



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**ANÁLISIS Y SIMULACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA
FRONTAL DE PLÁSMIDOS EN SISTEMAS DE
MEMBRANAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DEL 2007

Universidad de Sonora

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

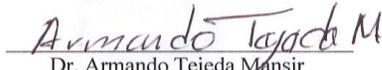
de la tesis presentada por:

JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA

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

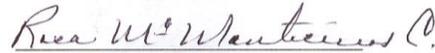
10-12-07

Fecha


Dr. Armando Tejada Mansir
Presidente

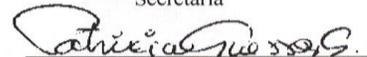
10-12-07

Fecha


Dra. Rosa María Montesinos Cisneros
Secretaria

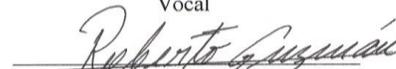
10-12-07

Fecha


M.C. Patricia Guerrero Germán
Vocal

10-12-07

Fecha


Dr. Roberto Guzmán Zamudio
Sinodal Externo



UNIVERSIDAD DE SONORA
AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Diciembre 10, de 2007.

Por la presente se hace constar que el estudiante JESUS ARMANDO LUCERO ACUÑA, 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. MANUEL PEREZ TELLO
Coordinador
Maestría en Ciencias de la Ingeniería

RESUMEN

En esta investigación se logró preparar y determinar las propiedades básicas de adsorción de columnas de intercambio iónico empacadas con membranas y con adsorbentes macroporosos. Las columnas de membranas mostraron un adecuado comportamiento dinámico y una capacidad de adsorción de plásmidos prácticamente igual a la reportada en literatura, mientras que la de los adsorbentes macroporosos fue menor. Los estudios de equilibrio con el plásmido pCAT mostraron que el modelo de Langmuir se ajustó adecuadamente a los datos experimentales.

Se desarrolló y evaluó un nuevo bioproceso para la producción de DNA plasmídico, que comprende las etapas de fermentación, recuperación y purificación del plásmido. La propagación de *E. coli.*, la cepa huésped del plásmido de interés, alcanzó productividades típicas de las operaciones de fermentación batch. La etapa de recuperación, comprende lisis celular, neutralización, clarificación y diafiltración. Mediante el uso de agitación moderada en la lisis y neutralización se logró obtener flóculos de gran dimensión, lo que permitió lograr una adecuada clarificación del lisado mediante una batería de separación sólido-líquido. El lavado y concentrado del caldo clarificado se realizó mediante diafiltración, lo cual permitió su procesamiento posterior.

En la purificación del caldo de pRL-CMV con el AMP-II, la capacidad de la columna prácticamente no varió con el flujo de alimentación en el rango estudiado. Mediante la elución con gradiente se logró la concentración del plásmido y una mayor purificación del mismo respecto a la elución isocrática. En los experimentos cromatográficos con membranas de intercambio iónico, se obtuvo un gradiente de elución que permitió una concentración y purificación parcial del plásmido pVR1012-NH36. Mediante una segunda operación cromatográfica de la fracción recuperada, se logró obtener el plásmido con la pureza requerida para RNA, determinada en gel de agarosa al 0.8%. Estos resultados apoyan la factibilidad técnica de un nuevo bioproceso para la

producción de plásmidos, mediante el uso de sólo cromatografía de intercambio iónico en membranas e la etapa de purificación.

Por medio de simulación se logró escalar al bioproceso desarrollado para la producción de plásmidos (bioproceso base). El análisis económico sugirió realizar modificaciones a este proceso, de tal manera que se generó un bioproceso alternativo. El análisis económico del bioproceso alternativo presentó valores mejorados en los indicadores económicos, sugiriendo que la producción de plásmidos es económicamente viable. Este tipo de análisis tradicionalmente empleado para la evaluación de proyectos, también resulta una herramienta valiosa para fijar directrices de investigación. La investigación muestra que la optimización del vector, el medio de cultivo y el modo de operación del fermentador para alcanzar mayores productividades del plásmido mejorarían aún más la competitividad tecnológica del bioproceso.

ABSTRACT

Ion-exchange chromatographic columns packed with membranes or macroporous particles were prepared and their basic adsorption properties were studied. Membrane columns showed an appropriate dynamic behavior and a plasmid adsorption-capacity practically equal to capacities previously reported. The adsorption capacity of the columns packed with macroporous particles was smaller than the reported ones. The Langmuir model was properly fitted to the experimental equilibrium data of pCAT.

A new bioprocess for plasmid DNA production was developed and evaluated. The main process stages are: fermentation, recovery and purification of the plasmid. The propagation of *E coli.*, plasmid's host, reached the typical productivities of batch fermentations. The recovery stage includes cellular lysis, neutralization, clarification and diafiltración. Using moderate agitation in the lysis and neutralization operations it was possible to obtain big flocs, which allowed obtaining a suitable clarification of the solution by means of a sequential solid-liquid separation. The clarify broth was then washed and concentrated by diafiltration, which allowed its further processing.

During the purification of pRL-CMV with AMP-II, column capacity practically did not fluctuate with flow in the studied rank. Plasmid concentration was attain using gradient elution and a greater purification achieved with respect to isocratic elution. An elution gradient was also found that allowed the concentration and partial purification of the plasmid in the chromatographic experiments of pVR1012-NH36 with ion-exchange membranes. By means of a second chromatographic operation of the recovered fraction, the plasmid was obtained with purity required for RNA, determined on 0.8% (w/v) agarose gels. These results support the technical feasibility of the new bioprocess for plasmid production using only ion-exchange membrane chromatography in the purification stage.

The bioprocess developed for the production of plasmids (base bioprocess) was scale up by simulation. The economic analysis suggested to make modifications to this bioprocess, and an alternative bioprocess was developed. The economic analysis of alternative bioprocess presented improved values in the economic indicators, suggesting that plasmid production is economically viable. This type of analysis traditionally used in feasibility analysis, it was also a valuable tool to obtain research directives. This research show that vector, culture medium and fermentation mode optimization to reach greater productivities of the plasmid would further improve the technological competitiveness of the bioprocess.

*Con amor para
Diana, Nodrik,
mis padres y
hermanos*

Que quede dicho, que de una vez por todas: hay
muchas cosas que no quiero saber. La sabiduría
marca unos límites, incluso al conocimiento.
Friedrich Wilhelm Nietzsche (1844-1900)
(Cómo se Filósofa a Martillazos)

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xv
NOMENCLATURA	xvi
AGRADECIMIENTOS	xvii
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
2.1 Los Plásmidos y sus Aplicaciones	5
2.2 Propagación y Purificación de Plásmidos	8
2.3 Simulación de Bioprocesos	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Materiales	14
3.2 Equipo	15
3.3 Preparación de Matrices y Columnas	16
3.3.1 AMP-II y Columnas	16
3.3.2 Membranas y Columnas	16
3.4 Estudios Básicos de Adsorción con Plásmidos Modelo	19
3.4.1 Isoterma	19
3.4.2 Curvas de Ruptura	19
3.4.3 Experimentos de Dispersión	20
3.5 Producción de Plásmidos	20
3.5.1 Diagrama de Bloques	20
3.5.2 Crecimiento Celular	22
3.5.3 Cinética de Crecimiento	25
3.6 Recuperación y Purificación de Plásmidos	27
3.6.1 Diagrama de Bloques	27
3.6.2 Recuperación de Plásmidos	29

	Página
3.6.3 Purificación de Plásmidos	34
3.6.4 Análisis de Muestras	36
3.7 Simulación del Bioproceso	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Preparación de Matrices y Columnas	41
4.1.1 AMP-II y Columnas	41
4.1.2 Membranas y Columnas	43
4.2 Estudios Básicos de Adsorción con Plásmidos Modelo	45
4.2.1 Isoterma	45
4.2.2 Curvas de Ruptura	51
4.2.3 Experimentos de Dispersión	53
4.3 Producción de Plásmidos	55
4.3.1 Crecimiento Celular	55
4.3.2 Cinética de Crecimiento	55
4.4 Recuperación y Purificación de Plásmidos	57
4.4.1 Recuperación de Plásmidos	57
4.4.2 Purificación de Plásmidos	58
4.5 Simulación del Bioproceso	83
4.5.1 Descripción del Bioproceso Base	83
4.5.2 Análisis Económico del Bioproceso Base	88
4.5.3 Desarrollo del Bioproceso Alternativo	90
4.5.4 Análisis Económico del Bioproceso Alternativo	94
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	103
5.1 Conclusiones	103
5.2 Recomendaciones	105
REFERENCIAS	106
APENDICES	
A. Preparación de Soluciones	111
B. Publicaciones y Reconocimientos Generados	114

LISTA DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Conformación estructural del plásmido pVR1012-NH36.	7
2	Proceso de adsorción frontal en una columna y curva de ruptura.	12
3	Preparación de la columna de membranas. 1 Cortado y acondicionamiento de las membranas. 2. Empaque.	18
4	Diagrama de bloques del proceso de producción de plásmidos a partir de la cepa hospedera.	21
5	Biorreactor BioFlo 3000 utilizado para cultivar a la cepa de <i>E. Coli JM109</i> con el plásmido pRL-CMV. a. Agitador, b. Control de temperatura, c. Mangueras de aire estéril, d. Bomba peristáltica.	23
6	Fermentador de 2 l utilizado para cultivar a la cepa de <i>E. coli</i> con el plásmido pVR1012-NH36. a. Agitador, b. Control de temperatura, c. Mangueras de aire estéril, d. Bomba peristáltica.	24
7	Crecimiento en matraz usando una incubadora (orbital shaker incubator) a condiciones de 225 rpm y 37 °C.	26
8	Diagrama de bloques del proceso de recuperación y producción de plásmidos a partir de una cepa hospedera. Incluye las etapas de resuspensión de células, lisis alcalina, neutralización, filtración primaria, microfiltración, diafiltración y cromatografía de intercambio iónico.	28
9	Sistema de vacío usado para eliminar los floculos generados en la lisis alcalina y neutralización de la etapa de recuperación de plásmidos.	30
10	Sistema de microfiltrado continuo. La solución se pasa primero a través del filtro de 5 µm y después se pasa por el filtro de 0.45 µm.	31
11	Celda de diafiltración amicon de Millipore con una membrana de la misma marca, fabricada con polietersulfona y de NMWL de 10,000. La celda se conectó a un tanque de nitrógeno puro a una presión menor de 55 psi.	33
12	Columna empacada con membranas Mustang Q conectada al equipo BioRad BioLogic LP con monitor de computadora.	35
13	Cámara de electroforesis conectada al transformador de corriente.	37
14	Curvas de adsorción, lavado y elución del experimento con BSA. La columna se empacó con 0.5 ml de AMP-II y se operó a un flujo de 0.5 ml/min con una concentración de entrada de BSA de 0.3 mg/ml. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la etapa de elución. Después de los 100 min alimentó 1 M HCl.	42
15	Columna empacada con membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro nominal de 800 nm, las cuales, se cortaron a un diámetro de 5 mm y se acondicionaron según el protocolo del fabricante.	44
16	Curva de calibración del plásmido pCAT a temperatura de 22.7 C ±1. Puntos experimentales (■), ajuste lineal (línea sólida). En el gráfico también se muestra la ecuación de la recta ajustada. El valor del coeficiente de extinción	

	E, es de 17.43 <i>ml/mg-cm</i> .	47
17	Isoterma del plásmido pCAT en membranas de intercambio iónico a 22.7 °C ±1 con el buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0. ($q_m = 22.465 \text{ mg/ml}$ y $K_d = 0.0929 \text{ mg/ml}$). Puntos experimentales (■), isoterma de Langmuir (línea sólida).	50
18	Efecto del número de membranas sobre las curvas de ruptura del plásmido pCAT. Flujo de alimentación de 0.15 <i>ml/min</i> y concentración de entrada del plásmido de 0.2 <i>mg/ml</i> . 30 membranas (▲), 45 membranas (■).	52
19	Curva de dispersión y lavado para una columna con 30 membranas. La concentración de la solución de lisozima fue de 1.0 <i>mg/ml</i> y el flujo de 0.15 <i>ml/min</i> . 1 inicio de la etapa de lavado.	54
20	Curva de crecimiento celular de la cepa de <i>E. Coli</i> . con el plásmido pVR1012-NH36. Volumen inicial 100 <i>ml</i> , temperatura de 37 °C y agitación de 225 <i>rpm</i> . Puntos experimentales medidos a 600 <i>nm</i> (■), ecuación logística (línea sólida) con $\mu = 1.0412 \text{ h}^{-1}$ y $X_\infty = 1.31 \text{ g/l}$.	56
21	Curvas de adsorción, lavado y elución de la purificación del plásmido pRL-CMV a partir de un lisado de <i>E. Coli</i> . La columna se empacó con 0.5 <i>ml</i> de AMP-II y el flujo utilizado fue de 0.25 <i>ml/min</i> . 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la etapa de elución.	60
22	Curvas de adsorción, lavado y elución de la purificación del plásmido pRL-CMV a partir de un lisado de <i>E. Coli</i> . La columna se empacó con 0.5 <i>ml</i> de AMP-II y el flujo utilizado fue de 0.5 <i>ml/min</i> . 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la etapa de elución.	61
23	Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para la purificación del plásmido pRL-CMV a partir de un lisado de <i>E. Coli</i> . La columna se empacó con 0.5 <i>ml</i> del adsorbente macroporoso de intercambio iónico. El flujo usado fue de 0.5 <i>ml/min</i> . 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.	64
24	Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el primer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 <i>ml/min</i> y la columna se empacó con 30 membranas. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.	67
25	Análisis electroforético del primer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 <i>pb</i>). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución alimentada a la columna, 3 etapa de adsorción (16 <i>min</i>), 4 adsorción (35.5 <i>min</i>), 5 lavado (120 <i>min</i>), 6 lavado (125 <i>min</i>), 7 elución (134 <i>min</i>), 8 elución (140 <i>min</i>), 9 elución (150 <i>min</i>), 10 elución (163 <i>min</i>), 11 elución (254 <i>min</i>), 12 elución (260 <i>min</i>).	69
26	Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el segundo estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 <i>ml/min</i> y la columna se empacó con 30 membranas. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.	72

27	Análisis electroforético del segundo estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 pb). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución de alimentación, 3 adsorción (11.5 min), 4 adsorción (17.5 min), 5 adsorción (28.5 min), 6 elución (61 min), 7 elución (66 min), 8 elución (69 min), 9 elución (74 min), 10 elución (77.5 min), 11 elución (80 min), 12 elución (87.5 min).	73
28	Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 ml/min y la columna se empacó con 30 membranas. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.	76
29	Análisis electroforético del tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 pb). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución de alimentación, 3 adsorción (10.5 min), 4 adsorción (25 min), 5 adsorción (32.5 min), 6 lavado (47 min), 7 elución (62 min), 8 elución (64.5 min), 9 elución (67 min), 10 elución (69 min), 11 elución (72 min), 12 elución (74 min).	77
30	Análisis electroforético del tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 pb). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El carril 1 contiene el marcador, el 2 contiene la solución de alimentación. Todos los demás carriles están alimentados de muestras de la etapa de elución. A cada carril le corresponden los tiempos de: 3 (77 min), 4 (79 min), 5 (81.5 min), 6 (84 min), 7 (87 min), 8 (90 min), 9 (94 min), 10 (98 min), 11 (103 min), 12 (108 min).	78
31	Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el cuarto estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 ml/min y la columna se empacó con 30 membranas. La solución de alimentación a la columna fue obtenida del lavado de las muestras seleccionadas de la etapa de elución del tercer estudio de purificación del plásmido. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.	80
32	Análisis electroforético del cuarto estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 pb). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución alimentada a la columna, 3 adsorción (5 min), 4 elución (39.5 min), 5 elución (45.5 min), 6 elución (47.5 min), 7 elución (50 min), 8 elución (52.5 min), 9 elución (55 min), 10 elución (57.5 min), 11 elución (60 min), 12 elución (63 min).	82
33	Diagrama de flujo del bioproceso a escala para la producción y purificación de plásmidos, tomando como base el bioproceso desarrollado a nivel laboratorio.	85
34	Diagrama de flujo del bioproceso alternativo para la producción y purificación de plásmidos, con una etapa de precipitación de RNA con sulfato de amonio.	91

35	Gráfico de Gantt para dos lotes consecutivos del bioproceso de producción de plásmidos alternativo.	95
36	Costos de operación anual del proyecto alternativo para la producción y purificación de plásmidos.	98
37	Costos de operación anual por sección del bioproceso alternativo.	99
38	Período de retorno y retorno sobre la inversión a diferentes precios de venta del plásmido para el bioproceso alternativo.	102

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Cálculo de Inversión fija total (FC).	39
2	Costos de operación.	40
3	Volúmenes adicionados a cada reactor del stock del plásmido pCAT (5.2545 mg/ml), absorbancias iniciales de cada sistema a 254 nm (sin membranas) y concentraciones iniciales calculadas.	46
4	Datos generales del balance de masa total de cada reactor, así como los valores de concentración del plásmido en el equilibrio para las fases líquida y sólida.	49
5	Gradiente de elución utilizado en el estudio de purificación del plásmido pRL-CMV. El buffer de adsorción fue 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 M de NaCl en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA.	63
6	Gradiente de elución utilizado en el primer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El buffer de adsorción fue 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 M de NaCl en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA.	66
7	Gradiente de elución usado en experimentos de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El buffer de adsorción fue 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 M de NaCl en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA.	71
8	Gradiente de elución utilizado en el tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El buffer de adsorción fue 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 M de NaCl en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA.	75
9	Parámetros de evaluación.	84
10	Resultados de la evaluación económica del proyecto base.	89
11	Balances de masa total para la producción de pDNA (kg/año). El rendimiento en la recuperación de plásmidos es del 70 %.	93
12	Resultados de la evaluación económica del proyecto alternativo.	96
13	Flujo de efectivo (miles) del proyecto alternativo.	101

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AMP-II	Adsorbente macroporoso de intercambio iónico
BSA	Suero bovino de albúmina
BTC	Curvas de ruptura
c	Concentración de soluto en el seno del líquido (mg/ml)
c_0	Concentración inicial de soluto en el seno del líquido (mg/ml)
c_{eq}	Concentración de equilibrio en el seno del líquido (mg/ml)
D	Depreciación
Da	Daltons
DC	Inversión directa
DFC	Inversión fija directa
E	Coefficiente de extinción ($ml/mg-cm$)
<i>E. Coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
FC	Inversión fija total
gDNA	DNA genómico
IC	Inversión indirecta
ISR	Impuesto sobre la renta
K_d	Constante de disociación (mg/ml)
M	Molar
NMWL	Limite nominal de peso molecular
OC	Otras inversiones
pb	Pares de bases
PC	Costo de equipo
pDNA	DNA plasmídico
q	Concentración de soluto en el adsorbente (mg/ml)
q_{eq}	Concentración de equilibrio en el adsorbente (mg/ml)
q_m	Capacidad máxima del adsorbente (mg/ml)
SC	Capital de arranque
SDC	Curvas de dispersión del sistema
t	Tiempo (h)
TAE	Buffer 1x Tris-Acetate-EDTA
TIR	Tasa interna de rendimiento
TLC	Mano de obra
UAI	Utilidad antes de impuesto
UDI	Utilidad después de impuesto
UV	Ultravioleta
VPN	Valor presente neto
vvm	Volumen de aire por volumen de medio
WC	Capital de trabajo
X	Concentración celular (g/l)
X_∞	Concentración celular máxima (g/l)
X_0	Concentración celular inicial (g/l)
ZTM	Zona de transferencia de masa
μ	Velocidad máxima de crecimiento (h^{-1})

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud a la Universidad de Sonora. Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte brindado a través de la beca 200965, sin la cual no hubiese sido posible la realización de esta investigación. A la Universidad de Arizona y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo brindado en la elaboración de este proyecto. Agradezco profundamente a mis tutores Dr. Roberto Guzmán Zamudio, Dra. Rosa María Montesinos Cisneros y M.C. Patricia Guerrero Germán por su gran disposición y generoso apoyo en la cristalización de este trabajo. Mi mas amplio reconocimiento al Dr. Armando Tejeda Mansir por su esmero e invaluable apoyo en la dirección de esta investigación. Además, mi agradecimiento al Dr. Jaime Ortega López por su generosa disposición, así como al Dr. Eduardo P. Canseco Vilchis y la M.C. María Eugenia Rentería por su asistencia en el fotografiado de los geles de electroforesis. Finalmente, reconozco a todos mis maestros y compañeros por su gran dedicación y apoyo.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

En la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de bioprocesos, particularmente por la necesidad de encontrar aplicaciones útiles en la prevención y tratamiento de enfermedades. Algunas de estas tendencias consisten en la transferencia de genes a células del cuerpo humano para que codifiquen la síntesis de alguna proteína, que al expresarse, realiza una acción inmunizante o terapéutica.

El uso de plásmidos para la producción a gran escala de vacunas de DNA esta orientado a la prevención de enfermedades como la malaria, hepatitis B, influenza y SIDA, para las cuales no existen vacunas aún, o su costo es muy elevado [1,2]. Se considera que las vacunas de esta nueva generación serán más seguras, baratas, y más fáciles de producir que las convencionales [3]. Otra aplicación de los plásmidos es en terapia génica, donde se usan para el tratamiento de enfermedades hereditarias monogénicas o adquiridas, como la hemofilia, la fibrosis cística, cáncer, problemas vasculares y desórdenes neurológicos [4,5]. Al presente en México se realizan diversos trabajos en estas áreas. Se ha reportado que cuando se inmunizan hamsters con los plásmidos, pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112, se obtiene una inducción temprana y alta de la anti-*Entamoeba histolytica* IgG, apoyando la factibilidad del uso de estos plásmidos en la producción de una vacuna para combatir la amibiasis [6]. Asimismo, ha sido reportado el uso del plásmido pVR1012-NH36 como vacuna contra la *leishmaniasis* [7].

Un prerrequisito para el uso efectivo de la vacunación o de la terapia génica con DNA es la transferencia eficiente del material genético a la célula receptora. Actualmente, alrededor del 24% de los protocolos en desarrollo emplean plásmidos superenrollados como vehículos de transferencia debido a que éstos son más eficientes en la

transferencia del material genético, que otro tipo de plásmidos, ya que ofrecen mayores ventajas de seguridad y de aplicación que los vectores de tipo viral [8]. Según China Daily via FDA News, 13 March 2004, la demanda proyectada para el uso de pDNA superenrollado en vacunas y terapia génica para el año 2007 es de más de 10 kg por año y su mercado, para el año 2010, de 45,000 millones de dólares [9]. Esto ha propiciado una gran actividad de investigación y desarrollo de bioprocesos de producción económicos de plásmidos que cumplan con las regulaciones impuestas para su uso terapéutico [8,10-13].

El incremento en la demanda de plásmidos para uso médico evidencia la necesidad de encontrar bioprocesos de producción escalables a bajos costos. Cuando se escala un bioproceso de producción de pDNA se genera una serie de retos que van desde la fermentación hasta la purificación final. Estos bioprocesos generalmente se inician a nivel laboratorio con la construcción y selección del vector de expresión adecuado, el microorganismo productor y las condiciones de fermentación para el crecimiento celular (upstream processing). Posteriormente, se llevan a cabo las operaciones de aislamiento y purificación (downstream processing). En el desarrollo de la etapa de aislamiento y purificación del plásmido se debe establecer un esquema de purificación que permita cumplir con las especificaciones recomendadas, y que asegure la validación del bioproceso [2,12].

Tradicionalmente, la purificación de DNA plasmídico se ha realizado a escala laboratorio utilizando químicos como EtBr, CsCl y fenol. Sin embargo estos métodos son difíciles de escalar y los reactivos que se utilizan son tóxicos, por lo que no es factible utilizarlos para la purificación de plásmidos de uso médico. En la purificación de plásmidos se utilizan técnicas cromatográficas que por cuestiones regulatorias participan en todos los esquemas de separación de los mismos, además de que son opciones económicas y prácticas. Recientemente, se han revisado los tipos de cromatografía que han sido utilizados para la purificación de plásmidos a escala laboratorio [14-16].

En el paso cromatográfico, la adsorción del plásmido se realiza sobre una matriz adsorbente. Para tal efecto, generalmente se emplean partículas porosas, pero estas normalmente están diseñadas para la adsorción de proteínas, por lo que existe la tendencia a probar otras geometrías en los adsorbentes, como es el caso de partículas macroporosas y membranas, donde se ha demostrado que tienen ventajas sobre los sistemas porosos tradicionales para biomoléculas grandes como los plásmidos [17,18]. Asimismo, varios autores coinciden que al utilizar procesos cromatográficos, el mecanismo de adsorción de intercambio iónico ofrece ventajas para la purificación de plásmidos a escala preparativa o industrial [19].

