



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**ESCALAMIENTO DE COLUMNAS DE CROMATOGRAFÍA
DE MEMBRANAS DE INTERCAMBIO IÓNICO PARA LA
PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

JONATHAN DE LA VEGA OLIVAS

HERMOSILLO, SONORA.

JULIO DE 2008

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

APROBACIÓN DEL JURADO

de la tesis presentada por:

JONATHAN DE LA VEGA OLIVAS

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

18-06-08
Fecha

Armando Tajada M.
Dr. Armando Tejeda Mansir
Presidente

18-06-08
Fecha

Rosa M. Montesinos C.
Dr. Rosa María Montesinos Cisneros
Secretaria

18-06-08
Fecha

Patricia Guerrero G.
M.C. Patricia Guerrero Germán
Vocal

18-06-08
Fecha

Roberto Guzmán
Dr. Roberto Guzmán Zamudio
Sinodal Externo



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

Julio 2, de 2008

M.C. JONATHAN DE LA VEGA OLIVAS
PRESENTE

Por medio del presente, se le notifica que de acuerdo a los requisitos establecidos en la Guía para la Impresión Final y Empastado de la Tesis (Versión 1) de la Maestría en Ciencias de la Ingeniería, su tesis intitulada "Escalamiento de Columnas de Cromatografía de Membranas de Intercambio Iónico para la Purificación de ADN Plasmídico" ha cumplido satisfactoriamente y se le da autorización para su impresión y empastado de la misma.

ATENTAMENTE

DR. VICTOR MANUEL SANCHEZ CORRALES
Coordinador
Maestría en Ciencias de la Ingeniería

RECIBI
JONATHAN DE LA VEGA



"EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRAN GRANDEZA"
POSGRADO EN CIENCIAS
DE LA INGENIERÍA

C.c.p. Expediente

EDIFICIO 5-1
BLVD. LUIS ENCINAS Y ROSALES
APARTADO POSTAL 106
C.P. 83000
HERMOSILLO, SONORA, MÉXICO

TEL. FAX 01(662) 259 21 07
CAMPUS EXT. 8107. 8359

RESUMEN

En esta investigación se desarrolló y evaluó un nuevo bioproceso para la propagación, recuperación y purificación de ADN plasmídico. A nivel laboratorio, se llevó a cabo la propagación del plásmido pcDNA-Ehcp112 por medio de replicación autónoma en células de *E. coli* de la cepa DH5 α en una fermentación por lote. La recuperación primaria comprendió las etapas de cosecha celular, lisis alcalina, neutralización y filtración. En la lisis alcalina y neutralización se utilizó agitación moderada por 5 minutos para provocar la formación de flóculos bien definidos que facilitarían la clarificación del lisado celular. En la recuperación intermedia, la solución conteniendo al plásmido fue lavada por diafiltración, requiriendo un promedio de 10 volúmenes, y fue posteriormente concentrada. La purificación final se llevó a cabo en columnas de cromatografía empacadas con membranas de intercambio iónico, utilizando un gradiente que permitió la elución diferenciada de los ácidos nucleicos presentes en el lisado, separando claramente al ARN del ADNp, de acuerdo al análisis realizado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Se realizaron varios estudios de escalamiento utilizando simulación con el software SuperPro Designer v.7.0, y se utilizó como base de comparación el Proceso I reportado en la literatura. Se escaló el bioproceso desarrollado en el laboratorio, Proceso II, demostrándose su factibilidad técnico-económica. Se realizó la validación del Proceso I cambiando a fermentación continua en la simulación, logrando obtener los resultados reportados, Proceso III. El Proceso IV fue desarrollado basado en los resultados del laboratorio y en reportes de la literatura, agregando varias modificaciones al proceso original. El análisis económico de este bioproceso, presentó muy buenos resultados de rendimiento así como de factibilidad económica.

ABSTRACT

A new bioprocess for the propagation, recovery and purification of plasmidic DNA was developed and economically evaluated. At a laboratory scale, the pcDNA-Ehpc112 plasmid was produced by autonomous replication using *E. coli* DH5 α strain by means of batch fermentation. The primary recovery stage included cellular harvesting, alkaline lysis, neutralization and filtration. In the alkaline lysis and neutralization moderate agitation for 5 minutes was employed to promote the formation of well defined flocs that facilitated the clarification of the cellular lysate. In the intermediate recovery stage, the solution containing the plasmid was diafiltrated using approximately 10 volumes of buffer solution, and then concentrated. The final purification was made using chromatography columns packed with ionic exchange membranes, using a gradient for the differential elution of the nucleic acids present in the solution, clearly separating RNA from pDNA, according to electrophoretic analysis in 0.8% agarose gels.

Several scale up simulation studies were developed using computer aided design with the software SuperPro Designer v 7.0. The economic evaluation results were compared with results previously reported, Process I. The bioprocess developed in the laboratory was scaled up, showing a positive technical and economic feasibility indicators. Process I was evaluated with continuous fermentation, Process III, achieving the same yields. Process IV was developed based on the laboratory results and previous reports, including several modifications to the original process. The economic analysis of this bioprocess showed very positive yield results as well as economic feasibility.

“...Todas nuestras facultades, en particular el entendimiento, están sometidas en su ejercicio a leyes que podemos investigar. Hay más; el entendimiento debe considerarse como el principio y la facultad para concebir las reglas en general. Así como la sensibilidad es la facultad de intuición, así el entendimiento es la facultad de pensar; es decir, la facultad de someter a leyes las representaciones sensibles. El entendimiento tiende a la investigación de las reglas y se encuentra feliz con haberlas hallado. Se trata, pues, de saber, ya que el entendimiento es el principio de las reglas, conforme a qué reglas procede él mismo...”

Immanuel Kant

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xiii
NOMENCLATURA	xiv
AGRADECIMIENTOS	xv
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo General	3
1.2.2 Objetivos Particulares	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Características Físicas y Químicas de los Plásmidos	6
2.2 Usos y Aplicaciones de los Plásmidos	8
2.2.1 Terapia Génica	11
2.2.2 Vacunación con ADN	11
2.2.3 Ventajas y Desventajas del Uso del ADN Plasmídico	12
2.3 Producción, Recuperación y Purificación de Plásmidos	13
2.4 El Plásmido pcDNA-Ehcp112	17
2.5 Simulación de Procesos	17
3. METODOLOGÍA	20
3.1 Materiales y Equipo	20
3.1.1 Materiales	20

3.1.2 Equipo	22
3.2 Propagación del Plásmido	25
3.2.1 Preparación del Medio de Cultivo	25
3.2.2 Preparación del Inóculo	25
3.2.3 Fermentación	27
3.2.4 Cinética de Crecimiento Celular	27
3.3 Recuperación Primaria del Plásmido	28
3.3.1 Cosecha de Células	28
3.3.2 Lisis Alcalina	28
3.3.3 Clarificación	31
3.4 Recuperación Intermedia por Diafiltración	31
3.5 Purificación Final en Columnas de Cromatografía de Intercambio Iónico	31
3.6 Análisis de Muestras por Electroforesis	34
3.7 Escalamiento del Proceso	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 Propagación del Plásmido	40
4.1.1 Fermentación	40
4.1.2 Cinética de Crecimiento Celular	40
4.2 Recuperación Primaria del Plásmido	42
4.2.1 Lisis Alcalina	42
4.2.2 Clarificación	43
4.3 Recuperación Intermedia por Diafiltración	43
4.4 Purificación Final en Columnas de Intercambio Iónico	44
4.5 Escalamiento del Proceso	55
4.5.1 Proceso I	55
4.5.2 Proceso II	60
4.5.3 Proceso III	65
4.5.4 Proceso IV	68

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
5.1 Conclusiones	79
5.2 Recomendaciones	80
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÉNDICE A	87

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del plásmido pcDNA-Ehcp112. Ehcp, gen insertado; ColE1, origen de replicación de los plásmidos ColE1; ampr, gen de resistencia a ampicilina.	5
2	Arriba, Conformaciones espaciales de los plásmidos, (a) lineal, (b) circular abierto, (c) superenrollado. Abajo, microfotografías de ADN superenrollado [5].	7
3	Representación esquemática del clonado de ADN. Un vector de clonación y cromosomas eucarióticos son cortados en formas separadas con las mismas endonucleasas de restricción. Los fragmentos que van a ser clonados son ligados al vector de clonación. El ADN recombinante obtenido es introducido en la célula anfitrión donde puede ser propagado (clonado).	9
4	Vectores utilizados actualmente en los ensayos clínicos para el desarrollo de nuevas terapias, los vectores plasmídicos usados en terapias génicas y vacunas con ADN ocupan representan más del 17% de los ensayos actuales [9].	10
5	Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112. (a) Organización genómica de los genes Ehcp112 y Ehadh112 de <i>E. histolytica</i> . NCR, región no codificante. (b) Vector pcDNA3. MCS sitio de clonación múltiple; SV40ori, origen de replicación del virus SV40; neor, gen de resistencia a neomicina; ColE1, origen de replicación de los plásmidos ColE1; ampr, gen de resistencia a ampicilina; pCMV, promotor de citomegalovirus. (c,d) plásmidos pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112 (e,f) polipépticos Ehcp112 y Ehadh112. SP, péptido señal; Pp, pro-péptido; RGD, dominio de unión a integrina; TM secuencias transmembranales; mAb, reconocimiento, secuencia de aminoácidos en donde se localiza el epítipo reconocido por el mAb anti-EhCPADH [15].	18
6	Diagrama general del proceso de producción y purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112.	21
7	Incubadora de agitación orbital utilizada en la preparación de inóculos.	23
8	Biorreactor utilizado para la propagación del plásmido pcDNA-Ehcp112.	24
9	Sistema para separación sólido-líquido.	30
10	Batería de filtros utilizados para clarificar el lisado.	32
11	Sistema de diafiltración utilizado en la recuperación secundaria del plásmido.	33

12	A la izquierda, equipo BioRad BioLogic LP y equipo de cómputo; a la derecha, columna cromatográfica empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q.	35
13	Curva de crecimiento de la cepa E. coli DH5 α conteniendo el plásmido pcDNA-Ehcp112. Los puntos representan los datos obtenidos en el laboratorio; la línea sólida representa los datos predichos de acuerdo a la ecuación logística, con los parámetros $\mu = 1 \text{ h}^{-1}$, y $X_{\infty} = 1.5 \text{ g/l}$.	41
14	Análisis cromatográfico de la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112. La adsorción comienza en el tiempo 0 y termina a los 24 minutos. El lavado termina a los 57 minutos. La elución comienza a los 57 minutos y termina a los 75 minutos. La columna se operó con un flujo de 1 ml/min, y fue empacada con 30 membranas.	46
15	Análisis electroforético de las muestras tomadas durante la corrida cromatográfica 1 para la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112, el cual tiene 6700 pb. En la parte derecha se enuncia el número del carril y el tipo de muestra, mientras que a la izquierda se muestra el número de pares de base del marcador Lamda Hind III.	47
16	Análisis cromatográfico de la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112. La adsorción comienza en el tiempo 0 y termina a los 135 minutos. El lavado termina a los 168 minutos. La elución comienza a los 168 minutos. La columna se operó con un flujo de 0.5 ml/min, y fue empacada con 30 membranas.	50
17	Análisis electroforético de las muestras tomadas durante la corrida cromatográfica 2 para la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112, el cual tiene 6700 pb. En la parte derecha se enuncia el número del carril y el tipo de muestra, mientras que a la izquierda se muestra el número de pares de base del marcador Lamda Hind III.	51
18	Análisis cromatográfico de la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112. La adsorción comienza en el tiempo 0 y termina a los 45 minutos. El lavado termina a los 88 minutos. La elución comienza a los 88 minutos. La columna se operó con un flujo de 1 ml/min, y fue empacada con 30 membranas.	53
19	Análisis electroforético de las muestras tomadas durante la corrida cromatográfica 3 para la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112, el cual tiene 6700 pb. En la parte derecha se enuncia el número del carril y el tipo de muestra, mientras que a la izquierda se muestra el número de pares de base del marcador Lamda Hind III.	54
20	Diagrama general de las operaciones realizadas en el Proceso I.	57
21	Diagrama de flujo del Proceso I. Proceso reportado por Freitas y col. [36] que utiliza HIC para la purificación final del plásmido.	58
22	Diagrama de flujo del Proceso II, el cual fue desarrollado con base en los resultados obtenidos a escala laboratorio. Se utiliza la cromatografía de intercambio iónico para la purificación final del plásmido.	61

23	Diagrama de flujo del Proceso III, aquí se utiliza la fermentación continua reduciendo considerablemente el tamaño del fermentador.	66
24	Diagrama de bloques del Proceso IV.	69
25	Diagrama de flujo del Proceso IV, aquí se implementan varias mejoras basadas en la literatura y reglas heurísticas.	70
26	Distribución de los costos de operación anual del Proceso IV.	76
27	Variación del TIR y del PR vs Precio de venta.	77
28	Variación del TIR vs concentración celular.	78

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Especificaciones y pruebas recomendadas para las preparaciones de ADN-p.	14
2	Composición del medio de cultivo 2TY, base 1 litro.	26
3	Cálculo de la inversión fija total (FC).	38
4	Costos de operación.	39
5	Gradiente de elución utilizado en el paso cromatográfico. El buffer de adsorción es buffer TE, y el buffer de elución es 2M de NaOH en buffer TE.	45
6	Gradiente de elución modificado utilizado en el paso cromatográfico. El buffer de adsorción es buffer TE, y el buffer de elución es 2M de NaOH en buffer TE.	49
7	Parámetro de evaluación económica.	56
8	Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso I.	59
9	Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso II.	64
10	Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso III.	67
11	Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso IV.	74

NOMENCLATURA

A	Adenina
ABS	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
ADNp	Ácido Desoxirribonucleico plasmídico
bp	Pares de bases, por sus siglas en inglés
C	Citosina
CA	Capital de Arranque
Da	Daltons
DC	Inversión directa
DFC	Inversión fija directa
FC	Inversión fija total
G	Guanina
HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica, por sus siglas en inglés
IC	Inversión indirecta
ISR	Impuesto sobre la renta
M	Molar
μ	Velocidad máxima de crecimiento
NMWL	Límite nominal de peso molecular
OC	Circular abierto, por sus siglas en inglés
OI	Otras inversiones
PC	Costo de equipo
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PR	Período de retorno
ROI	Retorno de la inversión, por sus siglas en inglés
SC	Superenrollado, por sus siglas en inglés
SDS	Sodio dodecil sulfato
T	Timina
TAE	Buffer 1x Tris-Acetate-EDTA
TBE	Buffer Tris-Boric Acid-EDTA
TE	Buffer 10 mM Tris, 1.0 mM EDTA
TIR	Tasa interna de retorno
UA	Unidades de absorbancia
UV	Ultravioleta
VPN	Valor presente neto
vvm	Volumen de aire por volumen de medio
WC	Capital de trabajo, por sus siglas en inglés
X	Concentración celular
X_0	Concentración celular inicial
X_∞	Concentración celular máxima

AGRADECIMIENTOS

A mi **Familia**, por que pase lo que pase son la base sobre la cual siempre me he apoyado y por estar siempre a mi lado.

A la **Universidad de Sonora**, y muy especialmente a la **Maestría en Ciencias de la Ingeniería** por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo académico.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, CONACyT, por el apoyo que me fue otorgado por medio de la beca 201001.

Al **Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** (CINVESTAV-IPN) por el apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto.

De manera muy especial, agradezco al **Dr. Armando Tejeda Mansir**, por su paciencia y dedicación, y por su ayuda dentro y fuera del contexto de este trabajo.

A los integrantes de mi comité de tesis, **Dra. Rosa María Montesinos Cisneros**, **M.C. Patricia Guerrero Germán**, **Dr. Roberto Guzmán Zamudio**, por el tiempo invertido para hacer posible la realización de este trabajo, y por enriquecerlo con sus conocimientos.

Al **Dr. Jaime Ortega López** por su ayuda y buena disposición, así como al **Dr. Eduardo Canseco Vilchis** por su apoyo y por facilitarme sus instalaciones para el fotografiado de los geles.

A mis **Maestros**, por su dedicación.

A mis **Amigos**, por ayudarme en las buenas y las malas.

MUCHAS GRACIAS

CAPITULO 1

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Actualmente, el desarrollo de nuevas vacunas y terapias génicas utilizando ADN plasmídico ha generado una gran demanda de estas macromoléculas biológicas en condiciones de alta pureza, de acuerdo con los lineamientos de los organismos reguladores para su administración en seres vivos.

Las dosis de ADNp requeridas para un tratamiento son del orden de miligramos, por lo que la demanda de este tipo de vectores es elevada. La capacidad de producción de los procesos a escala laboratorio con que se dispone hoy en día es muy reducida y no permite satisfacer la demanda del mercado. Por otro lado, los esquemas de purificación contemplan operaciones que no son adecuadas para su escalamiento, ya sea por el uso de sustancias tóxicas o por su bajo perfil de costo-beneficio. Debido a lo anterior, actualmente existe una necesidad real de desarrollar nuevos procesos a escala industrial para la producción y purificación de plásmidos con las especificaciones de calidad requeridas.

Con el objetivo de diseñar procesos en forma más racional, es necesario realizar estudios mediante un enfoque ingenieril que permita desarrollar los criterios de escalamiento y optimización adecuados, ya que éstos son cruciales para el éxito comercial de estas nuevas tecnologías. Estos estudios involucran el diseño del plásmido, la selección de la célula anfitrión, y las operaciones de propagación y purificación del plásmido.

En esta investigación se desarrolló y evaluó un nuevo proceso para la producción del plásmido pcDNA-EhCP112 utilizando la cepa *Escherichia coli* DH5 α . Se estableció un esquema de proceso para la producción y purificación del plásmido utilizando

membranas como soportes cromatográficos novedosos. Se investigó experimentalmente la secuencia de operaciones, principalmente la relacionada con las etapas cromatográficas. Los resultados experimentales sirvieron de base para el escalamiento y análisis de la factibilidad técnico-económica del proceso mediante estudios de simulación por computadora.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Desarrollar y escalar un proceso para la producción y purificación del plásmido pcDNA-EhCP112 expresado en la cepa *Escherichia coli* DH5 α utilizando membranas de intercambio iónico como soportes en el paso de la purificación cromatográfica.

1.2.2 Objetivos Particulares

- Realizar la síntesis del proceso para la propagación, recuperación y purificación del plásmido de interés, con base en el conocimiento actual y las reglas heurísticas disponibles.
- Efectuar los estudios experimentales para la propagación de la *E. coli* y la recuperación del plásmido mediante la lisis alcalina de estas células.
- Llevar a cabo los estudios cromatográficos experimentales para la purificación del plásmido en columnas empacadas con membranas de intercambio iónico.
- Utilizar los resultados experimentales para el escalamiento y análisis de la factibilidad técnico-económica del proceso mediante estudios de simulación por computadora utilizando el software SuperPro Designer v7.0.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de ADN cerradas y de doble hélice, que se caracterizan por que se pueden replicar de manera independiente del ADN genómico [1,2]. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad de la célula; sin embargo, algunos contienen genes que resultan útiles para la célula anfitrión. Por ejemplo, pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos [1].

Los plásmidos están presentes normalmente en bacterias y en algunas ocasiones en organismos eucarióticos [3]. Cada plásmido tiene por lo menos una secuencia de ADN que sirve como origen de replicación, es decir, un punto de partida para la réplica del ADN, que permite al plásmido duplicarse independientemente del ADNg [2]. Su tamaño varía desde 1 a 250 kbp, conteniendo de 2 a 30 genes. El número de plásmidos presentes en una célula puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula [1].

Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como "replicación relajada", esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación [1,3].

Los plásmidos utilizados con fines terapéuticos y de prevención, exhiben tres partes básicas en su conformación: el gen insertado, el gen de resistencia a antibióticos y el origen de replicación, como se muestra en la Figura 1 [4].

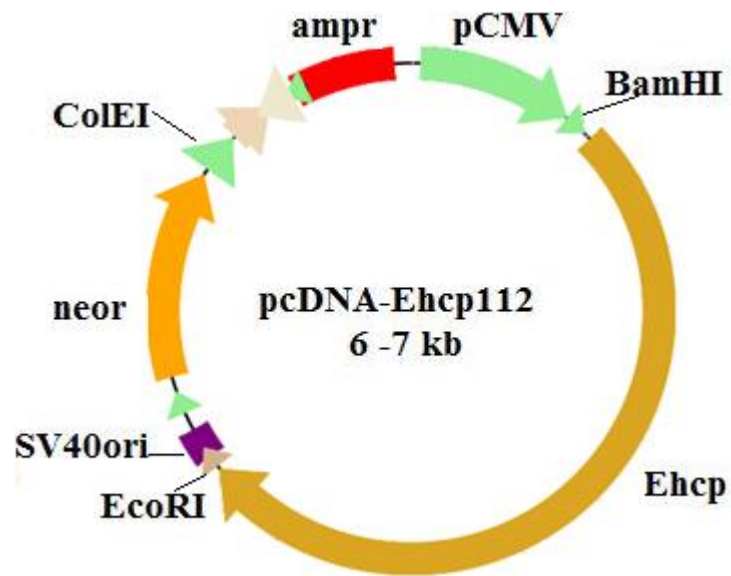


Figura 1. Representación Esquemática del plásmido pcDNA-Ehcp112. Ehcp, gen insertado; ColE1, origen de replicación de los plásmidos ColE1; ampr, gen de resistencia a ampicilina.

