



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y
METALURGIA

**Estudio de la recuperación primaria de ADN
plasmídico a partir de lisados de *E. coli* por
microfiltración de lecho profundo**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ADRIANA PADILLA ZAMUDIO

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2013

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 OBJETIVO GENERAL	4
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4 JUSTIFICACIÓN	5
1.5 HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO II	6
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	6
2.1 TERAPIA GÉNICA Y VACUNACIÓN	6
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PLÁSMIDOS	8
2.3 CARACTERÍSTICAS DEL PVAX1-NH36	9
2.4 ETAPAS EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ADNp	9
2.4.1 Fermentación	10
2.4.2 Recuperación Primaria	11
2.4.3 Recuperación Intermedia	16
2.4.4 Purificación Final	17
2.5 FILTRACIÓN	18
2.5.1 Microfiltración de lecho profundo	20
CAPÍTULO III	26
MATERIALES Y MÉTODOS	26

3.1 MATERIALES	26
3.2 EQUIPO.....	27
3.3 METODOLOGÍA.....	31
3.3.1 Fermentación.....	32
3.3.2 Recuperación primaria	33
3.3.3 Análisis del comportamiento de las operaciones de clarificación	35
3.3.4 Modelo de recubrimiento	37
CAPÍTULO IV.....	40
■ RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 FERMENTACIÓN	40
4.2 RECUPERACIÓN PRIMARIA	41
4.2.1 Clarificación por microfiltración de lecho profundo	41
4.2.2 Clarificación por centrifugación	63
4.3.3 Comparación.....	66
CAPÍTULO V.....	68
CONCLUSIONES.....	68
BILIOGRAFÍA	70
ANEXOS.....	74
ANEXO A: CÁPSULAS SARTOCLEAR®P: INSTRUCCIONES DE USO	74
ANEXO B: CÁPSULAS DE FILTRO DE PROFUNDIDAD SARTOCELAR®P PARA ENSAYOS A ESCALA LABORATORIO.....	80
ANEXO C: MANUAL DE INSTRUCCIONES TN-100/T-100, TURBIDIMETRO PORTABLE.....	82
ANEXO D: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON COLUMNA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HPLC- HIC).....	87
ANEXO E: DATOS DE LOS PROCESOS DE MICROFILTRACIÓN A DIFERENTES TIEMPOS, CAMBIANDO EL TAMAÑO DE PORO (8 Y 4 µM) Y EL FLUJO DE ENTRADA (6 Y 4 CM ³ /MIN) ..	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia electrónica de transmisión de plásmidos.....	9
Figura 2. Etapas en el proceso para la obtención de ADNp.....	10
Figura 3. Métodos de rompimiento celular.....	12
Figura 4. Lisis Alcalina para la liberación de plásmido.....	12
Figura 5. Operaciones unitarias usadas para remover sólidos.....	14
Figura 6. Purificación y concentración de lisado clarificado de ADNp.....	16
Figura 7. Mecanismos de filtración.....	18
Figura 8. Tipos de filtración según el tamaño de partícula que se retiene.....	19
Figura 9. Mecanismos de retención de partículas por filtros de lecho profundo.....	21
Figura 10. Ilustración de un filtro compuesto de fibras orientadas al azar antes (izquierda) y después (derecha) de recubrimiento.....	22
Figura 11. Incubadora, Orbital Shaker Incubator. VWR.....	29
Figura 12. a) Biorreactor Applikon® (Holanda) de 2L acoplado al software ez-Control, b) Centrifuga Thermo Fisher Scientific®.....	29
Figura 13. a) Microfiltros Sartoclear® P Caps, b) Bomba Masterflex Cole-Parmer.....	29
Figura 14. Turbidímetro OAKTON T-100.....	30
Figura 15. Cámara horizontal de electroforesis y Equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía.....	30
Figura 16. Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare®.....	30
Figura 17. Metodología utilizada en la etapa de recuperación primaria.....	31
Figura 18. a) Filtración al vacío para la recuperación del pre clarificado, b) Vista superior de lecho profundo.....	34
Figura 19. Sistema utilizado para el proceso de microfiltración de lecho profundo.....	35
Figura 20. Cápsula de microfiltro utilizada en la experimentación.....	38
Figura 21. Curva de crecimiento celular durante la etapa de fermentación, proporcionada por estudiantes de posgrado en DICTUS.....	40
Figura 22. Gel de electroforesis, Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder), Línea 2 lisado pre-clarificado al vacío con poro de 8-12 μm (Diluido 1/2).....	42

Figura 23. Cromatograma del lisado pre-clarificado al vacío con membranas de tamaño de poro 8-12 μm	43
Figura 24. Muestras colectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 4 cm^3/min a diferentes tiempos.....	44
Figura 25. Cambio de turbidez respecto al tiempo en microfiltración (4 μm y flujo de 4 cm^3/min).....	46
Figura 26. Gel de electroforesis de lisado clarificado con microfiltro de 4 μm y flujo inicial de 4 cm^3/min	46
Figura 27. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración (4 μm , flujo de 4 cm^3/min), (B) lisado clarificado por centrifugación.....	47
Figura 28. Perfil del volumen específico en sistema de microfiltración con tamaño de poro de 4 μm y flujo inicial de 4 cm^3/min	48
Figura 29. Muestras colectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 6 cm^3/min a diferentes tiempos.....	49
Figura 30. Turbidez de cada muestra recolectada durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 6 cm^3/min a diferentes tiempos.	50
Figura 31. Gel de electroforesis de lisado clarificado con microfiltro de 4 μm y flujo inicial de 6 cm^3/min	51
Figura 32. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración (4 μm , flujo de 6 cm^3/min), (B) lisado clarificado por centrifugación.....	52
Figura 33. Perfil del volumen específico en sistema de microfiltración (4 μm y flujo inicial de 6 cm^3/min).....	53
Figura 34. Muestras recolectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 8 μm y flujo de 4 cm^3/min	54
Figura 35. Turbidez de cada muestra recolectada durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con poro de 8 μm y flujo de 4 cm^3/min	55
Figura 36. Gel de electroforesis microfiltración con tamaño de poro 8 μm y flujo de 4 cm^3/min	56
Figura 37. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración (8 μm , flujo de 4 cm^3/min), (B) lisado clarificado por centrifugación.....	57
Figura 38. Curva de volumen específico en sistema de microfiltración (8 μm y flujo de 4 cm^3/min).....	58
Figura 39. Muestras recolectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 8 μm y flujo 6 cm^3/min	59

Figura 40. Turbidez de cada muestra recolectada durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con poro de 8 μm y flujo de 6 cm^3/min	60
Figura 41. Gel de electroforesis de lisado clarificado con microfiltro de 8 μm y flujo de 6 cm^3/min	61
Figura 42. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración (8 μm , flujo de 6 cm^3/min), (B) lisado clarificado por centrifugación.....	62
Figura 43. Curva de volumen específico en sistema de microfiltración (8 μm y flujo de 6 cm^3/min).....	63
Figura 44. Gel de electroforesis, Línea 7 clarificado por centrifugación (2x).	64
Figura 45. Cromatograma obtenido a partir de la muestra clarificada por doble centrifugación.....	65
Figura 46. Gel de electroforesis comparativo.	67
Figura 46. Alineación del vial con el turbidímetro.	83
Figura 47. Secuencia de calibración.	84
Figura 48. a) Vial muestreador, b) Aplicación de una película de aceite de silicona.	85
Figura 49. Curva estándar obtenida con ayuda del sistema HIC-HPLC	87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas de administración para vacunas de ADN (Prazeres y col., 2001).....	6
Tabla 2. Pruebas clínicas de ADNp en terapia génica	7
Tabla 3. Productos obtenidos del lisado de células bacterianas (Stadler y col., 2004)	13
Tabla 4. Parámetros utilizados en el modelo de recubrimiento de fibras en los microfiltros de lecho profundo	39
Tabla 5. Flux inicial para cada proceso de microfiltración de lecho profundo	39
Tabla 6. Agregados sólidos obtenidos al final de pre-clarificación	41
Tabla 7. Resultados obtenidos en el análisis del lisado pre-clarificado obtenido por filtración al vacío.	44
Tabla 8. Datos obtenidos en microfiltración con tamaño de poro de 4 μ m y flujo de 4 cm ³ /min	45
Tabla 9. Datos obtenidos en proceso de microfiltración con tamaño de poro de 4 μ m y flujo de 6 cm ³ /min	49
Tabla 10. Datos obtenidos en proceso de microfiltración con tamaño de poro de 8 μ m y flujo de 4 cm ³ /min	54
Tabla 11. Datos obtenidos en proceso de microfiltración con tamaño de poro de 8 μ m y flujo de 6 cm ³ /min	59
Tabla 12. Resultados obtenidos en el análisis del lisado clarificado por centrifugación	65
Tabla 13. Comparación del volumen, concentración, masa y turbidez del lisado clarificado por centrifugación con el obtenido en cada experimento de microfiltración.....	66
Tabla 14. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μ m y flujo de 4 cm ³ /min.....	88
Tabla 15. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μ m y flujo de 6 cm ³ /min.....	88
Tabla 16. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 8 μ m y flujo de 4 cm ³ /min.....	89
Tabla 17. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 8 μ m y flujo de 6 cm ³ /min.....	89

RESUMEN

Desde la última década, numerosos estudios han sido publicados sobre la posible aplicación de ADN plasmídico en terapia génica y en la producción de vacunas. El éxito de estas técnicas que utilizan ADN plasmídico como vector, depende del desarrollo de bioprocesos que entreguen este material de la mejor calidad y además sean escalables y sustentables.

El proceso para la preparación del ADNp involucra una etapa de producción de células de *E. coli* por fermentación seguida de una recuperación primaria que incluye las etapas de resuspensión de biomasa, lisis alcalina, neutralización del lisado y clarificación por centrifugación, después se pasa a una recuperación secundaria donde se trata de concentrar el ADNp de interés por medio de ultrafiltración para realizar la purificación final por medio de cromatografía.

La microfiltración de lecho profundo aparece como alternativa en la etapa de recuperación primaria, para clarificar el lisado neutralizado y de esta manera quitar la mayor cantidad de agregados sólidos formados durante el proceso de lisis y neutralización. Esta es una técnica que consiste en la separación de un sólido de un fluido por acción de un medio filtrante y un gradiente de presión, donde pequeñas partículas suspendidas en el fluido son depositadas en diferentes profundidades dentro de los poros de un lecho de material.

En el presente trabajo, se utilizó la macromolécula conteniendo el plásmido pVAX1-NH36 de 4 kpb hospedado en la cepa *E. coli* DH5 α . Se desarrolló la etapa de recuperación primaria por medio de la resuspensión, lisis alcalina y neutralización de la biomasa, para después realizar la clarificación por filtración al vacío y microfiltración de lecho profundo con diferente tamaño de poro: 4 y 8 μm , y diferente flujo volumétrico: 4 y 6 cm^3/min ,

además se llevó a cabo la clarificación del lisado neutralizado por medio de la operación de centrifugación, para así realizar una comparación entre ambos procesos.

Se utilizó un modelo de taponamiento por recubrimiento de fibras del medio filtrante para conocer el comportamiento del sistema de microfiltración de lecho profundo.

El proceso de microfiltración de lecho profundo resultó ser eficiente para la remoción de sólidos agregados en comparación de la clarificación por centrifugación.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

El interés en el ADN plasmídico (ADNp) para la vacunación y la terapia génica se ha ido incrementando drásticamente en los últimos años colocando un gran énfasis en la mejora de los métodos para su producción.

La idea detrás de su producción es que un gen medicinal, llevado por un plásmido de ADN de doble cadena, se administre al paciente, que el gen se codifique para una proteína que es, ya sea faltante o defectuosa (es decir, terapia génica) o antigénica (es decir, vacuna de ADN). Una de las claves para el desarrollo de productos biofarmacéuticos elaborados a partir de ADNp es la disponibilidad de métodos escalables para su producción.

En el proceso de producción y recuperación de ADNp se involucran 4 etapas: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final.

Siguiendo el proceso después de la fermentación de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), uno de los retos más importantes después de la lisis alcalina, en la etapa de recuperación primaria, que es paso clave para la fabricación de ADNp, es la eliminación de ARN, lipopolisacáridos (LPS), trazas de ADN genómico (ADNg), y el aislamiento de las isoformas de ADNp superenrollado de otras variantes menos activas. La centrifugación, filtración y flotación son algunas de las operaciones unitarias utilizadas para la remoción de sólidos (agregados sólidos y precipitados) de lisados neutralizados (Prazeres y col., 2001).

La centrifugación es una tecnología muy desarrollada y aún es usada predominantemente durante el bioproceso, sin embargo al presentar esta operación a escala industrial puede

resultar costosa y difícil de escalar, por lo que el interés en la filtración ha ido creciendo continuamente, por ser económica y fácilmente escalable (Karim y col., 2008).

La filtración es una operación mecánica o física ampliamente utilizada para la separación de sustancias basadas en el tamaño de partícula. La partícula o molécula de interés puede ser o bien parte de lo que pasa a través del filtro o parte de lo que es retenida. La filtración puede ser impulsado por gravedad, vacío o presión.

Los tipos de filtración utilizados en biotecnología incluyen: microfiltración, ultrafiltración y ósmosis Inversa.

El termino microfiltración indica un flujo impulsado por una presión a través de una superficie microporosa para separar y recuperar micro o sub-micro partículas de fluidos, partículas de 0.05 a 10 μm hasta partículas más grandes (Kulkarni y col., 1992). En la industria biotecnológica, la microfiltración es típicamente utilizada para la recuperación de células y su separación de fluidos extracelulares conteniendo la proteína recombinante deseada, o para la recuperación de cuerpos de inclusión y eliminación de proteínas indeseables de la célula huésped (Wang y col., 2005).

Esta investigación se centra en la etapa de recuperación primaria del proceso de obtención de ADNp la cual involucra operaciones de cosecha, lisis y neutralización y clarificación del lisado neutralizado obtenido. En los procesos probados a nivel laboratorio se efectúa la clarificación del lisado por medio de centrifugación para eliminar los restos celulares y precipitados. En este trabajo se investiga la microfiltración de lecho profundo para sustituir la centrifugación como operación de clarificación, que también es utilizada para clarificar lisados de cultivos directamente.

Conforme el fluido pasa a través del filtro las partículas son removidas y el filtro se va agotando hasta que eventualmente se empieza a detectar y elevar el nivel de sólidos a la salida del filtro. Paralelamente, la caída de presión en el lecho se irá incrementando.

La operación se detiene cuando la concentración de sólidos a la salida del filtro o turbidez alcanza un valor máximo aceptable o punto de ruptura, antes de alcanzar su caída de presión máxima (Tejeda y col., 2011).

La microfiltración forma el puente entre el cultivo/fermentación de la célula y el resto del proceso para las aplicaciones de purificación. Así pues, hay una gran necesidad para optimizar el proceso rápidamente y a bajo costo (Venkiteshwaran y Belfort, 2010).

1.2 Objetivo General

Estudiar el efecto de las variables de operación sobre la recuperación primaria de ADN plasmídico a partir de lisados de *E. coli* por microfiltración de lecho profundo.

1.3 Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto del tamaño de poro del filtro y flujo volumétrico de alimentación sobre la clarificación de lisados mediante microfiltración de lecho profundo.
- Comparar la clarificación de lisados mediante microfiltración de lecho profundo y por centrifugación.
- Analizar el comportamiento de la microfiltración por medio de los análisis de turbidez, electroforesis y concentración en el lisado clarificado.
- Describir el comportamiento del sistema de microfiltración mediante un modelo empírico.

1.4 Justificación

El proceso de recuperación primaria del plásmido puede ser desarrollado de varias maneras, como son: centrifugación, flotación y filtración. Hasta ahora la mayoría de los estudios se han basado sólo en la recuperación por centrifugación. Sin embargo, es necesario evaluar más detenidamente las operaciones alternativas como la filtración existiendo la posibilidad de optimizar el proceso. Además, los filtros pueden resultar más fáciles de escalar.

1.5 Hipótesis

- La aplicación de la microfiltración en la etapa de recuperación primaria, para clarificar el lisado alcalino, puede competir en rendimiento y en calidad del plásmido respecto a la clarificación por centrifugación.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Terapia génica y vacunación

La terapia génica es un proceso que consiste en transferir de manera eficiente el material genético a la célula receptora del cuerpo humano, para que codifique la síntesis de alguna proteína, que al expresarse, realiza una acción inmunizante o terapéutica. Uno de los métodos para administrar genes terapéuticos es la inyección directa de ADNp (Prazeres y col., 1998).

Las vacunas de ADN tienen el potencial de conferir protección a largo plazo de las enfermedades infecciosas tales como SIDA, debido a que el antígeno es (potencialmente) hecho continuamente por el gen suministrado en lugar de ser administrado sólo durante la vacunación.

Tabla 1. Sistemas de administración para vacunas de ADN (Prazeres y col., 2001)

Intramuscular	Inyección directa de ADN desnudo en el musculo y es captado por las células musculares.
Pistola de Genes	Impulsa plásmido revestido en oro dentro de las células. Algunos plásmidos son absorbidos por el núcleo.
Complejos de ADN	Se realiza un complejo de ADN con liposomas. Protege al ADN de la degradación.
Electroporación	Utiliza pulsos cortos de corriente eléctrica para mejorar la distribución del ADN. Permite a los plásmidos entrar pasiva y directamente en el citoplasma de la célula.
Sistemas de Entrega Viral	ADN que codifica para el antígeno se clona en un vector del virus, él huésped se infecta con muestra atenuada.

Uno de los beneficios de las vacunas de ADN es que cualquier proteína antigénica codificada por el gen suministrado provocará no sólo un anticuerpo primario específico, sino también una respuesta inmune secundaria debido a que el antígeno se origina dentro de las células del paciente (Graham, 2002).

La terapia génica y la vacunación de ADN requieren la identificación de genes relacionados a una enfermedad en particular (hereditaria o adquirida), la fabricación de un gen terapéutico, el diseño de un vector molecular (y su formulación), y la introducción del gen en el paciente. Cuando el gen es expresado en el paciente, se espera que la correcta proteína sea formada y funcione adecuadamente (Lara y Ramirez, 2011).

El éxito de la terapia génica es básicamente debido al desarrollo de un vector que puede entregar selectiva y eficientemente un gen a una célula objetivo con la mínima toxicidad (Li y Huang, 2000). En la Tabla 2, se muestran las diferentes enfermedades en donde se ha podido aplicar terapia génica y se mencionan varios ejemplos en específico de cada enfermedad.

Tabla 2. Pruebas clínicas de ADNp en terapia génica

Tipo de Enfermedad	Ejemplo de aplicaciones
Cáncer	Melanoma maligno, carcinoma pancreático, carcinoma de célula renal y de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma metastático y próstata, cáncer de pecho pulmón y colon, linfoma, leucemia, mieloma múltiple, glioma maligno
Enfermedades Cardiovasculares	Isquemia del miembro, enfermedad coronaria del corazón, enfermedad de oclusión de arterial periférica, angina.
Enfermedades Infecciosas	SIDA, hepatitis B, Tetanos, Influenza.
Enfermedades Monogénicas	Enfermedad de Huntington, hemofilia.
Enfermedades Neurológicas	Esclerosis múltiple, neuropatía diabética.
Otras	Retinitis pigmentosa (distrofia progresiva de retina), diabetes tipo 1, disfunción eréctil, fractura de cadera, hipertensión pulmonar.

Fuente: The journal of Gene Medicine (John Wiley & Sons)

2.2 Características de los plásmidos

Los plásmidos son entidades de replicación autónoma los cuales pueden ser encontrados esencialmente en todas las bacterias y el cual juega un rol importante en su adaptación y evolución, son normalmente circulares, sin embargo también se han descrito formas lineales y varían ampliamente en su tamaño desde 1 kb hasta 200 kb.

El ADNp es altamente isomórfico (Fig. 1), sus diferentes formas aisladas corresponden a estructuras moleculares distintivas e interconvertibles (Ferreira, 2005). La mayoría de los plásmidos existen como moléculas circulares de ADN de doble cadena.

Los plásmidos son moléculas de ADN covalentes cerradas, de doble cadena, cada cadena de ADN es un polímero lineal de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster (Sinden 1994).

La forma exacta de una molécula de plásmido depende en su integridad. El eje de la hélice de ADNp puede ser enrollado en el espacio, formando una molécula de orden superior llamado ADNp superenrollado (sc). La forma circular covalente cerrada (ccc) está en un estado superenrollado, la "circular abierto" (oc) está en un estado de relajación o se encuentra dañada (Schleef y Blaesen, 2009).

