



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y METALURGIA

MODELACIÓN DE LA ETAPA DE RECUPERACIÓN INTERMEDIA DE DNA
PLASMÍDICO MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN DE FLUJO TANGENCIAL

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

Jesús Iván Manzano García

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

VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 07 de Octubre de 2013.

M.C. JESÚS LEONEL SERVÍN RODRÍGUEZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO
INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional "MODELACIÓN DE LA ETAPA DE RECUPERACIÓN INTERMEDIA DE DNA PLASMIDÍCO MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN DE FLUJO TANGENCIAL", presentada por:

JESÚS IVÁN MANZANO GARCÍA

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

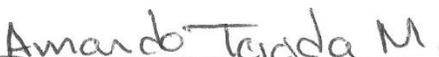
Ingeniero Químico

07/oct/13
Fecha



DRA. PATRICIA GUERRERO GERMAN

07/oct/13



DR. ARMANDO TEJEDA MANSIR

07/oct/13



M.C. GILBERTO GARCÍA NAVARRETE

07/oct/13



M.A. ALEJANDRO SALINAS ECHEVERRÍA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco respetuosamente a la Universidad de Sonora por brindarme la oportunidad de ser parte de esta reconocida institución, en particular al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia muy en especial a los maestros que han sido parte fundamental en esta etapa de formación profesional, que sin su guía y conocimientos, sería imposible lograr lo alcanzado.

Para la realización de este proyecto, resalto la participación del Programa para el Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) quien en una primera etapa, hizo posible la compra de equipo de laboratorio necesario para realizar la experimentación. De igual manera agradezco el apoyo económico que me fue otorgado por esta institución, en una primera etapa y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante la segunda parte de este proyecto.

El Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), fue el que me abrió las puertas para el llevar a cabo la etapa experimental. Al profesor responsable del laboratorio, el Dr. Armando Tejeda, le agradezco por el espacio, el tiempo, conocimientos y consejos que me fueron brindados por su parte.

A la Dra. Patricia Guerrero le agradezco la confianza brindada, el tiempo que le ha dedicado a este proyecto y los apoyos recibidos por su parte, que sin ellos jamás hubiera sido posible alcanzar las metas que nos planteamos durante el desarrollo de este proyecto.

A mi comité de tesis, conformado por el M.C. Gilberto García y el M.C. Alejandro Salinas, por su apoyo y contribuciones brindadas.

A mis compañeros en el Laboratorio de Bioprocesos, por estar a mi lado durante los largos experimentos que se llevaron a cabo, a Rodolfo, Cindy, Adriana, Diana y Alonso, muchas gracias. Espero seguir compartiendo con ustedes en las etapas posteriores.

A mis compañeros de generación que se convirtieron en parte fundamental en esta etapa de mi vida, quienes acompañaron al estudiante y contribuyeron a formar al profesionista. Sin ellos, hubiese sido muy difícil llevar el día a día de la vida universitaria. A Manuel, Rafael y Pablo quienes han estado en las buenas y las malas, siempre brindando una buena cara y con la mejor de las intenciones.

Finalmente, pero, más significativamente agradezco a mi Familia, quienes han moldeado con sus enseñanzas y sus ejemplos la persona que soy hoy en día. En especial a mis padres, Jesús y Olivia, por haberme traído al mundo y haber estado a mi lado durante todo este tiempo. A mi tío Luis Enrique, por su ejemplo y consejos brindados a lo largo de mi vida. Muy en especial a mi abuela Cecilia, mis tías Ana Cecilia y Gabriela por haberme abierto las puertas de su casa y haber hecho de él un hogar para mí. A Luisana muy en particular te agradezco el estar a mi lado, tu paciencia y comprensión, así como el apoyo que me has entregado durante el tiempo que hemos estado juntos.



A Ana, Cecy y Gaby.

RESUMEN

La necesidad de obtener un proceso de producción de plásmido de la más alta calidad, para ser utilizado en terapia génica y vacunación, ha llevado a la realización de estudios detallados de cada una de las etapas de este proceso.

En el presente trabajo se estudia la etapa de recuperación intermedia, la cual es llevada a cabo por la operación de Ultrafiltración de Flujo Tangencial. Esta es una operación escalable y sencilla de realizar que cuenta con la ventaja de no utilizar solventes químicos ni enzimáticos de origen animal.

Su principio en separación está basado en la diferencia de tamaños, lo que garantiza la separación de las moléculas de plásmido DNA de algunos de los contaminantes presentes como el RNA, las cuales son partículas más pequeñas y logran atravesar la membrana de filtración.

Para la realización de los estudios se estableció un sistema experimental de ultrafiltración con una membrana de 300 kDa, la cual es recomendada para la separación de plásmidos de hasta 15 kbp. Con este sistema se filtraron muestras de lisados clarificados de concentración conocida, para la obtención de parámetros de operación indispensables en el escalamiento del proceso.

De igual manera se determinaron los parámetros óptimos para diafiltración, la cual es una operación de suma importancia en el proceso de obtención del plásmido, ya que nos permite realizar el intercambio de buffer para garantizar la correcta operación de las etapas de alta resolución.

Finalmente por medio de un análisis cualitativo y cuantitativo de muestras filtradas y retenidas, se corrobora la presencia del plásmido en el sistema, así como se descartó el traspaso de estas macromoléculas a través de la membrana.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS	X
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivo General	2
1.4 Objetivos Específicos	2
CAPÍTULO II.....	3
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1 Terapia génica y vacunación	3
2.2 Proceso de Obtención de Plásmido.....	5
2.2.1. Propagación y cosecha celular.....	6
2.2.2. Rompimiento celular y clarificación	7
2.2.3. Recuperación intermedia	7
2.2.4. Purificación final	8
2.2.5. Control de calidad.....	11

2.3 Teoría de la Ultrafiltración	13
2.3.1. Modos de operación	15
2.3.2. Modelación de la operación de ultrafiltración	17
2.3.3. Optimización de la operación de la diafiltración	20
2.3.4. Incrustación de la membrana (fouling).....	21
2.3.5. Tendencias en la ultrafiltración	21
 CAPÍTULO III	 23
 MATERIALES Y MÉTODOS	 23
 3.1 Materiales	 23
3.2 Equipos.....	24
3.3 Metodología	28
3.3.1. Determinación de la resistencia de la membrana en el sistema experimental de ultrafiltración	29
3.3.2. Efecto de la concentración de la solución de plásmido sobre el flux	30
3.3.3. Ultrafiltración en modo batch	33
3.3.4. Análisis de muestras	34
 CAPÍTULO IV.....	 36
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 36
4.1 Determinación de la resistencia de la membrana del sistema experimental de ultrafiltración	36
4.2 Efecto de la concentración de la solución de plásmido sobre el flux	38
4.3 Análisis de la ultrafiltración en modo batch.....	43
 CAPÍTULO V	 46
 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	 46
5.1 Conclusiones.....	46
5.2 Recomendaciones.....	47
 CAPÍTULO VI.....	 48
 BIBLIOGRAFÍA	 48

ANEXOS	50
Anexo A. Curva Patrón para Cálculo de Concentración de pVAX1-NH36.	50
Anexo B. Protocolo de limpieza de la membrana de ultrafiltración GE	51
Anexo C. Tablas de registro de datos experimentales	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso Genérico De Producción De pDNA.....	6
Figura 2. Recuperación intermedia de pDNA de lisados clarificados.	8
Figura 3. Las Diferentes Técnicas De Cromatografía	9
Figura 4. Espectro de filtración.....	13
Figura 5. Modos de operación estándar para ultrafiltración.....	14
Figura 6. Modalidad por Lotes para procesos de ultrafiltración.	16
Figura7. Modalidad Lote Alimentado para procesos de ultrafiltración.	16
Figura 8. Modalidad Diafiltración para procesos de ultrafiltración.....	17
Figura 9. Ejemplo del cálculo de Cg por el método gráfico	20
Figura10. BiorreactorApplikon 3L y Sistema ez-control, Applikon.	24
Figura 11. Centrifuga BiofugeStratos, ThermoScientific.	24
Figura12. Sistema de Ultrafiltración.	25
Figura 13. Espectrofotómetro Lambda 2S, Perkin Elmer.	25
Figura14. Cámara de Electroforesis y MultiDocUnit.	26
Figura 15. Sistema AktaPurifier 10UPC.....	26
Figura 16. Congelador de Alta Capacidad Ultima II Series, ThermoScientific.	26
Figura 17. Diagrama de flujo de experimentación con agua desionizada.....	28
Figura 18. Diagrama de flujo de experimentación con soluciones de lisado lavado.....	28
Figura 19. Sistema de Ultrafiltración para Cálculo de Rm.	29
Figura 20. Sistema de ultrafiltración para lavado de soluciones lisadas.	31
Figura 21. Configuración UF - Concentración Constante.....	32
Figura 22. Modo Concentración a Tasa Constante.....	33
Figura 23. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC	35
Figura 24. Gráfica J en función de Δ TMP para Agua Desionizada.	37
Figura 25. Gel de electroforesis de solución lisado clarificado y lavado.	38
Figura 26. Cromatograma Intercambio de Buffer	39
Figura 27. Modelo del Sistema de Ultrafiltración.....	41
Figura 28. Flux en función de Cb en escala logarítmica.....	41
Figura 29. Gel de Electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando membrana de 300 kDa ...	43
Figura 30. Cromatograma concentración de lisado lavado E1.	44
Figura 31. Cromatograma concentración de lisado lavado E2	45