2.1 Características Físicas y Químicas de los Plásmidos

Los plásmidos que se utilizan para aplicaciones terapéuticas contienen genes insertados y generalmente son de tamaño mayor a las proteínas [1]. Cada cadena de una molécula de ADNp es un polímero lineal de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Estos grupos fosfato están cargados negativamente a $\text{pH} > 4$ [1,5]. El plegamiento de las dos cadenas antiparalelas alrededor de ellas mismas y alrededor de un eje común origina la estructura clásica de una doble hélice con giro hacia la derecha, que se estabiliza por puentes de hidrógeno entre pares de bases AT y GC y por fuerzas estáticas. El interior de la doble hélice es altamente hidrofóbico debido al fuerte empaquetamiento de las bases aromáticas. El eje de la hélice para el ADNp también puede estar enrollado en el espacio, formando un orden molecular superior llamado ADNp superenrollado (SC), se sabe que el ADNp superenrollado se desnaturaliza irreversiblemente a valores de pH superiores a 13. Una fracción del total de las moléculas de ADNp también puede existir en una forma no-superenrollada o en una forma circular abierta (OC), algunas de estas conformaciones se ilustran en la Figura 2. Otras variantes, como el ADNp lineal, desnaturalizado u oligomérico también se puede encontrar en los lisatos celulares. La forma lineal resulta del rompimiento químico/enzimático de los enlaces fosfodiéster de cadenas de ADN opuestas. La forma desnaturalizada exhibe una conformación donde el enlace de hidrógeno entre cadenas complementarias con cierta ubicación ha sido interrumpido y los oligómeros son una consecuencia de recombinación homóloga [1].

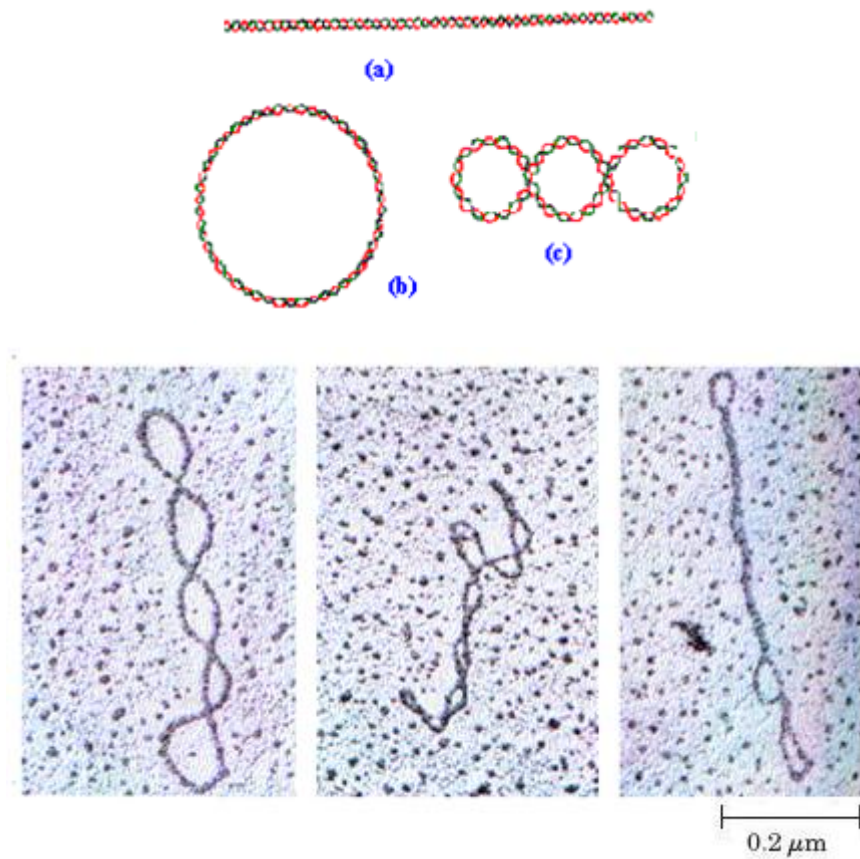


Figura 2. Arriba, Conformaciones espaciales de los plásmidos, (a) lineal, (b) circular abierto, (c) superenrollado. Abajo, microfotografías de ADN superenrollado [5].

2.2 Usos y Aplicaciones de los Plásmidos

Los plásmidos poseen un interés singular en ingeniería genética por ser uno de los sistemas vectoriales más sencillos; un vector es el sistema que permite introducir en una célula el fragmento de ADN que se pretende clonar; en esta célula anfitrión el vector se replica y expresa. La molécula resultante de la unión del vector con el ADN de interés se denomina molécula de ADN recombinante. En la Figura 3 se muestra una representación esquemática del clonado de ADN.

La ciencia médica reciente ha presenciado una de sus más notables innovaciones en el desarrollo de las tecnologías para la utilización de plásmidos [6]. El ADNp tiene el potencial de expresar proteínas al agregarse al ADN de una célula. En muchos casos, genes enteros son incorporados y expresados en las células objetivo, produciendo las correspondientes proteínas terapéuticas. Dependiendo de la patología a tratar, estas proteínas pueden: (a) reemplazar una proteína defectuosa (terapia génica), o (b) activar el sistema inmunológico en orden de matar células de un tumor o inmunizar individuos en contra de ciertos patógenos tales como la malaria (vacunación con ADN) [7].

Los ensayos clínicos de productos para terapias génicas comenzaron a principios de los 90's, y desde entonces han despertado un creciente interés al ofrecer nuevas alternativas para el tratamiento y prevención de enfermedades [8]. A la fecha se encuentran en desarrollo más de 200 tipos de terapias génicas basadas en ADNp, además se hacen ensayos clínicos para el desarrollo de varias vacunas terapéuticas novedosas [9]. En la Figura 4 se muestra un gráfico de la distribución de los vectores utilizados para el desarrollo de nuevas terapias.

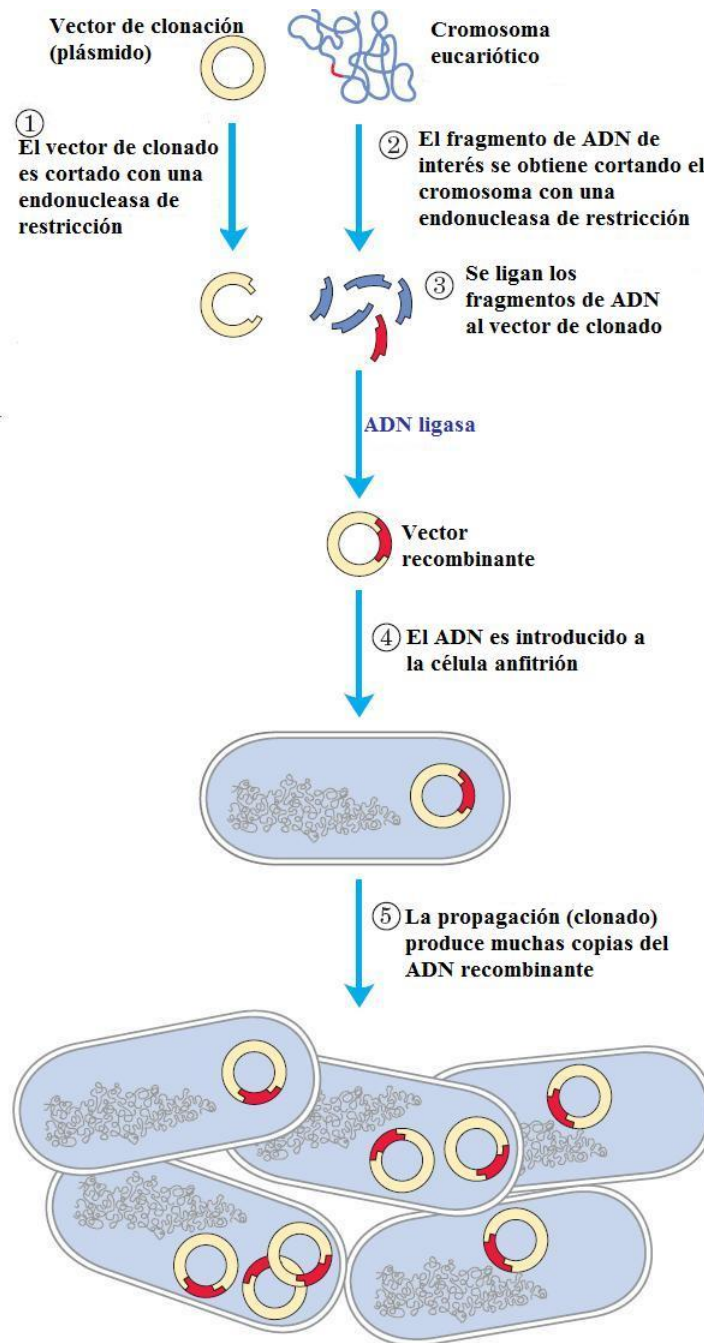


Figura 3. Representación esquemática del clonado de ADN. Un vector de clonación y cromosomas eucarióticos son cortados en formas separadas con las mismas endonucleasas de restricción. Los fragmentos que van a ser clonados son ligados al vector de clonación. El ADN recombinante obtenido es introducido en la célula anfitriona donde puede ser propagado (clonado).

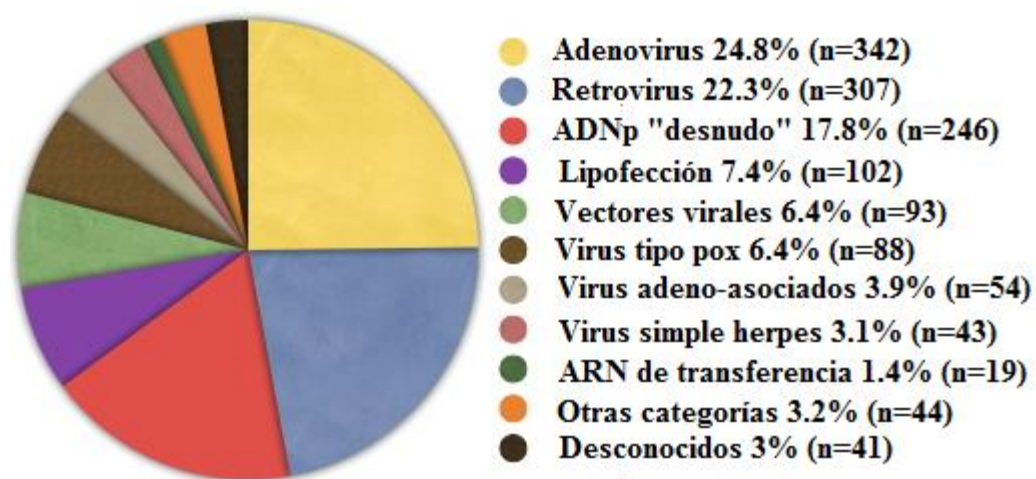


Figura 4. Vectores utilizados actualmente en los ensayos clínicos para el desarrollo de nuevas terapias, los vectores plasmídicos usados en terapias génicas y vacunas con ADN ocupan representan más del 17% de los ensayos actuales [9].

2.2.1 Terapia Génica

La terapia génica es una estrategia en la cual un ácido nucleico es introducido en células humanas, modificando su repertorio genético con el objetivo de prevenir, tratar o curar un determinado defecto genético [10]. Esta terapia se basa en el principio de que ciertas enfermedades son causadas por defectos genéticos, por lo que la adición de la información genética correcta podría compensarlas [11]. Otras estimaciones señalan el hecho de que la información genética adicional tiene el potencial de inducir efectos terapéuticos posteriores, como por ejemplo marcar células tumorales mediante la aplicación de genes terapéuticos, los que indicarían cuales son las células objetivo al sistema inmunológico [11]. La terapia génica es un proceso prometedor para la prevención, tratamiento, diagnóstico y cura de enfermedades tales como el cáncer, SIDA o la fibrosis cística [12,13].

2.2.2 Vacunación con ADN

El ADN también estimula y realiza la respuesta del sistema inmunológico, por lo que también pueden ser desarrolladas vacunas a partir de genes patógenos para proveer inmunidad contra enfermedades letales mayores [10]. La vacunación con ADN instruye al organismo como reaccionar ante un problema futuro presentado por un patógeno o parásito, es decir, es preventiva. Se cree que las vacunas de ADNp imitan los caminos naturales de expresión intracelular de los genes patógenos, lo que dispara las respuestas tanto celular como humoral, por lo cual puede alcanzar la misma respuesta que una vacuna con un microorganismo infeccioso atenuado [11, 14].

El ADNp ha sido utilizado con éxito para expresar antígenos específicos en membranas celulares, simulando y agrandando la memoria y la respuesta del sistema inmunológico, convirtiéndose en una nueva y más segura generación de vacunas [10,14]. Existen reportes de hámster inmunizados con los plásmidos, pcDNA-Ehpc112 y pcDNA-

Ehadh112, en los cuales se ha obtenido 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 [15].

2.2.3 Ventajas y Desventajas del Uso del ADN Plasmídico

El significativo interés en las vacunas con ADNp es debido a las numerosas ventajas que presentan sobre los tratamientos convencionales [16]. Su producción no requiere del cultivo de agentes peligrosos o infecciosos y, a diferencia de algunos vectores virales que han sido utilizados, no existe el riesgo de que el virus atenuado mute de nuevo a su forma virulenta [14, 17]. Esta tecnología permite producir vacunas para enfermedades en las cuales los virus atenuados han probado no ser eficaces como por ejemplo el VIH [18, 19]. El ADNp también ofrece una gran estabilidad, lo cual representa una ventaja invaluable para la vacunación de poblaciones en áreas donde no se tenga disponible tecnología sofisticada de almacenamiento [13, 17].

Debido a su toxicidad, los vectores virales son considerados como problemáticos desde el punto de vista de la seguridad [20, 21]. Por otra parte, los vectores no virales son considerados más seguros y se han convertido en una alternativa deseable. También se cree que estos vectores son más atractivos no sólo debido a factores de seguridad, sino también a los aceptables costos de producción a gran escala [21].

Mientras esta nueva tecnología de vacunación resulta muy atractiva, su principal desventaja es que los vectores de ADNp son menos efectivos al transferir el ADN a las células afectadas cuando son comparados con los vectores virales [17, 21]. Se estima que 1 de cada 1000 moléculas de plásmido inyectadas alcanzará el núcleo de la célula y será expresado. Por lo tanto, los tratamientos completos requerirán de cantidades del orden de miligramos de ADNp [10, 17, 22].

2.3 Producción, Recuperación y Purificación de Plásmidos

La producción de ADNp altamente purificado en grandes cantidades para su uso en terapia génica o vacunación es vital para el éxito en la utilización del ADNp como agente terapéutico [22]. El paso de la producción a escala laboratorio a la producción a escala industrial genera nuevas demandas para los procesos de fermentación celular, procesamiento del lisado bacteriano y la purificación final del plásmido [23]. La necesidad de resolver estos problemas relacionados con el procesamiento de plásmidos a gran escala se ha vuelto una cuestión de creciente importancia [24].

La producción de plásmidos en condiciones de laboratorio invariablemente ha generado muy bajos volúmenes de producción; Adicionalmente, la utilización de métodos de purificación de escala laboratorio a mayores escalas genera pobres resultados. Para la vacunación de una población potencialmente grande, y suponiendo dosis en un rango de uno a unos cuantos miligramos, es fácilmente apreciable que estos procesos no optimizados y las bajas productividades son inadecuados a escala industrial [17]. Además, los procesos a escala comercial deberán mantener no sólo los estándares económicos sino también los estándares regulatorios requeridos para la producción de vacunas comerciales [16], los cuales indican que el material genético debe consistir en una preparación altamente purificada y homogénea de ADNp superenrollado [23, 24, 25]. En la Tabla 1 se muestran algunas de las especificaciones y pruebas recomendadas para la solución final que contiene plásmido.

Los plásmidos son biosintetizados por replicación autónoma en *E. coli*, una bacteria con un historial de uso seguro en la bioindustria como un productor de proteínas recombinantes [1]. De forma análoga a la purificación de proteínas, los plásmidos deben de ser aislados de las células anfitrión, generalmente se logra utilizando un método alcalino para liberar el plásmido. En la primera etapa de la lisis alcalina, la suspensión que contiene a las células anfitrión es mezclada con una solución alcalina de NaOH y SDS la cual solubiliza la membrana celular provocando la liberación del material celular

Tabla 1. Especificaciones y pruebas recomendadas para las preparaciones de ADN-p.

IMPUREZAS	PRUEBAS RECOMENDADAS	ESPECIFICACIÓN DE APROBACIÓN
Proteínas	Prueba de proteína BCA ^a	Indetectable
ARN	Electroforesis en gel de agarosa	Indetectable
ADNg	Electroforesis en gel de agarosa	Indetectable
Endotoxinas	Prueba LAL ^b	< 0.1 UE ^c /μg de plásmido
Plásmidos isomorfos (lineales, relajados, desnaturalizados)	Electroforesis en gel de agarosa	< 5%
Actividad biológica	Endonucleasas de restricción	Fragmentos coherentes con el mapa de restricción de los plásmidos
	Electroforesis en gel de agarosa	Migración esperada a partir del tamaño y superenrollamiento
	Eficiencia de la transformación	Comparable con plásmidos estándar

^a: Ácido bicinonínico; ^b: Lisato de amebocito limulus; ^c: unidades de endotoxinas. [10]

seguida por la liberación y desnaturalización del ADNg, las paredes celulares y la mayor parte de las proteínas celulares [21, 26]. A pesar de que el ADNp superenrollado también es desnaturalizado como consecuencia del rompimiento de los puentes de hidrógeno, sí el pH se mantiene debajo de 12.5, ciertos pares de bases permanecen lo cual previene la separación completa de los filamentos de ADN. Estos pares de bases sirven como anclas para la renaturalización completa que se lleva a cabo en el paso de la neutralización posterior. Sí la lisis celular se lleva a cabo a un valor de pH mayor que 12.5 [12], o sí se presentan valores locales extremos de pH en la solución, los pares de bases que sirven como anclas pueden perderse resultando en la desnaturalización irreversible del ADNp [25]. Después del paso de la lisis, en la segunda etapa, el pH de la solución es reducido a un valor cercano a 5.5 mediante la adición de acetato de potasio. El cambio en las condiciones fisicoquímicas de la solución provoca la renaturalización y floculación del ADN cromosomal desnaturalizado así como la precipitación de los complejos de SDS-proteínas y los restos de las paredes celulares [26]. La separación del material insoluble y el licor que contiene el plásmido puede conseguirse mediante filtración y, una vez separados, el licor puede ser sometidos a procesos posteriores de purificación para recuperar el producto [27]; durante estas operaciones se debe tener cuidado de no inducir el rompimiento debido a la fracción del ADNg el cual puede resultar en pequeños fragmentos de ADNg, de tamaño similar al ADNp, que dificultarían considerablemente los procesos de purificación posteriores [22, 26]. Enseguida el extracto debe ser clarificado y concentrado para reducir el volumen de operación, después de ello los plásmidos deben de ser purificados lo cual puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos tales como ultracentrifugación, cromatografía, y membranas, basados en las diferentes propiedades físicas entre el plásmido y el resto del material celular, el reto en la purificación de plásmidos es el separar impurezas con propiedades similares, tales como lipopolisacáridos. ARN, y ADN cromosomal por último, la solución debe ser pulida.

El lisado clarificado resultante típicamente contiene proteínas, ARN, lipopolisacáridos, fragmentos de ADNg y menos del 1 por ciento en peso de ADNp, aquí el papel de la cromatografía es el de remover los componentes de la célula anfitrion (ARN, proteínas, fragmentos de ADNg, endotoxinas) y ADNp no superenrollado, las cuales son virtualmente imposibles de remover mediante otra operación unitaria [3]. El formato convencional para separaciones cromatográficas es una columna empacada con un adsorbente poroso operando en modo frontal (también conocida como adsorción en lecho fijo). En esta operación se involucran cuatro etapas (1) adsorción, (2) lavado, (3) elución y (4) regeneración. Después de la etapa de adsorción, el material no adsorbido es lavado con el buffer de adsorción, y posteriormente los solutos adsorbidos son eluidos. Generalmente, la recuperación se afecta, por cambios de pH, fuerza iónica o composición química del buffer. Para reutilizar la columna se debe llevar a cabo un proceso de regeneración [28].

En la purificación de plásmidos superenrollados una de las operaciones más utilizadas es la cromatografía de intercambio iónico. Esta, aprovecha la interacción entre los grupos fosfato del ADN, que se encuentran cargados negativamente, 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 interés [24, 29]. 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.