La forma lineal del plásmido ha sido considerada indeseable para los propósitos clínicos, debido al aumento del riesgo de eventos de recombinación y de integración en el ADNg, esta forma lineal puede estar sujeta a una degradación intracelular más rápida que la circular superenrollada y la circular abierta. Un plásmido lineal de 3 kpb tiene una masa molecular de 2×10^6 Da y una longitud de 1 μ m (Davis y col., 1980).

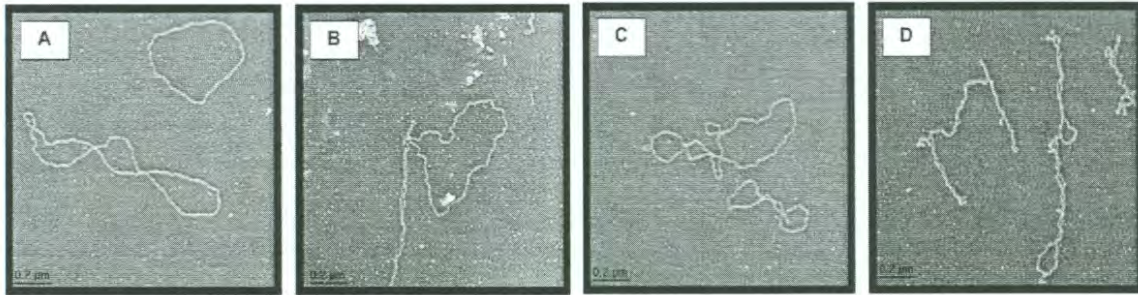


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de plásmidos: A) plásmido circular abierto B) plásmido superenrollado y abierto circular, C) plásmido relajado, D) plásmido superenrollado (Smith y col., 2007).

2.3 Características del pVAX1-NH36

- El plásmido pVAX1-NH36 tiene un tamaño de 4000 pb, codifica para la glicoproteína *Nucleósido Hidrolaza* (NH36), expresada por la mayoría de las especies de *Leishmania*. La leishmaniasis es una enfermedad causada por los parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Esta enfermedad puede ser clasificada en leishmaniasis visceral, si involucra la infección del hígado, el bazo, la médula espinal e inmunosupresión, causando severos daños y hasta la muerte de no ser atendida, o en leishmaniasis cutánea que se caracteriza por lesiones crónicas en la piel (Aguilar-Be, 2004).

2.4 Etapas en el proceso de obtención de ADNp

El bioproceso utilizado para la obtención de plásmidos se muestra a continuación (Fig. 2), se describe el seguimiento que se debe de realizar en condiciones estériles para obtener un alto grado de pureza en cada muestra de plásmido.

El proceso está constituido por cuatro etapas principales que son: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación; Estas etapas son explicadas a continuación más detalladamente.

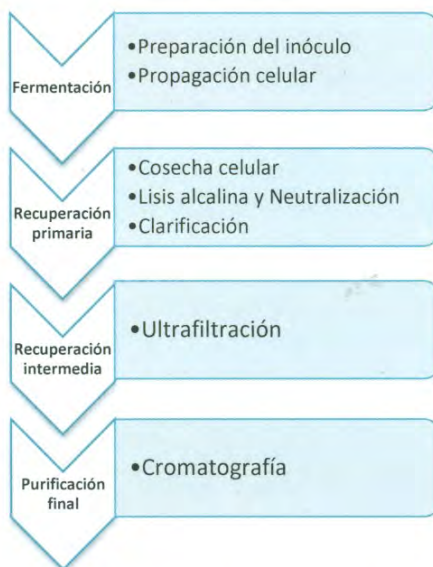


Figura 2. Etapas en el proceso para la obtención de ADNp.

2.4.1 Fermentación

El objetivo principal para diseñar un proceso de fermentación para la obtención de plásmidos es maximizar tanto la producción volumétrica (mg/L) como la producción específica (mg/g) del plásmido superenrollado. Optimizar la producción volumétrica permite una mejor y más económica fermentación mientras que la optimización de la producción específica mejora la pureza del plásmido en el proceso.

Es necesario establecer un proceso eficiente para obtener una gran cantidad de ADNp con gran pureza, ya que se sabe que la pureza final del producto va a depender de la pureza inicial del material utilizado. Para obtener una gran densidad de masa celular durante la fermentación se requiere un medio balanceado que suministre cantidades adecuadas de nutrientes necesarios para energía, biomasa y mantenimiento de la célula.

El diseño de un medio balanceado está basado en los requerimientos de energía y composición elemental de la célula. Una fermentación de gran densidad celular necesita un medio que contenga una fuente de carbón, nitrógeno, varias sales y rastros de metales (Carnes, 2005).

2.4.2 Recuperación Primaria

Las etapas siguientes del proceso consisten en una secuencia de operaciones unitarias diseñadas para liberar las moléculas de ADNp de las células hospedadoras y en remover impurezas y contaminantes hasta que el nivel de pureza y otras especificaciones se obtengan. El proceso comienza con la recuperación de las células del caldo por una centrifugación o microfiltración convencional. Las células son después resuspendidas en un buffer apropiado para el siguiente paso diseñado para el rompimiento de células y liberación del plásmido.

El buffer de resuspensión usualmente contiene agentes que tienen la habilidad de alterar los enlaces iónicos y de hidrógeno entre peptidoglicanos, lípidos y/o proteínas del contorno de la célula. Por ejemplo, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es comúnmente usado como agente quelante.

La remoción de cationes divalentes (comúnmente Ca^{2+} y Mg^{2+}) de la pared celular, membrana externa (en bacterias Gram negativa) y en membrana de plasma desestabiliza su estructura, facilitando el proceso de lisis y previniendo la degradación del plásmido. La glucosa es usualmente incluida en el buffer para proteger a los plásmidos de que se rompan (Prazeres y col., 2001).

Una buena recuperación de productos internos de la célula requiere del estudio sobre las capas que protegen a la célula que son la membrana y la pared celular.

Existen varios métodos para el rompimiento de la superficie celular, entre los que se encuentran los métodos químicos y los métodos mecánicos (Fig. 3).

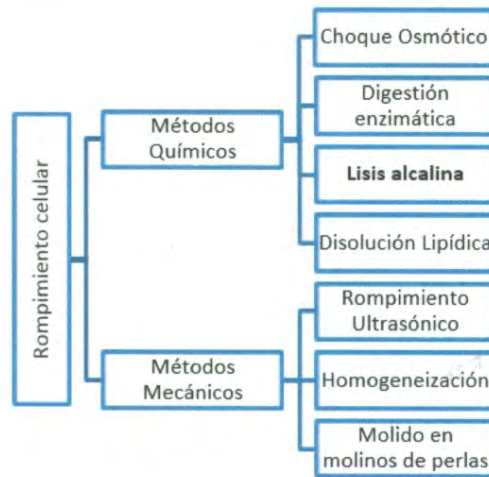


Figura 3. Métodos de rompimiento celular.

Lisis alcalina

Debido a que el daño ocasionado a las moléculas de plásmido es usualmente significativo se utiliza el procedimiento de lisis alcalina originalmente descrito por Birnboim y Doly (1979) el cual se basa en la solubilización de membranas por saponificación de lípidos pequeños.

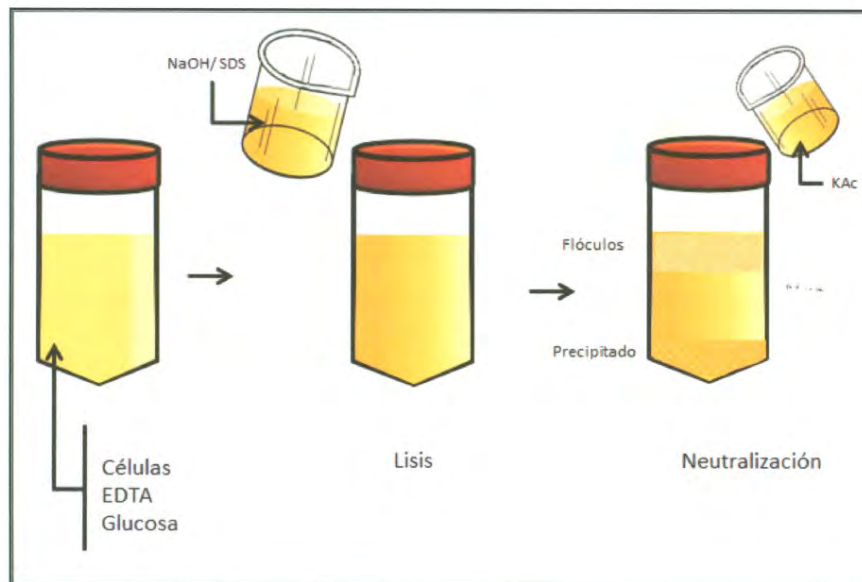


Figura 4. Lisis Alcalina para la liberación de plásmido: las células resuspendidas son lisadas por una mezcla de detergente. Los lisados después son neutralizados con una solución alta/baja de pH (KAc – acetato de potasio) (Prazeres y col., 2001).

El proceso de rompimiento es iniciado por la adición de un reactivo de lisis a la bacteria *E. coli* en suspensión (Fig. 4). Este reactivo normalmente contiene un agente alcalino (0.2M NaOH) y un detergente (1% dodecil sulfato de sodio, SDS). El papel del detergente es solubilizar el material de la membrana celular, mediante la eliminación de las interacciones interfaciales no covalentes entre proteínas y lípidos (Ciccolini y col. 1999).

El agente alcalino eleva el valor del pH por lo que promueve la desnaturalización irreversible del ADNg, y mantiene reversible la desnaturalización del plásmido (Prazeres y col. 2001). La lisis alcalina no solo rompe la pared celular, liberando moléculas de plásmidos, si no también remueve considerables cantidades de residuos (Tabla 2), ADNg y proteínas, las cuales precipitan en la neutralización, dejando ARN como el mayor contaminante, junto con pequeñas cantidades de ADNg, proteínas y endotoxinas (Smrekar y col., 2010).

Tabla 3. Productos obtenidos del lisado de células bacterianas (Stadler y col., 2004)

Macromolécula	Porcentaje
Proteína	55%
ARN	21%
ADNg (cel. Hospedadora)	3%
Lipopolisacáridos	3%
ADNp	3%
Otros	15%

Neutralización

El siguiente paso después de la lisis celular (Fig. 4), es la adición de una sustancia fría de neutralización alta en sales (3 M acetato de potasio, a un pH de 5), la cual causa la renaturalización de las moléculas del plásmido que permanecen en la solución y promueve la formación de agregados de ADNg y complejos de proteína.

Los fragmentos de ADNg precipitan mientras que los complejos de proteína forman una suave, flotante y altamente cortante gel-matriz sensible con propiedades visco elásticas, la cual atrapa restos celulares, ARN y ADNg (Ciccolini y col., 1999).

Clarificación

Después de la neutralización del lisado, se forma una gran cantidad de precipitado, con partículas entre 0.5 y 100 μm , este material sólido es altamente “gelatinoso” y tiende a flocularse. Cualquier operación sólido – líquido puede ser utilizada para remover el material sólido. Para esto se han utilizado varias operaciones unitarias como son la centrifugación, filtración y flotación (Fig. 5) las cuales se usan individualmente o combinadas para remover los sólidos del lisado (Prazeres y col., 2001).

La centrifugación es la operación de preferencia, sin embargo, en operaciones a grandes escalas se prefiere la filtración (Theodossiou y col., 1997).

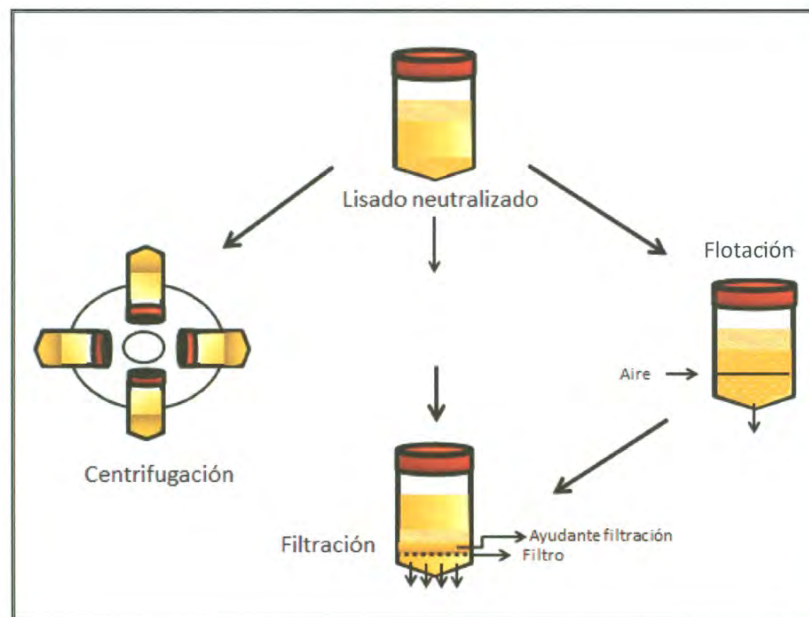


Figura 5. Operaciones unitarias usadas para remover sólidos (agregados sólidos y precipitados) del lisado neutralizado (Prazeres y col., 2001).

A pesar de que la centrifugación es altamente usada en escala de laboratorio, no es un procedimiento atractivo debido a las altas fuerzas de corte generadas. Además, los sólidos de baja densidad pueden ser difíciles de sedimentar aún con una centrifugación prolongada a alta velocidad (Tejeda y col., 2011).

Se ha estudiado, como alternativa a la centrifugación, la filtración con diferentes tipos de materiales con tamaño de poros en un rango de 5 -160 μm . Para mejorar la clarificación y la pureza del plásmido se pueden utilizar auxiliares de filtración (tierra de diatomeas, celulosa) como pre-revestimiento de materiales.

Estos materiales adsorben contaminantes tales como proteínas, ADN y ARN, mejorando la pureza del plásmido, pero la co-adsorción del plásmido usualmente representa pérdidas más grandes del 25% (Theodossiou y col., 1997).

Lucero A. (proyecto de maestría, 2007) realizó una clarificación por medio de dos etapas, una filtración al vacío como primera etapa, y una microfiltración en serie con diafiltración utilizando un filtro de 5 μm y uno de 0.45 μm , en esta investigación no se realizaron análisis de calidad en esta etapa sino hasta el final del proceso.

Nunes y col. (2012) realizan clarificación por microfiltración utilizando membranas con tamaño de poro de 0.2 μm con diafiltración como alternativa a la centrifugación obteniendo gran retención de sólidos contaminantes, mencionan que el uso de auxiliares de filtración pueden crear problemas conforme la escala del proceso va aumentando, debido a la gran cantidad de desechos sólidos formados y su eliminación, también se sugiere que utilizando microfiltración no se requiere de auxiliares de filtración y se pueden esperar rendimientos muy altos si se logra una adsorción baja del plásmido en la membrana. La microfiltración es altamente afectada por el tamaño de partícula y por la distribución de su tamaño.

Usualmente si el tamaño de partícula es grande el rendimiento de la microfiltración es mejor (Akeprathumchai y col., 2004).

Los lisados clarificados contienen solamente cerca del 3% de ADNp. La separación del ADNp de las impurezas de las células hospederas comparado al producto en sus características físicas y químicas es el mayor desafío de un ingeniero en bioprocesos (Schleef y Blaesen, 2009).

2.4.3 Recuperación Intermedia

La recuperación y purificación de moléculas de ADNp del lisado de células clarificado puede implicar varias técnicas. Los biólogos moleculares han desarrollado una gama de eficientes protocolos a escala laboratorio que utilizan diferentes operaciones como se muestra en la Figura 6 (Diogo y col., 2005).

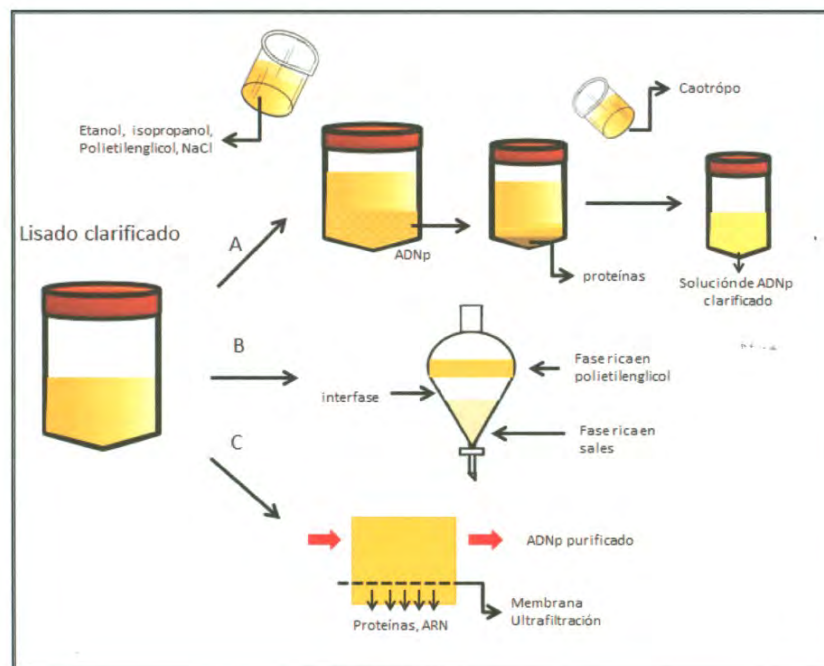


Figura 6. Purificación y concentración de lisado clarificado de ADNp mediante: A) Precipitación secuencial del ADNp y proteínas (PP), B) Sistema acuoso de dos fases (ATPS), C) Ultrafiltración (TFF) (Prazeres y col., 2001).

Como menciona Freitas y col. (2009) la meta de la siguiente recuperación intermedia es actuar sobre el lisado clarificado para concentrar el ADNp y reducir la mayor cantidad de impurezas (ARN, proteínas), que representan más del 90% de la masa total de soluto.

Esta recuperación intermedia se ha desarrollado usando un amplio rango de técnicas:

- La precipitación (por sus siglas en inglés PP), es una operación unitaria que puede ser utilizada para concentrar ADNp usando agentes como isopropanol, polietilenglicol, spermidina, bromuro de cetil trimetilamonio o policationes.

- Filtración de flujo tangencial (por sus siglas en inglés TFF) se presenta como una técnica prometedora para la recuperación de ADNp de lisados alcalinos. TFF toma ventaja de la diferencia de tamaño entre ADNp y las moléculas en el lisado como son las proteínas, endotoxinas y ARN de bajo peso molecular (Kahn y col., 2000).

- En el sistema de dos fases acuosas (por sus siglas en inglés ATPS) la recuperación de ADNp usualmente hace uso de polietilenglicol y una segunda fase inferior enriquecida por un polímero o una sal (Prazeres y col., 2001).

2.4.4 Purificación Final

La cromatografía es la tecnología actual esencial para la purificación final de ADNp, ya sea como una etapa de procesamiento o como una herramienta analítica.

Se utiliza generalmente después de las operaciones de clarificación y recuperación intermedia donde la carga de la impureza y el volumen de proceso han sido ya reducidos. En un proceso de producción de ADNp, la purificación por cromatografía es obligatoria para la eliminación de impurezas de la solución y evaluación de la pureza del ADNp para propósitos de calidad y seguridad. Tal purificación debe incluir la separación del ADNp (sc) de sus otros topoisómeros (oc y lineal), junto con la eliminación de las impurezas más importantes como el ADNg, proteínas, ARN y endotoxinas (Ghanem y col., 2013).

Las técnicas cromatográficas utilizadas ya sea en un modo único o integrado/combinado para la purificación/separación de ADNp de acuerdo a su estructura química pueden ser: cromatografía de intercambio aniónico (AEC) (Quaak y col., 2009), HPLC de fase inversa (RP), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (Diogo y col., 2003), cromatografía de pares de iones (IPC), cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad (AC). También pueden estructurarse de acuerdo con el tipo de cromatografía como son: cromatografía convencional, de perfusión y cromatografía de lecho expandido (Diogo y col., 2000).

2.5 Filtración

La filtración consiste en la separación de un sólido de un fluido por acción de un medio filtrante y un gradiente de presión. La filtración puede ser utilizada para recuperar un sólido como en una cosecha celular o remover un sólido como en los procesos de eliminación de virus. En los procesos biotecnológicos se utilizan tres tipos de mecanismos de filtración (Fig. 7): a) filtración convencional, b) filtración de lecho profundo y c) filtración con membranas.