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las vacunas de DNA. (Ghanem, 2012)	4
Tabla 2. Constituyentes de Lisados de <i>Escherichia Coli</i>	5
Tabla 3. Ventajas, desventajas y aplicación de la técnica HIC.....	9
Tabla 4. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica RPLC.....	10
Tabla 5. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica IEC.....	10
Tabla 6. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica SEC.....	10
Tabla 7. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica AC.	11
Tabla 8. Obtención de parámetros de ajuste para modelo de ultrafiltración.....	40
Tabla 9. Cálculo de C_g	42
Tabla 10. Comparación de las áreas de integración E1	44
Tabla 11. Comparación de las áreas de integración E2	45
Tabla 12. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración con agua desionizada en alimentación ...	52
Tabla 13. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración para la solución C1.....	52
Tabla 14. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración para la solución C2.....	52
Tabla 15. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración para la solución C3.....	53

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

La demanda para la producción de DNA plasmídico (pDNA) se ha visto incrementada en los últimos años debido a los recientes avances en su utilización para terapia génica y vacunas, lo que ha motivado a los productores a reevaluar su metodología de producción. Esto conlleva a realizar un estudio minucioso de cada una de las etapas necesarias para obtener este producto de interés.

Debido a que la etapa de purificación final es la más determinante en el costo de producción, es necesario que en las etapas previas, los volúmenes e impurezas sean reducidos evitando sobrecargas en las etapas de alta resolución. La etapa previa a la purificación es la recuperación intermedia. Actualmente existen algunas opciones a nivel laboratorio para la pre-purificación del pDNA, como la Separación por Dos Fases Acuosa (ATPS) y la Precipitación por Solventes (PP) que han demostrado tener buenos resultados en la remoción de impurezas (Prazeres et al., 2001), sin embargo utilizan grandes cantidades de solventes químicos, alcoholes y sales precipitantes, lo cual eleva considerablemente los costos de operación y/o los solventes a utilizar no son permitidos por las agencias regulatorias, además del impacto ambiental ocasionado por los desechos.

Una opción novedosa y prometedora es la ultrafiltración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) la cual es una operación escalable y sencilla de realizar (Freitas et al., 2009). Además de ofrecer una combinación de alta selectividad y un moderado costo de operación sin la necesidad de agentes químicos (Arkhangelsky et al., 2008). Esta operación consiste en hacer pasar el flujo de alimentación a través de una membrana que retendrá a los compuestos de mayor tamaño como el pDNA (producto de interés) permeando aquellos más pequeños como son las impurezas (RNA, proteínas, endotoxinas, etc.).

Sin embargo, por tratarse de una aplicación relativamente nueva hay muchas preguntas abiertas, sobre cómo influyen en la retención del DNA las condiciones de operación, incluyendo pH y fuerza iónica. En el presente trabajo se desarrolla un estudio sobre la influencia de los distintos factores que interactúan durante la operación de dicha etapa.

1.2 Justificación

La utilización de grandes cantidades de solventes químicos, durante la etapa de recuperación intermedia en la producción de DNA plasmídico acrecienta los costos y puede presentar sobrecargas en las etapas posteriores de alta resolución. Por otra parte la utilización de precipitantes enzimáticos de origen animal, para la eliminación de impurezas no es permitida por las agencias regulatorias. La ultrafiltración de flujo tangencial se presenta como una técnica económicamente viable y escalable que nos permite eliminar una gran cantidad de impurezas, reducir volúmenes e inclusive realizar un intercambio de buffer que facilita la aplicación de las técnicas de cromatografía disponibles.

1.3 Objetivo General

Estudiar la recuperación intermedia de DNA plasmídico a partir de lisados clarificados *E. coli* por ultrafiltración de flujo tangencial.

1.4 Objetivos Específicos

- Determinar la resistencia de la membrana de ultrafiltración a partir del sistema experimental con soluciones modelo.
- Estudiar el efecto de la concentración de la solución de plásmido sobre el flux en sistemas de concentración constante.
- Determinar el coeficiente de transferencia de masa y la concentración de polarización.
- Obtención de los parámetros óptimos de la operación del sistema.
- Efectuar los análisis de calidad del plásmido en un sistema de ultrafiltración en modo batch, por medio de electroforesis y cromatografía líquida de alta resolución.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Terapia génica y vacunación

Las vacunas tradicionales se basan en la administración de antígenos producidos *ex vivo* a organismos hospederos. Sin embargo en 1993 se descubrió que ratones a los que fue inyectado DNA plasmídico (pDNA) codificando un antígeno viral, podían desarrollar tanto respuestas humorales como celulares, esto vino a desarrollar un nuevo tipo de vacunas (Liu, 1996, Robinson et al., 1997). A este nuevo género se le llamó Vacunas de DNA cuyo nombre fue propuesto y convenido por la World Health Organization durante una convención en mayo de 1994.

La terapia génica consiste en administrar un gen medicinal que codifica una proteína que está ausente o defectuosa. Estos genes, en la vacunación o en la terapia génica, pueden ser transportados por diferentes vectores virales como el adenovirus o el rotavirus, sin embargo se ha encontrado que el pDNA puede ser utilizado como un vector no viral para realizar este transporte (Vacuna de DNA). Esta técnica tiene el potencial para tratar enfermedades como la hemofilia o la fibrosis quística que son causadas por la producción de una proteína disfuncional (Kelly, 2003).

Los plásmidos son moléculas o fragmentos de ácidos nucleicos que aparecen en el citoplasma de algunas procariotas. Se replican de manera independiente al cromosoma y presentan sus propios genes de iniciación de la replicación, pero, dependen de la maquinaria enzimática cromosomal. Varían en tamaño (2 – 200 kbp), siendo menores que el cromosoma principal. Los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero, contienen genes que les confieren ventajas de adaptación como la resistencia a antibióticos, metales pesados y bacteriófagos.

Cada cadena de pDNA es un polímero lineal de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster que presentan carga negativa a $\text{pH} > 4$. La unión de dos cadenas antiparalelas por enlaces de hidrogeno entre los pares de base AT y GC dan forma a la estructura de doble hélice. El interior de esta hélice es altamente hidrofóbico debido al empaqueo de las bases aromáticas, lo cual ha sido aprovechado para etapas de alta resolución y técnicas de cuantificación, ya que brinda una alta selectividad a ciertos ligandos o solventes.

Los ejes de las hélices del pDNA pueden enrollarse en el espacio para dar forma a una estructura de orden superior llamada superenrollada (SC). En algunas ocasiones este enrollamiento es eliminado para dar lugar a la isoforma relajada del DNA circular también llamada circular abierta (OC), en la cual las dos cadenas de DNA se encuentran intactas, pero, relajadas enzimáticamente. Debido a una sobre-alcalinidad de la solución de lisado se pueden presentar otras isoformas del pDNA, como la desnaturalizada, oligomérica y lineal, que son consecuencia del rompimiento de los enlaces fosfodiéster y de hidrogeno que se presentan.

Comparadas con los métodos terapéuticos convencionales, las vacunas de DNA han mostrado ventajas importantes (Tabla 1), de las cuales se puede destacar que con este tipo de tratamiento no hay riesgo de infección y se obtiene una mayor respuesta inmunológica, además las vacunas cuentan con una mayor estabilidad para almacenaje y transporte, lo que se verá reflejado en un costo menor. Otros investigadores han señalado también que con esta técnica se pueden obtener vacunas combinadas, para atacar a distintas enfermedades en una sola aplicación (Manoj et al., 2004, Prazeres y Monteiro, 2007, Ghanem, 2012)

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las vacunas de DNA. (Ghanem, 2012)

Ventajas	Desventajas
El almacenamiento del DNA es relativamente barato en comparación con los organismos o proteínas que se utilizan en las vacunas convencionales.	Los resultados obtenidos de las pruebas en animales pequeños han sido favorables, sin embargo al tratar de escalar a especies más grandes se han presentado complicaciones.
Producen una respuesta inmunológica más fuerte que las vacunas convencionales	No pueden ser utilizadas para antígenos no basados en proteínas
Estabilidad de la vacuna para almacenaje y transporte	Riesgo de afectar genes que controlan el crecimiento celular.
No hay riesgo de infecciones virales.	
Fácil desarrollo y producción	

En los últimos años ha proliferado la investigación, producción y optimización de las vacunas de DNA para la terapia génica esto se puede observar claramente en el trabajo presentado por Ulmer (Ulmer et al., 1996) donde se desarrolla un análisis sobre la rápida expansión del DNA como vector de selección en pruebas de terapia génica, por sobre otros vectores tales como, adenovirus y retrovirus.

