



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

ESTUDIO DE ESCALAMIENTO DE LA RUPTURA DE *E. coli* PARA EL DISEÑO DE UN MOLINO CONTINUO PARA LA RECUPERACIÓN DE PLÁSMIDO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

RAYZA HERRERA IMPERIAL

DIRECTORA: DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN

Hermosillo, Sonora

Julio 2021

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Rayza Herrera Imperial

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

09/07/21

Fecha



Dra. Patricia Guerrero Germán
Presidente

09/07/21

Fecha



Dr. Armando Tejeda Mansir
Secretario

09/07/21

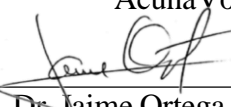
Fecha



Dr. Jesús Armando Lucero
Acuña Vocal

09/07/21

Fecha



Dr. Jaime Ortega López
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

12 de Julio de 2021.

Por medio de la presente se hace constar que la estudiante **RAYZA HERRERA IMPERIAL**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCÍA

COORDINADOR DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA:
INGENIERÍA QUÍMICA

RESUMEN

La inmunización es una de las intervenciones a la salud más potentes y rentables, sin embargo, un gran número de patógenos han desarrollado una multitud de estrategias de escape y mecanismos de resistencia y han frustrado los esfuerzos en el desarrollo de vacunas. Las vacunas de ADN plasmídico son una alternativa prometedora para la inmunización contra una diversidad de patógenos, incluyendo enfermedades que no son de origen infeccioso. En la actualidad se utilizan grandes cantidades de plásmido para su aplicación en vacunas, por lo que es necesario el desarrollo de un bioproceso eficiente, rentable y escalable para la recuperación y purificación del ADN plasmídico, con el fin de obtener un producto seguro y suficiente para producirlo a nivel farmacéutico. Actualmente el método de rompimiento celular más utilizado para la recuperación de plásmido es la lisis alcalina, esta técnica utiliza agentes químicos, por lo tanto las agencias reguladoras no recomiendan estos productos para uso directo o indirecto. Debido a esto se realizará un análisis comparativo utilizando estos dos métodos de rompimiento celular para la recuperación de plásmido. En este trabajo se estudia el comportamiento de un molino continuo por medio del escalamiento del rompimiento de *E. coli*: se analizó el grado de mezclado utilizando "Tanques en serie perfectamente agitados", se utilizaron cámaras de molienda (tanques) de diferentes volúmenes para simular los tanques en serie. También se analizó la cinética de liberación de plásmido por medio de una molienda en lote utilizando tres tipos de perlas de zirconio. La liberación de plásmido y la eficiencia de la etapa del proceso incrementa al realizar la molienda en un tanque de mayor volumen (50 mL) a un tiempo de operación de 2.1 min logrando una buena recuperación en 2 etapas, lo esperado obtener en el método mecánico operado en modo continuo. En esta etapa dentro del bioproceso para la producción de plásmido se busca liberar el producto de interés, el cual se encuentra en el interior de la célula hospedera y por lo tanto, obtener una mayor cantidad y calidad de la biomolécula.

ABSTRACT

Immunization is one of the interventions to the most powerful and cost-effective health, however, many pathogens have developed a multitude of escape strategies and mechanisms of resistance and have thwarted efforts in vaccine development. Plasmid DNA vaccines are a promising alternative for immunization against a variety of pathogens, including diseases that are not infectious in origin. Currently, large amounts of plasmid are used for its application in vaccines, so it is necessary to develop an efficient, profitable, and scalable bioprocess for the recovery and purification of plasmid DNA, to obtain a safe and sufficient product to produce it at the pharmaceutical level. Currently the most used cell breaking method for plasmid recovery is alkaline lysis, this technique uses chemical agents, therefore regulatory agencies do not recommend these products for direct or indirect use. Due to this, a comparative analysis will be carried out using these two methods of cell disruption for plasmid recovery. In this work, the behavior of a continuous mill is studied by scaling the breakdown of E. coli: the degree of mixing was analyzed using "perfectly stirred tanks in series", grinding chambers (tanks) of different volumes were used to simulate tanks in series. Plasmid release kinetics were also analyzed by batch milling using three types of zirconia beads. Plasmid release and the efficiency of the process stage increase when grinding in a larger volume tank (50 mL) at an operating time of 2.1 min, achieving a good recovery in 2 stages, which is expected to be obtained in the mechanical method. operated in continuous mode. At this stage, within the bioprocess for plasmid production, the aim is to release the product of interest, which is found inside the host cell and therefore obtain a greater quantity and quality of the biomolecule.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Guillermo Herrera Silva y María Elena Imperial Moreno, por ser un gran pilar de apoyo en mi vida, por sus consejos y por preocuparse por mí en todo momento.

Gracias a mi esposo Izaid Humberto Bojórquez Zapien que, a través de todos estos años juntos me apoya en todas las decisiones que tomo y por ser un gran compañero.

Para mi familia que siempre está dispuesta a ayudarme, a mis amigos Lupita Martínez, Liliana Gómez, Angélica Gracia, Eulalio Villa y Alfonso Álvarez.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS	XIII
NOMENCLATURA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción.....	1
1.1. Justificación.....	3
1.2. Objetivo General	4
1.3. Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO 2.....	5
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
2.1. Los plásmidos	5
2.2. Aplicaciones del ADN plasmídico.....	6
2.2.1. Características de un vector plasmídico	8
2.2.2. pVAX1-NH36	9

2.3. <i>Escherichia coli</i>	11
2.4. Bioproceso para la producción de plásmido	12
2.4.1. Materia prima y Establecimiento del banco de células.....	13
2.4.2. Fermentación	14
2.5. Recuperación primaria	16
2.5.1. Estructura de la pared celular	17
2.5.2. Métodos mecánicos.....	20
2.5.3. Molienda con perlas de zirconio	21
2.5.4. Métodos no mecánicos o químicos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.5.5. Recuperación intermedia	26
2.5.6. Purificación final.....	27
CAPÍTULO 3	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Materiales y Equipos	29
3.1.1 Materiales	29
3.1.2. Equipos.....	31
3.2. Metodología	34
3.2.1. Preparación de inóculos	34
3.2.2. Fermentación	35
3.2.3. Recuperación primaria	36
3.2.4. Análisis de muestras	38
3.2.5. Cinética de liberación de plásmido.	40
3.2.6. Modelo de “Tanques en serie perfectamente agitados”.	40

CAPÍTULO 4.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Fermentación de la bacteria.....	42
4.2. Recuperación primaria	43
4.2.1. Estudio 1	43
4.2.2. Estudio 2	47
4.2.3. Estudio 3	50
4.3. Diseño de un molino continuo	53
4.4. Isoformas del ADNp	60
CAPÍTULO 5.....	64
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
CAPÍTULO 6.....	66
BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterización física de diferentes isoformas del plásmido: 1) Plásmido superenrollado (SC), 2) Plásmido relajado (D), 3) Plásmido circular abierto (OC), 4) Plásmido lineal (L) (Molloy et al., 2004).	6
Figura 2. Representación esquemática de un plásmido adecuado para expresar proteínas en una célula mamífera (Crommelin et al., 2013).	9
Figura 3. Ciclo de transmisión de Leishmania.	10
Figura 4. Producción de ADN plasmídico (Prazeres & Ferreira, 2004).....	13
Figura 5. Método de extracción de ADN plasmídico (Birnboim & Doly, 1979).....	17
Figura 6. Estructura de la pared celular de microorganismos.....	18
Figura 7. Métodos de rompimiento celular.	20
Figura 8. Representación conceptual de un molino de perlas con el modelo de Tanques en serie perfectamente agitados (Adaptado de (Tejeda-Mansir et al., 1995).	24
Figura 9. Incubadora (VWR 1575 Incubator shaker).....	31
Figura 10. Espectrofotómetro VWR UV-6300PC.	31
Figura 11. Centrifuga Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific).....	32
Figura 12. Molino Retsch® MM 400.....	32
Figura 13. Cámara horizontal de electroforesis y fuente de voltaje (PowerPac™ Basic).	32
Figura 14. Cámara de rayos UV (UVP MultiDoc-It Digital Imaging System).	32
Figura 15. Cromatografo Äkta Purifier 10 UPC (GE Healthcare®), un auto-muestreador A-900 (GE HEalthcare®).	33
Figura 16. Esquema general de las operaciones previas y posteriores para la recuperación de plásmido.	34
Figura 17. Banco celular, inóculos congelados a -40 °C.....	35
Figura 18. Fermentación de la bacteria <i>E. coli</i>	36
Figura 19. Rompimiento celular por tratamiento alcalino.	37
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i>	43

Figura 21. Estudio 1: Análisis Electroforético de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 500 μm ..	44
Figura 22. Estudio 1: Cinética de liberación de ADNp de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 500 μm	45
Figura 23. Análisis cromatográfico: (-) Lisado mediante molienda con perlas. (-) Lisado mediante tratamiento alcalino.....	47
Figura 24. Figura 2. Estudio 2: Análisis Electroforético de la molienda utilizando perlas de zirconio con recubrimiento de diámetro de 200-400 μm	48
Figura 25. Estudio 2: Cinética de liberación de ADNp de la molienda utilizando perlas de zirconio con recubrimiento de diámetro de 200-400 μm	49
Figura 26. Análisis cromatográfico: (-) Lisado mediante molienda con perlas. (-) Lisado mediante tratamiento alcalino.....	50
Figura 27. Estudio 3: Análisis Electroforético de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 100 μm	51
Figura 28. Estudio 3: Cinética de liberación de ADNp de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 100 μm	52
Figura 29. Análisis cromatográfico: (-) Lisado mediante molienda con perlas. (-) Lisado mediante tratamiento alcalino.....	53
Figura 30. Análisis Electroforético de la molienda en tanques utilizando perlas de zirconio con recubrimiento de diámetro de 200-400 μm	55
Figura 31. Análisis cromatográfico: (-) Molienda en tanque de 10 mL. (-) Molienda en tanque de 35 mL. (-) Molienda en tanque de 50 mL.	56
Figura 33. Eficiencia global de la molienda continua en función del número de etapas y tiempo de residencia.	59
Figura 34. Medida de la distribución de tiempos de residencia de las células en la cámara de molienda. A) Molienda en tanque de 10 mL. B) Molienda en tanque de 35 mL. C) Molienda en tanque de 50 mL.	60
Figura 35. Análisis de isoformas, primer columna: (-) Purificado mediante kit. (-) Molienda a tiempo de 10 min (-) Molienda a tiempo de 2 min.	61
Figura 36. Análisis de isoformas, segunda columna: (-) Plasmido purificado mediante kit. (-) Lisado de molienda a tiempo de 10 min (-) Lisado de molienda a tiempo de 2.1 min.....	62

Figura 37. Análisis Electroforético de las fracciones recuperadas del estudio de las isoformas del ADNp.....63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de ácidos nucleicos y otros componentes en <i>E. coli</i> (Prazeres et al., 2001).	19
Tabla 2. Parámetros operativos típicos para una molienda con perlas (Middelberg, 2012).	23
Tabla 3. Parámetros de los estudios de molienda en lote.....	38
Tabla 4. Parámetros de la cinética de liberación de plásmido.	46
Tabla 5. Datos de tanques en serie perfectamente agitados.	54
Tabla 6. Cálculo de tanques en serie perfectamente agitados.....	58

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Dra. Patricia Guerrero Germán por todo el apoyo, paciencia, por ser tan detallista en su manera de explicar dudas, preguntas y por guiarme durante este tiempo.

Al laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) por brindarme las herramientas para el desarrollo de este proyecto.

Agradezco al Dr. Armando Tejeda Mansir por su tiempo y su valiosa contribución en este trabajo, al Dr. Armando Lucero Acuña y al Dr. Jaime Ortega López por brindarme su apoyo y conocimiento.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Bioprocesos: Adriana Padilla, Diana Franco y Miguel Félix por ofrecerme su tiempo y por mostrarme sus conocimientos para conocer las técnicas de operación de los distintos equipos del laboratorio.

Muchas gracias a mis compañeros de maestría: Fernanda, Bautista, Omar, Melissa, Daniela, Raquel y Sophia, por ser un gran apoyo, por brindarme de su ayuda y por la bonita amistad.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

En la última década ha incrementado el estudio en la aplicación de ADN plasmídico, tanto para su uso en terapia génica como en el desarrollo de vacunas. La vacunación es la técnica más efectiva y menos costosa que se utiliza para la prevención y erradicación de enfermedades, sin embargo, la amplia propagación de infecciones ha provocado que los científicos desarrollen nuevos tipos de vacunas, como las vacunas de tercera generación, basada en el uso de ADN plasmídico conteniendo transgenes que codifican un antígeno capaz de imitar la infección patogénica intracelular y desencadenar respuestas inmunes humorales y celulares (Abdulrahman & Ghanem, 2018).

Las vacunas se clasifican en dos tipos: vacunas virales y vacunas no virales. Las vacunas virales son mucho más eficientes para codificar la información en la célula y su capacidad de expresión, pero el potencial problema es el riesgo de que el vector, es decir, el virus se manifieste en su poder infeccioso. Una forma de vacunación no viral utilizada es con el uso de plásmidos, se aplica directamente al organismo receptor de diferentes maneras y en este caso el riesgo a infección no existe (Prazeres, 2011).

Las vacunas de ADN plasmídico son una modalidad prometedora para la inmunización contra una diversidad de patógenos, incluyendo enfermedades que no son de origen infeccioso (Greenland & Letvin, 2007).

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal (se encuentra físicamente separado del cromosoma) y es capaz de replicarse independientemente del cromosoma. Desde el punto de vista funcional, el papel de los plásmidos es almacenar información genética fuera del genoma de las procariontes. Generalmente se encuentran distribuidos en

bacterias, en algunos hongos y levaduras. Las bacterias suelen recurrir a este conjunto de genes citoplasmáticos, cuando se enfrentan a cambios ambientales o estrés y requieren la adaptación para sobrevivir (Prazeres, 2011).

El uso de plásmidos en vacunas y terapia génica aún requiere de estudios adicionales para cumplir con las normas de agencias reguladoras como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la agencia Europea de Medicamentos (EMA) las cuales establecen si el producto y el proceso se desarrolla de la mejor forma, es decir, que cumpla con las pautas de seguridad establecidas y haga de este un proceso sencillo y sea factible escalarlo (Klinman et al., 2010).

El bioproceso para la producción de plásmido para su uso en vacunas o terapia génica consta de cuatro etapas principales: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final, los cuales se describen brevemente a continuación.

La etapa de fermentación consiste en la producción de biomasa. La bacteria *Escherichia coli* es la célula hospedera más rentable y utilizada para la producción de plásmido (Selas Castiñeiras et al., 2018).

La etapa de recuperación primaria tiene la finalidad de liberar el ADN plasmídico que se encuentra en el interior de la célula hospedera para posteriormente en la recuperación intermedia y purificación final remover impurezas y contaminantes. El método utilizado para el rompimiento celular es muy importante ya que de este dependerá la cantidad y calidad del producto deseado, por tal razón es considerado el paso crítico de todas las operaciones unitarias en el procesamiento posterior de plásmido (Prazeres, 2011).

Existe una gran variedad de métodos para llevar a cabo el rompimiento celular y estos pueden ser divididos en mecánicos y no mecánicos, dentro de los métodos mecánicos se encuentra la molienda con perlas, la homogeneización y la prensa de French los cuales son equipos diseñados especialmente para el área de alimentos, de pinturas, pigmentos, entre otros. En los no mecánicos encontramos el tratamiento alcalino, el choque osmótico, la disolución lipídica y la digestión enzimática, que permiten la liberación selectiva del contenido intracelular (Tejeda Mansir et al., 2011).

La lisis alcalina ha sido el método más utilizado para la extracción de plásmidos. Esta técnica consiste en romper las células por medio de la acción de hidróxido de sodio y dodecil sulfato de sodio para liberar el plásmido junto con los demás componentes celulares. Posteriormente las impurezas son atrapados por complejos proteicos, los cuales precipitarán; a diferencia del ADN plasmídico que rápidamente se renaturaliza y adquiere su conformación natural (Urthaler et al., 2007).

Diferentes trabajos han estudiado los distintos tipos de técnicas de rompimiento celular para conocer cuál es más eficiente para la recuperación de plásmidos, no obstante, aún se requiere de más investigación para determinar un método que sea rentable y que pueda escalarse.

La molienda con perlas de zirconio para la lisis de la *E. coli* y posterior recuperación de ADN plasmídico resulta ser una técnica prometedora y con ello obtener una mayor recuperación de plásmido libre de contaminantes. El rompimiento celular se fundamenta en un movimiento que genera alto estrés a las células debido a la colisión de las perlas con la biomasa, generando un alto esfuerzo de corte lo cual provoca el rompimiento de la membrana liberando el contenido intracelular. Este método puede ser efectuado en equipos operados por lotes, o en modo continuo (Ferreira et al., 2000).

Dado que la lisis alcalina involucra el uso de agentes químicos, los cuales generan residuos difíciles de desechar, este método presenta problemas para ser escalado, por lo tanto, se considerará realizar un análisis comparativo entre la molienda con perlas y el tratamiento alcalino.

1.1. Justificación

Actualmente es necesario profundizar en los métodos de escalamiento de algunas operaciones, debido a que la gran mayoría se han adaptado a nivel industrial gracias a estudios previos realizados a partir del laboratorio. El bioproceso para la producción de plásmido aún no se encuentra bien establecido para lograr obtener la pureza deseada del producto de interés, como la eficiencia y rentabilidad del proceso de bioseparación. Considerando lo anterior y que una gran variedad de métodos se utiliza para el rompimiento

celular, existe la necesidad de desarrollar un estudio dentro de la recuperación primaria ya que cubre un papel muy importante en la liberación del ADN plasmídico. En la actualidad la lisis alcalina es el método no mecánico más utilizado a escala laboratorio para la recuperación de plásmido a partir de *E. coli* como la célula hospedera, sin embargo, esta técnica es difícil de controlar a gran escala y el uso de agentes químicos genera un problema en la pérdida significativa de ADN plasmídico. Distintos trabajos demuestran que la recuperación de plásmido es factible utilizando el método mecánico, debido a esto se estudiará el escalamiento de la ruptura de *E. coli* para el diseño de un molino continuo y recuperar el ADNp utilizando perlas de zirconio debido a las propiedades de dureza y tenacidad del material.

1.2. Objetivo General

Estudiar el escalamiento de la ruptura de *E. coli* para el diseño de un molino continuo para la recuperación de plásmidos.

1.3. Objetivos Específicos

- Estudiar la cinética de liberación de plásmido por medio de molienda con perlas de zirconio.
- Analizar el grado de mezclado en un molino de perlas utilizando el modelo de “Tanques en serie perfectamente agitados”.
- Analizar las isoformas presentes en los lisados obtenidos por medio de molienda.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Los plásmidos

Algunas células procariotas contienen segmentos circulares de ADN en el citoplasma llamados plásmido. Los plásmidos son moléculas pequeñas de ADN extracromosomal y son capaces de duplicarse de manera autónoma sin estar vinculada al cromosoma. Los plásmidos juegan un papel muy importante en los organismos que los contienen, codifican una amplia gama de actividades metabólicas y permiten a las bacterias degradar compuestos (Willey et al., 2008).

Los plásmidos se mueven dentro y fuera de las células, también constituye un medio para almacenar información genética adicional fuera del genoma de las procariotas, siendo portador de genes con la propiedad de adaptarse al crecimiento en determinados ambientes. La variedad de genes codificados por plásmidos que se encuentran en la naturaleza es enorme, desde genes que confieren resistencia a agentes como antibióticos o metales pesados hasta genes que amplían las propiedades metabólicas o confieren patogenicidad al huésped (Shuler, 2017).

El número de plásmidos presentes en una célula bacteriana suele estar presente en múltiples copias y el número de copias suele ser relativamente estable, sin embargo, esto se ve influenciado por el tipo de plásmido y de la célula (Million-Weaver & Camps, 2014).

El plásmido puede estar presente en diferentes formas topológicas y se caracteriza por su estructura molecular (Fig. 1). La "estructura circular retorcida" o también llamada superenrollada (sc) es la forma nativa del plásmido y se encuentra *in vivo* y el grado de enrollamiento en su doble cadena circular lo hace más compacto. El plásmido circular relajado (d), circular abierto (oc) y el lineal (l) se obtiene debido a la acción de enzimas y al

estrés considerable que puede ocurrir durante la lisis celular (Molloy et al., 2004; Prazeres, 2011).