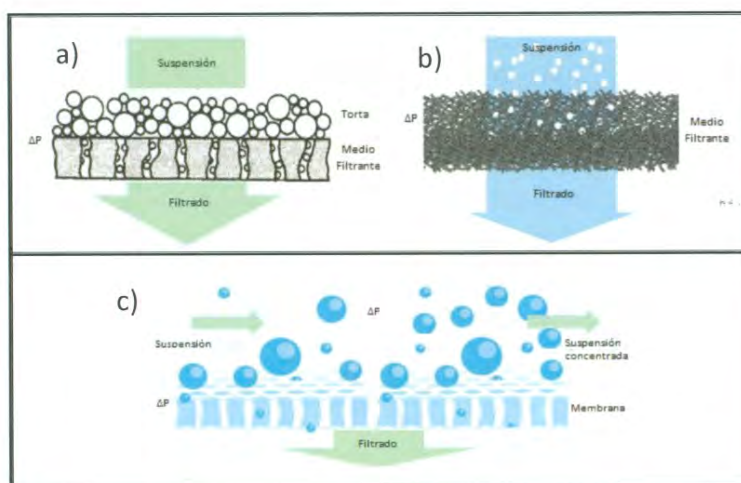


Figura 7. Mecanismos de filtración. a) Filtración con formación de torta, b) Filtración de lecho profundo y c) Filtración con membrana (Tejeda y col. 2011, y www.millipore.com)

En la filtración convencional los sólidos se depositan sobre el medio filtrante formando una pasta, mientras que en la filtración de lecho profundo los sólidos se depositan dentro del medio filtrante. La filtración por membrana se realiza utilizando membranas especiales de tamaño de poro muy pequeño, que generalmente operan con flujo paralelo a la membrana (cruzado), de tal manera que no hay un depósito de sólidos sobre la membrana sino una concentración del caldo (Tejeda y col., 2011).

De acuerdo a la bibliografía (www.millipore.com), la filtración se puede clasificar en base a la fuerza impulsora, el tipo de membrana (Fig. 7) y el rango de tamaño de partícula que retiene (Fig. 8).

Para que un fluido sea transportado a través de un filtro es necesario que exista una fuerza impulsora la cual puede ser: un gradiente de presión (como en los procesos de microfiltración, ultrafiltración, ósmosis inversa), un gradiente de concentración (diálisis) o un gradiente de potencial eléctrico (electrodialisis).

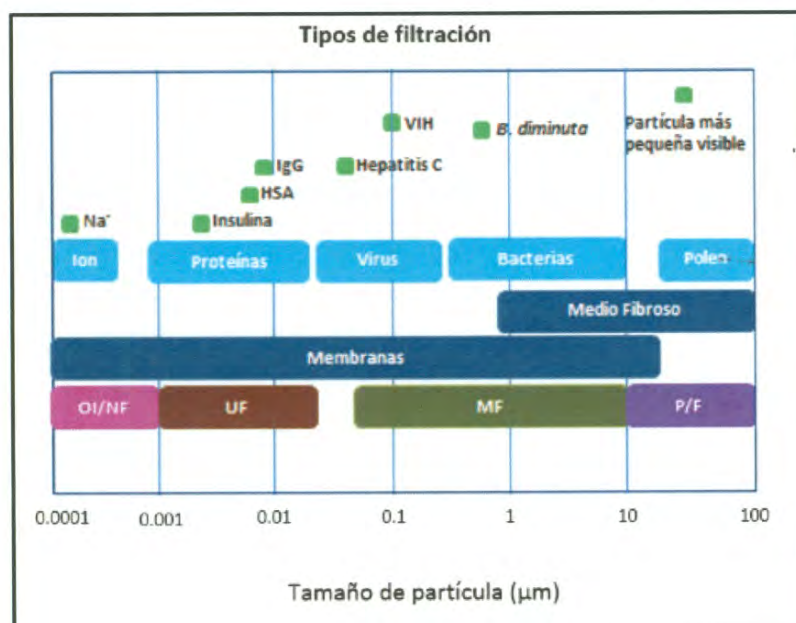


Figura 8. Tipos de filtración según el tamaño de partícula que se retiene. Millipore®

De acuerdo al tamaño de partícula que se retiene, el proceso se clasifica en:

- a) Filtración (F): 1000 – 10 μm
- b) Microfiltración (MF): 10 – 0.05 μm
- c) Ultrafiltración(UF): 0.03 – 0.001 μm
- d) Nanofiltración (NF): 0.001 – 0.0001 μm
- e) Ósmosis inversa (OI): 0.001 – 0.0001 μm

2.5.1 Microfiltración de lecho profundo

La microfiltración ha sido utilizada como el paso principal de recuperación primaria para productos biológicos ya que proporciona una separación de biomasa a partir del producto de interés y también puede ser utilizada para lograr una purificación significativa a través de un tamizado selectivo de subproductos o impurezas (Roush y Lu, 2008).

Debido a su bajo costo y a su facilidad de validación (comparado con la centrifugación y los dispositivos de TFF), la filtración de lecho profundo es ampliamente utilizada para la clarificación de cosechas de cultivo celular, el cual es un proceso ingenieril largo-establecido en el cual pequeñas partículas suspendidas en un fluido son depositadas en diferentes profundidades dentro de los poros de un lecho de material. La mayoría de estos filtros, que son utilizados en procesos biofarmacéuticos, están hechos de fibra de celulosa y ayudas filtro (por ejemplo, tierra diatomea) unidos por una resina polimérica que proporciona la resistencia húmeda necesaria e imparte una característica catiónica a la superficie (Singhvi y col, 1996).

El grado de compactación de las fibras se relaciona directamente a la permeabilidad del filtro y a las características de retención. Cuanto más compactada, mejor retiene partículas pequeñas, lo cual disminuye la permeabilidad. Adicionando tierra diatomea a la matriz del filtro mejora la permeabilidad y permite que el filtro de lecho profundo permanezca compactado y apretado (O'Brien y col., 2012).

La filtración de lecho profundo ha sido ampliamente usada para la clarificación de caldos de cultivo celular antes de un procedimiento de purificación, sirviendo como una clarificación secundaria seguida por un proceso de centrifugación o una microfiltración de flujo tangencial. En algunos casos, los filtros de lecho profundo son utilizados directamente para clarificar caldo de cultivo celular, retienen partículas a través de medio poroso permitiendo la retención de partículas más grandes y más pequeñas que el tamaño del poro (Roush y Lu, 2008).

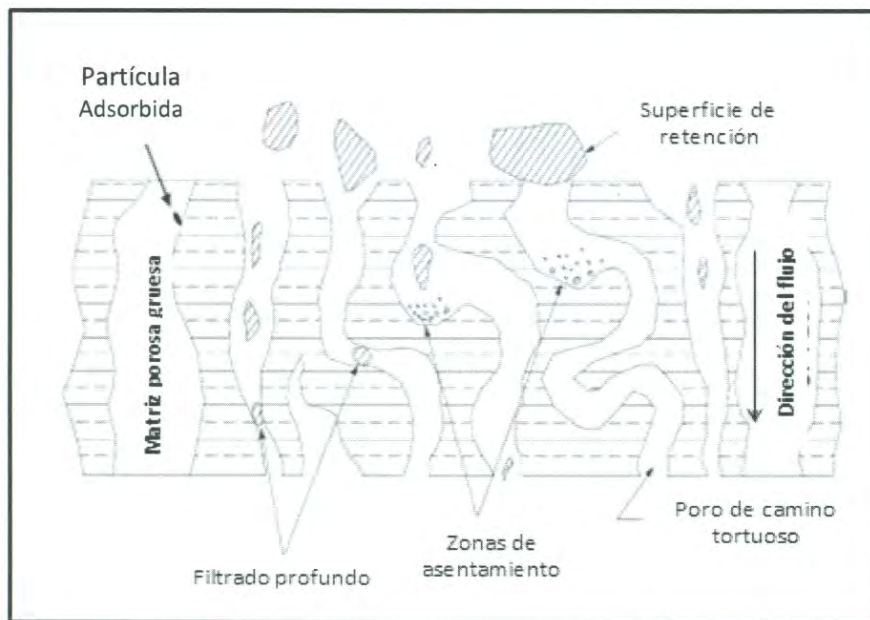


Figura 9. Mecanismos de retención de partículas por medio de filtros de lecho profundo. Se retienen partículas a través de retención y adsorción. Adaptada de Roush y Lü (2008).

La capacidad del medio filtrante es un indicador de cuanto volumen puede ser filtrado antes de que ocurra un taponamiento. La capacidad durante una operación a presión constante es definida como la cantidad de fluido por área de filtro que puede ser procesada hasta que el caudal disminuya a una fracción establecida del flujo inicial. La capacidad bajo condiciones de caudal fijo se determina cuando la presión aumenta hasta cierto rango del valor inicial (Hermia, 1992).

El taponamiento de un filtro puede ocurrir por depósito de las partículas dentro o sobre la superficie del filtro. Hay cuatro modelos que son típicamente usados para describir el taponamiento: Bloqueo completo asume que las partículas sellan las entradas del poro y evitan un flujo a través de él. El bloqueo intermedio es similar al completo pero supone que una porción de las partículas sella los poros y el resto se acumula en la parte superior de otro depósito de partículas. La torta de filtración se produce cuando las partículas se acumulan en la superficie de un filtro a manera de una torta permeable de espesor creciente que añade resistencia al flujo. El bloqueo estándar asume que las partículas son acumuladas en el interior del filtro en las paredes de poros cilíndricos rectos (Hermans y Bredee, 1936).

Conforme las partículas se van depositando, el poro va disminuyendo su espacio y reduce la permeabilidad del filtro. Los filtros de lecho profundo se taponeados típicamente por varios mecanismos de depósito de partículas en la superficie interna del medio, Bolton y col., 2005, desarrollaron un modelo de recubrimiento interno que trata a los filtros como un conjunto de fibras cilíndricas rectas. Se asume que la obstrucción del filtro ocurre cuando los sólidos cubren la superficies de las fibras, haciéndolas más gruesas y reduciendo la permeabilidad del filtro, como se ilustra en la Figura 10.

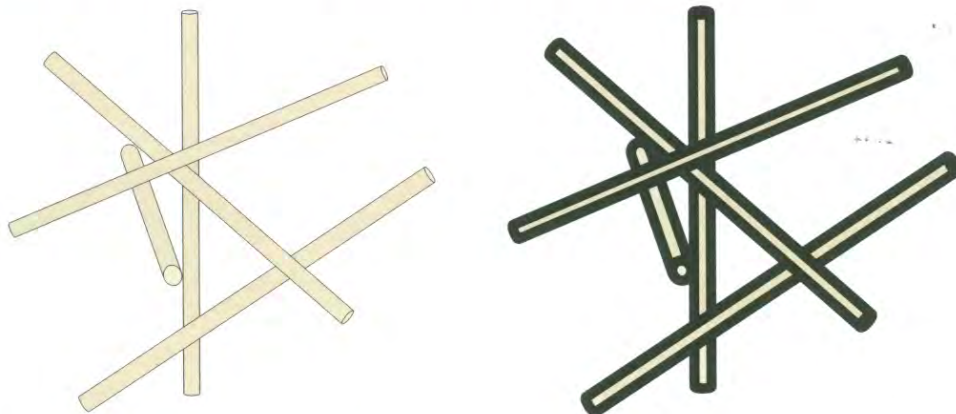


Figura 10. Ilustración de un filtro compuesto de fibras orientadas al azar antes (izquierda) y después (derecha) de recubrimiento, Los filtros conectan la capa de sólidos en las superficies de las fibras, el espesor de la fibra y la reducción de la permeabilidad del filtro aumentan. Adaptada de Bolton y col., 2005.

El modelo fue desarrollado relacionando primero el radio de la fibra al volumen de sólidos eliminados de una manera similar a la del bloqueo estándar (Paget, 1956).

$$2L_F\pi r_f dr_f = \left(\frac{c}{1-\varepsilon}\right) AdV \quad (1)$$

Integrando la Ecuación 1:

$$\pi L_F(r_f^2 - r_{f0}^2) = \left(\frac{c}{1-\varepsilon}\right) AV \quad (2)$$

Donde r_f es el radio de la fibra, L_F es la longitud total de todas las fibras, c es el volumen de sólidos por unidad de volumen filtrado, ε es la porosidad del sólido cuando es depositado en las fibras, y V es el volumen procesado normalizado por el área de filtrado A . La fracción sólida del filtro ϕ_0 está relacionada con el radio de la fibra y el espesor del filtro L_M .

$$\frac{\pi r_{f0}^2 L_F}{L_M A} = \phi_0 \quad (3)$$

El subíndice "0" se utiliza para indicar un valor inicial de una cantidad dada. Después de producirse el recubrimiento, la nueva fracción sólida puede relacionarse con el nuevo radio de fibra por medio de:

$$\phi = \frac{\pi r_f^2 L_F}{L_M A} = \phi_0 \left(\frac{r_f}{r_{f0}}\right)^2 \quad (4)$$

A pesar de que en la Ecuación 2 se asume que los sólidos depositados son porosos, la Ecuación 4 asume que los sólidos son no porosos. Esta suposición será certera si el flujo a través de los sólidos depositados es mínimo. El término V_{max} describe la cantidad de volumen de solución que puede ser filtrado hasta que volumen vacío del filtro quede completamente lleno con sólidos.

Un nuevo término, la constante de recubrimiento de la fibra K_f , es igual a la inversa de V_{max} . Por balance de materia de sólidos en el volumen del filtro, V_{max} es calculado como:

$$V_{max} = \frac{1}{K_f} = L_M \left(\frac{1 - \varepsilon}{c} \right) (1 - \phi_0) \quad (5)$$

Reacomodando la Ecuación 3 en una expresión para L_f y sustituyendo en la Ecuación 2, se obtiene la Ecuación 6, donde se permite el cálculo de r_f y ϕ a partir de V y otras constantes: L_M , c , ε , y ϕ_0 . La combinación con la Ecuación 5 lo reduce a dos constantes físicas, K_f y ϕ_0 .

$$\frac{r_f^2}{r_{f0}^2} = \frac{\phi}{\phi_0} = \left[1 + \left(\frac{c}{1 - \varepsilon} \right) \frac{V}{L_M \phi_0} \right] = \left[1 + \left(\frac{1 - \phi_0}{\phi_0} \right) K_f V \right] \quad (6)$$

Combinando la Ecuación 6 con el modelo teórico que relaciona la permeabilidad hidráulica al radio de la fibra permite derivar un modelo de recubrimiento del filtro que relaciona la permeabilidad con el volumen filtrado.

El modelo de Carman-Kozeny:

$$\frac{\kappa}{r_f^2} = \frac{(1 - \phi)^3}{20\phi^2} \quad (7)$$

Donde κ representa la permeabilidad del filtro Darcy, se desarrolló por extensión de la correlación entre el número de Reynolds y el factor de fricción para flujo laminar a través de tuberías que fluye por medio poroso. También se ha utilizado para describir el flujo a través de medio fibroso.

El flujo a través del filtro (dV/dt) puede ser calculado a través de la ley de Darcy como:

$$\frac{dV}{dt} = \kappa \frac{\Delta P}{\mu L_M} \quad (8)$$

Donde ΔP es la presión transmembrana y μ la viscosidad de la solución.

Modelo de recubrimiento: presión constante

En el estudio realizado por Bolton y col., 2005, se obtuvo el modelo de recubrimiento del filtro sustituyendo κ (Ley de Carman-Kozeny) en la ecuación de la Ley de Darcy y en la ecuación que hace relación al radio de las fibras del filtro antes y después de su recubrimiento (Ec. 6).

$$\frac{dV}{dt} = \left(\frac{\Delta P}{\mu L_M} \right) \frac{r_f^2 (1 - \phi)^3}{20 \phi^2} = \frac{J_0 (1 - K_f V)^3}{\left[1 + \frac{(1 - \phi_0)}{\phi_0} K_f V \right]} \quad (9)$$

Donde J_0 es el flux inicial del solvente. La ecuación puede ser integrada para obtener una ecuación explícita para el volumen filtrado como función del tiempo:

$$V = \frac{1}{K_f} + \frac{1}{K_f \alpha} \left[1 - \sqrt{1 + \frac{\alpha}{(1 - \phi_0)}} \right] \quad (10)$$

Donde α es un parámetro adimensional, definido como:

$$\alpha = (2K_f J_0 t + 1) \left(\frac{\phi_0}{1 - \phi_0} \right) - 1 \quad (11)$$

La remoción de partículas en los filtros de lecho profundo ocurre por una variedad de mecanismos. Las células y restos celulares pueden ser removidos por captura física en espacios de poros estrechos. Las interacciones electrostáticas son importantes para la captura de partículas cargadas. Los filtros de profundidad cargados positivamente pueden proporcionar gran remoción de ADN cargado negativamente, virus y endotoxinas (Reis y Zydney, 2007).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

En la investigación se utilizó una macromolécula conteniendo el plásmido pVAX1-NH36 de 4 kpb hospedado en la cepa *E. coli* DH5 α .

- La fermentación en matraz y en biorreactor se realizó en un cultivo definido rico en sales, glicerol como fuente de carbono y vitaminas a un pH igual a 6.8 adicionándosele Kanamicina para prevenir el crecimiento de otras cepas y dar resistencia a las células.

Para la recuperación primaria del plásmido se utilizaron tres soluciones, Solución de resuspensión (P1) que tiene una concentración de 50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCL (Hidroximetil Amino metano, P.M. = 121.14 g/mol) y 10 mM EDTA (P.M. = 292.25 g/mol) con un pH = 8; La solución de lisis (P2) está compuesta por 0.2 M de NaOH y 1% SDS; La solución de neutralización (P3) tiene una concentración de 3 M de Acetato de Potasio (P.M. = 98.15 g/mol) en ácido acético glacial y agua desionizada con un pH = 5.5. Las tres soluciones son pasadas por un microfiltro Millipore de 0.45 μ m al vacío para eliminar la presencia de contaminantes.

En la etapa de pre clarificación son utilizados filtros de membrana con tamaño de poro entre 8– 12 μ m utilizadas al vacío.

La clarificación por microfiltración de lecho profundo se llevó a cabo utilizando cápsulas Sartoclear® P con una retención nominal de partículas con tamaño de 4 y 8 μ m.

EN El análisis de calidad de plásmido en electroforesis se utilizó agarosa 0.8% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, CH₃COOH 20 mM, EDTA 1mM, pH= 7.6) el marcador Supercoiled DNA Ladder, Invitrogen®. La solución para teñir el gel es bromuro de etidio (0.5 µg/ cm³).

Para la cuantificación de plásmido por cromatografía HPLC-HIC se utilizó una columna HIC Source 15 PHE de 0.46 x 10 cm, se prepararon soluciones para equilibrar la columna de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM/HCl pH 8 y una solución Tris 10 mM/HCl pH 8, las cuales son filtradas al vacío con un microfiltro Millipore de 0.45 µm y desgasificadas.

3.2 Equipo

Para la preparación del inóculo se utilizaron cultivos en matraz en una incubadora Orbital Shaker Incubator, VWR. La propagación de las células con el plásmido pVAX1-NH36 se realizó en un biorreactor Applikon® (Holanda) de 2L, acoplado a un sistema de control, ez-control (Applikon®, Holanda). Para el control del crecimiento celular se midió la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer. Para la recuperación de biomasa y el proceso de clarificación por centrifugación se utilizó una centrífuga refrigerada BioFuge Stratos, Thermo Fisher Scientific®. Para la obtención del caldo pre-clarificado se utilizó un embudo Büchner.

El proceso de clarificación por microfiltración se realizó con cápsulas de microfiltros de lecho profundo Sartoclear® P los cuales son alimentados a través de una bomba peristáltica Masterflex Cole-Parmer modelo 7553-70 y cabezal modelo 7014-21 para obtener los flujos deseados. Para la limpieza de los microfiltros se utilizó un equipo de autoclave mod. FE-396 de FELISA®.

La turbidez del lisado clarificado se midió con un turbidímetro portable Eutech instruments, Oakton, proporcionado por el Dr. Agustín Gómez Álvarez, del área de Química Ambiental en el Posgrado en Ciencias de la Ingeniería

Los análisis de calidad del plásmido se realizaron en una cámara horizontal de electroforesis GT mini gel casting system de Biorad y Equipo Multi –Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía.

La cuantificación del ADNp en el lisado clarificado se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con columna de Interacción Hidrofóbica (HIC) en un equipo Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare® con una columna HIC Source 15PHE (Fenil-Poliestireno) de 0.46x10 cm marca GE Healthcare®.



Figura 11. Incubadora, Orbital Shaker Incubator. VWR.