Debido a los avances y el tiempo transcurrido desde la experimentación con vacunas de DNA a finales de la década de los 80's, se espera que la primera vacuna de DNA para humanos haga su aparición en el mercado entre los años 2015-2020 (Han et al., 2009). Por ello es necesario implementar técnicas económicamente viables y escalables que nos permitan satisfacer la demanda de mercado que está próxima a presentarse en el panorama mundial.

2.2 Proceso de Obtención de Plásmido

La producción de plásmido de alta calidad comienza con la construcción del vector, siendo ésta gobernada por diversos factores tales como: la selección de la célula hospedera, condiciones y medio de crecimiento así como la técnica de lisado seleccionada. A nivel industrial una mala selección de estos últimos factores, puede guiar al rechazo del lote previo a purificación, debido a que es más barato reiniciar el proceso, que tratar de enmendar el error. Esto último significa pérdidas para la empresa, por lo que se trata de un escenario no deseable y que se debe evitar a toda costa.

Los plásmidos para uso terapéutico son normalmente producidos de manera intracelular en *E. coli* como célula hospedera y los principales contaminantes incluyen endotoxinas, RNA y DNA cromosómico. La remoción de este último es particularmente difícil debido a la gran similitud con nuestro producto de interés. Además de que el DNA plasmídico se encuentra en cantidades menores al 3% de los contenidos totales de las células de *E. coli* (Tabla 2) siendo los contaminantes quienes representan la mayor parte del contenido intracelular y es por ello que se deben de eliminar, para evitar sobrecargas en las etapas de mayor resolución (Schleef y Blaesen, 2009).

Tabla 2. Constituyentes de Lisados de *Escherichia Coli*. Adaptada de Schleef y Blaesen, 2009

Constituyentes de Lisados de <i>E. coli</i>	Contenido
Proteínas	55%
RNA	21%
DNA cromosómico	3%
Lipolisacáridos	3%
DNA plasmídico	3%
Otros	15%
TOTAL	100%

El proceso de producción del plásmido consta de varios pasos, sin embargo, para su estudio se puede dividir en 4 etapas principales en lo que respecta a la ingeniería; Propagación Celular, Recuperación Primaria, Recuperación Intermedia y Purificación Final. Un punto importante a considerar es que todas las operaciones utilizadas deben de ser escalables, económicas y deben cumplir con los requerimientos de las agencias regulatorias. (Arkhangelsky et al., 2008, Marquet et al., 1997, Prazeres et al., 1999).

Es común que las etapas corriente abajo para la producción de proteínas intracelulares en *E. coli* consista en lisis alcalina, flotación, remoción de floculo, purificación intermedia como; precipitación, ultrafiltración o separación por dos fases acuosas. Finalmente una separación por cromatografía. (Kendall et al., 2002, Orr et al., 2012). De acuerdo con Schleef y Blaesen (2009) el diseño de un proceso de producción puede hacer uso de tecnología genérica, por lo menos en plásmidos de hasta 10 kbp.

Las operaciones unitarias que se presentan en la Figura 1 son escalables y una óptima combinación de ellas puede lograr una producción industrial de pDNA para satisfacer la demanda de mercado. A continuación se detallan las diferentes opciones con las que se cuenta actualmente.

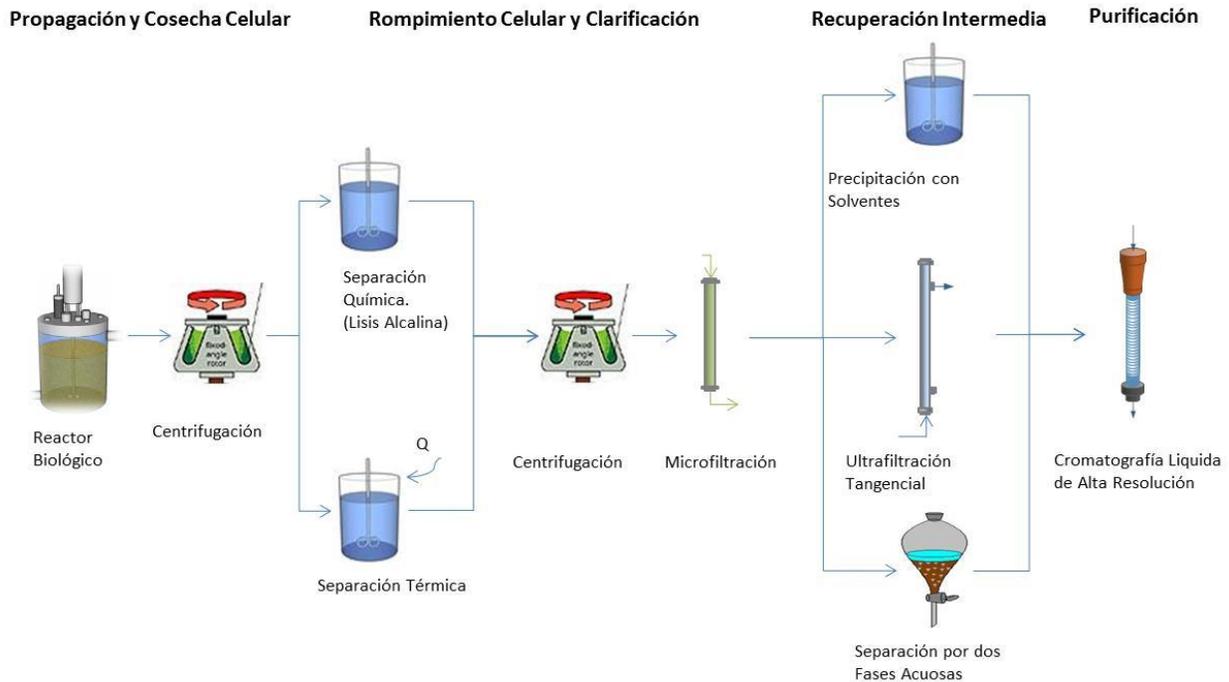


Figura 1. Proceso Genérico De Producción De pDNA. Adaptada De Shamlou, 2003.

2.2.1. Propagación y cosecha celular

Una vez seleccionada la célula hospedera comúnmente *Escherichia coli*, se debe reproducir en grandes cantidades por medio de una fermentación. La meta de esta operación es maximizar la cantidad de DNA superenrollado que se producirá durante la etapa.

A nivel laboratorio es común realizar dicha etapa en matraces aireados dentro de incubadoras. En algunas ocasiones se utilizan reactores de mediana capacidad (3L) y a nivel industrial podemos encontrarlos de hasta 10-12 litros. Estos dos últimos cuentan con sistemas de automatización y controladores de las variables que influyen en la operación (pH, Temperatura, OD, entre otras). Además de las variables ya mencionadas hay otro factor de gran importancia que se debe tomar en cuenta durante esta etapa. Un medio rico en nutrientes principalmente a base de carbono es indispensable para la óptima propagación de la célula en cuestión.

El cultivo de células de *E. coli* es un proceso bastante rápido en comparación con otras cepas. Típicamente con cultivar durante una noche entera es más que suficiente para obtener altas concentraciones de células con una gran cantidad de plásmido. Sin embargo, esto depende de mantener los parámetros correctos de operación. Estas condiciones se logran comúnmente con cultivos por Lote Alimentado (Fed-Batch) (Schleef y Schmidt, 2004).

El caldo que contiene las células con el producto de interés debe ser separado de estas últimas ya que su presencia acrecienta los costos de operación. Para ello se lleva a cabo la una operación de centrifugación (cosecha celular).

2.2.2. Rompimiento celular y clarificación

Cuando el producto de interés es intracelular, es necesario el romper o lizar las células que lo contienen. Actualmente en la industria el rompimiento celular se realiza por métodos mecánicos (como la sonicación y el rompimiento por molino de perlas), lo cual en el caso particular del plásmido no es recomendable ya que el pDNA superenrollado puede ser desnaturalizado permanentemente.(Prazeres et al., 1999).

Los métodos más comúnmente utilizados para llevar a cabo la liberación del pDNA son versiones modificadas de aquellos basados en tratamiento térmico(Holmes y Quigley, 1981) y los que llevan a cabo el rompimiento celular por solubilización de la membrana celular en un detergente contenido en medio alcalino (Birnboim y Doly, 1979).

La lisis alcalina, seguida de una precipitación con altas cantidades de sales es la técnica más popular para la liberación del pDNA. Desde el punto de vista de la ingeniería de las reacciones la lisis celular consiste en la solubilización de la pared celular en la solución de SDS. Sin embargo, al escalar esta técnica se dificulta su operatividad debido a que es difícil alcanzar homogeneidad a lo largo del tanque a causa del rápido incremento en la viscosidad de la muestra lo que ocasiona regiones de alto pH que desnaturaliza al pDNA. Para minimizar estos problemas se han implementados sistemas de mezclado en línea y la utilización de soluciones con baja concentración de NaOH. (Kelly, 2003, Prazeres et al., 1999, Shamlou, 2003).

