelo de parámetros agrupados y con datos experimentales de Arve y Liapis, (1987). Estos resultados se muestran en la Figura 23.

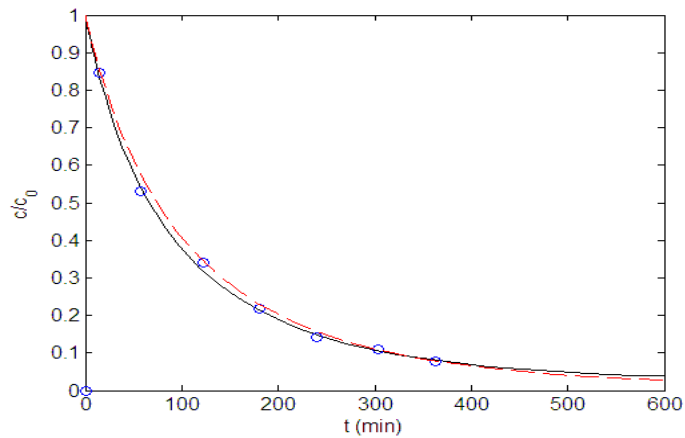


Figura 23. Perfil de concentración de adsorción en lotes de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa inmovilizada en una matriz de sílice porosa. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (o) Datos experimentales (Arve y Liapis, 1987). (—) Solución *MOL* del modelo de transporte de cromatografía por lotes en una plataforma MATLAB. (- - -) Solución del modelo de parámetros agrupados.

La corrida de simulación con la solución *MOL* se ajusta bien a los datos experimentales, cuando se usan los valores de los parámetros base, excepto para el parámetro cinético que fue ajustado a un valor relativamente alto de $k_1 = 0.0235 \text{ mL/mg-s}$, dado que en el modelo, este no es un parámetro agrupado. Esto sugiere que el proceso de transferencia de masa está controlado, solamente, por la difusión intrapartícula y la resistencia en la película. También la corrida de simulación con la solución analítica se ajusta bien a los datos experimentales usando el valor de la constante cinética agrupada $k_{11} = 0.0055 \text{ mL/mg-s}$. Es bien sabido que el método de parámetros agrupados es más útil cuando las resistencias de transferencia de masa son bajas.

La solución *MOL* del modelo de transporte se utilizó para describir en forma más detallada el proceso de adsorción, por medio de los perfiles de concentración adimensional en el líquido del poro, c_i/c_0 y en la fase sólida, q_i/q_m , en función del radio adimensional, R , y el tiempo real, t (Fig.24).

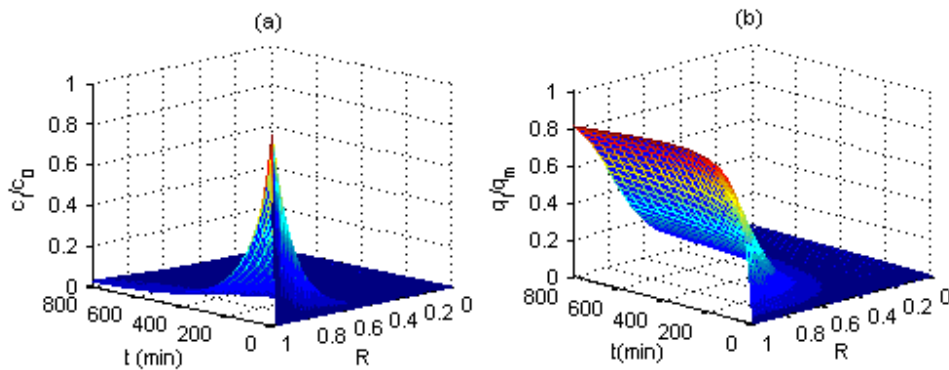


Figura 24. Perfil de concentración de β -galactosidasa sobre anti- β -galactosidasa inmovilizada en una matriz de sílice porosa. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (a) Perfiles de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (b) Perfiles de concentración adimensional de la proteína en el adsorbente.

Se observa un perfil de concentración de proteína muy agudo en la etapa inicial del proceso de adsorción (Fig. 24a), que sugiere una considerable resistencia a la transferencia de masa dentro del poro del adsorbente. A medida que la adsorción prosigue, los perfiles de concentración se vuelven menos agudos hasta que se alcanza un perfil de equilibrio muy bajo, aproximadamente después de los 400 minutos. La concentración de proteína en la fase sólida (Fig. 24b) muestra un incremento rápido desde un valor inicial cero, a un valor de equilibrio. Este perfil es más uniforme que el perfil del líquido en poro y alcanza un valor más alto, debido a un equilibrio favorable del sistema del tipo Langmuir. La mayor parte del fenómeno de cromatografía se lleva a cabo en el volumen externo de la partícula ($R > 0.5$), propio de resistencia de transferencia de masa alta dentro de los poros.

Análisis paramétrico. En el proceso de adsorción por lotes se investigó el efecto del diámetro de partícula, como parámetro físico, así como de la concentración inicial de proteína, como parámetro de proceso.

Para estudiar el primer efecto, se hicieron simulaciones con la solución *MOL*, tomando $\pm 40\%$ y $\pm 20\%$ sobre la base de $d_p = 150 \mu m$. En la Figura 25 se muestran las curvas correspondientes. Se obtiene una curva estrecha y en consecuencia mayor productividad en el proceso, cuando se disminuye el diámetro de la partícula (Fig. 25a) La velocidad de adsorción inicial aumenta notoriamente, dado que el tiempo de difusión disminuye debido a la poca difusión asociada. Al mismo tiempo la relación área/volumen se incrementa para una partícula ($3/r_m$) produciendo un incremento del área de transferencia de masa entre la fase líquida y la partícula. Ambos factores contribuyen a incrementar la velocidad de adsorción. Una difusión más pequeña asociada también produce un perfil de concentración menos pronunciado en el adsorbente (Fig. 25b), y prácticamente no hay efecto en el perfil de concentración en el líquido del poro del adsorbente (Fig. 25c y Fig. 25d).

El efecto de la concentración inicial de la proteína se estudió variando $\pm 40\%$ y $\pm 20\%$ sobre la base, $c_o = 0.0158 \text{ mg/mL}$. Las curvas correspondientes se muestran en la Figura 26. A baja concentración inicial se alcanza un mayor grado proporcional de adsorción en el equilibrio, como se puede observar en la parte horizontal de las curvas de la Figura 26a. Se debe tomar en cuenta que la concentración de la proteína está normalizada. Cuando se grafica en esta base, las velocidades de adsorción inicial se ven ligeramente afectadas por la concentración de la proteína. Sin embargo si se considera las cantidades absolutas de la adsorción, el mayor grado y velocidad de adsorción ocurren a concentraciones más altas.

La concentración de proteína en la fase sólida del adsorbente (Fig. 26b) y concentración de proteína en el líquido dentro del poro (Fig. 26c y Fig. 26d) muestran este comportamiento en forma más detallada. La utilización de la capacidad de adsorción de la matriz es mayor a una concentración de soluto más alta, pues se ocupan más sitios disponibles para la adsorción en el adsorbente y favorecen un mayor grado de la adsorción en el equilibrio.

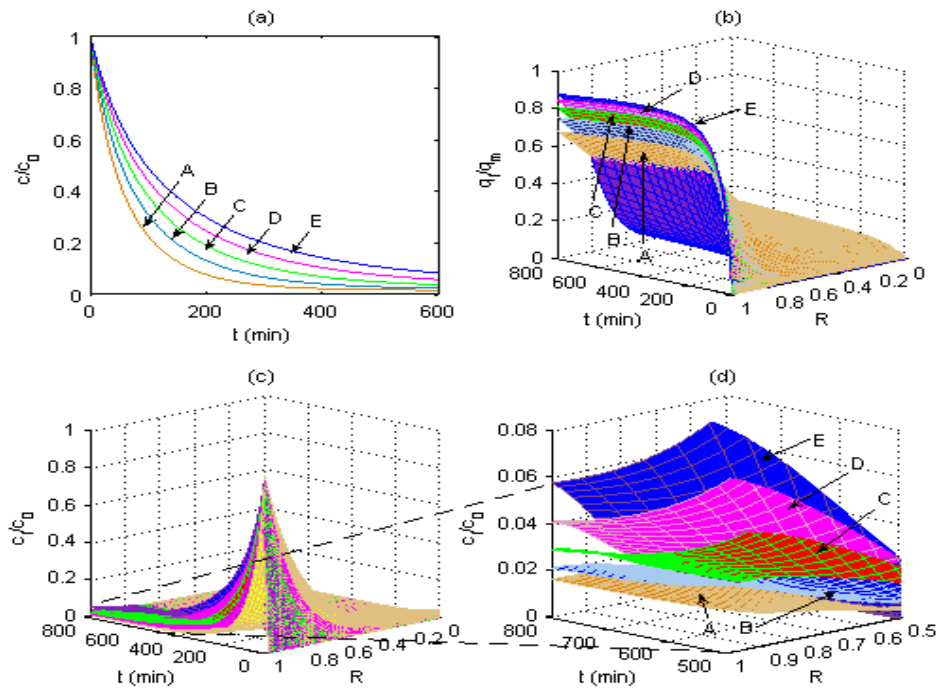


Figura 25. Influencia del diámetro de la partícula. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (a) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el seno del líquido. (b) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el adsorbente. (c) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (d) Ampliación de un área del perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (A) -40%, (B) -20%, (C) $d_p = 150 \mu\text{m}$, (D) +20%, (E) +40%.

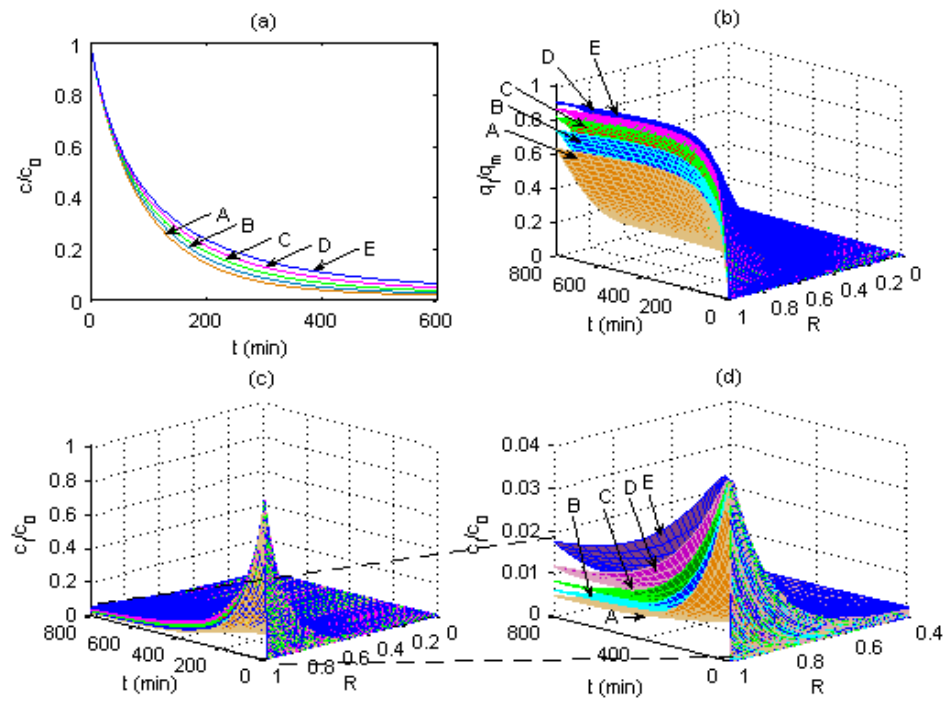


Figura 26. Influencia de la concentración inicial. Condiciones de operación de acuerdo a la Tabla 3. (a) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el seno del líquido. (b) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el adsorbente. (c) Perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (d) Ampliación de un área del perfil de concentración adimensional de la proteína en el líquido del poro del adsorbente. (A) -40%, (B) -20%, (C) $c_0 = 0.0158 \text{ mg/mL}$, (D) +20%, (E) +40%.

4.1.2 Solución numérica del modelo de transporte de cromatografía en columna de membranas

La solución *MOL* del modelo de transporte de cromatografía en columna de membranas de intercambio iónico se comparó con los datos experimentales de Montesinos-Cisneros *et al.*, (2007).

Los datos experimentales de las BTCs obtenidos con flujo constante de $F = 0.13 \text{ mL/min}$ usando tres concentraciones de entrada de pDNA, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL se presentan en la Figura 27; y los datos experimentales de las BTCs obtenidos a concentración de entrada de pDNA constante, $c_0 = 0.1 \text{ mg/mL}$ usando tres flujos, 0.13, 0.26 y 0.52 mL/min se encuentran en la Figura 28. Las BTCs experimentales son las típicas curvas de cromatografía frontal en membrana con valores asintóticos entre $c/c_0 = 0.95$ y $c/c_0 = 1.0$. Cuando la concentración de entrada se incrementa se obtiene una curva de ruptura más anticipada y de mayor pendiente (Fig.27). Se produce un efecto análogo con la variación del flujo (Fig. 28).

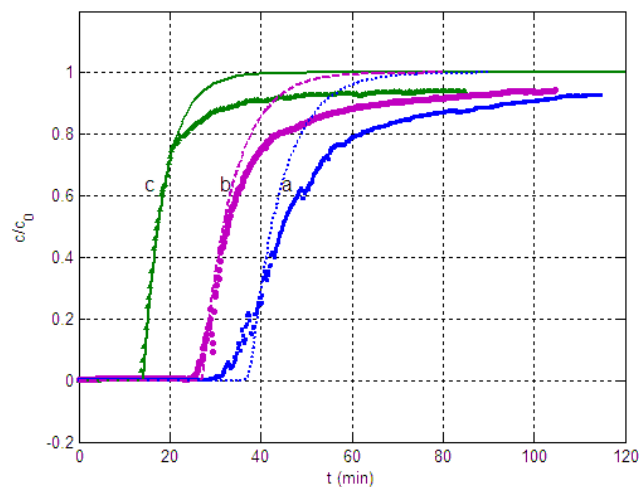


Figura 27. Efecto de la concentración de entrada en el sistema de BTCs obtenidos a flujo de $F = 0.13 \text{ mL/min}$: (a) $c_0 = 0.1 \text{ mg/mL}$, (b) $c_0 = 0.2 \text{ mg/mL}$, (c) $c_0 = 0.5 \text{ mg/mL}$. (\dots , $---$, $-$) valores ajustados.

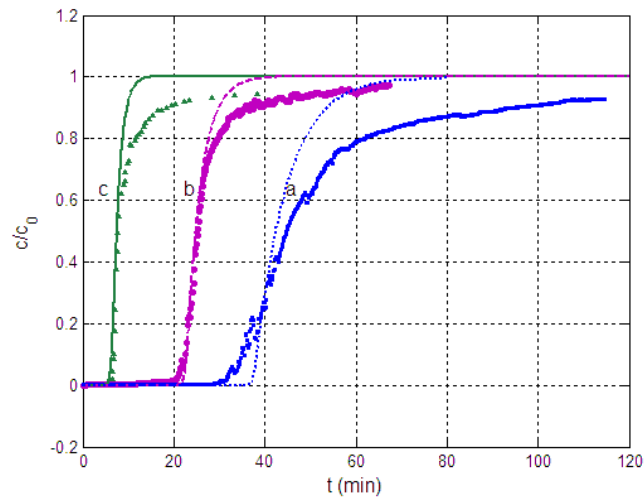


Figura 28. Efecto del flujo en el sistema de BTCs obtenidos a la concentración de entrada de $c_0 = 0.1 \text{ mg/mL}$: (a) $F = 0.13 \text{ mL/min}$, (b) $F = 0.26 \text{ mL/min}$, (c) $F = 0.52 \text{ mL/min}$. (\cdots , $---$, $—$) valores ajustados.

Para evaluar mejor el fenómeno fundamental que describe la curva de ruptura y generalizar los resultados experimentales, el modelo teórico se ajustó a los datos experimentales. El modelo de la curva de ruptura dado en las ecs. (13-18) se usó como datos de entrada en el modelo de dispersión dado por las ecs. (20-23). La estimación de los parámetros del modelo q_m , K_d y k_1 se hizo en un modo iterativo usando la rutina de optimización de Nelder-Mead. En todas las simulaciones se usaron los valores experimentales reportados de V_{CSTR} (Montesinos-Cisneros *et al.*, 2007), excepto para las corridas 2 y 3 (Tabla 5). Las líneas punteadas en las Figuras 27 y 28 representan el mejor ajuste del modelo teórico a los datos experimentales. En la Tabla 5 se presentan los valores correspondientes de los parámetros.