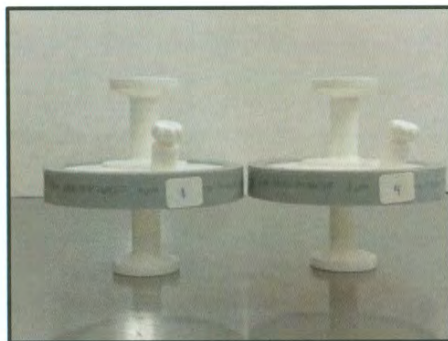


a)



b)

Figura 12. a) Biorreactor Applikon® (Holanda) de 2L acoplado al software ez-Control, b) Centrifuga Thermo Fisher Scientific®, ambos ubicados en el Laboratorio de Bioprosesos en el DICTUS.



a)



b)

Figura 13. a) Microfiltros Sartoclear® P Caps, b) Bomba Masterflex Cole-Parmer.



Figura 14. Turbidímetro OAKTON T-100



Figura 15. Cámara horizontal de electroforesis y Equipo Multi -Doc, Digital Imaging System, Trans UV de BioRad para fotografía.



Figura 16. Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare®

3.3 Metodología

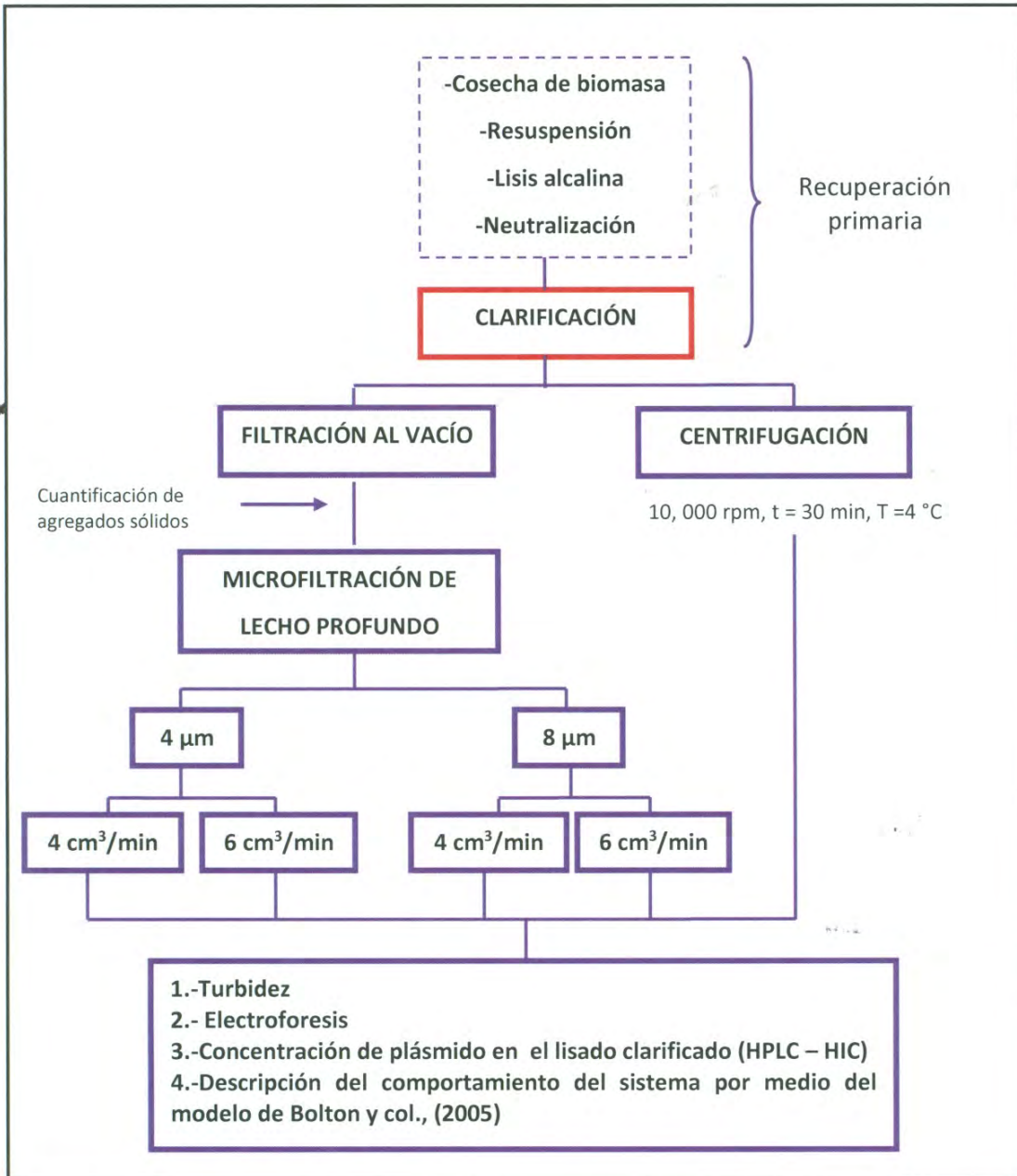


Figura 17. Metodología utilizada en la etapa de recuperación primaria

3.3.1 Fermentación

La etapa de fermentación se realizó gracias a los proyectos de investigación que se llevan a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos localizado en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) en la Universidad de Sonora, con ayuda de estudiantes de posgrado.

Para la producción de biomasa se utiliza la cepa *E. coli* DH5 α conteniendo al plásmido pVAX1-NH36, se utiliza un medio definido para el crecimiento de la bacteria en matraz y en biorreactor, en un sistema por lote alimentado.

El medio definido está compuesto por una solución de sales, solución traza, solución de glicerol y solución de vitaminas. Para el crecimiento del inóculo se realiza una fermentación en matraz al cual se le agrega kanamicina en condiciones estériles. Se le agrega el inóculo con la cepa *E.coli* DH5 α conteniendo el gen pVAX1-NH36 y se deja en la incubadora durante 8 horas.

Para la propagación celular se utiliza el mismo medio definido donde se hacen tres transferencias en matraces. Después de que la bacteria se aclimata se preparara el medio definido para la fermentación en el biorreactor, este se esteriliza con 2 L dentro para después inyectarse el inóculo en condiciones estériles, los otros dos litros se usan para cada perfusión (retro alimentación).

Durante el proceso de fermentación el biorreactor se mantiene conectado al equipo de perfusión el cual ayuda a limpiar el medio que se encuentra dentro del biorreactor al tiempo que se le suministra medio nuevo. La operación para al final de la fase estacionaria.

3.3.2 Recuperación primaria

El paso siguiente en el proceso de producción de vacunas de ADNp es la recuperación de las células del caldo obtenido durante la fermentación. Se recolectó el caldo del biorreactor y se midió el volumen y densidad óptica final, el volumen obtenido se distribuyó en frascos previamente pesados vacíos, en estos frascos las células son cosechadas por medio de centrifugación a 6500 rpm a 4°C por 20 minutos, se les recolectó el sólido y se desechó el sobrenadante. Se pesó el frasco después de la eliminación del sobrenadante para así obtener los gramos de biomasa húmeda obtenida.

- **Resuspensión.** Por cada gramo de célula húmeda recolectada se agregaron 8 cm³ de solución de resuspensión (P1), se agita suavemente hasta resuspender por completo el paquete celular.

Lisis Alcalina. Se agregó un volumen igual (8 cm³ de solución por gramo de célula húmeda) de la solución de lisis (P2), se agitó suavemente y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente para así lograr un buen rompimiento celular.

Neutralización. La solución en lisis es neutralizada agregando un volumen igual a la solución de neutralización (P3), se agita suavemente y se incuba por 10 minutos en hielo.

Clarificación

Se utilizaron dos métodos para la clarificación del lisado neutralizado:

- Clarificación por microfiltración de lecho profundo.

Pre-clarificación. Debido a que en la lisis y neutralización de la biomasa se produce la formación de agregados sólidos de gran tamaño es necesaria su remoción, por lo que estos son eliminados con una filtración al vacío utilizando membranas con tamaño de poro de 8 – 12 µm en forma de lecho profundo (3 membranas compactadas) las cuales se

pesaron y se colocaron en un embudo Büchner para así obtener un lisado pre clarificado, se guardaron y cuantificaron las membranas utilizadas para conocer la cantidad de sólidos retenidos durante esta etapa. Se midió la turbidez de este lisado pre clarificado.

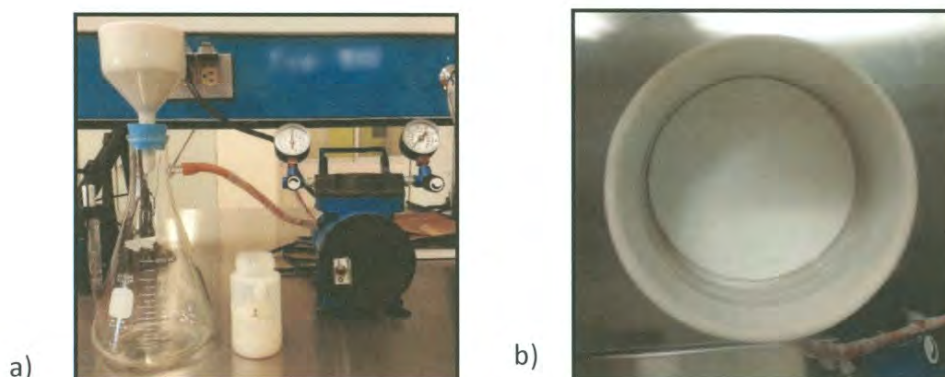


Figura 18. a) Filtración al vacío para la recuperación del pre clarificado, b) Vista superior de lecho profundo hecho con membranas con tamaño de poro de 8 – 12 μm en embudo Büchner.

La microfiltración consiste en pasar el lisado pre clarificado, a baja temperatura y en constante agitación, a través de microfiltros de lecho profundo. En los estudios se emplearon filtros de tamaño de poro 4 y 8 μm , y se utilizaron a flujos de 4 y 6 cm^3/min , ya que son el mínimo y el máximo de flujo recomendado por el proveedor para la clarificación de impurezas celulares (Anexo A).

Antes de realizar la operación de clarificación por microfiltración se realizó el lavado de cada cápsula, pasando 250 cm^3 de agua desionizada con un flujo de 10 cm^3/min a temperatura ambiente como se indica en el anexo A. Para determinar con cual microfiltro se obtiene la mejor clarificación de la solución se tomaron muestras a diferentes tiempos y se recolectó un volumen de solución filtrada durante toda la operación a las cuales se les midió turbidez, concentración y masa de plásmido por gramo de biomasa lisada.



Figura 19. Sistema utilizado para el proceso de microfiltración de lecho profundo.

Clarificación por centrifugación. El lisado conteniendo el plásmido se clarifica mediante la remoción del precipitado formado (restos celulares, ADN genómico y proteínas) por centrifugación a 10, 000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se recolecta el sobrenadante y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones.

3.3.3 Análisis del comportamiento de las operaciones de clarificación

Turbidimetría. El funcionamiento del turbidímetro se basa en el fenómeno óptico que ocurre cuando una luz incidente pasa a través de agua y se dispersa por existencia de partículas extrañas suspendidas en ella (Ahmad y Mohd, 2009), medidas en Unidad de Turbidez Nefelométrica (NTU).

Se efectuaron determinaciones de turbidez al lisado pre clarificado, a cada una de las muestras colectadas durante los estudios de microfiltración y al volumen de filtrado colectado.

Para obtener una óptima precisión de los resultados se calibró el turbidímetro antes de cada corrida poniendo las soluciones de calibración (800 NTU, 100 NTU, 20.0 NTU y 0.02 NTU) como lo menciona el manual Oakton manual Turbidity (Anexo C).

Análisis por electroforesis. Para evaluar el estado del plásmido se analizan todas las muestras obtenidas antes, durante y al final la microfiltración. Los estudios de

electroforesis se llevan a cabo en gel de agarosa al 0.8% agregando 100 cm³ de buffer TAE, se vierte el gel en la placa evitando que queden burbujas y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que solidifique.

Cada muestra se prepara agregando 10 µL de la muestra a analizar más 1.66 µL de colorante de carga blue/Orange 6x, se cargan las muestras en el gel dentro de la placa de electroforesis dejando el primer pozo para el indicador (supercoiled DAN ladder, é invitrogen) y se cubre con buffer TAE hasta que cubra el gel por completo, la placa se conecta poniendo el electrodo negativo arriba (en dirección cercana a los pozos donde se encuentra la muestra), se ajusta el voltaje (70 Volts) durante 2 hrs, se saca la placa con el gel y se sumerge en bromuro de etidio (0.5 µg/ cm³) 15 minutos para después ser sumergido en agua (15 min) para lavar y se pasa el gel a la cámara para fotografiar.

Análisis de concentración por cromatografía (HPLC-HIC). La concentración y pureza del plásmido en las muestras obtenidas en la recuperación primaria del proceso se determinan por cromatografía líquida de alta resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC- HIC) adaptando la metodología propuesta por Diogo et al., (2003). Se utiliza una columna HIC Source 15 PHE de 0.46 x 10 cm acoplada al sistema Äkta Purifier. Inicialmente la columna se equilibra con una solución de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM/HCl, pH= 8. Se inyecta con ayuda de un automuestrador un volumen de 30 µL de muestra diluida (1:5) en el buffer de equilibrio. Después de la inyección de la muestra, la columna debe ser eluída por 1.7 min con el mismo buffer de equilibrio a un flujo de 1 cm³/min. Todas las isoformas de ADNp (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 1.0 min, para eluir las especies adsorbidas. Después de este período la concentración de sulfato de amonio es incrementada al valor inicial para re-equilibrar la columna y eluir el RNA, durante los siguientes 5.5 min. En los cromatogramas de muestras, en general, se obtienen 4 picos: el

pico a los 0.68 min corresponde a ADNp total; el pico a los 3.58 min corresponde a RNA de alto peso molecular y ADNg 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 ADNp en una muestra se determina por medio de la ecuación de la curva estándar, (anexo D). La curva estándar se prepara inyectando al sistema HIC-HPLC, con el procedimiento antes descrito, soluciones de pVAX1-NH36 purificado por medio de un kit comercial, de concentraciones conocidas, asociando en cada solución inyectada, el área del pico de ADNp obtenido en el cromatograma a la concentración.

El grado de pureza HIC-HPLC del plásmido en una muestra, se define como el porcentaje 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 corrige 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.

3.3.4 Modelo de recubrimiento

Para la descripción del comportamiento del sistema de microfiltración mediante una expresión matemática, se utilizó el modelo de recubrimiento dado por las Ecuaciones 10 y 11.

La fracción sólida del filtro, ϕ_0 (Ec.3), se calculó de la siguiente manera, para cada filtro (tamaño de poro 4 y 8 μm): en la Ecuación 3, el numerador indica el volumen total de las fibras contenidas en el filtro $\pi r_f^2 L_f$, esta cantidad se obtuvo mediante una resta del volumen del microfiltro (V_m) y su volumen lleno de agua (V_a).

Se calculó el volumen del microfiltro (V_m) con la siguiente ecuación:

$$Vm = 2(\pi r_1^2 h_1) + \pi r_2^2 h_2 \quad (12)$$

Donde:

r_1 = Radio del cilindro 1 [m]

h_1 = Altura del cilindro 1 [m]

r_2 = Radio del cilindro 2 [m]

h_2 = Altura del cilindro 2 [m]



Figura 20. Cápsula de microfiltro utilizada en la experimentación

Se forró la salida del microfiltro con parafilm y se llenó el microfiltro con agua hasta que cubriera la entrada del cilindro 1, cuando alcanzó el extremo del cilindro se midió el agua utilizada.

Restando de la Ecuación 12 el volumen de agua (Va) con la que se llenó el microfiltro, se obtuvo el volumen total de las fibras dentro del microfiltro, $\pi r_{f_0}^2 L_f$ (Ec. 13), para así poder calcular ϕ_0 .

$$\pi r_{f_0}^2 L_f = Vm - Va \quad (13)$$

Los parámetros utilizados en el modelo se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros utilizados en el modelo de recubrimiento de fibras en los microfiltros de lecho profundo

Parámetro	Tamaño de poro	
	4 μm	8 μm
A	25 cm^2	25 cm^2
L_M	0.41 cm	0.41 cm
ϕ_0	0.38	0.23

El flux se calculó con el flujo con el que se inició el proceso y el área del filtro, se muestran en la Tabla 5 los datos para ambos flujos utilizados en el proceso de microfiltración.

Tabla 5. Flux inicial para cada proceso de microfiltración de lecho profundo

Flujo cm^3/min	Flux inicial cm/s
4	0.0027
6	0.004

El volumen máximo (V_{max}) es el parámetro de ajuste del modelo, que de acuerdo al fabricante de los microfiltros Sartoclear [®]P, debe estar en el rango de 50 y 1000 cm^3 (Anexo B), se determinó el valor que hiciera mejor ajuste del modelo con los datos experimentales, basándose en la definición de error (Ec. 12) y utilizando la función Solver de Excel.

$$Error = \sqrt{X_c^2 - X_r^2} \quad (14)$$

Donde:

X_c : Volumen calculado con modelo de recubrimiento de fibras (Bolton, 2005)

X_r : Volumen real, obtenido en cada experimento realizado con microfiltración de lecho profundo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fermentación

Los datos de fermentación se obtuvieron gracias a los proyectos de investigación que se realizan en el Laboratorio de Bioprocesos localizado en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) en la Universidad de Sonora, en colaboración de estudiantes de posgrado.

De acuerdo a los datos suministrados la propagación celular en matraz llegó a una $DO_{600} \approx 2.16$ en 8 horas y se realizó la fermentación con este inóculo. La curva de crecimiento obtenida durante la etapa de fermentación se muestra en la siguiente Figura 21 (proporcionada por una investigación alterna), en donde se observa el comportamiento de la bacteria *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pVAX1 NH36 durante 12 horas la cual alcanzó una $DO_{600} \approx 42.46$.

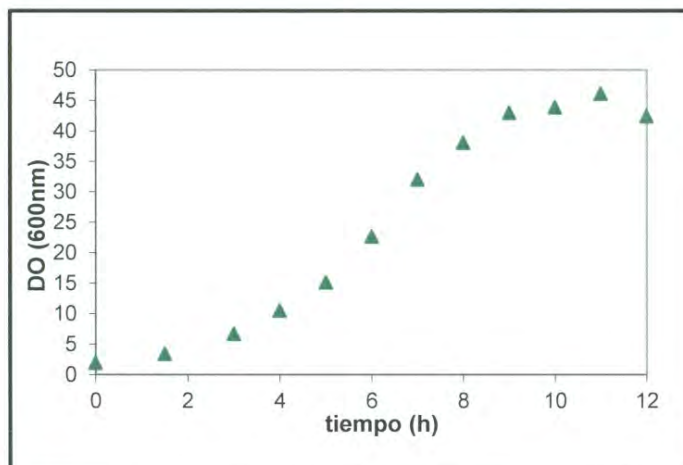


Figura 21. Curva de crecimiento celular durante la etapa de fermentación, proporcionada por estudiantes de posgrado en DICTUS.

4.2 Recuperación Primaria

Al finalizar la etapa de fermentación, se obtuvo un volumen de caldo celular igual a 1138 cm³ con una DO₆₀₀ ≈ 42.46, se realizó la cosecha celular y se obtuvo 83.84 g de células húmedas/Litro de cultivo.

El volumen total obtenido al final de la lisis fue de 2,012.23 cm³, se utilizó el 60% del total para pre-clarificarlo y después pasarlo por microfiltros de lecho profundo, y el 40% para clarificarse por centrifugación y así poder hacer una comparación entre el proceso de microfiltración de lecho profundo y centrifugación.

4.2.1 Clarificación por microfiltración de lecho profundo

Se utilizó un volumen de 1204.39 cm³ de lisado para realizarles un tratamiento de pre-clarificación. Haciendo una relación entre el volumen del lisado pre-clarificado (920 cm³) y la biomasa lisada (50.17 g) se obtienen 18.33 cm³ lisado/g célula húmeda.

Para el análisis del comportamiento del filtro se midió la cantidad de agregados sólidos recuperados al procesar sólo 786.44 de cm³ (32.56 g) obteniéndose los datos que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Agregados sólidos obtenidos al final de pre-clarificación

# Recipiente	Peso vacío (g)	Peso membrana húmeda (g)	Peso recipiente + filtros + sólidos (g)	# de filtros utilizados	Sólidos húmedos retenidos (g)
1	38.1	1.72	101.20	29	13.22
2	34.55	1.72	139.37	42	32.58
				Total	45.80

Se obtuvo una recuperación de 1.40 g de sólidos húmedos /g de biomasa que sugieren la hidratación de componentes formados durante la lisis. La turbidez del lisado pre-clarificado fue de 393 NTU que puede considerarse media, sin embargo aceptable para el método de pre clarificación empleado (Dibble, 2009).