Posteriormente la separación de los flóculos precipitados del licor que contiene al plásmido, la clarificación, puede ser alcanzada por una o dos operaciones de centrifugación seguida de una microfiltración. (Shamlou, 2003).

2.2.3. Recuperación intermedia

Las opciones más comunes que se presentan para realizar la recuperación intermedia se presentan en la Figura 2; precipitación por solventes y sales, separación de dos fases acuosas y ultrafiltración de flujo tangencial. (TFF, por sus siglas en inglés)siendo esta última una operación escalable y sencilla de realizar (Freitas et al., 2009).

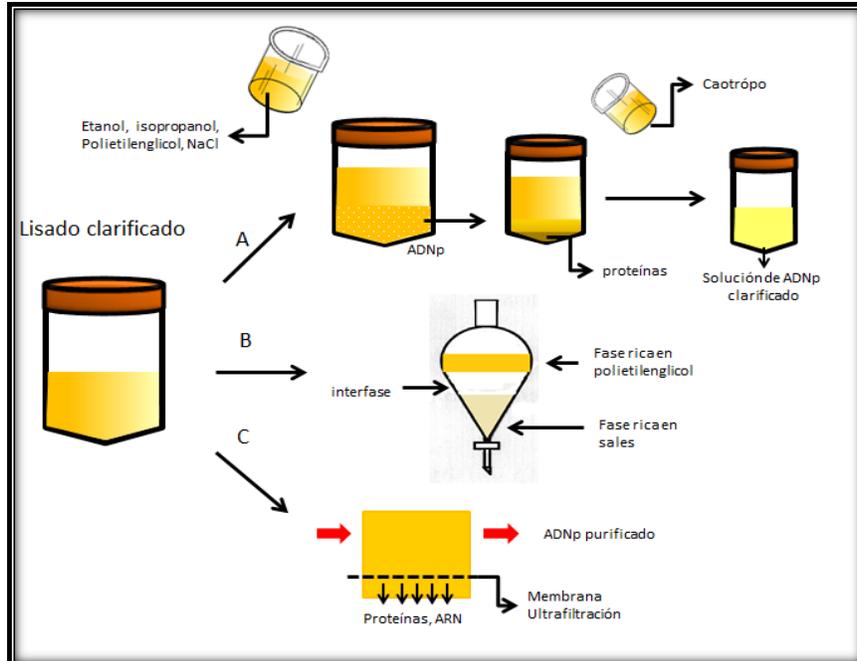


Figura 2. Recuperación intermedia de pDNA de lisados clarificados. Adaptada de Prazeres, 2001.

La operación de TFF consiste en hacer pasar el flujo de alimentación a través de una membrana que retendrá a los compuestos de mayor tamaño como el pDNA (producto de interés) y dejara pasar a los de menor tamaño que son las impurezas, RNA, proteínas, lipolisacáridos, y al mismo medio que los contiene, debido a esto es necesario reponer parte del fluido que contendrá a nuestro producto de interés, por lo que es recomendable sustituir el medio por alguna solución buffer que beneficie a la etapa posterior.

Se ha demostrado con anterioridad que el utilizar un cartucho de fibra hueca, es una manera gentil y rápida de reducir considerablemente el volumen a trabajar principalmente en las operaciones siguientes de purificación y pulimento, que son determinantes en el costo de producción del plásmido. (Stadler et al., 2004)

Otra de las ventajas con las que cuenta la Ultrafiltración de Flujo Tangencial es que ofrece una combinación de alta selectividad y un moderado costo de operación sin la necesidad de agentes químicos (Arkhangelsky et al., 2008), lo cual es bien visto por las agencias regulatorias como la World Health Organization (WHO) y la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA).

2.2.4. Purificación final

La última etapa que corresponde al proceso de obtención del plásmido es la de purificación final. En esta etapa del proceso, la mayoría de las impurezas presentes son RNA, fragmentos de DNA genómico, endotoxinas y variantes del plásmido. La similitud de tamaño entre estas impurezas con el plásmido de interés dificulta a sobremano la realización de esta operación.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es una importante opción para llevar a cabo esta etapa en el proceso de obtención de plásmido debido a su gran selectividad y diversidad, sin embargo, sufre de una baja capacidad de carga, lo que representa un verdadero reto a la hora de escalar el proceso.

En la Figura 3 se pueden observar las diferentes técnicas HPLC disponibles para la separación de biomoléculas y a continuación se describen las ventajas, desventajas y aplicaciones de las distintas técnicas HPLC (Diogo, 2005).

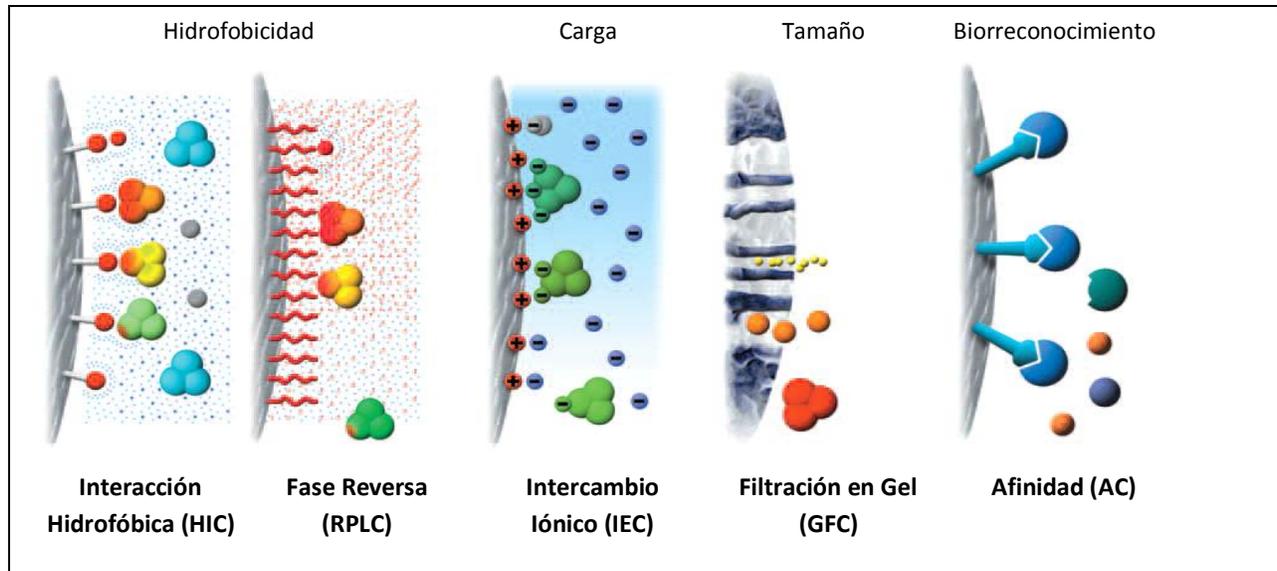


Figura 3. Las Diferentes Técnicas De Cromatografía. Tomada De GE®

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC): Depende de la adsorción reversible de biomoléculas en base a su hidrofobicidad.

Tabla 3. Ventajas, desventajas y aplicación de la técnica HIC.

Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Separa endotoxinas.	En algunos casos el pDNA se eluye en soluciones altamente salinas.	Captura del pDNA.
Algunas variantes separan isoformas del pDNA.	En algunos casos el pDNA eluye ocasionando su dilución.	Análisis Cuantitativo.
Fase móvil suave.		Concentración del pDNA
Técnica relativamente rápida.		

Cromatografía de Fase Reversa (RPLC): La separación depende de la adsorción reversible de biomoléculas de acuerdo a su hidrofobicidad bajo ciertas condiciones donde la fase estacionaria es más hidrofóbica que la fase móvil.

Tabla 4. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica RPLC.

Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Elución del pDNA en un solvente volátil.	Afectación de la integridad del pDNA.	Captura del pDNA.
Separa una gran cantidad de impurezas	Utilización de solventes.	Análisis Cuantitativo.
Separa una gran cantidad de impurezas.	Largos tiempos de operación	
Separa las distintas isoformas		

Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC): se basa en la adsorción reversible de moléculas cargadas a grupos de iones intercambiables de carga opuesta inmovilizados en una matriz.

Tabla 5. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica IEC.

Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Concentración del pDNA.	La resolución del pDNA superenrollado y el gDNA se ve dificultada.	Captura del pDNA.
Rápida y Sencilla.	Co-elución del pDNA con endotoxinas y RNA de alto P.M.	Concentración del pDNA.
Remoción eficiente de impurezas de baja densidad de carga.	Baja Capacidad	Análisis Cuantitativo.
Algunas variantes separan isoformas del pDNA.	Elución de pDNA en soluciones altamente salinas.	

Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC): Como su nombre lo dice, la separación está gobernada por la diferencia de tamaño en las biomoléculas.

Tabla 6. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica SEC.

Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Separa endotoxinas, gDNA, RNA de alto y bajo P.M., oligonucleótidos y proteínas.	Bajos volúmenes y concentración de alimentación.	Pulimiento final del producto.
Fracciona las isoformas del pDNA	Largos tiempos de operación.	Remoción de endotoxinas.
	Dilución del producto.	Fraccionamiento de isoformas
	Escalamiento limitado.	Separación de grupos.

Cromatografía de Afinidad (AC): Se fundamenta en la adsorción reversible de biomoléculas a través de interacciones bioespecíficas en el ligando.

Tabla 7. Ventajas, Desventajas Y Aplicación De La Técnica AC.

Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Separa el pDNA en sus distintas isoformas.	La elución se lleva a cabo en soluciones altamente salinas.	Captura del pDNA.
Concentración de pDNA	Costo.	Concentración del pDNA.
Altamente específica.	Baja versatilidad.	
Se realiza en un solo paso.	Baja capacidad.	

Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) y la de Intercambio Iónico (IEC, por sus siglas en inglés), parecen ser las más prometedoras técnicas para utilizarse a gran escala en el proceso de purificación de plásmido (Prazeres et al., 1999). La selección de la técnica de HPLC a utilizar depende de diversos factores como: el económico, la calidad del plásmido requerida y en algunas ocasiones el buffer en que está contenido el plásmido. Se ha reportado últimamente que los problemas que presentan estas técnicas de cromatografía pueden ser reducidos considerablemente al utilizar una configuración en la que se integran dos o tres de estas técnicas, tomando ventaja de su propiedad de selectividad (Stadler et al., 2004, Shamlou, 2003, Urthaler J, 2005).

2.2.5. Control de calidad

El pDNA de grado farmacéutico a escala industrial debe alcanzar tres requerimientos principales: el pDNA debe ser de la más alta pureza, libre de gDNA, RNA, proteínas, endotoxinas y otras impurezas relativas a la bacteria; el pDNA debe ser altamente homogéneo, principalmente de la isoforma superenrollada; por último el proceso de purificación debe ser factible económicamente hablando, escalable y de la más alta calidad, todo esto es logrado con el establecimiento de puntos de control a lo largo del proceso (Ghanem, 2012, Urthaler J, 2005).

En los Estados Unidos los productos genéticos para terapia son regulados por la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) especialmente por su Centro para la Investigación y Evaluación de Biológicos (CBER, por sus siglas en inglés). Mientras que en Europa estas tareas son realizadas por la Evaluación de Productos Médicos (EMA, por sus siglas en inglés). Las recomendaciones propuestas por estas agencias proveen un control de calidad además de un criterio de seguridad para cada uno de los productos genéticos.

Para satisfacer los lineamientos de estas agencias, el producto debe ser de alta pureza de preparaciones homogéneas de pDNA superenrollado además de estar libre de gDNA (<10ng), proteínas (<10ng), RNA (no detectado en electroforesis en gel de agarosa), endotoxinas o lipolisacáridos (LPS) (<1EU/kg) y virus eliminados o inactivados (Prazeres, 1998).

La electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio es el método analítico más utilizado y relativamente rápido ya que permite la comparación cualitativa de varias muestras al mismo tiempo, siendo analizadas paralelamente en una sola corrida (Stadler et al., 2004).

Recientemente se han desarrollado algunos métodos cromatográficos para la cuantificación de pDNA y sus diferentes isoformas para el control de pureza en la solución procesada. Diogo (Diogo, 2003) implementó la técnica HIC para la cuantificación de pDNA total. Por otra parte Bennemo (Bennemo, 2009) utilizó una combinación de la técnica SEC y TAC con la cual se puede obtener la concentración de las diferentes isoformas presentes en la solución problema.

Estas técnicas constituyen una alternativa viable a los métodos robustos utilizados actualmente logrando una precisión inclusive mayor a la de la electroforesis, contando con coeficientes de desviación menores al 2%.

2.3 Teoría de la Ultrafiltración

La ultrafiltración (UF) es un proceso de separación por membrana basado en el tamaño de partículas conducido por un diferencial de presión. Las membranas de ultrafiltración cuentan con tamaños de poro de 0.001 a 0.1µm (Fig. 4) y son capaces de retener especies en un rango de tamaño de 300 a 1,000,000 Da (Charcosset, 2012), este último parámetro es conocido también como Peso Molecular de Corte (PMC) y es utilizado para la caracterización de las membranas.

(http://www.wasserlab.com/media/wasserlab-espectro-filtracion_191.gif)

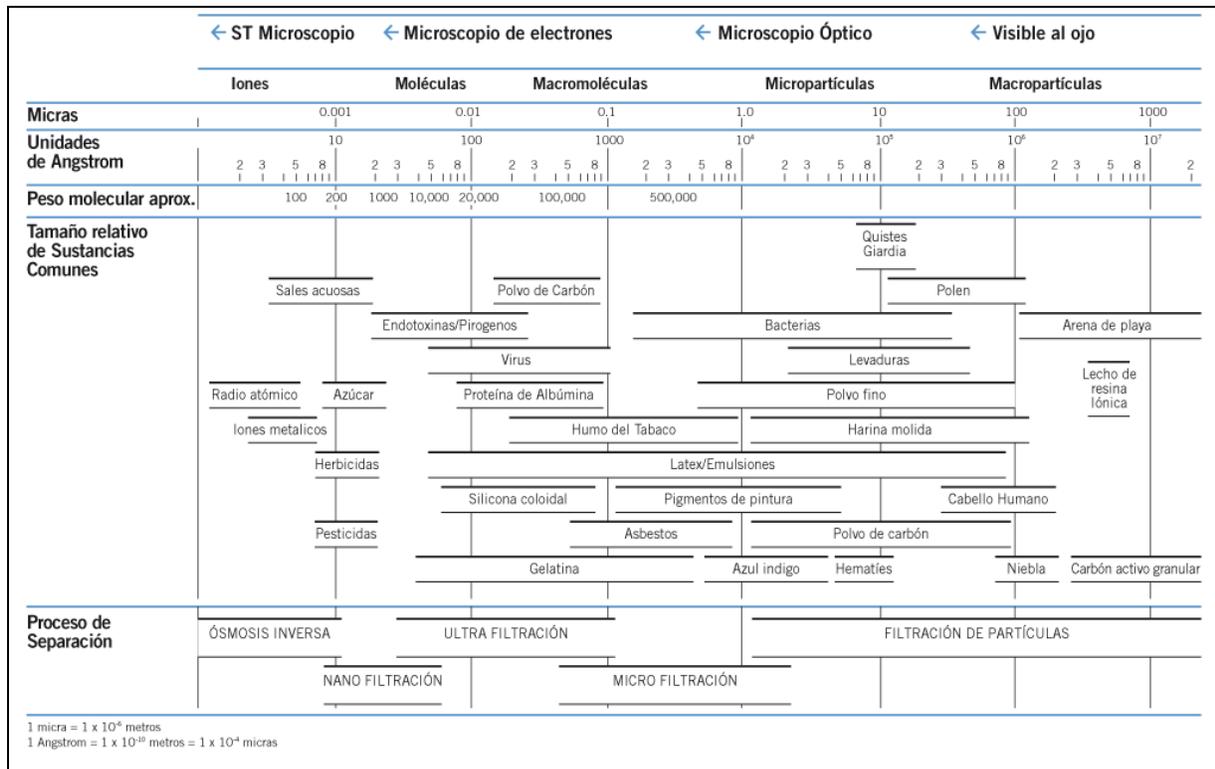


Figura 4. Espectro de filtración. Wasserlab®

Tradicionalmente la ultrafiltración es identificada como una operación unitaria que esta inherentemente limitada a la separación de solutos que se diferencian entre sí por más de 10 veces en tamaño. Esto ha limitado la aplicación de esta en el campo biotecnológico en tres principales aplicaciones: Separación de Células-Proteínas, Virus-Proteínas e intercambio de buffer (van Reis, 1997).

No por ello deja de ser una operación unitaria reconocida en los procesos de separación por membranas. Las distintas configuraciones incluyen cartuchos de fibra hueca, tubulares, platos planos, entre otras. Los dos modos de operación estándar son flujo paralelo y cruzado o tangencial (Fig. 5). En este último el fluido a filtrar fluye de manera paralela a la superficie de la membrana y las partículas más pequeñas son permeadas a través de esta última debido a una diferencia de presión, mientras que las partículas de mayor tamaño que no pueden atravesar la membrana son arrastradas con el flujo de

alimentación siendo recirculadas a lo largo del sistema, con esta configuración se reduce la formación de la torta de filtrado (Charcosset, 2006).