Cuando se trata de escalar un bioproceso desarrollado a nivel laboratorio, es posible que éste no sea técnica o económicamente viable. Para una escala dada, es posible que algunas operaciones de laboratorio no sean apropiadas para su uso industrial o bien el costo de producción unitario sea muy alto. Una herramienta muy utilizada actualmente para realizar estudios de factibilidad técnico-económica de bioprocesos es el paquete SuperPro Designer [20].

En esta investigación se desarrolló y evaluó un nuevo bioproceso para la producción de DNA plasmídico. Se estableció un esquema de proceso para la producción de plásmidos utilizando medios cromatográficos novedosos. Se investigó experimentalmente la secuencia de operaciones, principalmente las etapas cromatográficas. Los resultados experimentales sirvieron de base para el escalamiento del bioproceso. La factibilidad técnico-económica se analizó mediante la simulación del bioproceso.

1.2 Objetivos

Objetivo General

El objetivo general de esta investigación fue desarrollar y escalar un bioproceso para la producción plásmidos de uso médico utilizando sistemas cromatográficos macroporosos.

Objetivos Específicos

- Preparar y estudiar las propiedades de las matrices en el sistema de adsorción: isoterma, curva de ruptura y dispersión.
- Desarrollar experimentalmente un bioproceso para la propagación y purificación de plásmidos para la obtención de datos de diseño.
- Escalar el bioproceso para evaluar su factibilidad técnico-económica.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Los Plásmidos y sus Aplicaciones

Los plásmidos (pDNA), son moléculas pequeñas de DNA de doble cadena unidas covalentemente, que se encuentran en las bacterias y son independientes del DNA genómico (gDNA). Cada cadena del plásmido es un polímero lineal de desorribonucleotidos unidos por enlaces fosfodiester [14]. Estos plásmidos no son esenciales para la supervivencia de las bacterias pero pueden codificar para uno o más genes que les proporcionen ventajas bajo ciertas condiciones ambientales, como es el caso de resistencia a antibióticos, metales pesados, entre otros. Los plásmidos tienen la capacidad de poder ser transferidos de un organismo a otro, incorporarse en el genoma del huésped o pueden seguir siendo independientes en el protoplasma del mismo. Cada plásmido tiene por lo menos una secuencia de DNA que sirve como origen de replicación (un punto de partida para la replica del DNA), que permite al DNA del plásmido duplicarse independientemente del DNA cromosomal.

Recientemente se ha reportado que las muertes al año por tuberculosis son de tres millones, las de malaria de dos millones y las del SIDA de un millón [2]. En la actualidad, el uso de plásmidos para la producción a gran escala de vacunas de DNA esta orientado a la prevención de enfermedades como las mencionadas, para las cuales no existen vacunas aún, o su costo es muy elevado [1]. Se considera que las vacunas de esta nueva generación serán más seguras, baratas, y más fáciles de producir que las convencionales [3]. Otra aplicación de los plásmidos es en terapia génica, donde se introducen genes en células del cuerpo humano. Estos genes, al expresarse codifican y realizan una acción terapéutica, como el tratamiento de enfermedades hereditarias monogénicas o adquiridas, como la hemofilia, la fibrosis quística, cáncer, problemas vasculares y desórdenes neurológicos [4,5]. Actualmente en México se realizan diversos

trabajos en estas áreas. Se ha reportado que cuando se inmunizan hamsters con los plásmidos, pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112, se obtiene una inducción temprana y alta de la anti-*Entamoeba histolytica* IgG, apoyando la factibilidad del uso de estos plásmidos en la producción de una vacuna para combatir la amibiasis [6]. Asimismo, ha sido reportado el uso del plásmido pVR1012-NH36 como vacuna contra la *leishmaniasis* [7].

Los plásmidos utilizados con fines terapéuticos y de prevención, exhiben tres partes básicas en su conformación: el gen de resistencia a antibióticos, el gen insertado y el origen de replicación. En la Figura 1 se presenta la conformación del plásmido pVR1012-NH36.

Un prerrequisito para el uso efectivo de la terapia génica o de la vacunación con DNA es la transferencia eficiente del material genético a la célula receptora. Actualmente, alrededor del 24% de los protocolos en desarrollo emplean plásmidos superenrollados como vehículos de transferencia debido a que éstos son más eficientes en la transferencia del material genético, que otro tipo de plásmidos, ya que ofrecen mayores ventajas de seguridad y de aplicación que los vectores de tipo viral [8].

Cuando se escala un bioproceso de producción de pDNA se genera una serie de retos que van desde la fermentación hasta la purificación final. Estos bioprocesos generalmente se inician a nivel laboratorio con la construcción y selección del vector de expresión adecuado, el microorganismo productor y las condiciones de fermentación para el crecimiento celular (upstream processing) [21,22]. Posteriormente, se llevan a cabo las operaciones de aislamiento y purificación (downstream processing). En el desarrollo de la etapa de aislamiento y purificación del plásmido se debe establecer un esquema de purificación que permita cumplir con las especificaciones recomendadas, y que asegure la validación del bioproceso [2,12].

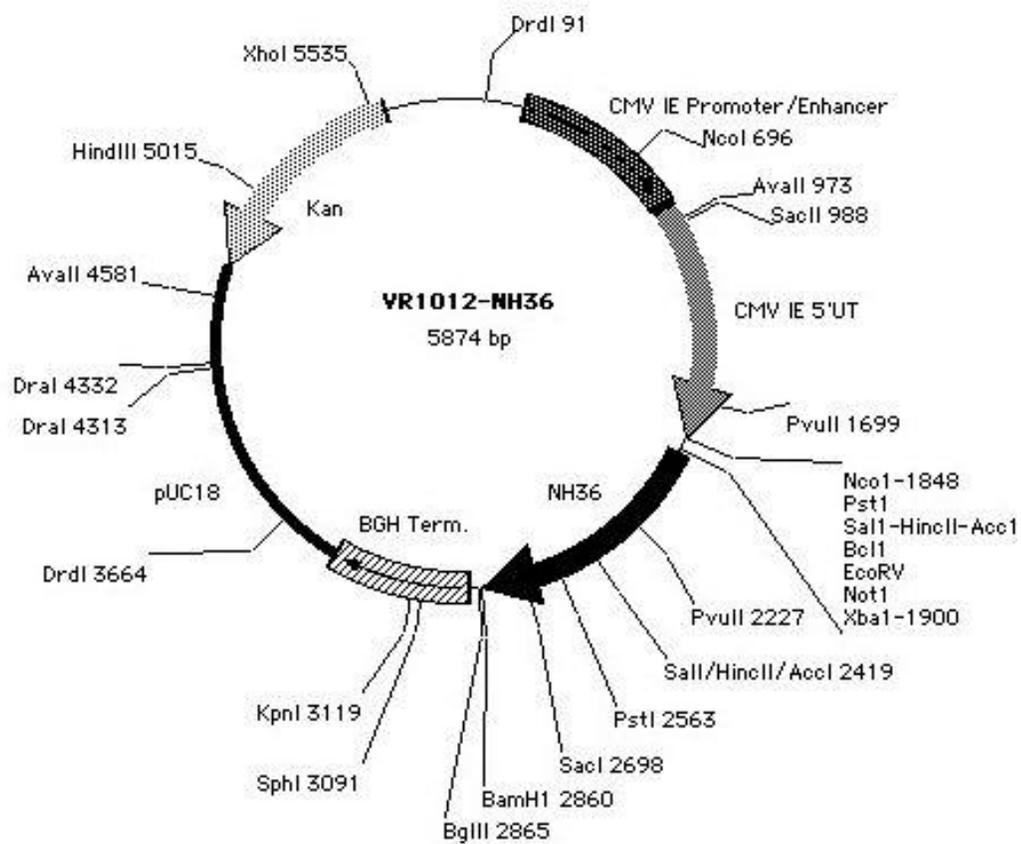


Figura 1. Conformación Estructural del Plásmido pVR1012-NH36

Tradicionalmente, la purificación de DNA plasmídico a escala laboratorio se ha realizado utilizando químicos como EtBr, CsCl y fenol. Sin embargo estos métodos son difíciles de escalar y los reactivos que se utilizan son tóxicos, por lo que no es factible utilizarlos para la purificación de plásmidos de uso médico. Las especificaciones y regulaciones para el producto e impurezas en estos bioprocesos son: el RNA no debe ser visible en gel de agarosa al 0.8%; gDNA < 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de plásmido; proteínas < 0.01 $\mu\text{g}/\text{dosis}$; endotoxinas < 0.1 EU/ μg de plásmido; plásmidos superenrollados > 90% [2,14].

2.2 Propagación y Purificación de Plásmidos

La elección de la cepa de la bacteria para la replicación del plásmido y las características del plásmido mismo, inciden en el rendimiento del proceso de producción de la biomolécula, así como también la proporción en la que se presentan las diferentes isoformas del pDNA [10,23]. Uno de los objetivos que se persigue cuando se diseña un proceso de fermentación para plásmidos, es el maximizar los rendimientos tanto volumétrico (mg/l) como específico (mg/g) del plásmido superenrollado. La optimización del rendimiento volumétrico permite llevar a cabo fermentaciones más pequeñas y menos costosas, mientras que la optimización del rendimiento específico mejora la pureza [24].

La cuantificación de la concentración celular en un medio de cultivo es esencial para la determinación de la cinética y estequiometría del crecimiento celular. En un cultivo batch cuando se grafican los datos de concentración celular contra tiempo se forma la curva típica de crecimiento. Un modelo muy empleado para el tratamiento de datos experimentales de curvas de crecimiento es la ecuación logística (Ec. 1), la cual se obtiene combinando la ecuación de Monod con la ecuación de crecimiento celular y una ecuación para el rendimiento de masa celular basada en el consumo de sustrato. La combinación de estas ecuaciones se integra asumiendo un rendimiento de metabolismo no endógeno.

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

La etapa de recuperación primaria del plásmido comprende la cosecha de células, una lisis alcalina, una clarificación mediante la filtración de los restos celulares y un lavado y concentración mediante diafiltración, para eliminar moléculas de bajo peso molecular y sales. Se ha reportado que las mejores condiciones para llevar a cabo la lisis consisten en utilizar una solución de NaOH entre 0.08 y 0.09 *M*. A concentraciones mayores de 0.15 ±0.03 *M* NaOH (pH 12.9 ±0.2), ocurre la desnaturalización irreversible del plásmido superenrollado [25]. La clarificación del lisado se ha realizado utilizando un sistema de dos filtros. Para eliminar las sales y realizar el proceso de lavado del extracto en menor tiempo se recomienda utilizar ultrafiltración tangencial [17].

Para satisfacer las normas que se imponen al uso terapéutico o en vacunas del pDNA, los esquemas de los procesos de purificación deben involucrar el uso de al menos una operación cromatográfica. Las propiedades de la molécula de DNA tales como tamaño, carga, hidrofobicidad, accesibilidad de las bases de nucleótidos a los ligandos y las restricciones de forma impuestas por el enrollado de la molécula, son características que deben explotarse en la interacción del ácido nucleico con el soporte de la matriz cromatográfica. La decisión de utilizar uno o más pasos cromatográficos está determinada por la naturaleza y distribución de las impurezas residuales, así como también por la cantidad de plásmido esperada. Algunas técnicas cromatográficas que pueden ser utilizadas para este efecto son: exclusión por tamaño, fase reversa, afinidad, interacción hidrofóbica e intercambio iónico [4].

La cromatografía convencional en columnas empacadas con partículas presenta serias limitaciones de capacidad de adsorción de plásmidos, ya que la adsorción de éstos, se ha demostrado experimentalmente que ocurre únicamente en la superficie de las partículas debido a su gran tamaño [2,9,12,26-28]. Los plásmidos cuya longitud oscila entre 5 y 20 *kb*, son moléculas muy grandes comparadas con las proteínas, para las que se diseñaron

esos adsorbentes. Típicamente, el diámetro hidrodinámico de los plásmidos es de 200 *nm* [5], mientras que el tamaño de poro de los adsorbentes convencionales es de 400 *nm*.

Una forma de evaluar la capacidad de los adsorbentes es utilizando isothermas, las cuales evalúan puntos de equilibrio. A los puntos de equilibrio se les ajusta un modelo para obtener los parámetros de adsorción. Un modelo muy utilizado para estos fines es el de Langmuir (Ec. 2).

$$q_{eq} = \frac{q_m \cdot c_{eq}}{(K_d + c_{eq})} \quad (2)$$

Las tecnologías de perfusión en partículas, las partículas macroporosas y las membranas han sido propuestas recientemente como una alternativa para solucionar los problemas de baja productividad y alta caída de presión, que se presentan en la cromatografía convencional que utiliza partículas que presentan únicamente poros difusivos [29,30]. Los sistemas de perfusión operan en modo convectivo, es decir, la solución que contiene el soluto de interés, que puede ser una proteína o DNA, se pone en contacto directo con el sitio de adsorción. Esto reduce significativamente las limitaciones difusionales y la caída de presión. Como consecuencia, el comportamiento del sistema se mejora significativamente [31,32].

Estudios experimentales reportados en la literatura indican que los adsorbentes de partículas macroporosas presentan una mayor capacidad para la adsorción de plásmidos que los adsorbentes convencionales [18]. Sin embargo son escasos los reportes en la literatura de datos de diseño para establecer el comportamiento de la adsorción en este tipo de materiales. Es necesario realizar estudios básicos de la adsorción de pDNA en sistemas de lotes y en columna mediante un enfoque basado en fenómenos de transporte donde se combinen modelos y experimentos. Estos modelos permitirán simular el comportamiento de estos sistemas y contribuirán al diseño más racional de los procesos.

En investigaciones realizadas por Theeters y col., [33] se reportan capacidades de membranas perfusivas de un orden de magnitud mayor que las capacidades típicas

reportadas para plásmidos en partículas porosas. La cromatografía de membranas basada en el uso de poros perfusivos, permite el flujo convectivo del soluto al sitio de adsorción, consecuentemente disminuye el tiempo de residencia en la columna y se alcanza una mayor productividad en los procesos [9,17,33-37].

Las etapas cromatográficas, generalmente se operan de modo frontal, donde la muestra se alimenta continuamente. En el primer período de tiempo el soluto en la alimentación se adsorbe casi completamente. Sin embargo después de cierto tiempo, la concentración de soluto a la salida de la columna se incrementa con el tiempo. La dinámica de la columna es resultado de las complejas interacciones de equilibrio, no-idealidad del flujo, velocidades de transferencia de masa finitas y de la cinética de adsorción de la misma. Como consecuencia, después de un cierto tiempo de proceso coexisten dentro de la columna las zonas: de equilibrio, no-utilizada y la de transferencia de masa (ZTM). Gran parte de la información requerida para evaluar el comportamiento de la columna está contenida en las gráficas típicas de concentración de soluto a la salida de la columna contra tiempo, llamadas “curvas de ruptura” (Fig. 2). Esas gráficas pueden ser utilizadas para determinar: (1) la capacidad utilizada de la columna, (2) las pérdidas de soluto en el efluente, y (3) el tiempo de proceso: esta es la información requerida para optimizar la separación [31].

En la purificación de plásmidos superenrollados una de las operaciones más utilizadas es la cromatografía de intercambio iónico (AEC de sus siglas en inglés). Esta, aprovecha la interacción entre los grupos fosfato del DNA, negativamente cargados, y los ligandos positivamente cargados de la superficie de la matriz. Estas interacciones pueden ser controladas variando las condiciones del pH o la fuerza iónica de la solución en la cual se encuentra el soluto de. Al finalizar la etapa de adsorción se aplica un gradiente salino para desorber los diferentes ácidos nucleicos, que eluyen en orden ascendente a su carga neta. Los plásmidos con formas superenrolladas que son más compactas y tienen una mayor densidad de carga, eluyen después que los plásmidos de forma circular abierta, los cuales tienen una baja densidad de carga [38].

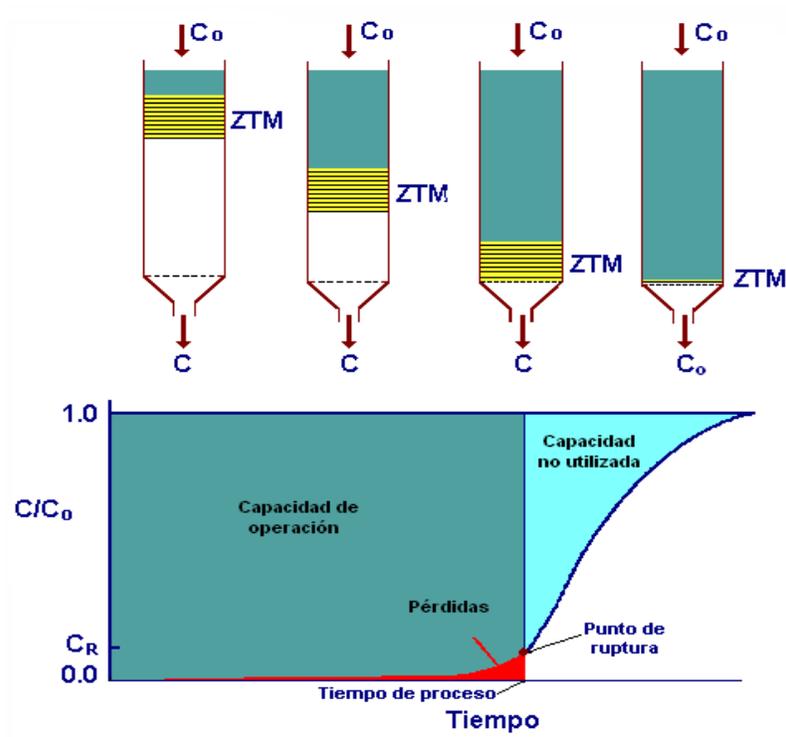


Figura 2. Proceso de adsorción frontal en una columna y curva de ruptura.

2.3 Simulación de Bioprocesos

Las simulaciones computacionales de bioprocesos están ganando auge en la industria biotecnológica. Usando herramientas de simulación, ingeniería y operación las compañías pueden identificar posibles cuellos de botella en los procesos y tomar acciones correctivas. Una característica de estos simuladores es que se pueden realizar estudios de escalamiento y evaluar económicamente al proceso. Las simulaciones son hechas en paquetes computacionales como Aspen, SuperPro Designer, entre otros. Dichas simulaciones tienen un rango muy grande de aplicaciones, desde modelos simples hasta modelos dinámicos.

El análisis de bioprocesos completos se lleva a cabo utilizando un amplio rango de herramientas de simulación. Estas simulaciones se usan para investigar modelos complejos y la integración de operaciones bioquímicas sin la necesidad de una extensiva experimentación [39].

Maitra y col. [40], llevaron a cabo un diseño de una planta industrial para la producción de γ -interferon, para ello utilizaron el simulador SuperPro Designer. En su estudio realizaron evaluaciones para una producción de γ -interferon de 337 kg/año y pudieron hacer un análisis económico y de sensibilidad de su planta industrial.

Freitas y col. [41], trabajaron en el diseño de una planta industrial para la producción de plásmidos, este diseño fue llevado a cabo en el paquete SuperPro Designer. El bioproceso de producción que utilizan contiene operaciones de precipitación con alcohol isopropílico y cromatografía de interacción hidrofóbica. Para su estudio plantean una demanda de plásmido de 23.2 kg/año. Después de una evaluación económica concluyen que su bioproceso es económicamente viable.

El paquete de simulación se elige dependiendo del nivel de detalle y aplicabilidad que se requiera. Por otro lado, el costo de esta paquetería varía de acuerdo a sus alcances en estos ámbitos. El paquete SuperPro Designer ofrece las herramientas necesarias para el diseño y evaluación de bioprocesos [42,43].

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Los reactivos utilizados en todos los experimentos fueron grado analítico o mayor. En los estudios básicos de adsorción de plásmidos se utilizó como macromolécula modelo el plásmido pCAT (4465 *pb*) Promega (Madison, WI). En los experimentos de dispersión en columna se usó la proteína lisozima (PM 14,000 *Da*) adquirida de Sigma Chemical Co. En la producción de plásmidos se utilizaron la cepa de *E. Coli JM109* con el plásmido pRL-CMV (4079 *pb*) proporcionada por la Universidad de Arizona y la cepa de *E. Coli* con el plásmido pVR1012-NH36 (5874 *pb*) proporcionada por CINVESTAV. En la propagación de las cepas se utilizaron los medios LB y 2TY, respectivamente. Estos medios fueron adicionados con ampicilina para prevenir el crecimiento de otra cepa.

El buffer de adsorción en todos los experimentos fue 10 *mM* Tris[hidroximetil]-aminometano (PM 121.14) y 1.0 *mM* EDTA (PM 292.25) a pH = 8.0. El buffer de elución fue una solución 2 *M* de NaCl preparada en buffer de adsorción a pH = 8.0. Éstos buffers fueron pasados a través de un microfiltro Gelman Science (Ann Arbor, Mich.) de 0.45 μm y se desgasificaron antes de su uso.

En la purificación del plásmido pRL-CMV se utilizó un adsorbente macroporoso (AMP-II), el cual se preparó utilizando Novarosa SE-10000/40 y cloruro de glicidil-trimetilamonio para la activación. Para evaluar el comportamiento del adsorbente, se realizó un estudio de adsorción usando albúmina de suero de bovino (BSA de sus siglas en inglés) adquirida de Sigma Chemical Co.

En la purificación del plásmido pVR1012-NH36 se usaron membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro nominal de 800 *nm*, las cuales, se cortaron a un diámetro de 5 *mm* utilizando un sacabocados. Las membranas se utilizaron solamente una vez y se acondicionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. En los estudios electroforéticos se utilizó el marcador Lamda Hind III de Stratagene.

3.2 Equipo

En los cultivos en matraz se utilizó una incubadora (orbital shaker incubator). En la propagación de la cepa de *E. Coli JM109* con el plásmido pRL-CMV, se manejó al biorreactor BioFlo 3000 de New Brunswick Scientific Co., Inc. de 1.5 *l*. Para la propagación de la cepa de *E. Coli* con el plásmido pVR1012-NH36 se usó un biorreactor de 2 *l*. La recuperación de la masa celular se realizó en un centrifuga Biofuge Stratos Heraeus.

En la clarificación, primero se pasó la solución por un filtro Millex-SV 5.0 μm y después por un Millex-HV Filter, 0.45 μm . Después, la solución se pasó con ayuda de nitrógeno puro, por un sistema de diafiltración amicon de Millipore con una membrana de la misma marca, fabricada con polietersulfona y de 10000 NMWL.

El equipo usado para llevar a cabo el paso cromatográfico del plásmido pRL-CMV consistió en una bomba de pistón conectada a una columna 0.5 \times 5 *cm* Pharmacia Amersham Biosciences con soporte de lecho, el cual sirvió como distribuidor de flujo. La columna estaba conectada a un detector UV con monitor de computadora.

El equipo utilizado en los experimentos cromatográficos del plásmido pVR1012-NH36 fue el BioRad Biological LP Chromatography con monitor de computadora. Para los experimentos de flujo se empleó una tubería Tygon de diámetro interno de 0.8 *mm*. La longitud de la tubería se redujo lo más posible y la calibración de la velocidad de flujo se verificó antes de todos los experimentos. Al equipo se conectó una columna 0.5 \times 5 *cm*

Pharmacia Amersham Biosciences con soporte de lecho, el cual sirvió como distribuidor de flujo.

En los estudios electroforéticos se utilizó una cámara horizontal de electroforesis GT mini-gel casting system de Biorad, y el gel de agarosa se fotografió utilizando un equipo Trans UV de Biorad.

3.3 Preparación de Matrices y Columnas

En esta investigación los procesos de purificación de plásmidos se realizaron con matrices adsorptivas de macroporo y membranas perfusivas, las cuales fueron acondicionadas de acuerdo a los procedimientos que se describen a continuación.

3.3.1 AMP-II y Columnas

En los estudios de adsorción de plásmido, se utilizó un adsorbente macroporoso al que se le acopló la amina cuaternaria glicidil-trimetil-amonio (Q), la cual le confiere carácter de intercambiador iónico. En el procedimiento se tomaron 5 g de Novarosa SE-10000/40 y se lavaron con agua. Seguidamente se mezclaron con 5 ml de cloruro de glicidil-trimetil-amonio y 5 ml de una solución de 0.6 M NaOH con 10 mg de borohidruro de sodio. A continuación se mezcló la suspensión por 8 h a 25 °C y después se lavó con 50 volúmenes de agua [18, 19, 44-46]. La columna se empacó con 0.5 ml de AMP-II preparado. Para evaluar el comportamiento del AMP-II se realizó un estudio de adsorción usando BSA.