Muestras del lisado pre clarificado se sometieron a estudios electroforéticos y de cromatografía de HPLC para verificar la presencia y la cantidad del plásmido, los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 22 y 23.

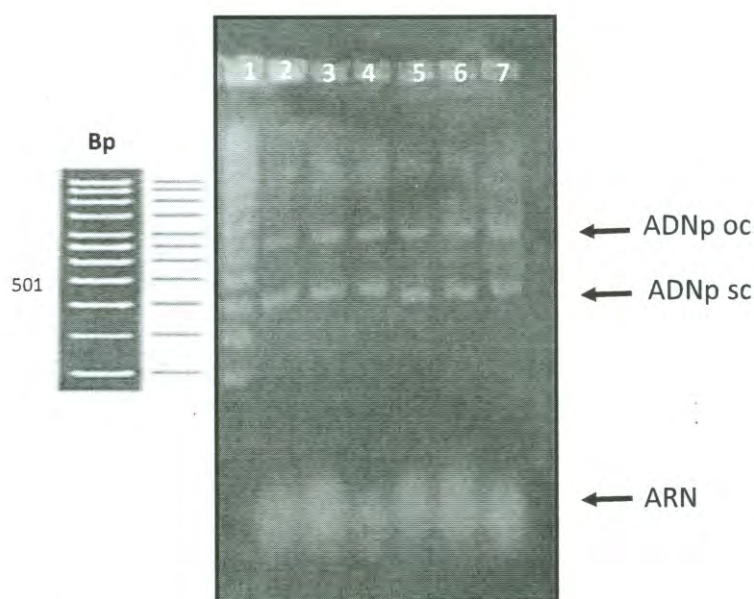


Figura 22. Gel de electroforesis, Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder), Línea 2 lisado pre-clarificado al vacío con poro de 8-12 μm (Diluido 1/2), Línea 3 microfiltración 8 μm , flujo de 6 cm^3/min , Línea 4 microfiltración 8 μm , flujo de 4 cm^3/min , Línea 5 microfiltración 4 μm , flujo de 6 cm^3/min , Línea 6 microfiltración 4 μm , flujo de 4 cm^3/min , Línea 7 clarificado por centrifugación (2x).

Se corrobora en el carril número 2 de la Figura 22 la presencia del ADNp, así como la de contaminantes como ARN. A partir del cromatograma de las muestras (Fig. 23) y utilizando la curva patrón obtenida (Anexo D) se determinó que la concentración de plásmido en el lisado pre-clarificado es de $5.574 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

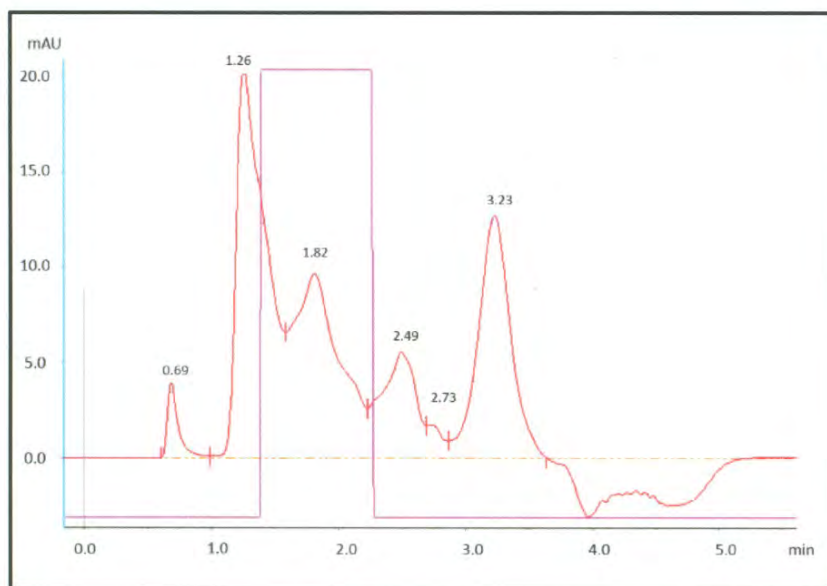


Figura 23. Cromatograma del lisado pre-clarificado al vacío con membranas de tamaño de poro 8-12 μm .

En la Tabla 7 se presenta un resumen de los datos obtenidos del análisis del lisado pre-clarificado, así mismo con los que se inició el proceso de microfiltración de cada experimento.

Tabla 7. Resultados obtenidos en el análisis del lisado pre-clarificado obtenido por filtración al vacío.

Volumen total	Concentración	Masa ADNp/ g biomasa	Turbidez
cm ³	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU
920	5.574	102.14	393

Experimento 1: Microfiltro de 4 μm con flujo de 4 cm³/min

Se utilizó un microfiltro de tamaño de poro de 4 μm con un flujo de 4 cm³/min, midiendo el volumen filtrado y tomando alícuotas a diferentes tiempos (segundos) para realizar las determinaciones correspondientes (Fig. 24). En la Tabla 14 (Anexo E) se muestran los datos obtenidos durante el proceso.

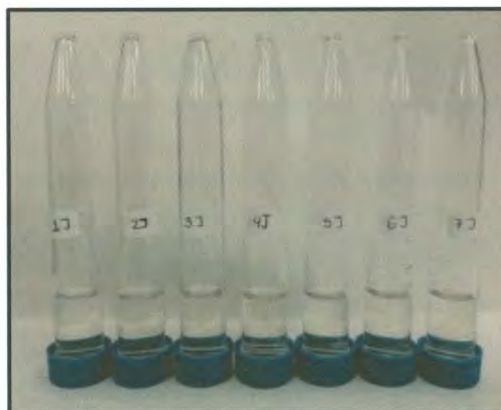


Figura 24. Muestras colectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 4 cm³/min a diferentes tiempos.

En la Tabla 8 se muestra los datos obtenidos, tanto del proceso de microfiltración como de los análisis correspondientes.

Tabla 8. Datos obtenidos en microfiltración con tamaño de poro de 4 μ m y

flujo de 4 cm³/min

	Vol.	Flux	Tiempo del proceso	Concentración ADNp	Masa ADNp/g biomasa	Turbidez
	cm ³	$\frac{\text{cm}}{\text{s}}$	s	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU
Solución de alimentación	69	0.0027	0	5.57	102.14	393
Permeado	62.9	0.0017	1307	3.72	62.26	2.13

El valor del flux durante el proceso disminuyó en aproximadamente 40%, sin embargo se mantuvo en el rango permisible para el proceso de clarificación, ya que el proveedor (Anexo A) indica el uso del microfiltro hasta que el flux decaiga hasta el 20% de su valor inicial. Se recuperaron 62.26 μ g de ADNp por gramo de biomasa lisada, equivalente a un 60.96% de recuperación, que sugiere que una parte considerable del plásmido queda atrapado en el lecho del filtro.

La disminución en turbidez durante el proceso fue de 99.45%, que representa un comportamiento altamente eficiente de esta operación en relación a la eliminación de turbidez. La Figura 25 muestra la variación de la turbidez de la solución de salida con el tiempo de filtrado.

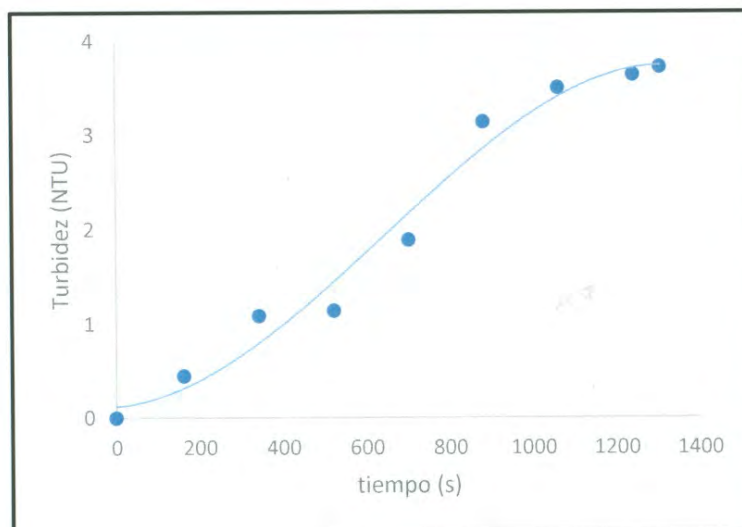


Figura 25. Cambio de turbidez respecto al tiempo en microfiltración ($4 \mu\text{m}$ y flujo de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$).

Se corrobora la presencia del plásmido durante el proceso de microfiltración por medio del análisis electroforético (Fig. 26), mostrándose junto con el plásmido de interés (superenrollado) contaminantes en el lisado clarificado.

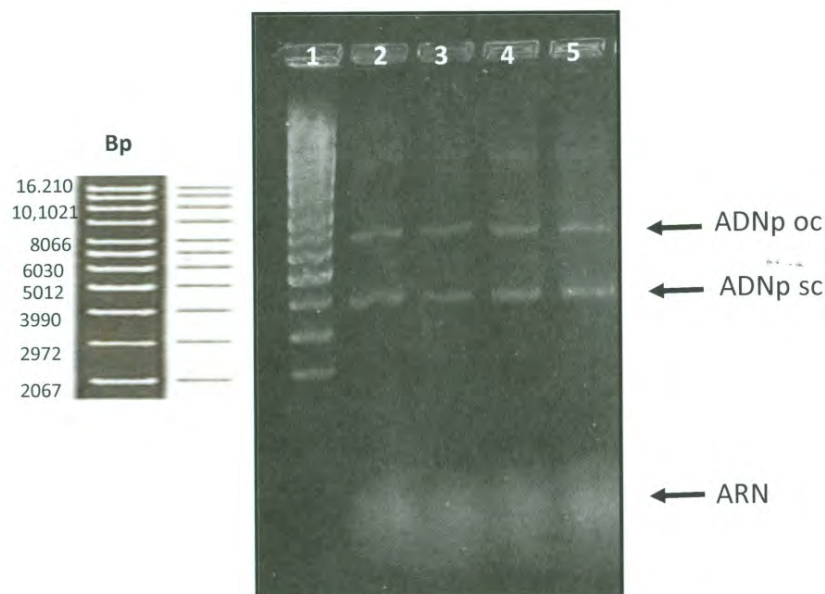


Figura 26. Gel de electroforesis de lisado clarificado con microfiltro de $4 \mu\text{m}$ y flujo inicial de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$, Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder); Línea 2 Volumen total filtrado, Línea 3 Muestra tiempo 342 s, Línea 4 Muestra tiempo 702 s, Línea 5 Muestra tiempo 702 s

En la Figura 27 se muestra la comparación del cromatograma del lisado clarificado por centrifugación y del lisado clarificado por microfiltración con filtro de tamaño de poro de 4 μm y flujo de 4 cm^3/min . Se puede observar en la Figura 27 que la concentración de ADNp en el proceso de microfiltración 3.72 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ es menor a la obtenida mediante centrifugación 4.60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

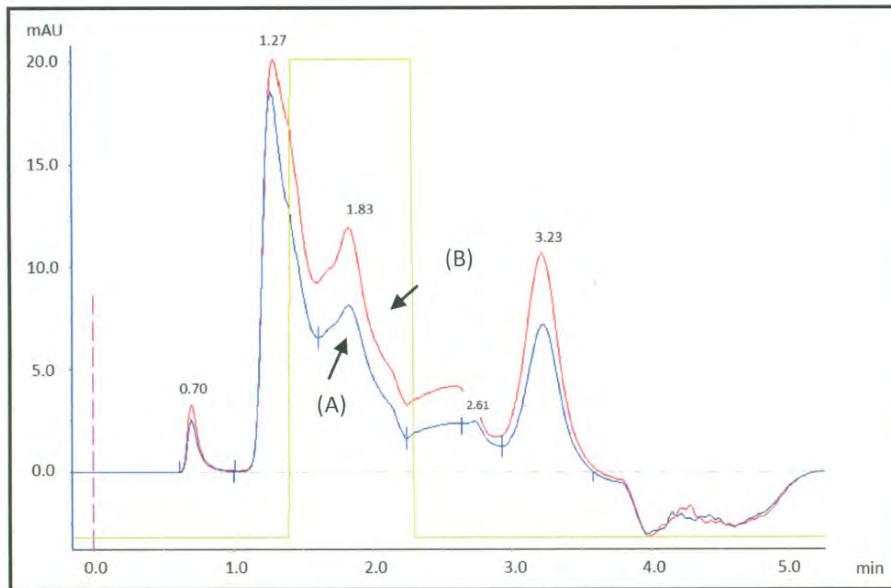


Figura 27. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración (4 μm , flujo de 4 cm^3/min), (B) lisado clarificado por centrifugación.

En la Figura 28 se presentan los datos experimentales del volumen específico contra tiempo del experimento 1. La línea continua representa el ajuste del modelo empleado (Ecs. 10 y 11) a los datos obteniéndose un error absoluto de 0.24, los parámetros utilizados en el modelo se encuentran en las Tablas 4 y 5.

El parámetro de ajuste obtenido fue la constante de recubrimiento de $K_f = 0.06 \text{ cm}^{-1}$. Se utilizó la Ecuación 5 para calcular el volumen máximo de filtración de $V_{max} = 16.22 \text{ cm}^3/\text{cm}^2$.

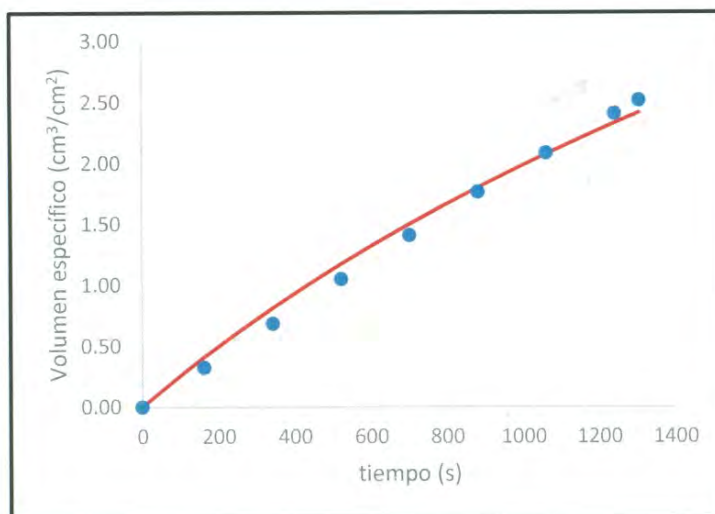


Figura 28. Perfil del volumen específico en sistema de microfiltración con tamaño de poro de $4 \mu\text{m}$ y flujo inicial de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$, ● Datos experimentales, — Datos obtenidos con modelo Bolton y col., 2005.

Experimento 2: Microfiltración $4 \mu\text{m}$ con flujo de $6 \text{ cm}^3/\text{min}$

Se utilizó un microfiltro de tamaño de poro de $4 \mu\text{m}$ con un flujo de $6 \text{ cm}^3/\text{min}$, midiendo el volumen filtrado y tomando alícuotas a diferentes tiempos (segundos) para realizar las determinaciones correspondientes (Fig. 29). En la Tabla 15 (Anexo E) se muestran los datos obtenidos durante el proceso.



Figura 29. Muestras colectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 6 cm^3/min a diferentes tiempos.

En la Tabla 9 se muestran los datos obtenidos, tanto del proceso de microfiltración como de los análisis correspondientes.

Tabla 9. Datos obtenidos en proceso de microfiltración con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 6 cm^3/min

	Vol.	Flux	Tiempo del proceso	Concentración ADNp	Masa ADNp/g biomasa	Turbidez
	cm^3	$\frac{\text{cm}}{\text{s}}$	s	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU
Solución de alimentación	53	0.004	0	5.57	102.14	393
Permeado	46.4	0.0007	600	3.70	59.42	2.34

El valor del flux durante el proceso disminuyó en aproximadamente 82.5%, sin embargo se mantuvo en el rango permisible para el proceso de clarificación, ya que el proveedor (Anexo A) indica el uso del microfiltro hasta que el flux decaiga hasta el 20% de su valor inicial. Se recuperaron 59.42 μg de ADNp por gramo de biomasa lisada, equivalente a un

58.17% de recuperación, que sugiere que una parte considerable del plásmido queda atrapado en el lecho del filtro.

La disminución en turbidez durante el proceso fue de 99.40%, que representa un comportamiento altamente eficiente de esta operación en relación a la eliminación de turbidez. La Figura 30 se muestra la variación de la turbidez de la solución de salida con el tiempo de filtrado.

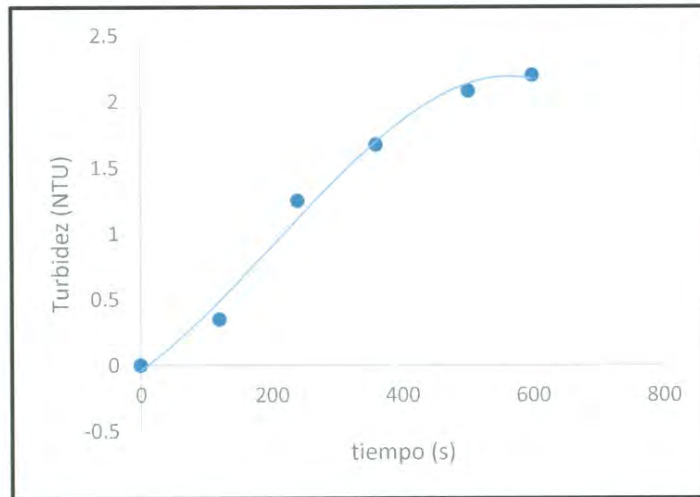


Figura 30. Turbidez de cada muestra recolectada durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de $4\ \mu\text{m}$ y flujo de $6\ \text{cm}^3/\text{min}$ a diferentes tiempos.

Se corrobora la presencia del plásmido durante el proceso de microfiltración por medio del análisis electroforético (Fig. 31), mostrándose junto con el plásmido de interés (superenrollado) contaminantes en el lisado clarificado.

RBC T. 130184

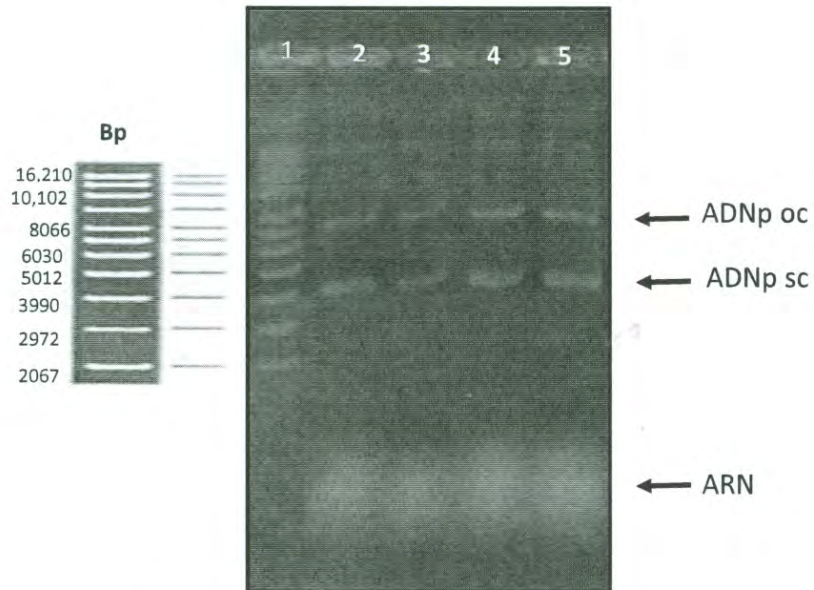


Figura 31. Gel de electroforesis de lisado clarificado con microfiltro de 4 μm y flujo inicial de 6 cm^3/min , Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder); Línea 2 Volumen total filtrado, Línea 3 Muestra tiempo 240 s, Línea 4 Muestra tiempo 502 s, Línea 5 Muestra tiempo 600 s.