La cromatografía de membranas de intercambio iónico ha recibido una cantidad considerable de atención recientemente. Las columnas de membranas pueden ser operadas de modo convectivo [30], el cual puede reducir significativamente las limitaciones de difusión encontradas comúnmente en los procesos convencionales utilizando partículas, aumentando la capacidad, así como la selectividad [3, 31, 32].

2.4 El Plásmido pcDNA-Ehcp112

El plásmido pcDNA-Ehcp112 (Entamoeba histolytica cistein proteasa) contiene un marcador resistente a ampicilina y está formado por 6.7 kbp. El péptido que produce este plásmido, el EhCP112, junto con el péptido EhADH112 que produce el plásmido pcDNA-Ehadh112, cuando son coexpresados forman la proteína inmunogénica heterodimérica EhCPADH. En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de la construcción de los plásmidos pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112 a partir de su organización genómica en el parásito Entamoeba histolytica. El gen que codifica a la proteína EhCP112 está involucrado en la virulencia de este parásito [15].

2.5 Simulación de Procesos

No obstante que los plásmidos son producidos en células de *E. coli* a través de una fermentación como la mayoría de las proteínas recombinantes, los reportes sobre procesos para su producción a gran escala son escasos [33]. El desarrollo de un proceso genérico y rentable para la producción de ADNp es un prerrequisito para su éxito como agente terapéutico. En la síntesis de este proceso, se consideran esenciales los pasos de alta resolución como la cromatografía para alcanzar los altos requerimientos de pureza para este tipo de productos de consumo humano [31].

La simulación de procesos es la tecnología que permite el modelar, evaluar, y optimizar en procesos integrados por computadora con varios niveles de detallado. Dependiendo de las capacidades de las herramientas con que se cuente, uno puede ser capaz de modelar no sólo un simple proceso sino todos los procesos de una línea de producción de diferentes productos e incluso todo el proceso de una corporación dentro de un mismo marco y evaluar sus interacciones con varios niveles de detallado [34].

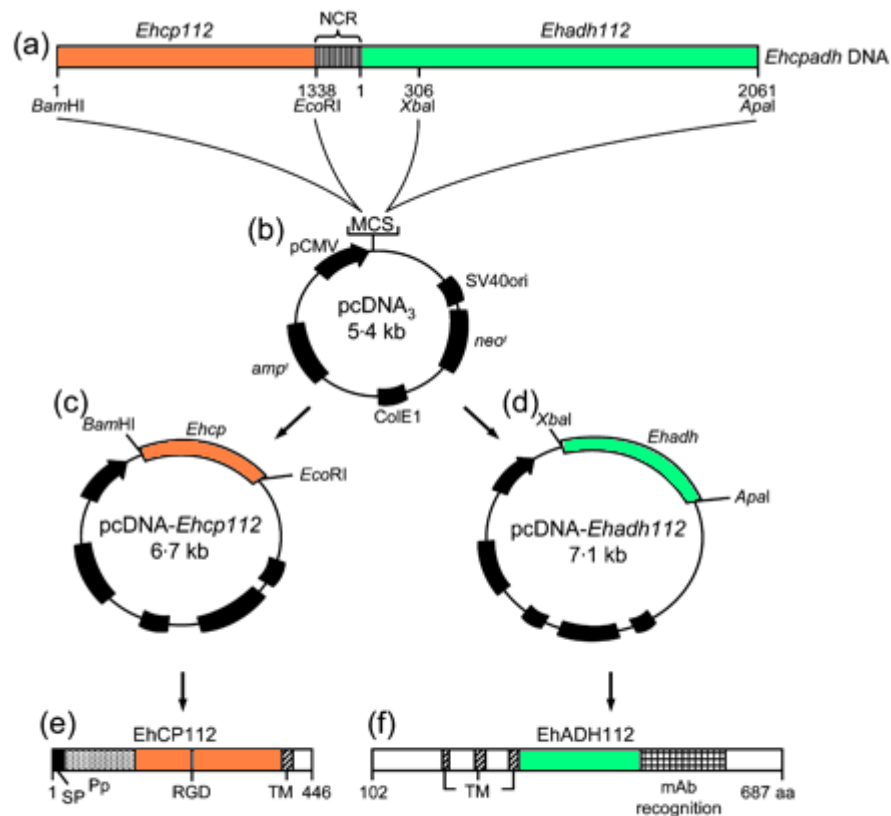


Figura 5. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112. (a) Organización genómica de los genes Ehcp112 y Ehadh112 de *E. histolytica*. NCR, región no codificante. (b) Vector pcDNA3. MCS sitio de clonación múltiple; SV40ori, origen de replicación del virus SV40; neor, gen de resistencia a neomicina; ColE1, origen de replicación de los plásmidos ColE1; ampr, gen de resistencia a ampicilina; pCMV, promotor de citomegalovirus. (c,d) plásmidos pcDNA-Ehcp112 y pcDNA-Ehadh112 (e,f) polipépticos Ehcp112 y Ehadh112. SP, péptido señal; Pp, pro-péptido; RGD, dominio de unión a integrina; TM secuencias transmembranales; mAb, reconocimiento, secuencia de aminoácidos en donde se localiza el epítipo reconocido por el mAb anti-EhCPADH [15].

Los diseños de procesos asistidos por computadora y las simulaciones pueden desempeñar un papel importante a través del ciclo del desarrollo de un producto y de su comercialización. En las primeras etapas de la generación de la idea este tipo de herramientas son utilizadas principalmente para investigar y evaluar el potencial de un proyecto. Durante el desarrollo del proceso, se utilizan para evaluar las alternativas desde un punto de vista económico y ambiental. A medida que avanzamos del desarrollo a la manufactura, este tipo de herramientas son utilizadas para el dimensionamiento del equipo y para el cálculo de las utilidades y del capital total de inversión. Finalmente, en los procesos de manufactura a gran escala se utiliza para la optimización de procesos que se encuentran en operación, para encontrar cuellos de botella, mejorar diseños, programar procesos y planeación de la producción.

Un paquete de cómputo que ha sido ampliamente como utilizado para el diseño y la evaluación de procesos para la propagación y purificación de plásmidos es el SuperPro Designer, de Intelligen Inc [24, 35, 36]. En el 2004, Prazeres y Ferreira [24], desarrollaron con esta herramienta un proceso para la producción a escala industrial de ADNp, basados en estudios de laboratorio. Asimismo, desarrollaron dos alternativas conceptuales para el mismo proceso, incluyendo diferentes operaciones para la purificación del plásmido. Freitas y col. 2006 [36] efectuaron también el diseño de una planta industrial para la producción de plásmidos basado en estudios de laboratorio, el cual fue escalado utilizando SuperPro. Después de realizar la evaluación económica concluyeron que su bioproceso era económicamente viable.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

La producción de plásmidos superenrollados inicia con la construcción del vector de expresión, y su posterior replicación dentro de una célula anfitrión, después es necesario recuperar el plásmido del interior de la célula mediante un proceso de lisis alcalina, y por último se procede al paso de la purificación cromatográfica. El proceso para la producción del plásmido pcDNA-Ehcp112 (*Entamoeba histolytica* cistein proteasa) fue desarrollado con base en las reglas heurísticas de los bioprocesos y está integrado por las etapas que se presentan en la Figura 6. Para el proceso de purificación del plásmido deseado se utiliza la cromatografía de intercambio iónico, la cual se lleva a cabo en columnas de lecho fijo. Toda vez que se tiene el producto final de la elución de la columna cromatográfica, la composición de la muestra de interés se determina mediante electroforesis de gel de agarosa.

3.1 Materiales y Equipo

3.1.1 Materiales

En la propagación del plásmido se utilizó la cepa de *E. Coli* DH5 α conteniendo el plásmido pcDNA-EhCP112 proporcionada por CINVESTAV-IPN. En esta investigación se utilizó el buffer TE que consiste en una solución 10 mM Tris[hidroximetil]-aminometano, PM 121.14, y 1.0 mM EDTA, PM 292.25 a pH = 8.0; y el buffer de elución fue una solución 2.0 M de NaCl en buffer TE. Ambos buffers fueron filtrados mediante un microfiltro Gelman Science (Ann Arbor, Mich.) de 0.45 μ m y se desgasificados previamente a su uso.

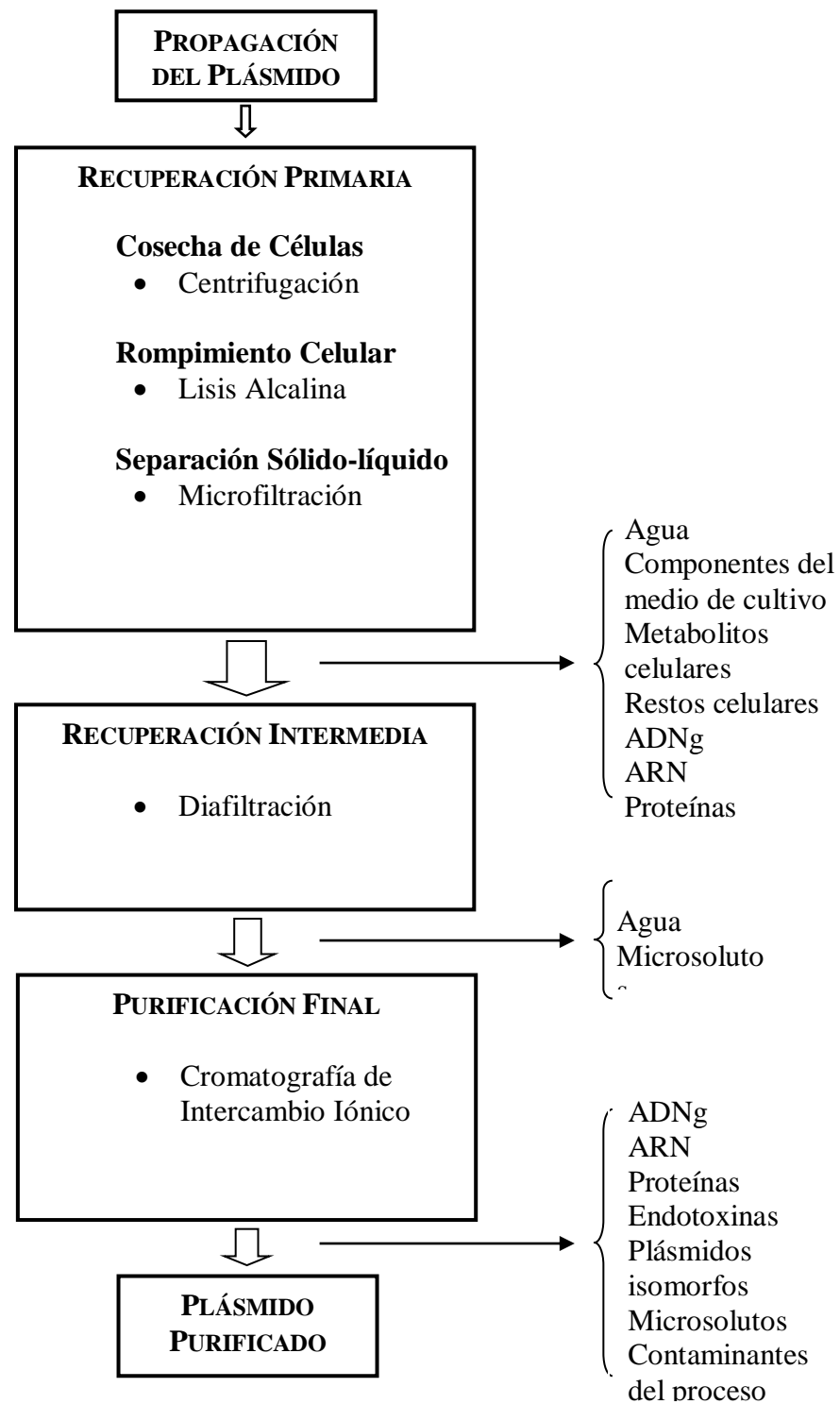


Figura 6. Diagrama general del proceso de producción y purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112.

En la purificación del plásmido pcDNA-EhCp112 se usaron membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals con un tamaño de poro nominal de 800 nm, las cuales, se recortaron a un diámetro de 5 mm utilizando un sacabocados. Las membranas fueron utilizadas una vez solamente y se acondicionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para llevar a cabo el análisis por electroforesis de las muestras recolectadas en la columna se utilizó el marcador Lambda Hind III de Stratagene. En todos los experimentos se utilizaron reactivos grado analítico, y se esterilizó todo el material utilizado.

3.1.2 Equipo

En los cultivos en matraz se utilizó una incubadora marca orbital shaker, mostrada en la Figura 7. La propagación de la cepa de *E. coli* con el plásmido Ehcp-112 se realizó en un biorreactor de 2 l de capacidad de operación, el cual se ve en la Figura 8. La recuperación de la masa celular se llevo a cabo 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. Posteriormente, la solución se pasó utilizando presión con nitrógeno puro, por un sistema de diafiltración amicon de Millipore con una membrana de la misma marca, fabricada con polietersulfona y de tamaño de corte 10,000 NMWL.

El equipo utilizado en los estudios cromatográficos fue el BioRad Biological LP Chromatography provisto del software LP Biorad y controlado mediante computadora. Al equipo se le conectó una columna 0.5 × 5 cm Pharmacia Amersham Biosciences con soporte de lecho fijo, el cual sirvió como distribuidor de flujo. En los estudios se empleó manguera Tygon de diámetro interno de 0.8 mm, cuya longitud se redujo tanto como fue posible en orden de reducir las caídas de presión. La calibración de la velocidad de flujo se verificó antes de todos los experimentos utilizando una probeta y un cronómetro.



Figura 7. Incubadora de agitación orbital utilizada en la preparación de inóculos.



Figura 8. Biorreactor utilizado para la propagación del plásmido pcDNA-Ehcp112.

En los análisis electroforéticos se utilizó una cámara horizontal de electroforesis GT mini-gel casting system de Biorad. Los geles de agarosa obtenidos en los análisis se fotografiaron utilizando un equipo Trans UV de Biorad.

3.2 Propagación del Plásmido

El paquete celular que contiene el plásmido se obtuvo mediante una fermentación por lote en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN. Las células de *E. coli* DH5 α fueron propagadas en medio de cultivo 2TY.

3.2.1 Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo 2TY fue adicionado con ampicilina para prevenir el crecimiento de cualquier otra cepa dentro del fermentador. La composición por litro de medio 2TY se describe en la Tabla 2. Para preparar el medio, se disuelve la peptona, el extracto de levadura y el cloruro de sodio en 900 ml de agua deionizada y se ajusta el pH a un valor de 7.5 utilizando una solución de NaOH. En seguida se afora a 1 litro usando agua deionizada para obtener un pH de 8.0. Por último, se esteriliza el medio de cultivo en la autoclave por 20 minutos a 15 psi.

3.2.2 Preparación del Inóculo

La preparación del inóculo para la fermentación se lleva a cabo en condiciones estériles. Se preparan 100 ml de medio 2TY en un matraz de 250 ml y se esterilizan por 20 minutos a 15 psi. Una vez enfriado el medio de cultivo, se agregan 0.1 ml de una solución de ampicilina 0.5 mg/ml y 1 ml de muestra de la bacteria *E. coli* que contiene el plásmido Ehcp-112. Enseguida se coloca el matraz en la incubadora con agitación de 225 rpm a 37°C y se deja incubar por aproximadamente 16 horas.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo 2TY, base 1 litro.

Compuesto	Cantidad
Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
Cloruro de sodio	5 g

3.2.3 Fermentación

La fermentación se inicia mientras el inóculo está siendo incubado. Se preparan 2 litros del medio de cultivo 2TY (1900 ml para bioreactor y 100 ml para preparación de inóculo) y se esterilizan 1900 ml dentro del biorreactor en el autoclave por 20 minutos y 15 psi de presión.

Cuando se ha enfriado el biorreactor se conectan los periféricos: mangueras de aire, bomba peristáltica, chaqueta eléctrica y agitador; entonces se aplica aire estéril al biorreactor (1-2 vvm) hasta que la temperatura del medio de cultivo baje aproximadamente a 37°C, en este punto se enciende el control de temperatura calibrado a 37°C. Una vez que se estabiliza la temperatura en el valor deseado, se procede a preparar un matraz estéril con un poco de agua estéril, 2 ml de solución de ampicilina 0.1 mg/ml y 100 µl de antiespumante, los cuales se bombean al biorreactor por medio de la bomba peristáltica. Enseguida se adiciona al biorreactor 100 ml de inóculo mediante una bomba. Las condiciones de la fermentación fueron 37°C, 300 rpm de agitación y aireación a 1.5 vvm a 10 psi de presión.

3.2.4 Cinética de Crecimiento Celular

Para el estudio de la cinética de crecimiento se utilizaron 100 ml de medio de cultivo 2TY adicionado con 0.1 ml de ampicilina y 1 ml de la cepa estudiada en un matraz de 500 ml. Se midió la absorbancia a 600 nm del medio de cultivo antes de ser agregada la cepa, y se resto este valor a todas las mediciones consecutivas; se dejó la fermentación a 37°C y 300 rpm durante 10 horas y se tomó 1 ml de muestra cada hora para medir su absorbancia. Los datos obtenidos fueron graficados (absorbancia vs t) para determinar los parámetros de crecimiento de la cepa.

Los datos se analizaron utilizando 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 [37].

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

donde; X = concentración celular (g/l), X₀ = concentración celular inicial (g/l), X_∞ = concentración celular máxima (g/l), μ = velocidad máxima de crecimiento (h⁻¹), y t = tiempo (h).

3.3 Recuperación Primaria del Plásmido

3.3.1 Cosecha de Células

Una vez terminada la fermentación se recupera el caldo en botellas de 150 ml. Cada botella se centrifuga a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C en la centrifuga Biofuge. Una vez que el sobrenadante ha sido retirado, la biomasa es resuspendida en aproximadamente 6 ml de buffer TE. La biomasa resuspendida se centrifuga de nuevo a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C, en caso de que no se produzca la separación del sólido, este paso se debe repetir, hasta obtener las dos fases completamente separadas. Una vez retirado el sobrenadante, la pasta celular debe congelarse a -70°C. Antes de congelar la biomasa se le puede agregar un poco de solución de buffer TE con un 10% de glicerol para evitar que las células se dañen en el proceso de congelamiento.

3.3.2 Lisis Alcalina

Al inicio del rompimiento celular, se descongela la biomasa en hielo, en seguida se resuspende en buffer TE en proporción de 8 ml/g de células húmedas. Una vez resuspendidas las células se agrega un volumen de buffer de lisis que consiste en una

solución de NaOH 0.09 M y SDS 1%. Se agita la solución suavemente por 5 minutos para evitar romper el ADNg y el ARN y facilitar su separación.

Inmediatamente después de haber concluido el período de agitación, se mezcla el lisado con un volumen, igual a la suma de los volúmenes anteriores, de acetato de potasio (CH₃-COOK) 3.0 M a pH = 5.5 enfriado en hielo, que provoca la precipitación de ADNg, proteínas, endotoxinas, ARN y sólidos en suspensión. El proceso se lleva a cabo mediante agitación leve por 5 minutos. Para retirar los flóculos formados, se realiza una filtración en un embudo de porcelana colocado en un matraz kitazato conectado a un sistema de vacío, como el mostrado en la Figura 9. En el embudo de porcelana se coloca un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 9 cm de diámetro.



Figura 9. Sistema para separación sólido-líquido.

3.3.3 Clarificación

La clarificación del lisado se lleva a cabo utilizando un sistema en serie de 2 microfiltros, de 5 y 0.45 micras de diámetro de poro, respectivamente. La solución es bombeada a través de cada filtro utilizando una bomba peristáltica, como se muestra en la Figura 10. Ambos filtros vienen esterilizados de fábrica.

3.4 Recuperación Intermedia por Diafiltración

El lisado es lavado y concentrado por diafiltración en una celda amicon con un límite de corte de 10,000 daltons. Para dar seguimiento a la operación de lavado, se utiliza como referencia la conductividad del buffer TE previamente medida. Para iniciar el lavado se agrega el lisado a la celda, se afora a 80 ml con buffer TE y se conecta a un tanque de nitrógeno regulando la presión de operación a 50 psi. Durante la operación la celda se mantiene con agitación continua y es enfriada sumergiéndola en hielo. El lavado se mantiene hasta alcanzar el volumen inicial de la solución del lisado y se repite hasta alcanzar la conductividad del buffer a la salida. Al final de la etapa de lavado, la solución puede ser concentrada (el plásmido no permea la membrana) reduciendo su volumen operándola en forma por lote. El sistema en que se opera la diafiltración es mostrado en la Figura 11.

3.5 Purificación Final en Columnas de Cromatografía de Intercambio Iónico

Para la purificación del plásmido se utilizó un sistema de columna de cromatografía frontal de membranas de intercambio iónico. La columna fue empacada con 30 membranas y conectada a un equipo BioRad BioLogic LP.