3.3.2 Membranas y Columnas

Se utilizaron membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro nominal de 800 nm. Las membranas se utilizaron solamente una vez y se acondicionaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las membranas Mustang Q se cortaron a 0.5 cm de diámetro utilizando un sacabocados. A continuación se sumergieron en 1.0 M NaOH por 5 min, agitando suavemente. Al

terminar el período se retira el NaOH y se enjuagan las membranas con 2 *ml* de 1.0 *M* NaCl. Posteriormente se sumergen las membranas en una solución de 1.0 *M* NaCl por 5 *min*, agitando suavemente. Al final de este período se retira la solución de NaCl y se enjuagan dos veces con buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0. Por último, las membranas se dejan reposar por aproximadamente 12 *h* en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0. para que se equilibren previamente a su uso. En la Figura 3 se observa el cortado y acondicionamiento de las membranas, además para los estudios en columna se muestra como se colocaron en el interior de la columna una a una utilizando un émbolo.

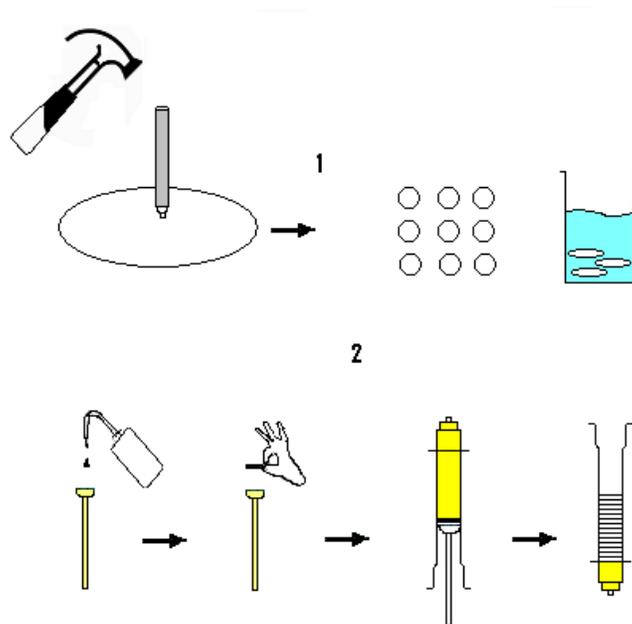


Figura 3. Preparación de la columna de membranas. 1 Cortado y acondicionamiento de las membranas. 2. Empaque.

3.4 Estudios Básicos de Adsorción con Plásmidos Modelo

Una parte básica del trabajo realizado consistió en investigar el proceso de adsorción de plásmidos en columnas de membranas utilizando el plásmido puro pCAT. Para tal efecto se obtuvieron isothermas de adsorción, curvas de ruptura y dispersión.

3.4.1 Isotherma

Para obtener la isoterma de adsorción del sistema experimental se utilizaron 8 reactores batch. A cada uno se le agregó inicialmente 25 *ml* de buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 y se les colocaron 60 membranas Mustang Q cortadas a 0.5 *cm* de diámetro y previamente acondicionadas. Para iniciar el experimento, se adicionaron diferentes pulsos a cada reactor de una solución stock de 5.2545 *mg/ml* del plásmido pCAT. Los pulsos agregados fueron de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 y 1.6 *ml*, respectivamente. Durante el experimento se muestreo cada reactor a intervalos de 12 *h* para medir la absorbancia de la fase líquida, mediante recirculación continua de la solución por un detector UV a 254 *nm*. Cada sistema se consideró en equilibrio cuando dos lecturas consecutivas de absorción resultaron prácticamente iguales. La cantidad del plásmido adsorbido en cada punto se calculó mediante un balance de masa total y los valores se utilizaron para generar la isoterma de adsorción.

3.4.2 Curvas de Ruptura

Para la obtención de las curvas de ruptura (BTC de sus siglas en inglés), se empacó la columna cromatográfica con membranas Mustang Q. A continuación se conectó al sistema hidráulico del equipo BioRad BioLogic LP. Para investigar el efecto del tiempo de residencia en la columna sobre la curva de ruptura del sistema pCAT-membranas se empacaron columnas con 30 y 45 membranas y el flujo se mantuvo constante a 0.5 *ml/min*. Las columnas fueron preequilibradas con 10 volúmenes de buffer de adsorción, estableciéndose la línea base. Al tiempo cero se alimentó una solución de pCAT 0.2 *mg/ml* en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA. El experimento se continuó hasta que no se

observaron cambios en la concentración de salida de la columna c . Al final del experimento se midió c_0 y los datos se graficaron en forma normalizada.

3.4.3 Experimentos de Dispersión

Para obtener las curvas de dispersión del sistema (SDC de sus siglas en inglés), inicialmente la columna se empacó con 30 membranas Mustang Q. Después se conectó al sistema hidráulico del equipo BioRad BioLogic LP. A continuación se preequilibró la columna con 10 volúmenes de buffer de elución y se estableció la línea base. Al tiempo cero se alimentó una solución de lisozima de 1 mg/ml preparada en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA + 1.0 M NaCl a un flujo constante de 0.5 ml/min . El experimento se continuó hasta que se formó la curva de dispersión y los valores registrados por el detector UV fueron prácticamente constantes. Posteriormente se inició el lavado de la columna con el buffer de elución 10 mM Tris/1.0 mM EDTA + 1.0 M NaCl. Por último se graficaron los datos en forma normalizada usando un coeficiente de extinción de 2.02 $ml/mg-cm$ para convertir los valores de Abs_{280 nm} a valores de concentración de lisozima.

3.5 Producción de Plásmidos

En esta parte de la investigación, se trabajó en cultivos por lotes en matraz y biorreactor de cepas bacterianas que contenían un plásmido de interés.

3.5.1 Diagrama de Bloques

En la Figura 4 se presentan las etapas utilizadas en los procesos de producción de plásmidos a partir de la cepa hospedera, mismas etapas que describen para los casos estudiados.

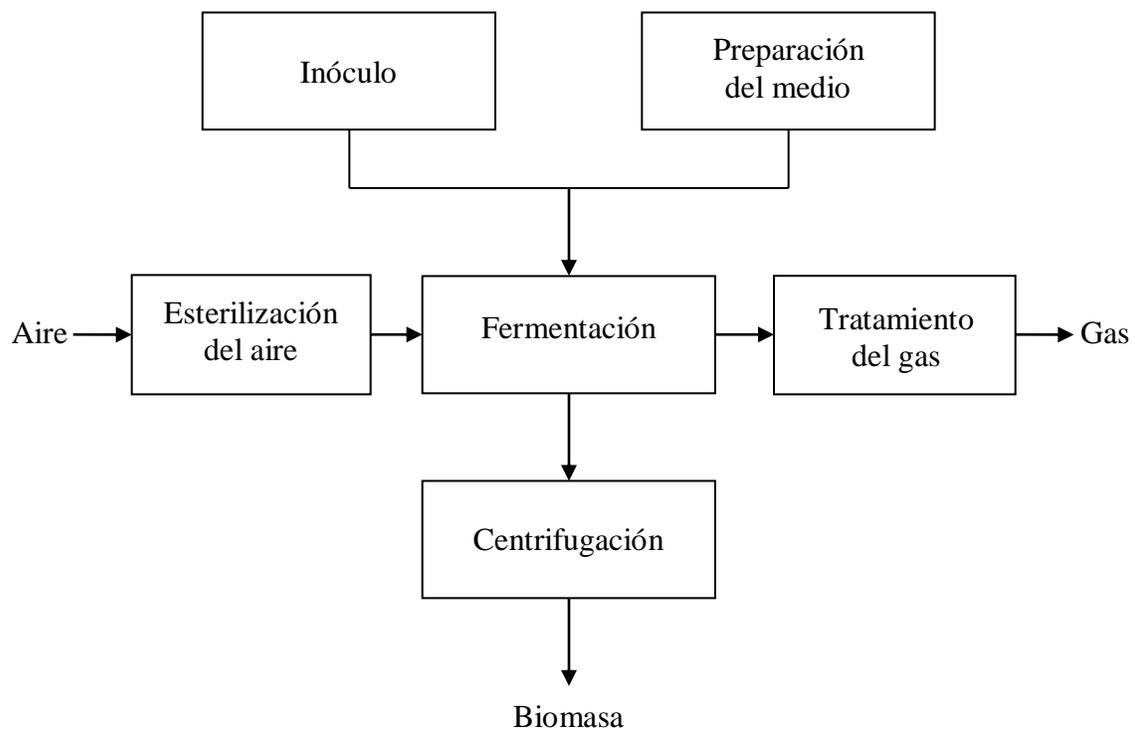


Figura 4. Diagrama de bloques del proceso de producción de plásmidos a partir de la cepa hospedera.

3.5.2 Crecimiento Celular

La producción de plásmidos para esta investigación se realizó utilizando la cepa *E. Coli JM109* con el plásmido pRL-CMV y la cepa *E. coli* con el plásmido pVR1012-NH36, usando los medios de cultivo LB y 2TY, respectivamente. En ambos cultivos se utilizó ampicilina para limitar el crecimiento de otra cepa. Los inóculos fueron preparados en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio.

En la propagación de la cepa de *E. Coli JM109* que contenía al plásmido pRL-CMV, se utilizó al biorreactor BioFlo 3000 de New Brunswick Scientific Co., Inc. de 1.5 l (Fig. 5) y en la propagación de la cepa de *E. coli* con el plásmido pVR1012-NH36, se trabajó en un biorreactor de 2 l (Fig. 6).

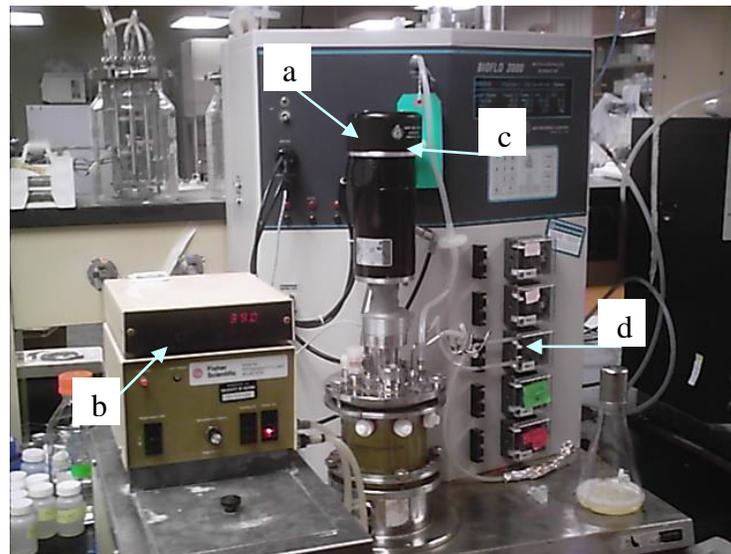


Figura 5. Biorreactor BioFlo 3000 utilizado para cultivar a la cepa de *E. Coli JM109* con el plásmido pRL-CMV. a. Agitador, b. Control de temperatura, c. Mangueras de aire estéril, d. Bomba peristáltica.

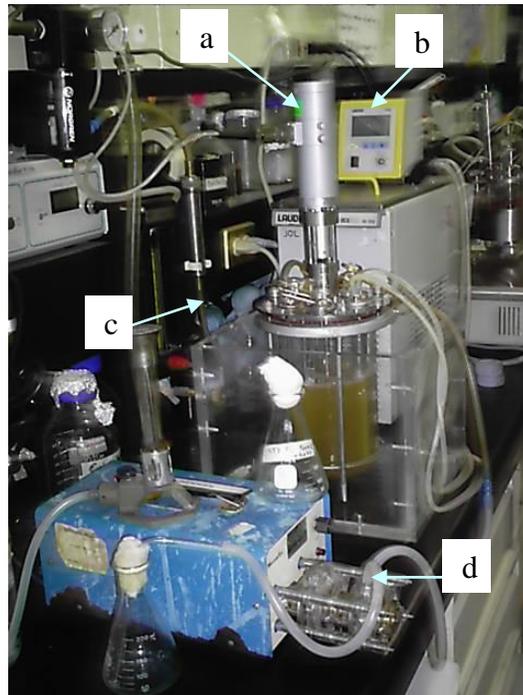


Figura 6. Fermentador de 2 l utilizado para cultivar a la cepa de *E. coli* con el plásmido pVR1012-NH36. a. Agitador, b. Control de temperatura, c. Mangueras de aire estéril, d. Bomba peristáltica.

Para realizar la propagación celular, se esterilizó al biorreactor junto con el medio de cultivo. Después se conectaron los periféricos al fermentador (mangueras de aire, bomba peristáltica, chaqueta eléctrica y agitador). Para prevenir la contaminación del fermentador y evitar la formación de espuma, con el mechero encendido, se agregó al biorreactor una solución de ampicilina (hasta alcanzar una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ en el biorreactor) y 100 μl de antiespumante. Seguidamente, se inoculó al biorreactor agregando 100 ml de inóculo por medio de la bomba peristáltica. La fermentación se realizó agregando 1.5 vvm de aire estéril a 2.0 psi , 37 $^{\circ}\text{C}$ y 300 rpm .

Después de 24 horas de crecimiento celular en el biorreactor (en ambas fermentaciones), se procedió a recuperar la pasta celular. Se colocó el caldo de la fermentación en botellas de 150 ml y se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura en una centrifuga Biofuge Stratos Heraeus. A continuación se retiró el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA pH = 8.0 (6 ml aprox.). Lo siguiente fue volver a centrifugar a las mismas condiciones y retirar el sobrenadante. Por último, cuando la pasta celular no va a tener un uso inmediato, se congela a -70 $^{\circ}\text{C}$ en poca solución de buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA pH = 8.0 con un 15% de glicerol.

3.5.3 Cinética de Crecimiento

Para tener una descripción más detallada del crecimiento celular, se obtuvo y modeló la curva de crecimiento de la cepa de *E. coli* con el plásmido pVR1012-NH36. En el experimento se usó un matraz de 500 ml , donde se prepararon 100 ml de medio 2TY y se esterilizaron en la autoclave por 20 min a 15 psi . En seguida se agregó 0.1 ml de una solución de ampicilina (0.1 mg/ml) y se homogenizó. A continuación se tomó 1 ml de muestra del matraz (medio más ampicilina) y se leyó la absorbancia a 600 nm . Después se añadió al matraz 1 ml de inóculo con la bacteria de interés y se homogenizó. Lo siguiente fue tomar 1 ml de muestra del matraz y leerle la absorbancia a 600 nm . Posteriormente se colocó el matraz en la incubadora (orbital shaker incubator) a 225 rpm y 37 $^{\circ}\text{C}$ como se muestra en la Figura 7. Para realizar el estudio se tomó 1 ml de muestra cada hora y se le leyó la absorbancia a 600 nm .



Figura 7. Crecimiento en matraz usando una incubadora (orbital shaker incubator) a condiciones de 225 rpm y 37 °C.

3.6 Recuperación y Purificación de Plásmidos

En esta sección del trabajo se describen los procedimientos para llevar a cabo la recuperación y purificación de plásmidos. Estos procedimientos abarcan técnicas como rompimiento celular, clarificación, lavado y por último uno o más pasos cromatográficos. En la cromatografía de intercambio iónico se trabajó con partículas macroporosas y sistemas de membranas.

3.6.1 Diagrama de Bloques

En la Figura 8 se presentan las etapas involucradas en el proceso de recuperación y purificación de plásmidos a partir de una cepa hospedera. Los pasos implicados en el proceso son la resuspensión de células, lisis alcalina, neutralización, filtración primaria, microfiltración, diafiltración y cromatografía de intercambio iónico.

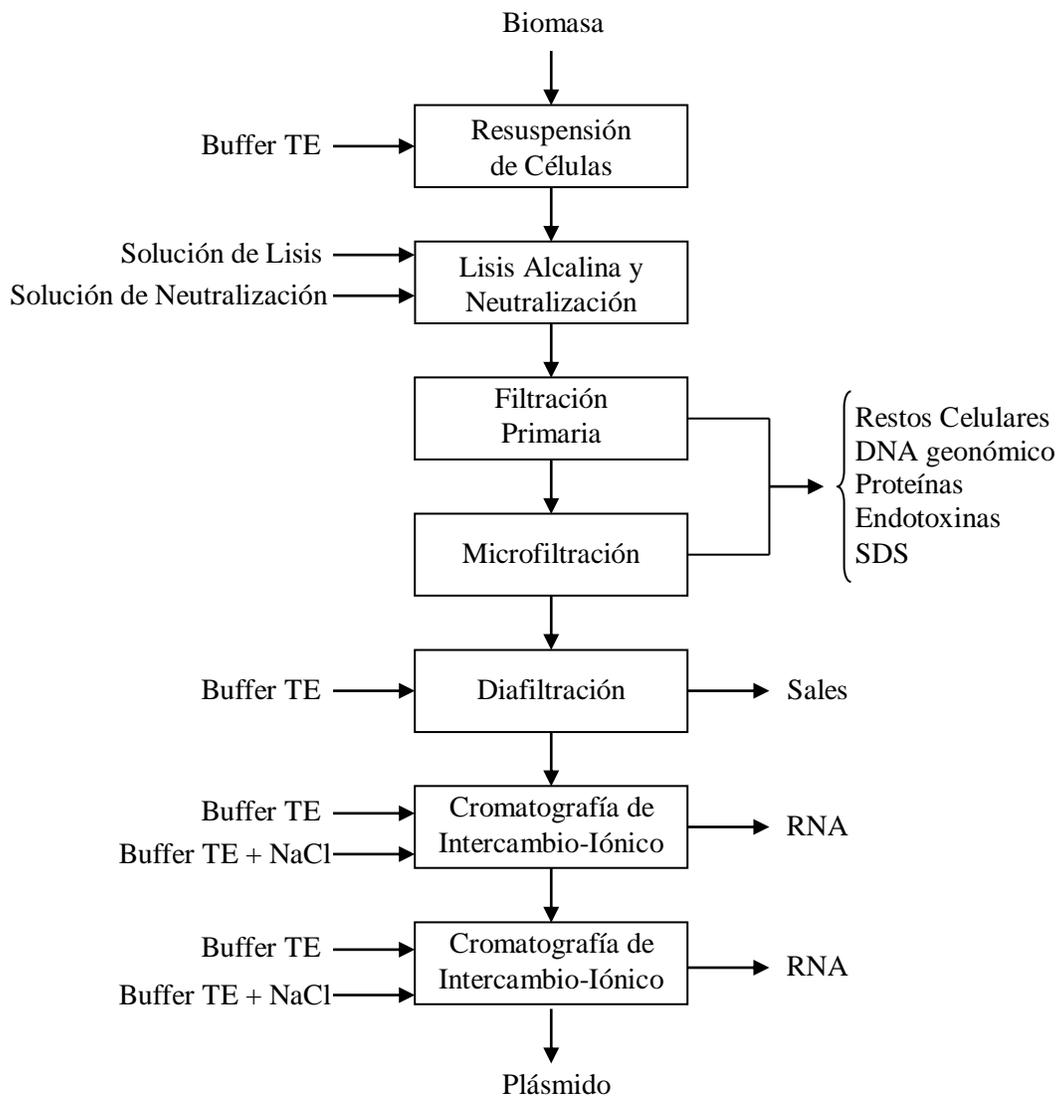


Figura 8. Diagrama de bloques del proceso de recuperación y purificación de plásmidos a partir de una cepa hospedera. Incluye las etapas de resuspensión de células, lisis alcalina, neutralización, filtración primaria, microfiltración, diafiltración y cromatografía de intercambio iónico.

3.6.2 Recuperación de Plásmidos

La recuperación de los plásmidos se inició descongelando la biomasa en hielo. A continuación se agregaron 8 *ml* de buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 por gramo de células húmedas y se agitó hasta resuspender el paquete celular. Después se agregó un volumen de buffer de lisis (NaOH 0.09 *M* y SDS 1%) y se agitó suavemente por 5 *min* para no romper el gDNA. Terminado este período se mezcló el lisato con un volumen (que es la suma de los volúmenes anteriores) de acetato de potasio 3.0 *M* a pH = 5.5 enfriado en hielo, y se dejó en agitación leve por 5 *min*. Posteriormente se retiraron los floculos generados usando un embudo de porcelana con un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 9 *cm* de diámetro (Fig. 9).

Después de eliminar los floculos, la solución resultante se pasa con ayuda de una bomba peristáltica a través de un filtro Millex-SV de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con 5.0 μm de diámetro de poro. El filtro fue esterilizado (fábrica) con oxido de etileno. Seguidamente, con ayuda de otra bomba peristáltica, como lo muestra la Figura 10, se pasa la solución por un filtro Millex-HV de PVDF estéril (irradiación gamma) con 0.45 μm de diámetro de poro.



Figura 9. Sistema de vacío para eliminar los floculos generados en la lisis alcalina y neutralización de la etapa de recuperación de plásmidos.



Figura 10. Sistema de microfiltrado continuo. La solución se pasa primero a través del filtro de $5\ \mu m$ y después se pasa por el filtro de $0.45\ \mu m$.

La solución resultante de las microfiltraciones se colocó en una celda de diafiltración amicon de Millipore con una membrana de la misma marca, fabricada con polietersulfona y de NMWL de 10,000. A la celda también se le agregó buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 hasta llenarla (previamente se midió la conductividad del buffer). Después se conectó el tanque de nitrógeno a la celda de diafiltración (Fig. 11) a una presión menor de 55 *psi*. Durante el estudio la celda de diafiltración se mantuvo con agitación continua y con enfriamiento (hielo) hasta alcanzar el volumen inicial de la solución. Posteriormente se midió la conductividad de la solución y se repitió este procedimiento hasta que la conductividad fue igual a la del buffer.



Figura 11. Celda de diafiltración amicon de Millipore con una membrana de la misma marca, fabricada con polietersulfona y de NMWL de 10,000. La celda se conectó a un tanque de nitrógeno puro a una presión menor de 55 *psi*.

3.6.3 Purificación de Plásmidos

La técnica utilizada para purificar al plásmido pRL-CMV, fue la cromatografía frontal de intercambio iónico en AMP-II. En la purificación se empacó la columna cromatográfica con 0.5 *ml* de suspensión del adsorbente macroporoso. A continuación las columnas fueron preequilibradas con 10 volúmenes de buffer de adsorción, estableciéndose la línea base. Al tiempo cero se alimentó una solución con el plásmido pRL-CMV por la columna hasta que se obtuvo la curva de ruptura del sistema y los valores registrados por el equipo fueron prácticamente constantes. Seguidamente se comenzó el lavado con buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 hasta que el detector UV con monitor de computadora registro valores de absorbancia muy cercanos a cero. Posteriormente se eluyó con 2 *M* de NaCl en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA. Se realizaron tres experimentos de purificación del plásmido pRL-CMV con el AMP-II, los dos primeros con elución isocrática y el tercero con gradiente de elución. Al final de cada experimento la columna se regenero con 1.0 *M* de HCl.

El plásmido pVR1012-NH36 se purificó usando cromatografía frontal de intercambio iónico en sistemas de membranas. Para tal efecto, la columna cromatográfica se empacó con 30 membranas y se conectó al sistema hidráulico del equipo BioRad BioLogic LP (Fig. 12). El flujo en todos los experimentos fue de 0.5 *ml/min*. Las columnas fueron preequilibradas con 10 volúmenes de buffer de adsorción, estableciéndose la línea base. Al tiempo cero se alimentó la solución obtenida de la diafiltración y el experimento se continuó hasta que no se observaron cambios en la concentración de salida. Posteriormente se inició el lavado con buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 hasta que el equipo registró valores cercanos a la línea base. Por último, se eluyeron las especies adsorbidas utilizando un gradiente de 2 *M* de NaCl en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0.



Figura 12. Columna empacada con membranas Mustang Q conectada al equipo BioRad BioLogic LP con monitor de computadora.

3.6.4 Análisis de Muestras

Con el fin de analizar los resultados obtenidos en el paso cromatográfico, se realizaron pruebas de electroforesis en gel de agarosa (Fig. 13). Para tal efecto, se preparó gel de agarosa al 0.8% y se colocó en la cámara de electroforesis. Después se vertió solución buffer 1x Tris-Acetate-EDTA (TAE) hasta el nivel indicado en la cámara. Se utilizó como marcadores una solución de 1.5 μ l Lamda Hind III en 3 μ l de buffer de carga. Las muestras, se prepararon mezclando 17 μ l de cada muestra con 3 μ l de buffer de carga.