En la Figura 32 se muestra la comparación del cromatograma del lisado clarificado por centrifugación y del lisado clarificado por microfiltración con filtro de tamaño de poro de 4 μm y flujo de 6 cm^3/min . Se puede observar en la Figura 32 que la concentración de ADNp en el proceso de microfiltración 3.70 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ es menor a la obtenida mediante centrifugación 4.60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

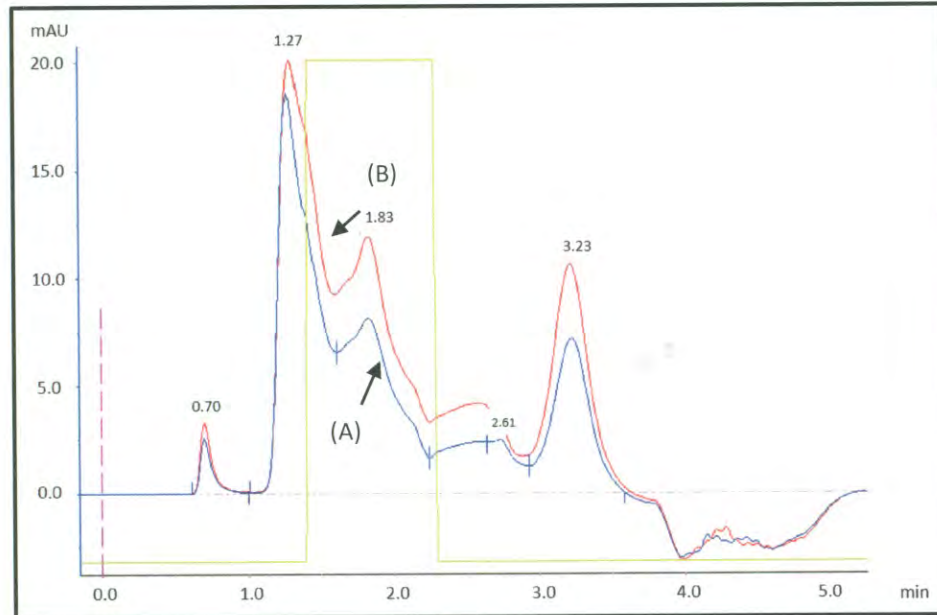


Figura 32. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración ($4\ \mu\text{m}$, flujo de $6\ \text{cm}^3/\text{min}$), (B) lisado clarificado por centrifugación.

En la Figura 33 se presentan los datos experimentales del volumen específico contra tiempo del experimento 2. La línea continua representa el ajuste del modelo empleado (Ecs. 10 y 11) a los datos obteniéndose un error absoluto de 0.16, los parámetros utilizados en el modelo se encuentran en las Tablas 4 y 5.

El parámetro de ajuste obtenido fue la constante de recubrimiento de $K_f = 0.04\ \text{cm}^{-1}$. Se utilizó la Ecuación 5 para calcular el volumen máximo de filtración de $V_{\text{max}} = 23.25\ \text{cm}^3/\text{cm}^2$.

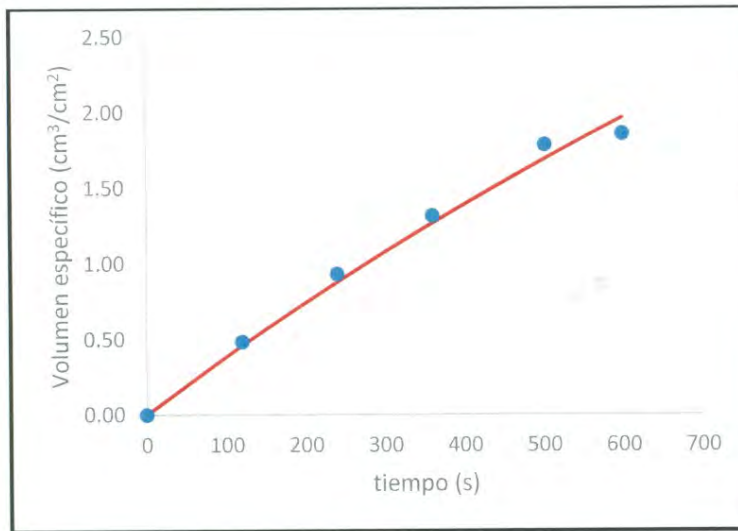


Figura 33. Perfil del volumen específico en sistema de microfiltración ($4\ \mu\text{m}$ y flujo inicial de $6\ \text{cm}^3/\text{min}$) con respecto al tiempo, ● Datos experimentales, — Datos obtenidos con modelo Bolton y col., 2005.

Experimento 3: Microfiltración $8\ \mu\text{m}$ con flujo de $4\ \text{cm}^3/\text{min}$

Se utilizó un microfiltro de tamaño de poro de $8\ \mu\text{m}$ con un flujo de $4\ \text{cm}^3/\text{min}$, midiendo el volumen filtrado y tomando alícuotas a diferentes tiempos (segundos) para realizar las determinaciones correspondientes (Fig. 34). En la Tabla 16 (Anexo E) se muestran los datos obtenidos durante el proceso.

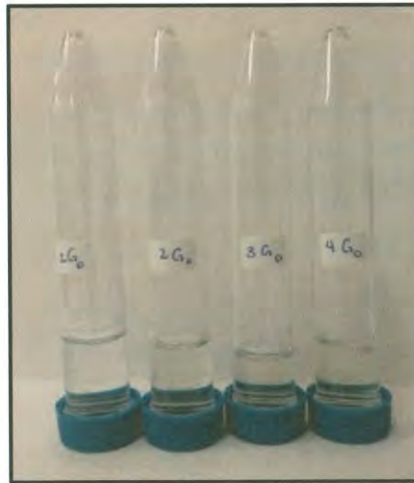


Figura 34. Muestras recolectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$ y flujo de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$.

En la Tabla 10 se muestra los datos obtenidos, tanto del proceso de microfiltración como de los análisis correspondientes.

Tabla 10. Datos obtenidos en proceso de microfiltración con tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$ y flujo de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$

	Vol.	Flux	Tiempo del proceso	Concentración ADNp	Masa ADNp/ g biomasa	Turbidez
	cm^3	$\frac{\text{cm}}{\text{s}}$	s	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU
Solución de alimentación	43	0.0027	0	5.57	102.14	393
Permeado	38.9	0.0022	644	4	66.34	2.59

El valor del flux durante el proceso disminuyó en aproximadamente 18.52%, sin embargo se mantuvo en el rango permisible para el proceso de clarificación, ya que el proveedor (Anexo A) indica el uso del microfiltro hasta que el flux decaiga al 20% de su valor inicial. Se recuperaron $66.34 \mu\text{g}$ de ADNp por gramo de biomasa lisada, equivalente a un 64.95%

de recuperación, que sugiere que una parte considerable del plásmido queda atrapado en el lecho del filtro.

La disminución en turbidez durante el proceso fue de 99.34%, que representa un comportamiento altamente eficiente de esta operación en relación a la eliminación de turbidez. La Figura 35 muestra la variación de la turbidez de la solución de salida con el tiempo de filtrado.

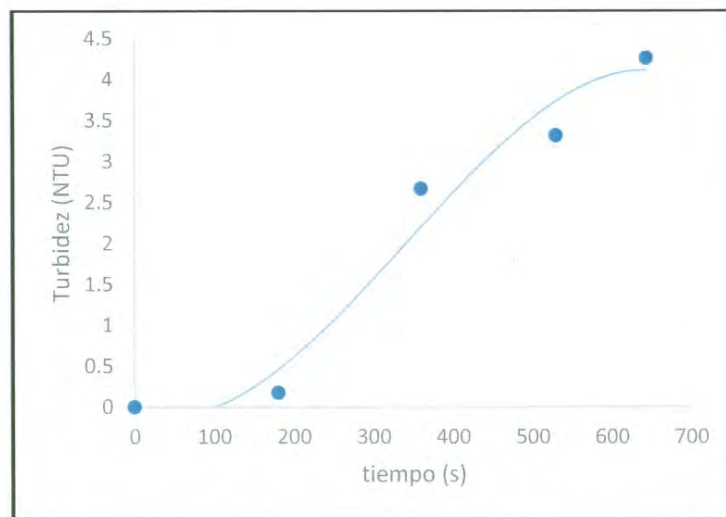


Figura 35. Turbidez de cada muestra recolectada durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con poro de $8\ \mu\text{m}$ y flujo de $4\ \text{cm}^3/\text{min}$.

Se corrobora la presencia del plásmido durante el proceso de microfiltración por medio del análisis electroforético (Fig. 36), mostrándose junto con el plásmido de interés (superenrollado) contaminantes en el lisado clarificado.

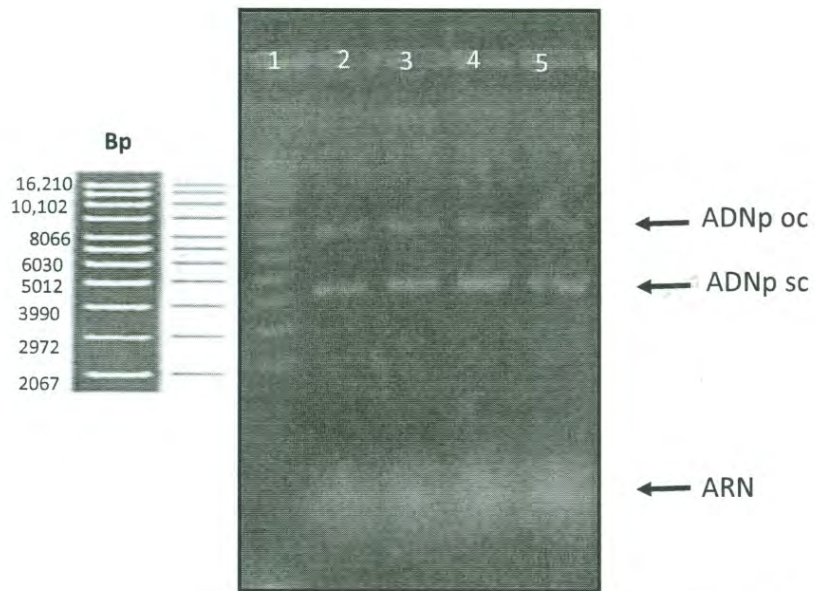


Figura 36. Gel de electroforesis microfiltración con tamaño de poro $8 \mu\text{m}$ y flujo de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$, Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled ADN ladder); Línea 2 Volumen total filtrado, Línea 3 Muestra tiempo 360 s, Línea 4 Muestra tiempo 540 s, Línea 5 Muestra tiempo 644 s.

En la Figura 37 se muestra la comparación del cromatograma del lisado clarificado por centrifugación y del lisado clarificado por microfiltración con filtro de tamaño de poro de $8 \mu\text{m}$ y flujo de $4 \text{ cm}^3/\text{min}$. Se puede observar en la Figura 37 que la concentración de ADNp en el proceso de microfiltración $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ es parecida a la obtenida mediante centrifugación $4.60 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

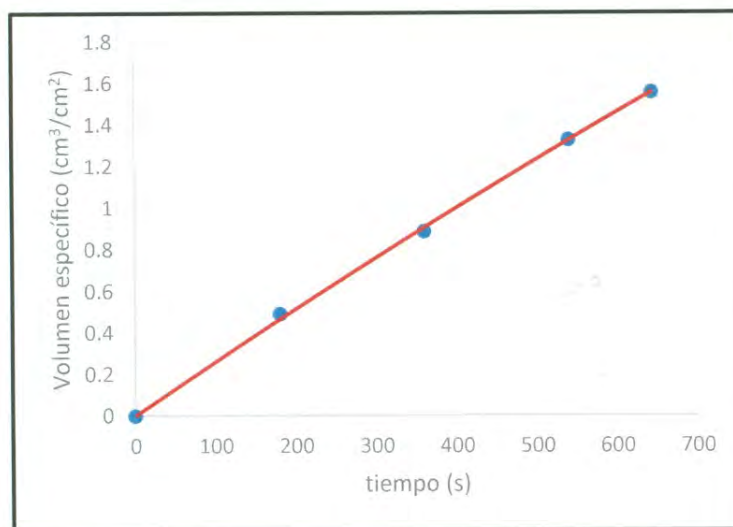


Figura 38. Curva de volumen específico en sistema de microfiltración (8 μm y flujo de 4 cm^3/min), ● Datos experimentales, — Datos obtenidos con modelo Bolton y col., 2005.

Experimento 4: Microfiltración 8 μm con flujo de 6 cm^3/min

Se utilizó un microfiltro de tamaño de poro de 8 μm con un flujo de 6 cm^3/min , midiendo el volumen filtrado y tomando alícuotas a diferentes tiempos (segundos) para realizar las determinaciones correspondientes (Fig. 39). En la Tabla 17 (Anexo E) se muestran los datos obtenidos durante el proceso.



Figura 39. Muestras recolectadas durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de $8\ \mu\text{m}$ y flujo $6\ \text{cm}^3/\text{min}$

En la Tabla 11 se muestran los datos obtenidos, tanto del proceso de microfiltración como de los análisis correspondientes.

Tabla 11. Datos obtenidos en proceso de microfiltración con tamaño de poro de $8\ \mu\text{m}$ y flujo de $6\ \text{cm}^3/\text{min}$

Vol.	Flux	Tiempo del proceso	Concentración ADNp	Masa ADNp/g biomasa	Turbidez	
cm^3	$\frac{\text{cm}}{\text{s}}$	s	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU	
Solución de alimentación	81	0.004	0	5.57	102.14	393
Permeado	76.7	0.003	960	4.56	79.12	3.31

El valor del flux durante el proceso disminuyó en aproximadamente 25%, sin embargo se mantuvo en el rango permisible para el proceso de clarificación, ya que el proveedor (Anexo A) indica el uso del microfiltro hasta que el flux decaiga hasta el 20% de su valor inicial. Se recuperaron $79.12\ \mu\text{g}$ de ADNp por gramo de biomasa lisada, equivalente a un

77.46% de recuperación, que sugiere que una parte considerable del plásmido queda atrapado en el lecho del filtro.

La disminución en turbidez durante el proceso fue de 99.16%, que representa un comportamiento altamente eficiente de esta operación en relación a la eliminación de turbidez. La Figura 40 se muestra la variación de la turbidez de la solución de salida con el tiempo de filtrado.

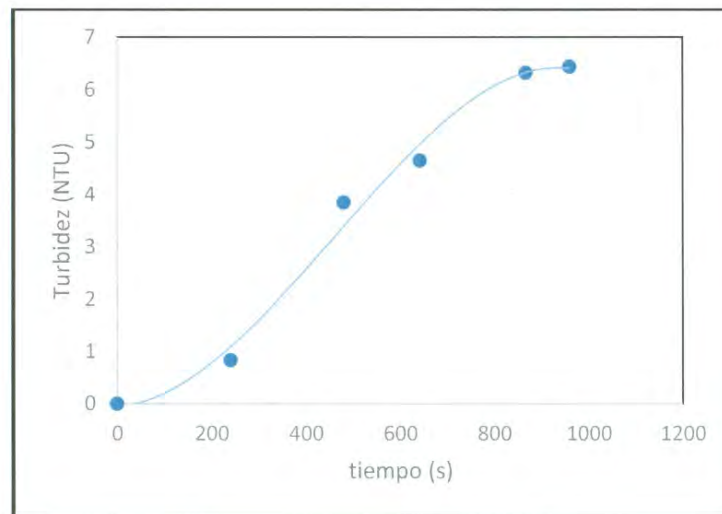


Figura 40. Turbidez de cada muestra recolectada durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con poro de $8\ \mu\text{m}$ y flujo de $6\ \text{cm}^3/\text{min}$.

Se corrobora la presencia del plásmido durante el proceso de microfiltración por medio del análisis electroforético (Fig. 41), mostrándose junto con el plásmido de interés (superenrollado) contaminantes en el lisado clarificado.

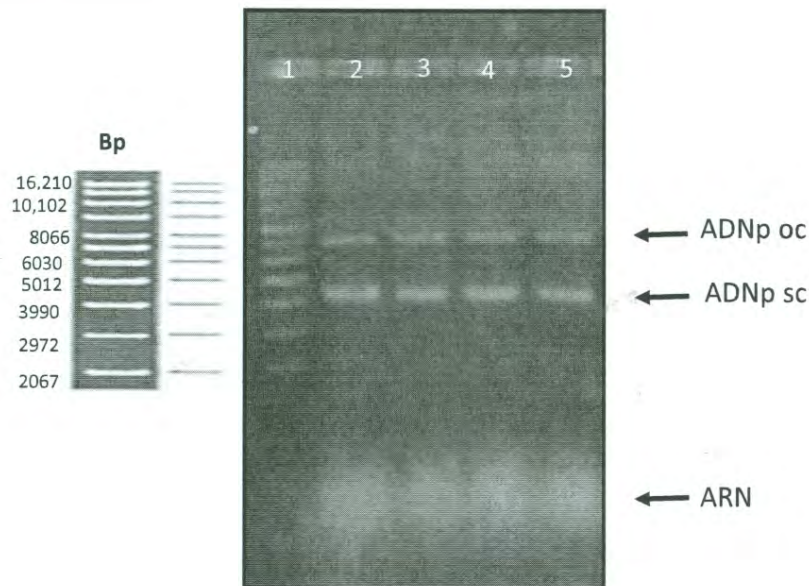


Figura 41. Gel de electroforesis de lisado clarificado con microfiltro de 8 μm y flujo de 6 cm^3/min , Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder); Línea 2 Volumen total filtrado, Línea 3 Muestra tiempo 480 s, Línea 4 Muestra tiempo 867 s, Línea 5 Muestra tiempo

En la Figura 42 se muestra la comparación del cromatograma del lisado clarificado por centrifugación y del lisado clarificado por microfiltración con filtro de tamaño de poro de 8 μm y flujo de 6 cm^3/min . Se puede observar en la Figura 42 que la concentración de ADNp en el proceso de microfiltración 4.56 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ es igual a la obtenida mediante centrifugación 4.60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

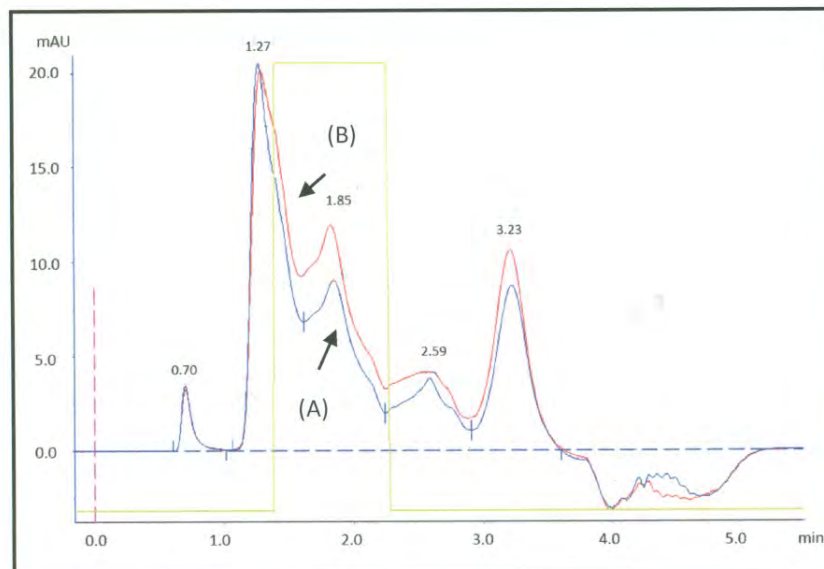


Figura 42. Comparación de los cromatogramas de: (A) lisado clarificado obtenido por microfiltración ($8\ \mu\text{m}$, flujo de $6\ \text{cm}^3/\text{min}$), (B) lisado clarificado por centrifugación.

En la Figura 43 se presentan los datos experimentales del volumen específico contra tiempo del experimento 4. La línea continua representa el ajuste del modelo empleado (Ecs. 10 y 11) a los datos obteniéndose un error absoluto de 0.14, Los parámetros utilizados en el modelo se encuentran en las Tablas 4 y 5.

El parámetro de ajuste obtenido fue la constante de recubrimiento de $K_f = 0.02\ \text{cm}^{-1}$. Se utilizó la Ecuación 5 para calcular el volumen máximo de filtración de $V_{max} = 45.28\ \text{cm}$.

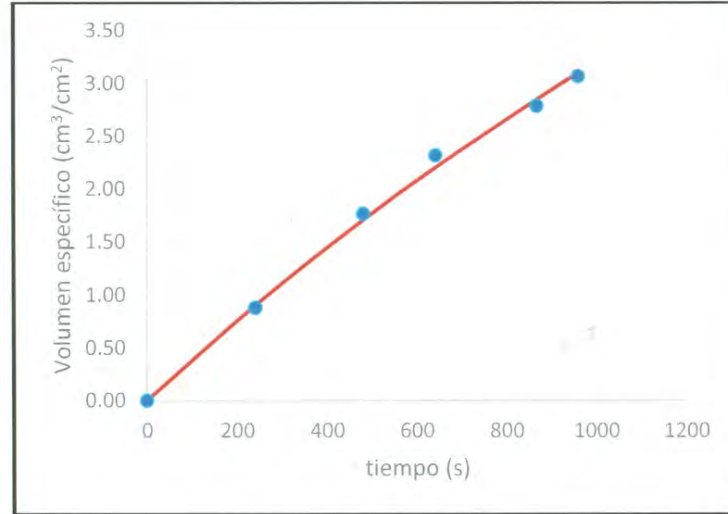


Figura 43. Curva de volumen específico en sistema de microfiltración (8 μm y flujo de 6 cm^3/min), ● Datos experimentales, — Datos obtenidos con modelo Bolton y col., 2005.