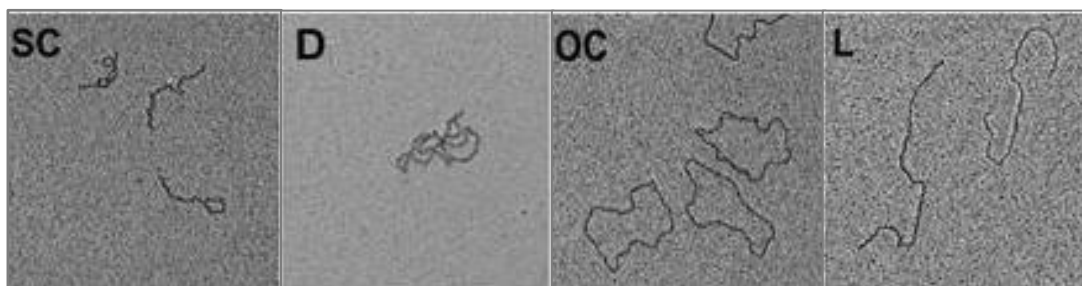


Figura 1. Caracterización física de diferentes isoformas del plásmido: 1) Plásmido superenrollado (SC), 2) Plásmido relajado (D), 3) Plásmido circular abierto (OC), 4) Plásmido lineal (L) (Molloy et al., 2004).

La isoforma de ADNp superenrollado es la forma topológica deseada, ya que garantiza el acceso más eficiente al núcleo de la célula y, en consecuencia, mejora la expresión génica en las células eucariotas (Carbone et al., 2012). Además, varias líneas de evidencia indican que se requieren altos niveles de superenrollamiento para obtener una respuesta inmune efectiva y, en última instancia, protección contra el desafío infeccioso (Cupillard et al., 2005). Para la terapia génica y vacunas de ADN plasmídico se desea el plásmido superenrollado, mientras que las isoformas lineales y circulares abiertas se consideran impurezas del producto (Stadler et al., 2004).

Debido a esto la demanda en la producción de grandes cantidades de ADN plasmídico superenrollado ha aumentado recientemente como resultado de la rápida evolución de la terapia génica y las vacunas de ADN (Ferreira et al., 2000).

2.2. Aplicaciones del ADN plasmídico

Los plásmidos son una herramienta indispensable en la investigación y desempeñan un papel muy importante en la industria de la biotecnología para producir proteínas farmacéuticas, anticuerpos, vacunas, enzimas industriales, marcadores biológicos entre otros productos. A través de los años ha aumentado el uso de estas macromoléculas como

biofarmaceuticos en terapia génica y vacunas de ADN por presentar un gran potencial en ensayos clínicos (Prazeres & Monteiro, 2015).

La terapia génica es una técnica prometedora para el tratamiento de enfermedades (adquiridas o heredadas) como el cáncer y trastornos genéticos. Este método terapéutico reemplaza el gen distorsionado por un gen sano, o completar un gen faltante para expresar la proteína requerida (Zhang et al., 2004). Los vectores virales es uno de los vectores más utilizados para la transferencia del material genético debido a su capacidad para transportar el gen de manera eficiente y asegurar la expresión a largo plazo (Boulaiz et al., 2005). Existen otros métodos de aplicación no virales que han sido muy utilizados como el empleo de ADN desnudo/ plasmídico, sin embargo, aún requiere de estudios (Goldman & Ausiello, 2009).

Las vacunas de ADN plasmídico transfieren genes a la célula huésped para codificar una proteína de interés la cual provoca la inmunidad o protección, es decir, se pueden administrar para prevenir futuras enfermedades (Zamfir et al., 2014). La simplicidad y efectividad de este de este tipo de vacunas ha inspirado los estudios preclínicos adicionales dirigidos a una gran cantidad de antígenos virales y no virales (Ferraro et al., 2011). Las formas clásicas para la administración de la vacuna son las inyecciones intramusculares, intradérmicas y subcutáneas, pero el mayor desafío es que requiere de una dosis significativa de ADN para una mejor respuesta (Hobernik & Bros, 2018).

Los vectores basados en ADN han sido autorizados para su uso en el campo veterinario y se puede esperar que el creciente número de éxitos de ensayos en humanos y no humanos, junto con las aprobaciones regulatorias genere la creciente demanda de producción a escala industrial (Kong et al., 2010). El ADN plasmídico puede manipularse y producirse genéticamente de forma sencilla mediante la propagación de la cepa hospedera que contiene el plásmido y los pasos posteriores, lo que facilita la producción comparado con otros vectores (Voß, 2007).

2.2.1. Características de un vector plasmídico

En los últimos años, los vectores plasmídicos se han convertido en una herramienta fundamental en el campo de la biología molecular. Los plásmidos son utilizados para impulsar los avances biotecnológicos, desde producción de insulina, eritropoyetina humana, activador tisular y el interferón α . Por lo tanto, los plásmidos se convirtieron en vectores, como medio de transporte, para entregar y manipular ADN extraño dentro de una célula huésped (Nora et al., 2019).

El procedimiento para llevar a cabo la clonación de ADN en un vector plasmídico inicia una vez identificado y aislado el gen o fragmentos de DNA de interés por la acción de la enzima de restricción, es necesario la inserción mediante ADN ligasa en un vector para replicarse de manera autónoma del genoma dentro de la bacteria como el organismo hospedero. Generalmente se utiliza la bacteria *E. coli* para propagar el ADN y son cultivadas a condiciones que favorezcan el crecimiento (Watson, 2006; Zárate et al., 2009).

Las características más importantes (Fig. 2) en este tipo de vector son: a) El origen de replicación (ORi), el cual permite que los plásmidos se repliquen por separado del cromosoma de la célula huésped. b) Un sitio de clonación múltiple (MCS). Contiene sitios de reconocimiento para una serie de enzimas de restricción y estos sitios facilitan la transferencia de ADN de un plásmido a otro. c) Genes de resistencia a antibióticos. Este marcador seleccionado permite identificar de manera fácil a las células que contienen el vector de clonación. d) Promotor para impulsar la expresión génica en otros huéspedes de expresión. e) Sitio de reconocimiento de poli (A), es decir, los vectores de expresión que se usan para conducir la expresión de proteínas en *E. coli* no contiene un sitio de reconocimiento de este sitio (Crommelin et al., 2013).

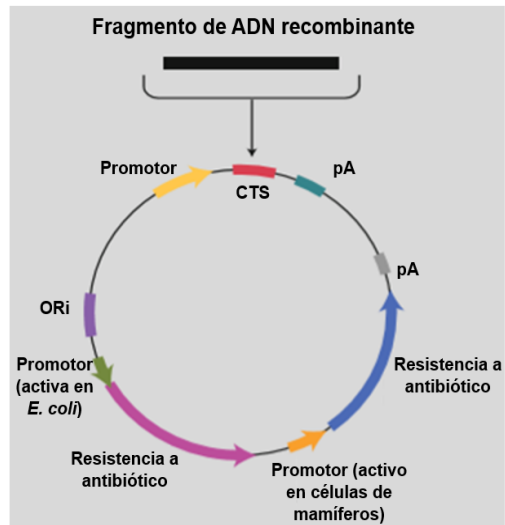


Figura 2. Representación esquemática de un plásmido adecuado para expresar proteínas en una célula mamífera (Crommelin et al., 2013).

2.2.2. pVAX1-NH36

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causada por un protozoo leishmania y transmitido por la picadura de un mosquito hembra de los arenales. El parásito se presenta en dos formas (Fig. 3): en su forma flagelada, llamado promastigote y en su forma amastigote. El mosquito al ingerir sangre inyecta la forma infecciosa promastigote, el cual ingresa a las células fagocíticas mononucleares (macrófagos). Una vez en el interior del huésped el parásito se multiplica dentro de una vacuola parasitófora en una nueva forma sin flagelo, llamada amastigote. El macrófago finalmente se rompe y múltiples amastigotes ingresan a un nuevo macrófago afectando a distintos tejidos, dependiendo de la especie de Leishmania. El ciclo de vida comienza cuando la mosca (hembra) toma sangre para alimentarse e ingiere amastigotes presentes en un hospedero y la transformación de amastigote a promastigote se lleva a cabo en el interior del mosco (Alvar et al., 2017).

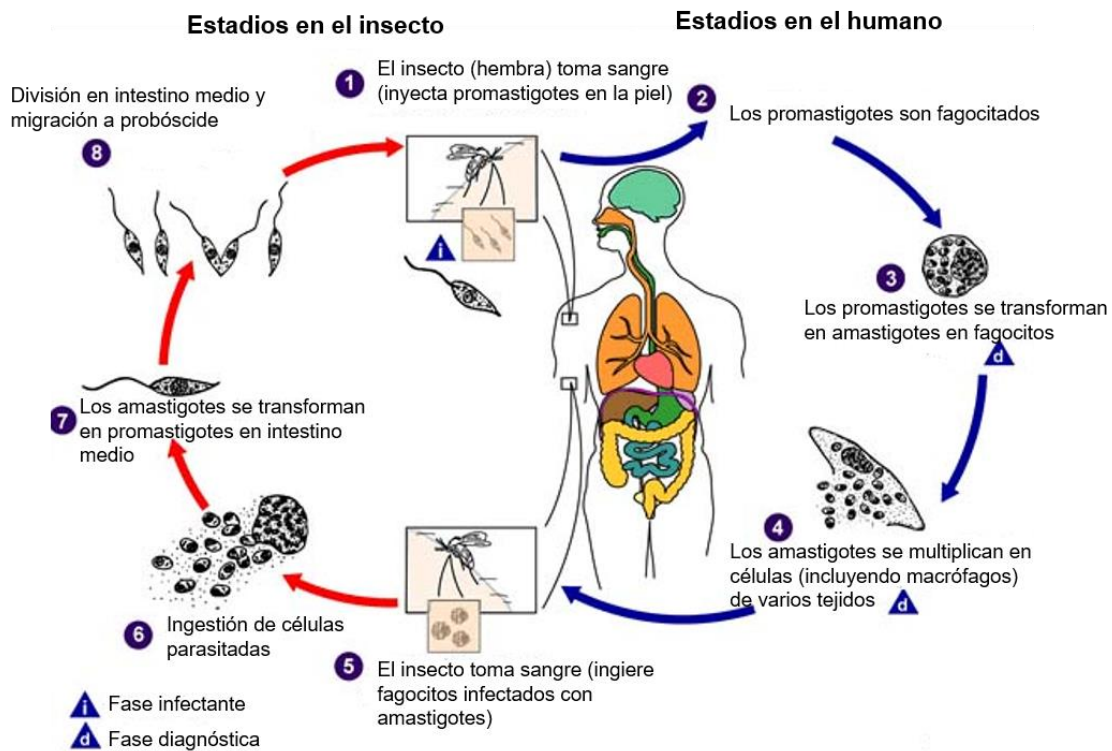


Figura 3. Ciclo de transmisión de Leishmania.

La leishmaniasis puede manifestarse de diversas formas como lesiones ulcerativas cutáneas, inflamación de la mucosa e infección visceral diseminada. La infección ocurre en múltiples regiones endémicas, tanto en niños como en adultos (Murray et al., 2005).

Una característica de la leishmaniasis es el papel que desempeña la respuesta inmune del huésped como resultado de la enfermedad. Las células T controlan el crecimiento del parásito, sin embargo, también pueden contribuir a la aparición y progresión de la enfermedad. Puede desarrollarse potentes respuestas reguladoras de células T que suprimen la inmunidad antiparasitaria. Alternativamente, se pueden generar células T CD4⁺ o T CD8⁺ hiperactivadas que causan daño a los tejidos del huésped. No existe una vacuna humana autorizada y las opciones de tratamiento farmacológico son limitadas, problemáticas y costosas (Kumar et al., 2017).

Debido a lo anterior, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para combatir esta enfermedad logrando una mejor respuesta inmune y la protección específica de diversas

especies. Muchos antígenos se han probado como posibles candidatos en vacunas convencionales (primera generación) que se basan en microorganismos inactivados o vivos atenuados o en subunidades de patógenos y vacunas recombinantes (segunda generación) se basan en antígenos proteicos altamente purificados, sin embargo, la vacuna de ADNp (tercera generación) aumenta la especificidad y presenta ventajas profilácticas sobre las anteriores (Tejeda-Mansir et al., 2019). Se ha demostrado que la vacuna de ADN que codifica el antígeno NH36 induce protección contra la Leishmaniasis. La hidrolasa de nucleósidos (NH36) de *Leishmania donovani* es una enzima vital de *Leishmania* que libera purinas o pirimidinas del ADN extraño y es utilizado para la síntesis del ADN del parásito (Santos et al., 2017).

El éxito de las vacunas basadas en ADNp ha generado el desarrollado del vector plasmídico pVAX1 de 3.0 kilo pares de bases (kpb), y mediante la inserción del gen NH36 dio como resultado el plásmido pVAX1-NH36 con un tamaño de 4.0 kpb candidato prometedor contra la Leishmaniasis (Sanchez-Casco et al., 2013).

2.3. *Escherichia coli*

Una característica importante en vacunas de ADN es que debe ser segura en humanos y fácil de producirse a escala comercial. Como medida de seguridad es necesario evitar la posibilidad de que el plásmido se integre al cromosoma humano, y, para minimizar el riesgo el vector no debe replicarse en células de mamíferos (ORi). En la actualidad se utilizan cantidades importantes de ADNp para una vacuna eficaz, por lo tanto, es necesario un alto rendimiento de plásmido. Por esta razón, los plásmidos bacterianos propagados en bacteria Gram negativa como la *E. coli* es el sistema de producción más utilizado y el más estudiado (Montgomery & Prather, 2006).

La *E. coli* es una bacteria con forma de bacilo, de aproximadamente 2.5 μm de largo y 1 μm de ancho. La célula tiene la propiedad de transferir ADN ya sea por conjugación bacteriana, transducción o transformación. El amplio conocimiento sobre su fisiología y genética explica su uso preferencial como huésped para la expresión génica y su fácil manipulación (Crommelin et al., 2013). Este tipo de bacteria tiene una alta tasa de crecimiento y un alto nivel de expresión. La *E. coli* se cultiva en un medio simple, la disponibilidad de nutrientes

y su concentración, especialmente las fuentes de carbono son los factores cruciales para determinar el perfil de crecimiento (Bren et al., 2013).

2.4. Bioproceso para la producción de plásmido

El desarrollo de productos biofarmacéuticos ha revolucionado el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades y ha sido desarrollado mucho más rápido que el mercado de medicamentos (Kesik - Brodacka, 2018), sin embargo, la metodología para la producción de productos biológicos requiere de una investigación científica rigurosa.

El uso de plásmidos de forma directa o indirecta requiere el permiso de agencias reguladoras. Estas regulaciones no son iguales en todo el mundo, pero si es necesario la fabricación de un producto que cumpla con muchas de las especificaciones establecidas y presente una garantía de calidad, con la finalidad de proteger al paciente de cualquier riesgo asociado con el uso de estos. Para aplicaciones directas, es decir, si se aplica en ensayos clínicos, el ADNp debe ser producido bajo las “buenas prácticas de fabricación” (GMP), pero, si no se aplica de forma directa la garantía en el control de calidad también es importante. Dependiendo de las aplicaciones previstas, el ADNp puede producirse a diferentes niveles de calidad (Schmeer & Schleef, 2014).

El bioproceso para la recuperación de plásmido ha sido clasificado en dos etapas (Fig. 4): operaciones previas (up-stream) y operaciones posteriores (down-stream). Antes del desarrollo en la fabricación de plásmido, es recomendable la evaluación del vector plasmídico para asegurar que el rendimiento y calidad de producción sean aceptables. Las operaciones previas comprenden la preparación del inóculo, esterilización y preparación del medio de cultivo para llevar a cabo la fermentación. En las operaciones posteriores involucra la recuperación, concentración, purificación y el acabado (Carnes & Williams, 2007; Tejeda Mansir et al., 2011).

Sin embargo, la recuperación y el aislamiento de plásmido presenta problemas específicos, relacionados con su forma peculiar y su conformación. Considerando lo anterior, el bioproceso para la recuperación de esta macromolécula sigue una serie de reglas heurísticas (Prazeres & Ferreira, 2004).

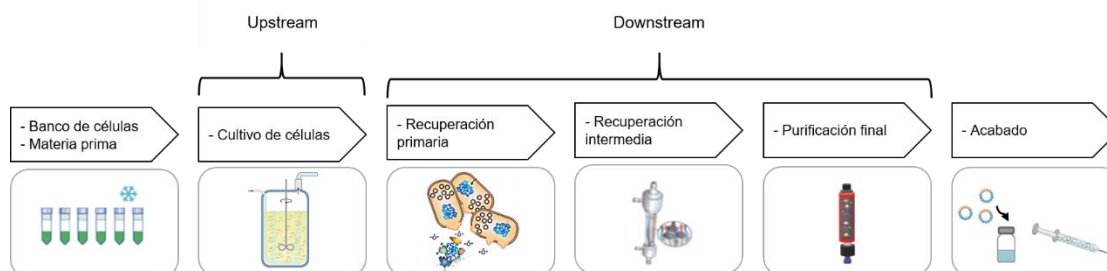


Figura 4. Producción de ADN plasmídico (Prazeres & Ferreira, 2004).

Teniendo en cuenta lo anterior, el desarrollo de un proceso a gran escala, dirigido a biofármacos debe diseñarse de la mejor forma, para evitar productos contaminados. También es importante que los procesos del desarrollo sean sencillos, que sean reproducibles para llevarlo a gran escala.

2.4.1. Materia prima y establecimiento del banco de células

El ADN plasmídico que contiene el gen de interés hospedado en la bacteria *E. coli* (inóculo), el cual debe ser producido en un establecimiento de banco de células, con el objetivo de facilitar los pasos posteriores. Estos se mantienen en crioviales, tubos o recipientes de mayor volumen para ser almacenados adecuadamente. Tales bancos celulares son considerados como la fuente celular original (Listner et al., 2006).

Los criterios de aceptación en los bancos de células de *E. coli* consideran de gran importancia conocer la identidad e integridad de la macromolécula (secuenciación y mapeo de restricción), estabilidad y una eficiente segregación, productividad, identidad de la cepa, viabilidad del huésped, altos rendimientos y alternativas de bajo costo, evitando algún tipo de contaminante (Urthaler et al., 2012).

Las condiciones de propagación del producto de interés deben manejar un alto control de calidad, esto quiere decir, que la materia prima utilizada para la fabricación de plásmido debió ser estudiada y analizada para realizar el trabajo posterior, ya que de esto depende en gran medida un mayor rendimiento y pureza (Schmeer et al., 2017). Se ha documentado

que se obtiene un mayor rendimiento de ADNp para fines de clonación en cepas como *E. coli* DH5 α y XL1-blue comparadas con K-12 (Brand et al., 2012).

Los componentes del medio de cultivo determinaran el rendimiento del plásmido, la calidad y la estabilidad, esto implica que, la fuente de nutrientes (metabolitos primarios y secundarios) que se encuentran en el sustrato tienen un profundo efecto en la fermentación. Los medios se clasifican según el tipo de metabolito que los compone, generalmente los medios complejos, son químicamente indefinidos y de composición variable, contienen componentes esenciales como la levadura, son relativamente fáciles de preparar y son muy utilizados por producir altas densidades celulares. Los medios sintéticos o químicamente definidos requieren de más componentes, son difíciles de preparar y a menudo se obtienen densidades celulares menores que lo que se puede lograr con el medio complejo. Cualquiera que sea el medio de cultivo debe de esterilizarse previamente para ser puesta en contacto con el inóculo, para evitar la formación de otro tipo de material (Danquah & Forde, 2007).

2.4.2. Fermentación

La fermentación es el primer paso para la producción de plásmido la cual inicia mediante la adición del inóculo. Los factores incluidos como lo es el medio, temperatura, suministro de oxígeno y la densidad celular deben optimizarse y controlarse. Cada una de estas condiciones tiene un impacto en la cosecha celular, así como en la recuperación primaria, el rendimiento y calidad del ADNp (Islas-Lugo et al., 2016).

El cultivo en matraces agitados es usado ampliamente a escala miligramo, pero no es práctico para producir la cantidad necesaria para estudios preclínicos y clínicos. Este tipo de estudios generalmente utilizan fermentadores de producción a escala industrial, los cuales pueden aplicar diferentes técnicas como fermentación en lote, lote alimentado y modo continuo. Un proceso de fermentación de plásmido se espera obtener como resultado alto rendimiento de biomasa, pero también debe diseñarse para maximizar la cantidad de producto en relación a la biomasa (Carnes & Williams, 2014).

Los cultivos en matraces resulta ser una técnica más barata y de mayor rendimiento, sin embargo, el control del proceso y el monitoreo no se pueden realizar constantemente, en

cambio la fermentación en lote, lote alimentado y modo continuo si presentan esa gran ventaja (Schmeer et al., 2017).