Posteriormente se inyectó el gel con las mezclas preparadas y se corrió a 70 *volts* por aproximadamente 90 minutos. Transcurrido este período se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se sumergió en una solución de 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, manteniendo al gel con agitación leve por 35 minutos. Por último el gel de agarosa se enjuagó con agua desionizada y se procedió a fotografiarlo en el transiluminador.

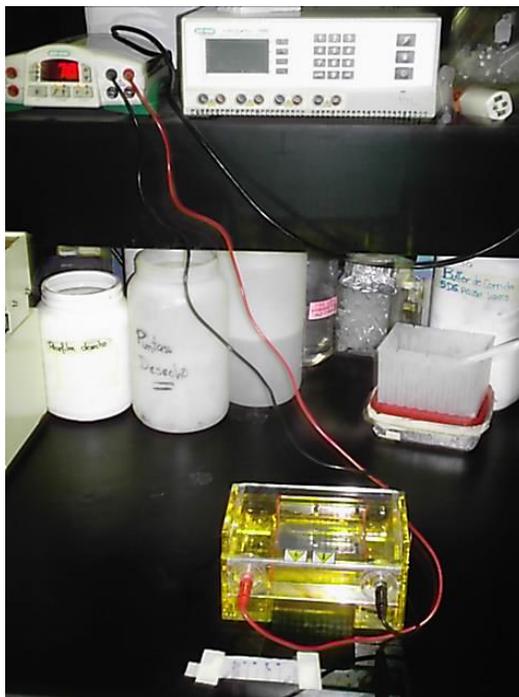


Figura 13. Cámara de electroforesis conectada al transformador de corriente.

3.7 Simulación del Bioproceso

Con el propósito de tener un análisis más detallado del bioproceso desarrollado experimentalmente, se realizaron simulaciones utilizando el software SuperPro Designer v7.0.

En la evaluación económica se utilizó un método basado en el costo de adquisición de equipo, recomendado por Peters et al. [47]. En la Tabla 1, se presentan las bases para el cálculo de la inversión fija total y en la Tabla 2 los del costo de operación.

Tabla 1. Cálculo de la inversión fija total (FC)

Rubro	Concepto	Monto
INVERSIÓN FIJA DIRECTA (DFC)		
Inversión directa (DC)	Equipo	PC
	Tubería	0.35PC
	Instrumentación	0.40PC
	Aislamiento	0.03PC
	Electricidad	0.10PC
	Edificios	0.45PC
	Terrenos	0.15PC
	Instalaciones	0.40PC
Inversión indirecta (IC)	Ingeniería	0.25DC
	Construcción	0.35DC
Otras inversiones (OC)	Consultorías	0.05(DC+IC)
	Contingencias	0.10(DC+IC)
CAPITAL DE TRABAJO (WC)	Mano de obra	30 días
	Materias primas	30 días
	Servicios	30 días
	Tratamientos	30 días
CAPITAL DE ARRANQUE	Arranque	0.05DFC

Costo de equipo (PC) = Costo de adquisición + 20% de equipo no listado

Inversión fija directa (DFC) = Inversión directa (DC) +
Inversión indirecta (IC) + Otras inversiones (OC)

Inversión fija total (FC) = Inversión fija directa (DFC) +
Capital de trabajo (WC) + Capital de arranque (SC)

Tabla 2. Costos de operación

Concepto	Monto
Materias primas	Base de datos
Mano de obra (TLC)	<i>h</i> -equipo
Costo de operación de equipo	0.06DFC
Mantenimiento	0.10PC
Depreciación	0.08DFC
Control de calidad	15% TLC
Consumibles	Base de datos
Tratamientos	Salidas
Servicios	0.1 <i>kw/h</i> ; \$4.20/1000 <i>kg</i> vapor; \$0.1/100 <i>kg</i> agua fría

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de Matrices y Columnas

En esta parte de la investigación se muestran los resultados obtenidos en la preparación de matrices adsorbentes y columnas para la purificación de plásmidos.

4.1.1 AMP-II y Columnas

Se logró preparar un adsorbente macroporoso, a partir de Novarosa SE-10000/40, la cual tiene un tamaño de exclusión de 10,000,000 *Da* y un diámetro promedio de 40 μm . Al adsorbente se le incorporó una amina cuaternaria (Q), mediante la adición de cloruro de glicidil-trimetil-amonio.

Los resultados de la evaluación de la capacidad y dinámica del adsorbente utilizando BSA, se muestran la Figura 14. La columna se empacó con 0.5 *ml* de AMP-II y se operó a un flujo de 0.5 *ml/min* con una concentración de entrada de BSA de 0.3 *mg/ml*. En la Figura se observan las curvas de adsorción, lavado y elución del experimento. La etapa de adsorción tuvo una duración de 81 minutos aproximadamente. La etapa de lavado se realizó del minuto 81 al 95. A continuación se llevó a cabo una elución isocrática por 5 *min*. Finalmente se alimentó 1 *M* HCl para regenerar la columna.

La capacidad específica del AMP-II, estimada por el método numérico del trapecio de aplicación múltiple fue de 18.64 *mg/ml*, que es menor que las reportadas [14], y su capacidad de concentración fue mayor a 3.8 veces bajo condiciones isocráticas. Los plásmidos, al igual que la proteína BSA están cargados negativamente, por lo que se puede argumentar que los plásmidos también presentarían afinidad por el adsorbente macroporoso.

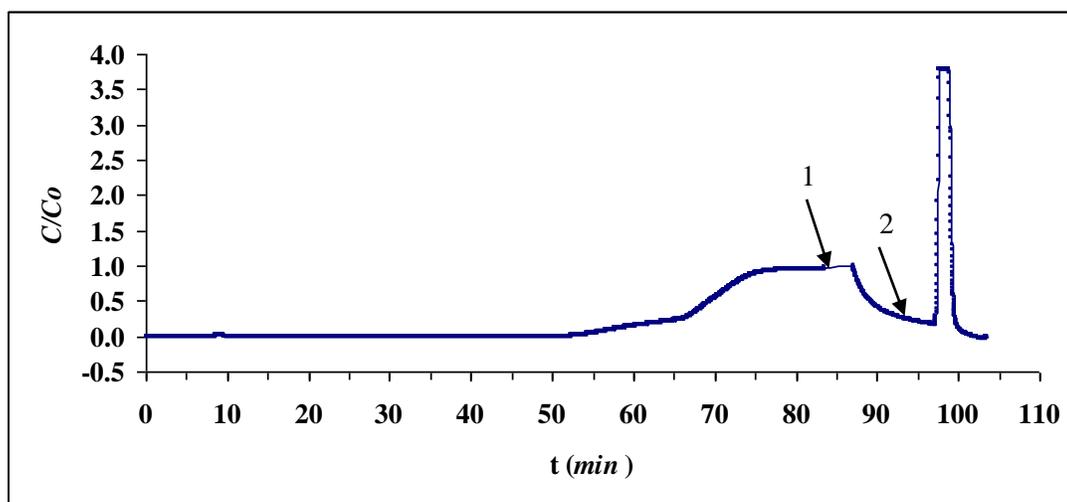


Figura 14. Curvas de adsorción, lavado y elución del experimento con BSA. La columna se empacó con 0.5 ml de AMP-II y se operó a un flujo de 0.5 ml/min con una concentración de entrada de BSA de 0.3 mg/ml. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la etapa de elución. Después de los 100 min alimentó 1 M HCl.

4.1.2 Membranas y Columnas

En la Figura 15 se muestra una columna empacada con membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro nominal de 800 *nm*, las cuales, se cortaron a un diámetro de 5 *mm* y se acondicionaron según el protocolo del fabricante.



Figura 15. Columna empacada con membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro nominal de 800 *nm*, las cuales, se cortaron a un diámetro de 5 *mm* y se acondicionaron según el protocolo del fabricante.

4.2 Estudios Básicos de Adsorción con Plásmidos Modelo

En esta parte del trabajo, se reportan los resultados obtenidos en los estudios básicos de adsorción con plásmido puro pCAT, que comprenden la obtención de la isoterma del sistema, las curvas de ruptura y los experimentos de dispersión.

4.2.1 Isotherma

La isoterma experimental para la adsorción del plásmido pCAT se realizó en 8 reactores, cada uno con 25 ml de buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0. A cada uno de los reactores se les adicionó un pulso diferente del stock de plásmido pCAT de concentración 5.2545 mg/ml. Los reactores estuvieron en agitación continua y a una temperatura de $22.7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Antes de iniciar el experimento se midió la absorbancia de la solución de cada reactor para obtener la curva de calibración del sistema. En la Tabla 3 se muestran los volúmenes adicionados del stock del plásmido pCAT a cada reactor, así como la absorbancia y la concentración inicial. A partir de los datos de la Tabla 3 se obtuvo la curva de calibración del plásmido pCAT (Fig. 16).

De la ecuación de la recta mostrada en la Figura 16 y del valor de longitud de la celda de 0.2 cm, se calculó el coeficiente de extinción, E, del plásmido pCAT, resultando en $E = 17.43\text{ ml/mg-cm}$. Dicho coeficiente, se utiliza para convertir datos de absorbancia a concentración.

Tabla 3. Volúmenes adicionados a cada reactor del stock del plásmido pCAT (5.2545 *mg/ml*), absorbancias iniciales de cada sistema a 254 *nm* (sin membranas) y concentraciones iniciales calculadas.

Reactor	Vol pulso (<i>ml</i>)	Abs (254 <i>nm</i>)	<i>c</i> cal (<i>mg/ml</i>)
1	0.2	0.1370	0.0420
2	0.4	0.2762	0.0841
3	0.6	0.3829	0.1261
4	0.8	0.5875	0.1681
5	1.0	0.7037	0.2102
6	1.2	0.8503	0.2522
7	1.4	0.9944	0.2943
8	1.6	1.1656	0.3363

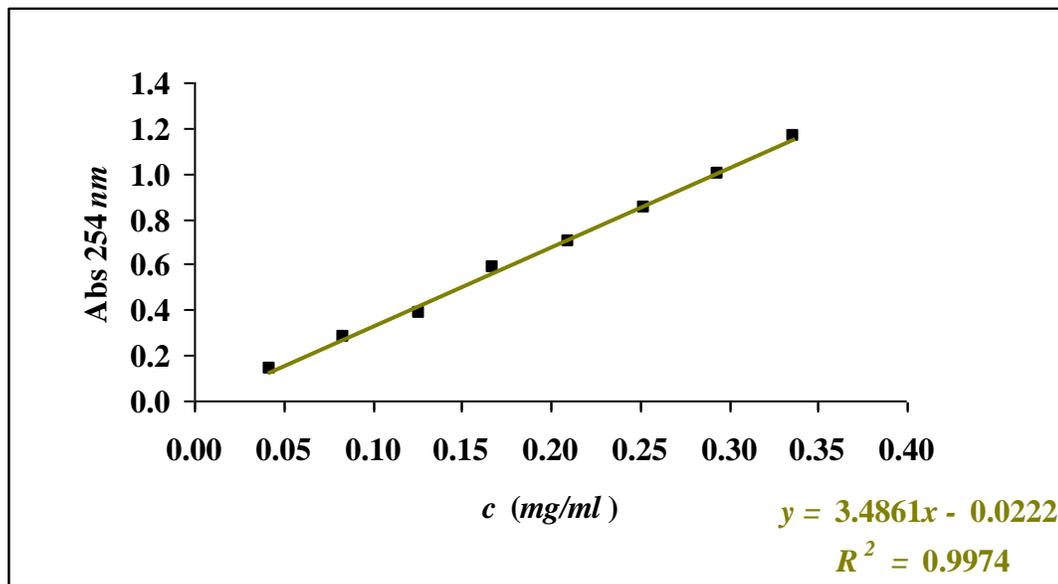


Figura 16. Curva de calibración del plásmido pCAT a temperatura de $22.7\text{ C} \pm 1$. Puntos experimentales (■), ajuste lineal (línea sólida). En el gráfico también se muestra la ecuación de la recta ajustada. El valor del coeficiente de extinción E, es de 17.43 ml/mg-cm .

Para iniciar el experimento de adsorción, se colocaron 60 membranas de intercambio iónico Mustang Q de 5 mm de diámetro en cada reactor. Se realizaron determinaciones de absorción de la fase líquida cada 12 horas para dar seguimiento al proceso de adsorción. El equilibrio de la adsorción se alcanzó entre 100 y 124 horas, siendo este tiempo similar en todos los reactores ya que eran soluciones muy diluidas. La cantidad de plásmido adsorbido en cada sistema, se calculó mediante un balance de masa total. Los datos generales del balance de masa y las concentraciones de equilibrio en la fase líquida y sólida se presentan en la Tabla 4. Se manipuló el modelo de Langmuir para ajustarlo a los datos experimentales utilizando un análisis de regresión no-lineal en programa Matlab

En la Figura 17 se muestra la isoterma experimental para la adsorción de pCAT en membranas de intercambio iónico a $22.7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. En esta Figura se observa un adecuado ajuste del modelo a los datos experimentales, con un coeficiente de correlación de 0.947, lo cual lo confirma. Los valores característicos de los parámetros son: $q_m = 22.465\text{ mg/ml}$ y $K_d = 0.0929\text{ mg/ml}$. La capacidad de adsorción de las membranas de intercambio iónico es del orden de las reportadas en la literatura [48].

Tabla 4. Datos generales del balance de masa total de cada reactor, así como los valores de concentración del plásmido en el equilibrio para las fases líquida y sólida.

Reactor	m inicial (mg)	Abs _{254 nm} eq.	c_{eq} (mg/ml)	m final (mg)	m adsorbida (mg)	q_{eq} (mg/ml)
1	0.9825	0.0388	0.0111	0.2783	0.7042	4.2699
2	1.9808	0.1256	0.0360	0.9007	1.0800	6.5483
3	2.7460	0.2228	0.0639	1.5978	1.1482	6.9614
4	4.2133	0.2936	0.0842	2.1052	2.1081	12.7814
5	5.0466	0.4310	0.1236	3.0906	1.9560	11.8595
6	6.0980	0.5455	0.1565	3.9121	2.1859	13.2531
7	7.1314	0.6466	0.1855	4.6371	2.4943	15.1228
8	8.3592	0.7803	0.2238	5.5956	2.7636	16.7556

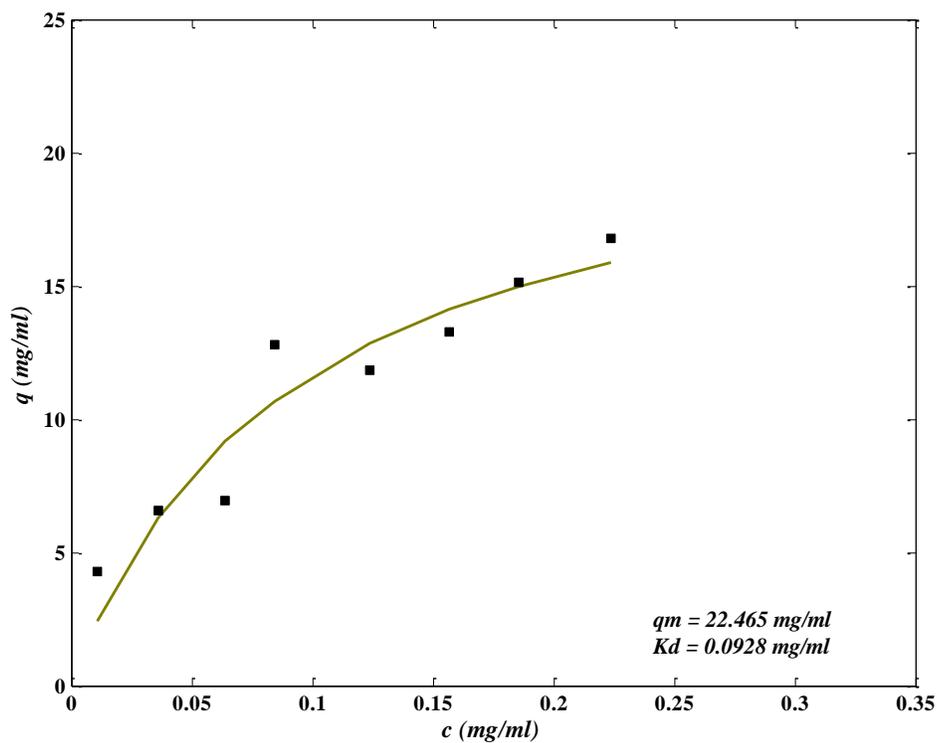


Figura 17. Isotherma del plásmido pCAT en membranas de intercambio iónico a $22.7 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ con el buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0. ($q_m = 22.465$ mg/ml y $K_d = 0.0929$ mg/ml). Puntos experimentales (■), isoterma de Langmuir (línea sólida).

4.2.2 Curvas de Ruptura

En los experimentos de adsorción en columna de un plásmido modelo, se utilizó a la biomolécula pCAT. La concentración del plásmido fue determinada a 254 *nm* utilizando el coeficiente de extinción de 17.43 *ml/mg-cm*.

La Figura 18 muestra los resultados de dos experimentos sobre el efecto del tiempo de residencia en la columna, en las curvas de ruptura experimentales del plásmido pCAT. En ambos experimentos la concentración de entrada del plásmido fue de 0.2 *mg/ml* y el flujo constante a 0.15 *ml/min*. El número de membranas fue de 30 y 45, respectivamente.

En la Figura 18 puede observarse que el punto rompimiento es prácticamente igual para ambas corridas y ocurre a los 7.5 minutos aproximadamente. La corrida con 30 membranas, implica comparativamente un menor tiempo de residencia en la columna y una menor capacidad de adsorción total. La forma de esta curva con una menor área a su izquierda refleja la menor capacidad total de esta columna. Asimismo, la forma más empinada corresponde con el menor tiempo de dispersión en dicha columna. Para la columna de 45 membranas, con una mayor capacidad de adsorción total y un mayor tiempo de residencia, se presenta una mayor área a la izquierda y una mayor dispersión.

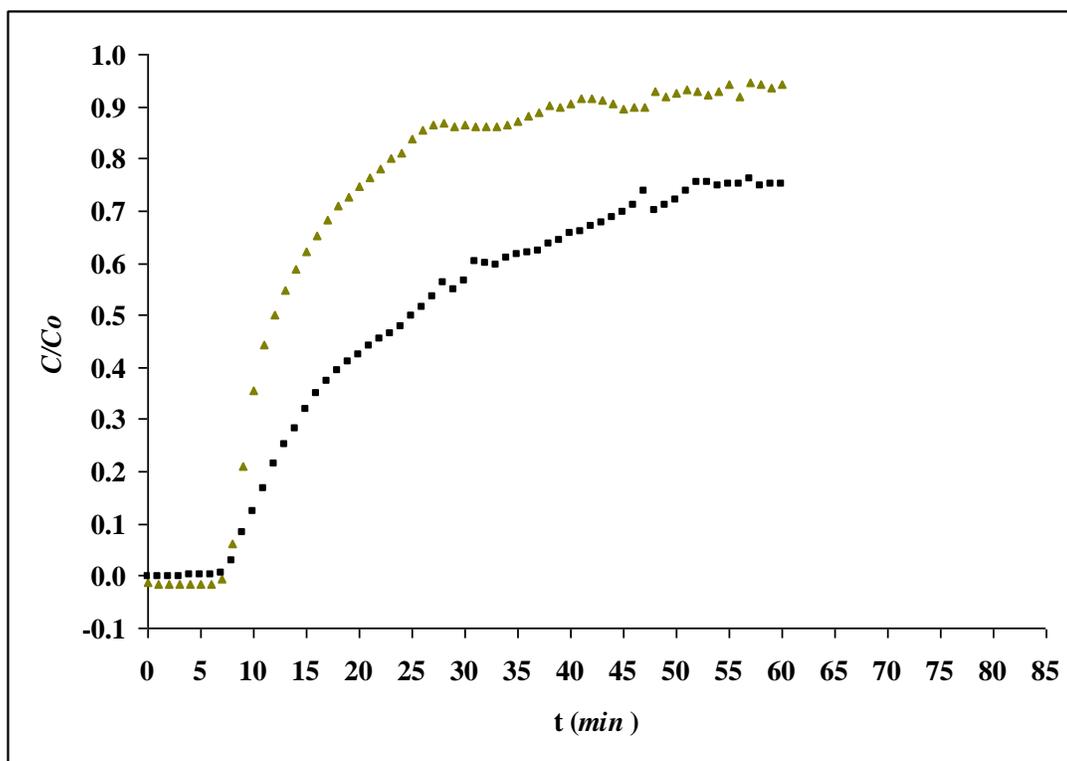


Figura 18. Efecto del número de membranas sobre las curvas de ruptura del plásmido pCAT. Flujo de alimentación de 0.15 ml/min y concentración de entrada del plásmido de 0.2 mg/ml . 30 membranas (\blacktriangle), 45 membranas (\blacksquare).

4.2.3 Experimentos de Dispersión

Las curvas de dispersión y lavado del sistema para una columna de 30 membranas, obtenida con una solución de alimentación de 1.0 *mg/ml* de lisozima, a un flujo de 0.15 *ml/min* se presenta en la Figura 19. La curva muestra que el tiempo de residencia en el sistema es de alrededor de 5 minutos. La pendiente inclinada de la curva de ruptura indica que el grado de dispersión en el sistema fue mínimo. La apropiada conformación de las curvas de ruptura y lavado del sistema indica que el empaque de las membranas y el sistema de distribución del líquido en la columna fue el adecuado.

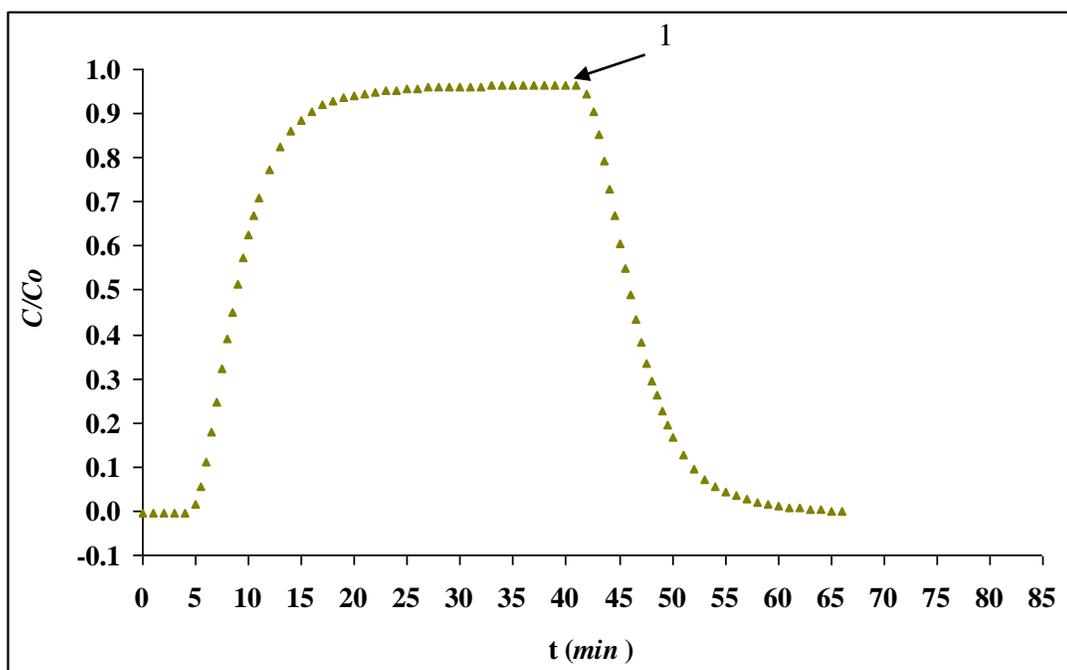


Figura 19. Curva de dispersión y lavado para una columna con 30 membranas. La concentración de la solución de lisozima fue de 1.0 mg/ml y el flujo de 0.15 ml/min. 1 inicio de la etapa de lavado.

4.3 Producción de Plásmidos

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos en el crecimiento por lotes de cepa de *E. Coli JM109* (pRL-CMV) y *E. Coli.* (pVR1012-NH36) a nivel matraz y biorreactor.

4.3.1 Crecimiento Celular

Se logró propagar la cepa de *E. Coli JM109* (pRL-CMV) en el biorreactor de 1.5 l, obteniéndose un rendimiento de de 5 g/l de células. Asimismo, se propagó la cepa *E. Coli.* (pVR1012-NH36) en biorreactor de 2 l, alcanzándose un rendimiento de 7 g/l de biomasa. Ambos rendimientos son del orden de los reportados para fermentaciones batch de *E. coli* [23].