En el primer paso se utilizaron membranas de intercambio iónico Mustang Q de Pall BioPharmaceuticals, las cuales se utilizaron solamente una vez. El acondicionamiento se

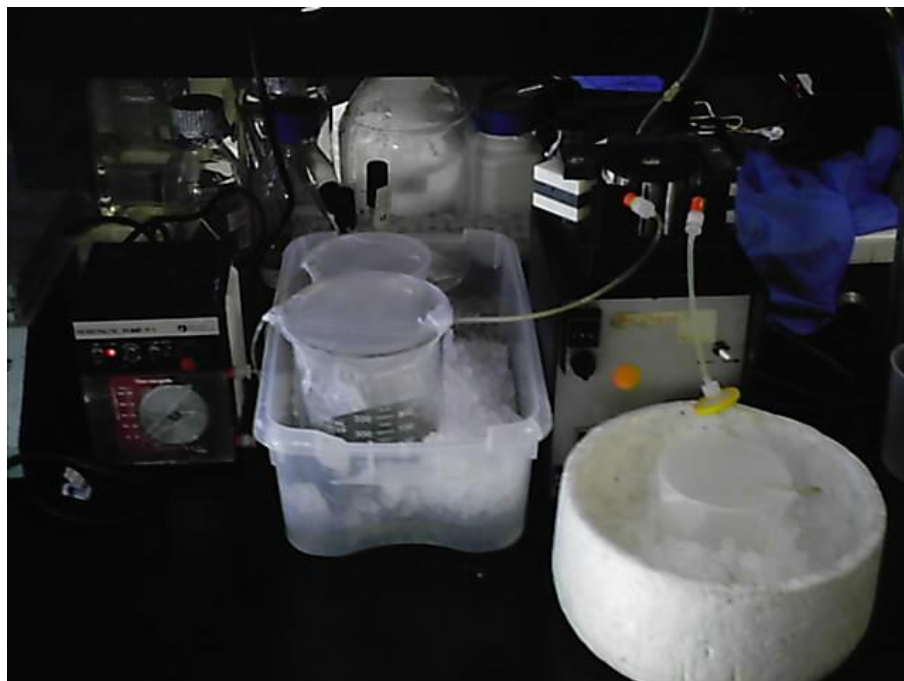


Figura 10. Batería de filtros utilizados para clarificar el lisado.



Figura 11. Sistema de diafiltración utilizado en la recuperación secundaria del plásmido.

llevo a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Una vez cortadas las membranas se sumergieron en una solución 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 solución 1.0 M NaCl. Posteriormente se sumergen las membranas en una solución de 1.0 M NaCl por 5 min, agitando suavemente. Enseguida se retira la solución de NaCl y se enjuagan dos veces con buffer TE. Finalmente se dejan reposar las membranas por 12 h en buffer TE, para que se equilibren. El siguiente paso es empacar la columna cromatográfica con las membranas ya acondicionadas, después se conecta al sistema hidráulico del equipo BioRad. En la Figura 12 se observan el equipo de cromatografía BioRad y la columna empacada con membranas.

Antes de cargar el lisado por la columna, es necesario equilibrarla con buffer de adsorción, calibrándose también la lámpara de medición de UV. Enseguida se carga el lisado a la columna hasta que se haya formado la curva de ruptura y los valores registrados por el equipo sean constantes. El siguiente paso es lavar con buffer TE hasta que el equipo registre valores de AUFs muy cercanos a cero. Después se lleva a cabo la elución con 2.0 M de NaCl en buffer TE. Durante todo el estudio se toman periódicamente muestras de la salida de la columna para ser analizadas mediante electroforesis.

3.6 Análisis de Muestras por Electroforesis

En orden de poder analizar los resultados de la purificación cromatográfica las muestras recolectadas se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa. Se utiliza un gel de agarosa al 0.8%, el cual se vierte en la cámara de electroforesis donde se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que se solidifica. Una vez solidificado el gel, se agrega buffer TAE hasta cubrirlo completamente y se inyectan el marcador y las muestras, utilizando 3 μ l de buffer de carga (TAE) y 17 μ l de la muestra. La cámara se conecta a una fuente de poder y se le aplican 70 volts por aproximadamente 90 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se retira el gel de la cámara de electroforesis y se sumerge en

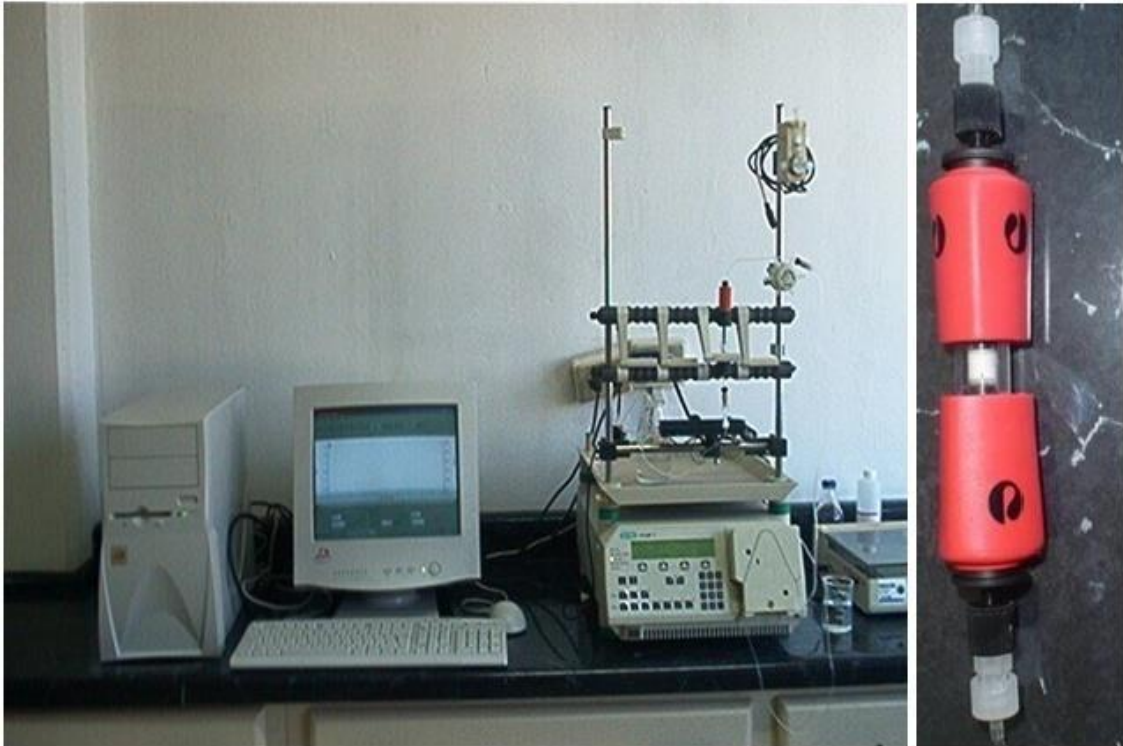


Figura 12. A la izquierda, equipo BioRad BioLogic LP y equipo de cómputo; a la derecha, columna cromatográfica empacada con 30 membranas de intercambio iónico Mustang Q.

buffer Tris-Boric Acid-EDTA (TBE) y se coloca en agitación leve por 35 minutos, después se sumerge el gel en agua deionizada y se pone en agitación leve por 5 minutos. Finalmente se fotografía el gel de electroforesis.

3.7 Escalamiento del Proceso

El análisis de escalamiento del protocolo de purificación desarrollado, desde la propagación del plásmido hasta su formulación final, se llevo a cabo utilizando el software SuperPro Designer v7.0. En el caso de la evaluación económica esta puede realizarse, ya sea, por el precio de adquisición, el costo real de producción o por la estimación correcta y razonable que de ellos se efectúe. En esta investigación la evaluación económica de costo-beneficio se realizó utilizando como concepto básico de evaluación el costo de adquisición del equipo. El costo de adquisición de un bien de uso representa el sacrificio económico para adquirir el bien y ponerlo en condiciones de ser utilizado en la actividad, como se muestra en la Ec. (2):

$$\mathbf{PC = Costo de adquisición + 20\% de equipo no incluido} \quad (2)$$

donde: PC = costo del equipo. Este incluye la compra y demás erogaciones necesarias, como fletes, seguros, honorarios de aduana, trámites de registro en el caso de ser necesario, costo de la función de compras, la construcción de plataformas, el montaje, la puesta en operación, los ensayos de puesta en marcha, el entrenamiento del personal, etc. La fecha límite para la activación de un componente en el costo de adquisición de un bien es aquella en la cual el bien se pone en marcha, los gastos en que se incurra después de esa fecha serán considerados resultados del período de evaluación al que sean asignados.

Por otra parte, los costos de inversión se determinaron de acuerdo a las Ec. (2) y (3) que se muestran a continuación:

$$\mathbf{DFC = DC + IC + OI} \quad (3)$$

donde: DFC = Inversión fija directa , DC = Inversión directa, IC = Inversión indirecta, OI = Otras inversiones

$$\mathbf{FC = DFC + WC + CA} \quad (4)$$

donde: FC = Inversión fija total, DFC = Inversión fija directa, WC = Capital de trabajo, CA = Capital de arranque.

En la Tabla 3 se presentan las bases de cálculo de la inversión fija total y en la Tabla 4 las de los costos de operación.

Tabla 3. 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 (OI)	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 (CA)	Arranque	0.05DFC

Tabla 4. Costos de operación.

Concepto	Monto
Materias primas	Base de datos
Mano de obra (TLC)	<i>h</i> -equipo
Costo de operación de equipo	0.06 DFC
Mantenimiento	0.10 PC
Depreciación	0.08 DFC
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

En esta sección se muestran los resultados obtenidos durante esta investigación. En primer lugar se presentan los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio y seguidamente los resultados de los estudios de escalamiento y evaluación económica realizados con base en los resultados experimentales y de la propia evaluación.

4.1 Propagación del Plásmido

4.1.1 Fermentación

La fermentación realizada en lote en un biorreactor de 2 l de operación con medio de cultivo 2TY. Al final de las 24 h de fermentación se cosecharon 16.574 g de células húmedas produciendo un rendimiento de 8.287 g/l, que es un valor típico de este tipo de fermentaciones para este tiempo y condiciones de operación. Una vez separada la biomasa, ésta se congelo a -70°C , agregando 6 ml/g de células húmedas de buffer TE adicionado con glicerol al 10%, para evitar dañar las células durante el congelamiento.

4.1.2 Cinética de Crecimiento Celular

La cinética de crecimiento se realizó en un matraz de 200 ml conteniendo 100 ml de medio de cultivo. Al inicio se midió la absorbancia a 600 nm del medio de cultivo 2TY cuyo valor fue de 0.02559 UA, el cual se restó a todas las mediciones posteriores. La curva de crecimiento, obtenida al graficar la absorbancia vs tiempo, para la cepa *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pcDNA-Ehcp112. Esta curva presenta las regiones características del crecimiento bacteriano en cultivos por lote. Del ajuste de la ecuación logística a los datos experimentales se representa por la línea continua en la Figura 13, con los parámetros $\mu = 1 \text{ h}^{-1}$, y $X_{\infty} = 1.5 \text{ g/l}$.

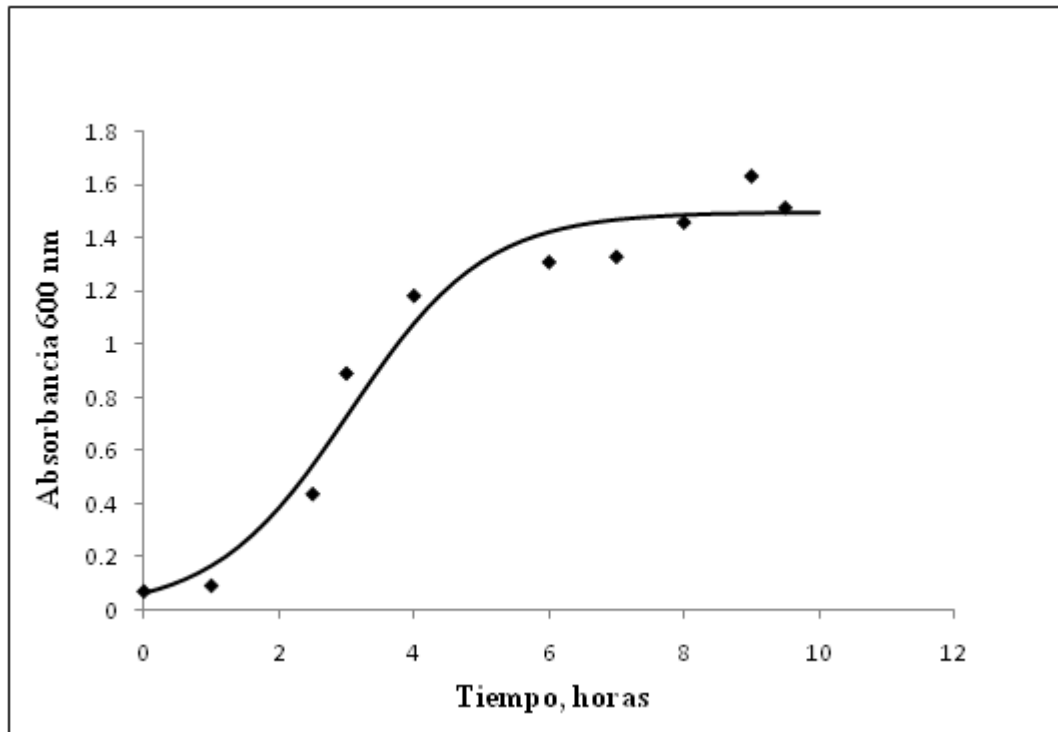


Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pcDNA-Ehcp112. Los puntos representan los datos obtenidos en el laboratorio; la línea sólida representa los datos predichos de acuerdo a la ecuación logística, con los parámetros $\mu = 1 \text{ h}^{-1}$, y $X_{\infty} = 1.5 \text{ g/l}$.

Los parámetros utilizados para la ecuación logística, derivados de los datos obtenidos en el laboratorio, representan el comportamiento de la cepa a nivel matraz, pero de acuerdo con los reportes de la literatura pueden ser optimizados bajo condiciones controladas.

4.2 Recuperación Primaria del Plásmido

4.2.1 Lisis Alcalina

Las células obtenidas en la fermentación, se descongelaron y resuspendieron en una proporción de 8 ml/g de células húmedas de buffer TE (132.6 ml). A la solución de biomasa se le agregaron 8 ml/g de células húmedas de buffer de lisis (132.6 ml), y se colocó la solución en agitación suave, por 5 minutos. En este paso la agitación es importante para evitar que se formen valores locales de pH elevados, que tendrían como consecuencia la desnaturalización irreversible del ADNp, afectando directamente el rendimiento general del proceso.

Inmediatamente después de terminar este tiempo, se agregó un volumen igual al acumulado de la solución de acetato de potasio 3M (265.2 ml) a pH = 5.5. Alcanzar el pH de la solución de acetato es problemático, pero es de gran importancia mantener el pH para evitar la desnaturalización irreversible del plásmido. Al momento en que se agregó el acetato, fue posible observar la precipitación y la floculación de compuestos de la mezcla. En un primer procedimiento, de acuerdo a las recomendaciones de la literatura, se intentó facilitar la floculación mediante aireación de la solución, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. Una segunda opción que produjo resultados substancialmente mejores, fue el uso de agitación moderada de la solución para la formación de flóculos bien definidos, y la precipitación de los complejos de SDS-proteínas. En este paso se lleva a cabo la renaturalización del material genético, tanto del ADNp como del ADNg; es muy importante que la agitación no sea demasiado fuerte, debido a que el esfuerzo cortante puede romper el ADNg en

pequeños segmentos que asemejen al ADNp en tamaño y dificulten aún más su separación.

4.2.2 Clarificación

El primer paso para la clarificación del lisado es la remoción de los flóculos de ADNg y de los compuestos SDS-proteínas precipitados. Esta remoción se efectuó mediante filtrado al vacío en un filtro de porcelana. Para agilizar la operación de filtrado, se decantaron los flóculos en un vaso y se vertió la solución restante al filtro. Después se colocaron los flóculos decantados sobre el filtro para filtrar la solución que se quedó atrapada en los flóculos y los sedimentos. Esta segunda operación de filtrado fue substancialmente más tardada. De los 530.4 ml de solución de lisado con que se contaba originalmente, se recuperaron en esta operación 450 ml, consiguiéndose una recuperación del 85%.

El siguiente paso de la clarificación del lisado fue la microfiltración llevada a cabo en 2 etapas, utilizando los filtros de 5.0 μm y 0.45 μm . Ambas filtraciones fueron operadas mediante una bomba peristáltica a un flujo nominal de 2.0 ml/min. Sin embargo, el tiempo para procesar el lisado fue 7 horas, lo que representa un flux promedio de 130 $\text{l/m}^2\text{-h}$. En este paso la remoción fue de alrededor del 1%. Al término de estas operaciones, se consiguió una adecuada clarificación del lisado.

4.3 Recuperación Intermedia por Diafiltración

La solución anterior fue procesada en lotes de 40 ml, mediante la diafiltración en una membrana de tamaño de corte de 10,000 Da se consiguió lavar el lisado, y eliminar las sales que fueron agregadas en las etapas anteriores así como microsolutos residuales (partículas pequeñas de proteínas, ADNg o endotoxinas) presentes en la solución. La operación se efectuó por lotes adicionando un volumen de lavado y monitoreando la conductividad de la solución de salida. La cantidad de buffer TE necesario para

completar el lavado fue, en promedio, 10 veces el volumen de la solución agregada a la celda.

4.4 Purificación Final en Columnas de Intercambio Iónico

La purificación final del lisado se llevo a cabo mediante cromatografía en columnas empacadas con membranas de intercambio iónico. Este tipo de membranas macroporosas permiten un flujo convectivo, es decir, eliminan las resistencias difusivas. Esto es de gran importancia debido a que los plásmidos son moléculas muy grandes, las cuales no se difunden fácilmente en los soportes de este tipo. El flujo convectivo permite al plásmido alcanzar todos los sitios de enlace disponibles, mejorando notoriamente el rendimiento general del proceso.

A lo largo de esta investigación, se realizaron 3 corridas experimentales; 1, 2 y 3. En la corrida 1 se operó la columna con un flujo de 1.0 ml/min, y se utilizó el gradiente descrito en la Tabla 5. Utilizando este gradiente no se consiguió la elución diferenciada de los ácidos nucleicos como se muestra gráficamente en la Figura 14. En la Figura 15 se muestra el análisis electroforético de las muestras recolectadas, aquí se puede apreciar cómo están presentes en el mismo carril tanto el plásmido de interés como el ARN contaminante.

Tabla 5. Gradiente de elución utilizado en el paso cromatográfico. El buffer de adsorción es buffer TE, y el buffer de elución es 2M de NaOH en buffer TE.

Duración (minutos)	Buffer	Gradiente
0 – 10	0 – 15 % Buffer Elución	1.5
10 – 85	15 – 100% Buffer Elución	1.3
85 – 100	Buffer Elución	
100 - 105	Buffer Adsorción	

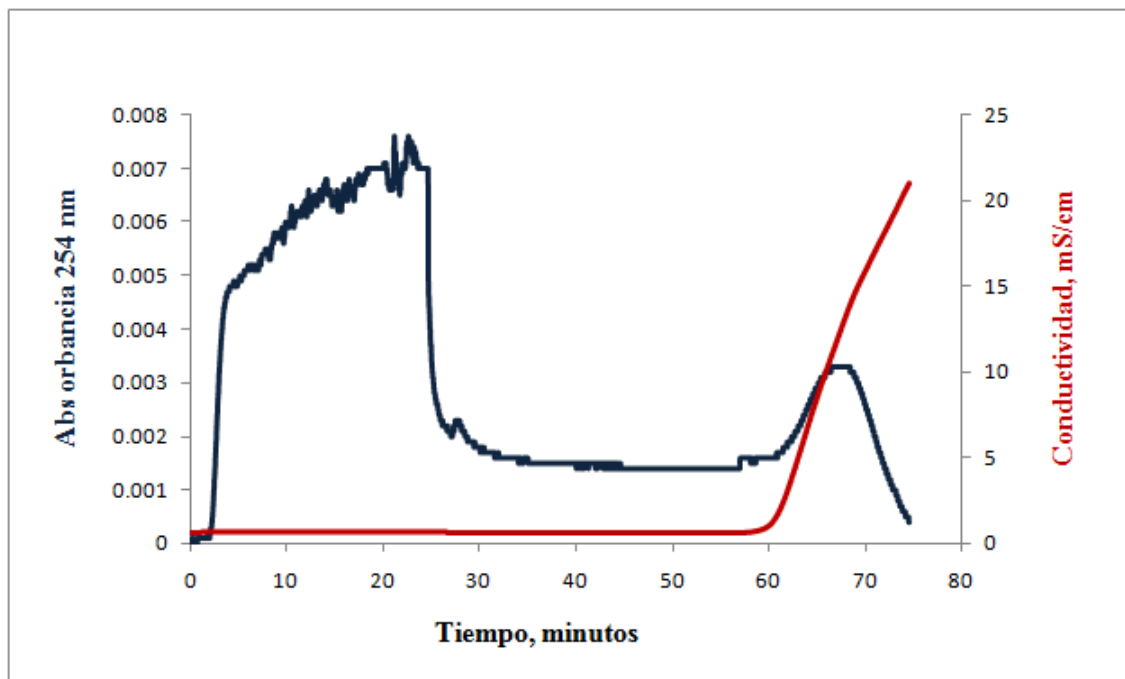


Figura 14. Análisis cromatográfico de la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112. La adsorción comienza en el tiempo 0 y termina a los 24 minutos. El lavado termina a los 57 minutos. La elución comienza a los 57 minutos y termina a los 75 minutos. La columna se operó con un flujo de 1 ml/min, y fue empacada con 30 membranas.