Las fermentaciones por lotes son las más simples de operar, donde todas las fuentes de carbono y los componentes del medio se agregan al comienzo de la fermentación, por lo tanto, la velocidad de crecimiento aumentará al igual que la constante de velocidad específica según la cinética de Monod, y finaliza hasta que se agota la fuente de carbono. Esto es fácil de operar, sin embargo, requiere un tiempo de inactividad prolongado para la entrega de lotes. También es ineficiente, con concentraciones cambiantes de sustrato, y no permite controlar la tasa de crecimiento o la tasa de formación del producto (Mears et al., 2017).

La fermentación por lote alimentado es la estrategia de cultivo más utilizada para la producción de plásmido, debido que se tiene un mejor control en la adición de nutrientes y con esto se obtiene mejor resultado en el rendimiento de la biomasa, debido a que el sustrato se suministra a una velocidad tal que se consume por completo. La fermentación comienza cuando las células se inoculan en un volumen del medio inicial, después comienzan a consumir el sustrato inicial limitante (Carnes & Williams, 2014). Diferentes estrategias de alimentación han sido desarrolladas, pero la alimentación exponencial con cultivos de perfusión resulta ser una estrategia de cultivo para la producción de plásmido efectiva. Este modo de operación puede lograr un crecimiento celular exponencial y una tasa de crecimiento específica constante (Munguía - Soto et al., 2015).

La fermentación en modo continuo, donde se agrega sustrato y el producto es removido a una tasa constante, puede resultar deseable para la producción de plásmido en grandes cantidades. El objetivo de esta operación es mantener al sistema en un estado estable con una alta formación de producto, sin embargo, existen desafíos operativos, especialmente a escala industrial, ya que requiere condiciones estrictamente controladas y métodos de monitoreo sólidos. También puede haber problemas de programación, ya que las operaciones posteriores no siempre se pueden operar de forma continua. Además, la operación prolongada requiere un sistema huésped genéticamente estable y también existe un mayor riesgo de contaminación (Mears et al., 2017).

2.5. Recuperación primaria

Las operaciones posteriores inician con la cosecha celular que consiste en separar la biomasa del medio de cultivo (gastado) por centrifugación continua o discontinua. A continuación, las células se suspenden en una solución tampón para llevar el siguiente paso diseñado para romper las células (Prazeres et al., 2001). Existen diferentes métodos para realizar la etapa de la recuperación primaria y todos tienen como objetivo liberar el plásmido que se encuentra en el interior de la célula bacteriana (Schmeer et al., 2017).

La lisis alcalina es el método más utilizado para la producción de plásmido (Fig. 5), esta técnica fue desarrollada originalmente por Birnboim y Doly en 1979 y consiste en desintegrar la célula *E. coli* mediante una solución alcalina de Hidroxido de Sodio (NaOH) y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) (Bimboim & Doly, 1979). Esta solución, además, desnaturaliza proteínas, ADN genómico e hidroliza el ARN. Posteriormente el lisado se neutraliza con una solución concentrada de acetato de potasio, el cual precipita principalmente restos celulares, proteínas y el ADNg, formando un flóculo de color blanco. Finalmente, el sobrenadante resultante contendrá el ADNp y pequeñas moléculas de ARN. Este método se desarrolló originalmente para operaciones a escala laboratorio donde la centrifugación se usa comúnmente para la eliminación de precipitados y la formación del flóculo, el cual tiene una densidad similar a la solución circundante distribuida en todo el volumen, sin embargo, para la operación de grandes volúmenes de ADNp, la centrifugación no es la mejor opción debido a la obstrucción de los filtros en la clarificación de los pasos posteriores (Blom et al., 2010; McLennan et al., 2012).

Algunos métodos para la extracción de ADNp no son fácilmente escalables, además las agencias reguladoras no recomiendan el uso de solventes, químicos tóxicos o enzimas que proviene de animales para su uso clínico (Xenopoulos & Pattnaik, 2014). A pesar de las altas densidades celulares que se pueden lograr en los procesos de cultivo, la recuperación primaria puede ser el cuello de botella en la fabricación de plásmido para su uso directo o indirecto. Por lo tanto, el ingeniero químico ha visto la necesidad de optimizar la productividad en esta etapa del bioproceso para la recuperación de ADNp (g a kg) realizando estudios mediante el uso de modelos y de manera experimental para aumentar la eficiencia de la separación de impurezas tales como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas

intracelulares y de minimizar la degradación del ADN plasmídico a causa de las fuerzas de corte (Roush & Lu, 2008).

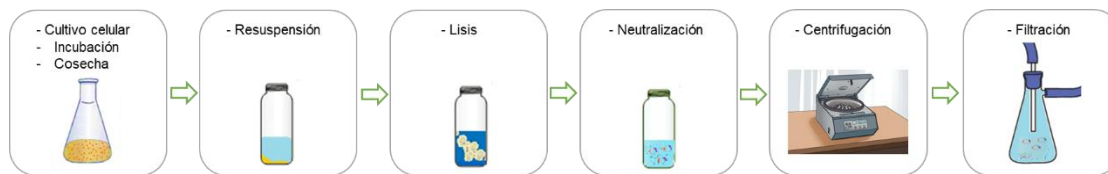


Figura 5. Método de extracción de ADN plasmídico (Birnboim & Doly, 1979).

El método seleccionado para romper la pared celular depende de varios factores como: la resistencia de la pared celular (depende del tipo de célula), la localización del producto de interés, la aplicación del producto, la estabilidad del producto a la temperatura y al esfuerzo cortante, facilidad para la recuperación del producto de interés, simplicidad del método y el costo de operación (Oliveira et al., 2017).

2.5.1. Estructura de la pared celular

Las paredes celulares de las bacterias son rígidas y porosas, poseen una elevada presión osmótica interna y frecuentemente pueden hallarse expuestas a diferentes condiciones ambientales externas. La pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas poseen una característica común, ambas están compuestas de peptidoglicano o mureína la cual soporta el estrés y mantiene la forma compacta del organismo. La capa de peptidoglicano en las células Gram positivas (10-80 nm de grosor) es mucho más gruesa que en las células Gram negativas (3 nm de grosor) y su estructura consiste en dos capas. El espacio debajo de la capa de peptidoglicano, llamado espacio periplasmático, tiene un grosor de aproximadamente 8 nm y a menudo contiene enzimas. La membrana plasmática (capa interna) es de aproximadamente 8 nm de grosor y está formada por fosfolípidos y proteínas. La envoltura de las células Gram negativas como la *E. coli* consta de tres capas, la membrana externa de aproximadamente 8 nm de espesor compuesta de un polímero que contiene proteínas y lipopolisacárido y una capa de peptidoglicano las cuales en conjunto proporcionan resistencia mecánica a la célula. Debajo existe el espacio

periplásmico y finalmente la tercera capa es la membrana citoplasmática, en su interior se encuentran proteínas, enzimas, plásmidos, ARN y ADN (Sivasankar, 2005; Tejeda Mansir et al., 2011).

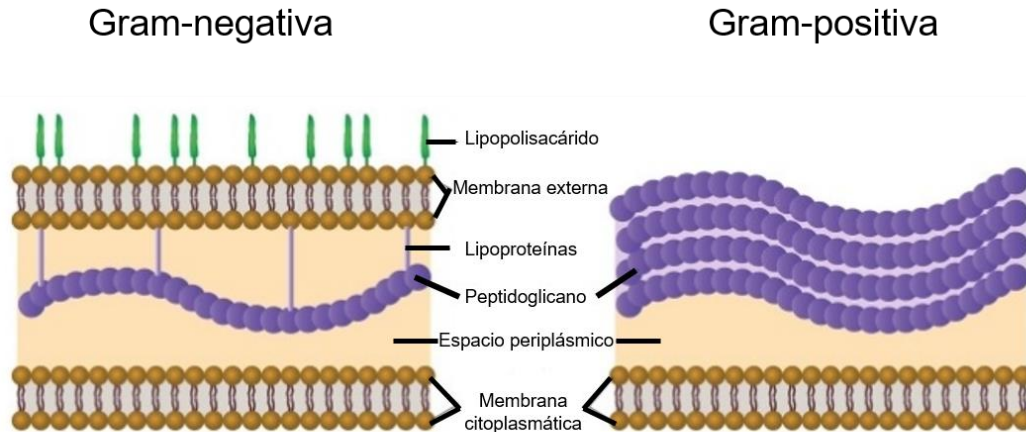


Figura 6. Estructura de la pared celular de microorganismos.

El método más apropiado para la disrupción celular debe ser lo suficientemente eficiente para romper las tres capas de envoltura de la bacteria *E. coli* y liberar grandes cantidades de ADN plasmídico superenrollado (sc). La ruptura de la membrana plasmática interna, la pared celular de peptidoglicano y la membrana externa liberan los componentes intracelulares como el ARN, ADN, LPS, proteínas, junto con el plásmido (Tabla 1) (Prazeres, 2011).

Tabla 1. Caracterización de ácidos nucleicos y otros componentes en *E. coli* (Prazeres et al., 2001).

Especies	Cantidad (% w/w)	Diferentes especies/ célula	Promedio MW (kDa)
Agua	70	1	18
Ácidos Nucleicos			
ADN genómico	0.5	1 ^a	2.8 ×10 ⁶
ARN de Transferencia	4.8	40	28
ARN Ribosomal	0.9	3	500-1000
ARN Mensajero	0.3	400-800	660-990
ADN Plasmídico	< 1	1	3300 ^b
Proteínas	15	1100	8-200
Lipopolisacáridos	5		10
Iones y pequeñas moléculas	3	800-2000	< 1

^a Las células de *E. coli* de crecimiento rápido tienen un promedio de 4 moléculas de ADN.

^b Se considera una molécula de plásmido con un promedio de 5 kb.

Los métodos para liberar el ADN plasmídico (Figura 7) se clasifican en métodos mecánicos y no mecánicos o también métodos químicos. Dentro de los primeros se encuentra la molienda con perlas, la homogeneización y la prensa de French. Dentro de los segundos se encuentra el choque osmótico, la disolución lipídica, la digestión enzimática y el tratamiento alcalino (Tejeda Mansir et al., 2011).

No todos los métodos de disrupción disponibles pueden ser aplicados a escala industrial, y para ser utilizados deben de cumplir lo siguiente: a) alta tasa de desintegración, por lo tanto, el tiempo de operación es un factor importante en la economía del proceso; b) bajo costo de operación y mantenimiento; y c) se debe de mantener la integridad del producto deseado. Las operaciones unitarias más comunes actualmente son la homogeneización a alta presión y la molienda con perlas. La lisis alcalina y la lisis enzimática han ganado importancia industrial para el aislamiento de ADNp, pero suelen consumir mucho tiempo y generar altos costos de energía (son más útiles a escala laboratorio) (Aires-Barros & Azevedo, 2017).

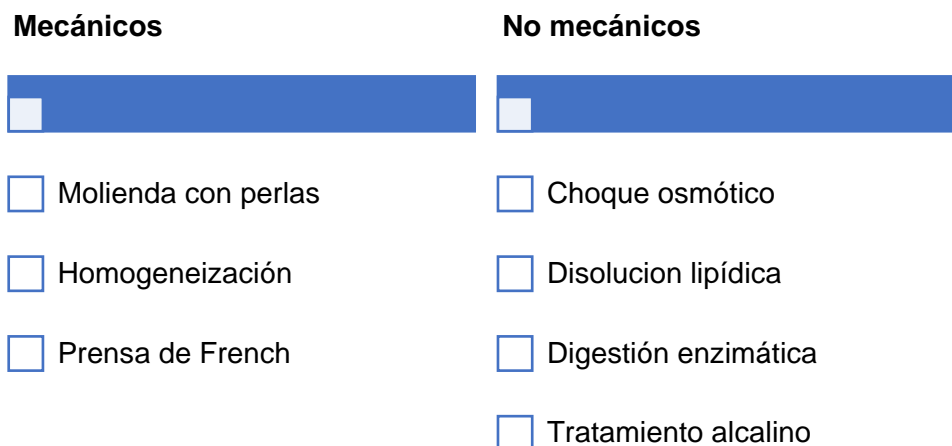


Figura 7. Métodos de rompimiento celular.

2.5.2. Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos son utilizados en el laboratorio y en operaciones a escala industrial. En el proceso, el microorganismo libera productos intracelulares a causa de la fuerza mecánica de corte. La envoltura celular se rompe físicamente liberando sus componentes en el medio circundante y el producto de interés debe separarse de la mezcla. La molienda con perlas se usó originalmente para la extracción de pigmentos de las células vegetales y la homogeneización de alta presión se adaptó originalmente en la industria de la leche. Estos dos métodos mecánicos han ganado importancia industrial para la recuperación de ADN plasmídico (Aires-Barros & Azevedo, 2017).

La desintegración celular no es una tarea fácil, por lo tanto, se debe evitar el cizallamiento y degradación del plásmido para poder alcanzar altos rendimientos. Con frecuencia se requiere de dos o tres pasos tanto en el homogeneizador como en el molino para alcanzar una desintegración celular mayor al 90% (Tejeda Mansir et al., 2011).

El funcionamiento de un homogeneizador de alta presión como Manton Gualin consiste en bombear la suspensión celular a alta presión a través de una válvula de orificio restringido, la cual se abre cuando la presión excede un valor determinado, chocando las células contra un anillo de impacto. La suspensión puede recogerse o ser de nuevo pasada a través de la válvula según sea necesario (Kumar & Awasthi, 2009; Tejeda Mansir et al., 2011).

La operación de la prensa de French es similar a la empleada con los homogeneizadores de alta presión, sin embargo, esta técnica es solo utilizada a pequeña escala. Las células pasan a través de una válvula de espacio reducido mediante una bomba a una presión alrededor de 1500 bar. Después las células pasan a través de una válvula de descarga donde la presión está cerca a la atmosférica y es ahí donde ocurre la disrupción. Una desintegración completa requiere de más pasos, pero el número de pasadas puede reducirse aumentando la presión en la operación (Show et al., 2019).

Existen diferentes diseños y tamaños de molinos de perlas y estos pueden ser operados de forma por lote o continúa. Los molinos constan fundamentalmente de una cámara horizontal o vertical para llevar a cabo el proceso de molienda. Estudios han mostrado una alta recuperación de plásmido utilizando esta técnica de rompimiento celular. La diferencia principal entre los diferentes métodos está relacionada con el tamaño de los fragmentos celulares generados y esto tiene un impacto importante en los procesamientos posteriores (Carlson et al., 1995).

2.5.3. Molienda con perlas de zirconio

La molienda con perlas resulta ser una técnica eficiente para el rompimiento de la bacteria *E. coli* y obtener una alta recuperación de plásmido intacto. Es uno de los métodos preferidos a escala industrial debido a su fácil operación y capacidad de control (Carlson et al., 1995; Haque et al., 2016).

Estos dispositivos pueden ser operados de distintas formas y las perlas utilizadas en la molienda pueden ser de diferente material, por ejemplo, pueden ser de óxido de zirconio, silicato de zirconio, vidrio, carburo de titanio, etc. Un molino de perlas operado en forma batch se utiliza cuando el volumen a la suspensión a tratar es bajo, o para realizar experimentos con la finalidad de generar datos de diseño. La operación consiste en cargar la cámara de molienda con perlas y la suspensión celular. Durante la operación se cierra la cámara y se lleva a cabo una agitación rápida el cual genera alto estrés a las células debido a la colisión, provocando la ruptura de la pared celular. El rompimiento celular en molinos de perlas operado en lote sigue una cinética de primer orden y el balance de masa de plásmido liberado puede expresarse mediante la siguiente ecuación (Tejeda Mansir et al., 2011).

$$V_M \frac{dR}{dt} = k(R_m - R)V_M \quad (1)$$

La ecuación establece que la velocidad de liberación de plásmido es proporcional al plásmido no liberado, donde:

V_M : Volumen libre del molino [L^3].

k : Constante de velocidad específica de primer orden que depende del tipo de célula, tipo y velocidad del agitador, carga y tamaño de perlas, de la concentración celular y la temperatura [t^{-1}].

R_m : Concentración máxima de plásmido obtenible [M/L^3].

R : Concentración de plásmido liberado en el tiempo [M/L^3].

t : Tiempo de operación [t].

La ecuación anterior puede ser integrada y se obtiene lo siguiente:

$$\ln\left(\frac{R_m}{R_m - R}\right) = kt \quad (2)$$

$$\frac{R_m}{R_m - R} = e^{kt} \quad (3)$$

$$R = R_m(1 - e^{-kt}) \quad (4)$$

La molienda con perlas operada en forma continua se basa en alimentar la suspensión celular a la cámara de molienda en uno de sus extremos, un agitador que consiste en una flecha giratoria sobre la que se monta un sistema de discos, barras o anillos provoca el movimiento del contenido e imparte la energía cinética a las perlas por fuerzas de adherencia en combinación con fuerzas de desplazamiento dentro de la cámara. Finalmente, el lisado es retirado de manera continua del extremo opuesto del molino. Estos molinos son utilizados a nivel industrial y a causa de la alta frecuencia de colisión es necesario el uso de una chaqueta de enfriamiento (Tabla 2). Generalmente estos equipos

alcanzan una alta eficiencia de molienda y requieren de poco mantenimiento (Tejeda Mansir et al., 2011).

Tabla 2. Parámetros operativos típicos para una molienda con perlas (Middelberg, 2012).

Parámetros	Valores típicos	Comentario
Agitado de velocidad periférica	5 – 10 <i>m/s</i>	La disrupción aumenta con la velocidad, pero luego alcanza un estado estable
Tamaño de perla	0.1 – 1.0 <i>mm</i>	Perlas de diámetro de 0.5 <i>mm</i> se considera óptimo; perlas más pequeñas tienden a flotar y perlas de mayor diámetro son ineficientes
Concentración celular	10 – 50% <i>V/V</i> de células húmedas	No afecta considerablemente la efectividad de la desintegración
Volumen de carga de perlas	70 – 90% <i>V/V</i>	80% se considera óptimo; si aumenta la carga de perlas hay mayor generación de calor
Temperatura	5 – 40 °C	Poco sensible

En el diseño de molinos continuos es necesario considerar el grado de dispersión de los tiempos de residencia de las células en el molino, ya que estos varían para las diferentes células de la suspensión. El tiempo de residencia medio \bar{t} de la distribución de tiempos de residencia es diferente al tiempo de residencia ideal t_R .

$$t_R = \frac{V_M}{F} \quad (5)$$

Donde:

t_R : Tiempo de residencia ideal [*t*].

V_M : Volumen libre del molino [L^3].

F : Flujo alimentado al molino [L^3/t].

El grado de desviación del flujo tapón ideal en molinos de perlas comerciales, ha sido simulado utilizando un modelo de “Tanques en serie perfectamente agitados” (Figura 8). Mediante el uso de este modelo los experimentos con pulso tinta permiten determinar cuántos tanques en serie perfectamente agitados equivale el grado de mezclado en un molino continuo (Tejeda Mansir et al., 2011).

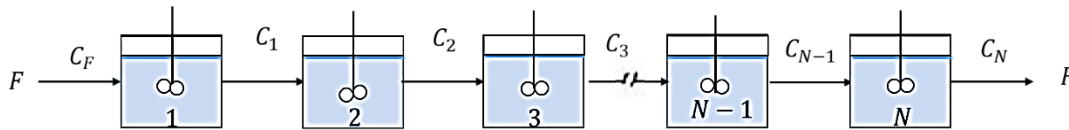


Figura 8. Representación conceptual de un molino de perlas con el modelo de Tanques en serie perfectamente agitados (Adaptado de (Tejeda-Mansir et al., 1995).

Al aplicar tinta en la primera etapa de tanques en serie perfectamente agitados, el balance de masa de tinta para cualquier etapa N se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{V_M}{N} \frac{dC_N}{dt} = F(C_{N-1} - C_N) \quad (6)$$

Donde:

N : Número de etapas.

C_N : Concentración de tinta en la etapa N [M/L^3].

Utilizando un tiempo adimensional definido por:

$$\theta = \frac{tF}{V_M} = \frac{t}{t_R} \quad (7)$$

El balance de masa puede expresarse como:

$$\frac{dC_N}{d\theta} = N(C_{N-1} - C_N) \quad (8)$$

Con las condiciones:

$$\theta < 0 \quad C_N = 0 \quad N = 1, 2, 3, \dots N$$

$$\theta = 0 \quad C_1 = NC_0$$

$$\theta > 0 \quad C_F = 0$$

Considerando que C_0 es la concentración que se obtendría por el mezclado instantáneo del pulso en todo el volumen del molino.

El balance de masa para la primera etapa se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{dC_1}{d\theta} = -NC_1 \quad (9)$$

Integrando:

$$\int_{NC_0}^{C_1} \frac{dC_1}{C_1} = -N \int_0^{\theta} d\theta \quad (10)$$

Se obtiene lo siguiente:

$$\frac{C_1}{C_0} = N \exp(-N\theta) \quad (11)$$

Siguiendo este procedimiento es posible demostrar que para la etapa N se tiene lo siguiente:

$$E(\theta) = \frac{C_N}{C_0} = \frac{N^N \theta^{N-1}}{(N-1)!} \exp(-N\theta) \quad (12)$$

Donde:

$E(\theta)$: Medida de distribución de tiempos de residencia.