4.2.2 Clarificación por centrifugación

Para realizar el proceso de clarificación por centrifugación, se utilizaron 807.84 cm^3 de lisado neutralizado para clarificarlo bajo las condiciones mencionadas anteriormente y se obtuvieron los siguientes resultados.

Una vez obtenido el lisado clarificado por centrifugación, se hizo una relación entre el volumen clarificado (660.8 cm^3) y la biomasa lisada (33.65 g) y se obtuvieron 19.64 cm^3 lisado/g célula húmeda.

Al realizarse el análisis de turbidez al lisado clarificado se obtuvo un valor de 6.09, considerarse bajo, sin embargo aceptable para el método de pre clarificación empleado (Dibble, 2009).

Se corrobora la presencia del plásmido al finalizar el proceso de clarificación por centrifugación por medio del análisis electroforético (Fig. 44), mostrándose junto con el plásmido de interés (superenrollado) contaminantes en el lisado clarificado.

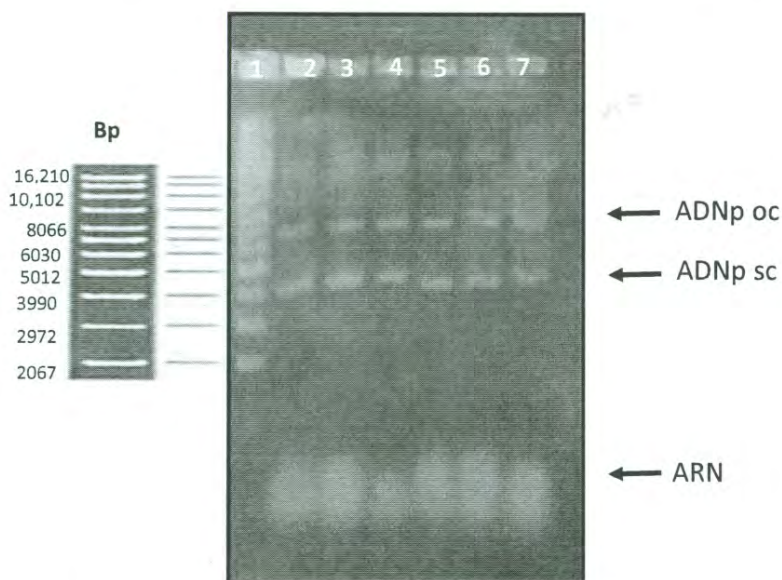


Figura 44. Gel de electroforesis, Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder), Línea 2 lisado pre-clarificado al vacío con poro de 8-12 μm (Diluido 1/2), Línea 3 microfiltración 8 μm , flujo de 6 cm^3/min , Línea 4 poro 8 μm , flujo de 4 cm^3/min , Línea 5 poro 4 μm , flujo de 6 cm^3/min , Línea 6 poro 4 μm , flujo de 4 cm^3/min , Línea 7 clarificado por centrifugación (2x).

El resultado de electroforesis se muestra en la Figura 44, observándose en el carril 7 la muestra conteniendo el plásmido superenrollado de 3990 Bp y la presencia de contaminantes. A partir del cromatograma de las muestras (Fig.44) y utilizando la curva patrón obtenida (Anexo D) se determinó que la concentración de plásmido en el lisado clarificado por centrifugación es de es de 4.60 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

El cromatograma se muestra en la Figura 45, el primer pico señala la presencia del plásmido, los demás picos se consideran contaminantes (Diogo, 2003).

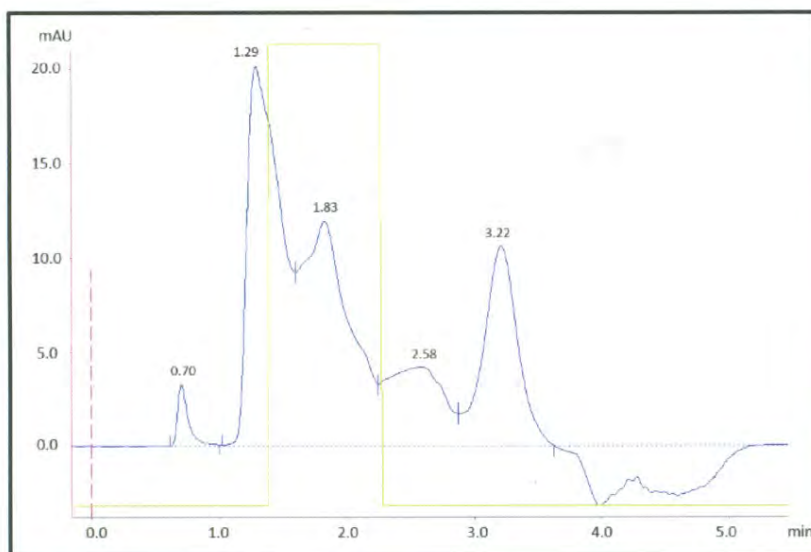


Figura 45. Cromatograma obtenido a partir de la muestra clarificada por doble centrifugación.

En la Tabla 12 se presenta un resumen de los datos obtenidos del análisis del lisado clarificado por centrifugación, que servirán para hacer la comparación entre ambos procesos: clarificación por microfiltración de lecho profundo y clarificación por centrifugación.

Tabla 12. Resultados obtenidos en el análisis del lisado clarificado por centrifugación

Volumen total	Concentración	Masa ADNp/ g biomasa	Turbidez
cm ³	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU
660.8	4.608	90.49	6.09

4.3.3 Comparación

Para realizar la comparación del proceso de clarificación por microfiltración de lecho profundo con el proceso de clarificación por centrifugación se hizo un resumen de los datos obtenidos en cada proceso de clarificación.

En la Tabla 16 se muestra la comparación del volumen total recuperado, la concentración de ADNp en cada volumen, la masa de ADNp por gramo de biomasa lisada y la turbidez del lisado clarificado por microfiltración de lecho profundo para cada experimento cambiando el tamaño de poro (8 y 4 μm) con variación en el flujo de entrada (6 y 4 cm^3/min) y los datos obtenidos por el proceso de clarificación por centrifugación.

Tabla 13. Comparación del volumen, concentración, masa y turbidez del lisado clarificado por microfiltración con cada experimento realizado y por centrifugación

	Volumen	Concentración	Masa ADNp/ g biomasa	Turbidez
	cm^3	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{cm}^3}$	$\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g biomasa}}$	NTU
Pre-clarificado	920	5.57	102.14	393
Experimento 1	62.9	3.72	62.26	2.13
Experimento 2	46.4	3.70	59.42	2.34
Experimento 3	38.9	4.00	66.34	2.59
Experimento 4	76.7	4.56	79.12	3.31
Centrifugación	660.8	4.60	90.49	6.09

Los datos obtenidos con cada clarificación por microfiltración coinciden con los resultados reportados en la bibliografía (Nunez y col., 2012), ya que, como muestran los valores de turbidez, se alcanzó a clarificar el lisado hasta 99% de su valor inicial para todos los casos.

Se observa con los datos reportados en la Tabla 13, que de los experimentos realizados, el experimento 4 (microfiltración con tamaño de poro de 8 μm y flujo de 6 cm^3/min), ofrece resultados favorables y competitivos.

El análisis de electroforesis se muestra en la Figura 46, corroborando la presencia del plásmido en los experimentos realizados por microfiltración de lecho profundo y por centrifugación, se observa como en los carriles del 2 – 7 aún hay impurezas presentes en todos los lisados clarificados, esto corroborando que aún se necesitará una recuperación secundaria del plásmido en el proceso.

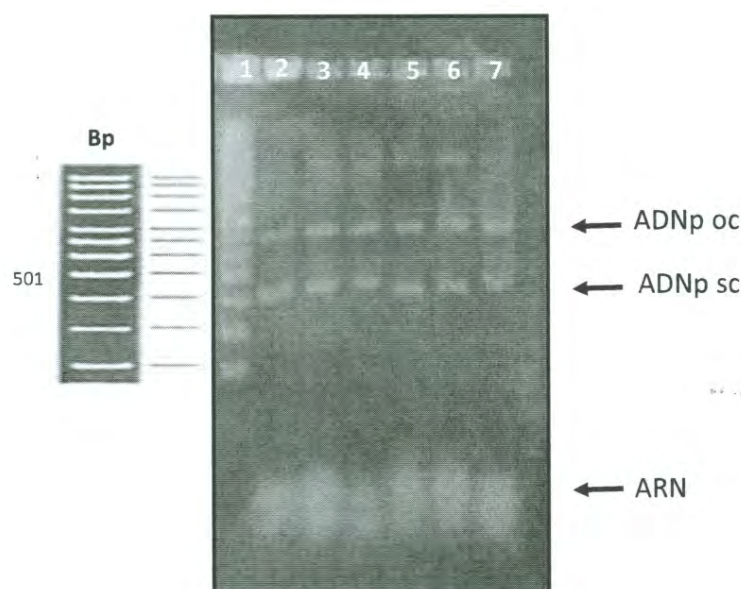


Figura 46. Gel de electroforesis, Línea 1 marcador de peso molecular (supercoiled DNA ladder), Línea 2 lisado pre-clarificado al vacío con poro de 8-12 μm (Diluido 1/2), Línea 3 Experimento 4, Línea 4 Experimento 3, Línea 5 Experimento 2, Línea 6 Experimento 1, Línea 7 clarificado por centrifugación (2x).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se logró la clarificación del lisado de células de *E. coli* para la recuperación del plásmido pVAX1-NH36 utilizando una filtración al vacío y una microfiltración de lecho profundo.

Los estudios del tamaño de poro del microfiltro mostraron que a menor tamaño de poro la retención de sólidos en el lecho del filtro es mayor.

La investigación del efecto del flujo de entrada de alimentación sobre el comportamiento de la microfiltración, sugiere que a mayor flujo la retención de sólidos es menor, reflejándose en curvas de turbidez menos pronunciadas

La clarificación de caldos conteniendo pVAX1-NH36 mediante microfiltración permitió una mayor eficiencia que mediante centrifugación. El proceso seleccionado de microfiltración presentó una recuperación de 87.5% respecto a la centrifugación sin embargo, se logró una mayor eliminación de sólidos.

La disminución de la recuperación se debe posiblemente, a que parte de ADNp queda retenido en el lecho del filtro, tanto en los sólidos filtrados como en el líquido intersticial. Sería recomendable evaluar el lavado del lecho al final de la operación para contrastar lo anterior.

Los estudios electroforéticos muestran que el ADNp mantiene su forma superenrollada durante la microfiltración. Los estudios cromatográficos permitieron determinar la concentración precisa de ADNp y comparar el contenido de impurezas durante los estudios realizados.

La descripción del proceso de microfiltración mediante el modelo de recubrimiento utilizado proporcionó un buen ajuste a los datos obtenidos en cada experimento de microfiltración, lo que sugiere que el agotamiento del filtro se produce por un recubrimiento de sus fibras.

El parámetro de ajuste (K_f) indica que los filtros utilizados son adecuados para el tipo de lisados empleados, indicando que el filtro tendrá una capacidad para procesar un menor volumen de lisado neutralizado conforme disminuye el tamaño del poro del filtro. El modelo de recubrimiento, el tamaño de poro y el flux son una herramienta que puede ayudar a escalar los procesos investigados.

La microfiltración puede ofrecer ventajas competitivas respecto a la centrifugación debido a la mayor clarificación que se obtiene bajo condiciones características. Además, permite utilizar un enfoque de escalamiento modular que puede ayudar a flexibilizar los bioprocesos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Be, I., da Silva, R., Paraguai, E., Borja-Cabrera, G.P., Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., García-Miss, M.R., Palatnik, C.B., Dumonteil E., (2005), Cross protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis, *Infection And Immunity*; 73, 2, 812–819.
2. Ahmad, B.O., Mohd B.M.J, (2009), Turbidimeter Design and Analysis: A Review on Optical Fiber Sensors for the Measurement of Water Turbidity, *Sensors*; 9: 8311-8335
3. Akeprathumchai, S., Han, B.B., Wickramasinghe, S.R., Carlson, J.O., Czermak, P., Preiss, K., (2004), Murine leukemia virus clearance by flocculation and microfiltration, *Biotechnol. Bioeng*; 88: 880–889.
4. Birnboim, H.C., Doly J., (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *J. Nucl. Acids Res.*; 7, 1513 – 1523.
5. Bolton, G.R., LaCasse, D., Lazzara, M.J., Kuriyel, R., (2005), The Fiber-Coating Model of Biopharmaceutical Depth Filtration, *AIChE Journal*; 51:2978-2987
6. Carnes, A.E., (2005), Fermentation Design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA, *Bioprocess Thechnical*; 2- 7.
7. Ciccolini, L.A.S., Shamlou, P.A., Titchener-Hooker, N.J., Ward, J.M. and Dunnill P., (1999), Rheological properties of chromosomal and plasmid DNA during alkaline lysis reaction, *Bioprocess Eng.*;21:231-237.
8. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., and Ginsberg H.S., (1980), *Microbiology*. 3rd Edition, *Harper & Row*, Philadelphia.
9. Dibble, K., (2009), Clarification for biopharmaceutical processing best practices for process development and implementation, Millipore bioprocess division, Millipore.
10. 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.
11. 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.
 12. Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Prazeres, D.M.F., (2005), Chromatography of plasmid DNA, *Journal of chromatography A.*; 3-22.
 13. Ferreira, G.N.M, (2005), Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination, *chemical engineering & technology*; 28:1285-1294.
 14. Freitas, S., Canário, S., Santos, J.A.L., Prazeres, D.M.F., (2009), Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact, *Biotechnology journal*; 4:265 – 278.
 15. Ghanem, A., Healey, R., Adly, F.G., (2013), Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review, *Analytica Chimica Acta*; 760: 1-15
 16. Graham, B., (2002), Clinical trials of HIV vaccines, *Annu. Rev. Med.*; 53, 207–221.
 17. Hermans, P.H., Bredee, H.L., (1936), Principles of the mathematical treatment of constant-pressure filtration. *J Soc Chem Ind.*; 55T:1-4.
 18. Hermia, J., (1982), Constant pressure blocking filtration laws—Application to power-law non-Newtonian fluids, *Trans IChemE.*; 60:183-187.
 19. Journal of Gene Medicine web presence 2010. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>
 20. Kahn, D.W., Bulter, M.D., Cohen, D.L., Gordon, M. et al., (2000), Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration, *Biotechnol. Bioeng*; 69: 101- 106.
 21. Karim, M.N., Graham, H., Han, B., Cibulskas, A., (2008), Flocculation enhanced microfiltration of *Escherichia coli* lysate, *Biochemical Engineering Journal*; 512-519.
 22. Kulkarni, S., Funk, E., Li, N., (1992), Membrane Handbook, *Ho, Sirkar (Eds)*.

23. Lara, A.R., Ramírez, O.T., (2012), Plasmid DNA Production for Therapeutic Applications, Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, Methods in Molecular Biology, *Springer Science Business Media*; 14: 271- 303.
24. Li, S., Huang, L., (2000), Nonviral gene therapy: promises and challenges, *Gene Ther*; 7:31-34.
25. Lucero, A., (2007), Desarrollo y simulación de un bioproceso para la producción de plásmidos, proyecto de tesis de maestría en ciencias, Universidad de Sonora
26. Nunes, J.C., Morao, A.M., Nunes, C., Pessoa de Amorim, M.T., Escobar, I.C., Queiroz, J.A., (2012), Plasmid DNA recovery from fermentation broths by a combined process of micro- and ultrafiltration: Modeling and application, *Journal of membrane science*; 1-12.
27. O'Brien, T.P., Brown, L.A., Battersby, D.G., Rudolph, A.S., Raman, L.P., (2012), Large-Scale, Single-Use Depth Filtration Systems for Mammalian Cell Culture Clarification, *BioProcess International*; 10: 50 - 57
28. Paget, H., (1956), Structure and performance of filter media, *AIChE J.*; 2:307-336.
29. Prazeres, D.M., Schluep, T., Cooney, C., (1998), Preparative Purification of supercoiled Plasmid DNA Using Anion Exchange Chromatography, *J. Chromatogr.*; 806. 31-45.
30. 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.*; 7: 1 – 30.
31. Quaak, S.G.L., Nuijen, B., Haanen, J.B.A.G., Beijnen, J.H., J., (2009), Development and validation of an LC-UV method for the quantification and purity determination of pDERMATT, *Pharm. Biomed. Anal.*; 49: 282–288.
32. Reis, R., Zydney, A., (2007), Bioprocess membrane technology, *Journal of Membrane Science*; 297: 16–50
33. Roush, D.J., Lu, Y., (2008), Advances in Primary Recovery: Centrifugation and Membrane Technology, *Biotechnol Prog*; 24, 488-495

34. Schleef, M. and Blaesen, M., (2007), Production of plasmid DNA as a Pharmaceutical, *Methods in Molecular Biology, Gene Therapy of Cancer*; 25: 471-495.
35. Shuler, M.L., Kargi, F., (2002), *Bioprocess Engineering: Basic Concepts, Prentice Hall*; 161-180.
36. Singhvi, R., Shorr, C., Xie, L., Wang, D.I.C, (1996), Clarification of animal cell culture Process fluids using depth microfiltration, *BioPharm*; 9(4): 35–41
37. Smith, C.R., DePrince, 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, *Journal of Chromatography*; 121-127.
38. Smrekar, F., Podgornik, A., Ciringer, M., Kontrec, S., Raspor, P., Strancar, A., Peterka, M., (2010), Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns, *Vaccine*; 28: 2039–2045.
39. Stadler, J., Lemmens, R., and Nyhammar, T., (2004), Plasmid DNA purification. *J. Gene Med*; 6:54 – 66.
40. Tejada, A., Montesinos, R.M., Guzmán, R., (2011), *Bioseparaciones, segunda edición, Pearson*.
41. Theodossiou, I., Collins, I.J., Ward, J.M., Thomas, O.R.T., Dunnill, P., (1997), The processing of a plasmid based gene from *E. coli* primary recovery by filtration, *Bioprocess Eng*; 16: 175–183.
42. Venkiteswaran, A., Belfort, G., (2010), Process optimization diagrams for membrane microfiltration, *Journal of membrane science*; 105 -108.
43. Wang, A., Lewus, R., Rathore, A., (2005), Comparison of different options for harvest of a therapeutic protein product from high cell density yeast fermentation broth, *Biotech. Bioeng*; 94: 91-104.
44. www.millipore.com

ANEXOS

Anexo A: CÁPSULAS SARTOCLEAR ®P: INSTRUCCIONES DE USO

1. Resumen

Este documento proporciona el método adecuado para identificación, instalación y uso de las cápsulas Sartorius Stedim Biotech Sartoclear ® P.

- Las cápsulas Sartoclear ®P están destinadas a ser utilizadas para la clarificación de cultivos de células animales y microbianas y de otros fluidos de origen biológico, por ejemplo, sangre y fracciones de plasma. El uso de este producto para otras aplicaciones o para otras formas de cómo se describe en este manual puede resultar en lesiones personales o mal funcionamiento del filtro. Por favor, siga las instrucciones para su propia seguridad y para obtener resultados de filtración óptimos

2. Identificación

Este documento hace referencia a las cápsulas Sartorius Stedim Biotech Sartoclear ®P con los números de serie siguientes:

Área de filtración: 25 cm² para todos los tipos

Multicapa

- 295PB1P13ACFF - M
- 295PB2P13ACFF - M
- 295PC1P13ACFF - M
- 295PC2P13ACFF - M

De una sola capa

- 293C4-P13ACFF - M
- 293C8HP13ACFF - M
- 293F4HP13ACFF - M
- 293F7HP13ACFF - M
- 293S5-P13ACFF - M
- 293S9-P13ACFF - M

3. Etiquetado

El tipo de filtro, el rango nominal de retención, el número de lote y número de serie de las cápsulas Sartoclear®P está impreso en la caja de cada cápsula.

La especificación de la identidad, junto con el número de orden están impresos en la etiqueta de la bolsa de plástico y en la caja de cartón.

El lado de entrada del flujo se encuentra marcado por la palabra "IN", el lado de salida de flujo está marcado con la palabra "OUT".

4. Mojado de las cápsulas Sartoclear®P

Antes del uso de los productos Sartoclear®P, el medio filtrante debe ser previamente enjuagado o alineado en la dirección de la filtración. Sartorius Stedim Biotech recomienda utilizar 100 L/m² de agua para inyección o solución buffer de lavado.