El valor de $K_d = 0.18 \pm 0.02 \text{ mg/mL}$ estimado para las cinco curvas de ruptura simuladas (Tabla 5) es ligeramente superior al valor experimental de $K_d = 0.11 \text{ mg/mL}$ reportado por Montesinos-Cisneros *et al.*, (2007). El valor $k_1 = 0.5 \text{ mL/mg-s}$ es igual para las cinco corridas, como se esperaba,

dato que es una constante cinética intrínseca. El valor estimado de la capacidad máxima de las membranas de $q_m = 14.2 \text{ mg/mL}$ fue prácticamente el mismo para todas las corridas simuladas, excepto para la corrida 5, realizada a $F = 0.52 \text{ mL/min}$, donde este valor fue $q_m = 10.5 \text{ mg/mL}$. Estos valores de capacidad, excepto para la corrida 5, fueron ligeramente menores que el valor experimental reportado de $q_m = 16.19 \text{ mg/mL}$. Esta diferencia refleja la desviación de la curva simulada de la curva experimental.

Tabla 5. Valores de los parámetros ajustados usados en la simulación de las curvas de ruptura.

Corrida	C_0 mg/mL	F mL/min	K_d mg/mL	q_m mg/mL	V_{CSTR} mL	q/q_m
1	0.1	0.13	0.160	14.2	0.90	0.38
2	0.2	0.13	0.160	14.2	0.85	0.55
3	0.5	0.13	0.200	14.2	0.60	0.71
4	0.1	0.26	0.165	17.0	0.80	0.38
5	0.1	0.52	0.170	10.5	0.70	0.37

El valor del volumen externo de mezclado, V_{CSRT} , disminuyó cuando el flujo se incrementó (corridas 1, 4 y 5, Tabla 5). Estos valores están en concordancia con los resultados experimentales. Este efecto de menor grado de mezclado es debido al menor tiempo de residencia predominante sobre la disminución de la viscosidad que los fluidos no-Newtonianos experimentan con el flujo como lo predicen los estudios de reometría. El valor del V_{CSRT} , también disminuyó cuando la concentración de entrada aumentó (corridas 1, 2 y 3, Tabla 5). El incremento de la viscosidad de la solución con la concentración de pDNA podría ser la causa de este fenómeno. Ambos resultados sugieren que las curvas de dispersión del sistema para pDNA son función del flujo y la concentración de entrada a la columna.

El grado de saturación de la columna (q/q_m) se incrementó cuando la concentración de entrada de pDNA aumentó (corridas 1, 2 y 3, Tabla 5), ésta es la explicación clásica del comportamiento de la curva de ruptura más anticipada y de mayor pendiente cuando la concentración de entrada se

incrementa. Este desplazamiento también se encontró en un trabajo reciente pero explicado en términos de interacciones de volumen-excluido (Haber *et al.*, 2004). El grado de saturación de la columna (q/q_m) fue prácticamente igual cuando el flujo se incrementó (corridas 1, 4 y 5, Tabla 5). Sin embargo la capacidad máxima de adsorción, q_m , en el experimento con flujo 0.52 mL/min, (corrida 5) fue significativamente más pequeño que los valores correspondientes para los experimentos con flujos 0.13 y 0.26 mL/min (corridas 1 y 4).

Los polímeros, específicamente el DNA sufren constantemente cambios en su conformación producidos por fluctuaciones Brownianas. Las deformaciones podrían ser más significativas si son bajo la influencia de un flujo de fluido. En este caso, el DNA se vuelve alargado y se adsorbe en un área superficial “excluida” más grande, reduciendo así la capacidad de la membrana. Que la molécula de DNA sea verdaderamente deformada, puede establecerse calculando el número de Weissenberg, W_i . Cuando W_i es pequeño, el polímero se relaja antes de que el flujo lo deforme significativamente, las perturbaciones para equilibrar son pequeñas (Squires y Quake, 2005). Si W_i se aproxima a 1, el polímero no tiene tiempo para relajarse y se deforma significativamente (Haber *et al.*, 2004). Montesinos-Cisneros *et al.*, (2007) estimaron valores de W_i para el sistema experimental de 0.0125, 0.025 y 0.050 para los respectivos flujos de 0.13, 0.26 y 0.52 mL/min. El número W_i fue muy pequeño para causar notables deformaciones del pDNA en el sistema experimental.

Para que el pDNA se difunda libremente a la pared de un poro y se enlace antes de que pase a través de la membrana, la escala de tiempo para la convección axial ($t_R = L/v$) debe ser más grande que la escala de tiempo para la transferencia de masa de la capa límite (t_{BLMT}) a la pared del poro, es decir $t_R \gg t_{BLMT}$. Como aproximación de un orden de magnitud, $t_{BLMT} \cong d_p^2/4D_{ox}$ (Suen y Etzel, 1992). De acuerdo a los datos experimentales utilizados en este trabajo, t_R fue 7.1 – 28.5 s, y t_{BLMT} fue 0.035 s. Consecuentemente las limitaciones del transporte de masa debido a la difusión de la

película fueron despreciables (Kochan *et al.*, 1996). La escala de tiempo para la asociación del pDNA a la matriz $t_A = 1/k_1c_0$ fue de 4 – 20 s. Esta escala de tiempo es del mismo orden de magnitud que la escala de tiempo de residencia, consecuentemente la cinética intrínseca participó en el control de la velocidad de cromatografía en el sistema experimental. El bajo tiempo de residencia y el alto tiempo de asociación parecen ser la causa de la baja capacidad de la columna en la corrida 5. Un efecto similar en membrana cromatográfica ha sido reportado recientemente (Boi *et al.*, 2007).

Cuando se comparan las curvas del modelo completo ($BTC - V_{CSTR} - PFR$) con el modelo de la columna solo (BTC), la mayor parte de la dispersión ocurre fuera de la columna. En este estudio, el número de Peclet axial, fue entre 1.56×10^5 y 6.23×10^5 , y de acuerdo a Suen y Etzel (1992), la dispersión axial de la columna puede ser despreciable para $Pe > 40$.

La solución MOL del modelo de transporte también se utilizó para describir en forma más detallada el proceso de cromatografía frontal, por ejemplo, especificando los perfiles de concentración adimensional, en la fase líquida a lo largo de la columna, c/c_0 y en la fase sólida, q/q_m , como función de longitud adimensional de la columna, Z_L , y el tiempo real, t , (Fig. 29 y Fig. 30). Todas las curvas de ruptura muestran una gran pendiente al inicio, la cual disminuye con el tiempo. Este efecto puede ser explicado en términos de que la columna y sistema de dispersión contribuyen a extender la curva.

La forma de las curvas de ruptura para todas las concentraciones es similar (Fig. 29as), nótese que la concentración está normalizada. Sí se consideran cantidades absolutas de concentración, el mayor grado y velocidad de adsorción sucede a más altas concentraciones.

Un incremento en la concentración de entrada de pCI-DNA a la columna, produce una curva de ruptura de mayor pendiente y con menor tiempo de proceso. Cuando la concentración de entrada

se incrementa, también aumentan las fuerzas impulsoras para el proceso de transporte, esto provoca una rápida saturación de las membranas, y como consecuencia, que se extraiga el soluto de la fase móvil en menos tiempo. En base a esto es más eficiente aplicar el soluto a alta concentración. La utilización de la capacidad máxima de las membranas es mejor a concentraciones de soluto más altas, dado estas condiciones favorecen un mayor grado de la adsorción en el equilibrio. Como fue reportado por Chase (1984) cuando se grafica la salida de la concentración adimensional de la columna, contra el soluto aplicado a la columna sólo se nota un efecto en la forma y posición de la curva de ruptura, cuando la concentración de entrada c_0 , es comparable o más pequeña que la constante de equilibrio, K_d . La forma y posición de la curva de ruptura se vuelve constante cuando $c_0 \gg K_d$.

Los perfiles de concentración en la fase adsorbida (Fig. 29bs) muestran la forma de prácticamente un escalón, debido a las altas velocidades de transporte de masa y cinética y el equilibrio de Langmuir favorable en el sistema experimental. Se obtiene un perfil más anticipado cuando la concentración de entrada se incrementa. También se observa un mayor grado de saturación, q/q_m , de acuerdo con la isoterma de Langmuir.

Un incremento en el flujo de entrada produce una curva de ruptura más esbelta y en menos tiempo (Fig. 30as). Cuando el flujo de entrada aumenta, el pCI-DNA se alimenta a la columna más rápidamente, se alcanza una saturación de las membranas más rápida y el proceso es más eficiente. La reducción del tiempo de residencia en la columna de membranas cuando el flujo se incrementa, también contribuye a la eficiencia del proceso, dado que hay menos tiempo para el sistema de dispersión. El perfil de concentración en la fase sólida (Fig. 30bs) también muestra la forma de escalón y más anticipada cuando se incrementa el flujo de entrada. Obviamente, el flujo de entrada no afecta el grado de saturación de la columna.

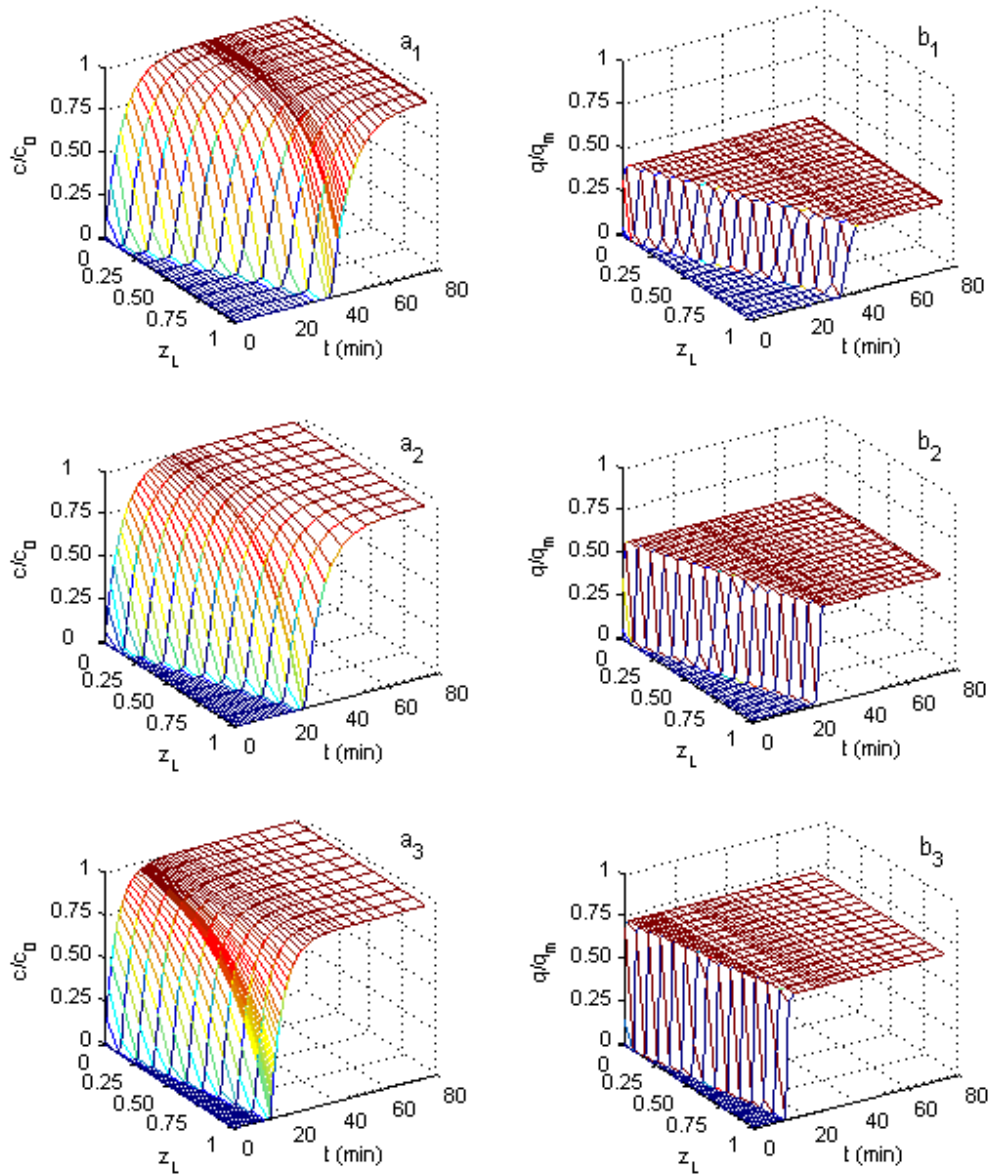


Figura 29. La influencia de la concentración de entrada de plásmido en el comportamiento de la curva de ruptura, se muestra la variación de la concentración adimensional de plásmido en el seno del líquido c/c_0 , y de la concentración adimensional de plásmido en la membrana, q/q_m , con la longitud de la columna adimensional, Z_L , y el tiempo real, t . (a1 y b1) $c_0 = 0.1$ mg/mL, (a2 y b2) $c_0 = 0.2$ mg/mL y, (a3 y b3) $c_0 = 0.5$ mg/mL.

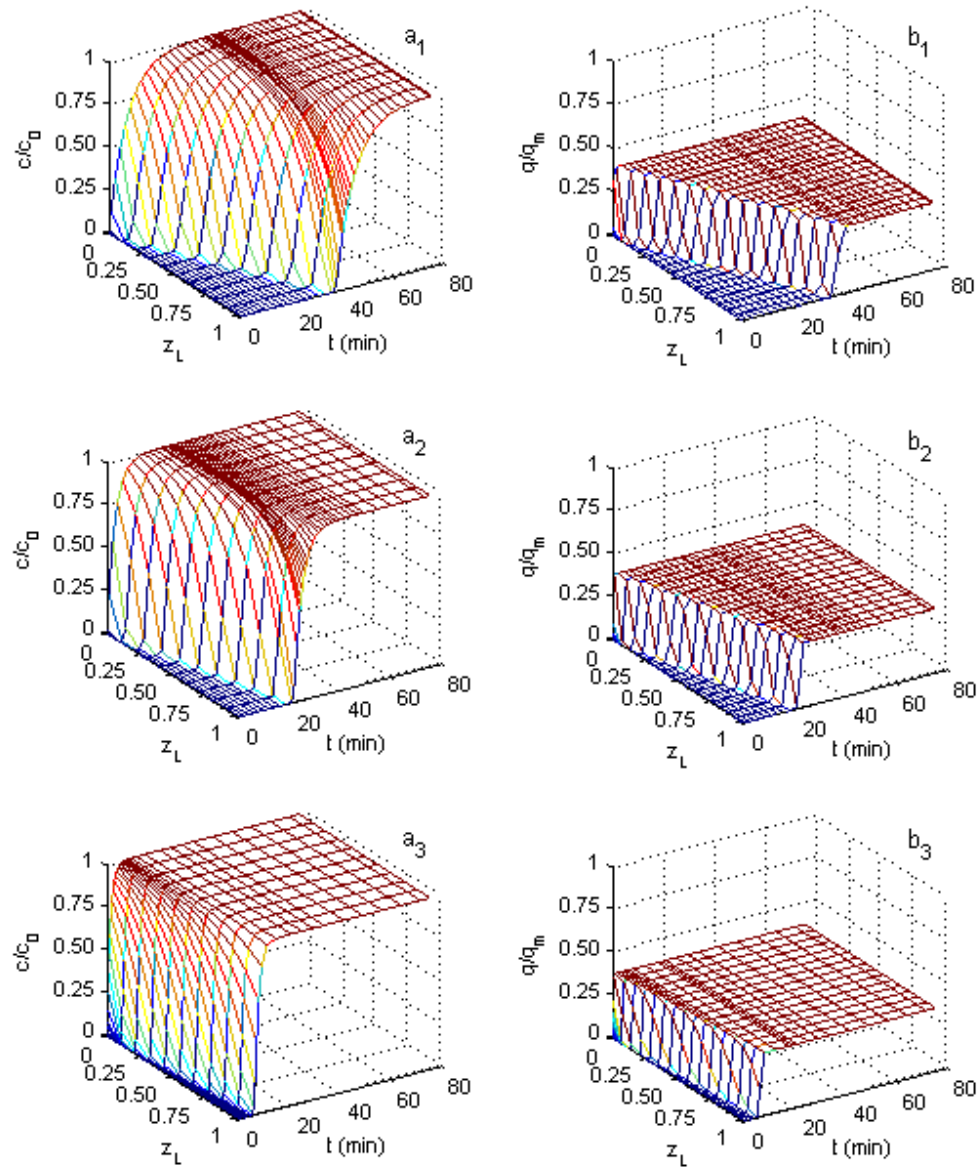


Figura 30. La influencia del flujo de entrada en el comportamiento de la curva de ruptura, se muestra la variación de la concentración adimensional de plásmido en el seno del líquido c/c_0 , y de la concentración adimensional de plásmido en la membrana, q/q_m , con la longitud de la columna adimensional, z_L , y el tiempo real, t . (a1 y b1) $F = 0.13 \text{ mL/min}$, (a2 y b2) $F = 0.26 \text{ mL/min}$ y, (a3 y b3) $F = 0.52 \text{ mL/min}$.