El número de etapas obtenido mediante experimentos de pulso tinta puede ser empleado para calcular la eficiencia de rompimiento. De tal forma que el balance de plásmido liberado (células rotas) es el siguiente:

$$\frac{V_M}{N} \frac{dR_1}{dt} = -FR_1 + k(R_m - R_1) \frac{V_M}{N} \quad (13)$$

V_M : Volumen libre del molino [L^3].

R_1 : Concentración de plásmido liberado en la etapa 1 [M/L^3].

R_m : Concentración máxima de plásmido [M/L^3].

t : Tiempo de operación [t].

k : Constante de velocidad específica de primer orden [t^{-1}].

En función de un tiempo adimensional dado por:

$$\tau = \frac{NtF}{V_M} \quad (14)$$

Integrando, utilizando las siguientes condiciones para N etapas:

$$\tau = 0 \quad R_1 = 0$$

$$\tau = 1 \quad R_1 = R_m$$

$$\frac{R_m}{R_m - R_N} = \left(1 + \frac{kV_M}{NF}\right)^N \quad \text{ó} \quad \frac{R_m}{R_m - R_N} = \left(1 + \frac{k}{N} t_R\right)^N \quad (15)$$

2.5.4. Recuperación intermedia

La recuperación intermedia ha sido diseñada para concentrar y purificar el ADNp, generalmente se utiliza una amplia gama de técnicas durante el proceso. El punto de partida de esta etapa es un lisado complejo, es decir, con una alta concentración de ARN y

proteínas proveniente de la recuperación primaria (Prazeres & Ferreira, 2004). La precipitación utilizando el agente como el isopropanol, polietilenglicol, espermidina y bromuro de cetil trimetilamonio, es una operación unitaria que puede usarse para concentrar las moléculas de plásmidos. Las ventajas que tiene esta operación incluye la eliminación de ácidos nucleicos de bajo peso molecular y del intercambio de buffer. Después de la precipitación de ADNp se pueden eliminar una gran fracción de impurezas con una etapa de precipitación adicional (Freitas et al., 2009).

Las separaciones basadas en membranas son un método atractivo para la purificación del ADNp. La microfiltración se ha aplicado para eliminar restos celulares en lisados por método químico, es decir partículas de mayor tamaño (Nunes et al., 2012).

La ultrafiltración de flujo tangencial es una operación que emplea membranas con el propósito de eliminar proteínas, ARN, entre otros, los cuales fluyen a través de la membrana, mientras tanto la biomolécula de interés es retenida. Estudios demuestran que también se pueden separar isoformas del ADNp como lo es el circular abierto y el lineal (Borujeni & Zydney, 2012; Li et al., 2015).

2.5.5. Purificación final

El grado de un nivel de pureza alto de ADNp se logra con la cromatografía y existen diferentes modalidades para llevar a cabo este proceso, por ejemplo: cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), intercambio aniónico (AEC), interacción hidrofóbica (HIC), intercambio iónico (IC), entre otras, todas con el objetivo de separar el plásmido de otras impurezas (Diogo et al., 2005).

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos del adsorbente utilizado. Se han observado que las membranas adsorbentes presentan mejores resultados sobre las resinas para la purificación de biomoléculas grandes como el plásmido (Abdulrahman & Ghanem, 2018). Estudios han mostrado que las membranas de intercambio iónico son más eficientes al adsorber mayor masa de ADNp comparada con perlas de intercambio iónico alimentando una solución pre-purificada a partir de un lisado obtenido por tratamiento químico (Franco-Medrano et al., 2017).

Una vez que el ADNp conteniendo un gen de interés es purificado, puede ser dirigido al desarrollo de tratamientos nuevos, como métodos basados en la transferencia de genes a células del cuerpo humano para que codifiquen la síntesis de alguna proteína que, al expresarse, realiza una acción terapéutica o inmunizante. El uso de estas vacunas basadas en ADN resulta más económico, seguro y fácil de producir a gran escala que las convencionales (virales), sin embargo, se requiere ADN plasmídico de una alta calidad y cantidad (Li et al., 2012) de acuerdo con las medidas impuestas por las agencias reguladoras como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la agencia Europa de Medicamentos (EMA).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y equipos

3.1.1 Materiales

Cepa y plásmido. Para realizar la parte experimental de la presente investigación se trabajó con la cepa de *E. coli* DH5 α hospedera del plásmido pVAX1-NH36 con un tamaño de 4,000 pb. El plásmido cuenta con el gen de resistencia a la kanamicina para facilitar la identificación de las células que contienen el vector de clonación. La cepa fue proporcionada por el Dr. Jaime Ortega López, investigador del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Medio de cultivo. La fermentación se llevó a cabo en un medio enriquecido Terrific Broth (TB) compuesto por glicerol 13.00 g/L, extracto de levadura 24.00 g/L, triptona 17.14 g/L, KH₂PO₄ 2.31 g/L, K₂HPO₄ 12.54 g/L y kanamicina a una concentración de 50 μ g/mL para evitar la formación de otro organismo. Los reactivos utilizados son de grado analítico de Sigma-Aldrich.

Recuperación primaria. Para trabajar en la primera etapa del bioproceso para la producción del plásmido pVAX1-NH36 se utilizaron dos soluciones de resuspensión. La biomasa fue resuspendida en buffer TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH=8) para realizar el rompimiento de células en un molino de perlas. La solución de buffer TE + glucosa (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH=8) se utilizó para resuspender las células y llevar a cabo el tratamiento alcalino. La solución de lisis está compuesta por 0.2 mM de NaOH, SDS al 1% y una solución de neutralización concentrada con CH₃CO₂K a 3 M, ácido acético glacial y agua deionizada. Las soluciones fueron filtradas al vacío para eliminar sólidos suspendidos a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m.

Molienda con perlas. Para la etapa de rompimiento celular se realizaron estudios con perlas de zirconio de diferentes tipos, tamaños y características. Se utilizaron perlas de diámetro de 500 μm , de forma esférica uniforme entre cada una, compuestas por óxido de zirconio y sin recubrimiento (SR5). Perlas de diámetro de 200-400 μm , forma no uniforme entre cada una de ellas, compuesta por óxido de zirconio y con recubrimiento (PR) para evitar la adherencia de los componentes celulares. Perlas de diámetro de 100 μm , de forma esférica uniforme entre cada una, compuesta por óxido de zirconio y sin recubrimiento (SR1).

Análisis del ADN plasmídico. La calidad del plásmido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH=7.6), se utilizó la escalera de ADN de 1 kb Sigma-Aldrich como marcador molecular para determinar el tamaño del ADN y solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para teñir el gel.

La concentración de plásmido se determinó mediante cromatografía con una columna de interacción hidrofóbica (HIC) Source 15-PHE (Fenil-Poliestireno) de 0.46 \times 10 cm GE Healthcare®. Para llevar a cabo la operación se utilizaron tres soluciones, buffer de adsorción (Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 M, Tris-HCl 10 mM, pH=8), buffer de elución (Tris-HCl 10 mM, pH=8) y etanol al 20% para la limpieza de la columna. Todas las soluciones fueron filtradas al a través de un filtro Millipore de 0.45 μm y desgasificadas.

El análisis de isoformas del ADN plasmídico circular abierto (oc) y superenrollado (sc) se determinó mediante cromatografía utilizando un conjunto de columnas PlasmidSelect Xtra de GE Healthcare. La primera de interacción hidrofóbica HiTrap™ Sepharose HP de 5 mL, diámetro de 1.6 cm, realiza la separación de grupos y la segunda HiTrap Plasmid Select Xtra 1 mL, diámetro 0.7 cm, para la desorción selectiva de las isoformas. La primera columna fue equilibrada con una solución buffer (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, Sulfato de amonio 2.1 M, pH=7.5) y la absorbancia de ADNp fue monitoreada a 260 nm. La segunda columna fue equilibrada con buffer (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, Sulfato de amonio 2.25 M, pH=7.5) y se eluye con buffer (NaCl 2.0 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH=7.5). Los buffers fueron filtrados al vacío utilizando un filtro Millipore de 0.45 μm y desgasificadas.

3.1.2. Equipos

Cultivo celular. La preparación del inóculo y la fermentación se llevó a cabo en una incubadora (VWR 1575 Incubator shaker) en frascos de cultivo agitados (Fig. 9). Para determinar la densidad óptica del cultivo de *E. coli* se utilizó el espectrofotómetro VWR UV-6300PC a una absorbancia de longitud de 600 nm (Fig. 10).



Figura 9. Incubadora (VWR 1575 Incubator shaker).



Figura 10. Espectrofotómetro VWR UV-6300PC.

Recuperación primaria. Al terminar el cultivo se recupera la biomasa por medio de una centrífuga Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific) (Fig. 11). Para realizar la molienda celular se utilizó un molino mezclador Retsch® MM 400 (Fig. 12), en el cual se colocan dos cámaras de acero inoxidable (10 mL, 35 mL y 50 mL) en posición horizontal y mediante la agitación se mueven en forma de arco circular. También, para llevar a cabo la cinética de liberación de plásmido se utilizaron dos adaptadores para 10 tubos de 2 mL cada uno, colocando en el interior perlas de zirconio variando el tamaño de diámetro de 500 μm , 200-400 μm y 100 μm para cada estudio.



Figura 11. Centrifuga Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific).



Figura 12. Molino Retsch® MM 400.

El lisado obtenido de la molienda y del tratamiento alcalino se clarificó utilizando la centrífuga Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific).

Los geles de electroforesis se corrieron en una cámara horizontal de electroforesis (Bio-Rad), una fuente de voltaje (PowerPac™ Basic) (Fig. 13) y se utilizó el fotodocumentador UV (UVP MultiDoc-It Digital Imaging System) para fotografiar el gel (Fig. 14).



Figura 13. Cámara horizontal de electroforesis y fuente de voltaje (PowerPac™ Basic).



Figura 14. Cámara de rayos UV (UVP MultiDoc-It Digital Imaging System).

Se utilizó el equipo Äkta Purifier 10 UPC (GE Healthcare®), un auto-muestreador A-900 (GE Healthcare®) y el colector de fracciones (Fig. 15) para determinar la concentración y el análisis de isoformas (oc) y (sc) del ADN plasmídico.



Figura 15. Cromatografo Äkta Purifier 10 UPC (GE Healthcare®), un auto-muestreador A-900 (GE Healthcare).

3.2. Metodología

La presente investigación comprende el estudio de la primera etapa del bioproceso (fermentación y recuperación primaria) para la recuperación del plásmido pVAX1-NH36. La Figura 16 muestra el diagrama que representa las operaciones realizadas en el estudio.

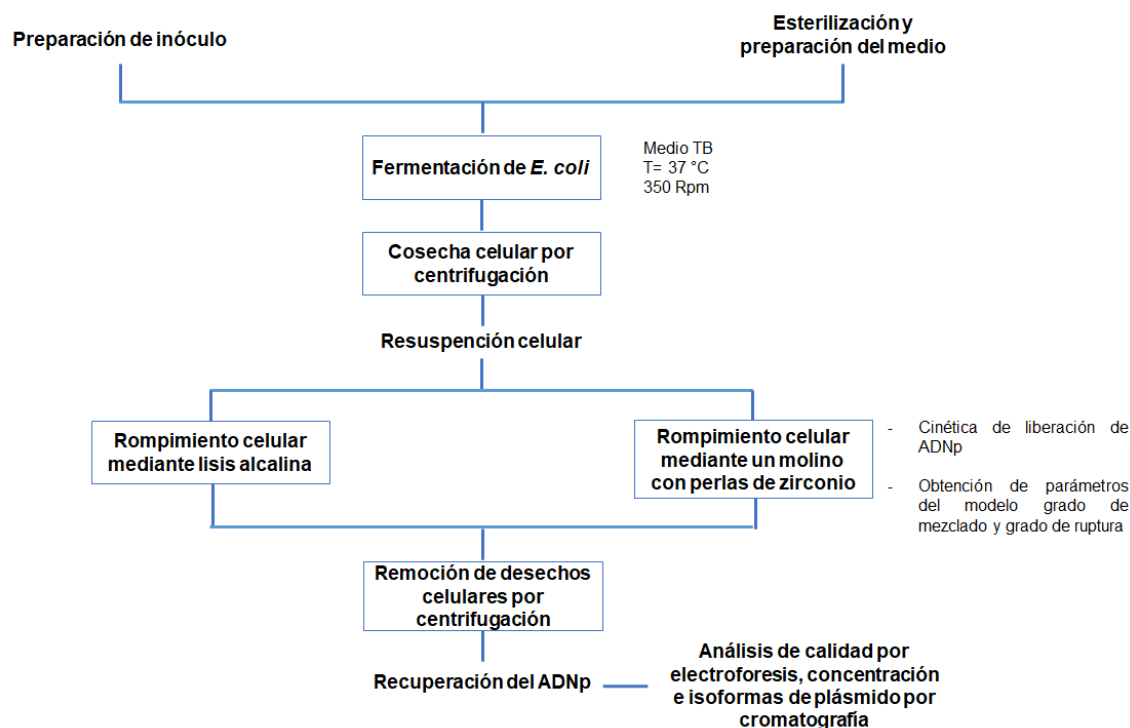


Figura 16. Esquema general de las operaciones previas y posteriores para la recuperación de plásmido.

3.2.1. Preparación de inóculos

Para la preparación de inóculos de *E. coli* DH5 α con el plásmido pVAX1-NH36 se puso en contacto con el medio enriquecido TB para contar con un banco de células. Una vez preparado el medio se coloca dentro de la autoclave, se realiza la esterilización a 121 °C por 15 min Después de llevar el proceso de esterilización, se toma el frasco para medio de cultivo y se deja reposar hasta que alcance la temperatura ambiente. A condiciones estériles se agrega kanamicina (concentración 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se añade un inóculo (de un banco

externo) y se coloca en la incubadora a 37 °C, a 350 rpm y aproximadamente 12 horas. Después de transcurrido ese tiempo, se toman alícuotas del cultivo con 20% de glicerol y se congelan a -40 °C (Fig. 17).

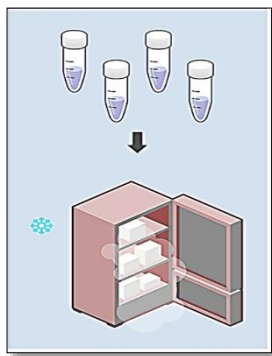


Figura 17. Banco celular, inóculos congelados a -40 °C.

3.2.2. Fermentación

La producción de las células de *E. coli* se realizó en medio TB compuesto por glicerol 13 g/L, extracto de levadura 24 g/L, triptona 17.14 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, K_2HPO_4 y se esteriliza. Posteriormente se agrega kanamicina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un medio estéril y se inocula. Se cultiva la bacteria en el medio durante 12 horas a 37 °C y a una agitación de 350 rpm.

Para la propagación de la biomasa se hace una transferencia a un frasco de cultivo de 500 mL con 75 mL de medio TB estéril y kanamicina. Por consiguiente, se inocula el medio y se incuba a las condiciones ya antes mencionadas durante 12 horas (Fig. 18). Finalmente se mide su densidad óptica (DO) a 600 nm.

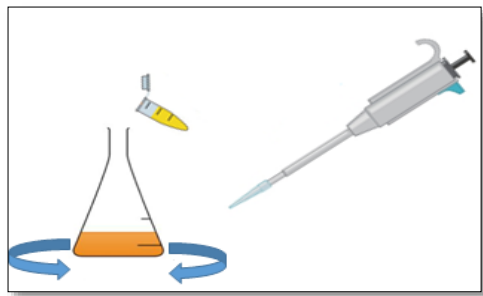


Figura 18. Fermentación de la bacteria *E. coli*.

3.2.3. Recuperación primaria

Cosecha celular. Finalizando la etapa de la fermentación el primer paso de la ruta de bioseparación consiste en la recuperación de las células por centrifugación. Tubos estériles para centrifuga de alta velocidad son pesados vacíos, después el caldo concentrado se envía a los tubos, se distribuye en proporciones de igual volumen y se lleva a cabo la centrifugación a 6500 rpm, durante 15 minutos y a una temperatura de 4 °C. Se remueve el líquido, se cosecha la biomasa y se pesan los tubos con el pellet para conocer los gramos de células húmedas recuperadas.

Resuspensión celular. La biomasa cosechada se resuspende en buffer según sea el método de rompimiento que se opere para el estudio comparativo de estas dos técnicas de rompimiento celular.

Rompimiento celular mediante lisis alcalina. Las células se resuspenden en buffer TE + glucosa (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH=8) hasta conseguir una concentración de 8 mL/g cel. hum. y se mezcla en un vortex hasta obtener una mezcla homogénea. A las células resuspendidas se les agrega solución de lisis (8 mL/g cel. hum) y se mezcla de manera suave hasta que la mezcla se vuelva viscosa y se deja reposar durante 10 minutos. Posteriormente los desechos celulares precipitan al agregar solución de neutralización (8 mL/g cel. hum), el tubo se agita suavemente y se deja enfriar en hielo durante 10 minutos (Fig. 19).

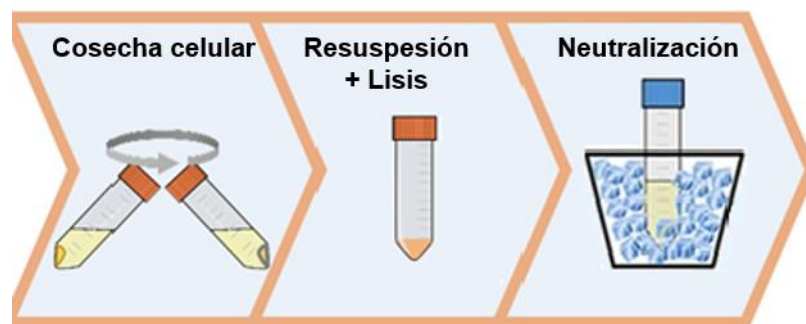


Figura 19. Rompimiento celular por tratamiento alcalino.

Remoción de desechos celulares. Una vez que las células se rompen y liberan su contenido intracelular, los desechos celulares son eliminados por medio de la operación de centrifugación a 13,000 g, durante 30 minutos y a una temperatura de 4 °C. Se recupera la fase líquida, se desechan los restos celulares y se realiza de nuevo la operación de centrifugación a las mismas condiciones. Para eliminar partículas más pequeñas, el líquido se filtra a través de un microfiltro de diámetro de 0.45 μm .

Rompimiento celular mediante un molino con perlas de zirconio. La biomasa cosechada se resuspende en buffer TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH=8) para obtener una concentración celular de 20 g cel. hum/L y se mezcla hasta que queden las células completamente distribuidas en el líquido.

- Molienda en lote. Se llevaron a cabo tres estudios con diferentes tipos de perlas para la cinética de liberación de plásmido mediante una molienda (Tabla 3). El rompimiento se realiza en un molino en lote Retsch MM 400 a una velocidad de agitación de 30 Hz, utilizando dos adaptadores para 10 tubos de 2 mL cada uno y colocando en el interior 1 mL de suspensión celular más perlas (relación [1:2] de perlas y células). Para el estudio 1 la operación de molienda trabajó con perlas de zirconio sin recubrimiento y con un diámetro de 500 μm (SR5). En el estudio 2 se realizó la operación de molienda utilizando perlas con recubrimiento y de diámetro de 200-400 μm (PR). Finalmente, para el estudio 3 se utilizaron perlas sin recubrimiento y con un diámetro de 100 μm (SR1). Se toman muestras a diferentes tiempos para determinar la concentración del ADN plasmídico liberado durante el tiempo de rompimiento.

Remoción de desechos celulares. La centrifugación a 14,000 g, a temperatura de 4 °C y durante 20 minutos es empleada para la remoción de los desechos celulares.

Tabla 3. Parámetros de los estudios de molienda en lote.

Estudio	Tamaño de perla (µm)	Característica de la perla	Concentración celular (g/L)	Relación Perla/solución celular	Velocidad de agitación (Hz)
1	500 (SR5)	Sin recubrimiento			
2	200-400 (PR)	Con recubrimiento	20	[1:2]	30
3	100 (SR1)	Sin recubrimiento			

3.2.4. Análisis de muestras

Una vez recuperado el ADNp mediante los métodos (mecánico y no mecánico) se analizan las muestras por electroforesis para conocer la calidad del plásmido, y por cromatografía para medir concentración de la biomolécula.

Electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de lisados fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH=7.6), se aplica calor hasta que la mezcla quede completamente disuelta, se coloca en la cámara de electroforesis y se llena la cámara con buffer TAE hasta un nivel donde cubra el gel.