- Se recomiendan 250 cm³ de agua para las cápsulas Sartoclear®P.

Por favor, abrir la válvula de purga e introducir el medio de lavado a través de la entrada (entrada de cápsula indicada "IN") a una velocidad de flujo de aproximadamente de 10 cm³ por 25 cm² cápsula/min.

Por favor, tenga cuidado de no superar una presión diferencial de 1 bar | 15 psi.

Mantener la válvula de ventilación ligeramente abierta para asegurar la expulsión completa de aire. Una vez que el aire sea expulsado por completo y aparezca líquido, la válvula de ventilación debe cerrarse. Por favor, siga lavando la cápsula hacia abajo para que el aire atrapado pueda salir completamente. Continúe el lavado hasta que se procese el volumen recomendado.

Después del lavado, el líquido puede ser drenado a través de aire a presión o nitrógeno a una presión máxima de 0.5 bar | 7 psi.

Las cápsulas Sartoclear [®]P ya está listas para su uso o para la confección de medios tampón antes de usar.

5. Esterilización | Autoclave

Las cápsulas Sartoclear [®]P pueden ser esterilizadas en húmedo o seco en autoclave durante 30 minutos a 121 ° C, a 1 bar. Pueden no estar en línea directa con el vapor. Durante el tratamiento en autoclave la válvula de ventilación debe estar abierta y envuelta con papel de autoclave.

Las conexiones de entrada y salida de las cápsulas Sartoclear [®]P no deben ser envueltas con demasiada fuerza. Esto ayudará a evitar la deformación de la cápsula durante el ciclo de autoclave.

Después del ciclo de autoclave, extraer y dejar enfriar.

6. Realización del proceso de filtración

La cápsula pre-lavada, confeccionada y esterilizada puede ahora estar conectada al sistema de filtración.

La instalación debe ser hecha de tal manera que el flujo del Sistema y el flujo de las cápsulas Sartoclear[®]P sea consistente el uno con el otro (como se indica la flecha gravada).

Para aprovechar al máximo la superficie total del filtro, se debe realizar un paso inicial de expulsión. Por lo tanto el flujo debe de introducirse con la válvula de venteo abierta (no se debe excederse el flujo recomendado en la sección 6a) una vez que el fluido salga a través la válvula debe cerrarse.

Nota: El flujo constante es el modo de filtración ideal, donde la velocidad de flujo a través de las cápsulas Sartoclear[®]P Caps se mantenga fijo.

7. Caudales recomendados para filtración con cápsulas Sartoclear[®]P

Con el fin de maximizar el rendimiento del producto, el caudal recomendado se detalla a continuación y debe de seguirse estrictamente.

Caudales más altos como el que se indica en la sección 6a pueden dar lugar a una disminución de la capacidad global de filtrado.

Sección 6a

Los caudales recomendados para las cápsulas Sartoclear[®]P (cm³/min) son los siguientes:

-Clarificación celular (Post biorreactor y posterior centrifugación)

Max. 4-6 cm³/min

- Clarificación de sangre y derivados de plasma

Max. 2-3 cm³/min

8. Presión máxima permitida en el Sistema y presión diferencial permitida

La presión máxima permitida en el sistema es de 5.5 bar (80 psi) a 20 ° C.

La presión diferencial máxima admisible depende de la temperatura a la que se ejerce la presión.

Los valores de presión en el sentido de la filtración son los siguientes:

- 2 bar | 29 psi a 20 °C

- 1 bar | 14.5 psi a 80 °C

■ - 0.2 bar | 2.9 psi a 121 °C

La presión diferencial máxima permisible en la dirección inversa de la filtración es de 0.3 bar | 5 psi a 20 ° C.

Nota: No se recomienda la presión inversa.

9. Cambio de cápsula Sartoclear ®P

Las cápsulas Sartoclear ®P deben cambiarse cuando se alcanza el diferencial de presión máximo permisible o la turbidez especificada del efluente.

Cuando se trabaja a presión constante, se recomienda para la operación al momento de que el flux disminuya hasta un 20% de su valor inicial.

10. Eliminación

Todos los componentes de cápsulas Sartoclear ®P son no-peligrosos y pueden ser dispuesto a través de métodos normales de eliminación de residuos de acuerdo a la legislación local.

El método de eliminación de las cápsulas puede depender de la naturaleza del material residual del material filtrado.

11. Soporte de aplicaciones

Póngase en contacto con su representante de Sartorius Stedim Biotech local para obtener información general y datos técnicos.

Estaremos encantados de ayudarle en su proceso de filtración con uno de nuestros especialistas de aplicaciones en todo el mundo.

12. Devolución de los elementos filtrantes usados

Todos los elementos filtrantes utilizados deben ser esterilizados adecuadamente antes de ser enviados a Sartorius Stedim Biotech. Esto permite a nuestro personal manejarlos con un riesgo mínimo durante la inspección de los elementos de filtro.

La ley requiere que una forma de devolución (disponible a través con su representante local de Sartorius Stedim Biotech) debe ser completada antes del envío de los materiales filtrantes utilizados.

13. Responsabilidad

Sartorius Stedim Biotech no puede asumir ninguna responsabilidad si las cápsulas Sartoclear[®]P son sometidos a un uso inadecuado. En el interés del desarrollo del producto desarrollo nos reservamos el derecho de hacer cambios.

Gracias por trabajar con Sartorius Stedim Biotech, apreciamos su negocio.

Anexo B: CÁPSULAS DE FILTRO DE PROFUNDIDAD SARTOCELAR®P PARA ENSAYOS A ESCALA LABORATORIO

Descripción

Las cápsulas Sartoclear® P están especialmente desarrollados para procesar volúmenes a escala pequeña en aplicaciones de cosecha y clarificación celular.

El producto ofrece filtros de profundidad encapsulados a base de celulosa con una alta capacidad de retención de sólidos.

Las cápsulas Sartoclear® P están siendo fabricadas con la ventaja del sistema único y cerrado de Sartoscale.

Aplicaciones

Las cápsulas Sartoclear® P son utilizadas como cápsulas únicas de ensayos a escala de laboratorio, pruebas de ampliación y fabricación a pequeña escala.

Área del filtro

Cada cápsula Sartoclear® P contiene un área efectiva de filtrado de 25 cm².

Ventajas del producto

Las cápsulas Sartoclear® P son cápsulas completamente desechables. Esta tecnología proporciona mayor flexibilidad para el desecho del proceso a pequeña y gran escala. Las cápsulas Sartoclear® P se pueden conectar sencilla y directamente a la línea de procesamiento.

La válvula de ventilación de teflón integrada provee un procedimiento de venteo único y elimina contaminación del ambiente de laboratorio.

Flexibilidad

Las cápsulas Sartoclear[®] P se puede utilizar para procesar cantidades de volumen pequeñas desde 50 cm³ hasta 1000 cm³.

Esterilización

1 ciclo de autoclave húmedo 121 ° C a 1 bar durante 30 minutos.

- Las cápsulas Sartoclear[®] P pueden no estar en línea con el vapor estéril.

Extraíbles

Las cápsulas de filtro de lecho profundo Sartoclear[®] P reúne los requisitos de las normas de calidad para la inyección de agua establecidos por la USP 26.

- No pirogénica según USP endotoxinas bacterianas después de una lavado de 50 L/m² de agua inyectada.

- Nivel de LAL <0.125 UE/ cm³

- Pasar la prueba de plástico USP Class VI

Extracción de metales

(Por favor, consulte la guía de validación de Módulo Sartoclear[®] P filtro de profundidad)

No liberador de fibras según 21 CFR

Anexo C: MANUAL DE INSTRUCCIONES TN-100/T-100, TURBIDIMETRO PORTABLE.

1. Calibración de turbidímetro

El turbidímetro TN-100/T-100 fue calibrado y provado antes de dejar la fábrica. Por lo tanto, es posible usar directamente el instrumento al sacarlo de su caja. Sin embargo, una re-calibración del instrumento es recomendada para ayudar a familiarizarse con la operación del instrumento y el procedimiento de calibración. En adición, se recomienda una re-calibración al menos una vez al mes para una precisión óptima.

Se recomienda que se realiza una completa calibración usando las 4 soluciones estándar dadas para asegurar un rango total óptimo.

1.1 Soluciones de calibración

Se recomienda que se usen los siguientes materiales durante la calibración para lograr el estado óptimo en este manual:

- CAL 1: 800 NTU solución de calibración
- CAL 2: 100 NTU solución de calibración
- CAL 3: 20.0 NTU solución de calibración
- CAL 4: 0.02 NTU solución de calibración

Procedimiento de calibración

Coloque el turbidímetro TN-100/T-100 en una superficie plana equilibrada, seleccione la función de calibración del instrumento presionando el botón CAL una vez. El anunciador [CAL] parpadeará momentáneamente y el medidor le pedirá la primera solución de calibración CAL 1 (800 NTU). Inserte la solución CAL 1 (800 NTU) en el orificio de muestra, alineando la marca del vial con la marca del medidor, Figura 46.

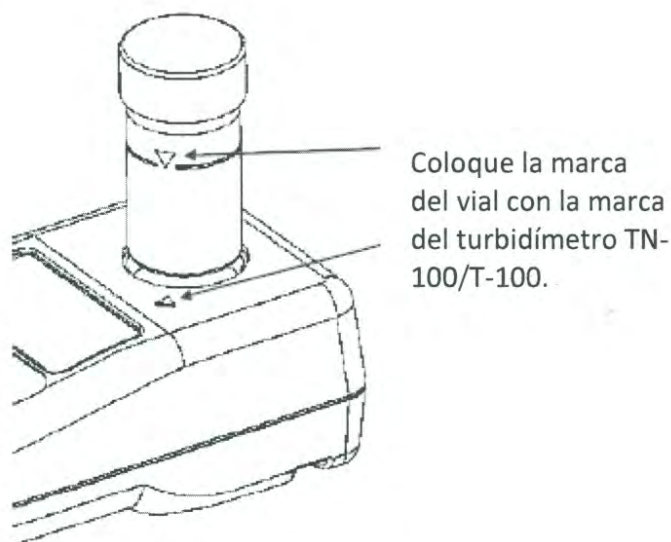


Figura 46. Alineación del vial con el turbidímetro.

Presione hasta que el vial quede completamente dentro del instrumento, presione el botón READ/ENTER.

El anunciador [CAL 1 800 NTU] parpadeará por aproximadamente 12 segundos.

Cuando el instrumento haya completado la calibración hasta este punto, te pedirá que insertes la próxima solución de calibración dentro del instrumento [CAL 2 100 NTU], repita la secuencia de calibración para cada solución de calibración.

Después de que haya calibrado exitosamente la solución CAL 4 (0.02 NTU), la pantalla mostrará [STbY], El medidor está listo para la siguiente medición.

La siguiente Figura muestra la secuencia completa de calibración.

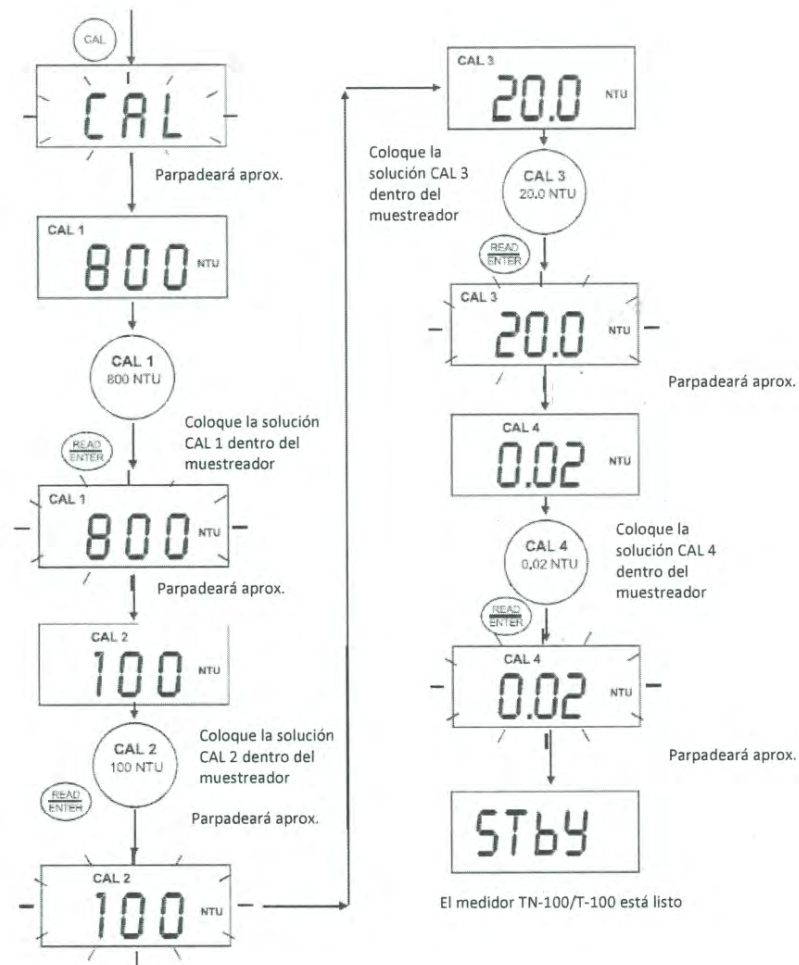


Figura 47. Secuencia de calibración.

2. Medición de turbidez

2.1 Información general

El turbidímetro TN-100/T-100 a prueba de agua te permite medir la turbidez de una muestra colectada. La turbidez es reportada en Unidades nefelométricas de turbidez (por sus siglas en inglés NTU). La lectura fuera de 1000 NTU está fuera del rango del instrumento.

2.2 Procedimiento de medición de turbidez

Una óptima medición de la turbidez depende de buenas técnicas de medición. Factores como la limpieza de los viales, el posicionamiento del vial en el muestreador, la calibración, la base del turbidímetro y otros, tienen que tomarse en consideración.

2.2.1 Preparación de los viales

Tome líquido con el tubo de plástico otorgado, tome un vial seco y limpio (Fig. 48a), tenga cuidado de manejar el vial por la tapa. Vierta en el vial aproximadamente 10 cm^3 de la agua, tape el vial con la tapa de enrosque negra y agítelo suavemente varias veces. Deseche la muestra utilizada y repita el procedimiento de lavado dos o más veces.

Llene el vial lavado con la porción remanente (10 cm^3 aproximadamente) de la muestra hasta la marca indicada en el vial. Tape el vial con la tapa de enrosque negra.

Limpie el vial con la tela suave libre de hilo. Asegure que el exterior del vial esté seco y libre de manchas, aplique una delgada película de aceite de silicona (incluido) en el vial de muestra (Fig. 48b), limpie con la tela suave para obtener una mejor distribución sobre toda la superficie del vial, ahora se encuentra listo para colocar el vial dentro del muestreador.

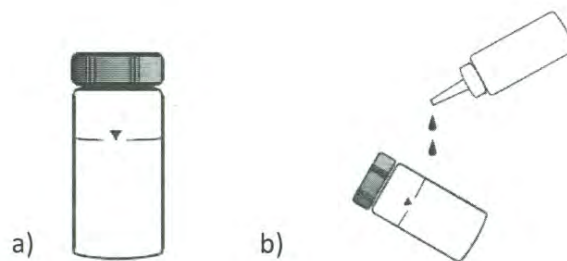


Figura 48. a) Vial muestreador, b) Aplicación de una delgada película de aceite de silicona.

Mediciones continuas

Asegúrese de que el medidor se encuentra en una superficie plana y equilibrada y está en modo de medición. La pantalla muestra [STbY], coloque el vial con la muestra dentro del muestreador, presione READ/ENTER y sostenga aproximadamente 0.3 segundos, la pantalla parpadeará [-Rd-] durante 10 veces o más y se mostrará el valor medido.

Anexo D: CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON COLUMNA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HPLC- HIC)

La concentración de las muestras se calculó a partir de una curva estándar, la curva estándar se obtiene inyectando, con ayuda del automuestreador, al sistema HIC-HPLC, con el procedimiento antes descrito, soluciones de pVAX1-NH36 purificado por medio de un kit comercial, de concentraciones conocidas, asociando en cada solución inyectada, el área del pico de ADNp obtenido en el cromatograma a la concentración.

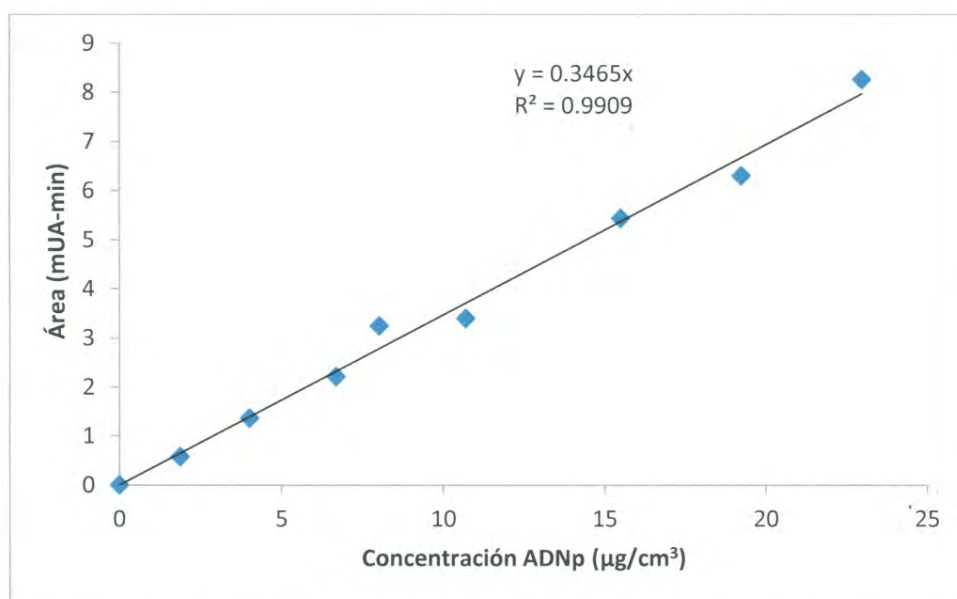


Figura 49. Curva estándar obtenida con ayuda del sistema HIC-HPLC

Anexo E: DATOS DE LOS PROCESOS DE MICROFILTRACIÓN A DIFERENTES TIEMPOS, CAMBIANDO EL TAMAÑO DE PORO (8 Y 4 μm) Y EL FLUJO DE ENTRADA (6 Y 4 cm^3/min)

Tabla 14. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 4 cm^3/min

Muestra	Tiempo de filtración (s)	Vol. Colectado (cm^3)	Volumen específico (cm^3/cm^2)	Flux (cm/s)	Turbidez NTU
0	0	0	0	0	0
1	162	8.1	0.324	0.0020	0.40
2	342	17.1	0.684	0.0020	0.98
3	522	26.2	1.048	0.0020	1.03
4	702	35.2	1.408	0.0020	1.70
5	882	44.1	1.764	0.0020	2.83
6	1062	52.1	2.084	0.0018	3.15
7	1242	60.2	2.408	0.0018	3.28
8	1307	62.9	2.516	0.0017	3.35

Tabla 15. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 4 μm y flujo de 6 cm^3/min

Muestra	Tiempo de filtración (s)	Vol. Colectado (cm^3)	Volumen específico (cm^3/cm^2)	Flux (cm/s)	Turbidez (NTU)
0	0	0	0	0.0000	0
1	120	12.1	0.484	0.0040	0.35
2	240	23.3	0.932	0.0037	1.25
3	360	32.9	1.316	0.0032	1.68
4	502	44.6	1.784	0.0033	2.08
5	600	46.4	1.856	0.0007	2.20

Tabla 16. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 8 μm y flujo de 4 cm^3/min

Muestra	Tiempo de filtración (s)	Vol. Colectado (cm^3)	Volumen específico (cm^3/cm^2)	Flux (cm/s)	Turbidez (NTU)
0	0	0	0	0.0000	0
1	180	12.3	0.492	0.0027	0.17
2	360	22.2	0.888	0.0022	2.67
3	530	33.2	1.328	0.0024	3.32
4	644	38.9	1.556	0.0022	4.26

Tabla 17. Datos obtenidos durante el proceso de microfiltración de lecho profundo con tamaño de poro de 8 μm y flujo de 6 cm^3/min

Muestra	Tiempo de filtración (s)	Vol. Colectado (cm^3)	Volumen específico (cm^3/cm^2)	Flux (cm/s)	Turbidez (NTU)
0	0	0	0	0.0000	0
1	240	22	0.88	0.0037	0.83
2	480	44.2	1.768	0.0037	3.85
3	642	58	2.32	0.0034	4.65
4	867	69.7	2.788	0.0021	6.33
5	960	76.7	3.068	0.0030	6.44