4.2 Proceso Base de Producción de Plásmido

El proceso fue integrado por las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. El plásmido obtenido por medio de este proceso se usó en la preparación de las muestras para construir la curva estándar de pVax- LacZ.

4.2.1 Fermentación de *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ)

Durante la primera etapa del proceso base las operaciones realizadas fueron la preparación de inóculo y el cultivo en matraz.

Se prepararon 30 mL de inóculo, incubado por 8 h y se utilizó para realizar el cultivo en un matraz de 2 L con 250 mL de medio. Después de 14 h, el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 3.7$, y se procedió a la siguiente etapa.

4.2.2 Recuperación primaria

En esta etapa del proceso base se realizaron las operaciones de cosecha celular, lisis y clarificación.

Cosecha celular. Al término del cultivo, las células fueron cosechadas, obteniéndose 3.8 g de células en 250 mL de medio. De tal manera la concentración máxima de biomasa obtenida en el cultivo en matraz fue de aproximadamente 15.2 g/L de cultivo. Este comportamiento es típico del sistema *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ) a nivel matraz (Passarinha *et al.*, 2006, Diogo *et al.*, 2003).

Lisis y clarificación. La biomasa cosechada de cultivos de 250 mL fue resuspendida, lisada y neutralizada, utilizando la relación de volúmenes de los buffers correspondientes, obteniéndose 23 mL de lisado clarificado. Al final del proceso de lisado se tomaron muestras para su análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Estas fueron comparadas con un patrón de pDNA purificado utilizando un kit comercial (High pure plasmid isolation).

La Figura 31 muestra los resultados del análisis electroforético de una muestra de pDNA purificado (línea 2) y 4 muestras de lisado alcalino, (líneas 3 – 6). Es posible observar las tres isoformas de la molécula de pDNA (línea 2, Fig. 31), en una muestra de pVAX-LacZ purificado por medio un kit comercial, todas ellas tienen el mismo número de pares de bases. Las moléculas circulares abiertas relajadas y las moléculas lineales de longitud completa avanzan más lentamente que las superenrolladas. En este caso, las dos bandas superiores avanzan como si tuviesen 7.0 y 6.0 kbp. La primera es la forma circular abierta (OC) y para ella la estimación de 7.0 kb es incorrecta, pues no se tiene en cuenta su conformación no lineal. La segunda es la forma lineal (L) de longitud completa, y ése será el tamaño correcto para el pVAX-LacZ, 6.0 kbp. Igualmente, las moléculas superenrolladas del mismo número de pares de bases avanzan con un tamaño aparente de 4.0 kbp, ya que dado el enrollamiento de la molécula, tiene un menor tamaño. Todas las moléculas de la muestra purificada tienen el mismo número de pares de bases de 6.0, sin embargo dada su diferente forma, ocupan un volumen efectivo diferente y avanzan por el gel a distinta velocidad.

También puede observarse en la Figura 31 que los patrones de las 4 muestras de lisado (líneas 3 – 6) obtenidas de 4 cultivos de 250 mL, son prácticamente iguales entre sí, lo que sugiere una adecuada reproducibilidad de la metodología. Cuando las muestras de lisado se comparan con el patrón de pDNA purificado, se puede apreciar la presencia de una banda inicial de pDNA circular abierto (OC), una segunda banda de pDNA súperenrollado (SC). La gran cantidad de RNA presente en las muestras de lisado evidencian la necesidad de las etapas posteriores del proceso para lograr la purificación del pDNA.

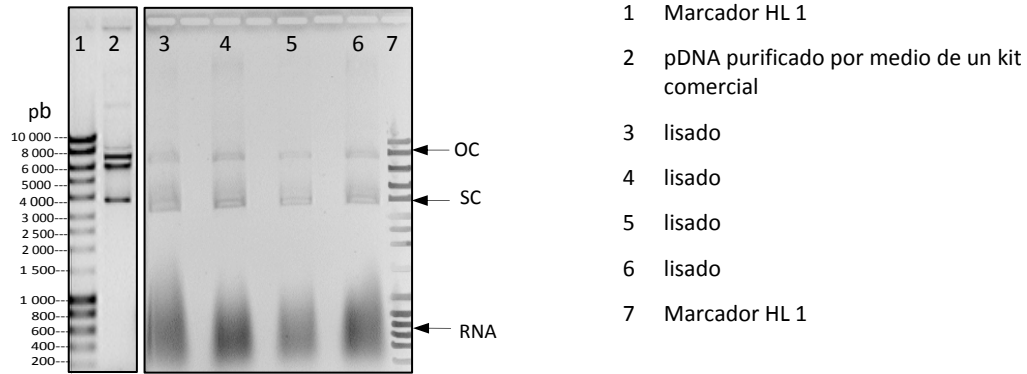


Figura 31. Análisis por electroforesis de muestras de pDNA purificado y lisado clarificado. OC = variante de pDNA circular abierto, SC = variante de pDNA súperenrollado.

4.2.3 Recuperación intermedia

En esta etapa se llevaron a cabo las operaciones de precipitación 1, lavado, resuspensión, precipitación 2, clarificación.

4.2.4 Purificación final

En la etapa de purificación final del proceso base, se realizaron las operaciones de cromatografía HIC y SEC.

Para evaluar el comportamiento de la batería de purificación HIC-SEC, se tomaron muestras a la salida de columna SEC y se compararon con muestras de plásmido obtenido mediante un kit comercial. Los resultados electroforéticos se muestran en la Figura 32. Puede observarse en las líneas 2, 3 y 4 de la figura, la presencia de una banda de alrededor de 7.0 kbp que corresponde al pDNA circular abierto (OC), una segunda banda de alrededor de 4.0 kbp correspondiente al pDNA superenrollado (SC). Asimismo, puede observarse que la purificación del plásmido mediante el proceso base, (líneas 3 y 4) es prácticamente igual a la lograda por medio del kit High Pure Plasmid Isolation, (línea 2). En general, el proceso es altamente reproducible y forma parte de una técnica estandarizada para la producción del plásmido puro a nivel laboratorio.

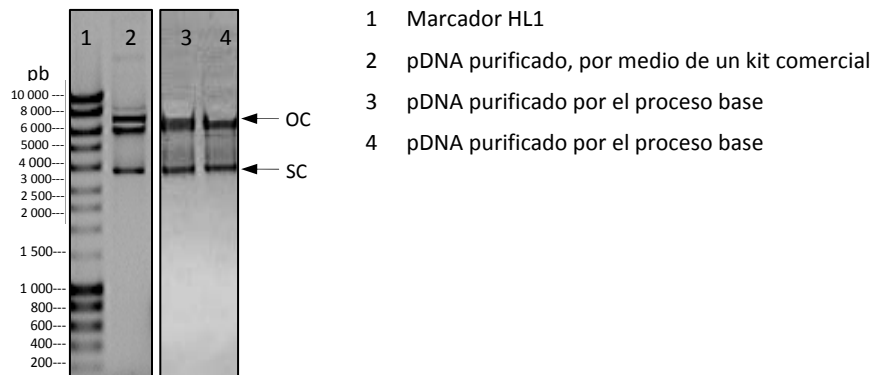


Figura 32. Análisis por electroforesis de muestras de pDNA purificado. OC = variante de pDNA circular abierto, SC = variante de pDNA súperenrollado.

Para ampliar el análisis del comportamiento de la purificación del plásmido mediante el proceso base, también se tomaron muestras a la salida de la columna SEC para su análisis de concentración y pureza por HIC-HPLC. En la Figura 33 se muestra el cromatograma obtenido en este estudio, donde se observa el pico de elución del pDNA a los 0.68 min, de una muestra que fue previamente diluida 1:5 en buffer TE y después 1:5 en sulfato de amonio 1.5 M en Tris/HCl 10 mM, pH 8. La altura del pico es de aproximadamente 87 mAU y su área de 7.53 mAU – min que corresponde a una concentración de pDNA de 112.3 $\mu\text{g/mL}$ a la salida de la columna SEC, de acuerdo a la ec. (36), (Anexo B). También puede observarse en el cromatograma la ausencia de RNA en la muestra, dado que el tiempo de elución de esta molécula es 3.58 min bajo las condiciones experimentales utilizadas. Estos resultados sustentan la alta pureza obtenida de 96.32 % HPLC, en el plásmido obtenido por el proceso base.

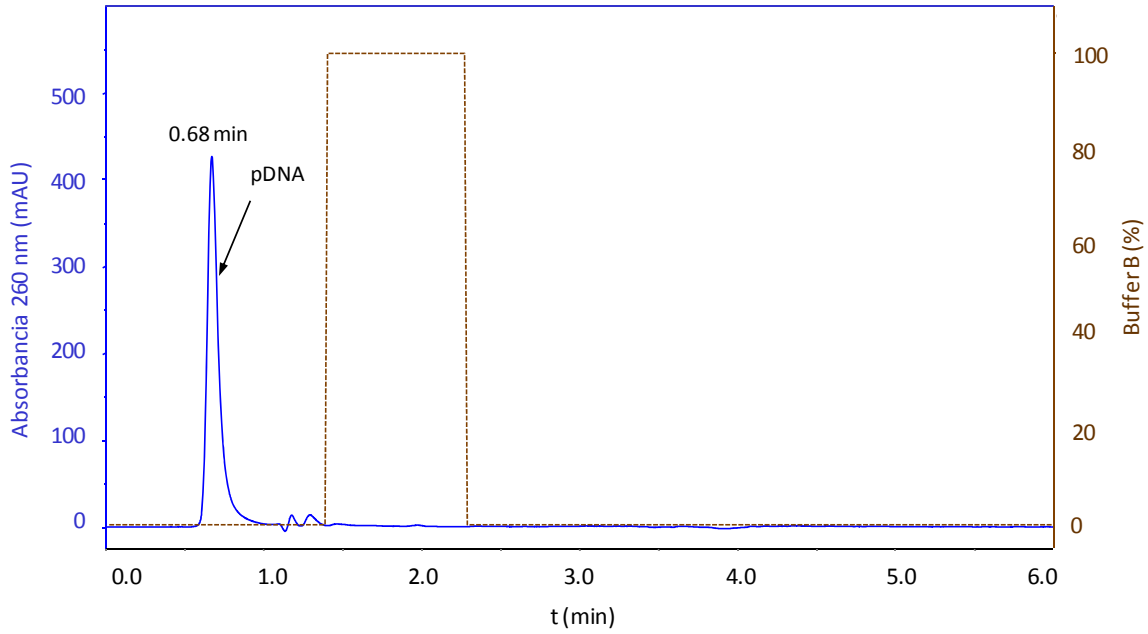


Figura 33. Cromatograma analítico HIC-HPLC de plásmido purificado por el Proceso Base. La muestra de pDNA fue diluida 1:5 en bufferTE. La línea punteada indica el porcentaje del buffer de elución.

4.3 Proceso de Producción de Plásmido por Cromatografía Frontal de Intercambio Iónico en Membranas

En el proceso de producción de plásmido por FAEMC se desarrollaron las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido.

4.3.1 Fermentación de *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ)

La etapa de fermentación del proceso comprende las operaciones de preparación del inóculo y la propagación celular.

Durante la propagación celular a nivel fermentador utilizando un volumen de operación de 2.2 L, se extrajeron muestras del cultivo, y se midió su densidad óptica a 600 nm. Los datos obtenidos se utilizaron para generar la curva de crecimiento que se muestra en la Figura 34. La ecuación logística, ec. (1) se ajustó a los datos experimentales obteniéndose una velocidad específica de crecimiento de $\mu = 0.74 \text{ h}^{-1}$, esta velocidad está en el rango de los parámetros para cultivos de *E. coli*.

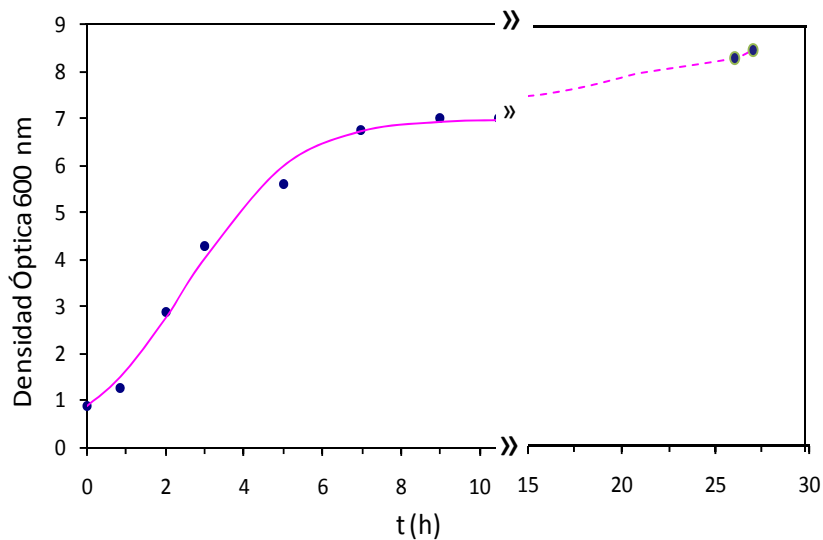


Figura 34. Curva de crecimiento celular la cepa de *E. coli* conteniendo pVAX1-LacZ. (•) Densidad óptica 600 nm datos experimentales; (—) Curva de crecimiento ajustada por la ecuación logística con $\mu = 0.74 \text{ h}^{-1}$

De las muestras de cultivo obtenidas durante la fermentación se tomó el volumen de cultivo necesario para el índice de masa igual a 25, y estos volúmenes fueron sometidos a un proceso de lisis y clarificación.

En la Figura 35 se muestran los resultados del análisis en gel de electroforesis de las muestras de crecimiento. La línea 2 corresponde al pDNA purificado de la última muestra del cultivo, mediante el Proceso Base. Las líneas 4 – 13 corresponden a los lisados de cada una de las muestras tomadas a diferentes tiempos durante el crecimiento celular.

Puede observarse en la línea 2, una banda inicial de pDNA de circular abierto (OC) y una segunda de pDNA súperenrollado (SC) que indica una mayor concentración de esta isoforma. En las líneas 4 – 13 de la figura, se observa la presencia de plásmido súperenrollado y RNA contaminante, la concentración de ambos aumenta gradualmente con el tiempo de cultivo.

En las muestras de cultivo lisadas se determinó la concentración y porcentaje de pureza del plásmido por análisis en columna de cromatografía líquida (HIC-HPLC), estos resultados se muestran en las Figuras 36 y 37 respectivamente. Puede observarse en la Figura 36 que la concentración de plásmido aumenta en forma similar a la concentración celular. El porcentaje de pureza HPLC varía prácticamente en forma lineal con el tiempo (Fig. 37), indicando una mayor proporción de pDNA respecto a las impurezas. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Passarinha *et al.*, (2006) y Diogo *et al.*, (2003).

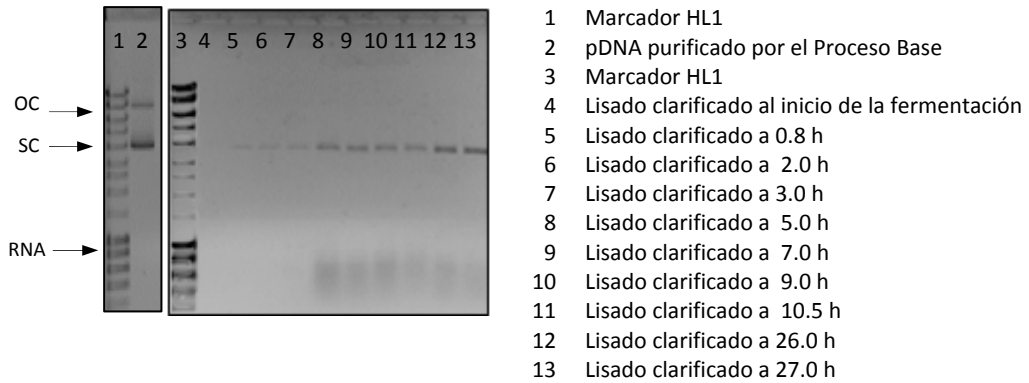


Figura 35. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la fermentación, lisadas y clarificadas. OC = variante de pDNA circular abierto, SC = variante de pDNA súperenrollado.