Cada muestra se preparó agregando 15 µL de lisado y 3 µL de colorante (6X TrackIt™ Cyan/Yellow). Las muestras se cargan y dentro del primer pozo se deposita el marcador molecular (DNA Ladder 1 kb Sigma-Aldrich). Se aplica energía eléctrica a la cámara (50 volts durante 110 minutos), enseguida el gel se sumerge en bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 30 minutos y finalmente el gel se sumerge en agua deionizada para ser colocado en el fotodocumentador (UVP MultiDoc-It).

Concentración de plásmido. Las muestras se analizaron por cromatografía en una columna de interacción hidrofóbica de 0.46x10 cm (HIC Source 15 PHE), de acuerdo a la metodología desarrollada por Diogo (M. Diogo et al., 2003). La columna se conecta al sistema Äkta Purifier y se equilibra con buffer de adsorción (Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 M, Tris-HCl 10 mM, pH=8). Por medio del auto-muestreador se inyecta 30 μL de muestra (diluida en buffer de adsorción a una relación 1:5) y después se eluye con el mismo buffer durante 1.4 minutos a 1 mL/min. El primer pico (0.68 minutos) corresponde al ADN plasmídico (ADNp y sus isoformas), especie no adsorbida en la columna. Las especies adsorbidas son eluidas de la columna con buffer de elución (Tris-HCl 10 mM, pH=8) durante 1.0 minuto. Al finalizar la elución, la columna es de nuevo equilibrada con sulfato de amonio (buffer de elución) durante 5.5 minutos para continuar analizando las muestras.

El segundo, tercero y cuarto pico del cromatograma se atribuye a las impurezas presentes en solución de lisis. El pico a los 3.58 minutos corresponde al ADNg y ARN de alto peso molecular, el pico a los 1.28 minutos y 1.75 corresponden al ARN de bajo peso molecular y proteínas remanentes. Estas especies son adsorbidas debido a que son más hidrofóbica.

La concentración de plásmido en cada muestra se determinó mediante una curva de calibración construida a partir de muestras de pVAX1-NH36 purificadas por un kit comercial, para obtener estándares de ADNp de concentraciones conocidas. Las muestras se inyectaron a la columna utilizando el procedimiento ya anteriormente mencionado. Se obtuvo una correlación lineal entre el área del pico y la concentración de plásmido (Anexo A).

Isoformas del plásmido. Se realizó el análisis de las isoformas (circular abierta (oc) y superenrollado (sc)) de lisados obtenidos de la molienda. Se desarrolló la metodología de Bennemo (Bennemo et al., 2009), que consiste en equilibrar la columna HiTrap™ Sepharose HP 5 mL, con buffer (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, Sulfato de amonio 2.1 M, pH=7.5) con flujo de 2 mL/min antes de inyectar la muestra, posteriormente se inyecta 2 mL de muestra por medio de un loop de 1 mL. Se recolecta la muestra del primer pico conteniendo ADNp.

La muestra recolectada de la primer columna se acondiciona hasta 3 M con sulfato de amonio antes de inyectarse a la segunda columna HiTrap Plasmid Select Xtra 1 mL y

permitir la unión a la resina. Una vez colocada la segunda columna al equipo, se equilibra con 6 volúmenes de columna (CV) de buffer (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, Sulfato de amonio 2.25 M, pH=7.5) con un flujo de 0.385 mL/min y se inyecta 2 mL de muestra acondicionada mediante el loop de 1 mL. El ADNp se separa en sus dos isoformas mediante la elución con un gradiente lineal de 0 a 55% de buffer NaCl 2.0 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl, pH=7.5 a un flujo de 0.385 mL/min. El plásmido circular abierto eluye primero (primer pico), seguido del superenrollado, finalmente, la columna es lavada con agua durante cada corrida (Bennemo et al., 2009).

3.2.5. Cinética de liberación de plásmido

Con los datos de concentración de ADNp a diferentes tiempos es posible determinar los parámetros de la cinética de liberación utilizando el modelo (Ec. 4).

$$R = R_m(1 - e^{-kt}) \quad (4)$$

Donde:

R : Concentración de plásmido liberado a tiempo t [μg ADNp/g cel.hum.]

k : Constante de velocidad específica de primer orden [min^{-1}]

R_m : Concentración máxima de plásmido obtenible [μg ADNp/g cel.hum.]

Con los datos obtenidos de concentración de plásmido por duplicado, se determinó un promedio, la desviación estándar y mediante regresión no lineal (función *nlinfit* de MATLAB) se calculó la constante de velocidad específica de primer orden (k) y la concentración máxima de plásmido (R_m). También se determinó el coeficiente de correlación r^2 .

3.2.6. Modelo de “Tanques en serie perfectamente agitados”.

A partir de datos de diseño de un molino continuo como lo es el volumen libre del molino y el tiempo de residencia fueron obtenidos de la literatura y fue calculado el flujo de alimentación.

Se utilizaron tres tanques de diferente volumen, de 10 mL, 35 mL y 50 mL, cada uno con duplicado. Se calculó el volumen libre de cada etapa (volumen de reacción), el número de etapa, el tiempo de residencia y se realizó una molienda para cada volumen de reacción y tiempo de residencia, utilizando perlas de diámetro de 200-400 μm , una relación perlas/células [1:2] y una concentración celular de 20 g/L. Al final se determinó la concentración de plásmido (R) liberado en el tiempo de operación.

De la cinética de liberación de ADNp utilizando perlas de diámetro de 200-400 μm se conoce la concentración máxima de ADNp (R_m), se determina la constante de velocidad específica grafica (k) por medio de la gráfica $\text{Ln} [R_m / R_m - R]$ con respecto a t (Ec. 2). Finalmente se comparó el cálculo para el modelo de un molino operado en lote (Ec. 3) y el modelo de un molino continuo (Ec. 15) para determinar si el número de tanques perfectamente agitados en serie equivale al grado de mezclado de un molino de perlas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados de la presente investigación que se encuentra dentro de la primera etapa del bioproceso para la producción de ADNp pVAX1-NH36.

4.1. Fermentación de la bacteria

El tener el conocimiento del crecimiento celular de la bacteria *E. coli*, es útil para determinar el tiempo necesario para llevar a cabo la fermentación, obtener una mayor concentración de biomasa y llevar a cabo la recuperación primaria. La operación se efectuó en matraces agitados con medio TB a una velocidad de agitación de 350 rpm y a una temperatura de 37 °C. Durante el proceso de la fermentación se tomaron muestras del cultivo cada hora y se midió su densidad óptica (OD_{600nm}).

La Figura 20 muestra los datos experimentales de la curva de crecimiento y el modelo logístico utilizado para el cálculo de parámetros (Ec. 16) (Shuler, 2017) del promedio de los datos experimentales obtenidos por duplicado, utilizando la función *nlinfit* de MATLAB. Se observa la fase de adaptación, la fase exponencial y la fase estacionaria. Se obtuvieron los parámetros del modelo Logístico, el coeficiente de capacidad de carga $c = 0.72 \text{ h}^{-1}$ y la concentración máxima $X_{\infty} = 14$. La velocidad específica μ se determinó mediante la Ec.17 (Shuler, 2017). Este último parámetro va a cambiar hasta llegar a un mínimo en la fase estacionaria. En la fase de adaptación la velocidad específica es constante y después comienza a variar hasta llegar a un mínimo.

$$X = \frac{x_0 e^{ct}}{1 - \frac{x_0}{x_{\infty}} (1 - e^{ct})} \quad (16)$$

$$\mu = c \left(1 - \frac{X}{X_{\infty}} \right) \quad (17)$$

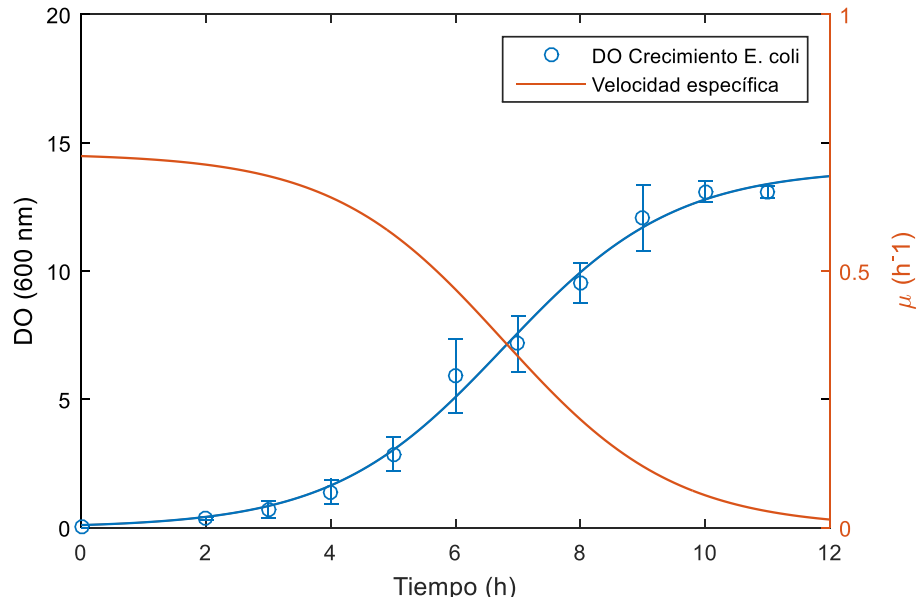


Figura 20. Curva de crecimiento de *E. coli*.

4.2. Recuperación primaria

Se cosecharon las células por centrifugación y se resuspenden en buffer TE dependiendo del método de rompimiento. Se realizaron tres estudios de la molienda con perlas para conocer la cinética de liberación de plásmido (Tabla 3) y se realizó la molienda en tres tanques de diferente volumen para determinar las etapas necesarias equivalente a la operación de un molino continuo.

4.2.1. Estudio 1

El estudio 1 se llevó a cabo utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento con diámetro de 500 μm (SR5), una concentración celular de 20 g/L y una velocidad de agitación de 30 Hz.

Se tomaron muestras cada 30 segundos hasta alcanzar 11 minutos de molienda. De las muestras se remueven restos celulares más perlas por medio de una centrifuga a 14,000 g, durante 20 minutos y a una temperatura de 4°C.

La Figura 21 muestra el análisis electroforético de los lisados clarificados obtenidos de la molienda a diferentes tiempos, al igual que la muestra del lisado alcalino. Se observa en el carril 1 el marcador molecular, y en los carriles del 2 al 11 muestras de lisado mecánico tomadas a diferentes tiempos del proceso. Se puede apreciar que al aumentar el tiempo de operación en la molienda va incrementando la intensidad de las bandas, lo que indica la presencia del ADN plasmídico en su forma circular abierto (oc) y superenrollado (sc), este último en mayor proporción, también se localiza la presencia de ADN genómico. El carril 12 contiene la muestra de un lisado alcalino, con el fin de comparar el método mecánico con el no mecánico, puede observarse que no se encuentra la presencia del ADN genómico, pero si la del ADN plasmídico y el ARN. La molienda con perlas libera el ARN que se encuentra dentro de los ribosomas, sin embargo, el tratamiento alcalino muestra mayor relación, el cual es una de las impurezas difíciles de desechar en la purificación de plásmido. En los carriles 14 al 19 aparecen duplicados del estudio 1.

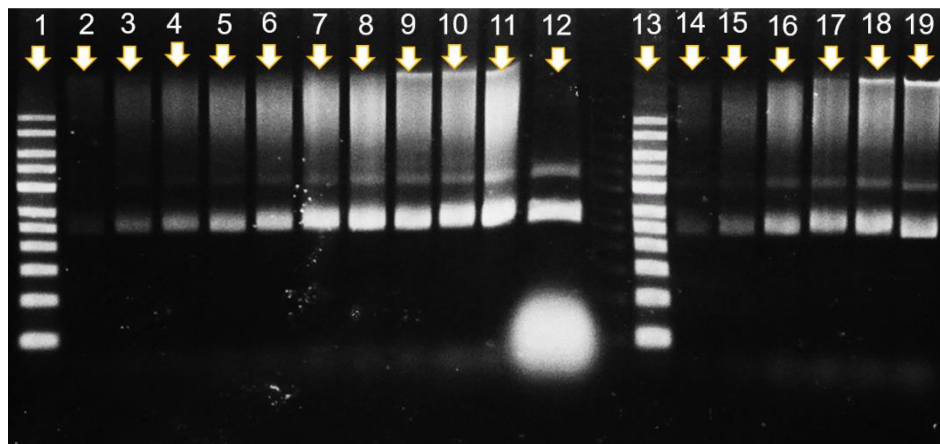


Figura 21. Estudio 1: Análisis Electroforético de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 500 μm . Carril 1) Ladder (DNA Ladder, Sigma Aldrich). Carril 2) 0.5min. Carril 3) 1 min. Carril 4) 1.5 min. Carril 5) 2 min. Carril 6) 3 min. Carril 7) 4 min. Carril 8) 5.5 min. Carril 9) 7 min. Carril 10) 9 min. Carril 11) 11 min. Carril 12) Lisis alcalina. Carril 13) Ladder. Carril 14) Duplicado 0.5 min. Carril 15) Dup. 1.5 min. Carril 16) Dup. 4 min. Carril 17) Dup. 7 min. Carril 18) Dup. 9 min. Carril 19) Dup. 11 min.

Con el análisis cromatográfico se determina la concentración de plásmido liberado durante la molienda, de acuerdo a la técnica desarrollada por (Diogo et al., 2003), las unidades son $\mu\text{g ADNp/mL}$. Esta cantidad se multiplica por el volumen de muestra y se divide por la masa de células procesadas para expresar la concentración en $\mu\text{g ADNp/ g cel.hum.}$ (microgramos de ADN plasmídico por gramo de célula húmeda).

La Figura 22 muestra la cinética de liberación de plásmido durante el proceso de molienda. El modelo (Ec. 4) se ajustó a los datos experimentales mediante la función *nlinfit* de MATLAB y se calcularon los parámetros, obteniendo una concentración máxima de plásmido de $2678.8 \mu\text{g ADNp/ g cel. hum.}$ (R_m) a un tiempo mayor de 20 minutos y la constante de velocidad específica de primer orden de 0.1034 min^{-1} (k) (Tabla 4). Se observa que la concentración de ADNp aumenta conforme avanza el tiempo y el modelo tiene un buen ajuste a los datos experimentales ($r^2= 0.9976$). Mediante la lisis alcalina se obtuvo una concentración de plásmido de $499.50 \mu\text{g ADNp/ g. cel. hum.}$

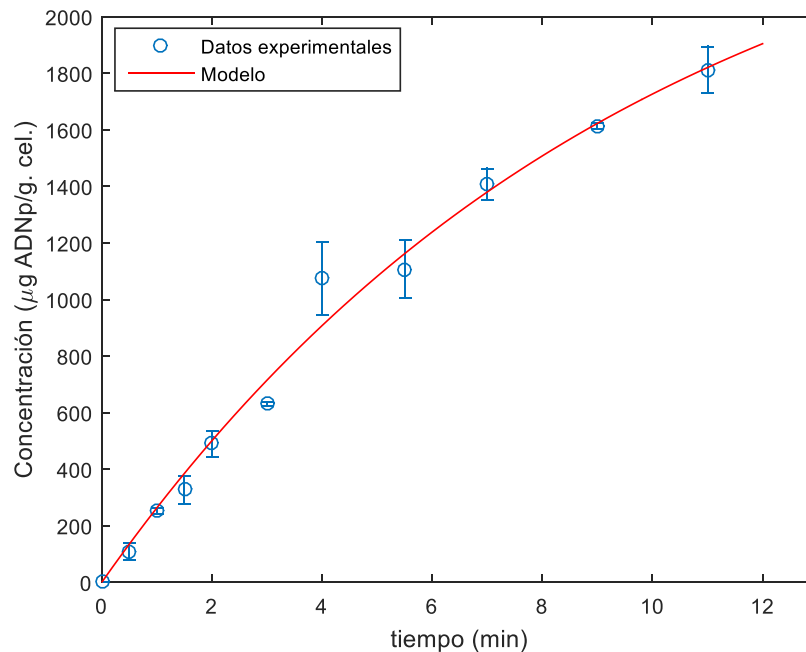


Figura 22. Estudio 1: Cinética de liberación de ADNp de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de $500 \mu\text{m}$.

Tabla 4. Parámetros de la cinética de liberación de plásmido.

	Perlas SR5	Perlas PR	Perlas SR1
$R_m \left(\frac{\mu\text{g ADNp}}{\text{g cel.hum.}} \right)$	2678.8	2378.7	2745.2
$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0.1034	0.2531	1.6001
r^2	0.9892	0.9943	0.9895
$D_p \text{ (}\mu\text{m)}$	500	200 - 400	100

La Figura 23 representa el análisis cromatográfico (HIC) de un lisado obtenido mediante la molienda utilizando perlas de diámetro de 500 μm (SR5) a un tiempo de agitación de 11 minutos y de un lisado alcalino. La masa celular que se procesó mediante la lisis alcalina fue el doble de la masa celular tratada por el método mecánico, por esta razón el cromatograma del lisado mecánico se multiplicó por un factor de 2, con la finalidad de comparar estas dos técnicas de rompimiento celular. Se puede observar que se alcanza mayor concentración del ADNp por el tratamiento mecánico con respecto al lisado alcalino y esto se ve representado en el primer pico. El segundo y tercer pico muestra la presencia de impurezas, las cuales se presentan en mayor cantidad en el método mecánico, sin embargo, el cuarto pico que corresponde al ARN de alto peso molecular la presencia de este es muy pequeña comparado con la lisis alcalina.

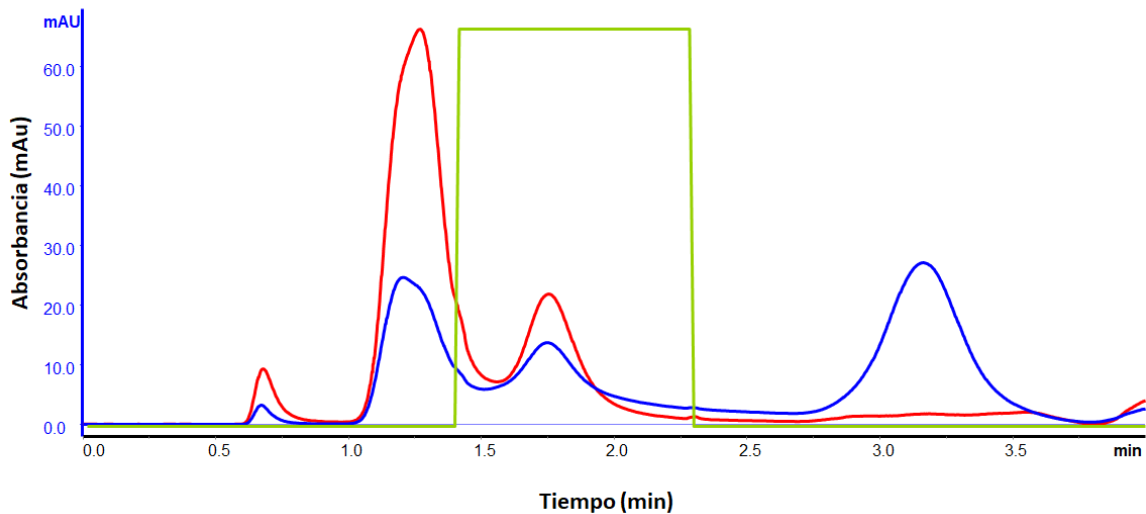


Figura 23. Análisis cromatográfico: (-) Lisado mediante molienda con perlas. (-) Lisado mediante tratamiento alcalino.

4.2.2. Estudio 2

El estudio 2 se efectuó utilizando perlas de zirconio con recubrimiento y de diámetro de 200-400 μm (PR), una concentración celular de 20 g/L y una velocidad de agitación de 30 Hz. Se tomaron muestras cada 30 segundos hasta alcanzar 11 minutos de molienda y se clarifico el lisado por centrifugación a 14,000 g durante 20 minutos y a una temperatura de 4 °C.

La Figura 24 muestra el análisis electroforético de los lisados clarificados obtenidos de la molienda a diferentes tiempos y la muestra de un lisado alcalino. Se observa en el carril 1 el marcador molecular, y en los carriles del 2 al 11 muestras del lisado mecánico tomadas a diferentes tiempos del proceso. Se aprecia que al aumentar el tiempo de operación de molienda incrementa la intensidad de las bandas, indicando la presencia de ADN plasmídico (sc) y (oc), este último en menor proporción y también aparece ADN genómico. El carril 12 contiene la muestra de un lisado alcalino para comparar los dos métodos de rompimiento celular y se aprecia que no se encuentra la presencia de ADN_g debido a la desnaturalización y precipitación de la molécula, pero si la del ADN_p y ARN. En los carriles 14 al 20 aparecen duplicados del estudio 2.