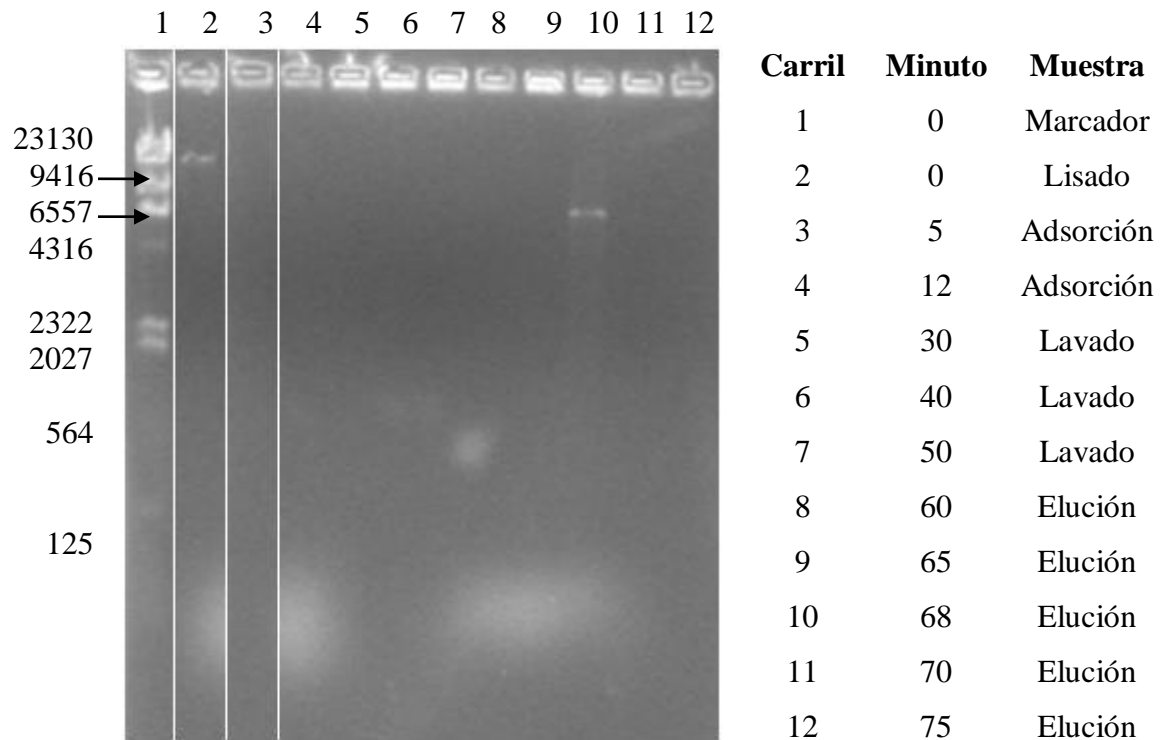


Figura 15. Análisis electroforético de las muestras tomadas durante la corrida cromatográfica 1 para la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112, el cual tiene 6700 pb. En la parte derecha se enuncia el número del carril y el tipo de muestra, mientras que a la izquierda se muestra el número de pares de base del marcador Lamda Hind III.

La corrida 2 se efectuó a un flujo de 0.5 ml/min utilizando el gradiente que se muestra en la Tabla 6. En la Figura 16 se muestra el cromatograma obtenido en la purificación del plásmido; la línea correspondiente a la conductividad se representa mediante una tendencia, a diferencia de la absorbancia donde se muestra el comportamiento experimental. Aquí se puede observar que el lisado se encuentra en forma muy diluida, sin embargo, gran parte del ARN eluye antes que el ADNp, formándose 2 picos perfectamente diferenciados. El primer pico se presenta a los 190 minutos, para un valor de conductividad de 11.6 mS/cm, mientras que el segundo pico se presenta a los 220 minutos para un valor de conductividad de 48.37 mS/cm. En la Figura 17 se observa el análisis electroforético de las muestras tomadas, como se comenta anteriormente, el lisado está muy diluido por lo que es difícil verlo, pero aun así se puede observar con claridad.

Tabla 6. Gradiente de elución modificado utilizado en el paso cromatográfico. El buffer de adsorción es buffer TE, y el buffer de elución es 2M de NaOH en buffer TE.

Duración (minutos)	Buffer	Gradiente
0 – 5	Buffer Adsorción	
5 – 15	0 – 15% Buffer de Elución	3.00
15 – 90	15 – 100% Buffer de Elución	2.26
90 – 105	Buffer Elución	
105 – 120	Buffer de Adsorción	

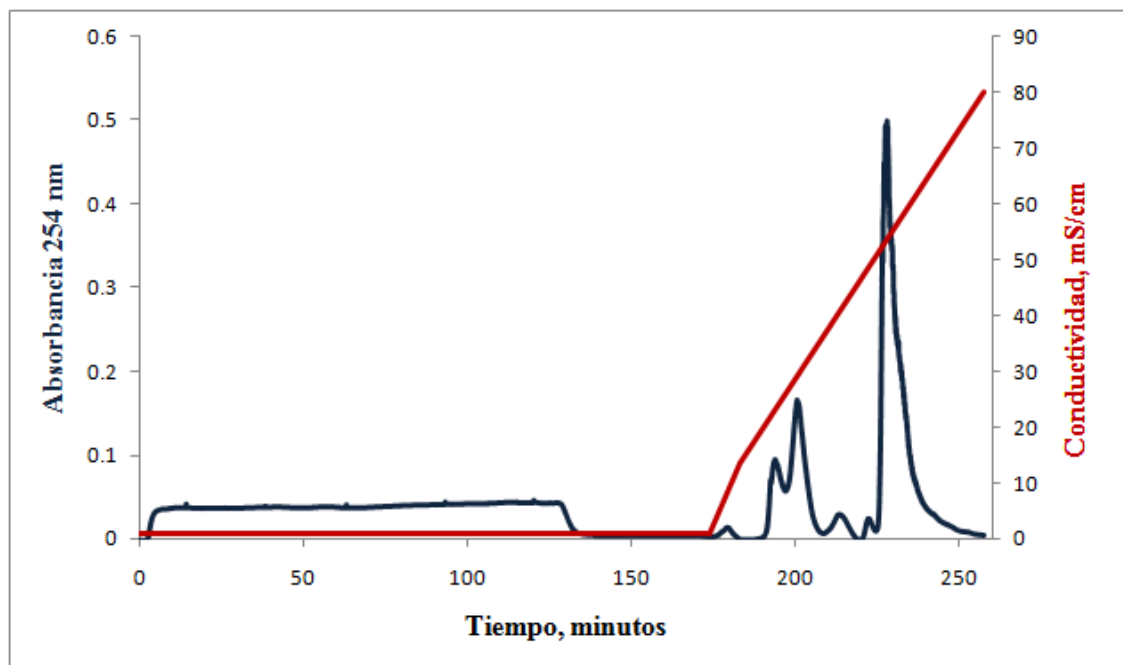


Figura 16. Análisis cromatográfico de la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112. La adsorción comienza en el tiempo 0 y termina a los 135 minutos. El lavado termina a los 168 minutos. La elución comienza a los 168 minutos. La columna se operó con un flujo de 0.5 ml/min, y fue empacada con 30 membranas.

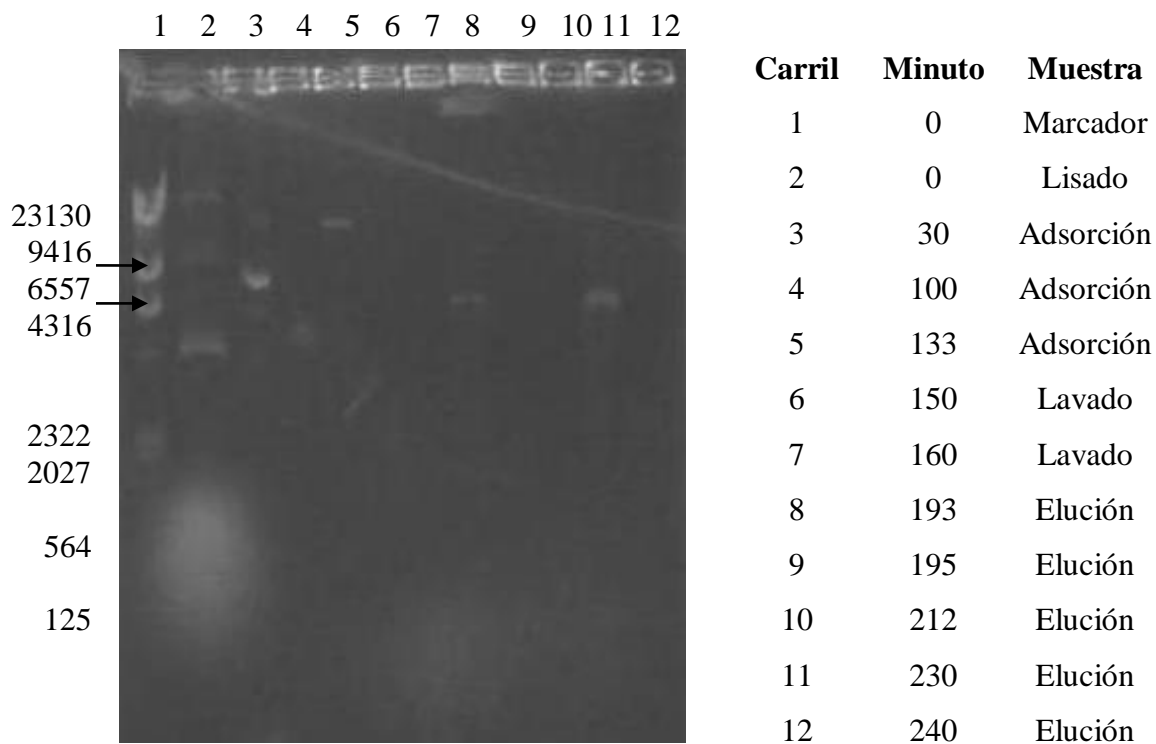


Figura 17. Análisis electroforético de las muestras tomadas durante la corrida cromatográfica 2 para la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112, el cual tiene 6700 pb. En la parte derecha se enuncia el número del carril y el tipo de muestra, mientras que a la izquierda se muestra el número de pares de base del marcador Lamda Hind III.

La corrida 3 se realizó a las mismas condiciones que la corrida 2, excepto que la solución de alimentación se concentró 2 veces previamente. En el cromatograma, mostrado en la Figura 18, la línea correspondiente a la conductividad se representa mediante una tendencia, a diferencia de la absorbancia donde se muestra el comportamiento experimental. Se pueden apreciar que se tiene 2 picos diferenciados. El primer pico se presenta a los 95 minutos a un valor de conductividad de 12.77 mS/cm; el segundo pico se presenta a los 106 minutos a una conductividad de 41 mS/cm. Tanto el tiempo de separación entre los picos como los valores de conductividad a los que se presentan son congruentes con los obtenidos en la corrida 2. La fracción con el plásmido purificado supera la escala, indicando que se adsorbió una cantidad considerable de plásmido a las membranas. En la Figura 19 se muestra el análisis electroforético, Se puede ver como en la fase de adsorción, en los carriles 3 y 4, todo el material celular se adhiere a la columna, indicando una adecuada adsorción. En el carril 12 se puede observar que el plásmido está más concentrado. Se corrobora que el primer pico está compuesto por ARN, mientras que el segundo está compuesto por ADNp muy puro.

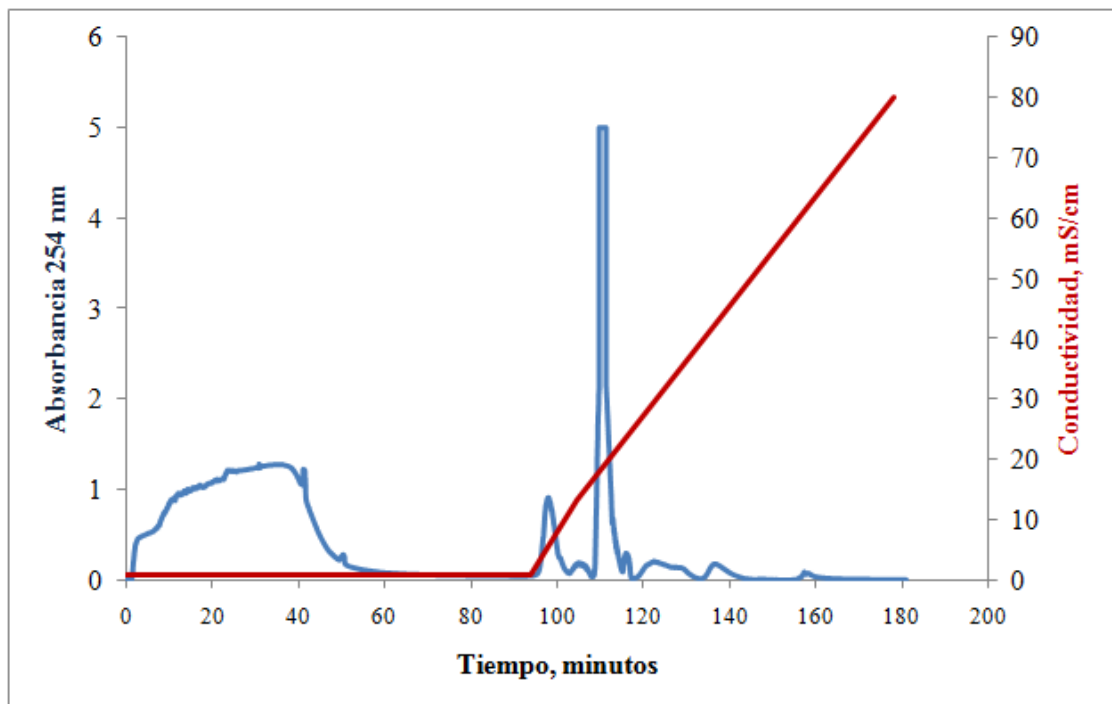


Figura 18. Análisis cromatográfico de la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112. La adsorción comienza en el tiempo 0 y termina a los 45 minutos. El lavado termina a los 88 minutos. La elución comienza a los 88 minutos. La columna se operó con un flujo de 1 ml/min, y fue empacada con 30 membranas.

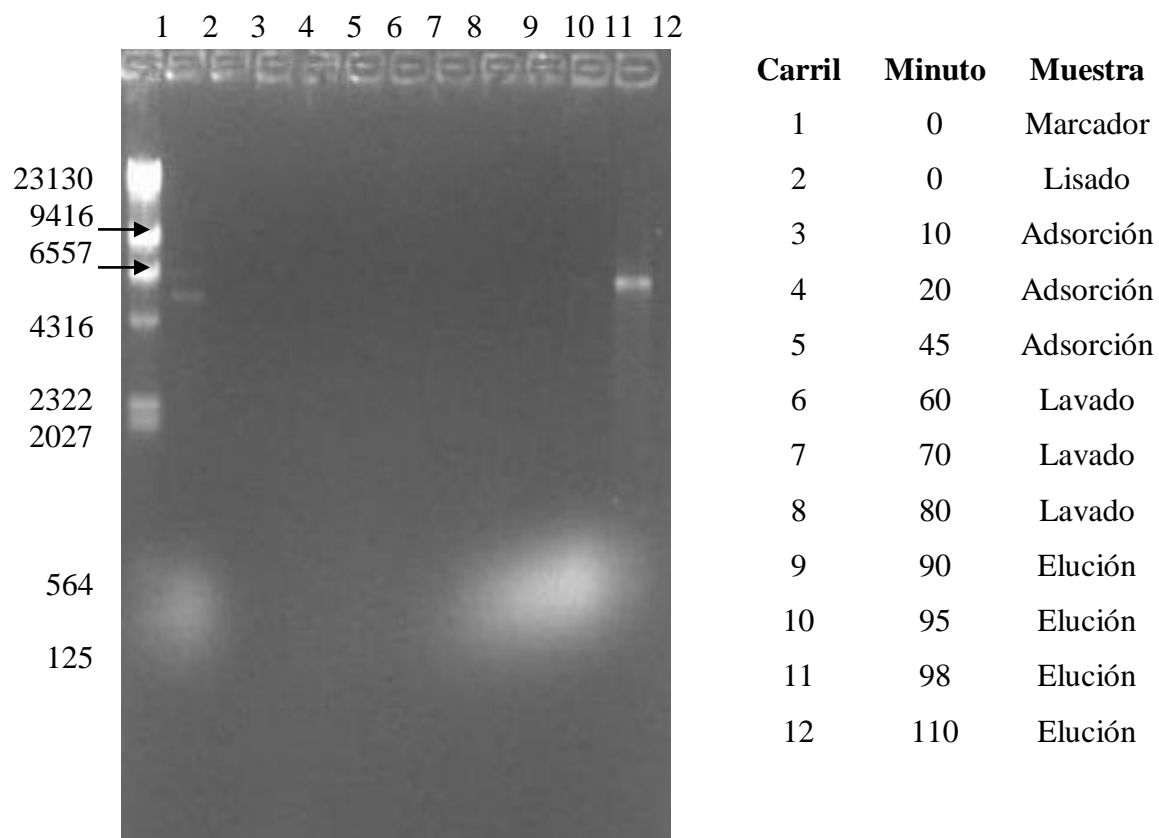


Figura 19. Análisis electroforético de las muestras tomadas durante la corrida cromatográfica 3 para la purificación del plásmido pcDNA-Ehcp112, el cual tiene 6700 pb. En la parte derecha se enuncia el número del carril y el tipo de muestra, mientras que a la izquierda se muestra el número de pares de base del marcador λ Hind III.

4.5 Escalamiento del Proceso

En los estudios de escalamiento realizados, se utilizaron como base de comparación los resultados reportados por Freitas y col. en 2006 [36], sobre la evaluación de un bioproceso por lotes para la producción de plásmidos utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés), Proceso I. Con base en el bioproceso desarrollado a nivel laboratorio en nuestra investigación, se realizó la simulación de un proceso para la producción y purificación de ADNp a escala industrial, Proceso II. Como parte del análisis y para efecto de validar una fermentación continua, se evaluó el comportamiento del Proceso I en condiciones de fermentación continua, Proceso III. En función de los resultados obtenidos en esta investigación, y de reportes de la literatura, se propusieron varias modificaciones al Proceso II, las cuales se evaluaron en el Proceso IV. Para todos estos estudios los parámetros de evaluación utilizados son los descritos en la Tabla 7.

4.5.1 Proceso I

Freitas y col. en 2006 [36] reportan el escalamiento de un proceso específicamente diseñado para la producción y purificación de plásmidos que cubra los requerimientos de calidad de las agencias reguladoras, utilizando el software SuperPro Designer. Los datos de producción y purificación utilizados se basaron en resultados obtenidos a escala laboratorio. Los criterios de escalamiento utilizados son los descritos en la Tabla 7.

La Figura 20 muestra el diagrama de bloques del proceso el cual se divide en 4 secciones: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. Se describen las operaciones realizadas en cada una de las etapas, así como el tipo de contaminantes removidos. La Figura 21 muestra el diagrama de flujo del proceso, incluyendo la sección de empacado. El rendimiento general de la recuperación del plásmido es de 65%, 141 g de ADNp se recuperan como producto final de los 216 g del lisado celular. En la Tabla 8 se muestran los resultados de la evaluación económica.

Tabla 7. Parámetro de evaluación económica.

Área	Concepto	Valor
Mercado	Demanda	22.2 Kg ADNp/año
	Producción	330 días/año
		1 lote/2 días
		3 dosis ^a /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%

^a dosis de 1 ml conteniendo 2 mg ADNp/ml.