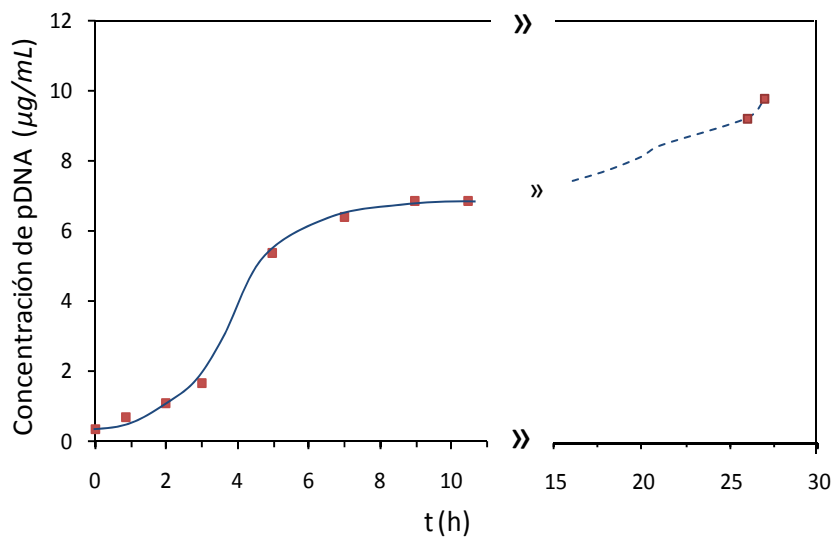


Figura 36. Concentración de pDNA en las muestras de cultivo lisadas, estandarizadas utilizando un índice de masa de 30, tomadas durante la fermentación de *E. coli* conteniendo pVAX1-LacZ Determinación hecha por HIC-HPLC.

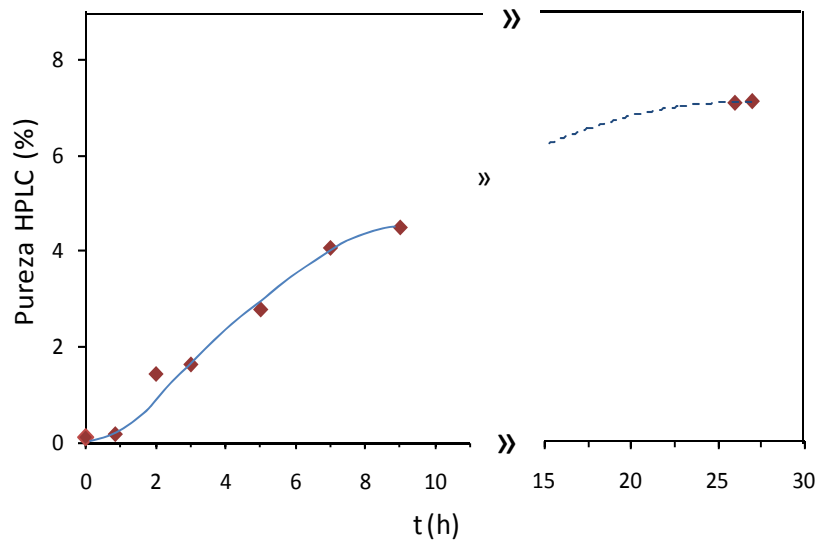


Figura 37. Porcentaje de pureza de pDNA en las muestras de cultivo lisadas, estandarizadas utilizando un índice de masa de 30, tomadas durante la fermentación de *E.coli* conteniendo pVAX1-LacZ. Determinación hecha por HIC-HPLC.

4.3.2 Recuperación primaria

En la etapa de recuperación intermedia se realizaron las operaciones de cosecha celular, lisis y clarificación.

Al término del cultivo, las células fueron cosechadas, obteniéndose 40 g de células en 2.2 L de caldo. De tal manera la concentración máxima de biomasa obtenida en el fermentador fue de aproximadamente 18.2 g/L de cultivo. Este comportamiento es típico del sistema *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ) a nivel fermentador, de acuerdo al resultado obtenido por Passarinha *et al.*, (2006).

Lisis y clarificación. La biomasa cosechada de 2.2 L de cultivo fue resuspendida, lisada y neutralizada, utilizando la relación de volúmenes de los buffers correspondientes, obteniéndose 200 mL de lisado clarificado. Al final del proceso de lisado se tomaron muestras para su análisis

por electroforesis en gel de agarosa, también se determinó la concentración y porcentaje de pureza de pDNA por HIC-HPLC, encontrándose 29.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2.64 % respectivamente.

4.3.3 Recuperación intermedia

En la etapa de recuperación intermedia se realizaron las operaciones de diafiltración-1, pre-purificación por FAEMC y diafiltración-2.

Diafiltración-1. Esta operación se realizó en una membrana de fibra hueca por TFF, usando el buffer TE para el lavado. Se utilizaron 33 mL de lisado clarificado y se diluyeron 1:2 con buffer TE. Al efectuar los ciclos de diafiltración, se lavó el volumen retenido con 132 mL de buffer TE, resultando 5 volúmenes de lavado. El volumen final de retenido fue 26.0 mL , de conductividad 5.3 mS/cm . Al terminar los ciclos de diafiltración la solución de retenido-1 fue analizada por HIC-HPLC y se obtuvo 4.7 % de pureza HPLC y concentración de pDNA de 35.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La recuperación de plásmido fue de 93.0 %, las ligeras pérdidas posiblemente se deban a la unión irreversible del plásmido a la superficie interna de la membrana del cartucho de diafiltración, como ya se reportó por Eon-Duval *et al.*, (2003).

En la Figura 38 se presentan la comparación de los cromatogramas obtenidos del análisis por HIC-HPLC de una muestra de lisado clarificado y una de retenido-1, ambos diluidos en proporción 1:5. En los cromatogramas se observa que la concentración y elución del pDNA en ambas muestras es prácticamente igual. Sin embargo, en los picos correspondiente al RNA puede observarse una reducción de éste en la muestra de retenido-1, (más de 35.0 % de RNA eliminado), sugiriendo que el tamaño de corte de 300 kDa de la membrana utilizada, permite lavar el plásmido y eliminar parte de RNA, aumentando su pureza 1.8 veces.

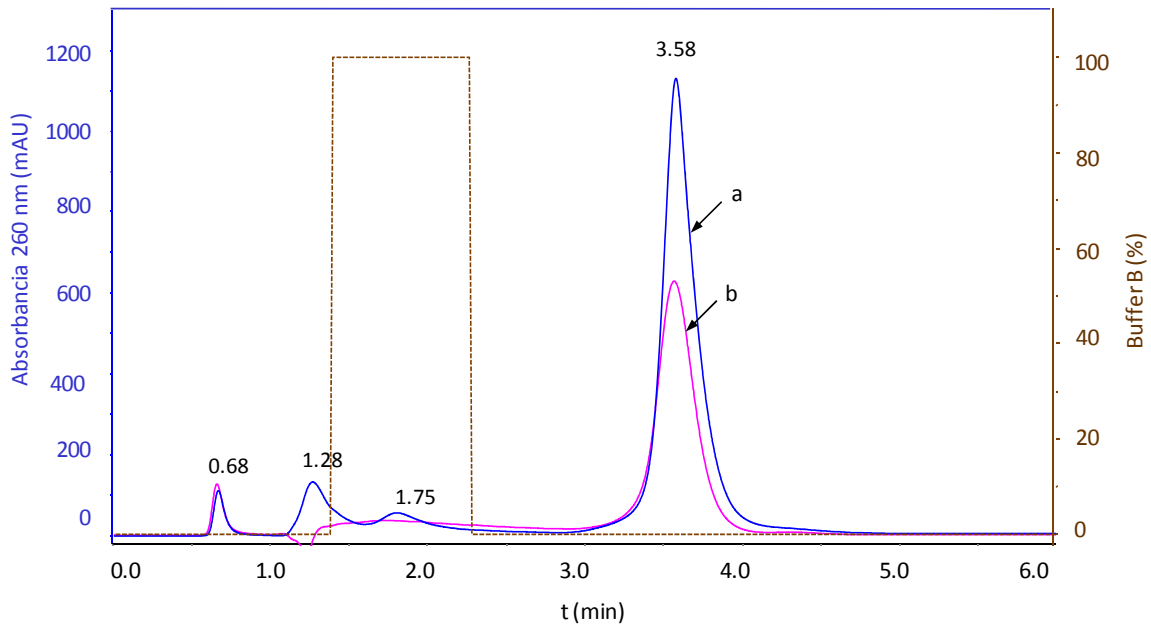


Figura 38. Cromatogramas analíticos por HIC-HPLC de: (a) lisado clarificado diluido 1:5, de [pDNA] = 5.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y pureza 2.6 %; (b) retenido-1 diluido 1:5, de [pDNA] = 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y pureza 4.7 %. La línea punteada indica el porcentaje de buffer de elución.

Pre-purificación por FAEMC. Para estudiar las condiciones de pre-purificación se realizaron 7 corridas experimentales (A – G). Las condiciones de cada una de estas corridas se muestran en la Tabla 6. En cada una de estas corridas se alimentó el retenido-1 en modo frontal a una columna (0.5 \times 5 cm), empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q, conectada al sistema Äkta Purifier.

Las corridas A, B, y C se realizaron para estudiar el efecto del tiempo de lavado y el gradiente de elución sobre el comportamiento de la separación cromatográfica, con este propósito se colectaron muestras de 1.5 mL a la salida de la columna, durante las fases de adsorción, lavado y elución.

Tabla 6. Condiciones utilizadas en las corridas A, B, C, D, E, F y G de pre-purificación por FAEMC.

Fase	Tiempo (min)	Buffer % B	Molaridad M
Corrida A: retenido-1 [pDNA] = 11.75 $\mu\text{g/mL}$			
adsorción	0 – 30	0	0.0
lavado	30 – 40	30	0.6
elución	40 – 70	30 – 60	0.6 – 1.2
	70 – 85	60 – 100	1.2 – 2.0
	85 – 100	100	2.0
equilibrio	100 – 115	0	0.0
Corrida B: retenido-1 [pDNA] = 11.75 $\mu\text{g/mL}$			
Corrida C: retenido-1 [pDNA] = 7.05 $\mu\text{g/mL}$			
adsorción	0 – 25	0	0.0
lavado	25 – 45	30	0.6
elución	45 – 65	30 – 60	0.6 – 1.2
	65 – 75	60 – 100	1.2 – 2.0
	75 – 90	100	2.0
equilibrio	90 – 105	0	0.0
Corridas D, E, F, y G: retenido-1 [pDNA] = 7.05 $\mu\text{g/mL}$			
adsorción	0 – 25	0	0.0
lavado	25 – 50	30	0.6
elución	50 – 60	30 – 60	0.6 – 1.2
	60 – 65	60 – 100	1.2 – 2.0
	65 – 70	100	2.0
equilibrio	70 – 85	0	0.0

B = NaCl 2.0 M en buffer TE

Buffer TE = Tris 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8.0

En la corrida A se alimentaron 15 mL de retenido-1 diluido en buffer TE, obteniéndose una concentración de pDNA de 11.75 $\mu\text{g/mL}$ y conductividad 2.3 mS/cm . El perfil de absorbancia de las fases de adsorción, lavado y elución se muestran en la Figura 39. Puede observarse en la figura un perfil de adsorción muy agudo que rompe los 20 min aproximadamente. La fase de lavado inicialmente se desarrolló en forma adecuada, sin embargo el tiempo de lavado programado no fue suficiente, de tal manera que el pico de elución se traslapó con esta fase.

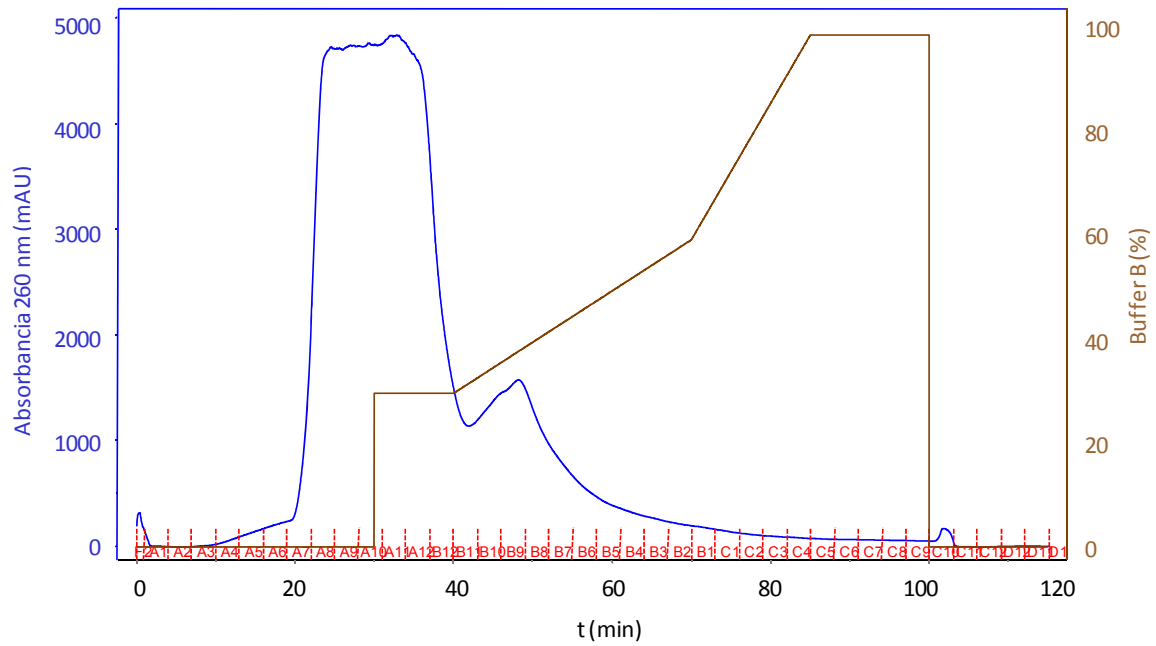


Figura 39. Perfil de adsorción, lavado y elución en una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico, usando flujo de entrada de 0.5 mL/min de retenido-1 (1:5), con [pDNA] = 11.75 µg/mL y conductividad 2.3 mS/cm, corrida A.

En el análisis en gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida A (Fig. 40), indica que el RNA es concentrado durante la cromatografía frontal y se elimina parcialmente durante la fase de lavado (líneas 7, 8 y 9 de la fila superior). El patrón de elución (líneas 3 – 13 de la fila inferior) corresponde a la del pico triangular del cromatograma donde la concentración mayor de pDNA se alcanza en las líneas 5 y 6, mientras que el RNA eluye a partir de la línea 3 hasta la línea 7.

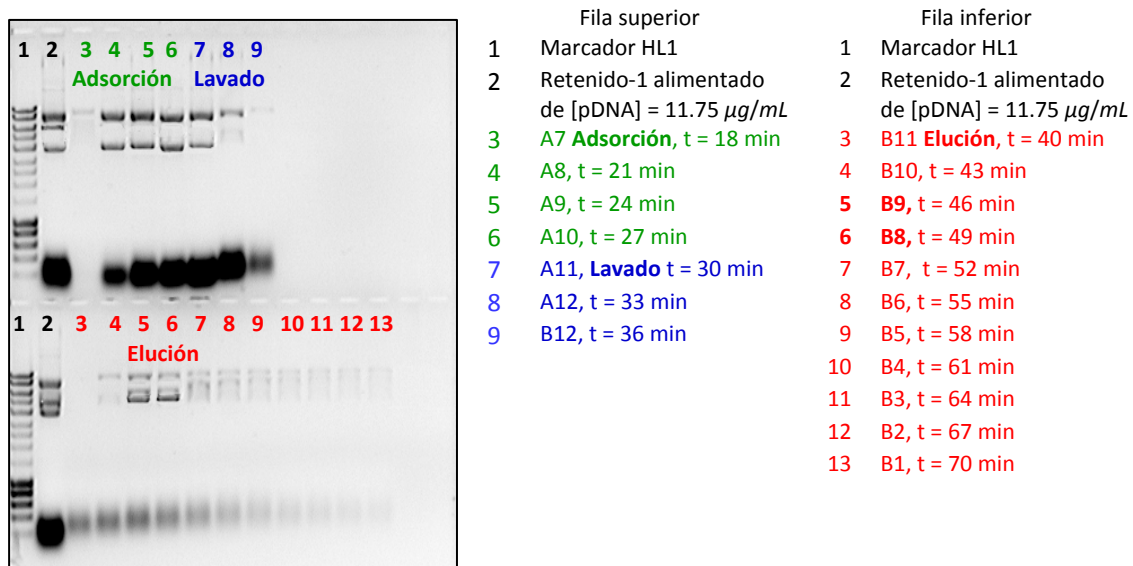


Figura 40. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida A.

Las corridas B y C (Tabla 6) se realizaron disminuyendo en 5 min el tiempo de adsorción, aumentando 10 min el tiempo de lavado y disminuyendo 10 min el tiempo de elución, respecto a la corrida A. Lo anterior con el fin de mejorar el lavado, la resolución y obtener un pico de elución más estrecho.

La corrida B se efectuó alimentando 12.5 mL de retenido-1 diluido en buffer TE, obteniéndose una concentración de pDNA de 11.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y conductividad 2.3 mS/cm . En la corrida C se alimentaron 12.5 mL de retenido-1 diluido en buffer TE, alcanzando una concentración de pDNA de 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y conductividad 1.2 mS/cm .