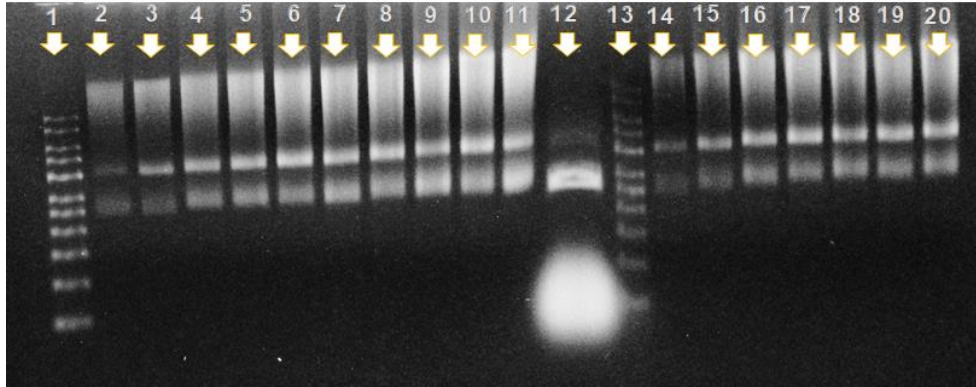


Figura 24. Figura 2. Estudio 2: Análisis Electroforético de la molienda utilizando perlas de zirconio con recubrimiento de diámetro de 200-400 μm . Carril 1) Ladder (DNA Ladder, Sigma Aldrich). Carril 2) 0.5min. Carril 3) 1 min. Carril 4) 1.5 min. Carril 5) 2 min. Carril 6) 3 min. Carril 7) 4 min. Carril 8) 5.5 min. Carril 9) 7 min. Carril 10) 9 min. Carril 11) 11 min. Carril 12) Lisis alcalina. Carril 13) Ladder. Carril 14) Duplicado 0.5 min. Carril 15) Dup. 1.5 min. Carril 16) Dup. 4 min. Carril 17) Dup. 5.5 min. Carril 18) Dup. 7 min. Carril 19) Dup. 9 min. Carril 20) Dup. 11 min.

Para determinar la concentración de plásmido se siguió el mismo procedimiento del estudio 1.

La Figura 25 muestra la cinética de liberación de plásmido durante el proceso de molienda del estudio 2. El modelo (Ec. 2) se ajustó a los datos experimentales utilizando la función *nlinfit* de MATLAB y se determinó los distintos parámetros (Tabla 4), obteniendo una concentración máxima de 2378.7 $\mu\text{g ADNp/g cel.hum}$. (R_m) a un tiempo de 14 minutos y la constante de velocidad específica de primer orden de 0.2531 min^{-1} (k). Podemos observar que el modelo tiene buen ajuste a los datos experimentales dándonos una $r^2= 0.9943$. Mediante la lisis alcalina se obtuvo una concentración de plásmido de 499.50 $\mu\text{g ADNp/g cel.hum}$.

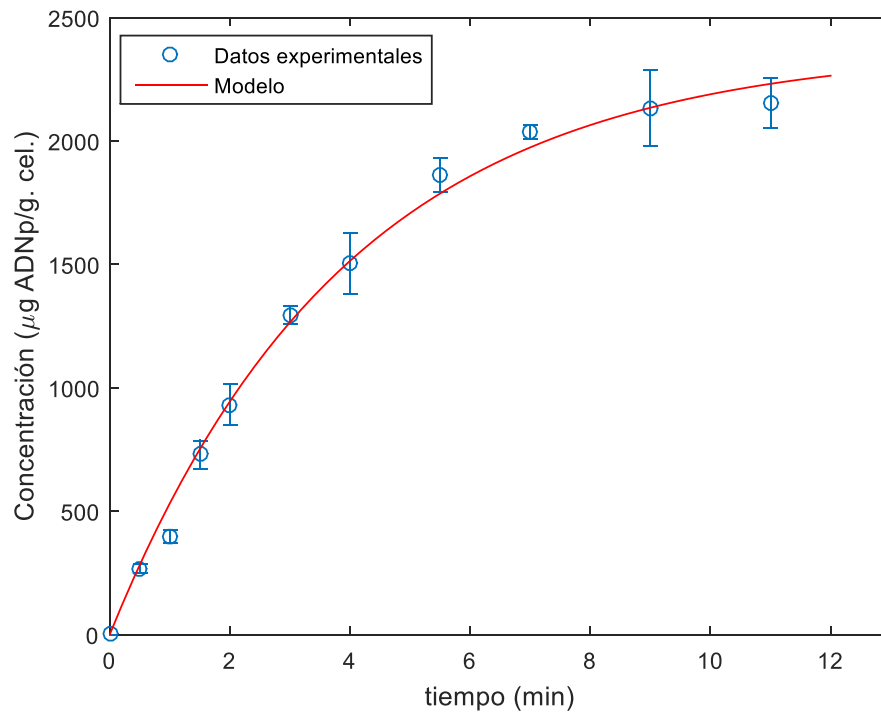


Figura 25. Estudio 2: Cinética de liberación de ADNp de la molienda utilizando perlas de zirconio con recubrimiento de diámetro de 200-400 μm .

En la Figura 26 se muestra el análisis cromatográfico (HIC) de un lisado obtenido mediante la molienda utilizando perlas de diámetro de 200- 400 μm (PR) a un tiempo de agitación de 11 minutos y el lisado recuperado mediante el tratamiento alcalino. La masa que se procesó mediante el tratamiento químico fue el doble de masa celular tratada por el método mecánico, debido a esto, el cromatograma del lisado mecánico se multiplicó por un factor de 2, con la finalidad de comparar estas dos técnicas para llevar a cabo la recuperación primaria. Se alcanza mayor concentración del ADNp al llevar a cabo la molienda con respecto al obtenido en el tratamiento alcalino, esto se ve representado en el primer pico. El segundo y tercer pico representan impurezas las cuales se encuentran en mayor proporción con respecto al tratamiento químico de rompimiento celular, sin embargo, el cuarto pico que corresponde al ARN de alto peso molecular, su concentración es muy pequeña con respecto a la lisis alcalina.

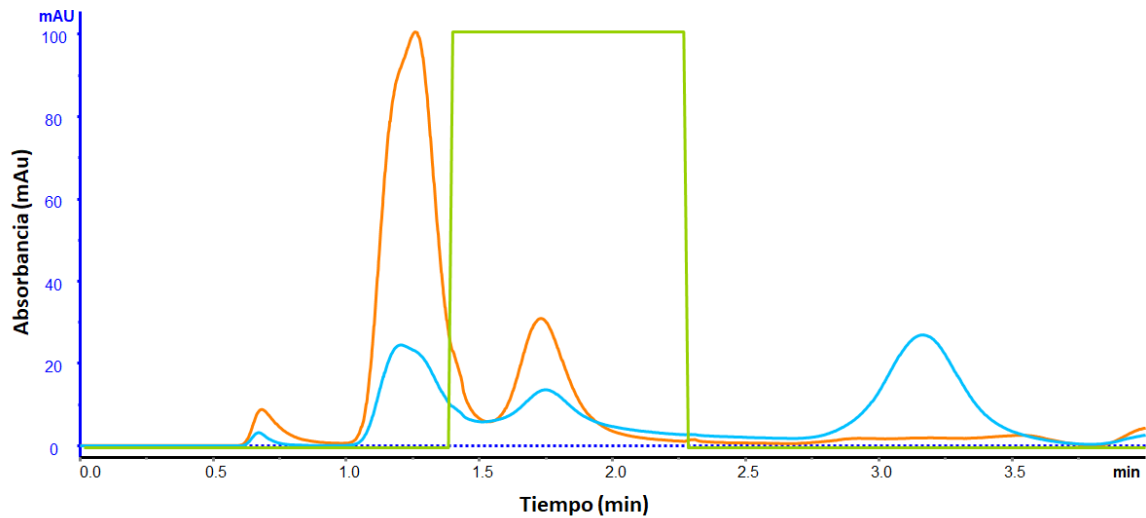


Figura 26. Análisis cromatográfico: (-) Lisado mediante molienda con perlas. (-) Lisado mediante tratamiento alcalino.

4.2.3. Estudio 3

El estudio 3 se realizó utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento y con diámetro de 100 μm (SR1), una concentración celular de 20 g/L, una velocidad de agitación de 30 Hz y se tomaron muestras cada 30 segundos hasta alcanzar 11 minutos de molienda. El lisado se clarifica mediante una centrifugación a 14,000 g, durante 20 minutos y a 4 °C.

La Figura 27 muestra el análisis electroforético de los lisados clarificados obtenidas del estudio 3 y la muestra obtenida mediante un tratamiento alcalino. Se observa en el carril 1 el marcador molecular, y en los carriles del 2 al 11 muestras de lisado mecánico tomadas a diferentes tiempos del proceso. Se puede observar que al aumentar el tiempo de operación de molienda va incrementando la intensidad de las bandas en un periodo de tiempo muy corto, lo que indica la presencia de ADNp (oc) en mayor cantidad con respecto al ADNp (sc), este último aumenta su proporción al final de la operación y también se encuentra la presencia de ADNg. En el carril 12 se encuentra la muestra del lisado alcalino, como análisis comparativo entre estos dos métodos de rompimiento celular y se aprecia que no se encuentra la presencia de ADNg pero si la del ADNp y ARN. En los carriles al 14 al 20 se encuentran duplicados de las muestras del estudio 3.

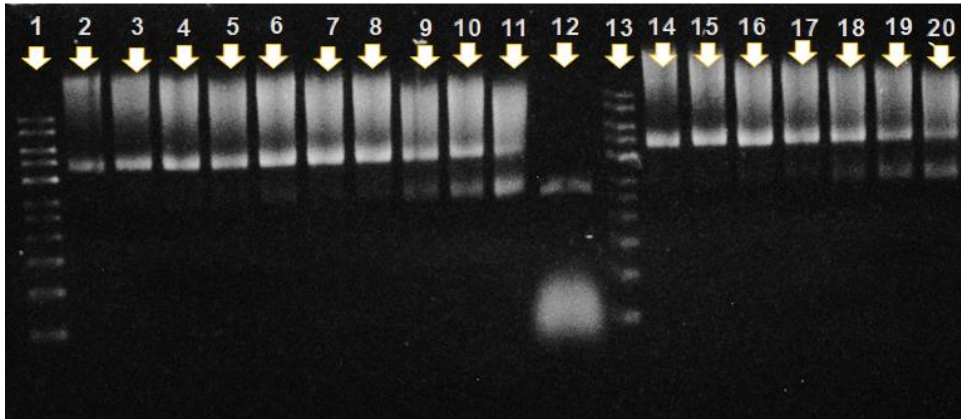


Figura 27. Estudio 3: Análisis Electroforético de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 100 μm . Carril 1) Ladder (DNA Ladder, Sigma Aldrich). Carril 2) 0.5min. Carril 3) 1 min. Carril 4) 1.5 min. Carril 5) 2 min. Carril 6) 3 min. Carril 7) 4 min. Carril 8) 5.5 min. Carril 9) 7 min. Carril 10) 9 min. Carril 11) 11 min. Carril 12) Lisis alcalina. Carril 13) Ladder. Carril 14) Duplicado 0.5 min. Carril 15) Dup. 1.5 min. Carril 16) Dup. 4 min. Carril 17) Dup. 5.5 min. Carril 18) Dup. 7 min. Carril 19) Dup. 9 min. Carril 20) Dup. 11 min.

La Figura 28 muestra la cinética de liberación de plásmido durante el proceso de molienda del estudio 3. El modelo (Ec. 2) es empleado para el ajuste de los datos experimentales, utilizando la función *nlinfit* de MATLAB. Mediante el ajuste se obtienen los parámetros de concentración máxima de plásmido de 2745.2 $\mu\text{g ADNp/g cel.hum.}$ (R_m) y la constante de velocidad específica de primer orden de 1.6001 min^{-1} (k), datos mostrados en la Tabla 4. Se puede observar que la liberación de plásmido se efectúa en un periodo de tiempo muy corto, es decir, antes de los 2 minutos se alcanza una concentración de ADNp muy cercana a la concentración máxima de plásmido liberado. El modelo tiene un buen ajuste a los datos experimentales obteniendo una $r^2 = 0.9895$. Mediante la lisis alcalina se obtuvo una concentración de plásmido de 499.50 $\mu\text{g ADNp/g cel.hum.}$

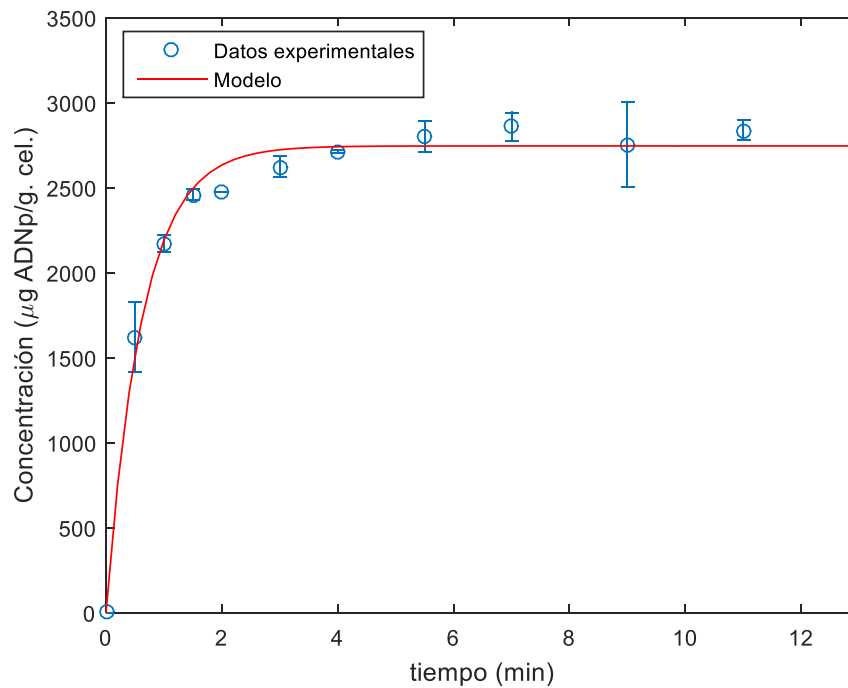


Figura 28. Estudio 3: Cinética de liberación de ADNp de la molienda utilizando perlas de zirconio sin recubrimiento de diámetro de 100 μm .

La Figura 29 muestra el análisis cromatográfico (HIC) de una muestra recuperada mediante la molienda utilizando perlas de diámetro de 100 μm (SR1) a un tiempo de agitación de 11 minutos y también se observa la muestra recuperada mediante la lisis alcalina. La masa celular procesada en la lisis alcalina fue el doble que la masa celular tratada por el método mecánico, por esta razón el cromatograma del lisado recuperado de la molienda se multiplicó por un factor de 2, con la finalidad de comparar estas dos técnicas de rompimiento celular. La concentración del ADNp, correspondiente al primer pico, es mayor en el tratamiento mecánico con respecto a la lisis alcalina. El segundo y tercer pico representan las impurezas presentes en el lisado, las cuales se encuentran en mayor proporción con respecto al método químico, sin embargo, el cuarto pico representa el ARN de alto peso molecular, en donde la concentración es pequeña comparado con el método químico.

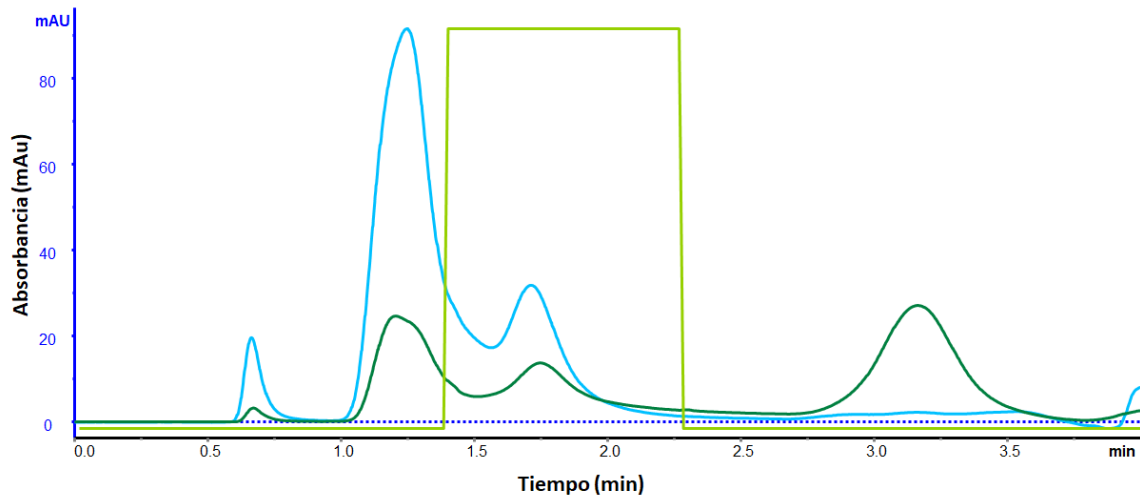


Figura 29. Análisis cromatográfico: (-) Lisado mediante molienda con perlas. (-) Lisado mediante tratamiento alcalino.

4.3. Diseño de un molino continuo

El escalamiento para el diseño de un molino continuo se desarrolló basándose de la literatura donde utilizaron un molino operado en modo continuo (Veide et al., 1984) y de datos de diseño de un equipo DYNO®- MILL, se tomaron los parámetros tiempo de residencia ($t_R = 5$ min), volumen libre del molino ($V_M = 0.05$ L) y se calculó el flujo ($F = 0.01$ L/min).

La molienda se llevó a cabo utilizando perlas de zirconio con recubrimiento y de diámetro de 200-400 μm (PR) en tanques de diferente volumen (10 mL, 35 mL y 50 mL) cada uno por duplicado. Para conocer el volumen libre de cada tanque (volumen de reacción V_R), se colocó en el interior de la cámara perlas más la suspensión celular a una relación [1:2] y se calculó el número de etapa ($N = V_M / V_R$) y el tiempo de residencia de la etapa ($t_{Re} = N / t_R$) para cada tanque. La molienda se realizó con una concentración celular de 20 g/L, una velocidad de agitación de 30 Hz y se determinó la concentración de plásmido liberado durante la operación (Tabla 5) mediante el análisis de cromatografía, esta cantidad se multiplica por el volumen de muestra y se divide por la masa de células procesadas para

obtener $\mu\text{g ADNp/g cel.hum.}$ Las muestras se analizan por duplicado y se calcula un promedio.

Tabla 5. Datos de tanques en serie perfectamente agitados.

V_M (mL)	V_R (L)	N	t_{Re} (min)	Concentración (R) ($\mu\text{g ADNp/ g. cel. hum.}$)	Concentración promedio (R) ($\mu\text{g ADNp/ g. cel. hum.}$)
2	0.0015	33	0.15	88.614	88.614
10	0.006	8	0.6	286.844 281.443	284.144
35	0.016	3	1.6	1211.613 1197.145	1204.379
50	0.021	2	2.1	1468.364 1491.705	1480.035

La Figura 30 muestra el análisis electroforético de los lisados clarificados obtenidos de la molienda en los tres diferentes tanques. Se observa en el carril 1 el marcador molecular, en los carriles del 2 y 3 se encuentra la muestra del lisado recuperado en un tanque de 10 mL y el duplicado, se observa la presencia de ADNg y ADNp, pero la banda está más intensa en la isoforma oc, esto puede atribuirse a que el tiempo de molienda en el estudio es muy corto (0.6 min). El carril 4 y 5 representa la molienda en el tanque de 35 mL y el duplicado, en un periodo de tiempo de 1.6 min y se identifica la presencia de ADNg y plásmido en proporciones iguales en su isoforma oc y sc. El carril 6 y 7 corresponde a la molienda en el tanque de 50 mL y el duplicado, se aprecia la presencia del ADNg, plásmido en su isoforma sc en mayor proporción y ADNp oc en menor proporción, a un tiempo de molienda de 2.1 min. Finalmente, en el carril 8 se encuentra la muestra de un purificado obtenido mediante un kit.