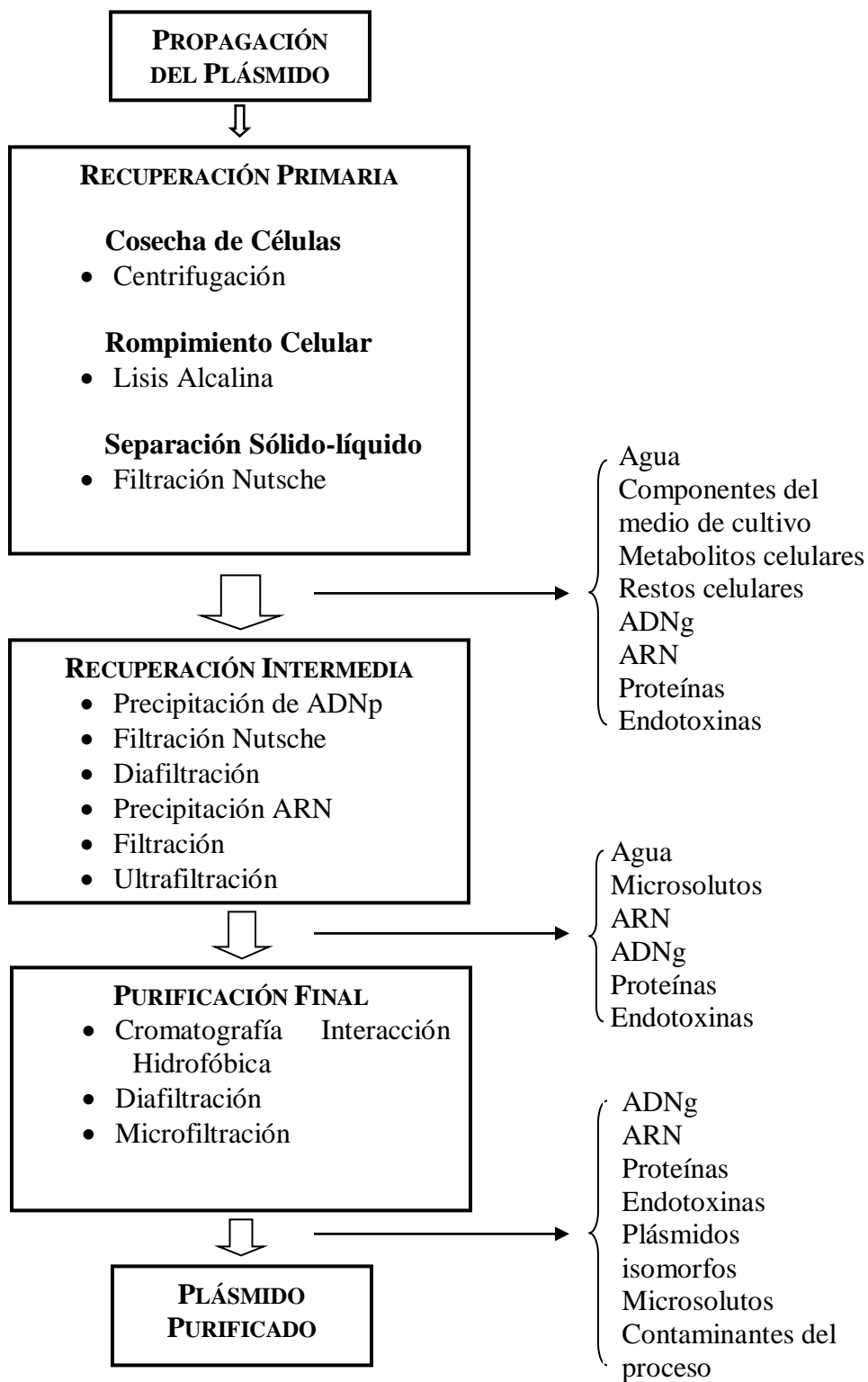


Figura 20. Diagrama general de las operaciones realizadas en el Proceso I.

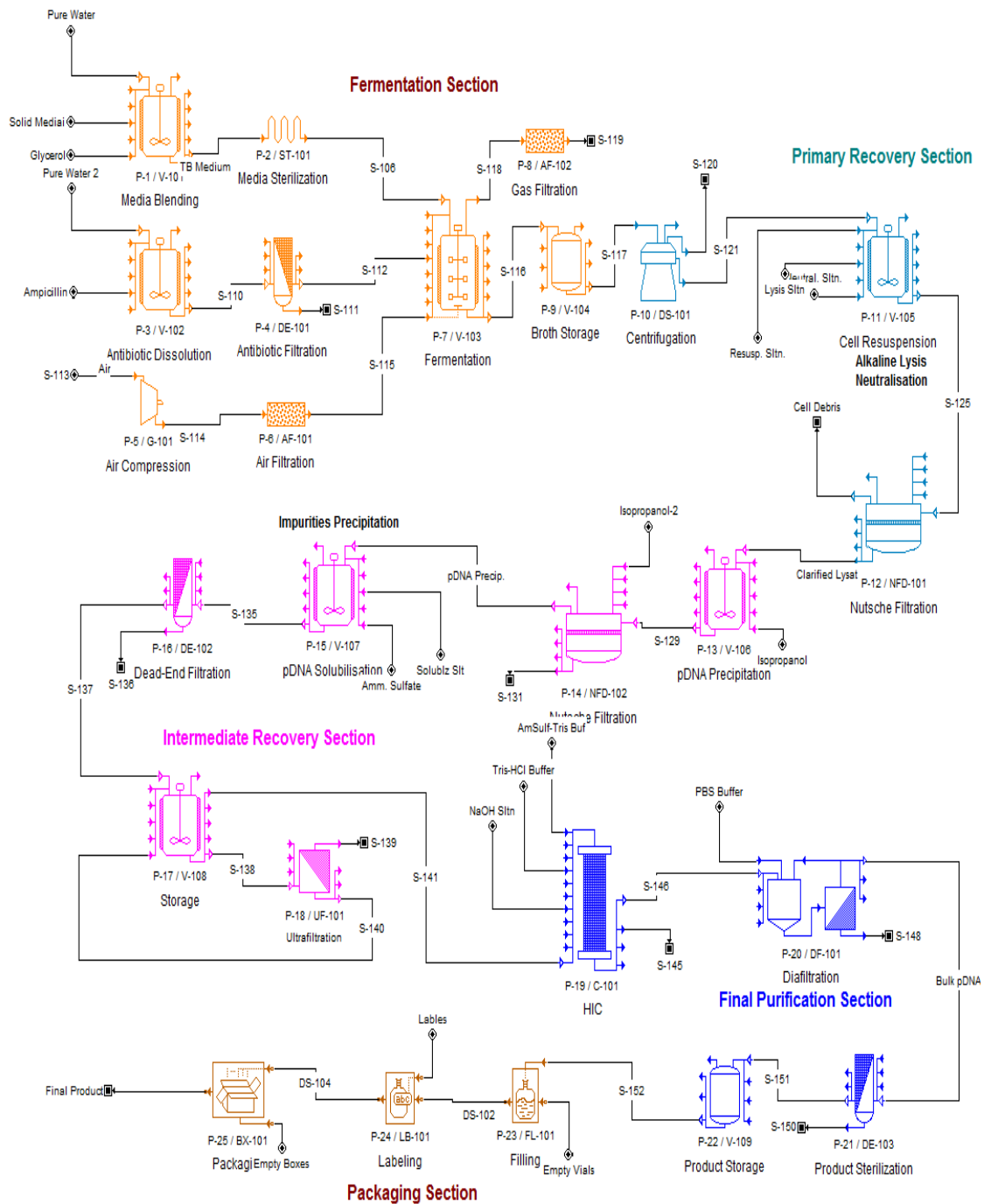


Figura 21. Diagrama de flujo del Proceso I. Proceso reportado por Freitas y col. [36] que utiliza HIC para la purificación final del plásmido.

Tabla 8. Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso I.

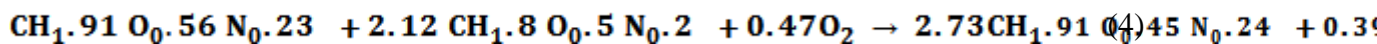
Parámetro de Evaluación	Valor
Inversión fija directa	\$ 23.2 millones
Capital total de inversión	\$ 20.8 millones
Rendimiento de la planta	23.2 kg ADNp/año
Costo de operación	\$ 8.4 millones/año
Costo de producción por unidad	\$ 2.17/paquete 6 mg de ADNp
Precio de Venta	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp
Ingresos	\$ 38.7 millones
Utilidad antes de impuestos	\$ 30.2 millones/año
Impuestos (40%)	\$ 12.1 millones/año
Utilidad neta	\$ 20.0 millones/año
Período de retorno (PR)	1.16 años
Retorno sobre la inversión (ROI)	83.26%
Tasa interna de retorno (TIR)	68.52%
Valor presente neto (VPN), 7% de interés	\$ 127.3 millones

Puede apreciarse en la Tabla 8 que los valores de los parámetros de evaluación económica son favorables para la inversión, sintetizados en un TIR del 63% y un PR de 1.16 años.

4.5.2 Proceso II

El Proceso II está basado en el proceso de laboratorio desarrollado en esta investigación, el cual se muestra en el diagrama de bloques en la Figura 6. El diagrama de flujo del proceso se presenta en la Figura 22, y consta de 5 etapas: propagación del plásmido, recuperación primaria, recuperación intermedia, purificación final y empaçado. El rendimiento general del proceso es del 70%, recuperándose 147g de ADNp de los 209 g de ADNp presentes en el lisado celular.

Propagación del plásmido. Se lleva a cabo en un fermentador de 5000 l durante 24 h a 37°C, obteniéndose una concentración celular de 7 g de células por litro. La Ec. (4) es utilizada para describir la estequiometría de la biorreacción conversión de los nutrientes a biomasa:



Los coeficientes estequiométricos fueron calculados mediante balances de los elementos C, H, O y N. Se supuso que el consumo de triptona es el doble del extracto de levadura. El coeficiente de respiración resultó en 0.826. Las formulas empíricas para el extracto de levadura ($\text{CH}_{1.91}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.23}$), triptona ($\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$) y biomasa ($\text{CH}_{1.77}\text{O}_{0.49}\text{N}_{0.24}$) en su forma reducida fueron tomadas de Freitas y col [36].

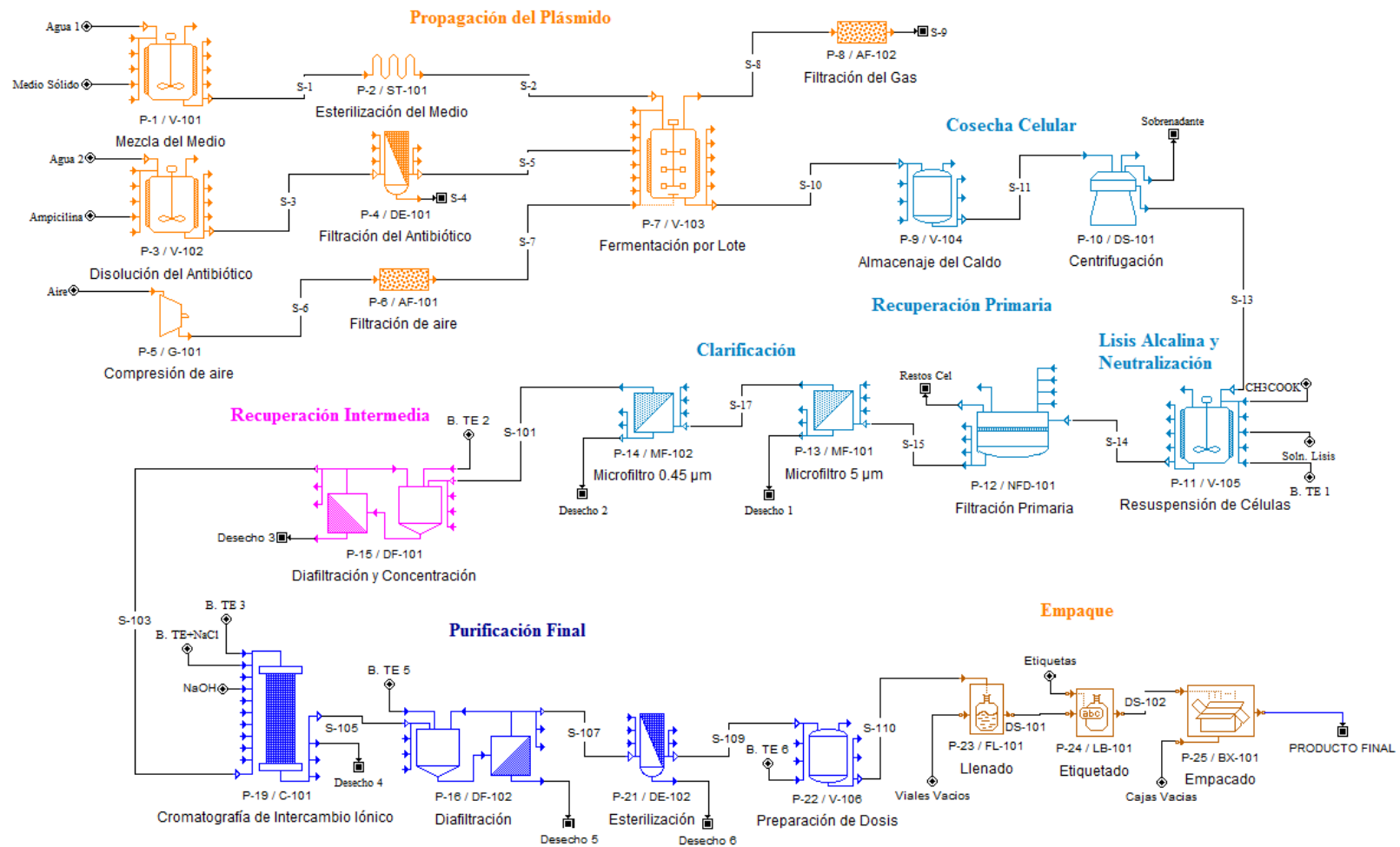


Figura 22. Diagrama de flujo del Proceso II, el cual fue desarrollado con base en los resultados obtenidos a escala laboratorio. Se utiliza la cromatografía de intercambio iónico para la purificación final del plásmido.

La composición utilizada de *E. coli* en peso seco es de 50% proteínas, 20% ARN, 16.7% endotoxinas, 1.7 gDNA, 10.9% de otros componentes (iones pequeños, lípidos, carbohidratos, etc.) y 0.7% de plásmido [38].

Recuperación Primaria. Inicialmente se cosechan las células en una centrifuga donde el volumen de operación se reduce de 4276 l a 197 l. En el tanque de agitación las células son resuspendidas con 450 l de buffer TE. Para la lisis alcalina se agregan 450 l de solución de lisis y se aplica agitación. La solución se neutraliza adicionando 187 l de acetato de potasio 3M, provocando la precipitación de los complejos SDS-proteínas y ADNg. Hasta este punto, la temperatura de operación se mantiene en 4°C.

Los precipitados formados son removidos por filtración. En esta etapa del proceso se separan el 95% de las endotoxinas y del ADNg, así como el 99% de las proteínas, y el 10% del ARN. Con respecto al plásmido de interés, durante la lisis alcalina y neutralización se pierde el 10%. Para clarificar el lisado, después de la filtración se lleva a cabo una microfiltración utilizando 2 filtros en serie, de 5.0 μm y 0.45 μm de diámetro de poro, respectivamente.

Recuperación Intermedia. Con el fin de eliminar las sales agregadas en las etapas anteriores, así como también moléculas pequeñas como fragmentos de proteínas, endotoxinas o ADNg, se lleva a cabo una diafiltración. Para esto, se utilizan 10 volúmenes de buffer TE. Terminada la diafiltración, la muestra es concentrada, obteniéndose un volumen de operación de 122.2 l.

Purificación Final. Esta se lleva a cabo en 5 columnas empacadas con membranas de intercambio iónico Mustang Q. Primero, las columnas se equilibran con buffer de adsorción y se carga con el lisado proveniente de la diafiltración. Los solutos que no se adsorben en la columna son lavados con buffer de adsorción. Terminado el lavado, la elución se realiza utilizando un gradiente en dos etapas. En la primera etapa de la elución, se desprende el ARN, mientras que en la segunda etapa eluye el ADNp.

La solución purificada es diafiltrada nuevamente para retirarlas sales agregadas durante la elución. Enseguida se esteriliza la solución y se pasa a un tanque de almacenamiento.

Empaque. Una vez en el tanque de almacenamiento, la solución es diluida, con buffer TE, para obtener una concentración de 2 g/l. De aquí se pasa al llenado de los viales, con un ml de solución (2 mg/ml), los cuales son etiquetados y empacados. Los paquetes contienen tres viales y tiene un precio de venta de 10 dólares. Para la evaluación económica, los costos de la sección de empaçado no fueron tomados en consideración.

En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos en la evaluación económica del Proceso II y se comparan con los obtenidos en el Proceso I. En esta comparación se puede apreciar una reducción en el capital total de inversión (23.2 contra 18.6 millones), un incremento de los costos de operación (8.4 contra 10.9 millones), un incremento en los ingresos (38.7 contra 40.3 millones), una reducción del PR (1.16 contra 0.97 años), un aumento del ROI (83.26 contra 102.89%) una disminución del TIR (68.52 contra 56.64%), y un decremento del VPN (122.3 contra 111.2 millones). Los índices de evaluación de ambos procesos son muy favorables. La considerable disminución del costo de la inversión fija directa en el Proceso II se traduce en un menor riesgo del mismo como lo sugieren el ROI y el PR. Sin embargo, los mayores costos de operación impactan el TIR y el VPN.

Tabla 9 . Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso II.

Parámetro de Evaluación	Proceso I	Proceso II
Inversión fija directa	\$23.2 millones	\$18.6 millones
Capital total de inversión	\$ 20.8 millones	\$17.5 millones
Rendimiento de la planta	23.2 kg ADNp/año	23.2 kg ADNp/año
Costo de operación	\$ 8.4 millones/año	\$ 10.9 millones/año
Costo de producción por unidad	\$ 2.17/paquete 6 mg de ADNp	\$ 2.71/paquete 6 mg de ADNp
Precio de venta	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp
Ingresos	\$38.7 millones	\$40.3 millones
Utilidad antes de impuestos	\$ 30.2 millones/año	\$ 29.3 millones/año
Impuestos (40%)	\$ 12.1 millones/año	\$ 11.7 millones/año
Utilidad neta	\$ 20.0 millones/año	\$ 19.2 millones/año
Período de retorno (PR)	1.16 años	0,97 años
Retorno de la inversión (ROI)	83.26%	102.89%
Tasa interna de retorno (TIR)	68.52%	56.64%
Valor presente neto (VPN), 7% de interés	\$ 127.3 millones	\$ 111.2 millones

4.5.3 Proceso III

El Proceso I fue evaluado bajo condiciones de fermentación continua; el objetivo fue obtener los mismos resultados de producción y de rendimiento en la fermentación, con el fin de validar el uso de la fermentación continua como una alternativa a la fermentación por lotes. El proceso general se operó por lotes a partir de la recuperación primaria.

Al implementar la fermentación continua, se redujo el volumen del fermentador, de 5000 l a 600 l, lo que representa un ahorro sensible en el precio de compra. La fermentación fue alimentada con un flujo de 93.8 l/h de medio de cultivo y 0.093 l/h de ampicilina. Las condiciones de la fermentación fueron las mismas que en el Proceso I, y el rendimiento también fue el mismo.

El diagrama de bloques del Proceso III es el análogo al que se muestra en la Figura 20 para el Proceso I, y su diagrama de flujo se muestra en la Figura 23. En la Tabla 10 se muestran los resultados de la evaluación económica y se comparan con los obtenidos para el Proceso I. Es apreciable que el proceso incluyendo la fermentación continua es económicamente viable. La inversión es ligeramente menor gracias a la reducción del volumen del fermentador, lo que genera que los ingresos se incrementen. En general, los resultados de producción muestran que el uso de la fermentación continua permite obtener los mismos resultados, en cuanto a rendimiento, que la fermentación por lote.