En la Figura 41 se muestra el efecto de la concentración de pDNA en la alimentación, sobre el perfil de adsorción, lavado y elución. El perfil de adsorción muestra el comportamiento típico de la adsorción frontal en membrana: cuando la concentración de entrada se incrementa se obtiene una curva en menos tiempo de proceso, dado que también aumentan las fuerzas impulsoras para el proceso de transporte, esto provoca una rápida saturación de las membranas, y como

consecuencia, que se extraiga el plásmido de la solución en menos tiempo. En base a esto es más eficiente alimentar la solución a alta concentración, siempre y cuando se evite la pérdida de plásmido que pudiera salir de la columna sin adsorberse, cuando las membranas se encuentren en equilibrio. Durante el lavado y elución los perfiles de absorbancia obtenidos son prácticamente iguales, en ambas corridas. Al comparar los resultados de las corridas B y C con los de la A se puede apreciar un mejoramiento sustancial de las fases de lavado y elución, que se manifiesta por una mejor separación.

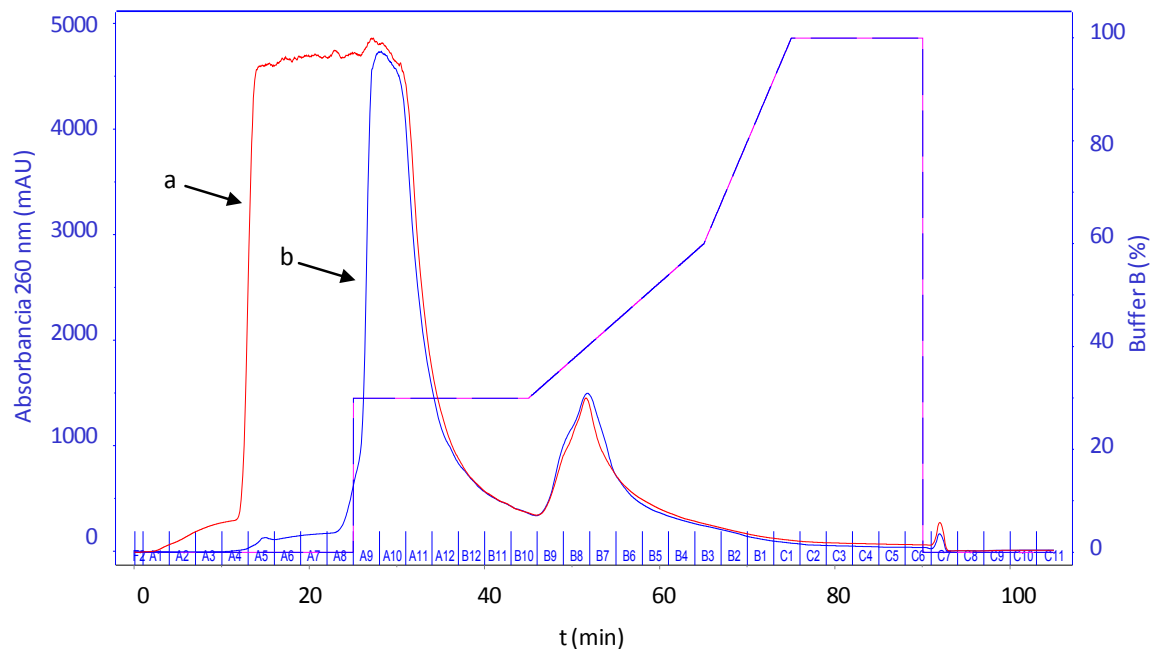


Figura 41. Efecto de la concentración de pDNA en la alimentación, sobre perfil de adsorción, lavado y elución. Alimentación de retenido-1: (a) [pDNA] = 11.75 $\mu\text{g/mL}$, corrida B; (b) [pDNA] = 7.05 $\mu\text{g/mL}$, corrida C.

En la Figura 42 se presenta el gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida B. Las líneas 3 – 7 de la fila superior, corresponden a las muestras obtenidas durante la fase de adsorción. La línea 3 indica que en este punto la columna está adsorbiendo casi todos solutos alimentados, mientras que las líneas 4 – 7, indican que la columna alcanzó el equilibrio con la solución de alimentación. Las líneas 8 – 12 de la fila superior y líneas 3 y 4 de la fila inferior

corresponden a la fase de lavado. La mayor parte del RNA que se elimina en esta fase se aprecia en las líneas 8 – 10, que corresponden con el perfil de absorbancia mayor del lavado. Las líneas 5 a 13 de la fila inferior corresponden a la fase de elución. Puede observarse en estas líneas la obtención del plásmido pre-purificado, donde la mayor parte del RNA contaminante ha sido eliminado. Las líneas están en concordancia con forma triangular del pico de elución obtenido con una concentración máxima de plásmido en la línea 7.

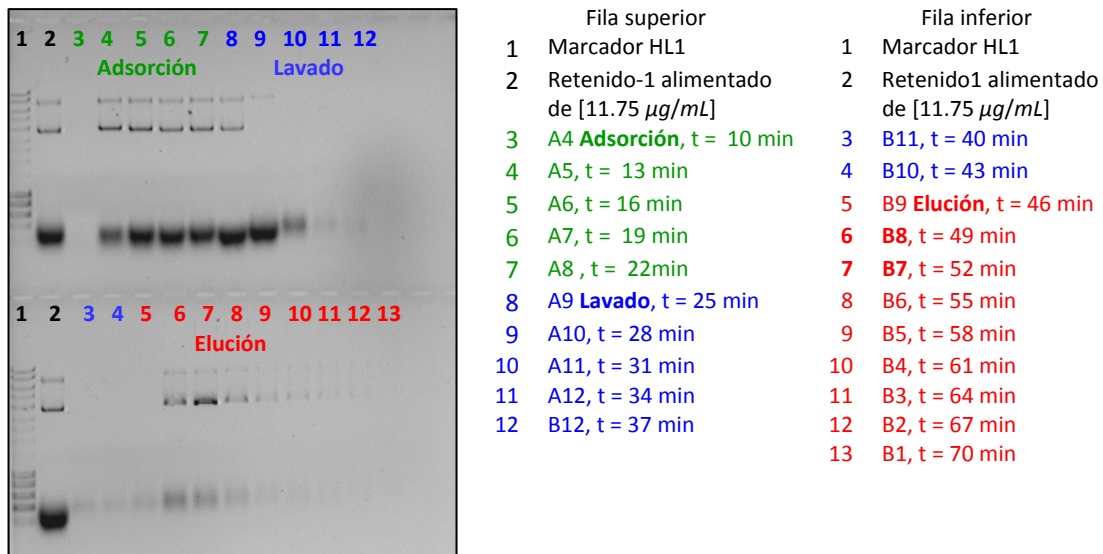


Figura 42. Gel de electroforesis de los volúmenes colectados durante la corrida B.

En la Figura 43 se muestra el gel de electroforesis de las fracciones colectadas durante la corrida C. La línea 3 de la fila superior, corresponde a la muestra obtenida durante la fase de adsorción. La línea indica que en este punto la columna está adsorbiendo casi todos solutos alimentados. Las líneas 4 – 10 de la fila superior corresponden a la fase de lavado. La mayor parte del RNA que se elimina en esta fase, realizada con NaCl 0.6 M en TE, se aprecia en las líneas 4 – 6 que corresponden con el perfil de absorbancia mayor en el lavado. Las líneas 3 a 11 de la fila inferior corresponden a la fase de elución. Puede apreciarse en estas líneas la obtención del plásmido pre-

purificado, donde la mayor parte del RNA contaminante ha sido eliminado. Las líneas están en concordancia con forma triangular del pico de elución obtenido, con una concentración máxima de plásmido en la línea 5.

Los resultados de las corridas B y C, sugieren que el comportamiento de la pre-purificación prácticamente no varía con la concentración de la solución alimentada, excepto por el tiempo de ruptura, que es inversamente proporcional a la concentración.



Figura 43. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida C.

La corrida D (Tabla 6), se realizó con alimentación de retenido-1 de concentración de pDNA de 7.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En esta corrida se programó un tiempo de lavado mayor y un tiempo de elución menor, con el fin de mejorar el lavado, la resolución y obtener un pico de elución más estrecho. También se redujo el volumen de las fracciones colectadas durante la elución, de 1.5 a 1.0 mL para evitar la contaminación entre ellas.

En la Figura 44 se muestran los perfiles de adsorción, lavado y elución correspondiente a la corrida *D*. En la figura puede apreciarse un perfil de adsorción muy agudo en concordancia con la ausencia de resistencia a la difusión y a la transferencia de masa en la película en las membranas cromatográficas. El perfil de lavado muestra una gran duración de la región inicial de alta absorbancia, sugiriendo que parte del RNA eluye de la columna desde esta etapa. Solo se obtiene un pico durante la etapa de elución.

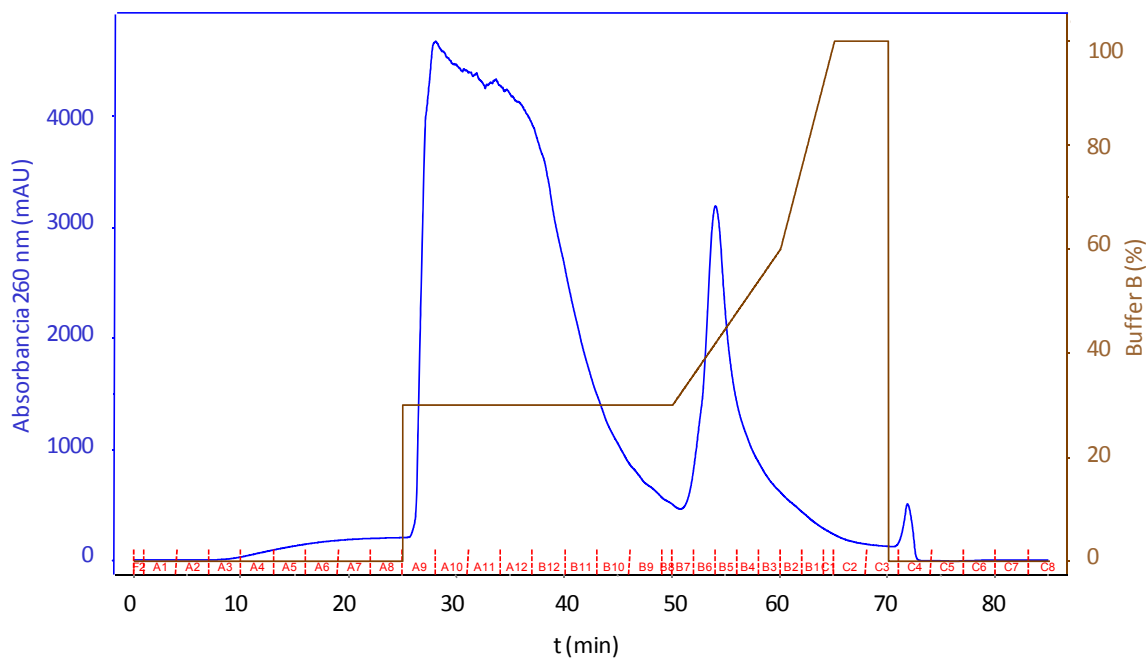


Figura 44. Perfiles de adsorción, lavado y elución de 12.5 mL de solución de retenido-1 de concentración de pDNA de 7.05 µg/mL, corrida *D*.

En la Figura 45 se muestra el gel de electroforesis de las fracciones colectadas durante la corrida *D*. La fase de adsorción, corresponde a las líneas 3 – 6 fila superior. En estas líneas no se aprecia pDNA ni RNA, lo que sugiere que la solución alimentada se estaba adsorbiendo completamente durante este periodo. Las líneas 7 – 15 de la fila superior corresponden a la fase de lavado. Durante esta fase se elimina gran parte del RNA retenido en la columna. La fase de elución

corresponde a las líneas 3 – 9 de la fila inferior, donde puede observarse que el plásmido fue retenido y concentrado por las membranas de intercambio iónico. La mayor parte de plásmido se eluyó en las fracciones correspondientes a las líneas 5 – 7 donde también se observan trazas de RNA. Los resultados de la elución concuerdan con forma triangular del pico obtenido, con una concentración máxima de plásmido en la línea 5 donde predomina la forma súperenrollada.

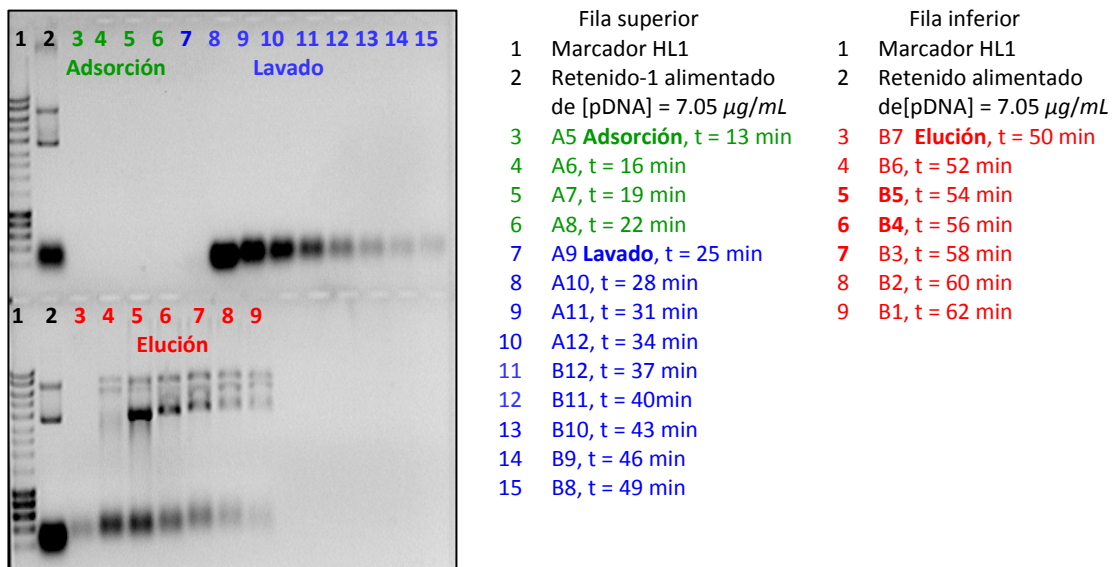


Figura 45. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida D.

El proceso de pre-purificación de la corrida D fue monitoreado mediante análisis por HIC-HPLC. En la Figura 46 se presenta la comparación de los cromatogramas obtenidos de una muestra del retenido-1 alimentado y de muestras de las fracciones de elución durante la corrida D (fracciones B5 a B2). Considerando que el RNA eluye a los 3.58 min, puede observarse en la figura que una gran disminución del contenido del RNA (más del 90 %) de la alimentación durante la pre-purificación. La pureza HPLC calculada de la fracción B5 fue del 21.87 %. (8.4 veces más que la del

lisado) y su concentración de pDNA de $5.88 \mu\text{g/mL}$, las fracciones restantes tienen 18 % pureza en promedio.

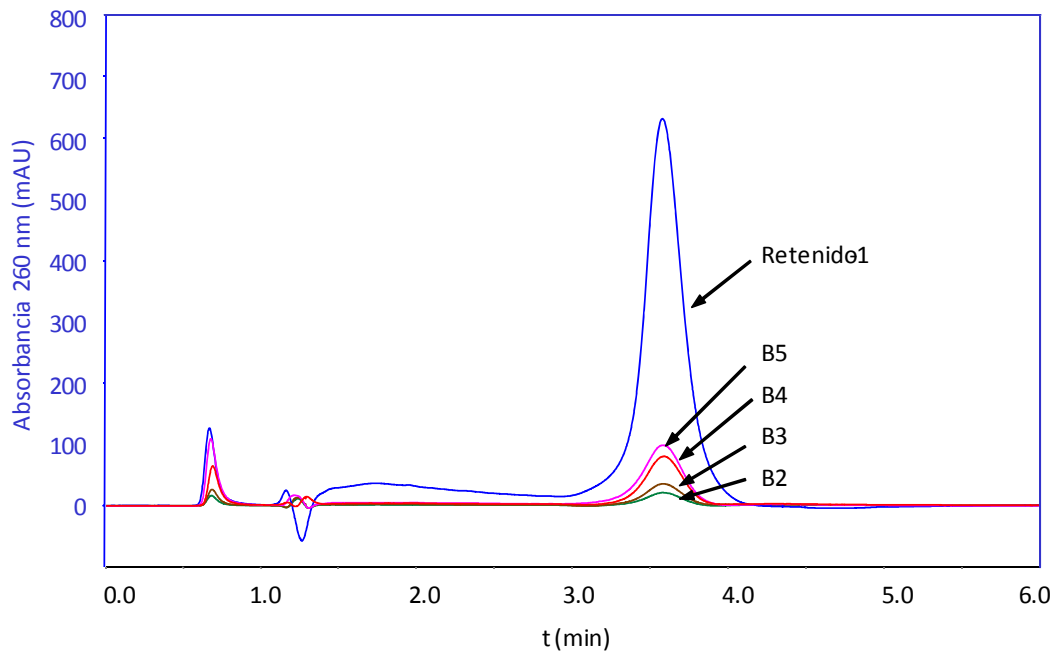


Figura 46. Cromatogramas analíticos HIC-HPLC del retenido-1 alimentado durante la corrida *D*, diluido de concentración de pDNA de $7.0 \mu\text{g/mL}$, pureza 4.7 % y las fracciones de elución B5, B4, B3 y B2.