4.3.2 Cinética de Crecimiento

En la Figura 20 muestra la curva de crecimiento de la bacteria *E. Coli.* (pVR1012-NH36) obtenida a nivel matraz. La absorbancia del medio 2TY fue de 0.02559 UA, la cual se restó a todos los datos de absorbancia registrados en el experimento. La línea continua de la Figura se obtuvo mediante el ajuste de la ecuación logística a los datos experimentales, con los parámetros $\mu = 1.0412 h^{-1}$ y $X_{\infty} = 1.31 g/l$.

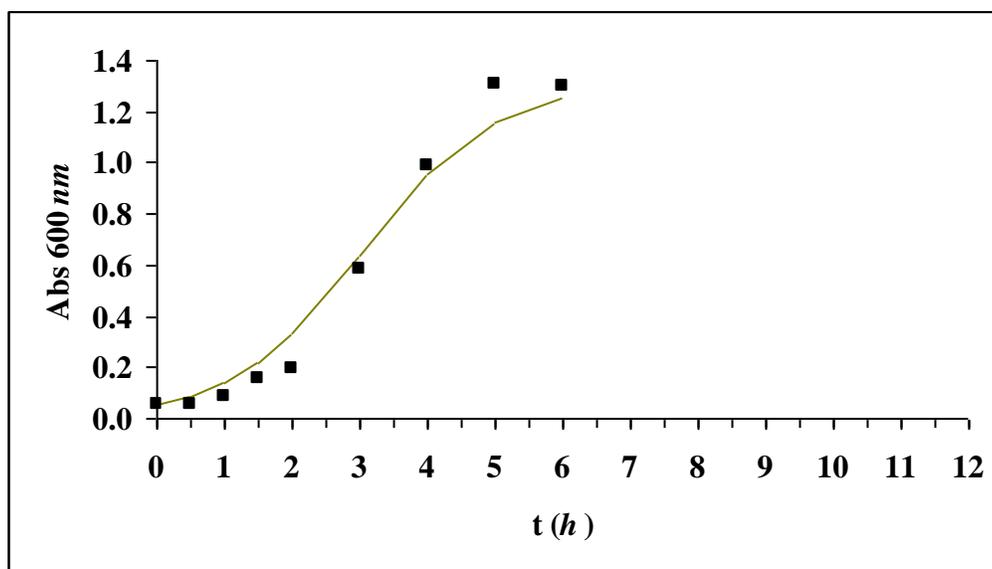


Figura 20. Curva de crecimiento celular de la cepa de *E. Coli.* con el plásmido pVR1012-NH36. Volumen inicial 100 ml, temperatura de 37 °C y agitación de 225 rpm. Puntos experimentales medidos a 600 nm (■), ecuación logística (línea sólida) con $\mu = 1.0412 h^{-1}$ y $X_{\infty} = 1.31 g/l$.

4.4 Recuperación y Purificación de Plásmidos

En esta parte de la investigación, se reportan los resultados experimentales obtenidos en la recuperación y purificación de plásmidos. Estos resultados abarcan al rompimiento celular, clarificación, lavado y por último uno o más pasos cromatográficos. En la parte cromatográfica se reportan estudios con partículas macroporosas y sistemas de membranas.

4.4.1 Recuperación de Plásmidos

Se resuspendieron alícuotas típicamente de 6 g del paquete celular recuperado por centrifugación y posteriormente sometieron a lisis alcalina para liberar el plásmido y desnaturalizar al DNA geonómico y las proteínas. En este paso característicamente se obtiene una solución compleja y altamente viscosa.

La neutralización del lisado con 3.0 M de acetato de potasio evita que los plásmidos se desnaturalicen, además, se lleva a cabo con el fin de precipitar a moléculas grandes como el gDNA, proteínas y restos celulares, ya que son insolubles en concentraciones altas de sal [49]. Un resultado muy relevante de esta investigación es la obtención de flóculos de gran dimensión mediante el uso agitación moderada durante la neutralización, lo cual facilita la separación de estos precipitados.

La clarificación del lisado se realizó en dos partes, primero usando un sistema de filtrado a vacío tipo Büchner, al cual se acopló un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 9 cm de diámetro y segundo, pasando de manera continua al lisado por filtros de 5.0 μm y 0.45 μm de diámetro de poro. La microfiltración de la solución con el pRL-CMV se realizó a 2.8 ml/min durante 6.5 h y la de la solución con el pVR1012-NH36 se efectuó a 2.0 ml/min durante 8.0 h.

En el lavado y concentración de la solución se eliminaron las sales del sistema, ya que estas pasan fácilmente a través de la membrana de diafiltración. De la misma forma se eliminan partículas pequeñas como sería el caso de algunas proteínas y endotoxinas. El

volumen de buffer utilizado en la diafiltración (con ambas cepas) fue aproximadamente 10 veces el volumen de solución.

4.4.2 Purificación de Plásmidos

En los estudios de purificación del plásmidos a partir de caldos de *E. coli*, se utilizaron columnas empacadas con las partículas macroporosas de intercambio iónico para el estudio del pRL-CMV y columnas empacadas con membranas de intercambio iónico para el caso del pVR1012-NH36.

Purificación del pRL-CMV. La solución del plásmido pRL-CMV obtenida en la etapa de recuperación fue alimentada a la columna empacada con 0.5 ml del adsorbente AMP-II. Se experimentó a flujos de 0.25 y 0.50 ml/min.

La Figura 21 muestra las curvas de adsorción, lavado y elución para un flujo de alimentación de 0.25 ml/min. Puede observarse que estas curvas se conformaron adecuadamente lo que sugiere que el experimento fue bien realizado. Asimismo se observa, que la etapa de adsorción tiene una duración de aproximadamente 10 minutos, que se traduce en una capacidad de adsorción estimada de 0.5864 UA-ml/ml. El pico de elución alcanza una altura de 0.45 UA y tiene una duración de aproximadamente 3 min.

Para realizar el estudio a un flujo de 0.5 ml/min la columna de AMP-II fue regenerada aplicando 7 volúmenes de columna de una solución de 1.0 M HCl hasta alcanzar la línea base. La Figura 22 muestra las curvas de adsorción, lavado y elución para este experimento. Puede observarse en esta figura que estas curvas presentan la conformación teóricamente esperada. En este experimento, la etapa de adsorción tiene una duración de aproximadamente 5 minutos, que se traduce en una capacidad de adsorción estimada de 0.6338 UA-ml/ml. El pico de elución alcanza una altura de 0.65 UA y tiene una duración de aproximadamente 2.0 min.

El análisis del efecto del flujo en los resultados, sugiere que la capacidad de la columna prácticamente no varía en el rango de los flujos estudiados, ni con el tratamiento de

regeneración. Al comparar los cromatogramas de las Figuras 21 y 22, se observa un comportamiento similar, pero como era de esperarse, cuando el flujo es mayor la columna se equilibra más rápidamente y la elución es más eficiente, dado que se alcanza una mayor concentración y el pico es más esbelto. En ambos experimentos se obtuvo un solo pico donde se encuentran todas las especies adsorbidas, por lo que en la operación sólo se logra una concentración y purificación parcial.

En los experimentos de las Figuras 21 y 22 el plásmido adsorbido tiene un tamaño de 2,712,535 *Da* mientras que el tamaño de exclusión del adsorbente es de 10,000,000 *Da*, es decir sólo 3.7 veces mayor que el tamaño del plásmido. Debido a esto es posible que se presenten fenómenos de interferencia física que eviten la adsorción dentro de los poros y provoquen la menor capacidad de la columna por el plásmido.

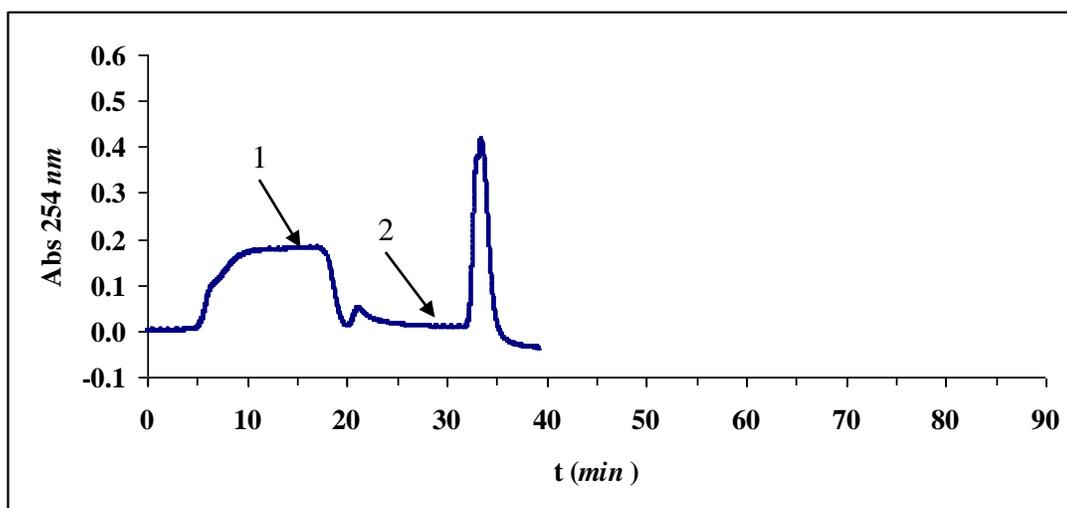


Figura 21. Curvas de adsorción, lavado y elución de la purificación del plásmido pRL-CMV a partir de un lisado de *E. Coli*. La columna se empacó con 0.5 ml de AMP-II y el flujo utilizado fue de 0.25 ml/min. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la etapa de elución.

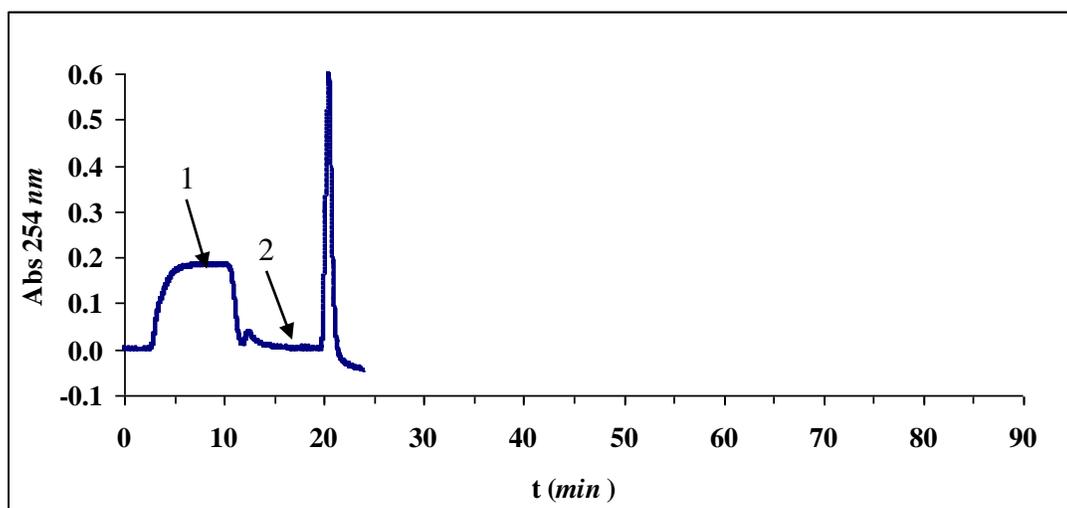


Figura 22. Curvas de adsorción, lavado y elución de la purificación del plásmido pRL-CMV a partir de un lisado de *E. Coli*. La columna se empacó con 0.5 ml de AMP-II y el flujo utilizado fue de 0.5 ml/min. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la etapa de elución.

Para realizar el estudio de elución por gradiente a un flujo de 0.25 ml/min , la columna de AMP-II fue regenerada aplicando 7 volúmenes de columna de una solución de 1.0 M HCl hasta alcanzar la línea base. El gradiente desarrollado para este estudio se muestra en la Tabla 5.

En la Figura 23 se muestran las curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente. La comparación de las etapas de adsorción de las Figuras 21 y 22 sugiere la reproducibilidad del experimento y la resistencia del adsorbente y el ligando al procesos de regeneración.

En la elución, al aumentar gradualmente la carga iónica del solvente, se va alcanzando el punto isoelectrico de las moléculas adsorbidas y de este modo se neutraliza progresivamente la fuerza que las mantiene unidas a la columna. Las moléculas de RNA y los plásmidos presentan una carga neta negativa al pH utilizado, por lo que se adsorben en el intercambiador aniónico empleado. Durante la elución por ser las moléculas de RNA más pequeñas que los plásmidos, estas alcanzan primero el punto isoelectrico y eluyen más fácilmente. Los picos principales de la etapa de elución de la Figura 23 corresponden el primero al RNA y el segundo al plásmido. Mediante este enfoque experimental se logró la concentración del plásmido y una mayor purificación del mismo.

Tabla 5. Gradiente de elución utilizado en el estudio de purificación del plásmido pRL-CMV. El buffer de adsorción fue 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 M de NaCl en buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA.

Pasos	Tiempo (min)	Buffer
1	0 - 10	100 % Buffer de Adsorción
2	10 - 40	0 – 100 % Buffer de Elución
3	40 - 50	100 % Buffer de Elución

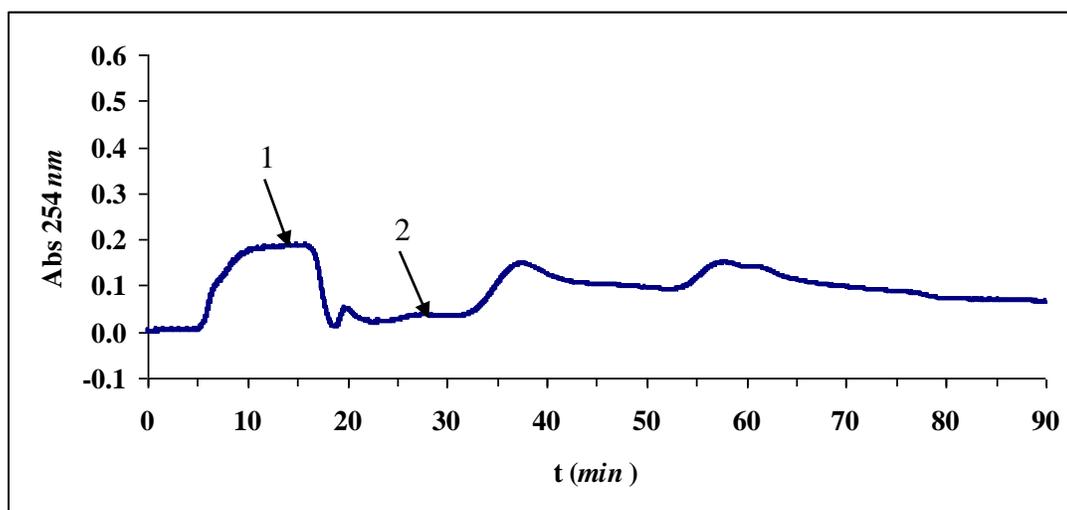


Figura 23. Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para la purificación del plásmido pRL-CMV a partir de un lisado de *E. Coli*. La columna se empacó con 0.5 ml del adsorbente macroporoso de intercambio iónico. El flujo usado fue de 0.5 ml/min. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.

Purificación del plásmido del plásmido pVR1012-NH36. La solución del plásmido pVR1012-NH36 obtenida en la etapa de recuperación fue alimentada a la columna empacada con 30 membranas Mustang Q. Se experimentó a un flujo de 0.5 *ml/min* utilizando 3 diferentes gradientes de elución para investigar las condiciones óptimas de purificación.

El gradiente utilizado en el primer estudio de purificación se muestra en la Tabla 6. La Figura 24 muestra las curvas de adsorción, lavado y elución correspondientes. En la elución las especies adsorbidas no lograron separarse completamente lo que sugiere que el gradiente empleado 1.5 *M/115 min* fue muy bajo.

Tabla 6. Gradiente de elución utilizado en el primer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El buffer de adsorción fue 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 *M* de NaCl en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA.

Pasos	Tiempo (<i>min</i>)	Buffer
1	0 - 115	0 – 75 % Buffer de Elución
2	115 - 140	100 % Buffer de Elución
3	140 - 155	100 % Buffer de Adsorción

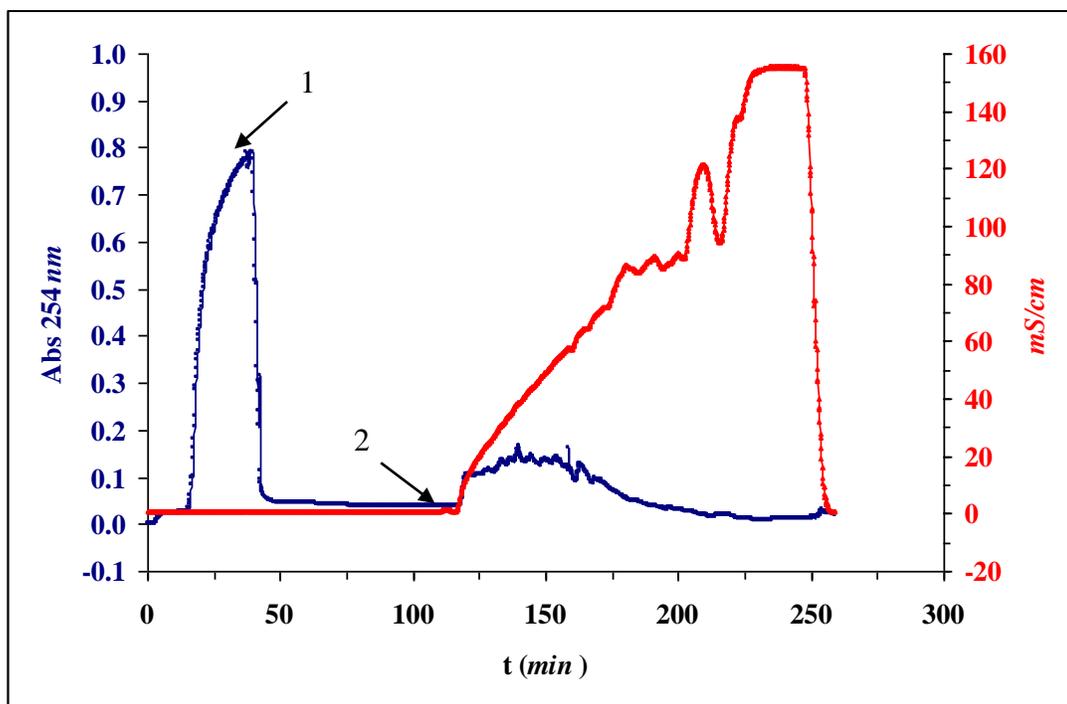


Figura 24. Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el primer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 ml/min y la columna se empacó con 30 membranas. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.

La Figura 25 muestra los resultados del análisis por electroforesis de las muestras de solución tomadas a la salida de columna de membranas, durante el primer estudio de purificación. El carril 1 corresponde al marcador Lambda Hind III. Los carriles del 2 al 12 corresponden a las muestras recolectadas en el estudio cromatográfico. En el carril 2 corresponde a la solución alimentada, donde se puede observar la presencia del plásmido (5874 bp) y una gran cantidad de RNA. El carril 3 corresponde a la muestra tomada a los 16 *min*, al inicio del rompimiento de la curva de adsorción. Pueden observarse las mismas bandas que las del carril 2 pero más atenuadas, lo que indica la transición entre el período de adsorción completa y el inicio de la ruptura. El carril 4 corresponde a la muestra tomada a los 35.5 *min* del estudio, en la fase de equilibrio de la columna. Puede observarse en la Figura que las bandas de este carril son prácticamente iguales a las del carril 2, obviamente debido a que la columna a estas condiciones ya no adsorbe.

Los carriles 5 y 6 de la Figura 25 corresponden a muestras tomadas a los 120 y 125 *min* durante período final de la etapa de lavado. La ausencia de bandas en estos carriles es congruente con la nula señal de absorción a estos tiempos en el cromatograma. Los carriles 7, 8 y 9 son de muestras tomadas a los 134, 140 y 150 *min*, durante la etapa de elución. En estos carriles se puede observar bandas de muy bajo peso molecular relacionadas con el RNA en la muestra. En el carril 10 se colocó una muestra tomada a los 163 *min* durante la etapa de la elución. En este carril se observan bandas tenues del plásmido y el RNA. En los carriles 11 y 12 correspondientes a muestras tomadas a los 254 y 260 *min* del estudio, no se presentan bandas, en correspondencia con la nula señal de absorción en el cromatograma.

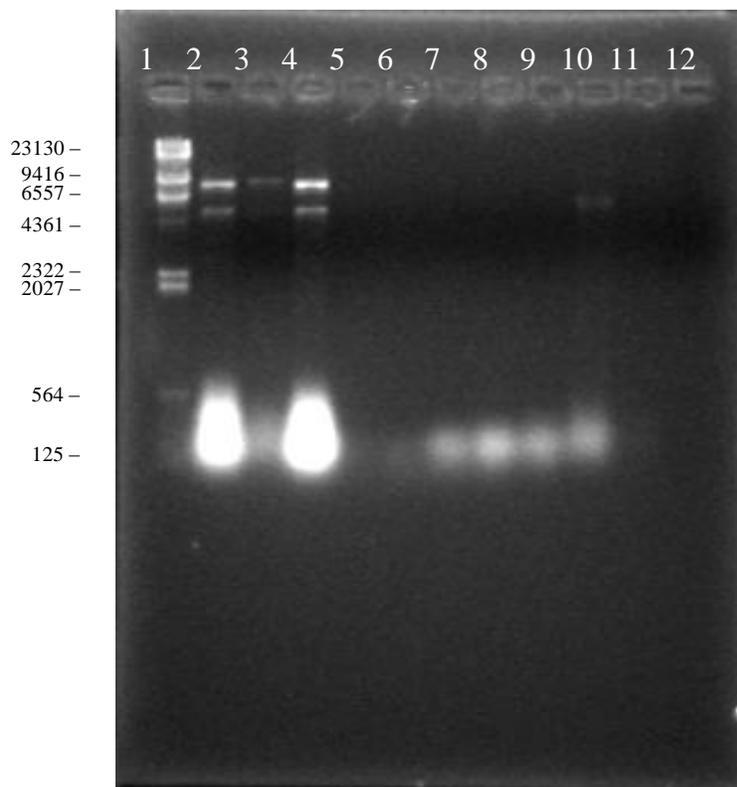


Figura 25. Análisis electroforético del primer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 pb). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución alimentada a la columna, 3 etapa de adsorción (16 min), 4 adsorción (35.5 min), 5 lavado (120 min), 6 lavado (125 min), 7 elución (134 min), 8 elución (140 min), 9 elución (150 min), 10 elución (163 min), 11 elución (254 min), 12 elución (260 min).

Para mejorar la purificación del plásmido, en el segundo estudio realizado se incremento el gradiente de elución, utilizando los valores mostrados en la Tabla 7. La Figura 26 muestra las curvas de adsorción, lavado y elución correspondientes.

La Figura 27, muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa realizada con las muestras del segundo estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El carril 1 corresponde al marcador Lambda Hind III. El carril 2 corresponde a la muestra de la solución alimentada a la columna. En éste, se observan bandas que corresponden al plásmido y el RNA. En los carriles 3 y 4, correspondientes a las muestras tomadas del estudio a los 11.5 y 17.5 *min* durante la etapa de adsorción, no se alcanzan a detectar bandas, lo cual indica una adecuada adsorción. El carril 5 pertenece a la muestra tomada a los 28.5 *min* durante el rompimiento, donde se detectan bandas claras lo que indica la salida de la zona de transferencia de masa (ZTM) de la columna.

El carril 6 de la Figura 27 corresponde a una muestra tomada a los 61 *min* durante la etapa de elución. Aquí no se alcanzan a percibir bandas a pesar de que existe señal en el cromatograma, esto puede ser debido a un efecto de baja concentración a este nivel de la elución combinado con un coeficiente de extinción alto del RNA (aproximadamente 25 *ml/mg-cm*). En el carril 7 relacionado con la muestra tomada durante la etapa de elución a los 66 *min*, se aprecia una débil banda de RNA. Los carriles 8 y 9 corresponden a muestras tomadas a los 69.6 y 74 *min* respectivamente. En estos carriles sólo se observan bandas muy nítidas de RNA, en concordancia con su orden de elución. En los carriles 10 y 11 se colocaron muestras tomadas en la elución a los 77.5 y 80 *min*, en ellos se observan bandas con el plásmido y RNA. En el carril 12 correspondiente a los 87.5 *min* del estudio se observa una banda con el plásmido y otra con muy poco RNA.