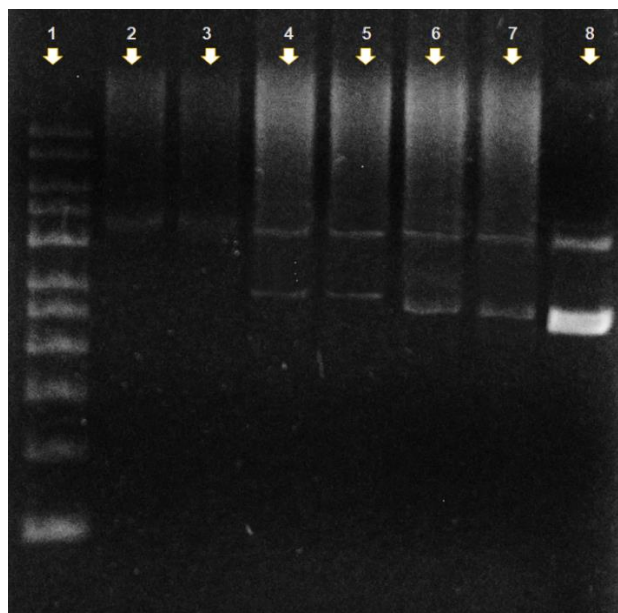


Figura 30. Análisis Electroforético de la molienda en tanques utilizando perlas de zirconio con recubrimiento de diámetro de 200-400 μm . Carril 1) Ladder (DNA Ladder, Sigma Aldrich). Carril 2) Lisado del tanque de 10 mL. Carril 3) Duplicado lisado del tanque de 10 mL. Carril 4) Lisado del tanque de 35 mL. 5) Duplicado lisado del tanque de 35 mL. Carril 6) Lisado del tanque de 50 mL. Carril 7) Duplicado lisado del tanque de 50 mL. Carril 8) Purificado kit.

La Figura 31 representa el análisis cromatográfico (HIC) de los lisados obtenidos en la molienda operado en los tres diferentes tanques. La línea rosa representa la molienda en un tanque de 10 mL y observamos que la concentración de ADN plasmídico es muy pequeña (primer pico), esto se debe a que la operación se realizó en un periodo de tiempo muy corto ($t_{Re}= 0.6$ min). La línea continua azul corresponde a la molienda en un tanque de 35 mL y se observa que la concentración del ADNp aumentó considerablemente, debido a que la operación se realizó en un tiempo mayor ($t_{Re}= 1.6$ min) y esto influyó en el aumento de la liberación del producto de interés. La línea continua color café corresponde a la molienda en un tanque de 50 mL y nos muestra que la concentración de plásmido es mayor, debido a que la operación de molienda se llevó a cabo en un periodo de tiempo más grande ($t_{Re}= 2.1$ min) provocando una mejor colisión, y por lo tanto, el aumento en la liberación de plásmido. En los tres casos observamos la presencia de impurezas.

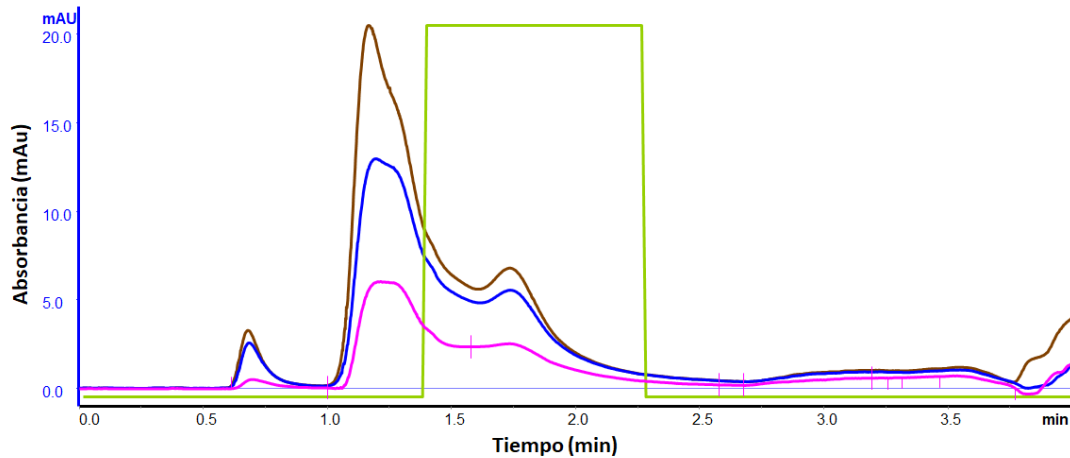


Figura 31. Análisis cromatográfico: (-)Molienda en tanque de 10 mL. (-) Molienda en tanque de 35 mL. (-)Molienda en tanque de 50 mL.

Mediante la cinética de liberación de ADNp a las condiciones de concentración de la suspensión celular, tipo de perla y velocidad de agitación, se pudo estimar la concentración máxima de ADNp (R_m) con un valor de $2378.7 \mu\text{g ADNp/ g cel.hum.}$ y con los datos obtenidos de concentración promedio de cada tanque se obtiene la constante de velocidad específica (k) mediante la Ec. 2. La representación gráfica de la Ec. 2 se muestra en la Figura 32, donde la pendiente de cada recta representa el valor de la constante específica de velocidad.

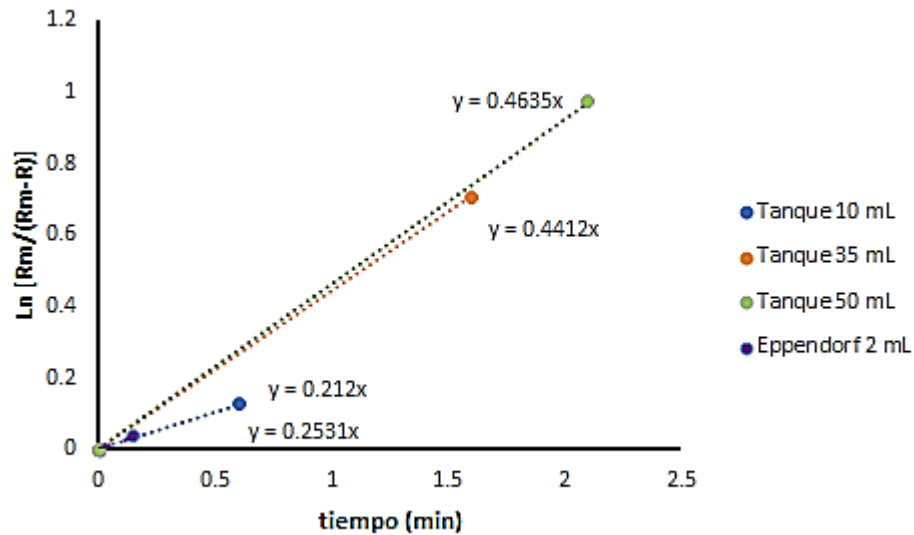


Figura 32. Liberación de ADNp a partir de *E. coli* utilizando perlas de 200-400 μm .

A continuación, se calcula el lado derecho de la Ec. 3, también se estimó la liberación de plásmido que se lograría obtener en un molino operado en modo continuo utilizando el lado derecho de la Ec. 15 y obteniendo como resultado una liberación de la biomolécula de interés muy aproximada a la alcanzada con los tanques en serie perfectamente agitados (Tabla 6). Esto nos permite concluir que para N etapas de cada tanque perfectamente agitado es posible alcanzar el grado de mezclado que se obtendría en un molino continuo, ya que la liberación del ADN plasmídico es muy similar en los dos modos de operación de la molienda. Finalmente se calcula la eficiencia de rompimiento en cada etapa del proceso para cada tanque.

Se puede observar que es más efectiva la molienda en los tanques de 50 mL, ya que se alcanza una eficiencia de etapa mayor comparada con los otros tanques perfectamente agitados, logrando de esto una mayor liberación de ADNp en 2 etapas del proceso.

Tabla 6. Cálculo de tanques en serie perfectamente agitados.

Tanque (mL)	V_R (L)	k (min ⁻¹)	e^{kt}	$\left(1 + \frac{k}{N}t_{Re}\right)^N$	Eficiencia de la etapa	Eficiencia global
2	0.0015	0.2531	1.039	1.039	0.001	3.73
10	0.006	0.212	1.136	1.135	0.015	11.95
35	0.016	0.4412	2.026	1.890	0.184	50.63
50	0.021	0.4635	2.647	2.262	0.290	62.22

La Figura 33 muestra el estudio de escalamiento del rompimiento de *E. coli*. mediante el cálculo de la eficiencia global de la liberación de plásmido (Ec. 18). La grafica representa el número de etapas y el tiempo de residencia correspondiente, basándose de los datos experimentales, representado por el área de color azul. La eficiencia del proceso que se esperaba obtener escalando el sistema a un tiempo de residencia mayor, por ejemplo, para $t_R = 10$ min y $N = 2$ es del 90 %. Para $N = 8$ y $t_R = 10$ min se logra una eficiencia del 97%.

$$\frac{R}{R_m} = \left(1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{kt_R}{N}\right)^N}\right) \quad (18)$$

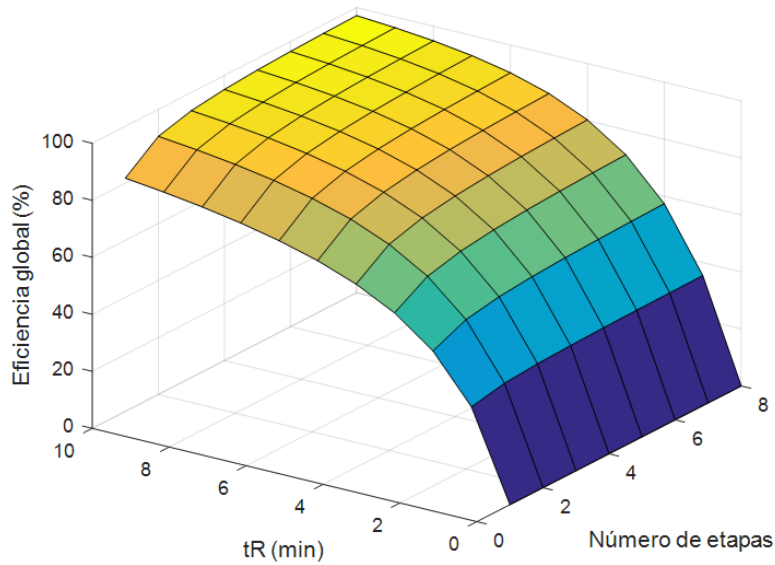


Figura 33. Eficiencia global de la molienda continua en función del número de etapas y tiempo de residencia.

La Figura 34 muestra la medida de la distribución de tiempos de residencia de las células dentro de la cámara de molienda (Ec. 12). El inciso A) para $N = 8$ y representa las células a la salida de la cámara, pero es tan rápido el proceso de operación ($t_{Re} = 0.6$ min) que no se alcanza una distribución máxima de tiempos de residencia. La imagen debajo muestra que a $\theta = 0.3$, donde va incrementando la curva, comienza a aumentar la intensidad a la salida, por lo tanto, se puede decir que a ese tiempo inicia la liberación dentro de la cámara de molienda. El inciso B) representa $N = 3$ y se muestra en este caso a las células al salir de la cámara tienen un grado de dispersión variable hasta alcanzar una distribución máxima $E = 0.81$ a un tiempo adimensional $\theta = 0.64$. La imagen que se encuentra debajo muestra la distribución a la salida de la cámara y como se ve esa dispersión de células en un periodo de tiempo muy corto y como va aumentando. El inciso C) muestra $N = 2$ y representa como las células en un periodo de tiempo adimensional muy corto va aumentando su distribución $E = 0.74$ hasta alcanzar un máximo en $\theta = 0.48$, para después comenzar a disminuir. Una operación así es más efectiva, ya que el tiempo de residencia para una gran cantidad de células es similar, generando que exista más probabilidad de rompimiento y que libere el

ADNp, además no se requeriría de aumentar el número de pasos. La imagen debajo muestra como las células a la salida de la cámara de molienda disminuye su concentración.

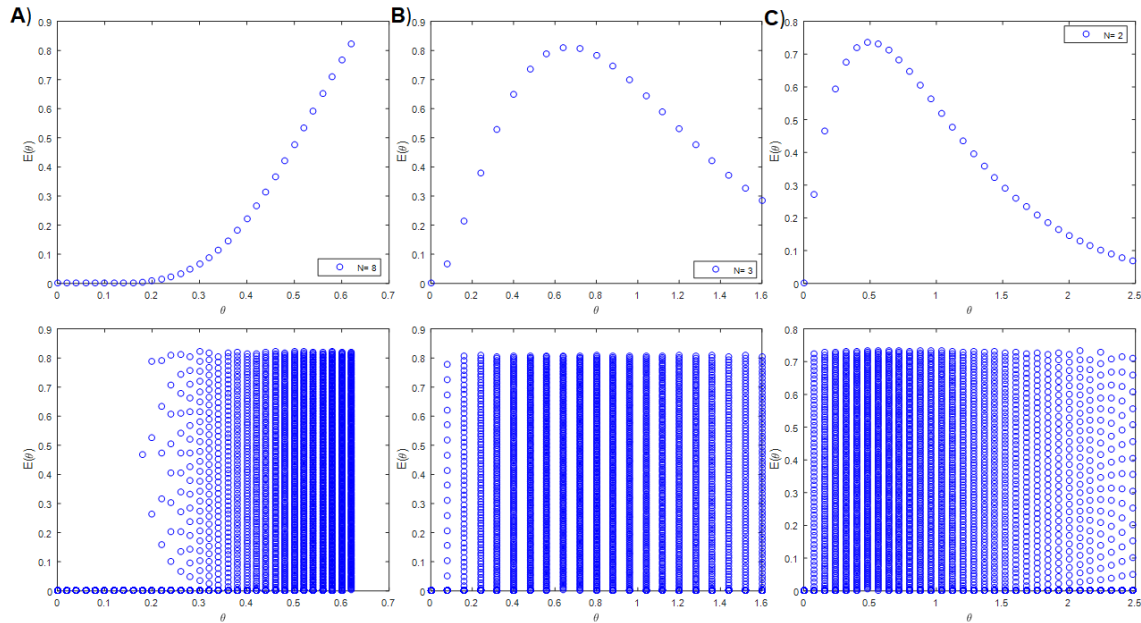


Figura 34. Medida de la distribución de tiempos de residencia de las células en la cámara de molienda. A) Molienda en tanque de 10 mL. B) Molienda en tanque de 35 mL. C) Molienda en tanque de 50 mL.

4.5. Isoformas del ADNp

La Figura 35 muestra el cromatograma para el análisis de isoformas circular abierta (oc) y superenrollado (sc) alimentando a través de la primer columna HiTrap™ Sepharose HP 5 mL. La finalidad de esta columna es la separación de grupos y recuperar de la muestra alimentada el ADNp en sus dos isoformas y desechar las impurezas. Las muestras alimentadas fueron un purificado obtenido mediante un kit, un lisado recuperado de la molienda operado en un tanque de 50 mL agitado durante un tiempo de 2.1 min y de un lisado obtenido de la molienda a un tiempo de agitación de 10 min. El método mecánico se efectuó utilizando perlas de zirconio con recubrimiento y de diámetro de 200-400 μm (PR), una relación [1:2], una concentración celular de 20 g/L y una velocidad de agitación de 30 Hz. Se observa en la Figura 34 que el primer pico del cromatograma, que representa la concentración de plásmido, es mayor en la molienda a tiempo de 10 min, seguida del

purificado obtenido mediante el kit, en el cual no se presentan impurezas y por último la concentración de plásmido es menor a una molienda de 2.1 min.

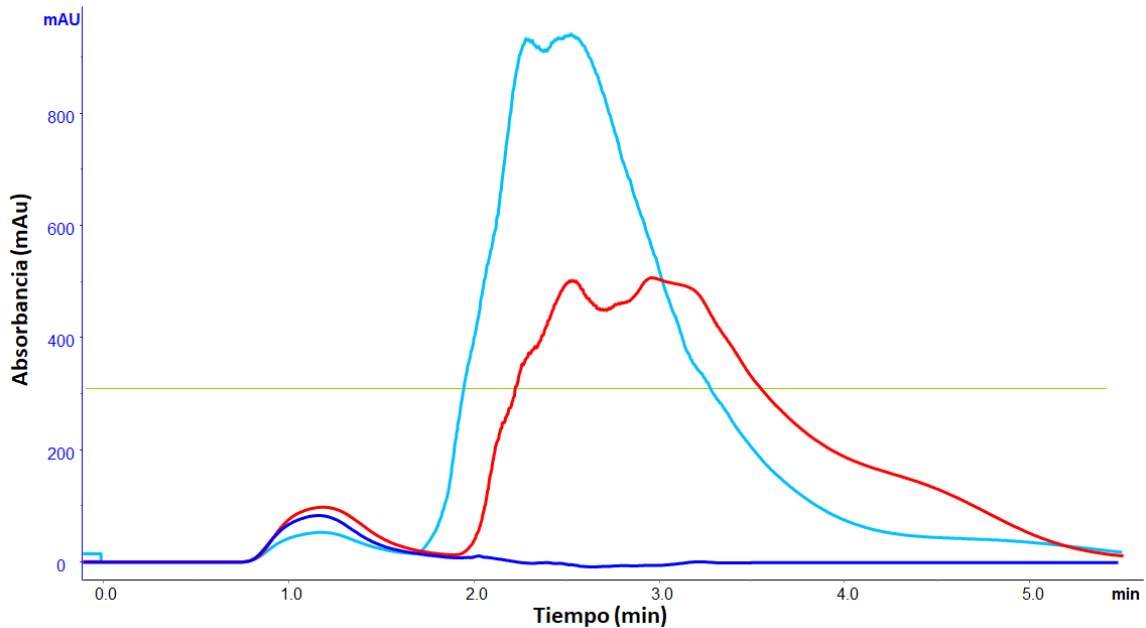


Figura 35. Análisis de isoformas, primer columna: (-) Purificado mediante kit. (-) Molienda a tiempo de 10 min (-) Molienda a tiempo de 2 min.

La Figura 36 muestra un cromatograma para el análisis de isoformas en la segunda columna HiTrap Plasmid Select Xtra 1 mL. La muestra alimentada es la fracción colectada de la primera columna. Se observa en el caso de la muestra del purificado que corresponde a la línea continua color azul, como se separan las dos isoformas del plásmido, donde el primer pico corresponde a la isoforma oc y se ve en menor proporción con respecto al segundo pico que representa al ADNp sc, donde la altura del pico es mayor y más ancho. Este cromatograma para un plásmido purificado es semejante al reportado por Bennemo, (Bennemo et al., 2009). La línea color naranja y café son los cromatogramas de las muestras del lisado obtenido de la molienda, operado a tiempo de agitación durante 10 minutos y una molienda efectuada a un tiempo de 2.1 minutos respectivamente. Se puede observar en los cromatogramas de los lisados siguen el patrón del cromatograma de un purificado, donde se muestra la presencia del plásmido superenrollado en un pico mayor en el lisado de la molienda durante 10 min, sin embargo, a pesar de que el tiempo de

operación durante la molienda en el tanque de 50 mL fue muy corto, también se aprecia la presencia del ADNp. Comparando el método mecánico con el purificado, se puede concluir que la molienda con perlas es un método efectivo para la recuperación de ADNp en su forma superenrollada.

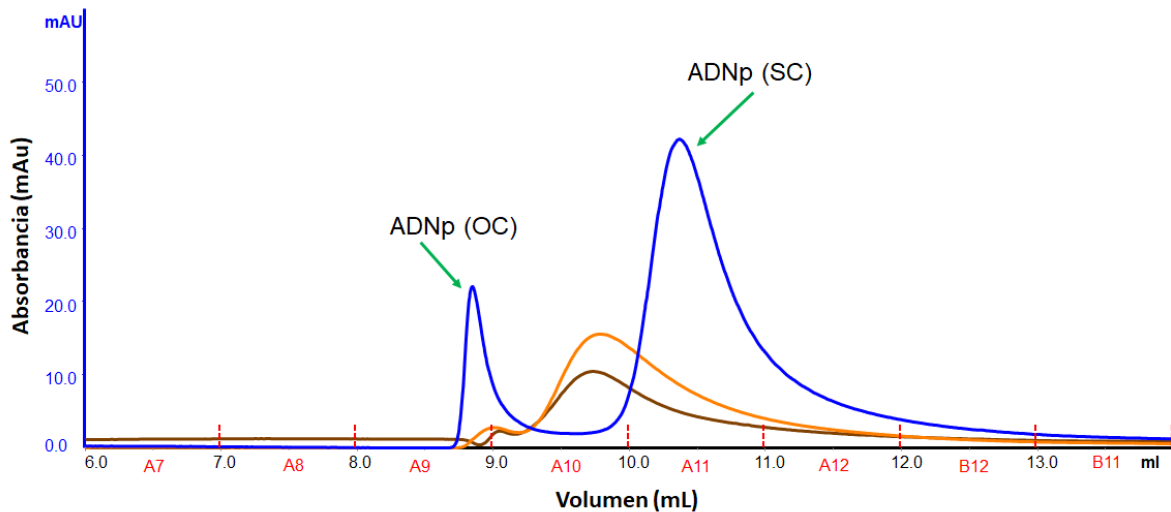


Figura 36. Análisis de isoformas, segunda columna: (-) Plásmido purificado mediante kit. (-) Lisado de molienda a tiempo de 10 min (-) Lisado de molienda a tiempo de 2.1 min.