En base a este resultado se eligieron las condiciones bajo las cuales se realizó la corrida *D* para pre-purificar más lotes de solución de retenido-1. Se efectuaron 3 corridas adicionales (*E*, *F* y *G*) con la finalidad de coleccionar los volúmenes de elución de las fracciones B5, B4, B3 y B2 de cada corrida e integrar un volumen de pre-purificación para ser procesado en las siguientes etapas.

En la Figura 47 se muestran los perfiles de absorbancia de las fases de adsorción, lavado y elución de las corridas *D*, *E*, *F* y *G*, que sugieren una alta reproducibilidad experimental. Las muestras coleccionadas a la salida de la columna, en estas corridas, también fueron analizadas electroforéticamente con resultados similares al de la Figura 45.

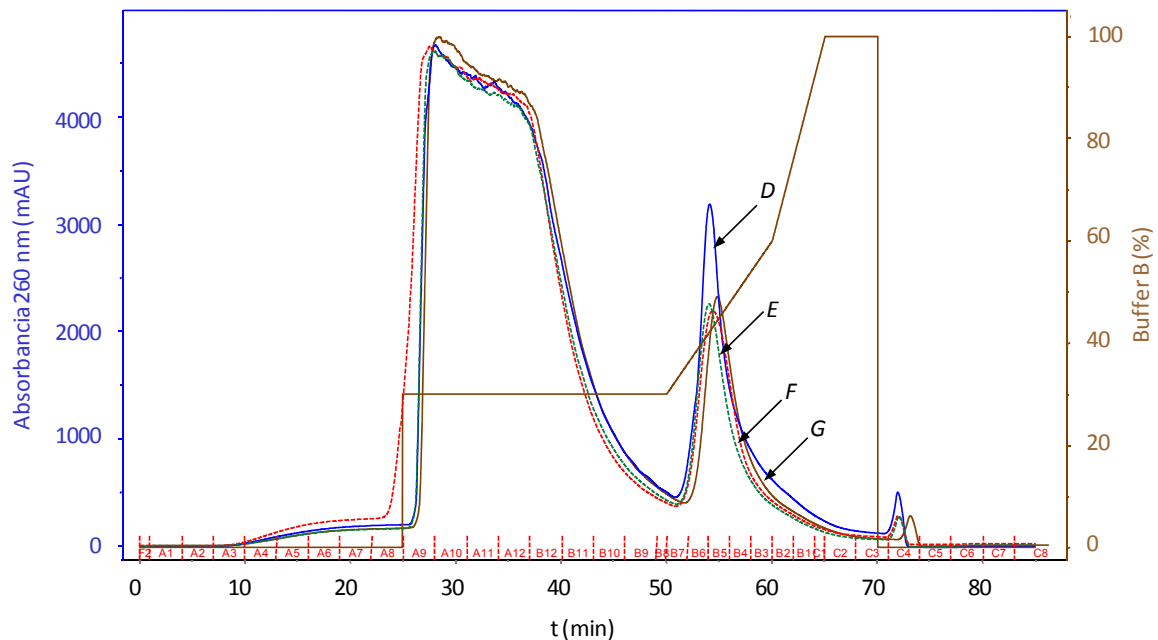


Figura 47. Perfiles de adsorción, lavado y elución en una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico usando un flujo de 0.5 mL/min de retenido-1 diluido 1:5 de concentración de pDNA de 7.05 $\mu\text{g/mL}$, en las corridas D, E, F y G.

Diafiltración-2. El volumen total de las fracciones B5 a B2 de la corridas D, E, F y G fue de 16 mL.

Este volumen fue diafiltrado por TFF, utilizando 4 volúmenes de buffer TE en el lavado. Después de diafiltrar y concentrar, el volumen obtenido fue de 10 mL de retenido-2. La concentración de pDNA en el retenido-2 fue 5.84 $\mu\text{g/mL}$, 51.0 % de pureza HPLC y la conductividad 1.5 mS/cm.

El retenido-2 se comparó con el retenido-1 en términos de reducción de impurezas. En la Figura 48 se presentan los cromatogramas analíticos del retenido-1 diluido 1:5 y retenido-2. En la figura se muestra que hay una disminución de impurezas en el retenido-2, como lo denota la reducción de los picos a los 1.28, 1.75 y 3.58 min de retención. La pureza del retenido-2 aumentó considerablemente (19.6 veces), sin embargo no hubo incremento en la concentración de pDNA. Estos resultados muestran que en esta etapa se ha eliminado más del 97 % del RNA.

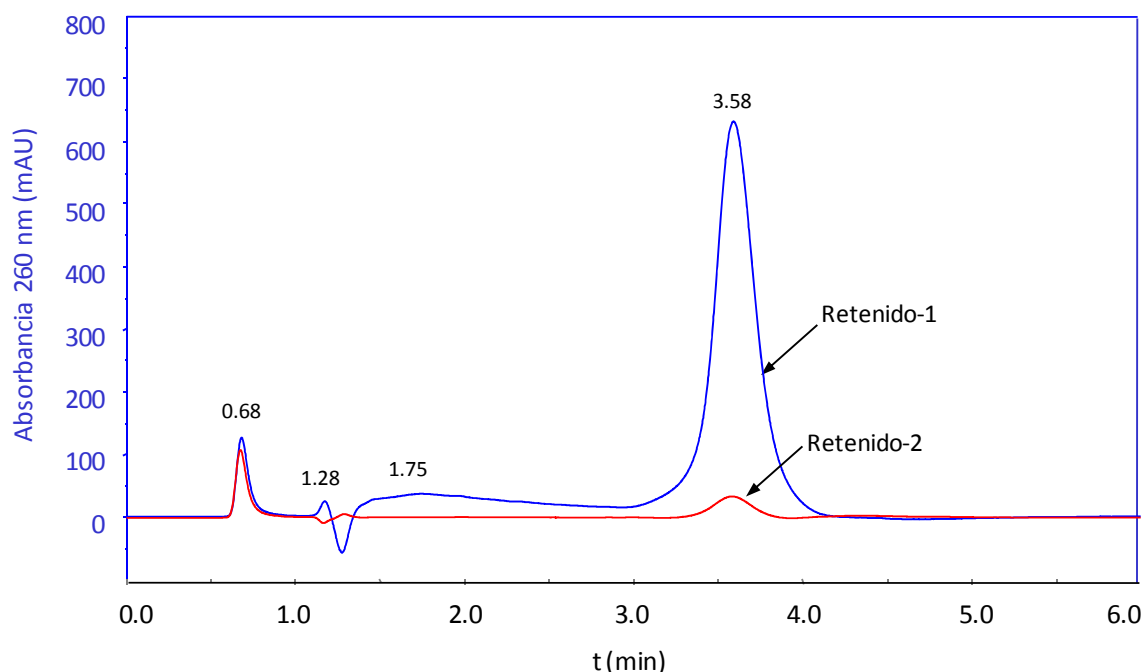


Figura 48. Cromatogramas analíticos HIC-HPLC del retenido-1, diluido de concentración de pDNA 7.05 $\mu\text{g/mL}$, pureza 4.69 % y retenido-2, sin diluir de concentración de pDNA de 5.84 $\mu\text{g/mL}$, pureza 51 %.

4.3.4 Purificación final

La purificación final del plásmido por cromatografía frontal se efectuó mediante la corrida experimental *H*, bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 7. Se alimentaron 5 mL de retenido-2 de concentración de pDNA de 5.84 $\mu\text{g/mL}$ a un flujo de 0.5 mL/min a una columna (0.5 x 5 cm), empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q, conectada al sistema Äkta Purifier. Durante la fase de elución se colectaron fracciones de 0.5 mL, con la finalidad de analizar más detalladamente las muestras.

Tabla 7. Condiciones utilizadas en la corrida *H* de purificación por AEC.

Fase	Tiempo (min)	Buffer % B	Molaridad M
adsorción	0 – 10	0	0.0
lavado	10 – 30	30	0.6
elución	30 – 38	30 – 60	0.6 – 1.2
	38 – 41	60 – 100	1.2 – 2.0
	41 – 45	100	2.0
equilibrio	45 – 60	0	0.0

B = NaCl 2.0 M en buffer TE

Buffer TE = Tris 10 mM/EDTA 1 mM, pH 8.0

En la Figura 49 se muestra el perfil de absorbancia de las fases de adsorción, lavado y elución obtenido durante la purificación de plásmido. En el perfil de adsorción se observa que no se alcanzó el punto de ruptura con la cantidad de muestra aplicada. En el perfil de lavado se muestra que una pequeña cantidad de RNA se elimina durante esta etapa. Durante la etapa de elución se obtuvieron dos picos, el primero formado por la fracción de RNA y el segundo de pDNA.

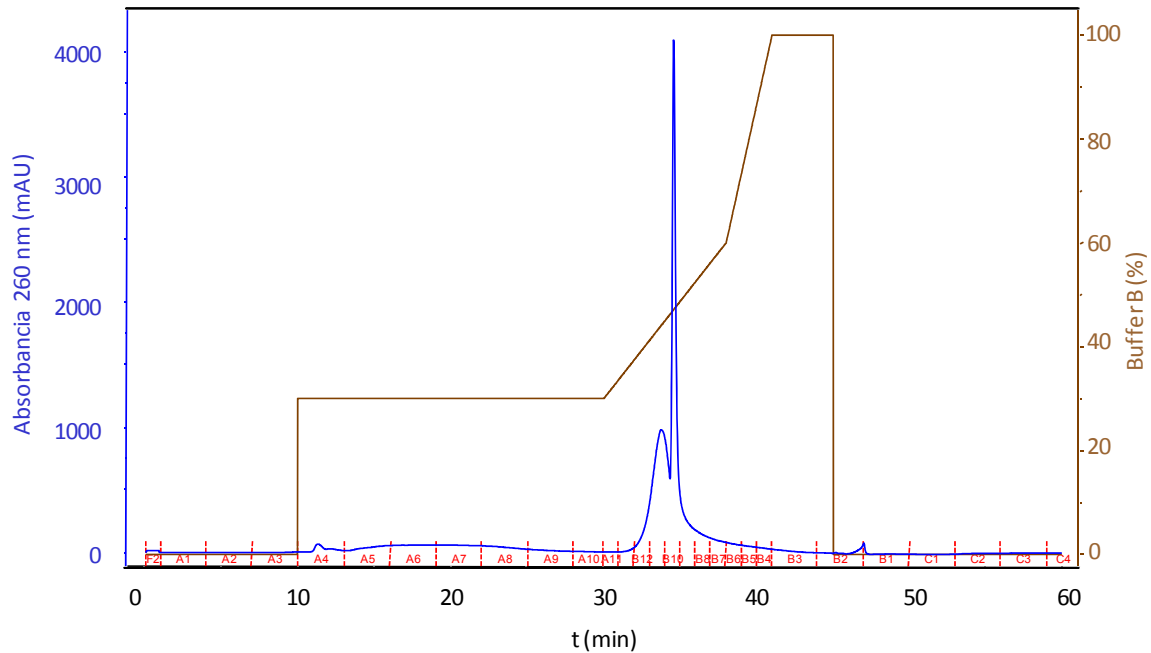


Figura 49. Perfiles de adsorción, lavado y elución obtenido en una columna empacada con 30 membranas de intercambio iónico, usando un flujo de 0.5 mL/min de solución de retenido-2 de concentración de pDNA de 5.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$, corrida H.

En la Figura 50 se encuentra el análisis en gel de electroforesis de muestras colectadas. La línea 3 de la parte superior, correspondiente a la fase de adsorción, muestra que la columna se encuentra adsorbiendo al 100% los solutos de la solución alimentada. Las líneas 4 – 10 de la parte superior, de muestras correspondientes a la fase de lavado, indican que prácticamente no se elimina RNA durante esta fase. Las líneas 7 y 8 parte inferior, muestran la mayor parte del plásmido eluye en dos fracciones. La primera presenta trazas de RNA, mientras que la segunda se encuentra

prácticamente libre de este contaminante. Además, el gel de agarosa muestra que en la fracción que contiene el plásmido, predomina la forma súperenrollada. La concentración de pDNA en la segunda fracción fue de $8.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ (aumentó 1.3 veces) y 73.45 % de pureza HPLC (aumentó 28.2 veces). La optimización del gradiente de elución podría ayudar a una mejor separación entre los picos de pDNA y RNA.



Figura 50. Gel de electroforesis de las muestras colectadas durante la corrida H.

En la Figura 51 se presentan los cromatogramas analíticos HIC-HPLC de las muestras de soluciones en diferentes etapas, con el fin de visualizar el comportamiento de las soluciones de plásmido, en cuanto a su purificación a lo largo de las etapas del proceso. Se puede observar en la figura que el área correspondiente al pDNA (tiempo de retención 0.68 min), es prácticamente igual en todas las muestras, lo que indica que la concentración de pDNA no disminuyó durante el proceso. También se puede apreciar en la figura la disminución del contenido de impurezas, como lo denota la reducción de los picos de RNA de bajo peso molecular y proteínas (tiempo de retención 1.28 y

1.75 min) y del pico de RNA de alto peso molecular y gDNA (tiempo de retención 3.58 min). Gran parte del RNA de alto peso molecular se elimina mediante la diafiltración-1, pero la mayor reducción se logra mediante la pre-purificación con membranas de intercambio iónico.

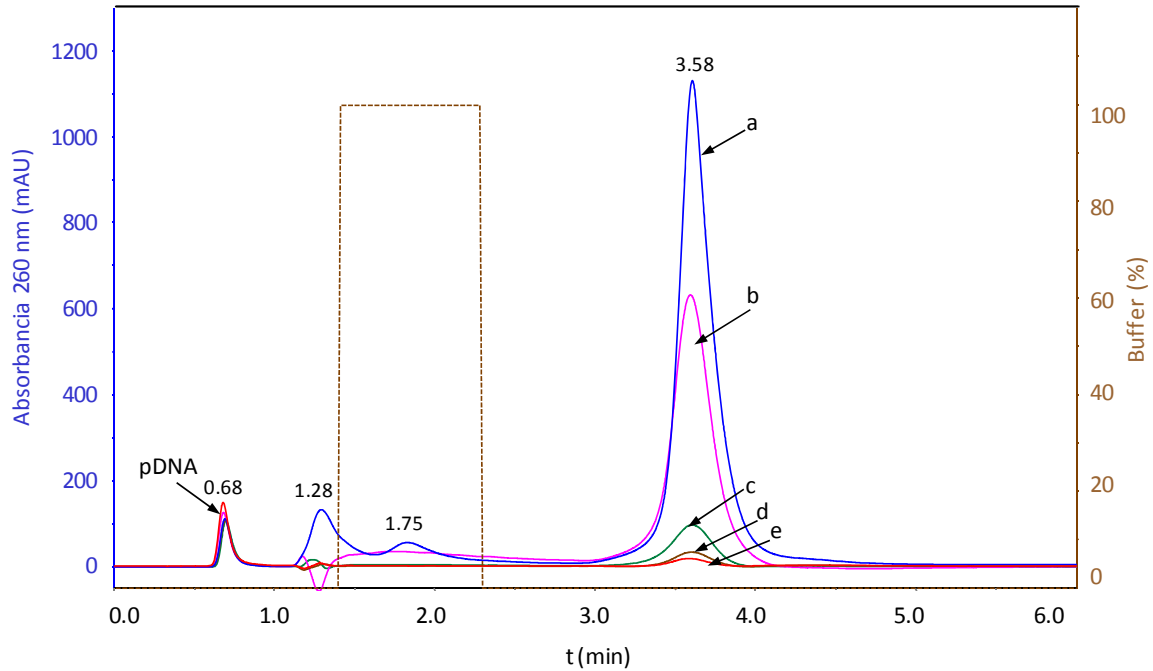


Figura 51. Cromatogramas analíticos HIC-HPLC de muestras de soluciones en las diferentes etapas del proceso de purificación por AEC: (a) lisado clarificado diluido, de [pDNA] = $5.95 \mu\text{g/mL}$ y pureza 2.64 %; (b) retenido-1 diluido, de [pDNA] = $7.05 \mu\text{g/mL}$ y pureza 4.69 %; (c) fracción B5 de elución en la pre-purificación, sin diluir de [pDNA] = $5.88 \mu\text{g/mL}$ y pureza 21.87 %; (d) retenido-2 sin diluir, [pDNA] = $5.84 \mu\text{g/mL}$ y pureza 51.00 % y (e) fracción de elución de purificación sin diluir, [pDNA] = $8.03 \mu\text{g/mL}$ y pureza 73.45 %. La línea punteada indica el porcentaje de buffer de elución.