Los resultados anteriores indican que el gradiente empleado de 1.5 *M/50 min* permitió una mayor concentración y purificación parcial del plásmido.

Tabla 7. Gradiente de elución usado en experimentos de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El buffer de adsorción fue 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 *M* de NaCl en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA.

Pasos	Tiempo (<i>min</i>)	Buffer
1	0 - 50	0 – 75 % Buffer de Elución
2	50 - 75	100 % Buffer de Elución
3	75 - 90	100 % Buffer de Adsorción

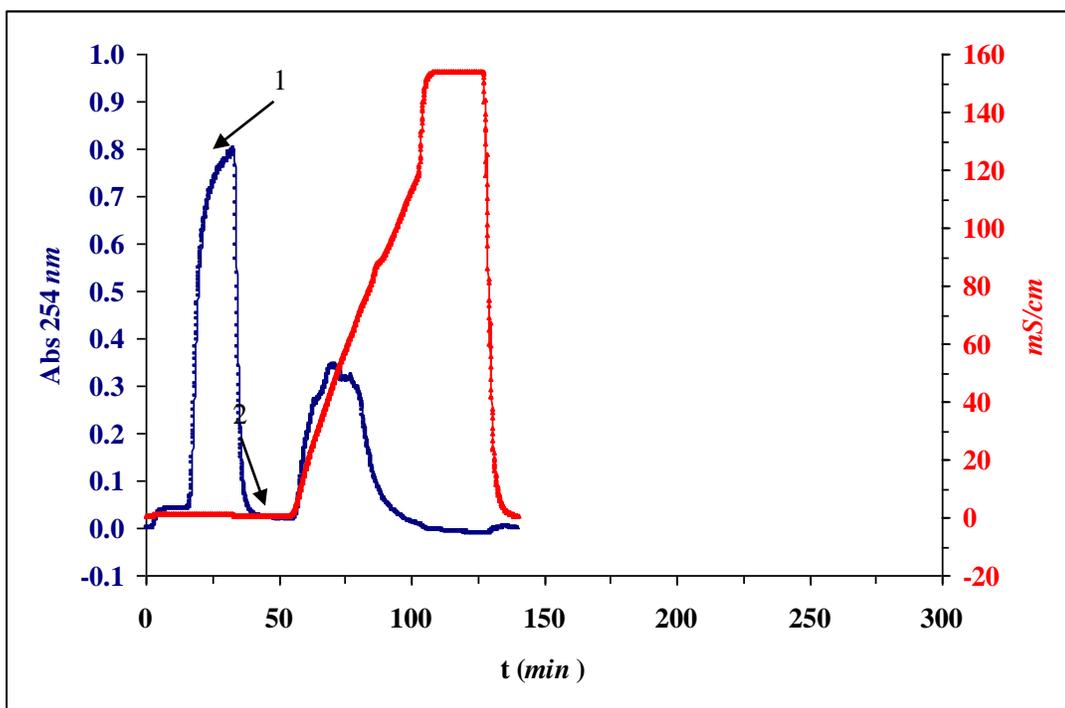


Figura 26. Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el segundo estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 ml/min y la columna se empacó con 30 membranas. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.

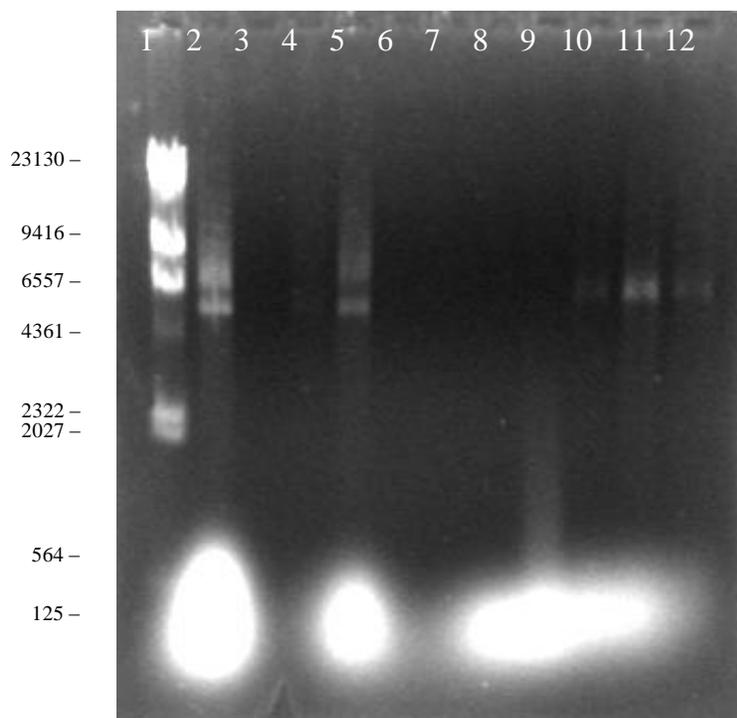


Figura 27. Análisis electroforético del segundo estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 *pb*). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución de alimentación, 3 adsorción (11.5 *min*), 4 adsorción (17.5 *min*), 5 adsorción (28.5 *min*), 6 elución (61 *min*), 7 elución (66 *min*), 8 elución (69 *min*), 9 elución (74 *min*), 10 elución (77.5 *min*), 11 elución (80 *min*), 12 elución (87.5 *min*).

En el tercer estudio realizado para mejorar la purificación del plásmido, se diseñó un gradiente intermedio entre los dos anteriores de $1.5M/60 \text{ min}$, que permitiera una mayor resolución entre las especies, el cual se muestra la Tabla 8. La Figura 28 muestra las curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36.

En el tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 se recolectaron 20 muestras, las cuales analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras se corrieron en dos geles, los cuales se muestran en las Figuras 29 y 30.

El carril 1 de la Figura 29 corresponde al marcador Lambda Hind III. En el carril 2 se presentan las bandas correspondientes a la solución alimentada, donde se observa la presencia del plásmido y el RNA. El carril 3 corresponde a la muestra tomada al inicio de la etapa de adsorción los 10.5 min . En este carril no se alcanzan a apreciar bandas, indicando una adecuada adsorción. Los carriles 4 y 5 pertenecen a las muestras tomadas durante el rompimiento a los 25 y 32.5 min respectivamente. En estos carriles se observan bandas con el plásmido y RNA, indicando la salida de la ZTM de la columna. El carril 6 pertenece a una muestra de la etapa de lavado a los 47 min y no se aprecian bandas, en concordancia con la nula señal de absorción en el cromatograma. Los carriles 7 (62 min), 8 (64.5 min), 9 (67 min), 10 (69 min), 11 (72 min), 12 (74 min) pertenecen a la etapa de elución y en todos se observa una sola banda de RNA.

El carril 1 de la Figura 30 corresponde al marcador Lambda Hind III. En el carril 2 se presentan las bandas correspondientes a la solución alimentada, donde se observa la presencia del plásmido y RNA. En los carriles 3, 4 y 5 pertenecen a las muestras tomadas durante la etapa de elución a los 77 , 79 y 81.5 min respectivamente. En estos carriles sólo se observa una banda de RNA. En los carriles correspondientes a las muestras tomadas en la etapa de elución: 6 (84 min), 7 (87 min), 8 (90 min), 9 (94 min), 10 (98 min), 11 (103 min) y 12 (108 min); se aprecian dos bandas, una con el plásmido y la otra con RNA.

Tabla 8. Gradiente de elución utilizado en el tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El buffer de adsorción fue 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA a pH = 8.0 y el de elución fue 2 *M* de NaCl en buffer 10 *mM* Tris/1.0 *mM* EDTA.

Pasos	Tiempo (<i>min</i>)	Buffer
1	0 - 60	0 – 75 % Buffer de Elución
2	60 - 80	100 % Buffer de Elución
3	80 - 90	100 % Buffer de Adsorción

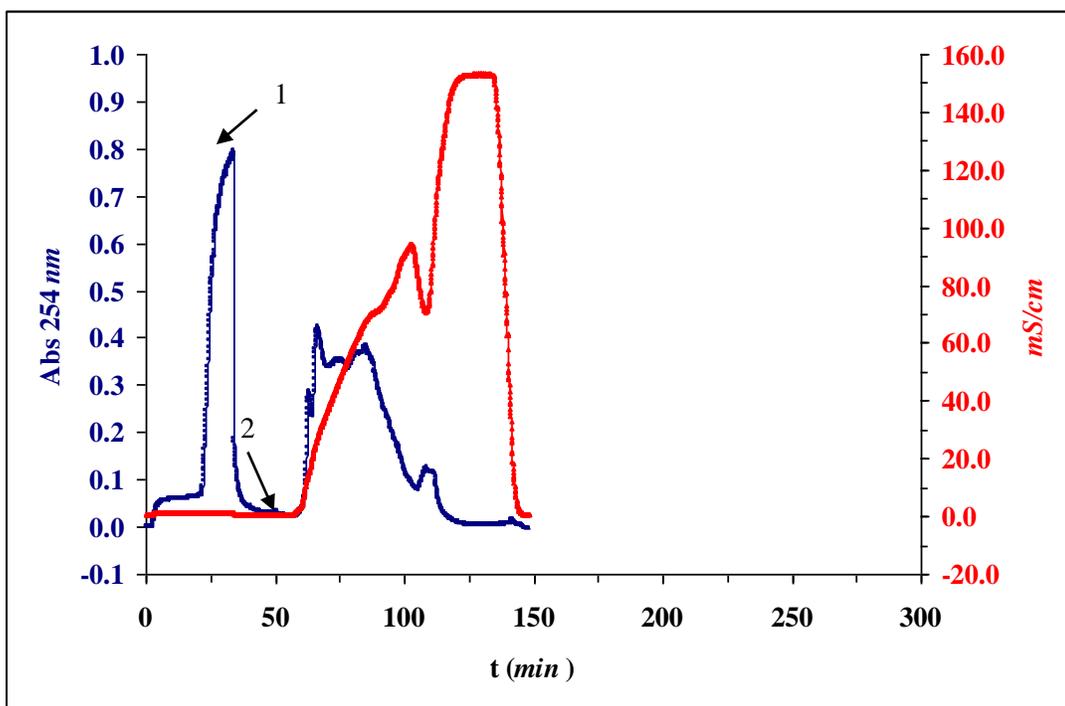


Figura 28. Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 ml/min y la columna se empacó con 30 membranas. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.

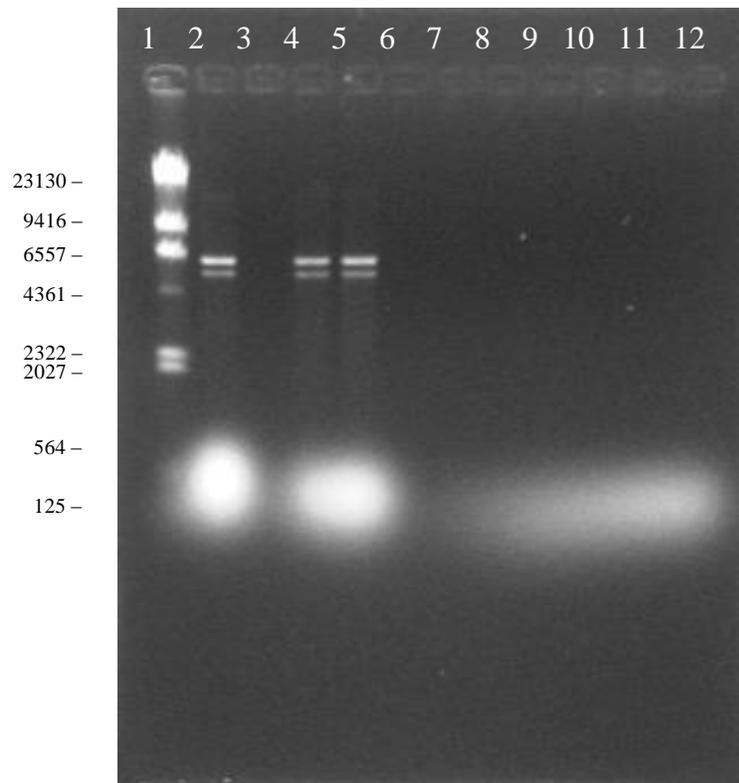


Figura 29. Análisis electroforético del tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 pb). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución de alimentación, 3 adsorción (10.5 min), 4 adsorción (25 min), 5 adsorción (32.5 min), 6 lavado (47 min), 7 elución (62 min), 8 elución (64.5 min), 9 elución (67 min), 10 elución (69 min), 11 elución (72 min), 12 elución (74 min).

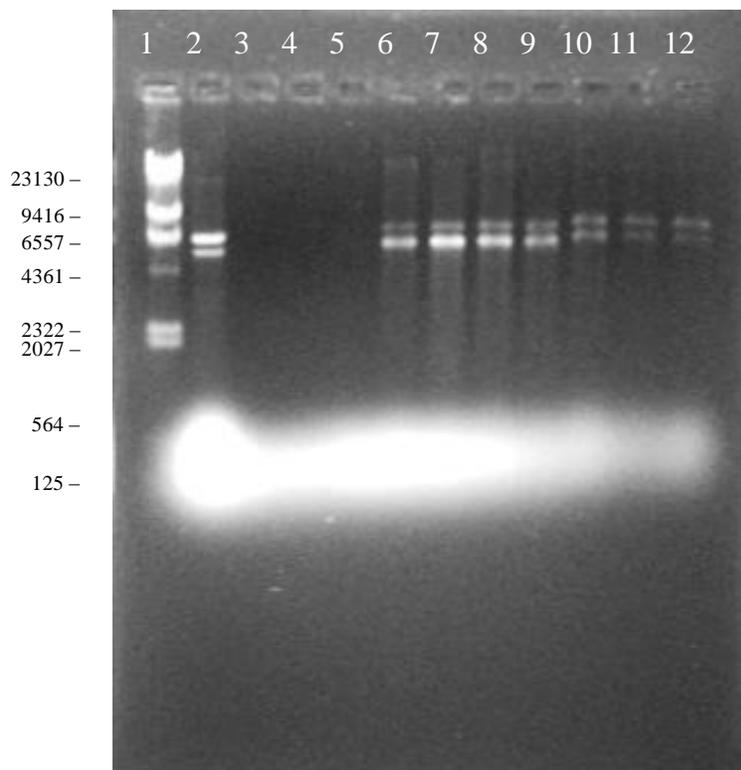


Figura 30. Análisis electroforético del tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 *pb*). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El carril 1 contiene el marcador, el 2 contiene la solución de alimentación. Todos los demás carriles están alimentados de muestras de la etapa de elución. A cada carril le corresponden los tiempos de: 3 (77 *min*), 4 (79 *min*), 5 (81.5 *min*), 6 (84 *min*), 7 (87 *min*), 8 (90 *min*), 9 (94 *min*), 10 (98 *min*), 11 (103 *min*), 12 (108 *min*).

Los resultados que se mostraron en las Figuras 29 y 30 sugieren la formación en el cromatograma de un pico de RNA traslapado con un pico triangular del Plásmido. Esto produce un gradiente de negativo de concentración y positivo de purificación del plásmido, que se observa en los carriles 6 al 12 de la Figura 30.

Por otro lado, al comparar las Figuras 24, 26 y 28 se observa que los comportamientos en las etapas de adsorción son prácticamente iguales, indicando una singular reproducibilidad del experimento en esta fase.

Los resultados del tercer estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36, muestran que a partir de la muestra 6 del segundo gel (Fig. 30) se detecta la presencia de plásmido en la elución, pero aún no completamente purificado. Este resultado condujo a un cuarto estudio de purificación, utilizando las fracciones cromatográficas de aproximadamente 1.5 ml, correspondientes a las muestras de los carriles 6-12 de la Figura 30.

Antes de iniciar el cuarto estudio, los 10.0 ml de la mezcla de fracciones se lavaron en la celda de diafiltración para eliminar las sales y acondicionar la muestra. Debido a que la solución de entrada de este experimento contenía muy poca concentración de RNA, comparada con la solución de entrada de los anteriores, se decidió utilizar el gradiente 1.5 M/50 min de la Tabla 7.

En la Figura 31 se muestran las curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente correspondientes. Puede observarse en la Figura que la etapa de adsorción transcurrió por 20 min, tiempo en el que se alimentó la muestra conteniendo el plásmido. Se observa una pequeña meseta en la adsorción, la cual no representa la curva de ruptura de la solución de entrada, ya que esta no alcanzó a equilibrar la columna. Dicha meseta ha estado presente en los estudios anteriores y podría ser la curva de ruptura de alguna impureza en la solución.

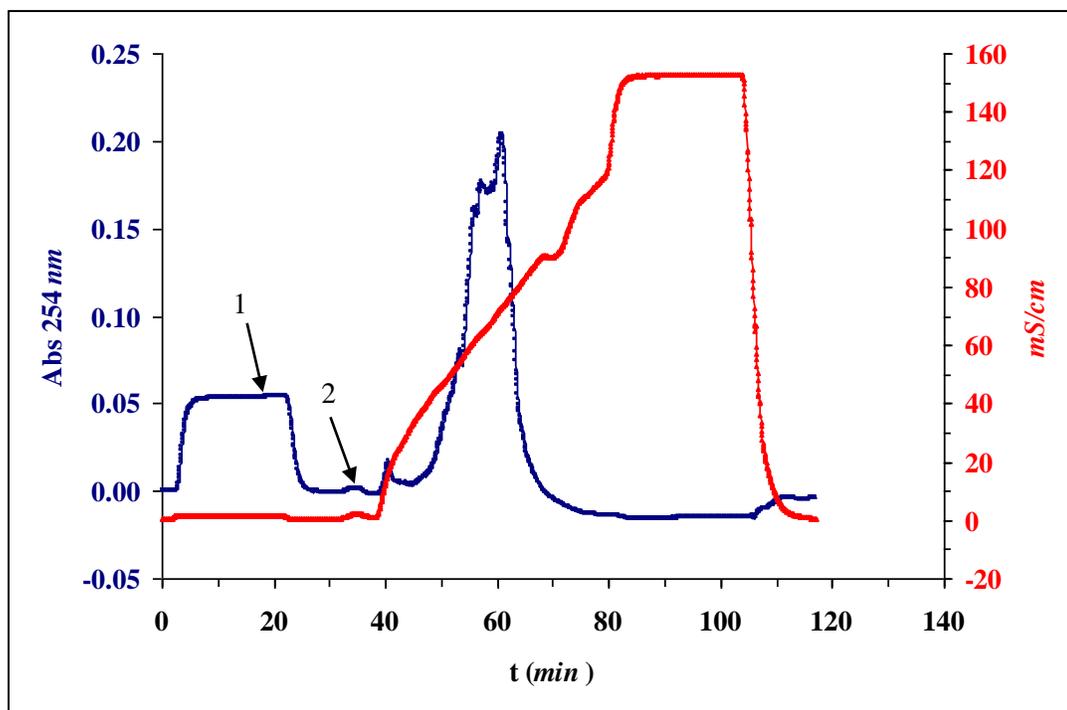


Figura 31. Curvas de adsorción, lavado y elución con gradiente para el cuarto estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El flujo fue de 0.5 ml/min y la columna se empacó con 30 membranas. La solución de alimentación a la columna fue obtenida del lavado de las muestras seleccionadas de la etapa de elución del tercer estudio de purificación del plásmido. 1 inicio de la etapa de lavado, 2 inicio de la elución con gradiente.

La Figura 32, muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa realizada con las muestras del cuarto estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36. El carril 1 corresponde al marcador λ Hind III. En el carril 2 se presentan las bandas correspondientes a la solución alimentada, donde se observa la presencia del plásmido y RNA. El carril 3 corresponde a la muestra tomada a los 5 *min* de comenzado el estudio, en este carril no se alcanzan a detectar bandas, lo cual indica que todo lo que está entrando a la columna se está adsorbiendo.

Los carriles 4, 5, 6 y 7 de la Figura 32 corresponden a las muestras tomadas en la etapa de elución a los 39.5, 45.5, 47.5 y 50.0 *min* respectivamente. En estos carriles no se alcanzan a percibir bandas, esto debido a que la señal en el cromatograma es muy baja, lo que indica que estas muestras están muy diluidas y el análisis electroforético no las detecta. Los carriles 8, 9 y 10 corresponden a muestras tomadas durante la etapa de elución a los 52.5, 55.0 y 57.5 *min*, respectivamente. En estos carriles sólo se observa una banda de RNA. En el carril 11 de la muestra de la etapa de elución tomada a los 60 *min* se observa una banda de plásmido y otra con RNA. En el carril 12 de la muestra de la etapa de elución tomada a los 63 *min*, se observa una banda bien definida que correspondería a plásmido, sin la presencia de RNA. “Estos resultados apoyan la factibilidad técnica de un nuevo bioproceso para purificación de plásmidos mediante el uso de sólo cromatografía de intercambio iónico en membranas”.

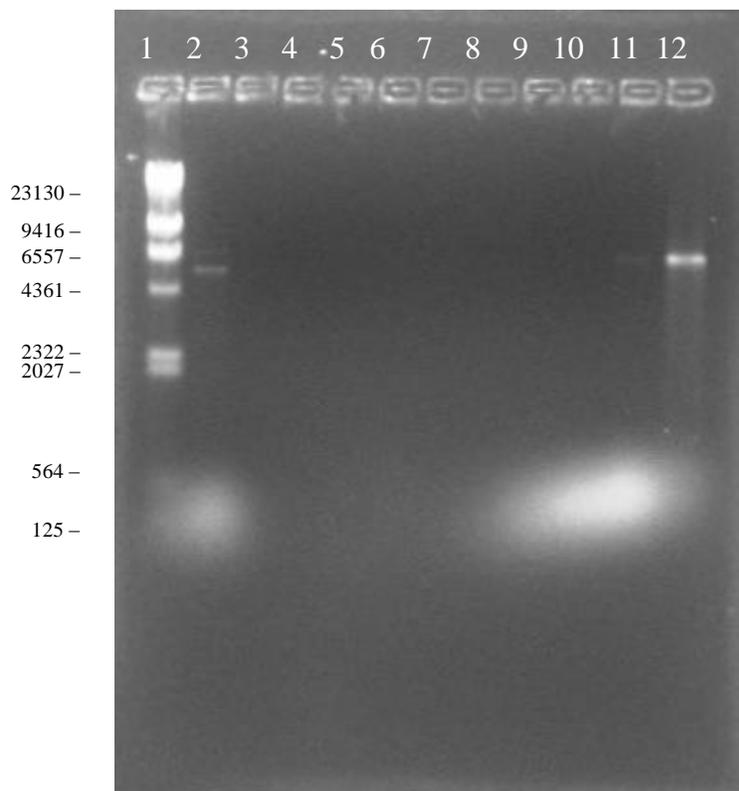


Figura 32. Análisis electroforético del cuarto estudio de purificación del plásmido pVR1012-NH36 (5874 *pb*). En la parte superior aparece el número de carril y en la parte izquierda el número de pares de bases del marcador utilizado. El contenido de cada carril es: 1 marcador, 2 solución alimentada a la columna, 3 adsorción (5 *min*), 4 elución (39.5 *min*), 5 elución (45.5 *min*), 6 elución (47.5 *min*), 7 elución (50 *min*), 8 elución (52.5 *min*), 9 elución (55 *min*), 10 elución (57.5 *min*), 11 elución (60 *min*), 12 elución (63 *min*).

4.5 Simulación del Bioproceso

4.5.1 Descripción del Bioproceso Base

Se realizó la simulación del bioproceso para la producción de plásmidos desarrollado a nivel laboratorio. Para establecer una base comparativa con los resultados reportados por Freitas y col. [41], en el análisis técnico-económico del bioproceso se utilizaron los parámetros de evaluación que se muestran en la Tabla 9.

En la Figura 33 se presenta el diagrama de flujo del bioproceso a escala para la producción y purificación de plásmidos, tomando como base el bioproceso desarrollado a nivel laboratorio. Se pueden distinguir las etapas de fermentación, recuperación, purificación y empaque. En este bioproceso el rendimiento en la recuperación del plásmido por batch es alrededor del 64% (Se recuperan 133 g de pDNA de un lisado que contenía 209 g de pDNA). A continuación se describe brevemente este bioproceso.

Tabla 9. Parámetros de evaluación

Área	Concepto	Valor
Mercado	Demanda	$P = 22.2 \text{ kg pDNA/año}$
	Producción	330 días/año 1 batch/2 días 3 dosis ¹ /caja
	Precio	\$10.00/caja
Evaluación	Vida del proyecto	15 años a partir del 2008
	Depreciación	Lineal, 10 años y 10% valor salvamento
	ISR	40%

¹dosis de 1 ml con concentración de 2 mg pDNA/ml.