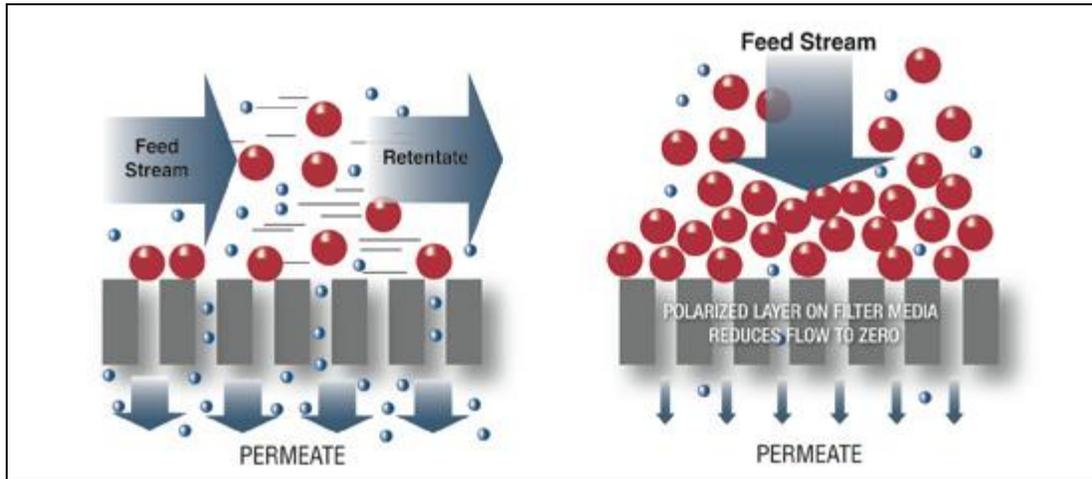


Figura 5. Modos de operación estándar para ultrafiltración. (Izquierda) Filtración de Flujo Tangencial. (Derecha) Filtración de Flujo Paralelo.

La retención del plásmido por las membranas de ultrafiltración depende de diversos factores tales como; (1) el tamaño del DNA, carga superficial y la hidrofobicidad. (2) tamaño de poro de membrana, permeabilidad y la hidrofiliidad. A pesar de esto dichas membranas no proveen una barrera absoluta para la retención de DNA. Y aunque los procesos de separación basados en membranas han demostrado su potencial en la purificación de plásmido, sigue siendo una aplicación relativamente nueva y aún hay una discrepancia considerable al respecto de cómo influyen estos factores en la retención del DNA. (Arkhangelsky et al., 2008, Latulippe et al., 2007)

De acuerdo con Shamlou (Shamlou, 2003) una membrana con un PMC de 300 kDa es recomendado para plásmidos en un rango de tamaño entre 2 y 15 kbp. Para plásmidos en rangos superiores (15-50kbp) las membranas de 500 kDa han demostrado ser más convenientes.

Sin embargo hay estudios recientes que muestran que el tamaño de poro no parece afectar considerablemente a la transmisión del plásmido, debido a la propiedad de elongación con la que cuenta el plásmido (Ager et al., 2009). Se ha demostrado que la transmisión del plásmido a través de una membrana de ultrafiltración está fuertemente ligada al flux que se maneja durante la operación. Al aumentar el flux de filtrado la transmisión aumenta debido a la elongación provocada por el mismo flujo. (Latulippe et al., 2007).

A un bajo flux de filtrado, el plásmido superenrollado no se ve afectado por este y es excluido de los pequeños poros de la membrana. Sin embargo a un alto flux la molécula de DNA se estrecha debido a su propiedad de elongación y por ello logra atravesar la membrana hasta la solución permeada. (Latulippe y Zydny, 2011).

Otra variedad que se ha presentado en los últimos años es el utilizar membranas negativamente cargadas junto con bajas concentraciones de sal reduciendo significativamente la transmisión del plásmido a través de la membrana, debido a las fuertes interacciones electrostáticas bajo estas condiciones (Ager et al., 2009). Una solución de baja fuerza iónica tiene un efecto solubilizador en la dinámica de formación de la capa de gel sobre la membrana y por ello, permite la separación del RNA del plásmido en base a su diferencia de tamaño (Eon-Duval et al., 2003).

2.3.1. Modos de operación

Los procesos de ultrafiltración a gran escala utilizan la configuración de flujo tangencial en la cual el flujo de alimentación es dirigido de manera paralela a la membrana y perpendicular al flujo de filtrado, es por ello que también se conoce como filtración de flujo cruzado. Esta configuración permite a las especies retenidas recorrer la superficie de la membrana hasta salir del equipo aumentando significativamente el flux del proceso en comparación con aquellos obtenidos en flujo normal.

La principal ventaja de utilizar un sistema de flujo cruzado es la minimización de la acumulación de solutos y partículas cerca de la superficie de la membrana. Este arreglo permite además la recirculación del retenido al tanque de alimentación lo que es conveniente a la hora de mezclar con medio fresco.

La ultrafiltración puede ser operada en diferentes modos, dependiendo de los requerimientos del proceso. Comúnmente estos modos incluyen: batch (lote), fed-batch (lote alimentado), diafiltración y sistemas en cascada. En la configuración batch el volumen total a alimentar está contenido en el tanque de recirculación (Fig. 6). Una configuración fed-batch utiliza un tanque adicional para alimentar el tanque de recirculación (Fig.7). La diafiltración (Fig. 8) utiliza una configuración parecida al fed-batch solo que el segundo tanque contiene una solución o solvente (típicamente buffer) que es añadida al tanque de recirculación simultáneamente con la filtración. Con esto se logra trabajar a volumen constante en el retenido ya que el buffer es añadido a la misma tasa con la que el permeado está saliendo de la membrana.

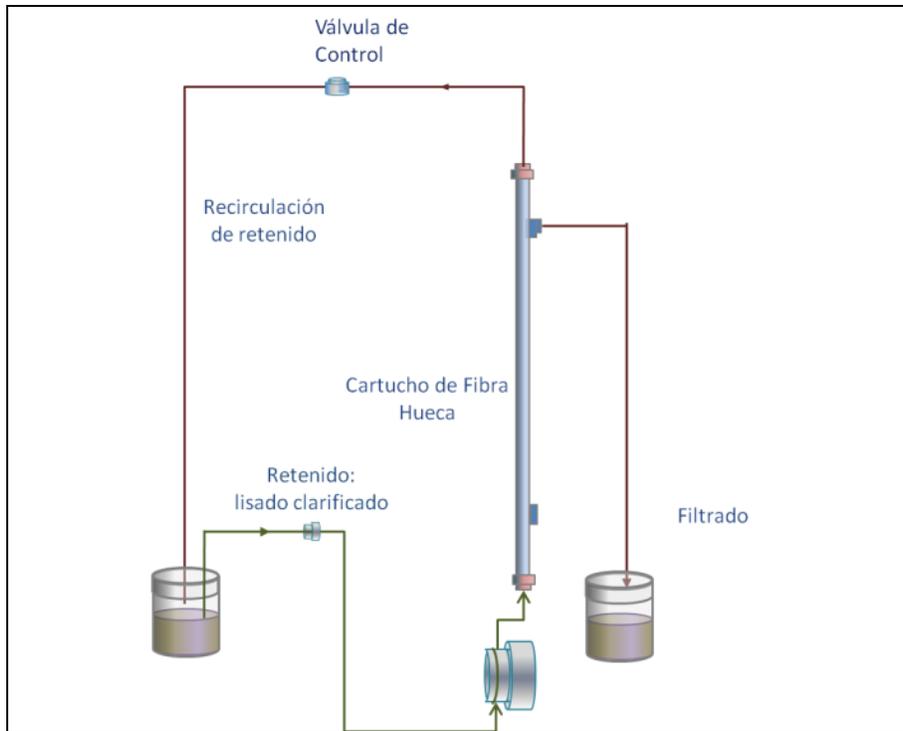


Figura 6. Modalidad por Lotes para procesos de ultrafiltración.

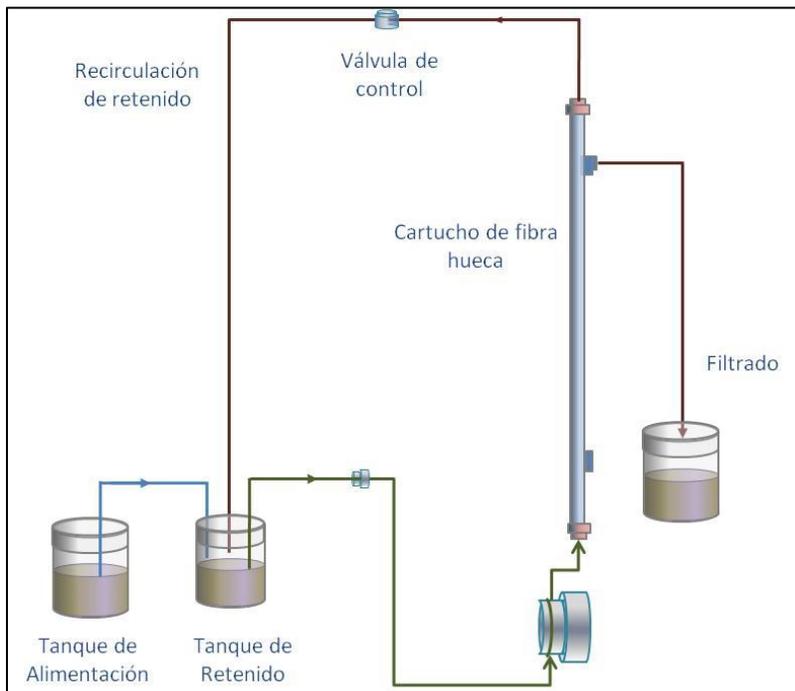


Figura7. Modalidad Lote Alimentado para procesos de ultrafiltración.