En la Figura 37 muestra el análisis electroforético de las muestras recuperadas de cada fracción, obtenidas de la segunda columna. El primer carril contiene el marcador molecular, en el carril 2 se encuentra la fracción del primer pico (A10) del cromatograma correspondiente al plásmido purificado con kit, está fracción corresponde al plásmido oc y en el carril 3 y 4 se encuentra la muestra del segundo pico (A11), indicando la presencia de plásmido sc en mayor proporción con respecto al plásmido oc. En el carril 5, 6 y 7 aparecen las fracciones obtenidas de los picos del cromatograma correspondientes al lisado obtenido de la molienda durante 10 min. En el carril 5 se muestra la fracción colectada del primer pico (A10), donde se aprecia la presencia de ADNp oc, en el carril 6 y 7 se encuentra la muestra recuperada de la fracción del segundo pico (A11) y observamos plásmido sc en mayor proporción debido al ancho de la banda. Finalmente, en el carril 8 se encuentra la muestra del ADNp purificado mediante un kit.

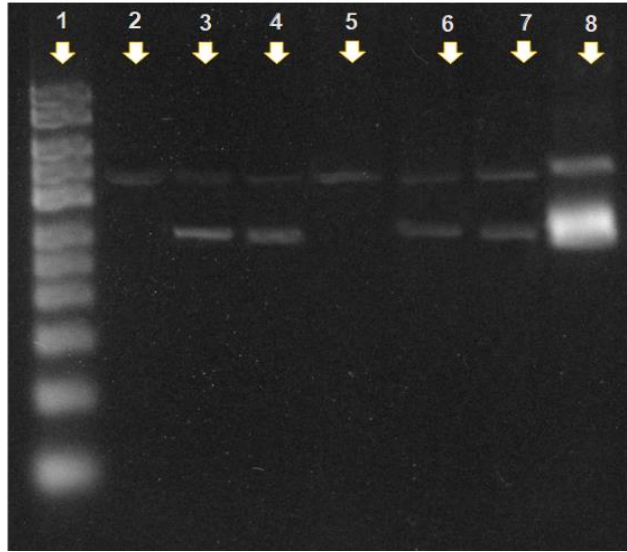


Figura 37. Análisis Electroforético de las fracciones recuperadas del estudio de las isoformas del ADNp. Carril 1) Ladder. Carril 2) Fracción 10, purificado kit. Carril 3) Fracción 11, purificado kit. Carril 4) Duplicado fracción 11, purificado kit. Carril 5) Fracción 10, molienda a $t= 10$ min. Carril 6) Fracción 11, molienda a $t= 10$ min. Carril 7) Duplicado fracción 11, molienda a $t= 10$ min. Carril 8) Purificado mediante un kit.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, la recuperación de plásmido por el método mecánico es favorable, ya que se alcanza una alta concentración de ADNp comparado con la técnica de rompimiento celular más usado a nivel laboratorio.

Los estudios de electroforesis muestran que influye mucho el tamaño de perla con el que se operará para romper la célula *E. coli* y de ello depende la recuperación de plásmido en su forma superenrollada. Al no detectarse el ARN en el gel de electroforesis es posible que no se libere éste en el lisado mecánico y quizá este método de rompimiento ayude en las etapas posteriores de recuperación y purificación de plásmido, para separar el producto de interés de las impurezas, sin embargo, si se detecta la presencia de ADNg en el lisado mecánico.

La cinética de liberación de plásmido es más rápida al utilizar perlas de zirconio sin recubrimiento y de diámetro de 100 μm (SR1) con el valor de la constante de velocidad específica de 1.6001 min^{-1} , no obstante, el ADN plasmídico liberado de la célula se va degradando conforme avanza el tiempo de molienda. La cinética de liberación de plásmido al utilizar perlas con recubrimiento y de diámetro de 200-400 μm (PR) se efectúa de manera rápida pero no mayor a la cinética anterior, con una constante de velocidad específica de 0.2531 min^{-1} , además, la calidad de plásmido (sc) es muy satisfactoria. Al utilizar perlas de 500 μm de diámetro y sin recubrimiento (SR5), la cinética de liberación de plásmido fue más lenta, con una constante de velocidad específica de 0.1034 min^{-1} , encontrándose también que la calidad del plásmido (sc) es muy buena y de alta concentración. De acuerdo a la literatura (Tejeda Mansir et al., 2011) y los estudios (Haque et al., 2016; Padilla-Zamudio et al., 2018) se establece que el diámetro de las perlas es un factor determinante para realizar la molienda, debido a que si se utiliza un diámetro pequeño el espacio que existirá entre cada una de ellas será menor dentro de la cámara de molienda y por lo tanto hay más

probabilidad de colisión, en cambio, entre mayor es el tamaño de la perla, aumenta el espacio libre entre cada una de ellas, por lo que se requerirá de más tiempo en romper las células.

El análisis de isoformas fue satisfactorio para la muestra de plásmido purificado logrando diferenciar el ADNp sc y oc, sin embargo, para las muestras de lisados mecánicos posiblemente sea necesario alimentar en las columnas cromatográficas mayor volumen de muestra para lograr una buena resolución.

El estudio desarrollado en tanques en serie perfectamente agitados para el diseño de un molino continuo ha mostrado ser de gran utilidad, ya que es posible analizar el grado de mezclado equivalente al grado de ruptura de la célula de *E. coli*. Cabe mencionar que la liberación de plásmido y la eficiencia de la etapa del proceso es menor al efectuar la molienda en un tanque de menor volumen (10 mL), además de que el tiempo de operación es muy corto (0.6 min) y se requiere de más etapas ($N = 8$) para lograr el grado de mezclado de un molino continuo. La literatura menciona que las operaciones de bioseparaciones para un proceso debe ser seleccionado con el fin de que el costo sea mínimo y en este caso se obtuvo una recuperación del producto de interés a baja concentración y requiere de varias etapas (Tejeda Mansir et al., 2011).

La recuperación del ADNp incrementa al realizar la molienda en los tanques de volumen de 35 mL y 50 mL a un tiempo de operación de 1.6 min y 2.1 min respectivamente. La eficiencia global del proceso en la liberación de la biomolécula de interés es de 50.63 y 62.22, lo que hace del proceso una mejor opción para obtener una buena recuperación en 3 y 2 etapas para lograr la eficiencia de rompimiento esperada de un molino continuo.

El estudio de escalamiento basado en datos experimentales permite estimar el comportamiento de una operación para tiempos de residencia mayores y por lo tanto mayor volumen de trabajo dentro del molino.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrahman, A., & Ghanem, A. (2018). Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review. *Analytica chimica acta*, 1025, 41-57.
- Aires-Barros, M. R., & Azevedo, A. M. (2017). 7 - Fundamentals of Biological Separation Processes. In A. Pandey & J. A. C. Teixeira (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 187-237). Elsevier.
- Alvar, J., Mowdray, C., Alves, F., Yardley, V., Martin, J., Fernandez, C., . . . Demicheli, C. (2017). *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Royal Society of Chemistry.
- Bennemo, M., Blom, H., Emilsson, A., & Lemmens, R. (2009). A chromatographic method for determination of supercoiled plasmid DNA concentration in complex solutions. *Journal of Chromatography B*, 877(24), 2530-2536.
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- Blom, H., Bennemo, M., Berg, M., & Lemmens, R. (2010). Flocculate removal after alkaline lysis in plasmid DNA production. *Vaccine*, 29(1), 6-10.
- Borujeni, E. E., & Zydney, A. L. (2012). Separation of plasmid DNA isoforms using centrifugal ultrafiltration. *Biotechniques*, 53(1), 49-56.
- Boulaiz, H., Marchal, J. A., Prados, J., Melguizo, C., & Aranega, A. (2005). Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 51(1), 3-22.
- Brand, E., Ralla, K., & Neubauer, P. (2012). Strategies for plasmid DNA production in *Escherichia coli*. *Biopharmaceutical Production Technology*, 1, 1-41.
- Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D., & Alon, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC systems biology*, 7(1), 1-9.
- Carbone, A., Fioretti, F. M., Fucci, L., Ausió, J., & Piscopo, M. (2012). High efficiency method to obtain supercoiled DNA with a commercial plasmid purification kit. *Acta biochimica Polonica*, 59(2).
- Carlson, A., Signs, M., Liermann, L., Boor, R., & Jem, K. J. (1995). Mechanical disruption of *Escherichia coli* for plasmid recovery. *Biotechnology and bioengineering*, 48(4), 303-315.
- Carnes, A. E., & Williams, J. A. (2007). Plasmid DNA manufacturing technology. *Recent patents on biotechnology*, 1(2), 151-166.
- Carnes, A. E., & Williams, J. A. (2014). Plasmid fermentation process for DNA immunization applications. In *DNA Vaccines* (pp. 197-217). Springer.
- Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., & Meibohm, B. (2013). *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media.

- Cupillard, L., Juillard, V., Latour, S., Colombet, G., Cachet, N., Richard, S., . . . Fischer, L. (2005). Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine*, 23(16), 1910-1916.
- Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2007). Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(6), 490-497.
- Diogo, M., Queiroz, J., & Prazeres, D. (2003). Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 998(1-2), 109-117.
- Diogo, M., Queiroz, J., & Prazeres, D. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 1069(1), 3-22.
- Ferraro, B., Morrow, M. P., Hutnick, N. A., Shin, T. H., Lucke, C. E., & Weiner, D. B. (2011). Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical infectious diseases*, 53(3), 296-302.
- Ferreira, G. N. M., Monteiro, G. A., Prazeres, D. M. F., & Cabral, J. M. S. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in biotechnology*, 18(9), 380-388.
- Franco-Medrano, D. I., Guerrero-Germán, P., Montesinos-Cisneros, R. M., Ortega-López, J., & Tejeda-Mansir, A. (2017). Plasmid pVAX1-NH36 purification by membrane and bead perfusion chromatography. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(3), 463-471.
- 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(2), 265-278.
- Goldman, L., & Ausiello, D. (2009). *Cecil tratado de medicina interna*. Elsevier.
- Greenland, J. R., & Letvin, N. L. (2007). Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*, 25(19), 3731-3741.
- Haque, S., Khan, S., Wahid, M., Mandal, R. K., Tiwari, D., Dar, S. A., . . . Jawed, A. (2016). Modeling and optimization of a continuous bead milling process for bacterial cell lysis using response surface methodology. *RSC Advances*, 6(20), 16348-16357.
- Hobernik, D., & Bros, M. (2018). DNA vaccines—how far from clinical use? *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3605.
- Islas-Lugo, F., Vega-Estrada, J., Alvis, C. A., Ortega-Lopez, J., & del Carmen Montes-Horcasitas, M. (2016). Developing strategies to increase plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5 α using batch culture. *Journal of biotechnology*, 233, 66-73.
- Kesik - Brodacka, M. (2018). Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(3), 306-322.
- Klinman, D. M., Klaschik, S., Tross, D., Shirota, H., & Steinhagen, F. (2010). FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine*, 28(16), 2801-2805.
- Kong, S., Aucamp, J., & Titchener-Hooker, N. J. (2010). Studies on membrane sterile filtration of plasmid DNA using an automated multiwell technique. *Journal of Membrane Science*, 353(1-2), 144-150.
- Kumar, A., & Awasthi, A. (2009). *Bioseparation engineering*. IK International Pvt Ltd.
- Kumar, R., Chauhan, S. B., Ng, S. S., Sundar, S., & Engwerda, C. R. (2017). Immune checkpoint targets for host-directed therapy to prevent and treat leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 8, 1492.
- Li, L., Saade, F., & Petrovsky, N. (2012). The future of human DNA vaccines. *Journal of biotechnology*, 162(2-3), 171-182.

- Li, Y., Borujeni, E. E., & Zydney, A. L. (2015). Use of preconditioning to control membrane fouling and enhance performance during ultrafiltration of plasmid DNA. *Journal of Membrane Science*, 479, 117-122.
- Listner, K., Bentley, L. K., & Chartrain, M. (2006). A simple method for the production of plasmid DNA in bioreactors. *DNA Vaccines*, 295-309.
- McLennan, A., Bates, A., Turner, P., & White, M. (2012). *Bios instant notes in molecular biology*. Taylor & Francis.
- Mears, L., Stocks, S. M., Sin, G., & Gernaey, K. V. (2017). A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *Journal of biotechnology*, 245, 34-46.
- Middelberg, A. P. J. (2012). *Biopharmaceutical production technology, 2 volume set* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Million-Weaver, S., & Camps, M. (2014). Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid*, 75, 27-36.
- Molloy, M. J., Hall, V. S., Bailey, S. I., Griffin, K. J., Faulkner, J., & Uden, M. (2004). Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. *Nucleic acids research*, 32(16), e129-e129.
- Montgomery, D. L., & Prather, K. J. (2006). Design of plasmid DNA constructs for vaccines. In *DNA Vaccines* (pp. 11-22). Springer.
- Munguía - Soto, R., García - Rendón, A., Garibay - Escobar, A., Guerrero - Germán, P., & Tejeda - Mansir, A. (2015). Segregated growth kinetics of Escherichia coli DH5 α - NH36 in exponential - fed perfusion culture for pDNA vaccine production. *Biotechnology and applied biochemistry*, 62(6), 795-805.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561-1577.
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins - Santana, L., Alves, L. d. F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E., & Silva - Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next - generation genetic tools. *Microbial biotechnology*, 12(1), 125-147.
- Nunes, J. C., Morão, A. M., Nunes, C., de Amorim, M. T. P., 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*, 415, 24-35.
- Oliveira, C., Aguiar, T. Q., & Domingues, L. (2017). 4 - Principles of Genetic Engineering. In A. Pandey & J. A. C. Teixeira (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 81-127). Elsevier.
- Padilla-Zamudio, A., Lucero-Acuña, J. A., Guerrero-Germán, P., Ortega-López, J., & Tejeda-Mansir, A. (2018). Efficient disruption of escherichia coli for plasmid DNA recovery in a bead mill. *Applied Sciences*, 8(1), 30.
- Prazeres, D., Monteiro, G., Ferreira, G., Diogo, M., Ribeiro, S., & Cabral, J. (2001). Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination.
- Prazeres, D. M. F. (2011). *Plasmid biopharmaceuticals: basics, applications, and manufacturing*. John Wiley & Sons.
- Prazeres, D. M. F., & Ferreira, G. N. M. (2004). Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 43(5), 609-624.
- Prazeres, D. M. F., & Monteiro, G. A. (2015). Plasmid biopharmaceuticals. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 669-688.

- Roush, D. J., & Lu, Y. (2008). Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. *Biotechnology progress*, 24(3), 488-495.
- Sanchez-Casco, M., Dumonteil, E., & Ortega-Lopez, J. (2013). Production optimisation of a DNA vaccine candidate against leishmaniasis in flask culture. *African Journal of Biotechnology*, 12(31).
- Santos, B., Luize, M., Nico, D., de Oliveira, F. A., Barreto, A. S., Palatnik-de-Sousa, I., . . . Morrot, A. (2017). Leishmania donovani nucleoside hydrolase (NH36) domains induce T-cell cytokine responses in human visceral leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 8, 227.
- Schmeer, M., Buchholz, T., & Schleef, M. (2017). Plasmid DNA manufacturing for indirect and direct clinical applications. *Human gene therapy*, 28(10), 856-861.
- Schmeer, M., & Schleef, M. (2014). Pharmaceutical grade large-scale plasmid DNA manufacturing process. In *DNA vaccines* (pp. 219-240). Springer.
- Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A. G., & Smith, D. C. (2018). E. coli strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. *FEMS microbiology letters*, 365(15), fny162.
- Show, P. L., Ooi, C. W., & Ling, T. C. (2019). *Bioprocess engineering: downstream processing*. CRC Press.
- Shuler, M. L. (2017). *Bioprocess engineering*. Prentice-Hall, 40-420.
- Sivasankar, B. (2005). *Biosperations: Principles and Techniques*. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Stadler, J., Lemmens, R., & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *The Journal of Gene Medicine: A cross - disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 6(S1), S54-S66.
- Tejeda Mansir, A., Montesinos Cisneros, R. M., & Guzmán Zamudio, R. (2011). *Bioseparaciones* (PEARSON, Ed. 2ed. ed.).
- Tejeda-Mansir, A., García-Rendón, A., & Guerrero-Germán, P. (2019). Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 35(1), 46-68.
- Urthaler, J., Ascher, C., Wöhrer, H., & Necina, R. (2007). Automated alkaline lysis for industrial scale cGMP production of pharmaceutical grade plasmid-DNA. *Journal of biotechnology*, 128(1), 132-149.
- Urthaler, J., Schuchnigg, H., Garidel, P., & Huber, H. (2012). Industrial manufacturing of plasmid-DNA products for gene vaccination and therapy. In *Gene vaccines* (pp. 311-330). Springer.
- Veide, A., Lindbäck, T., & Enfors, S.-O. (1984). Continuous extraction of β -d-galactosidase from Escherichia coli in an aqueous two-phase system: effects of biomass concentration on partitioning and mass transfer. *Enzyme and Microbial Technology*, 6(7), 325-330.
- Voß, C. (2007). Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. *Biotechnology annual review*, 13, 201-222.
- Watson, J. D. (2006). *Biología molecular del gen*. Ed. Médica Panamericana.
- Willey, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology.
- Xenopoulos, A., & Pattnaik, P. (2014). Production and purification of plasmid DNA vaccines: is there scope for further innovation? *Expert review of vaccines*, 13(12), 1537-1551.
- Zamfir, G. M. B., Ramírez, O. T., & Lara, A. R. (2014). Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente. *Bio Tecnología*, 17(3), 87-109.
- Zárate, C. B., Sahagún, D. O., & Borunda, J. S. A. (2009). *Biología molecular*. McGraw-Hill Interamericana.

Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., & Li, Z. (2004). Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *Journal of controlled release*, 100(2), 165-180

ANEXOS

Anexo A:

La concentración de ADNp de las muestras se calculó a partir de una curva estándar de correlación. La curva estándar se construyó con soluciones de concentración conocida de pVAX1-NH36 purificado por medio de un kit y analizadas por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Se relaciona la concentración conocida de cada solución inyectada con el área del pico correspondiente al ADNp, como se muestra en la Figura A1. La pendiente de la recta obtenida se utiliza para calcular la concentración en muestras, mediante la relación

$$c = \frac{a}{0.0648}$$

Donde c es la concentración de ADNp en ($\mu\text{g/mL}$) y a es el área del pico de ADNp en ($\text{mAU}\cdot\text{min}$).

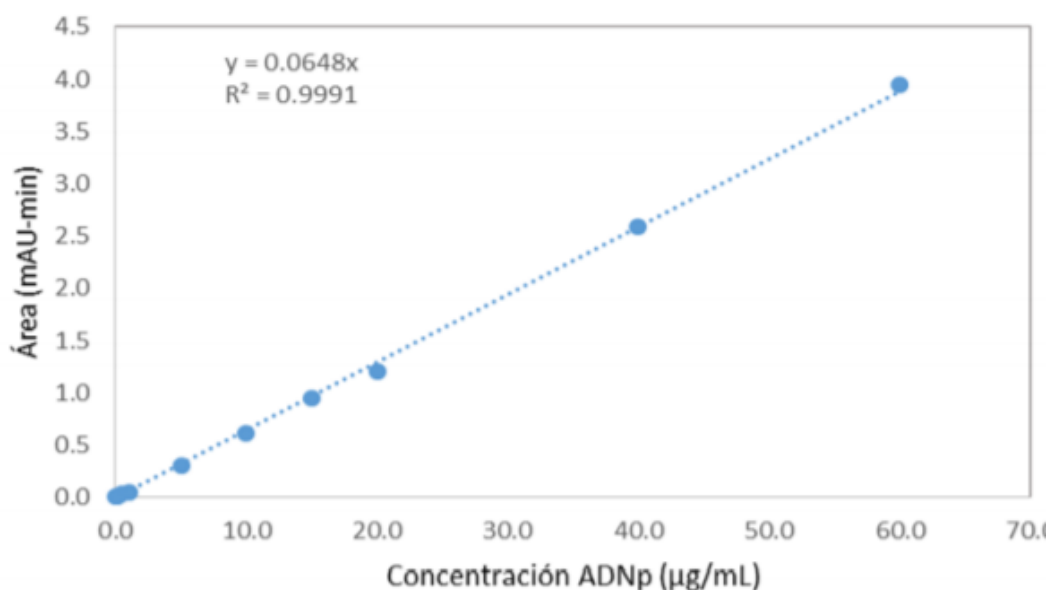


Figura A1. Curva estándar para pVAX1-NH36