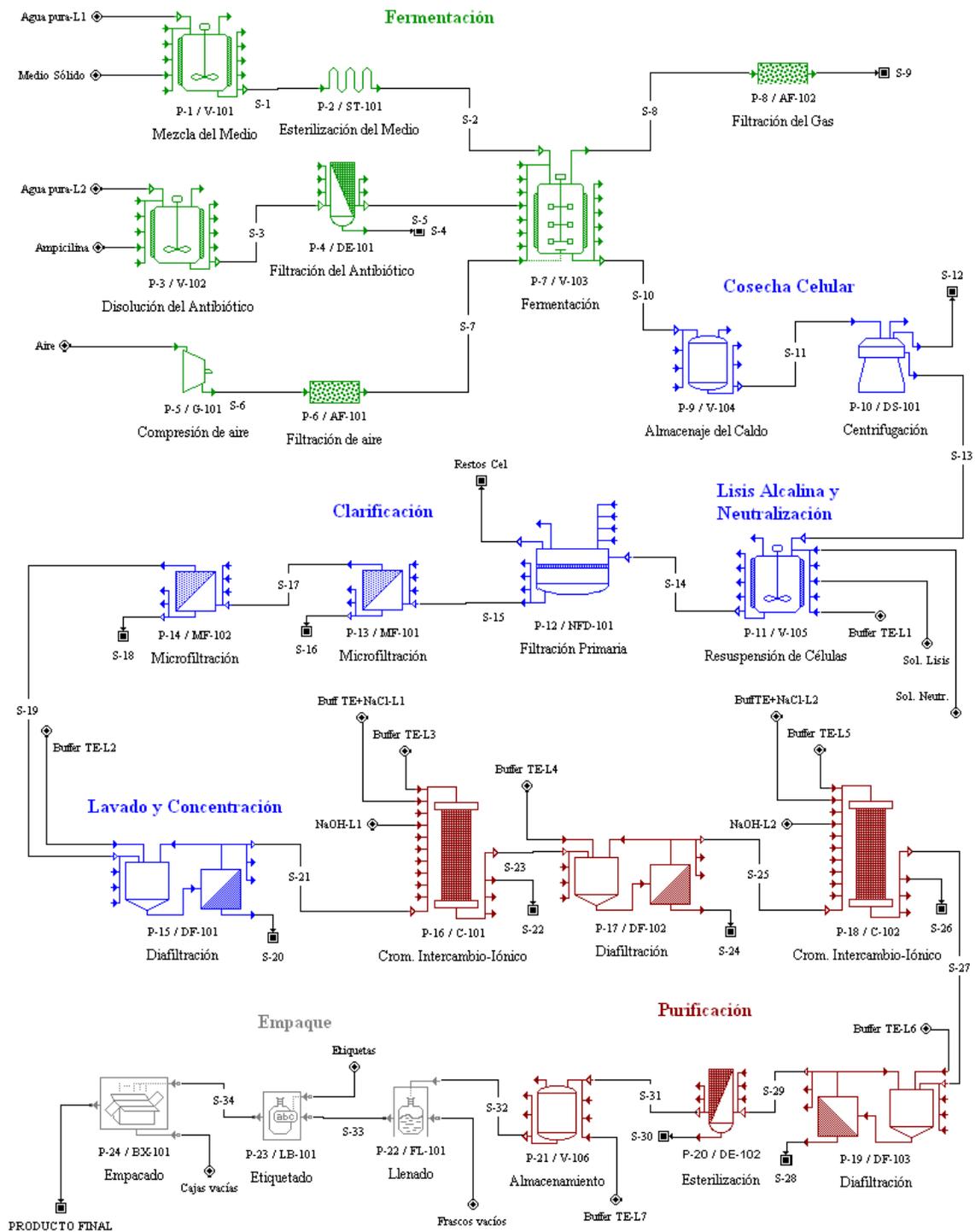
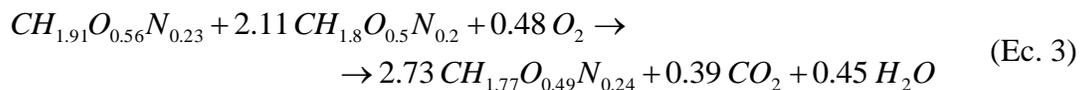


Figura 33. Diagrama de flujo del bioproceso a escala para la producción y purificación de plásmidos, tomando como base el bioproceso desarrollado a nivel laboratorio.

Fermentación. El medio 2TY para la fermentación se prepara en un tanque de acero inoxidable (P-1) y se esteriliza continuamente en el equipo (P-2). El compresor axial (P-5) y el filtro (P-6) proveen aire estéril al fermentador a un flujo de 1.5 *vvm*. El inóculo, formado por células de *E. coli*, se prepara mediante fermentaciones de volúmenes progresivos (no se muestra en la Figura). La solución de ampicilina es utilizada para prevenir el crecimiento de bacterias libres del plásmido y otros microorganismos, se prepara en el tanque de acero inoxidable (P-3) y es esterilizada por filtración (P-4) debido a su sensibilidad al calor. La fermentación (P-7) se lleva a cabo durante 24 h a 37°C. La concentración final de células en el fermentador V-103 fue de 7 g/l de peso seco. Al final de la fermentación el caldo es transferido a un tanque de almacenamiento (P-9) y el fermentador es lavado y esterilizado para prepararlo para el siguiente batch.

La reacción que se usó para describir la conversión de nutrientes a biomasa se muestra en la ecuación (Ec. 3).



Los coeficientes estequiométricos fueron calculados mediante balances de los elementos C, H, O y N como recomienda Shuler y col. [50]. Se asumió que el consumo de triptona es el doble del extracto de levadura. El coeficiente de respiración resultó en 0.845, cercano a valores reportados [41]. Las formulas empíricas para el extracto de levadura ($CH_{1.91}O_{0.56}N_{0.23}$), triptona ($CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$) y biomasa ($CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$) en su forma reducida fueron tomadas de Doran [51].

La composición utilizada de *E. coli* es de 50% proteínas, 20% RNA, 16.7% endotoxinas, 1.7% gDNA, 10.9% de otros componentes (iones pequeños, lípidos, carbohidratos, etc.) y 0.7% de plásmido en peso seco [52].

Recuperación. Las células se recuperan en una centrifuga de discos (P-10) a 14300 *g* (se asumió un rendimiento del 98%). Durante la centrifugación se logra concentrar aproximadamente 21 volúmenes, de 4276 *l* a 197.39 *l*. El paso siguiente es la resuspensión del paquete celular en un tanque mezclador (P-11) agregando 1595 *l* de buffer TE. La lisis se lleva a cabo agregando el mismo volumen de solución de lisis y aplicando agitación. Los restos celulares, proteínas y moléculas de gDNA se precipitan por la adición de 3190 *l* de solución 3 *M* de acetato de potasio a pH=5.5. Los precipitados se remueven por filtración (P-12). La temperatura de operación se mantuvo a 4°C en el proceso de lisis y neutralización. Al final de estas operaciones se remueve 94.3% de endotoxinas, 40% de gDNA 99% de proteínas, 66% de RNA, 10% de moléculas pequeñas y se pierde el 20% del plásmido.

Después de la filtración primaria, el lisado se pasa consecutivamente por un microfiltro de 5 μm de diámetro de poro (P-13), un microfiltro con 0.45 μm de diámetro de poro (P-14) y por un sistema de diafiltración con 10 volúmenes (P-15), donde se eliminan precipitados, sales del sistema y moléculas pequeñas como es el caso de algunas proteínas y endotoxinas. Al final del de la diafiltración la solución se concentra 10 veces de 3355 *l* a 335 *l*.

Purificación. La purificación se realiza en columnas cromatografías de intercambio iónico empacadas con membranas comerciales Mustang Q. En la operación cromatográfica (P-16) primero se equilibra la columna con buffer de adsorción y a continuación se carga la solución proveniente de la diafiltración. Seguidamente se lleva a cabo un lavado con buffer de de adsorción y posteriormente se eluye con gradiente (2*M*/120 *min*). Por último se lava y acondiciona la columna con 1 *M* NaOH. En este paso cromatográfico se utilizan 10 columnas en paralelo.

La solución que contiene la fracción del plásmido del primer paso cromatográfico se diafiltra (P-17) utilizando las mismas condiciones de lavado y concentración que en la primer diafiltración (10 vol y 10:1). La solución resultante de esta diafiltración se alimenta a una columna cromatográfica de intercambio iónico (P-18), que opera de igual

manera que las columnas del primer paso cromatográfico. A continuación la solución recuperada del paso cromatográfico se pasa por un sistema de diafiltración (P-19) para lavar las sales (10 volúmenes). Posteriormente la solución es esterilizada por filtración (P-20) para asegurarse que no existan contaminantes antes del empaque y se deposita en un tanque de almacenamiento (P-21).

Empaque. El producto se pasa al llenado, donde se coloca un mililitro de solución con aproximadamente 2 mg/ml de pDNA en viales que son etiquetados y empacados. Cada paquete de producto final contiene tres viales. El impacto de esta sección en el análisis económico del bioproceso no se tomo en cuenta directamente en el estudio.

4.5.2 Análisis Económico del Bioproceso Base

En la Tabla 10 se muestran los principales indicadores de la evaluación económica del bioproceso base. El proyecto presenta valores muy positivos para el período de recuperación, la tasa interna de rendimiento y el valor presente neto. Sin embargo, cuando se comparó la inversión inicial y los costos de operación con los del proyecto de referencia, se observó una diferencia significativa en los costos de producción, debida principalmente al costo de la primera operación cromatográfica.

Tabla 10. Resultados de la evaluación económica del proyecto base.

Concepto	Monto
Inversión total	\$ 28,274,881
Ingresos anuales	\$ 37,724,006
Costos de operación anual	\$ 8,528,341
Producción (cajas/año)	3,772,400
Costo de producción por caja	\$ 2.26
Margen (utilidad bruta/ingresos)	77.39%
Retorno sobre la inversión	70.45%
Período de retorno en años	1.42
Tasa interna de rendimiento (TIR)	43.67%
Valor presente neto (VPN) al 7.00 %	\$ 107,479,178

4.5.3 Desarrollo del Bioproceso Alternativo

En base a lo anterior se realizaron modificaciones sustanciales al bioproceso base, se substituyó la primera etapa cromatográfica por una operación de precipitación de RNA con sulfato de amonio, seguida de su remoción por medio de microfiltración. En la Figura 34 se presenta el diagrama de flujo del bioproceso con las modificaciones realizadas. En este bioproceso el rendimiento en la recuperación del plásmido por batch es alrededor del 70% (Se recuperan 147 g de pDNA de un lisado que contenía 209 g de pDNA). Dicho rendimiento en la recuperación del plásmido muestra un avance significativo con respecto al rendimiento obtenido con el bioproceso base, que fue de 64%. A continuación se describe brevemente este bioproceso.

Fermentación. Todas las operaciones consideradas y parámetros usados en esta etapa son los mismos que los de la etapa de fermentación del caso base.

Recuperación. Las células se recuperan en una centrifuga de discos (P-10) a 14300 g (se asumió un rendimiento del 98%). Durante la centrifugación se logra concentrar aproximadamente 21 volúmenes, de 4276 l a 197.39 l. El paso siguiente es la resuspensión del paquete celular en un tanque mezclador (P-11) agregando 1595 l de buffer TE. La lisis se lleva a cabo agregando el mismo volumen de solución de lisis y aplicando agitación. Los restos celulares, proteínas y moléculas de gDNA se precipitan por la adición de 3190 l de solución 3 M de acetato de potasio a pH=5.5. Los precipitados se remueven por filtración (P-12). La temperatura de operación se mantuvo a 4°C en el proceso de lisis y neutralización. Al final de estas operaciones se remueve 94.3% de endotoxinas, 40% de gDNA 99% de proteínas, 66% de RNA, 10% de moléculas pequeñas y se pierde el 20% del plásmido.

Después de una filtración primaria (P-12), el lisado se pasa consecutivamente por microfiltros de 5 y 0.45 μm de diámetro de poro (P-13 y P-14) y por un sistema de diafiltración (P-15), donde se eliminan precipitados, sales y moléculas pequeñas. Al final del de la diafiltración la solución se concentra 10 veces de 3355 l a 335 l.

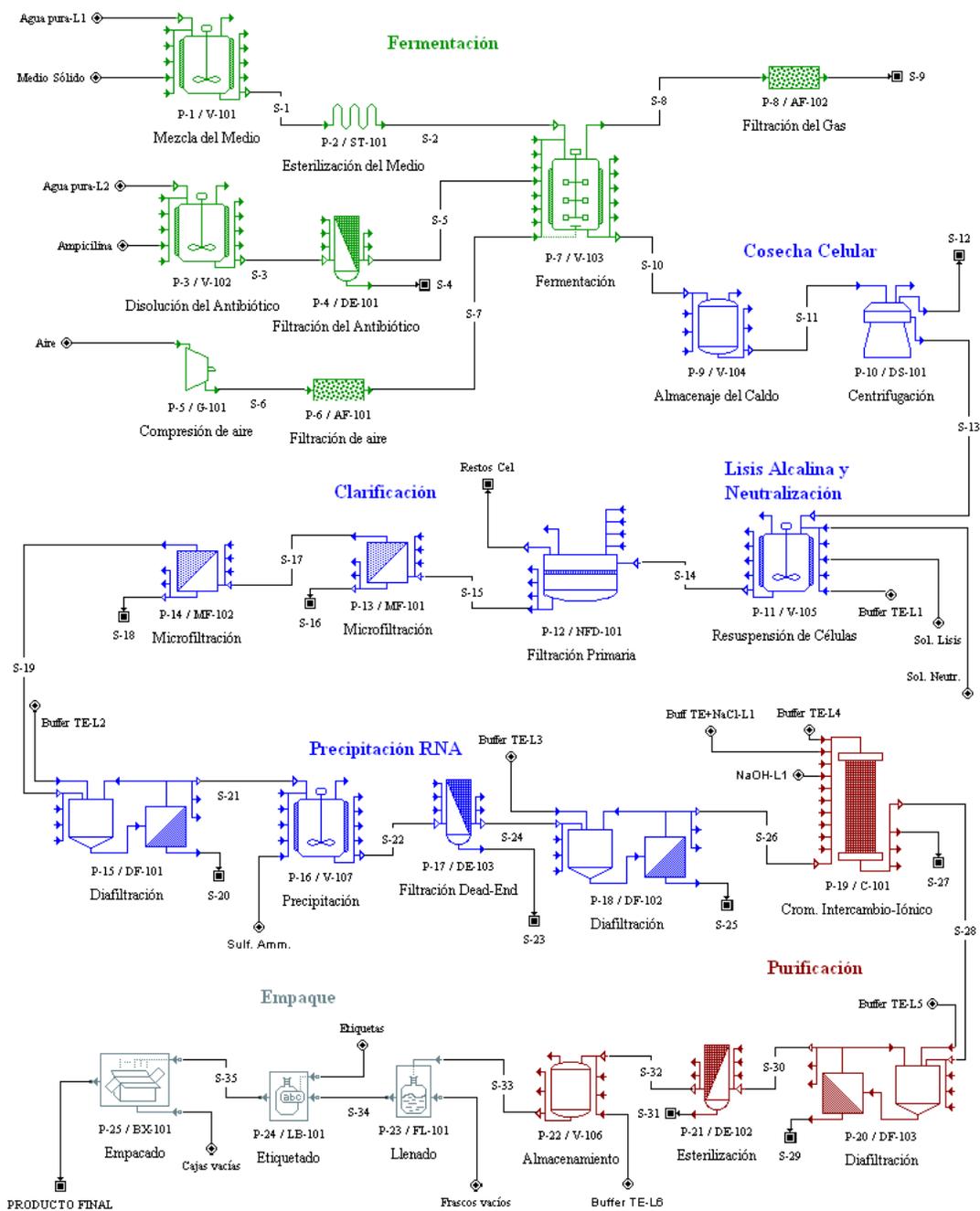


Figura 34. Diagrama de flujo del bioproceso alternativo para la producción y purificación de plásmidos, con una etapa de precipitación de RNA con sulfato de amonio.

Los 355 l resultantes de la diafiltración se pasan a una precipitación con sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración 2.5 M (P-16), seguida de una separación de los precipitados con un microfiltro (P-17), removiendo 99.8% de endotoxinas, 97.2% de gDNA, 83% de proteínas y 97.1% de RNA [41]. Después de la remoción de precipitados la solución se pasa por un sistema de diafiltración con 14 volúmenes (P-18) donde se lavan las sales y se concentra la solución 8 veces de 401 l a 50 l.

Purificación. La purificación se realiza en una columna cromatográfica de intercambio iónico empacada con membranas comerciales Mustang Q. En la operación cromatográfica (P-19) primero se equilibra la columna con buffer de adsorción y a continuación se carga la solución proveniente de la diafiltración. Seguidamente se lleva a cabo un lavado con buffer de de adsorción y posteriormente se eluye con gradiente (2M/120 min). Por último se lava y acondiciona la columna con 1 M NaOH.

La fracción recuperada del paso cromatográfico se pasa por un sistema de diafiltración (P-20) para lavar las sales (10 volúmenes). Posteriormente la solución es esterilizada por filtración (P-21) para asegurarse que no existan contaminantes antes del empaque y se deposita en un tanque de almacenamiento (P-22).

Empaque. El producto se pasa al llenado, donde se coloca un mililitro de solución con aproximadamente 2 mg/ml de pDNA en viales que son etiquetados y empacados. Cada paquete de producto final contiene tres viales. El impacto de esta sección en el análisis económico del bioproceso no se tomo en cuenta directamente en el estudio.

Balances de masa del bioproceso. El balance de masa de bioproceso, se presenta en la Tabla 11 en forma resumida. Los valores de los componentes son típicos de estos tipos de procesos. El aire y el agua representan el 98.28% de las materias primas más utilizadas. A excepción del plásmido y los gases, todos los demás materiales de salida van a líneas de desecho, donde son dispuestos para un tratamiento adecuado en orden de minimizar los impactos ambientales.

Tabla 11. Balances de masa total para la producción de pDNA (kg/año). El rendimiento en la recuperación de plásmidos es del 70 %.

Componente	Total de Entrada (Kg/año)	Total de Salida (Kg/año)	Producto (Kg/año)
Acetato de Potasio	2209	0	
Agua	3041897	3042491	
Agua para inyección	371442	371442	
Ampicilina	0.33	0.33	
Biomasa	0	100	
Cloruro de sodio	4438	4438	
Dióxido de carbono	0	1259	
EDTA	177	177	
Endotoxinas	0	819	
Extracto de levadura	6924	5008	
gDNA	0	83	
Hidróxido de sodio	5247	5247	
Moléculas pequeñas	0	535	
Nitrógeno	1397635	1398288	
Oxígeno	424295	423367	
Papel	13160	13160	
pDNA	0	34.3	24.15
Proteínas	0	2453	
RNA	0	981	
SDS	2630	2630	
Sulfato de Amonio	20172	20172	
Triptona	11080	7268	
TRIS HCl	734	734	
Vidrio	25067	25067	
Total (materias primas)	5327107	5325755	

Programa de Producción. La programación de los equipos del proceso para dos lotes de producción consecutivos se muestra en la Figura 35 en forma de gráfico de Gantt. Puede observarse en la Figura que el proceso de un lote tiene la duración de 56 *h*, siendo la etapa de fermentación el cuello de botella del proceso con una duración 24 *h*. Conjuntamente con las operaciones de preparación, vaciado y limpieza del fermentador el ciclo tiene una duración de 48 *h*.

4.5.4 Análisis Económico del Bioproceso Alternativo

En la Tabla 12 se muestran los principales indicadores de la evaluación económica del bioproceso alternativo. El proyecto presenta valores muy positivos para el período de recuperación, la tasa interna de rendimiento y el valor presente neto. Al comparar la inversión inicial y los costos de operación con los del proyecto de referencia y los del bioproceso base, se observó una significativa mejoría en los indicadores económicos. La inversión disminuyó en un 25%, los ingresos anuales aumentaron en un 10% y los costos de producción unitaria disminuyeron en un 25%. De tal manera que tanto el período de retorno, la TIR y el VPN se mejoraron significativamente.

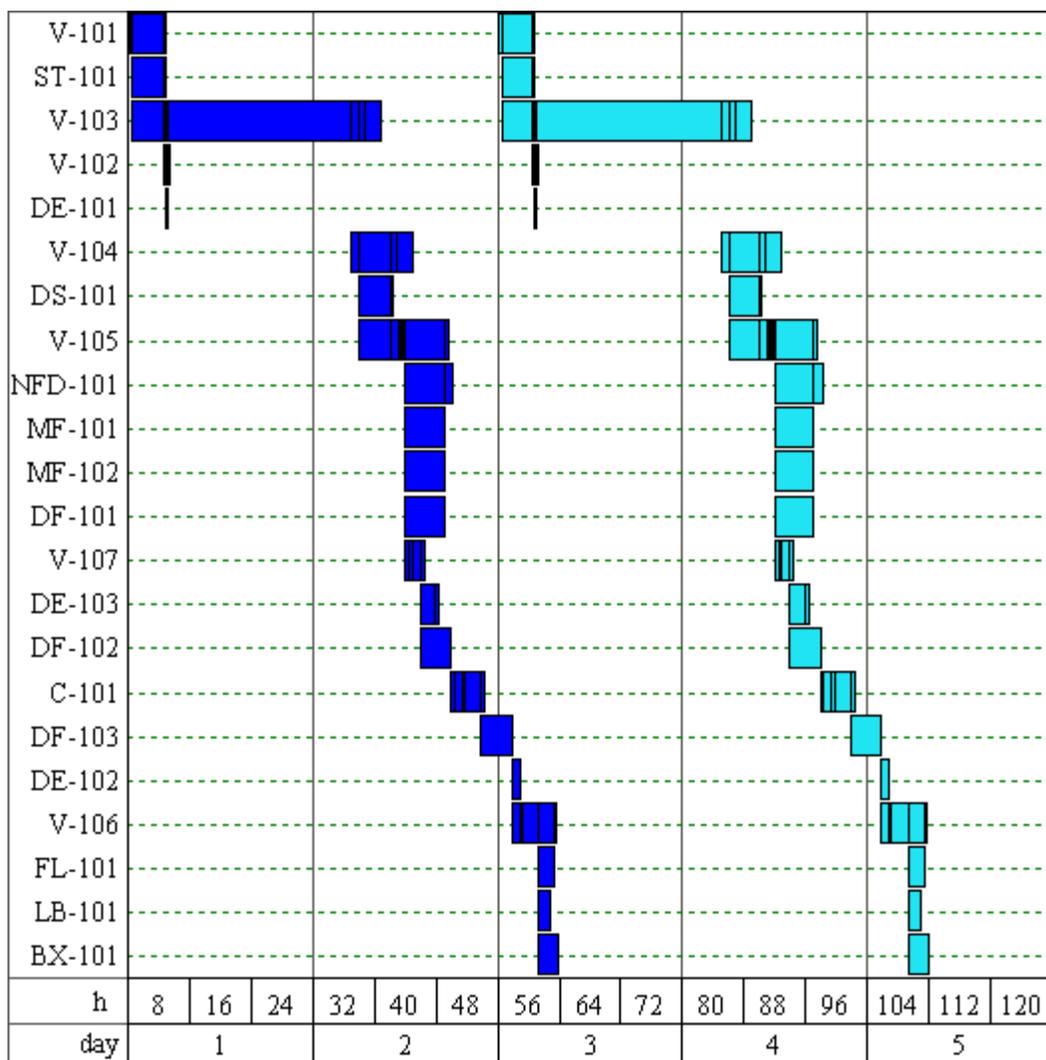


Figura 35. Gráfico de Gantt para dos lotes consecutivos del bioproceso de producción de plásmidos alternativo.

Tabla 12. Resultados de la evaluación económica del proyecto alternativo.

Concepto	Monto
Inversión total	\$ 21,298,247
Ingresos anuales	\$ 41,778,396
Costos de operación anual	\$ 7,042,167
Producción (cajas/año)	4,177,839
Costo de producción por caja	\$ 1.69
Margen (utilidad bruta/ingresos)	83.14%
Retorno sobre la inversión	106.33%
Período de retorno en años	0.94
Tasa interna de rendimiento	57.89%
Valor presente neto al 7.00 %	\$ 131,847,327

En la Figura 36 se muestra la distribución de los costos de operación anual del proyecto alternativo, nótese que los costos de servicios son mínimos representando solamente el 1%. El equipo representa el 52% de los costos de operación anual, siendo este costo de operación el más alto, lo que puede deberse al tipo de proceso, ya que el producto se produce en pequeñas cantidades. El costo que le sigue es el de mano de obra con 28%, luego el de materias primas con un 8% que es muy cercano al costo de operación anual de consumibles (7%). Por último está el costo de operación anual de control de calidad con un 4%.