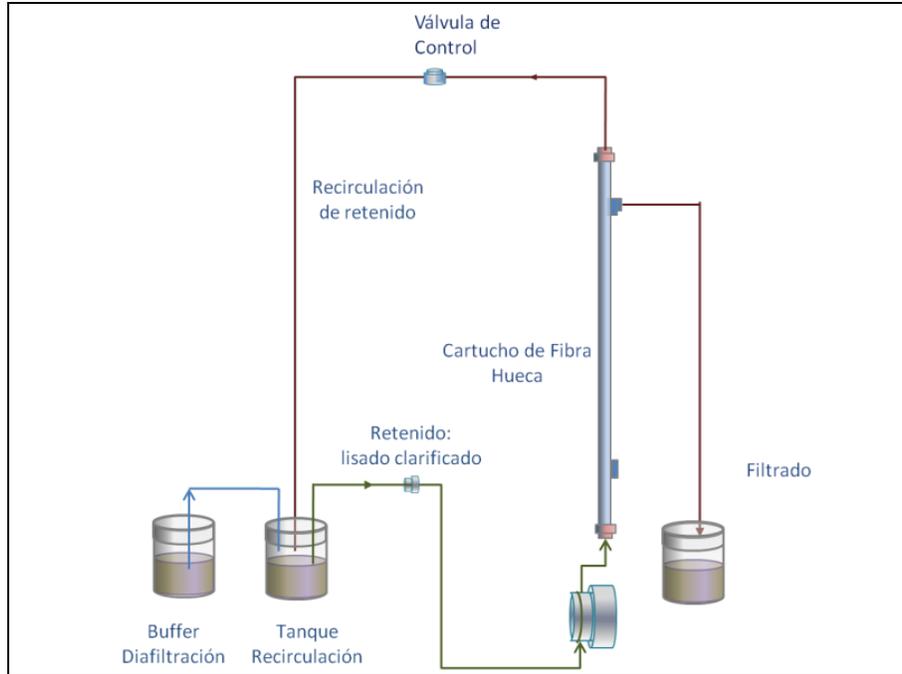


Figura 8. Modalidad Diafiltración para procesos de ultrafiltración.

Los procesos de ultrafiltración son comúnmente operados en modo fed-batch, y es el modo batch el más utilizado cuando se requiere de concentración de la solución a tratar. Para el intercambio de solución amortiguadora es necesario operar a volumen retenido constante y en modo diafiltración.

Una aplicación muy común de la ultrafiltración es la concentración del producto. El cambio de solución buffer y desalinización puede ser obtenido utilizando diafiltración donde se lava el buffer original y es reemplazado con la solución nueva. (Charcosset, 2006).

2.3.2. Modelación de la operación de ultrafiltración

La fuerza impulsora de los procesos de UF es el gradiente de presión transmembrana (ΔTMP), definido por:

$$\Delta TMP = \frac{P_i + P_o}{2} - P_f \quad (1)$$

Donde P_i es la presión en la entrada de la alimentación, P_o es la presión de salida del retenido y P_f es la presión de salida del permeado o filtrado.

De igual manera la transmisión parcial de las especies permeadas a través de la membrana es expresada en términos el coeficiente intrínseco o real de Sieving:

$$S_i = \frac{C_f}{C_w} \quad (2)$$

Donde C_f es la concentración de solutos en el permeado y C_w la concentración en la pared de la membrana. Sin embargo este es un poco difícil de calcular experimentalmente ya que no siempre se cuenta con datos de concentración en la pared de la membrana, por lo que el coeficiente aparente de Sieving es más utilizado. Este último está dado por la siguiente ecuación:

$$S_a = \frac{C_f}{C_b} \quad (3)$$

Donde C_b es la concentración de solutos en el seno de la solución.

S_i depende del sistema de solvente macromolecular, la membrana las condiciones fisicoquímicas del sistema, la presencia de otras macromoléculas y el flux de permeado. S_a depende de la hidrodinámica del sistema aunado a los parámetros mencionados para S_i .

El coeficiente de retención intrínseco está definido de la siguiente manera:

$$\sigma_i = 1 - \frac{C_f}{C_w} \quad (4)$$

Y el coeficiente de retención aparente.

$$\sigma_a = 1 - \frac{C_f}{C_b} \quad (5)$$

Donde C_f es la concentración de soluto en el permeado y C_b la concentración de soluto en el seno de la solución. De esto se puede deducir que $\sigma_a = 1$ cuando hay una retención completa de soluto por la membrana y $\sigma_a = 0$ cuando la retención de soluto es nula.

En el caso particular de la diafiltración a volumen constante, se tiene que la concentración de solutos en cualquier tiempo (volumen de diafiltración) está dada por la siguiente ecuación:

$$C = C_0 e^{-S_a N} \quad (6)$$

Donde C es la concentración de soluto, C_0 es la concentración inicial del soluto, S_a es el coeficiente aparente de Sieving (3) y N es el número de volúmenes de diafiltración.

A la vez el flux de filtrado J está fuertemente ligado a la presión transmembrana que se trabaja y existen algunos modelos enfocados en describir esta relación. Uno de los más utilizados es el *Modelo basado en la Ley de D'arcy* con el cual se obtiene la siguiente ecuación:

$$J = \frac{\Delta TMP - \sigma_a \Delta \pi}{\mu(R_m + R_s)} \quad (7)$$

Donde R_m es la resistencia de la membrana y R_s la resistencia de la capa de soluto de polarización, $\Delta \pi$ es la contrapresión osmótica, μ es la viscosidad dinámica y σ_a es el coeficiente de retención aparente definido anteriormente.

Basándonos en el *Modelo de Resistencias* se sabe que la presión osmótica para macromoléculas en solución y dispersiones coloidales es despreciable por lo que la Ecuación 7 se transforma en:

$$J = \frac{\Delta TMP}{\mu(R_m + R_s)} \quad (8)$$

Otro parámetro a considerar es el coeficiente de permeabilidad dado por la siguiente ecuación:

$$L_p = \frac{1}{\mu(R_m + R_s)} \quad (9)$$

Para analizar los resultados experimentales de un ejercicio de UF de una solución de concentración dada es conveniente dividirlos en dos regiones separadas por un gradiente de referencia ΔTMP^{**} .

En la región I, localizada a la izquierda de ΔTMP^{**} , J es función de ΔTMP y la velocidad de recirculación U . En esta región se puede considerar que $R_m > R_s$, es decir la resistencia de la membrana es controlante. Es una zona donde los incrementos en ΔTMP producen un aumento en R_s , de tal manera que J tiende a un valor máximo conforme aumenta la ΔTMP .

De acuerdo con Tejeda (Tejeda et. al, 1995), tras analizar el comportamiento experimental de un sistema de ultrafiltración en esta región, se ha determinado que:

- J es proporcional a $\ln(1/C_b)$. Cuando se considera la velocidad de recirculación, U constante.
- J aumenta al aumentar U , con una relación $J = U^{1/3}$ en régimen laminar. Y $J = U^{0.83}$ en régimen turbulento.
- J aumenta al aumentar C_w .

Por otro lado en la región II, la cual se encuentra a la derecha de ΔTMP^{**} . J es independiente de ΔTMP y solo es función de la velocidad de recirculación U . En esta región $R_s > R_m$.

Debido a la presión aplicada, el solvente, se ve forzado a pasar a través de los poros de la membrana. Este arrastra consigo moléculas contra la pared de la membrana y en algunos casos a través de ella. De acuerdo con el modelo de polarización en película el flux J puede ser incrementado aumentando la concentración de soluto en la membrana C_w (aumentando ΔTMP).

$$J = k_s \ln \left(\frac{C_w - C_f}{C_b - C_f} \right) \quad (10)$$

Donde k_s es el coeficiente de transferencia de masa particular para cada módulo. C_w , C_b y C_f son las concentraciones de proteína en la superficie de la membrana, en el seno de la solución y en el filtrado, respectivamente.

Sin embargo en la región II existe un límite para este tipo de correlación esto se puede constatar gráficamente en curvas de flux contra ΔTMP en las cuales se aprecia una meseta donde el aumento en

la presión no parece afectar al flux. Este fenómeno es comúnmente explicado por el modelo de capa de gel.