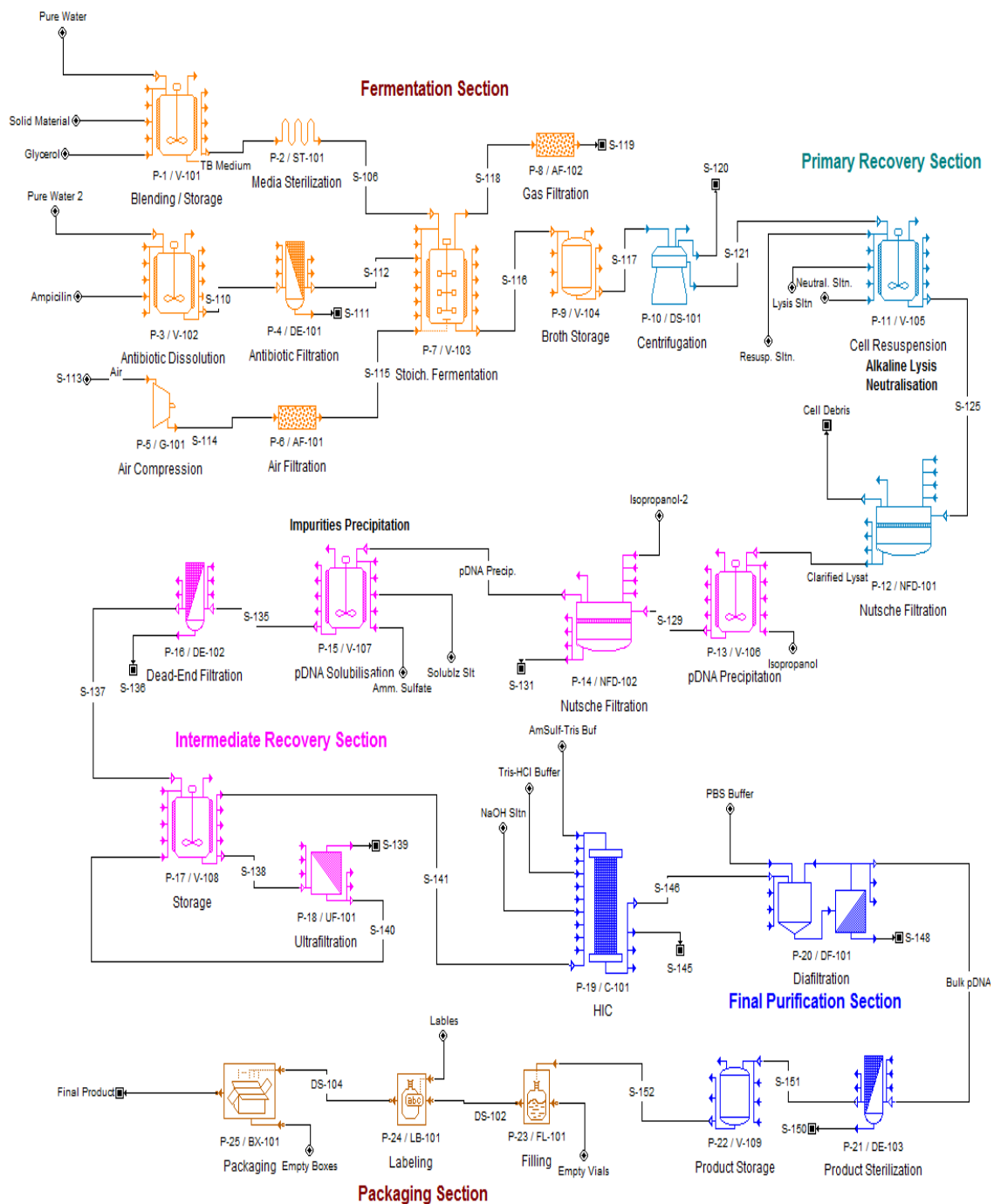


Figura 23. Diagrama de flujo del Proceso III, aquí se utiliza la fermentación continua reduciendo considerablemente el tamaño del fermentador.

Tabla 10. Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso III.

Parámetro de Evaluación	Proceso I	Proceso III
Inversión fija directa	\$23.2 millones	\$21.2 millones
Capital total de inversión	\$ 20.8 millones	\$19.0 millones
Rendimiento de la planta	23.2 kg ADNp/año	23.2 kg ADNp/año
Costo de operación	\$ 8.4 millones/año	\$ 8.5 millones/año
Costo de producción por unidad	\$ 2.17/paquete 6 mg de ADNp	\$ 2.19/paquete 6 mg de ADNp
Precio de venta	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp
Ingresos	\$38.7 millones	\$38.9 millones
Utilidad antes de impuestos	\$ 30.2 millones/año	\$ 30.4 millones/año
Impuestos (40%)	\$ 12.1 millones/año	\$ 12.1 millones/año
Utilidad neta	\$ 20.0 millones/año	\$ 19.9 millones/año
Período de retorno (PR)	1.16 años	1.07 años
Retorno de la inversión (ROI)	83.26%	93.85%
Tasa interna de retorno (TIR)	68.52%	73.05%
Valor presente neto (VPN), 7% de interés	\$ 127.3 millones	\$ 128.2 millones

4.5.4 Proceso IV

Para desarrollar el Proceso IV a partir de los resultados obtenidos en esta investigación, y de reportes de la literatura se propusieron varias modificaciones al Proceso II. El diagrama de flujo de la recuperación y purificación de ADNp fue desarrollado con base en reglas heurísticas, reportes de la literatura, así como los resultados obtenidos en el laboratorio a lo largo de esta investigación, para determinar las impurezas asociadas y los rendimientos de las operaciones unitarias disponibles para el procesado del plásmido.

El Proceso IV fue evaluado bajo condiciones de fermentación continua; se hicieron, además, a largo del proceso diferentes adecuaciones. En la Figura 24 se muestra el diagrama de bloques del proceso el cual se divide en 4 secciones: propagación del plásmido, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final, en el se describen las operaciones realizadas en cada una de las etapas, así como el tipo de contaminantes removidos. La Figura 25 muestra el diagrama de flujo del proceso, incluyendo la sección de empacado. El rendimiento general de la recuperación del plásmido fue de 86%, 185 g de ADNp se recuperan como producto final de los 216 g del lisado celular.

Propagación del plásmido. Se lleva a cabo mediante una fermentación continua en un fermentador de 460 l a 37°C, obteniéndose una concentración celular de 7 g de células por litro. La estequiometría de la biorreacción es la descrita en la **Ec. (4)**.

Para el cálculo del volumen del fermentador continuo se estableció:

$$\mu = D = 0.2 \text{ h}^{-1} \quad (5)$$

donde D = es la velocidad de dilución. Con base en la concentración de salida del fermentador y la productividad anual establecida se estimó el flujo de medio al fermentador en 93.6 l/h.

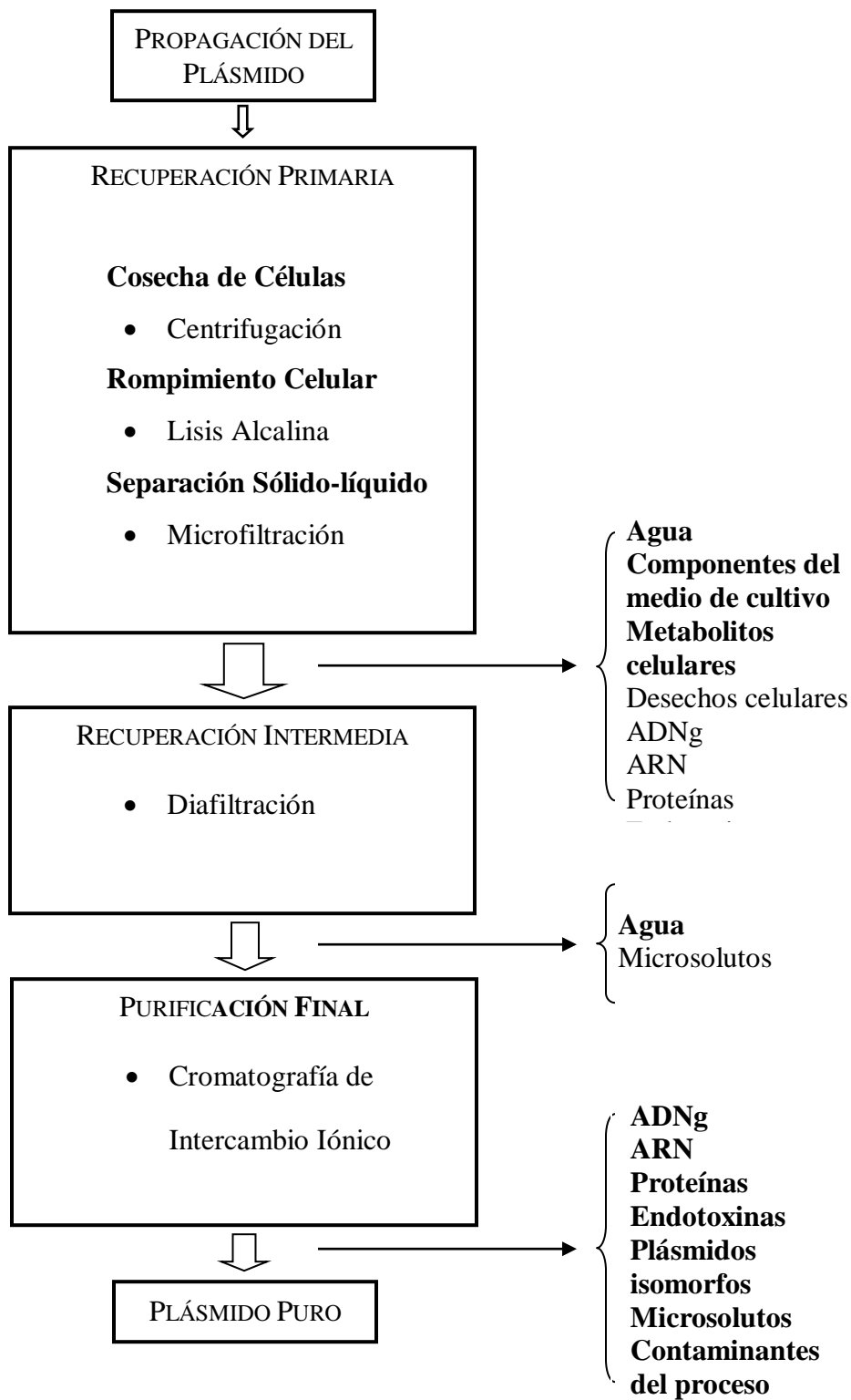


Figura 24. Diagrama de bloques del Proceso IV.

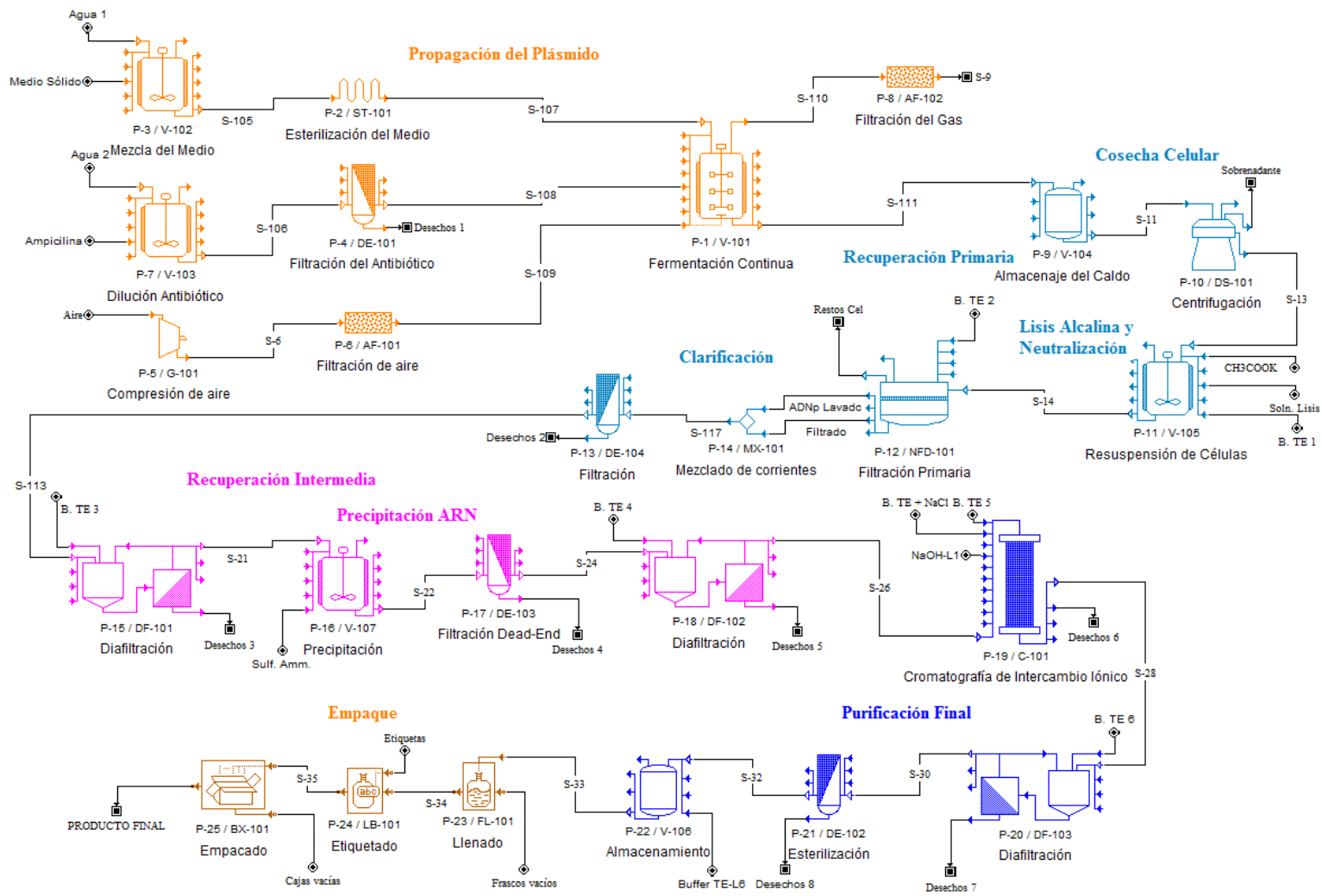


Figura 25. Diagrama de flujo del Proceso IV, aquí se implementan varias mejoras basadas en la literatura y reglas heurísticas.

Sabemos que en estado estacionario se cumple que:

$$D = \frac{F}{V} \quad (6)$$

donde F = flujo de entrada al fermentador.

Combinando las Ec. (5) y (6) y suponiendo un volumen de operación de 77%, el volumen del fermentador se estimó en 460 l.

Recuperación Primaria. La cosecha de las células se realiza de la misma manera que la descrita en el Proceso II, obteniéndose un volumen final de suspensión celular de 203.7 l. En el tanque de lisis las células son resuspendidas con 450 l de buffer TE. Para la lisis alcalina se agregan 450 l de solución de lisis y se aplica agitación. La solución se neutraliza mediante la adición de 187 l de acetato de potasio 3M, provocando la precipitación de los complejos SDS-proteínas y ADNg. Hasta este punto, la temperatura de operación se mantiene en 4°C.

Los precipitados formados son removidos por filtración. En esta etapa se presenta otra de las modificaciones propuestas al proceso; según lo reportado por Urthaler y col. [25], después de haber filtrado la solución, la torta resultante con los flóculos y los restos celulares precipitados es lavada con buffer TE, y es posible recuperar el 100 por ciento del ADNp retenido en ella. Para efecto de los cálculos realizados, se considero una recuperación inicial del 60% del plásmido y se recupero además el 90% del ADNp retenido mediante el lavado de la torta. Esta modificación repercute en la cantidad de plásmido recuperado, y en el rendimiento general del proceso. El volumen de operación después de la filtración fue de 1363.6 l. Theodossiou y col. [39] reportan que las separaciones mediante filtros Nutsche presurizados son muy nítidas, y presentan un alto grado de separación [24], lo que hace posible llevar a cabo la clarificación del lisado

substituyendo los microfiltros (de 5.0 μm y 0.45 μm de diámetro de poro) por una sola filtración, este cambio permite una reducción sensible en los costos de adquisición del equipo, debido a que el costo de esta unidad es menor que la suma de los costos de las dos unidades reemplazadas.

Recuperación Intermedia. La diafiltración se lleva a cabo en las mismas condiciones que las reportadas para el Proceso II. Durante la etapa de la recuperación intermedia se agregó una operación de precipitación de ARN, ADNg y proteínas con sulfato de amonio. Los 136.4 l de lisado restantes de la diafiltración y concentración son almacenados en un tanque de 206 l, y se les adiciona 31.2 l de sulfato de amonio para alcanzar una concentración de 2.5 M. En seguida los precipitados son separados por una filtración, donde se remueven el 99.8% de endotoxinas, 97.2% de ADNg, 83% de proteínas y 97.1% de ARN [36]. El siguiente paso es una diafiltración, donde la solución se lava de nuevo con 10 volúmenes de buffer TE y después se concentra, previo a la purificación final, obteniéndose un volumen de operación de 20.5 l.

Purificación Final. Se utilizan columnas de 5 l empacadas con membranas de intercambio iónico Mustang Q, con una vida útil de 10 ciclos. Para determinar el número de columnas, así como el número de ciclos necesarios, primero se determina el volumen del lecho, los valores de altura y diámetro de la columna se fijaron en 50 y 14 cm, respectivamente, y la altura del lecho se fijó en 35 cm. De tal manera que el volumen del lecho, V_l , fue:

$$V_l = \frac{\pi \times 1.4^2 \text{ dm}^2}{4} \times 3.5 \text{ dm} = 5.31 \quad (7)$$

Suponiéndose una capacidad de operación, CO, del 80%, se calcula la capacidad de adsorción de acuerdo a la Ec. (8):

$$\text{Capacidad de adsorción} = \text{CO} \times V_l \times Q \quad (8)$$

donde Q es la capacidad de adsorción de las membranas con un valor total de 22.4 mg/ml. De tal manera que la capacidad de operación calculada fue de 0.095 kg.

$$\text{Capacidad de adsorción} = 0.8 \times 5.31 \times 0.0224 \frac{\text{kg}}{\text{l}} = 0.095 \text{kg} \quad (9)$$

La masa estimada de las sustancias retenibles es igual a la suma de la masa de ADNg, ARN y ADNp presentes en la corriente de entrada, la cual es igual a 0.26849 kg. El número de ciclos es calculado dividiendo la masa de las sustancias retenibles entre la capacidad de adsorción de la columna, obteniéndose un número de 2.8 ciclos. Se utilizan 2 columnas realizando 2 ciclos por columna.

La solución purificada es diafiltrada nuevamente para retirar las sales agregadas durante la elución. Enseguida se esteriliza la solución y se pasa a un tanque de almacenamiento.

Empaque. La preparación de las dosis y el empaque de las mismas, se lleva a cabo de la misma manera reportada para el Proceso II.

En la Tabla 11 se muestran los valores obtenidos en la evaluación económica del Proceso IV y se comparan con los obtenidos en el Proceso III. Se puede ver una notoria mejoría en todos los aspectos de la evaluación económica. En esta comparación se pueden apreciar, principalmente, reducciones sensibles en: el capital total de inversión (17.5 contra 21.2 millones), los costos de operación (6.8 contra 8.5 millones) y el PR (0.63 contra 1.07 años). También son sensibles los incrementos en: el ROI (158.62 contra 93.85%), TIR (74.61 contra 73.05%) y VPN (170.0 contra 128.2 millones). Es fácilmente apreciable que el Proceso IV presenta índices muy favorables para la inversión.

Tabla 11. Valores de los parámetros de evaluación económica del Proceso IV.

Parámetro de Evaluación	Proceso III	Proceso IV
Inversión fija directa	\$21.2 millones	\$17.5 millones
Capital total de inversión	\$19.0 millones	\$ 16.5 millones
Rendimiento de la planta	23.2 kg ADNp/año	30.4 kg ADNp/año
Costo de operación	\$ 8.5 millones/año	\$ 6.8 millones/año
Costo de producción por unidad	\$ 2.19/paquete 6 mg de ADNp	\$ 1.34/paquete 6 mg de ADNp
Precio de venta	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp	\$ 10/paquete 6 mg de ADNp
Ingresos	\$38.9 millones	\$50.8 millones
Utilidad antes de impuestos	\$ 30.4 millones/año	\$ 44.0 millones/año
Impuestos (40%)	\$ 12.1 millones/año	\$ 17.6 millones/año
Utilidad neta	\$ 19.9 millones/año	\$ 27.8 millones/año
Período de retorno (PR)	1.07 años	0.63 años
Retorno de la inversión (ROI)	93.85%	158.62%
Tasa interna de retorno (TIR)	73.05%	74.61%
Valor presente neto (VPN), 7% de interés	\$ 128.2 millones	\$ 170.0 millones

En la Figura 26 se muestra la distribución de los costos anuales de producción, se observa que la operación del equipo instalado representa la mayor parte de los costos (44%), seguida por el costo de la mano de obra (32%).

Como parte del análisis de factibilidad económica del Proceso IV, se analizó la sensibilidad del proceso a variaciones del precio de venta y la concentración celular final en el fermentador, sobre TIR y del PR. La Figura 27 muestra los cambios del TIR y del PR contra variaciones del precio de venta. Tanto el TIR como el PR son muy sensibles al cambio del precio de venta en el rango estudiado, mostrando una dependencia lineal del TIR con respecto al precio de venta. Este cambio puede interpretarse como el beneficio del proyecto respecto al precio de venta, es decir, entre mayor sea el precio de venta, mayor es el beneficio obtenido. La Figura 28 muestra las variaciones del TIR contra la concentración celular final en el biorreactor, se puede observar que el TIR varía sensiblemente, conforme la concentración celular aumenta, la inversión se hace más atractiva. De esta relación es posible visualizar la importancia que representa la optimización de la fermentación para el éxito futuro de este tipo de tecnologías.