En la Figura 37 muestra los costos de operación anual por cada sección para el bioproceso alternativo. La sección de purificación representa un 11% de los costos de operación anual. A las secciones de fermentación y recuperación les corresponden los costos de operación de 49 y 40, respectivamente. Generalmente la sección de fermentación es la que representa los costos de operación más altos, esto debido a las grandes cantidades de medio de cultivo que se utilizan. El hecho de que el porcentaje de la sección de recuperación, sea semejante al de la fermentación, se debe principalmente a los consumibles utilizados en las operaciones de microfiltración y diafiltración.

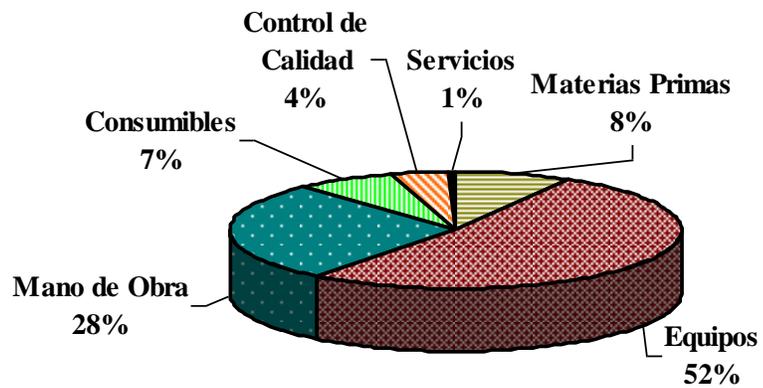


Figura 36. Costos de operación anual del proyecto alternativo para la producción y purificación de plásmidos.

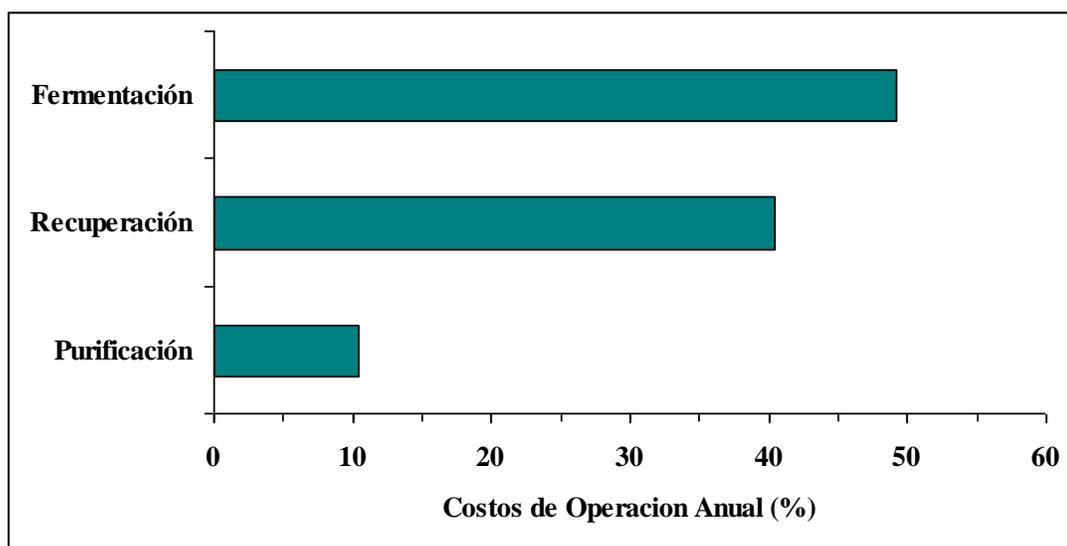


Figura 37. Costos de operación anual por sección del bioproceso alternativo.

La Tabla 13 muestra el flujo de efectivo anual del proyecto alternativo. En la tabla se puede apreciar que el proyecto arranca en el segundo cuatrimestre del cuarto año, por lo que las ventas en este año son correspondientes a solamente ocho meses. Nótese que desde que finaliza el período de arranque la planta trabaja al 100%. A partir del quinto año y hasta el año trece que es cuando se completan los diez años de depreciación del equipo, el flujo de efectivo anual se mantiene constante. Por otro lado el flujo de efectivo en el año catorce disminuye a pesar de que los costos de operación también disminuyen, esto se debe a que ya no se carga la depreciación del equipo al flujo de efectivo. Por último, en el año 15, que es hasta donde se planea el proyecto, se observa un flujo de efectivo mayor que en los años anteriores y este se debe en mayor medida a que se carga a la inversión fija directa un valor de recuperación por los equipos de la planta.

En la Figura 38 se muestra un aumento en el retorno sobre la inversión del 11.77% por cada \$ 1 que se incrementa en el precio de venta de cada paquete. Por otro lado el período de retorno disminuye por cada \$ 1 que se incrementa. Con el precio más bajo (\$ 5) el período de retorno es alrededor de 2.11 años.

Tabla 13. Flujo de efectivo (miles) del proyecto alternativo.

Año	DFC	Ventas	OC	UAI	D	Impuesto	UDI	Flujo de Efectivo
1	-6,018	0	0	0	0	0	0	-6,018
2	-8,024	0	0	0	0	0	0	-8,024
3	-6,018	0	0	0	0	0	0	-6,018
4	-235	27,852	6,571	21,281	1,805	8,512	12,769	14,339
5	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
6	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
7	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
8	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
9	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
10	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
11	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
12	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
13	0	41,778	7,042	34,736	1,805	13,894	20,842	22,647
14	0	41,778	5,237	36,542	0	14,617	21,925	21,925
15	2,241	41,778	5,237	36,542	0	14,617	21,925	24,166

Utilidad antes de impuesto (UAI) = Ventas - Costos de operación (OC)

Impuesto = UAI × 0.4

Utilidad después de impuesto (UDI) = UAI - Impuesto

Flujo de Efectivo = Inversión Fija Directa (DFC) + Depreciación (D) + UDI

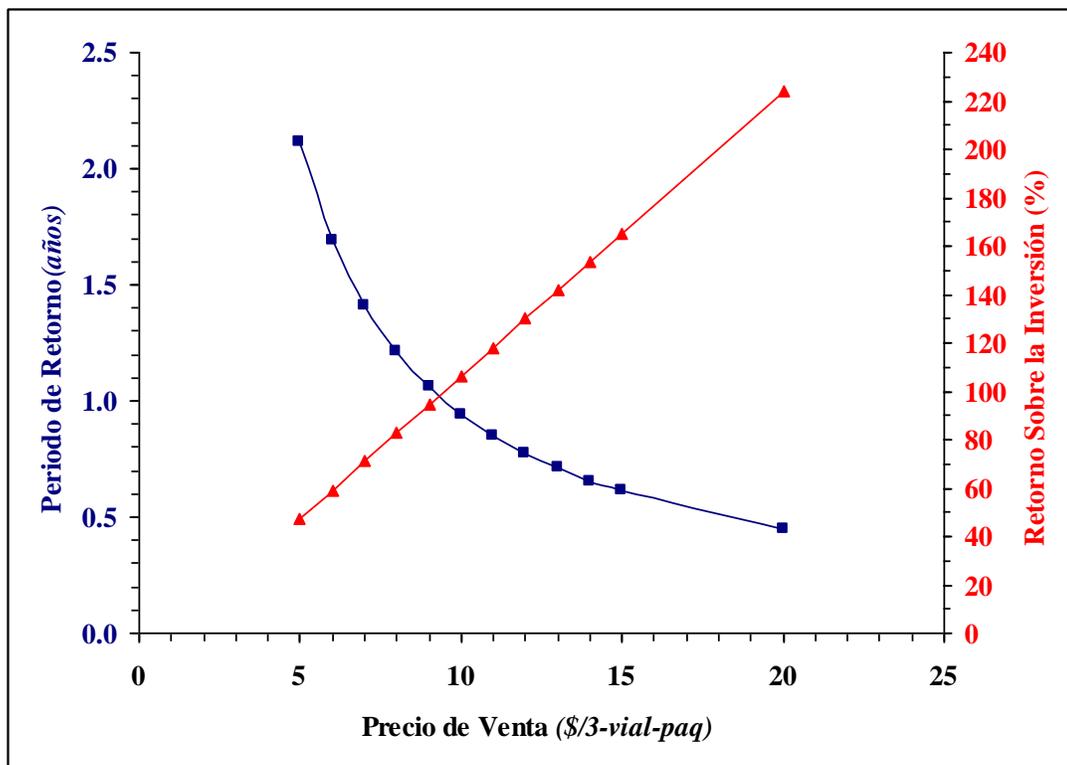


Figura 38. Período de retorno y retorno sobre la inversión a diferentes precios de venta para el bioproceso alternativo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En esta investigación se lograron preparar y determinar las propiedades básicas de adsorción de columnas empacadas con membranas de intercambio iónico. Estas columnas mostraron un adecuado comportamiento dinámico y una capacidad de adsorción de plásmidos prácticamente igual a la reportada en literatura. Los adsorbentes macroporosos de intercambio iónico preparados a partir de Novarosa SE-10000/40, presentaron una menor capacidad de adsorción que las reportadas en la literatura. Los estudios de equilibrio con el plásmido pCAT mostraron que el modelo de Langmuir se ajustó adecuadamente a los datos experimentales.

En el bioproceso desarrollado para la producción de plásmidos, la etapa de biorreacción alcanzó rendimientos típicos de las fermentaciones batch. En los procesos de lisis y neutralización, se logró obtener flóculos de gran dimensión mediante el uso de agitación moderada, lo cual facilitó la separación de estos precipitados. El esquema propuesto para la clarificación del sobrenadante mediante una combinación de una filtración primaria y una microfiltración secuencial continua, permitió un adecuado manejo de los sólidos.

Los estudios cromatográficos para la purificación del pRL-CMV con AMP-II mostraron una buena reproducibilidad en la etapa de adsorción. El análisis del efecto del flujo en los resultados sugiere que la capacidad de la columna prácticamente no varía en el rango estudiado, ni con el tratamiento de regeneración. Al eluir isocráticamente se logró una concentración y purificación parcial del plásmido. Mediante el enfoque experimental de elución con gradiente se logró la concentración del plásmido y una mayor purificación del mismo.

En esta investigación se logró una buena reproducibilidad entre los experimentos cromatográficos de adsorción del pVR1012-NH36 con membranas de intercambio iónico. A través de los estudios de condiciones de elución, se logró obtener un gradiente que permitió una concentración y purificación parcial del plásmido. Mediante una segunda operación cromatográfica de la fracción recuperada, se logró obtener el plásmido con una concentración de RNA indetectable en gel de agarosa al 0.8%. Estos resultados apoyan la factibilidad técnica de un nuevo bioproceso para la purificación de plásmidos, mediante el uso de sólo cromatografía de intercambio iónico en membranas. Mediante simulación se logró escalar al bioproceso desarrollado para la producción de plásmidos (bioproceso base). En la simulación se utilizó cromatografía de membranas de intercambio iónico. El análisis económico del bioproceso base, realizado en forma comparativa con un proyecto de referencia, presentó indicadores económicos del mismo orden. Sin embargo, la inversión inicial y los costos de operación del bioproceso base fueron más altos que los del proyecto de referencia. Este análisis sugirió realizar modificaciones al bioproceso base, de tal manera que se generó un bioproceso alternativo. El análisis económico del bioproceso alternativo, comparado con los bioprocesos base y de referencia, presentó valores mejorados en los indicadores económicos. El análisis de los bioprocesos base y alternativo presentados en esta investigación, indica que la producción de plásmidos es económicamente viable. Este tipo de análisis tradicionalmente empleado para la evaluación de proyectos, también resulta una herramienta valiosa para fijar directrices de investigación.

5.2 Recomendaciones

Partiendo de que el éxito de este tipo de bioprocesos depende fundamentalmente de la competitividad tecnológica y el mercado, se recomienda mejorar los parámetros de la fermentación mediante la optimización del vector, el medio de cultivo y el modo de operación del fermentador. Asimismo, optimizar la cinética de floculación en la etapa de neutralización del lisado. Para futuras investigaciones se recomienda sintetizar adsorbentes con tamaños de exclusión mucho mayores a 10,000,000 *Da*, para tratar de mejorar la capacidad de adsorción del plásmido. De igual forma se recomienda desarrollar experimentalmente el bioproceso alternativo diseñado en este trabajo. En la simulación del bioproceso se recomienda adecuar el estudio a un mercado específico, dosis y a costos de México.

REFERENCIAS

- [1] A. Mhashilkar, S. Chada, J.A. Roth, R. Ramesh, Gene therapy, therapeutic approaches and implications, *Biotechnol. Adv.* 19 (2001) 279-297.
- [2] M.S. Levy, R.D. O'Kennedy, P. Ayazi-Shamlou, P. Dunnill, Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA, *Trends Biotechnol.* 18 (2000) 296-305.
- [3] G.M. Forde, Rapid response vaccines does DNA offer a solution, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1059-1062.
- [4] G.N.M. Ferreira, G.A. Monteiro, D.M.F. Prazeres, M.S. Cabral, Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications, *Trends Biotechnol.* 18 (2000) 380-387.
- [5] W.J. Kelly, Perspectives on plasmid-based gene therapy: challenges for the product and the process, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 219-223.
- [6] X. Madriz, M.B. Martínez, M.A. Rodríguez, G. Sierra, C. Martínez-López, A.M. Riverón, L. Flores, E. Orozco, Expression in fibroblast and in live animals of *Entamoeba histolytica* polipeptides EhCP112 and EhADH112, *Microbiology.* 150 (2004) 1251-1260.
- [7] E. Dumonteil, Vacunas de DNA: el presente y el futuro, *Rev. Biomed.* 11 (2000) S7-S12.
- [8] I. Schalk, P.M. Hegger, J.M. Jongen, Gene therapeutics and DNA vaccines, quality and regulatory aspects, National Institute of Public Health and Environment, RIVM report 605200 001, 2001.
- [9] H.N. Enders, J.A. Johnson, C.A. Ross, J.K. Welp, M.R. Etzel, Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 259-266.
- [10] J. Stadler, R. Lemmens, T. Nyhammar, Plasmid DNA purification, *J. Gene Med.* 6 (2004) 554-566.
- [11] P.A. Shamlou, Scaleable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 207-218.

- [12] D.M.F. Prazeres, G.N.M. Ferreira, G.A. Monteiro, C. Cooney, J.M.S. Cabral, Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks, *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 169-174.
- [13] D.M.F. Prazeres, G.N.M. Ferreira, Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination, *Chem. Eng. Process.* 43 (2004) 615-630.
- [14] M.M. Diogo, J.A. Queiroz, D.M.F. Prazeres, Chromatography of plasmid DNA, *J. Chromatogr. A.* 1069 (2005) 3-22.
- [15] G.N.M. Ferreira, Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination, *Chem. Eng. Technol.* 28 (2005) 1285-1294.
- [16] J. Urthaler, W. Buchinger, R. Necina, Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy, *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 703-711.
- [17] S. Zhang, A. Krivosheyeva, S. Nochumson, Large-scale capture and partial purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules, *Biotechnol Appl. Biochem.* 37 (2003) 245-249.
- [18] P. Tiainen, P.-E. Gustavsson, A. Ljunglöf, P.-O. Larsson, Superporous agarose anion exchangers for plasmid isolation, *J. Chromatogr. A.* 1138 (2007) 84-94.
- [19] P. Gustavsson, R. Lemmens, T. Nyhammar, P. Busson, P. Larsson, Purification of plasmid DNA with a new type of anion-exchange beads having a non-charged surface, *J. Chromatogr. A.* 1038 (2004) 131-140.
- [20] N. Arifeen, R. Wang, I.K. Kookos, C. Webb, A.A. Koutinas, Process Design and optimization of novel wheat-based continuous bioethanol production system, *Biotechnol. Prog.* Published on Web 10/10/2007.
- [21] M. Schleef, T. Schmidt, Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications, *J. Gene Med.* 6 (2004) S45-S53.
- [22] R. Grabherr, K. Bayer, Impact of targeted vector design on Co/E1 plasmid replication, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 257-260.

- [23] K.J. Prather, S. Sagar, J. Murphy, M. Chartrain, Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification, *Enzyme Microb. Tech.* 33 (2003) 865-883.
- [24] A. Carnes, Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA, *Bioprocess International*. (2005) 2-7.
- [25] F.J. Meacle, R. Lander, P.A. Shamlou, N.J. Titchener-Hooker, Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations, *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 293-302.
- [26] A. Ljunglöf, P. Bergvall, R. Bhikhabhai, R. Hjorth, Direct visualization of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy, *J. Chromatogr. A*. 844 (1999) 129-135.
- [27] E. Thwaites, S.C. Burton, Lyddiatt, Impact of the physical and topographical characteristics of adsorbent solid-phase upon the fluidised bed recovery of plasmid DNA from *Escherichia coli* lysates, *J. Chromatogr. A*. 943 (2001) 77-90.
- [28] G.N.M. Ferreira, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, Studies on the batch adsorption of plasmid DNA onto anion exchange chromatographic supports, *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 416-424.
- [29] N.B. Afeyan, N.F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Várady, S.P. Fulton, Y.B. Yang, F.E. Regnier, Flow-through particles for the high performance liquid chromatography separations of biomolecules: perfusion chromatography, *J. Chromatogr.* 519 (1990) 1-29.
- [30] S. Brandt, R.A. Goffe, S.B. Kessler, J.L. O'Connors, S.E. Zale, Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications, *Bio/Technology*. 6 (1988) 779-782.
- [31] A. Tejada-Mansir, R.M. Montesinos, R. Guzmán, Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particles and membrane configurations, *J. Biochem. Biophys. Methods*. 49 (2001) 1-28.

- [32] R.M. Montesinos-Cisneros, O.J. De la Vega, J. Ortega, R. Guzmán, A. Tejada-Mansir, Breakthrough performance of plasmid DNA on Ion-Exchange membrane columns, *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 881-887.
- [33] M.A. Teeters, S.E. Conrardy, B.L. Thomas, T.W. Root, E.N. Lightfoot, Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA, *J. Chromatogr. A.* 989 (2003) 165-173.
- [34] A. Shiosaki, M. Goto, T. Hirose, Frontal analysis of protein adsorption on a membrane adsorber, *J. Chromatogr. A.* 679 (1994) 1-9.
- [35] H. Yang, C. Viera, J. Fischer, M.R. Etzel, Purification of large protein using ion-exchange membranes, *Ind. Eng. Chem. Res.* 41 (2002) 1597-1602.
- [36] A. Grunwald, M.S. Shields, Plasmid purification using membrane-based anion-exchange chromatography, *Anal. Biochem.* 296 (2001) 138-141.
- [37] R. Giovannini, R. Freitag, High-performance membrane chromatography of supercoiled plasmid DNA, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3348-3354.
- [38] D.M.F. Prazeres, T. Schluep, C. Cooney, Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A.* 806 (1998) 31-45.
- [39] I. Gosling, Process simulation and modeling for industrial bioprocessing: tools and techniques, *Industrial Biotech.* 11 (2005) 1-7.
- [40] S.S. Maitra, A.K. Verma, End of small volume high value myth in biotechnology - process design for a mega-plant producing γ -Interferon for mega profit, *The Institution of Engineers (India)*. 84 (2003) 17-24.
- [41] S.S. Freitas, J.A.L. Santos, D.M.F. Prazeres, Plasmid DNA, in E. Heinzle, A.P. Biver, C.L. Cooney, *Development of sustainable bioprocesses modeling and assessment*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006, pp. 270-285.
- [42] S.S. Farid, Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture, *J. Chromatogr. B.* 848 (2007) 8-18.
- [43] S. Ernst, O.A. Garro, S. Winkler, G. Venkataraman, R. Langer, C.L. Cooney, R. Sasisekharan, *Process simulation for recombinant protein production: cost*

- estimation and sensitivity analysis for heparinase I expressed in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* 53 (1997) 575-582.
- [44] P.-E. Gustavsson, P.-O. Larsson, Superporous agarose, a new material for chromatography, *J. Chromatogr. A.* 734 (1996) 231-240.
- [45] L. Sundberg, J. Porath, Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes, *J. Chromatogr.* 90 (1974) 87-98.
- [46] L.A.A. Sluyterman, J. Wijdenes, Properties of an agarose polyethy-leneimine ion exchanger and its suitability for protein separations, *J. Chromatogr.* 206 (1981) 441-447.
- [47] M.S. Peters, K.D. Timmerhaus, *Plant design and economics for chemical engineers*, McGraw Hill, 1980.
- [48] T. Warner, P. Kostel, Mustang Q disposable capsules and cartridges, *Genetic Engineering News.* 20 (2000) 1-3.
- [49] H.C. Bimboim, J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7 (1979) 1513-1523.
- [50] M.L. Shuler, F. Kargi, *Bioprocess engineering basics concepts*, Prentice Hall PTR, 2002.
- [51] P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*, Academic Press, London, 1995.
- [52] M. Diogo, S. Ribeiro, J. Queiroz, G. Monteiro, N. Tordo, P. Perrin, D. Prazeres, Production, purification and analysis o an experimental DNA vaccine against rabies, *J. Gene Med.* 3 (2001) 577-584.

APENDICE A**Preparación de Soluciones**

Buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0. Se pesaron 1.2114 g de Tris base y 0.2923 g de EDTA y se disolvieron en 900 ml de agua desionizada. A continuación se ajustó el pH a 8 con unas gotas de HCl. Cuando la solución tuvo el pH indicado se aforó a un litro con agua desionizada. Posteriormente se filtró a 0.45 μm y se desgasificó.

Buffer 10 mM Tris/1.0 mM EDTA a pH = 8.0 + 2 M NaCl. Se pesaron 1.2114 g de Tris base, 0.2923 g de EDTA y 116.88 g de NaCl y se disolvieron en 900 ml de agua desionizada. A continuación se ajustó el pH a 8 con unas gotas de HCl. Cuando la solución tuvo el pH indicado se aforó a un litro con agua desionizada. Posteriormente se filtró a 0.45 μm y se desgasificó.

Medios de cultivo. El medio de cultivo utilizado para crecer las células de *E. Coli JM109* con el plásmido pRL-CMV fue el Luria-Bertani (LB). La composición por litro de medio fue la siguiente: 10 g de peptona o triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio. Por otro lado, para crecer las células de *E. coli.* con el plásmido pVR1012-NH36 se utilizó el medio 2TY. La composición por litro de medio fue la siguiente: 16 g de peptona o triptona, 10 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. El procedimiento de preparación de los medios de cultivo se llevó a cabo disolviendo la triptona, el extracto de levadura y el cloruro de sodio en 900 ml de agua desionizada. Seguidamente se ajustó el pH en 7.5 y después se aforó a un 1 litro usando agua desionizada. Por último se esterilizó el medio poniendo la solución en la autoclave por 20 min a 15 psi (1.05 kg/cm²). Nota: Si se pesa exacto no es necesario ajustar el pH del medio.

Preparación del inóculo. El procedimiento de preparación del inóculo se realizó preparando 100 ml de medio de medio de cultivo en un matraz 500 ml. Seguidamente se esterilizó el medio en la autoclave por 20 min a 15 psi. Después se agregó 0.1 ml de una solución de ampicilina 100 mg/ml. A continuación se agregó 1 ml de muestra con la bacteria de interés. Posteriormente se colocó el matraz en la incubadora (orbital shaker incubator), con una agitación de 225 rpm a 37°C. Después de aproximadamente 16 horas

se consideró al inóculo listo. Nota: El procedimiento descrito se lleva a cabo en condiciones estériles.

Buffer de lisis. Se pesaron 3.6 g de NaOH y 10 g de SDS y se disolvieron en 900 *ml* de agua desionizada. Posteriormente se aforó a un litro con agua desionizada.

Buffer 1x Tris-Acetate-EDTA (TAE). Se preparó una solución stock 50X, para esto se pesaron 242.28 g de tris base y se agregaron junto con 57.1 *ml* de ácido acético glacial a 100 *ml* de una solución 0.5 M EDTA (pH 8). La solución de trabajo se obtuvo diluyendo el stock preparado a 1X.

Gel de agarosa al 0.8%. Se pesaron 8 g de agarosa y se disolvieron en 200 *ml* de buffer TAE. Después se aforó a un litro, se calentó un poco y por último se dejó enfriar.

Buffer de carga. Para preparar buffer de carga 6X (solución de trabajo), se pesaron 2.5 *mg* de azul de bromofenol, 2.5 *mg* de xylene cyanol FF y 400 *mg* de sucrosa y se disolvieron en un mililitro de agua desionizada.