4.4 Proceso de Producción de Plásmido por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

El proceso de purificación de plásmido por la FAEMC y la HIC (proceso FAEMC-HIC) consta de las etapas de fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia, y purificación final del plásmido

4.4.1 Fermentación de *E. coli* DH5 α (pVAX1-LacZ), recuperación primaria y recuperación intermedia

Las etapas de fermentación, recuperación primaria y recuperación intermedia son iguales a las del proceso anteriormente descrito. De tal manera que para analizar el comportamiento de este proceso se tomó una muestra de 5 mL de retenido-2 y se sometió a la etapa de purificación final.

4.4.2 Purificación final

En la etapa de purificación final se realizaron las operaciones de precipitación, clarificación y cromatografía por elución en HIC.

Precipitación y clarificación. Un volumen de 5 mL de retenido-2 se acondicionó para la procesarse en HIC, por medio de una precipitación con sulfato de amonio y después del periodo de incubación, se clarificó por centrifugación para eliminar los sólidos. El retenido-2 acondicionado tuvo una concentración de pDNA de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ y 55 % de pureza HPLC (aumentó 21.4 veces).

Cromatografía por elución en HIC. Primero se equilibró la columna HIC pre-empacada con 1 mL de resina Phenyl Sepharose 6 fast flow con 10 volúmenes de buffer de adsorción (sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM/HCl, pH 8) con flujo constante de 0.5 mL/min. Se realizó la corrida I. En la corrida I se alimentó el retenido-2 acondicionado a la columna por medio de inyección de 1 mL, en un loop de 0.5 mL, seguido de un lavado con buffer de adsorción durante 6 min. Después se hizo

una elución isocrática con buffer Tris 10 mM/HCl, pH 8.0, por 9 min. Finalmente se incrementó la fuerza iónica 3 min con el buffer de adsorción. Se colectaron muestras de 0.5 mL para su análisis.

En la Figura 52 se muestra el perfil de absorbancia de las etapas de lavado y elución del retenido-2 acondicionado de la corrida en HIC. El perfil del lavado corresponde al plásmido purificado y una pequeña cantidad de impurezas no retenidas por la columna. Durante la elución isocrática se obtiene un solo pico que corresponde a las impurezas más hidrofóbicas, principalmente RNA.

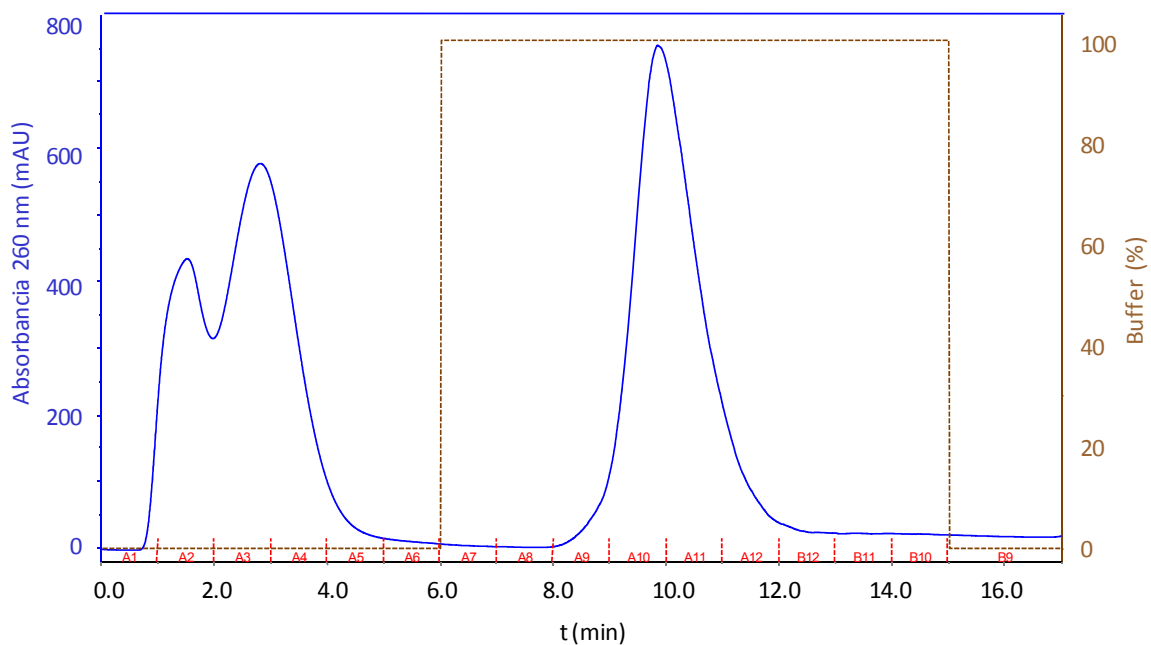


Figura 52. Perfiles de lavado y elución obtenido en una columna pre-empacada con 1 mL de resina Phenyl Sepharose 6 fast flow usando un flujo de 0.5 mL/min de una solución de retenido-2 acondicionado con sulfato de amonio, de concentración de pDNA de 6.25 $\mu\text{g/mL}$, corrida 1.

Las muestras colectadas durante la corrida fueron desaladas por medio de centrifugación en filtros de Microcon Centrifugal antes del análisis electroforético en gel de agarosa. En la Figura 53 se presenta el gel de electroforesis correspondiente a la corrida 1. Las líneas 3, 4 y 5 corresponden al a la fase de lavado y muestran que durante esta fase se recupera el plásmido purificado, lo que es

característico de la HIC. En las líneas 6, 7 y 8 corresponden al pico de elución. En estas líneas se observa que el pico está conformado sólo por RNA contaminante.

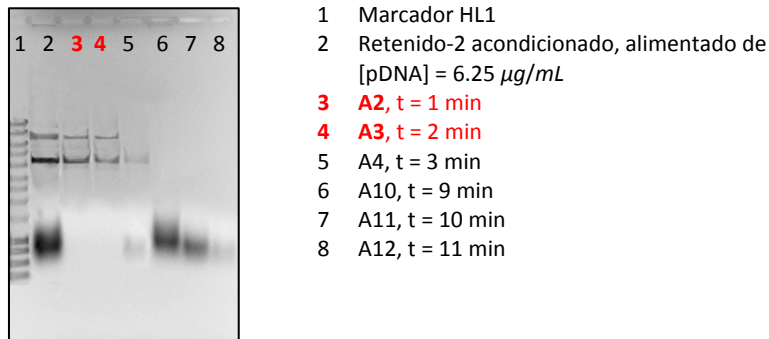


Figura 53. Gel de electroforesis de las muestras de volúmenes colectados durante la cromatografía por elución de 0.5 mL de solución de retenido-2 acondicionado con sulfato de amonio.

El análisis por HIC-HPLC de las fracciones colectadas durante la corrida 1, muestra que la fracción A2 (correspondiente a la línea 3, Fig. 53) presenta un 79.31 % de pureza HPLC y una concentración de pDNA de 1.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con este proceso se logró eliminar del 99 % de las impurezas del lisado y un incremento de pureza de 30.5 veces. Sin embargo el factor de dilución fue de 3.2 veces, este efecto es propio del comportamiento de la cromatografía por elución, que purifica y diluye la muestra alimentada.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En los estudios de simulación, los modelos de transporte de cromatografía por lotes y en columna de membranas fueron resueltos de una forma relativamente sencilla usando el método de líneas (*MOL*) acoplado en una plataforma MATLAB.

En los estudios de simulación, la solución *MOL* del modelo de transporte tanto de la cromatografía por lotes, como de la cromatografía en columna de membranas permitió una predicción segura del desarrollo y una mejor comprensión de los mecanismos fundamentales responsables de la separación. La respuesta dinámica obtenida en ambos casos, está en concordancia con las predicciones teóricas y muestra que el modelo de transporte puede usarse como una referencia para proporcionar una descripción general de la mayoría de los sistemas prácticos, cuando se usan los parámetros básicos experimentales apropiados.

Se logró establecer un proceso base, de acuerdo a reportes de la literatura para la producción de pDNA a escala laboratorio. Este proceso fue utilizado como patrón de comparación y para obtener pDNA purificado para los estudios cualitativos.

Se desarrollaron los nuevos bioprocesos FAEMC y FAEMC-HIC para obtener pDNA purificado a partir de cultivos de *E. coli*. En ambos bioprocesos la operación de filtración de flujo tangencial (TFF) sirvió para eliminar una parte considerable del RNA presente en el lisado, esto favoreció la capacidad de adsorción del pDNA durante la cromatografía en la etapa de pre-purificación.

En el proceso FAEMC, las columnas de membranas fueron capaces de recuperar y purificar eficientemente el pDNA a altas velocidades de flujo, la mayor parte del RNA del lisado fue eliminado durante las operaciones del proceso y se obtuvo una solución de pDNA de alta pureza, adecuada para ser procesada en las operaciones posteriores de acabado. Las operaciones de acabado son necesarias en todos los procesos de purificación de pDNA para alcanzar la calidad requerida por las agencias reguladoras en pDNA de uso clínico.

El Proceso FAEMC puede ser escalado debido a que evita el uso de sales precipitantes y alcoholes, frecuentemente usados en las etapas de recuperación de los procesos de producción de pDNA a nivel laboratorio. Estos agentes constituyen una limitación en el escalamiento de procesos debido a los problemas que presentan para su tratamiento o desecho.

El uso de membranas ofrece muchos beneficios incluyendo que son desechables (no requieren ser empacadas), mayor capacidad dinámica de adsorción para moléculas grandes y procesos linealmente escalables. Para incrementar la capacidad de producción, además del uso de membranas grandes, es posible el uso de unidades múltiples en una combinación de flujo en paralelo y en serie. Este enfoque puede permitir una pre-purificación eficiente para el pDNA en escala de kilogramos operando a altas velocidades de flujo.

En investigaciones futuras pueden mejorarse varias condiciones de operación de este bioproceso, para maximizar el rendimiento y pureza del pDNA, particularmente las fases de lavado y elución durante la cromatografía en columna.

La purificación de pDNA en el Proceso FAEMC-HIC fue eficiente para recuperar el pDNA proveniente de la solución de pre-purificación acondicionada, sin embargo este tipo de operación tiene la limitante que debe ser operada en forma de elución, lo que limita el tamaño de la muestra y produce la sustancia de interés en forma diluida. Dado que este proceso utiliza sulfato de amonio como precipitante, esto constituye un inconveniente en términos de tratamientos de desechos, si se desea escalar el proceso.

En el Proceso FAEMC-HIC puede mejorarse para posteriores investigaciones, probando en la columna HIC, diferentes volúmenes de muestra inyectada y eventualmente la operación en modo frontal para un posible aumento en la productividad del proceso y la concentración de la solución de pDNA recuperado.

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS

1. Arnold F. H., Blanch, H.W., Wilke C. R. (1985). Analysis of affinity separations I: Predicting the performance of affinity adsorbers. *Chem. Eng. J.*, 30, B9 – B23.
2. Arve B.H., Liapis A.I. (1987). Modeling and analysis of biospecific adsorption in a finite bath. *AIChE J.*, 33, 179 – 193.
3. Ashino R., Nagase M., Vaillancourt R. (2000). Behind and beyond the MATLAB ODE Suite. *Comput. & Math. with Appl.*, 40, 491 – 421.
4. Ask A., Akesson A., Onsbler M. (2006). Ion exchange HPLC simulations by a user-friendly simulation tool, CProcessimulering. *Workshop Proceedings*. Nilsson, B. Editor. Lund University.
5. Avci A.K., Camurdan M.C., Ulgen, K.O. (2000). Quantitative description of protein adsorption by frontal analysis. *Process Biochem.*, 36, 141 – 148.
6. Bhikhabhai K. (2002). Plasmid DNA purification using divalent alkaline earth metal ions and two anion exchangers. Patente 6410274 E.U.A.
7. Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *J. Nucl. Acids Res.*, 7, 1513 – 1523.

8. Boi C., Dimartino, S. Sarti G.C. (2007). Modelling and simulation of affinity membrane adsorption. *J. Chromatogr. A.*, 1162, 24 – 33.
9. Carlson A., Signs M., Liermann L., Boor, R. Jem K. J. (1995). Mechanical disruption of *Escherichia coli* for plasmid recovery. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 303 – 315.
10. Chase, H.A. (1984). Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 291, 179 – 202.
11. Danckwerts, P.V. (1953). Continuous flow systems: distribution of residence times. *Chem. Eng. Sci.*, 2, 219 – 230.
12. Demmer, W.; Nussbaumer, D. (1999). Large-scale membrane adsorbers. *J. Chromatogr. A*, 852, 73 – 81.
13. Diogo M.M., Queiroz J.A., Prazeres D.M.F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, 1069, 3 – 22.
14. Diogo M.M., Queiroz J.A., Prazeres D.M.F. (2003). Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 998, 109 – 117.
15. Diogo M.M., Ribeiro S.C., Queiroz J.A., Monteiro G.A., Tordo N., Perrin P., Prazeres D.M.F. (2001). Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J. Gene Med.*, 3, 577 – 584.
16. Diogo M. M., Queiroz J. A., Monteiro G. A., Martins S. A. M., Ferreira G. N. M., Prazeres D. M. F. (2000). Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 576 – 583.
17. Diogo M.M., Ribeiro S.C., Queiroz J.A., Monteiro G.A., Perrin P., Tordo N., Prazeres D.M.F. (2000a). Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies. *Biotechnol. Letters*, 22, 1397–1400.
18. Duarte S. P., Fortes A. G., Prazeres D. M.F., Marcos J. C., (2007). Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process. *J. Chromatogr. A*, 1164, 105 – 112.

19. Enders H.N., Johnson J.A., Ross C.A. Welp J.K., Etzel M.R. (2003). Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 259 – 266.
20. Eon-Duval A., Burke G. (2004). Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B*, 804, 327 – 335.
21. Eon-Duval A., Gumbs K., Ellett C. (2003). Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: Use of experimental design to determine reaction conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 544 – 553.
22. Eon-Duval A., MacDuff R.H., Fisher C. A., Harris M. J., Brook C. (2003a). Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Anal. Biochem.*, 316, 66 – 73.
23. Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *TIBTECH.*, 18, 380 – 388.
24. Ferreira G.N.M., Cabral J.M.S., Prazeres D.M.F. (2000a) Studies on the Batch Adsorption of Plasmid DNA onto Anion-Exchange Chromatographic Supports. *Biotechnol. Prog.*, 16, 416 – 424.
25. Ferreira G.N.M., Cabral J.M.S., Prazeres D.M.F. (1999). Development of process flow sheets for the purification of supercoiled plasmids for gene therapy applications. *Biotechnol. Prog.*, 15, 725 – 731.
26. Ferreira G.N.M., Cabral J.M.S., Prazeres D.M.F. (1997). A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification. *Biotechnol. Tech.*, 11, 417 – 420.
27. Fischer-Frühholz S. (2005). Membrane adsorbers Part 1. *GIT. Lab. J.*, 2, 53 – 55.
28. Freitas S.S., Santos J.L., Prazeres D.M.F. (2008). Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep. Purif. Technol.*, doi:10.1016/j.seppur.2008.04.001 (en prensa).

29. Freitas S.S., Santos J.L., Prazeres D.M.F. (2006). Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.* 22, 1179 – 1186.
30. Geankoplis, C. J. *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias* (1998), CECSA. México.
31. Ghose S., Forde G.M., Slater N.K.H. (2004). Affinity Adsorption of Plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.*, 20, 841 – 850.
32. Gomes G.A., Azevedo A.M., Aires-Barros M.R., Prazeres D.M.F. (2008). Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Sep. Purif. Technol.*, doi:10.1016/j.seppur.2008.01.026 (en prensa).
33. Grunwald A., Shields M.S. (2001). Plasmid purification using membrane based anion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.*, 296, 138 – 141.
34. Guichon G., Shirazi S. G., Katti A. M. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography* (1994), Academic Press, Boston, MA.
35. Haber C., Skupsky J., Lee A., Lander R. (2004). Membrane chromatography of DNA: Conformation-induced capacity and selectivity. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 26 – 34.
36. He L., Niemeyer B.A. (2003). Novel correlation for protein diffusion coefficients based on molecular weight and radius of gyration. *Biotechnol. Prog.*, 19, 544 – 548.
37. Horn N.A., Meek J.A., Budahazi G., Marquet M. (1995). Cancer gene therapy using plasmid DNA: Purification of DNA for human clinical trials. *Hum. Gene Ther.*, 6, 565 – 573.
38. Horstmann B.J., Chase H.A. (1989). Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein A immobilised to agarose matrices. *Chem. Eng. Res. Des.* 67, 243 – 254.
39. Kahn D.W., Butler M.D., Cohen D.L., Gordon M., Kahn J. W., Winkler M E. (2000). Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 101 – 106.
40. Kelly W. (2003). Perspectives on plasmid-based gene therapy: challenges for the product and the process. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37, 219 – 223.