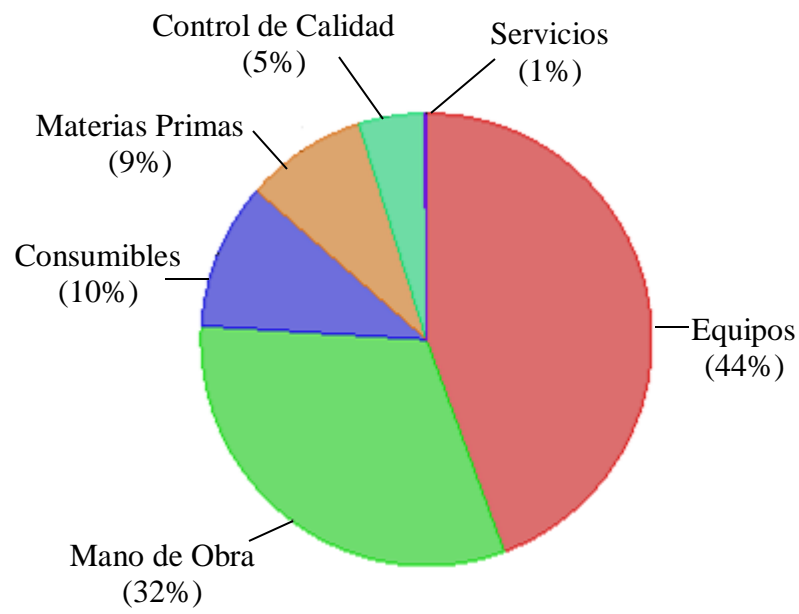


Figura 26. Distribución de los costos de operación anual del Proceso IV.

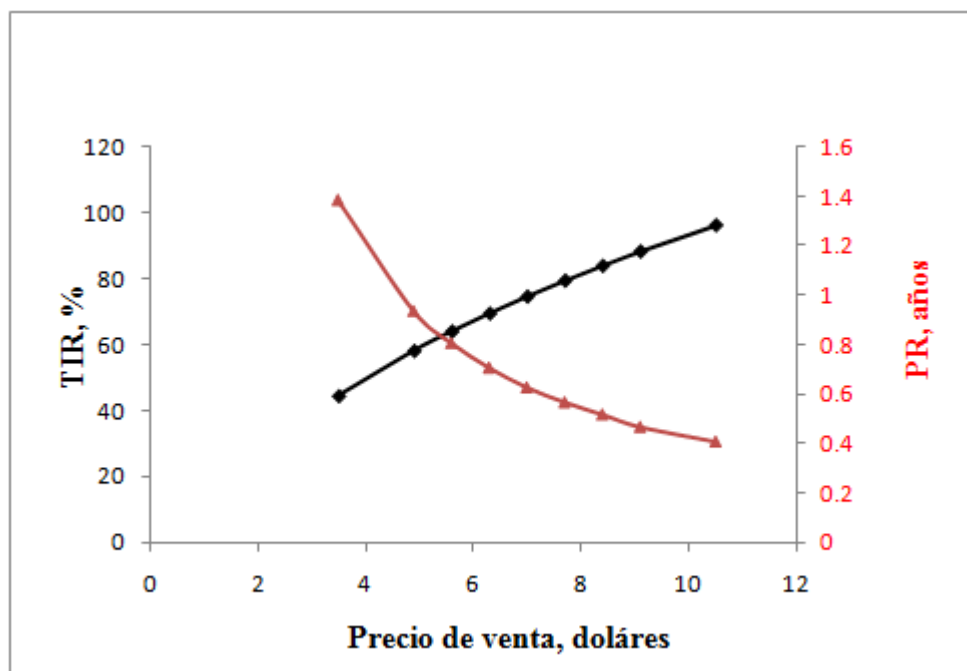


Figura 27. Variación del TIR y del PR vs Precio de venta.

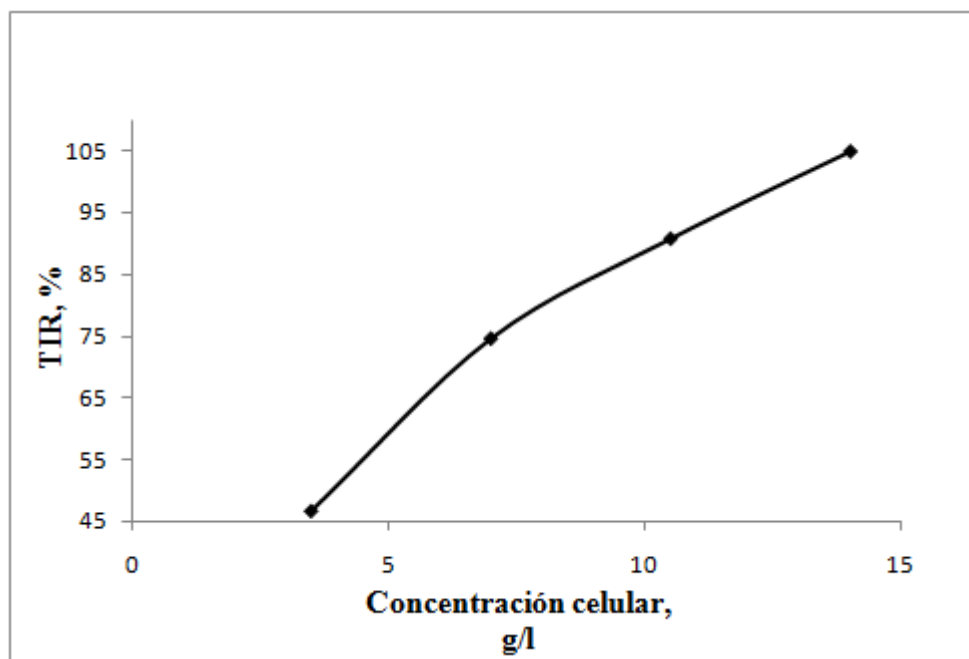


Figura 28. Variación del TIR con respecto a la concentración celular.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En esta investigación se logró desarrollar un proceso de laboratorio en el cual la purificación del plásmido se realiza utilizando un solo paso cromatográfico. Durante la propagación del plásmido, se alcanzaron resultados típicos para la fermentación de *E. coli* bajo las condiciones de fermentación establecidas. En la recuperación primaria se logró mejorar el rendimiento de la lisis alcalina mediante el uso de agitación moderada y se estableció una secuencia de filtración-microfiltración en serie. Mediante diafiltración en membranas de 10,000 NMWL se logró recuperar, concentrar y purificar parcialmente la solución de plásmido.

En la purificación cromatográfica del plásmido, el gradiente de elución utilizado consiguió la elución diferenciada de los diferentes tipos de ácidos nucleicos presentes en el lisado, separando claramente la elución del ARN contaminante y el ADNp.

Se realizaron varios estudios de escalamiento sobre el escalamiento del proceso mediante simulación por computadora con el software SuperPro Designer. En los estudios realizados se utilizó como base de comparación el Proceso I reportado en la literatura. El proceso desarrollado en el laboratorio fue escalado, Proceso II, demostrándose su factibilidad técnico-económica. Se validó la utilización de la fermentación continua en la simulación del Proceso I, logrando obtener los resultados reportados, Proceso III. El Proceso IV desarrollado finalmente, presentó los mejores índices de evaluación económica.

5.2 Recomendaciones

Se ha propuesto el Proceso IV, basado en la experiencia y el conocimiento, sin embargo, no ha sido probado experimentalmente y se recomienda se profundice en su análisis a través de la experimentación, optimización y evaluación económica detallada. Se recomienda que la evaluación económica atienda a demandas específicas del mercado, así como a los costos y disposiciones fiscales en México.

CAPITULO 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; Prazeres, D. M. F. Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1069, 3–22.
2. Branovic, K.; Forcic, D.; Ivancic, J.; Strancar, A.; Barut, M.; Kosutic, T.; Zgorelec, R.; Mazuran, R. Application of short monolithic columns for fast purification of plasmid DNA. *J. Chromatogr. B* **2004**, 801, 331-337.
3. Latulippe, D.; Ager, K.; Zydney, A. Flux-dependent transmission of supercoiled plasmid DNA through ultrafiltration membranes. *J. Membrane Scien.* **2007**, 294, 169–177.
4. Carnes, A.; Hodgson, C.; Williams, J. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2006**, 45, 155–166.
5. Ferreira, G. Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination. *Chem. Eng. Technol.* **2005**, 28, 1285-1294.
6. Sandberg, L.M.; Nilsson, P.; Hakansson, A.; Vasi, J.; Lemmens, R. Scale up of a cost-effective and generic purification process for plasmid DNA. *Life Science News* **2004**, 16, 16-17.

7. Schalk, J.; Mooi, F.; Berbers, G.; van Aerts, L.; Ovelgönne, H.; Kimman, T. Preclinical and Clinical Safety Studies on DNA Vaccines. *Human Vaccines* **2006**, 2, 45-53.
8. Kelly, W. Perspectives on plasmid-based gene therapy: challenges for the product and the process. *J. Applied. Biochem.* **2003**, 37, 219 – 223.
9. Journal of Gene Medicine, **2008**. <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
10. Ferreira, G.; Monteiro, G.; Prazeres, M.; Cabral, J. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *R. TIBTECH* **2000**, 18, 380-388.
11. Schleef, M.; Schmidt, T. Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *J. Gene Med.* **2004**, 3, 45 – 53.
12. Prazeres, M.; Schlupe, T.; Cooney, C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anionexchange chromatography *J. Chromatogr. A* **1998**, 806, 31-45.
13. Cooke, J.; McKie, E.; Ward, J.; Keshavarz-Moore, E. Impact of intrinsic DNA structure on processing of plasmids for gene therapy and DNA vaccines. *J. Biotechnol.* 2004, 114, 239 – 254.
14. Dumonteil, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J. Biomed. Biotechnol.* **2007**, 1155-1166.
15. Madriz, X.; Martínez, M.B.; Rodríguez, M.A.; Sierra, G.; Martínez-López, C.; Riverón, A.M.; Flores, L.; Orozco, E. Expression in fibroblast and in live

- animals of *Entamoeba histolytica* polipeptides EhCP112 and EhADH112. *Microbiol.* **2004**, 150, 1251-1260
16. Eon-Duval, A.; Burke, G. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatog. B* **2004**, 804, 327-335.
17. Prather, K.; Sagar, S.; Murphy, J.; Chartrain, M. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzim. Microb. Technol.* **2003**, 33, 865-883.
18. Diogo, M.; Queiroz, J.; Monteiro, A.; Martins, A.; Ferreira, G.; Prazeres, M. Purification of a Cystic Fibrosis Plasmid Vector for Gene Therapy Using Hydrophobic Interaction Chromatography. *BIOTECHNOL. BIOENGINEER.* **2000**, 68, 576-583.
19. Mwau, M.; Cebere, I.; Sutton, J.; Chikoti, P.; Winstone, N.; Wee, E.; Beattie, T.; Chen, Y.; Dorrell, L.; McShane, H.; Schmidt, C.; Brooks, M.; Patel, S.; Roberts, J.; Conlon, C.; Rowland-Jones, S.; Bwayo, J.; McMichael, A.; Hanke, T. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J. Gener. Virolog.* **2004**, 85, 911-919.
20. Clemson, M.; Kelly, W. Optimizing alkaline lysis for DNA plasmid recovery. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2003**, 37, 235-244.
21. Wahlund, P.; Gustavsson, V.; Izumrudov, P.; Larsson, P.; Galaev, Y. Precipitation by Polycation as Capture Step in Purification of Plasmid DNA From a Clarified Lysate. *BIOTECHNOL. BIOENGIN.* **2004**, 87, 675-684.

22. Frerix, A.; Müller, M.; Kula, M.; Hubbuch, J. Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2005**, *42*, 57–66.
23. Stadler, J.; Lemmens, R.; Nyhammar, T. Plasmid DNA purification. *J. Gene Med.* **2004**, *6*, 54–66.
24. Prazeres, M.; Ferreira, G. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemic. Engineer. Process.* **2004**, *43*, 615–630.
25. Urthaler, J.; Ascher, C.; Wöhrer, H.; Necina, R. Automated Alkaline Lysis for Industrial Scale cGMP Production of Pharmaceutical Grade Plasmid-DNA. *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 132–149.
26. Meacle, F.; Lander, R.; Shamlou, P.; Titchener-Hooker, N. Impact of Engineering Flow Conditions on Plasmid DNA Yield and Purity in Chemical Cell Lysis Operations. *BIOTECHNOL. BIOENGINEER.* **2004**, *87*, 293-302.
27. Hoare, M.; Levy, S.; Bracewell, D.; Doig, S.; Kong, S.; Titchener.Hooker, N.; Ward, J.; Dunnill, P. Bioprocess Engineering Issues That Would Be Faced in Producing a DNA Vaccine at up to 100 m³ Fermentation Scale for an Influenza Pandemic. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1577-1592.
28. Montesinos, R.; Tejada-Mansir, A.; Guzmán, R.; Ortega, J.; Schiesser, W. Analysis and Simulation of Frontal Affinity Chromatography of Proteins. *Separat. Purific. Technol.* **2005**, *42*, 75–84.
29. Tseng, W.; Fu-Lyn, H.; Fang, T.; Suen, S. Effect of Alcohol on Purification of Plasmid DNA Using Ion-exchange Membrane. *J. Membr. Scien.* **2004**, *223*, 161–167.

30. Urthaler, J.; Schlegl, R.; Podgornik, P.; Strancar, A.; Jungbauer, A.; Necina, R. Application of Monoliths for Plasmid DNA Purification Development and Transfer to Production. *J. Chromatog. A* **2005**, 1065, 93–106.
31. Montesinos-Cisneros, R.; De la Vega, J.; Ortega, J.; Guzmán, R.; Tejeda-Mansir, A. Breakthrough Performance of Plasmid DNA on Ion-Exchange Membrane Columns *Biotechnol. Prog.* **2007**, 23, 881-887.
32. Haber, C.; Skupsky, J.; Lee, A.; Lander, R. Membrane Chromatography of DNA: Conformation-Induced Capacity and Selectivity. *BIOTECHNOL. BIOENGINEER.* **2004**, 81, 26-34.
33. Freitas, S.; Azzoni, R.; Santos, J.; Monteiro, G.; Prazeres, M. On the Stability of Plasmid DNA Vectors During Cell Culture and Purification. *Mol. Biotechnol.* **2007**, 36, 151-158.
34. Jakobsson, N.; Karlsson, D.; Axelsson, J.; Zacchi, G.; Nilsson, B. Using Computer Simulation to Assist in the Robustness Analysis of an Ion-exchange Chromatography Step. *J. Chromatog. A* **2005**, 1063, 99–109.
35. Arifeen, N.; Wang, R.; Kookos, I.K.; Webb, C.; Koutinas, A. Process Design and Optimization of Novel Wheat-based Continuous Bioethanol Production System. *Biotechnol. Prog.* **2007**, Published on Web.
36. Freitas, S.; Santos, J.; Prazeres, M. Plasmid DNA. 270-285. En: Heinzle, E.; Biwer, P.; Cooney, C. *Development of Sustainable Bioprocesses Modeling and Assessment*. John Wiley & Sons, Ltd. **2006**.

37. Shuler, M.L.; Kargi, F. Bioprocess Engineering Basics Concepts. *Prentice Hall PTR. Second edition 2002.*
38. Carnes, A. Fermentation Design for the Manufacture of Therapeutic Plasmid DNA. *BioProc. Internat. 2005, 2-7.*
39. Theodossiou, I.; Collins, J.; Ward, M.; Thomas, T.; Dunnill, P. The Processing of a Plasmid-based Gene from *E. coli*. Primary Recovery by Filtration. *Bioprocess and Biosystem Engineering 1997, 16, 175-183.*

APÉNDICE A

Publicaciones y Reconocimientos Generados

Breakthrough Performance of Plasmid DNA on Ion-Exchange Membrane Columns

Rosa Ma. Montesinos-Cisneros,[†] Jonathan de la Vega Olivas,[‡] Jaime Ortega,[§] Roberto Guzmán,^{||} and Armando Tejada-Mansir^{*-1}

Departamento de Matemáticas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México CP 83000, Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México CP 83000, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Avenida IPN No. 2508, México, D.F. CP 07360, México, Chemical and Environmental Engineering Department, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, and Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Apartado Postal 593, Hermosillo, Sonora, México CP 83000

Breakthrough performance of plasmid DNA adsorption on ion-exchange membrane columns was theoretically and experimentally investigated using batch and fixed-bed systems. System dispersion curves showed the absence of flow non-idealities in the experimental arrangement. Breakthrough curves (BTC) were significantly affected by inlet flow rate and solute concentration. In the theoretical analysis, a model was integrated by the serial coupling of the membrane transport model and the system dispersion model. A transport model that considers finite kinetic rate and column dispersed flow was used in the study. A simplex optimization routine, coupled to the solution of the partial differential model equations, was employed to estimate the maximum adsorption capacity constant, the equilibrium desorption constant, and the forward interaction rate constant, which are the parameters of the membrane transport model. The analysis shows that as inlet concentration or flow rate increases, the deviation of the model from the experimental behavior decreases. The BTCs displacement as inlet concentration increases was explained in terms of a greater degree of column saturation reached and more efficient operation accomplished. The degree of column saturation was not influenced by inlet flow rate. It was necessary to consider in the column model the slight variation in the BTC produced by the axial dispersion, in order to accomplish the experimental curve dispersion. Consequently, the design criteria that for $Pe > 40$ the column axial dispersion can be neglected should be taken with precaution.

Introduction

The demand for efficient production methods of plasmid DNA (pDNA) has increased vastly in response to rapid advances in the use of pDNA in gene therapy and vaccines. A prerequisite for the success of these therapies is the development of cost-effective and generic production processes of pDNA (1, 2). In the process synthesis, high-resolution steps such as column chromatography are considered essential to achieve the high purity requirements for this type of products (3–5). Among the different chromatography modes available for plasmid purification, anion-exchange membrane chromatography has received considerable attention recently (6–10).

Membrane columns can operate in convective mode, which can significantly reduce diffusion limitations commonly encountered in conventional commercial processes using beads. Besides numerous systems for laboratory-scale applications, modular systems of membrane adsorbers for a technical scale in pharmaceutical downstream processing have been reported

(7, 11, 12). Numerous comprehensive reviews discuss the fundamentals and applications of membrane chromatography (13–20).

Sharp breakthrough curves (BTCs) are obtained in membrane chromatography of small proteins (21–24). However, pronounced asymmetric BTCs have been reported for large proteins (24–26). Recently, an analogous BTC asymmetric behavior was reported for pDNA membrane chromatography (27). The steric hindrance and spreading models have been used to explain these results (28). In these studies very dilute feed solutions were used; furthermore, in three of the cases (including the pDNA study (27)) an extremely low residence time in the membrane system was also used. According to Chase (29) this type of operating condition contributes to BTC broadening. In a recent study sharp BTCs up to values of $c/c_0 = 0.8$ were reported for pDNA adsorption on ion-exchange membranes. The dynamic capacity for pDNA was found to be highly dependent on flow rates and concentrations (30).

The literature suggests that the frontal adsorption mechanism of DNA in membrane columns is more complex than the corresponding mechanism for proteins and that it is necessary to have a better understanding of the fundamental mechanisms underlying such chromatographic processes. We hypothesized that a study of the hydrodynamic and adsorption behavior of pDNA in a well-designed membrane system using a theoretical–experimental approach, may contribute to this understanding.

* To whom correspondence should be addressed. Ph: +52 (662) 259 21 69. Fax: +52 (662) 259 2197. Email: atejeda@guayacan.uson.mx.

[†] Departamento de Matemáticas, Universidad de Sonora.

[‡] Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora.

[§] CINVESTAV-IPN.

^{||} University of Arizona.

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora.



**La División de Ciencias Biológicas y de la Salud
y el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas
de la Universidad de Sonora**

Otorgan la presente

Constancia

Al Ing. Jonathan de la Vega Olivas por su participación con la ponencia:

Escalamiento de procesos de producción de plásmidos

**En el Coloquio de Tecnología de Plásmidos:
producción de vacunas y terapia génica**

"El Saber de mis Hijos Hará mi Grandeza"

**Dr. Carlos E. Peña Limón
Jefe del Departamento**

**Dr. Samuel Galaviz Moreno
Director de la División**

Hermosillo, Sonora. Mayo de 2007





CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA


A QUIEN CORRESPONDA.

Por medio la presente me permito hacer constar que el **Ing. Jonathan de la Vega Olivas**, realizó una estancia de investigación del 12 al 23 de febrero de 2007, en Laboratorio de Biotecnología de Proteínas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, IPN. Durante este período se realizaron experimentos dentro del proyecto de *"Producción, cosecha y purificación del plásmido pc-DNA-Ehcp112"*

Se extiende la presente a los trece días del mes de abril de dos mil siete para los fines que a la interesada convengan.

Muy Atentamente


 Dr. Jaime Ortega López,
 Profesor Titular y Responsable del
 Laboratorio de Biotecnología de Proteínas


 CENTRO DE INVESTIGACION
 Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
 DEL IPN
 13 2007 ☆
 BIOTECNOLOGIA
 Y BIOINGENIERIA
 CINVESTAV-QUERETARO

JOL/az