41. Kendall D., Lye G.J., Levy M.S. (2002). Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption. *Biotechnol. Bioeng.*, 79, 816 – 822.
42. Kochan J.E., Wu Y., Etzel M.R. (1996). Purification of bovine immunoglobulin G via protein G affinity membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 35, 1150 – 1155.
43. Ledley E. (1995). Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. *Hum. Gene Ther.*, 6, 1129 – 1144.
44. Levy M.S., O’Kennedy R.D., Ayazi-Shamlou P., Dunnill, P. (2000). Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol.*, 18, 296 – 305.
45. Li L., Liu Y., Sun M., Shao Y. (2007). Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1139, 228 – 235.
46. Li X., Jin H., Wu Z., Rayner S., Yin J., Yu Y., Zhang W., He Z., Wang C., Wang B. (2007). An automated process to extract plasmid DNA by alkaline lysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, 1217 – 1223.
47. Li Y., Dong X., Sun Y. (2005). High-speed chromatographic purification of plasmid DNA with a customized biporous hydrophobic adsorbent. *Biochem. Eng. J.*, 27, 33 – 39.
48. Liapis A. I. (1989). Theoretical aspects of affinity chromatography. *J. Biotechnol.*, 11, 143 – 160.
49. Listner K., Bentley L., Okonkowski J., Kistler C., Wnek R., Caparoni A., Junker B., Robinson D., Salmon P., Chartrain M. (2006). Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnol. Prog.*, 22, 1335 – 1345.
50. Liu H., Fried J. R. (1994). Breakthrough of lysozyme through an affinity membrane of cellulose-cibacron blue. *AIChE J.*, 40, 40 – 49.
51. Ljunglöf A., Bergvall, P., Bhikhabhai R., Hjorth, R. (1999). Direct visualization of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy. *J. Chromatogr. A*, 844, 129 – 135.

52. Ljunglöf A., Thömmes J. (1998). Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy. *Chromatogr. A.*, 813, 387 – 395
53. Manthorpe M., Hobart P., Ferrari M., Geall A., Goff B., Rolland A., (2005). Plasmid vaccines and therapeutics: from design to applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 99, 41 – 92.
54. Meacle F. J., Lander R., Ayazi Shamlou P., Titchener-Hooker N. J (2004). Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations. *Biotechnol. Bioeng.*, 87, 291 – 302.
55. Meyers J.J., Crosser O.K., Liapis A.I. (2001). Pore network modelling: determination of the dynamic profiles of the pore diffusivity and its effect on column performance as the loading of the solute in the adsorbed phase varies with time. *J. Chromatogr. A*, 908, 35 – 47.
56. Meyers J.J., Crosser O.K., Liapis A.I. (2001a). Pore network modelling of affinity chromatography: determination of the dynamic profiles of the pore diffusivity of β -galactosidase and its effect on column performance as the loading of β -galactosidase onto anti- β -galactosidase varies with time. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 49, 123 – 139.
57. Montesinos-Cisneros R.M., Vega J., Ortega J., Guzmán R., Tejeda-Mansir A. (2007). Breakthrough performance of plasmid DNA on ion-exchange membrane columns. *Biotechnol.Prog.*, 23, 881 – 887.
58. Montesinos-Cisneros R.M., Guzmán-Zamudio R., Ortega-Lopez J.,Tejeda-Mansir A. (2005). Cromatografía frontal de plásmidos: estimación de parámetros y simulación. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 4, 47 – 48.
59. Montesinos R.M., Tejeda-Mansir A., Guzmán R., Ortega J. Schiesser W.E. (2005a). Analysis and simulation of frontal affinity chromatography of proteins. *Sep. Purif. Technol.*, 42, 75 – 84.
60. Mountain A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.*, 18, 119 – 128.
61. Passarinha I. A., Diogo M. M., Queiroz J. A., Monteiro G. A., Fonseca I. P., Prazeres D. M. F. (2006). Production of ColE1 type plasmid by *Escherichia coli* DH5 α cultured under nonselective conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 20 – 24.

62. Persson P., Kempe H., Zacchi G., Nilsson B. (2005). Estimation of adsorption parameters in a detailed affinity chromatography model based on shallow bed experiments. *Proc. Biochem.*, 40, 1649 – 1659.
63. Persson P., Kempe H., Zacchi G., Nilsson B. (2004). A methodology for estimation of mass transfer parameters in a detailed chromatography model based on frontal experiments. *Chem. Eng. Res. Des.*, 82, 517 – 526.
64. Prather K.J., Sagar S., Murphy J., Chartrain M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 865 – 883.
65. Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M. (2004). Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chem. Eng. Process.*, 43, 609 – 624.
66. Prazeres D.M.F., Monteiro G.A., Ferreira G.N.M., Diogo M.M., Ribeiro S.C., Cabral J.M.S. (2001). Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol. Ann. Rev.* M.R. El-Gewely. Elsevier. Amsterdam. 7, 1 – 30.
67. Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Cooney C.L., Cabral J.M.S. (1999). Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottleneck. *Trends Biotechnol.* 17, 169 – 174.
68. Prazeres D.M.F., Schluep T., Cooney C. (1998). Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion exchange Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 806, 31 – 45.
69. Rahimpour F., Feyzi F., Maghsoudi S., Hatti-Kaul R. (2006). Purification of Plasmid DNA with Polymer-Salt Aqueous Two-Phase System: Optimization Using Response Surface Methodology. *Biotechnol. Bioeng.*, 95, 627 – 637.
70. Ribeiro S.C., Monteiro G.A., Prazeres D.M.F. (2004). The role of polyadenylation signal secondary structures on the resistance of plasmid vectors to nucleases. *J. Gene Med.*, 6, 565 – 573.
71. Sarfert F.T., Etzel M.R. (1997). Mass transfer limitations in protein separations using ion-exchange membranes. *J. Chromatogr. A*, 764, 3 – 20.

72. Schiesser W.E., Silebi C.A. (1997). *Computational transport phenomena: numerical methods for the solution of transport problems*. Cambridge University Press. Cambridge. U.K.
73. Schleef M., Schmidt T. (2004). Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *J. Gene Med.*, 6, S45 – S53.
74. Schluep T., Cooney C.L. (1998). Purification of plasmids by triplex affinity interaction *Nucleic Acids Res.*, 26, 4524 – 4528.
75. Schmidt T., Friehs K., Schleef M., Voss C., Flaschel E. (1999). Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 274, 235 – 240.
76. Shampine L.F., Reichelt M.W., Kierzenka J.A. (1999). Solving index-1 DAEs in MATLAB and Simulink. *Siam Review*, 18, 538 – 552.
77. Shampine L. F., Reichelt M.W. (1997). The MATLAB ODE suite. *Siam J. Sci. Comput.*, 18, 1 – 22.
78. Shuler M.L., Kargi F. (2001). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall Prof. Tech. Ref. New Jersey.
79. Silebi C.A., Schiesser W. E. (1992). *Dynamic Modeling of Transport Process Systems*. Academic Press Inc. San Diego, Ca.
80. Sinden R.R. (1994). *DNA Structure and Function*. Academic Press, San Diego CA.
81. Skidmore G.L., Hortsman B.J., Chase H.A. (1990). Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger s sepharose® FF. *J. Chromatogr. A.*, 498, 113 – 128.
82. Smith C. R., De Prince R. B., Dackor J., Weigl D., Griffith J., Persmark M. (2007). Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA. *J. Chromatogr. B.*, 854, 121 – 127.
83. Sousa F., Freitas S., Azzoni A.R, Prazeres D.M.F., Queiroz J. (2006). Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 45, 131 – 140.

84. Sousa F., Tomaz C.T., Prazeres D.M.F., Queiroz J.A. (2005). Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support. *Anal. Biochem.*, 343, 183 – 185.
85. Squires T. M., Quake S. R. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.*, 77, 977 – 1026.
86. Sridhar P. (1996). Modelling of affinity separation by batch and fixed bed adsorption – a comparative study. *Chem. Eng. Technol.* 19, 357 – 363.
87. Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T. (2004). Plasmid DNA purification. *Gene Med.*, 6, S54 – S66.
88. Suen S., Etzel M. R. (1992). A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations. *Chem. Eng. Sci.*, 47, 1355 – 1364.
89. Summers D.K. (1996). *The Biology of Plasmid*. Blackwell, Oxford, UK.
90. Sun J.Y., Anand-Jawa V., Chatterjee S., Wong, K.K. (2003). Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther.*, 10, 964 – 976.
91. Teeters M.A., Root T.W., Lightfoot E.N. (2004) Adsorption and desorption behavior of plasmid DNA on ion-exchange membranes. Effect of salt valence and compaction agents. *J. Chromatogr. A*, 1036, 73 – 78.
92. Teeters M.A., Conrardy S.E., Thomas B.L., Root T.W., Lightfoot E.N. (2003). Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, 989, 165–173.
93. Tejeda-Mansir A., Montesinos R.M., Guzmán R. (2005). Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 1–28.
94. Theodossiou I., Thomas O.R.T., Dunnill P. (1999). Methods of enhancing the recovery of plasmid genes from neutralised cell lysate. *Bioprocess Eng.*, 20, 147 – 156.
95. Tiainen P., Galaev I., Larsson P.(2007). Plasmid adsorption to anion-exchange matrices: Comments on plasmid recovery. *Biotechnol. J.*, 2, 726 –735.

96. Trindade I.P., Diogo M.M., Prazeres D.M.F., Marcos J.C. (2005). Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr.A*, 1082, 176 –184.
97. Tscheliessniga A, Hahn R., Jungbauer A., (2005). In situ determination of adsorption kinetics of proteins in a finite bath. *J. Chromatogr. A*, 1069, 23 – 30.
98. Tseng W., Ho F., Fang T., Suen S. (2004). Effect of alcohol on purification of plasmid DNA using ion-exchange membrane. *J. Membr. Sci.*, 233, 161–167.
99. Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Feigner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWit C.M., Friedman A., Howe L.A., Leander K.R., Martinez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.L., Liu M.A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259, 1745 – 1749.
100. Urthaler J., Ascher C., Wöhrer H., Necina R. (2007). Automated alkaline lysis for industrial scale cGMP production of pharmaceutical grade plasmid-DNA. *J. Biotechnol.*, 128, 132 – 149.
101. Urthaler J., Buchinger W., Necina R. (2003). Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 703 – 711.
102. Wagner E. (1999). In: Blankenstein T. (Ed.) *Gene therapy: Principles and applications*. Basel, Birkhauser Verlag. 47 – 59.
103. Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. (1990). Direct gen transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 247, 1465 – 1468.
104. Wouwer A. V., Saucez P., W. E. Schiesser W.E. (2004). Simulation of distributed parameter systems using a MATLAB-based method of lines toolbox: chemical engineering applications. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 43, 3469 – 3477.
105. Yang H., Etzel M.R. (2003). Evaluation of three kinetic equations in models of protein purification using ion-exchange membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 890 – 896.
106. Yang H., Bitzer M., Etzel M.R. (1999). Analysis of protein purification using ion-exchange membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 4044 – 4050.

107. Yang N.S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B., McCabe D. (1990). *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9568 – 9572.
108. Zhang S., Krivosheyeva A., Nochumson S. (2003). Large-scale capture and partial purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 245 – 249.
109. Zhu K., Jin H., Ma Y., Ren Z., Xiao C., He Z., Zhang F., Zhu Q., Wang B. (2005). A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA. *J. Biotechnol.*, 118, 257 – 264.

ANEXO A

Acondicionamiento de las Membranas Mustang Q

Las membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals (Mich. EUA) con un tamaño de poro nominal de 800 *nm*, se cortaron a 0.5 *cm* de diámetro, por medio de un punzón.

Se acondicionaron de acuerdo con las instrucciones del proveedor:

- Se sumergen en NaOH 1.0 M por 5 min, agitando suavemente
- Se retira el NaOH y se enjuagan con 2 ml de NaCl 1.0 M
- Se sumergen en NaCl 1.0 M por 5 min, agitando suavemente, al final de este período se elimina la solución de NaCl
- Se enjuagan dos veces con buffer Tris 10 mM/1.0 mM EDTA a pH 8
- Se dejan reposar por aproximadamente 12 h en el mismo buffer para que se equilibren previamente a su uso.

Se colocan las membranas en el interior de la columna una a una utilizando un émbolo y se utilizan una vez en cada estudio.

ANEXO B

Construcción de la Curva Estándar para pVAX-LacZ

Para la determinación de la concentración de plásmido pVAX1-LacZ, en las muestras, a partir de los cromatogramas HIC-HPLC, se obtuvo una curva estándar para relacionar el área del pico del plásmido con su concentración.

Se utilizaron volúmenes de 1 mL de estándares preparados en concentraciones de 2.5, 5.0, 10.0, 25.0 y 50.0 $\mu\text{g/mL}$ de plásmido purificado por el proceso base. La concentración de pDNA en los estándares fue determinada por absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia (UA) corresponde a 50.0 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA (Diogo *et al.*, 2003).

Los estándares fueron diluidos en sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM /HCl, pH 8 para ser analizados por HIC-HPLC usando el procedimiento descrito en la sección 3.7.2. El área del pico asociada al pDNA (tiempo de retención de 0.68 min) de cada estándar, se graficó contra la concentración utilizada de plásmido y se ajustó una línea recta a los datos.

La Figura BI muestra la curva estándar obtenida, siendo la ecuación correspondiente:

$$y = 1.6767 x \quad (36)$$

donde

y = Área de pDNA en mAU-min

x = concentración de pDNA en $\mu\text{g/mL}$

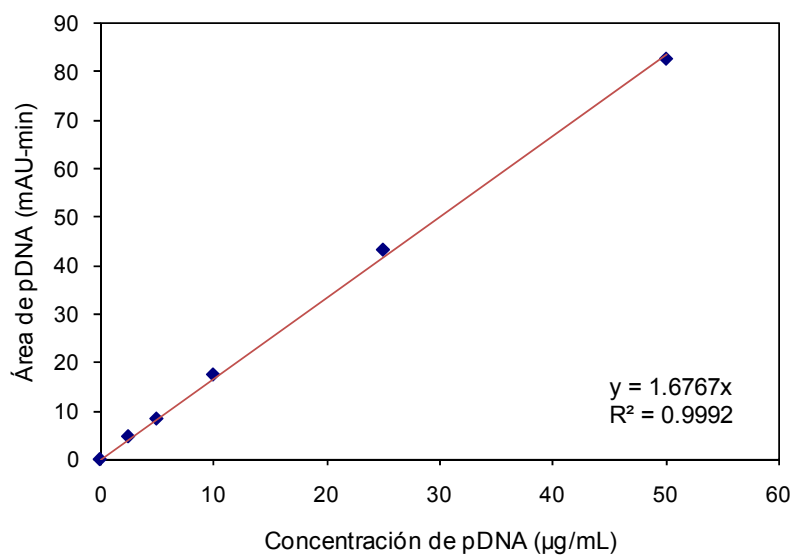


Figura B1. Curva estándar para pVAX-LacZ.

ANEXO C

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

Y

PUBLICACIONES

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Proyecto: “Producción cosecha y purificación del plásmido pc-DNA-Ehcp112”. México, Febrero de 2007.

Instituto Superior Técnico de la Universidad Técnica de Lisboa, en el Centro de Ingeniería Biológica y Química. Proyecto: “Análisis y Diseño de Procesos para la Purificación de DNA Plasmídico”. Portugal, Septiembre de 2007 a Marzo 2008.

PUBLICACIONES

Guerrero G. P., Lucero A. A., Montesinos C. R. M., Tejeda M. A. (2007) Analysis and simulation of batch affinity processes applied to separation of biomolecules. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 51(2) 59 – 66.

Guerrero-Germán P., Prazeres D.M.F, Guzmán R., Montesinos-Cisneros R. M., Tejeda-Mansir A. (2008). Purification of plasmid DNA using tangential flow filtration and tandem anion-exchange membrane chromatography. *Bioprocess Biosyst. Eng.* DOI 10.1007/s00449-008-0284-7 (en prensa).

Guerrero-Germán P., Montesinos-Cisneros R. M., Guzmán R., Tejeda-Mansir A. (2008) Modelling and simulation of plasmid DNA adsorption on ion-exchange membrane columns. *Biotech. Bioprocess Eng.* (en revisión).

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Participación en el XXVIII Encuentro Nacional de la Asociación Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ) que se realizó en Manzanillo, Colima del 1 al 4 de Mayo de 2007. El trabajo presentado fue: "Simulación de procesos cromatográficos en columnas de membranas aplicados a la separación de plásmidos".

Participación en el Coloquio de Tecnología de Plásmidos, organizado por el Depto. de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, de la Universidad de Sonora y el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. en Hermosillo, Sonora, el 17 de Mayo. El trabajo presentado fue: "Simulación de columnas para purificación de plásmidos con *MATLAB*".