2.3.2.1 Modelo de polarización en película y capa de gel

En este teorema se propone que en las soluciones macromoleculares, el aumento de C_w con ΔTMP tiene un límite, C_g . Donde la solución forma un gel. De esta manera la ecuación 10 se transforma en:

$$J = k_s \ln \left(\frac{C_g}{C_b} \right) \quad (11)$$

Donde C_g es la concentración límite (concentración de la capa de gel) y es constante para un sistema dado. Debe ser determinado de extrapolar el valor de $J = 0$ en una gráfica de J en función de $\ln(C_b)$ (Tejeda et. al, 1995).

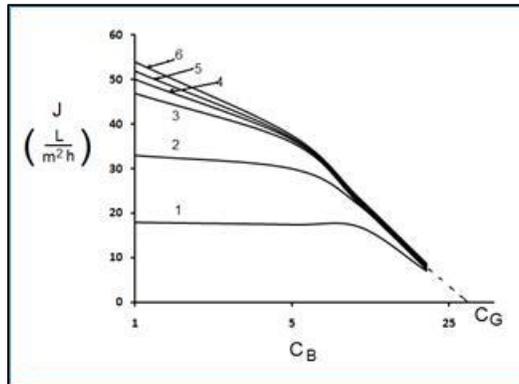


Figura 9. Ejemplo del cálculo de C_g por el método gráfico. Las líneas del 1 al 6 representan líneas de presión constante para un ejercicio de diafiltración. Tomada de Tejeda et. al, 1995.

Una manera práctica de obtener este valor es prolongando las rectas de presión constante en un gráfico como el que se muestra en la Figura 9, hasta encontrar la intersección con el eje de las abscisas. De igual manera el coeficiente de transferencia está dado por el valor absoluto de la pendiente de las curvas en la zona de formación de gel, que en este tipo de gráficos se encuentra donde se aprecia un comportamiento lineal de J con C_b , por ello K_s puede ser estimado con dos puntos sobre esta recta.

2.3.3. Optimización de la operación de la diafiltración

La UF es comúnmente operada a presión transmembrana constante ya sea con sistemas manuales o automatizados. Donde ambos métodos proveen un control de procesos simple y se ha demostrado que se pueden obtener los mismos efectos al variar la presión transmembrana o el flux de filtrado. La optimización del proceso se logra principalmente con la investigación empírica de los flujos de permeado, alimentación, presión transmembrana y/o concentración de solutos en el bulto.

Para el caso de la diafiltración Ng (Ng, 1976) demostró que el modelo de película estancada predice una concentración de bulto óptima:

$$C_b^* = \frac{C_g}{e} \quad (12)$$

Donde C_b^* es la concentración óptima para diafiltración, C_g es la concentración de soluto en la pared de la membrana y e es la base de logaritmo natural.

Si la diafiltración es llevada a cabo a una concentración de bulto menor, el tiempo de operación incrementa por el gran volumen de buffer necesario para obtener la remoción de impurezas deseada. Por otra parte si la diafiltración es llevada a cabo a una concentración de bulto mayor, el tiempo de operación incrementa por la reducción del flux de filtrado al incrementar C_b .

Debido a que C_g no es un valor conocido a priori, se deben realizar estudios empíricos del flux en función de la concentración en el seno de la solución para determinar C_g y k_s y determinar así mismo el efecto entre el flux y los volúmenes de diafiltración. De esto se conduce que el flux óptimo durante la diafiltración está dado por la siguiente ecuación:

$$J^* = k_s \quad (13)$$

Donde k_s es el coeficiente de transferencia de masa (van Reis y Zydney, 2007).

La TFF convencional opera típicamente en la región independiente de la presión en las curvas de flux de filtrado. Se puede obtener una mejor resolución al operar en la región del flux dependiente de la presión (van Reis, 1997). La Δ TMP óptima suele ser seleccionada en la "rodilla" de las curvas de flux contra presión transmembrana.

2.3.4. Incrustación de la membrana (fouling)

La incrustación de la membrana es uno de los mayores problemas que se presentan durante la operación de estos sistemas y consiste en la adsorción de partículas en la pared de la membrana. Esta incrustación está relacionada con diversos factores de operación tales como; la membrana y la proteína a utilizar, la composición química del buffer y la dinámica de fluidos.

En la UF el poro de la membrana es más chico que la proteína que se busca separar por lo que es muy común que ocurra un depósito de proteína en la superficie de la membrana. Actualmente se han presentado algunas técnicas que tratan de minimizar este efecto. Entre ellas se incluyen; flujo pulsátil, Ultrafiltración acompañada con ultrasonido y otras técnicas basadas en las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que se presentan. Sin embargo la mayoría de estos métodos son rechazados debido al alto consumo de energía la complejidad del módulo y contraindicaciones con el proceso (Charcosset, 2006)

2.3.5. Tendencias en la ultrafiltración

La ultrafiltración cuenta con el potencial para sustituir a la cromatografía en la etapa de purificación de DNA plasmídico (Ager et al., 2009). Estudios recientes demuestran que bajo las condiciones adecuadas de flux y presión transmembrana, la ultrafiltración tangencial puede lograr una separación de alta

resolución de las distintas isoformas del plásmido, basándose en las diferencias en su propiedad de flexibilidad elongacional (Latulippe y Zydney, 2011)

Este proceso descrito anteriormente parece ser particularmente atractivo para la purificación a gran escala de plásmido superenrollado para su utilización en terapia génica debido a su bajo costo de operación y la relativamente sencilla escalabilidad de los procesos con membranas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

La materia prima son las células de *E. coli* conteniendo al plásmido pVAX1-NH36. Siendo este último utilizado en el tratamiento de la leishmaniosis. Para reproducir las células se utilizó un medio definido enriquecido con glicerol como fuente de carbón.

Para la lisis celular se utilizaron las siguientes soluciones: Solución de Resuspensión: 50 mM glucosa, 25 mM Tris – HCl 10 mM EDTA. Una solución de Lisis: 0.2 M NaOH 1% SDS. Y finalmente una solución de Neutralización: Acetato de Potasio en ácido acético glacial y agua desionizada. Todas ellas microfiltradas con una membrana de 0.45µm

Para el sistema de ultrafiltración fueron necesarias dos soluciones de limpieza (etanol al 30% y NaOH al 0.5M) tal como lo indica el fabricante. Para su operación se utilizó la solución buffer Tris 20mM pH7.5 HCl que de acuerdo con estudios anteriores demuestra ser la mejor solución para la ultrafiltración de plásmido (Eon-Duval et al., 2003).

Las pruebas de electroforesis se llevaron a cabo en gel de agarosa al 0.8% en Buffer TAE 1x, el marcador utilizado fue Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen, USA) en el buffer de carga Blue Orange 6x Loading Dye (Promega, USA) y la solución de bromuro de etidio (0.5µg/mL) para teñir el gel.

En las pruebas cuantitativas por HPLC-HIC se utilizaron la solución buffer de adsorción Sulfato de Amonio 1.5M en Tris 10mM/pH 8 HCl. Y la solución buffer de Elución Tris 10mM pH 8 HCl. Para la limpieza de la columna se utiliza etanol al 20%. Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos de calidad cromatografía, filtradas con membrana de 0.45µm y desgasificadas con el fin de minimizar los sobre tonos del sistema.

3.2 Equipos

La propagación celular se llevó a cabo en un Fermentador Applikon® (Holanda) de 2L, acoplado a un sistema de control, ez-control (Applikon®, Holanda). La cosecha fue realizada en la centrifuga BiofugeStratos (ThermoScientific, USA).



Figura10. Biorreactor Applikon 3L y Sistema ez-control, Applikon.



Figura 11. Centrifuga BiofugeStratos, ThermoScientific.

Para llevar a cabo los experimentos de ultrafiltración se acopló el sistema MidJet Benchtop System (GE Healthcare, USA) con a una membrana de ultrafiltración tangencial de 300 kDa, esta membrana cuenta con una capacidad de operación de hasta 1.5 kg/cm² de Δ PTM, de acuerdo con el fabricante. Se le acopló la unidad digital de monitoreo de presión MidJet (GE Healthcare, USA). Además se utilizó una bomba peristáltica de 600 – 6000 rpm y un controlador de flujo (Cole Palmer, USA) para mantener una tasa de alimentación constante.



Figura12. Sistema de Ultrafiltración.

Los equipos utilizados para análisis del plásmido fueron los siguientes: Para medir absorbancia se utilizó el espectrofotómetro Lambda 2S (Perkin-Elmer, USA). La electroforesis se realizó en una cámara horizontal de electroforesis GT Minigel Casting System apoyada con el sistema MultiDoc Digital Imaging System, Trans UV (Biorad, USA) para la toma de la fotografía. Finalmente la cromatografía se llevó a cabo en un cromatografo Aktapurifier 10-UPC acoplado a una columna HIC-Source 15 PHE. Apoyado en un auto-muestreador A-900 y un colector de fracciones F-950. Todos ellos de GE Healthcare, USA.



Figura 13. Espectrofotómetro Lambda 2S, Perkin Elmer.

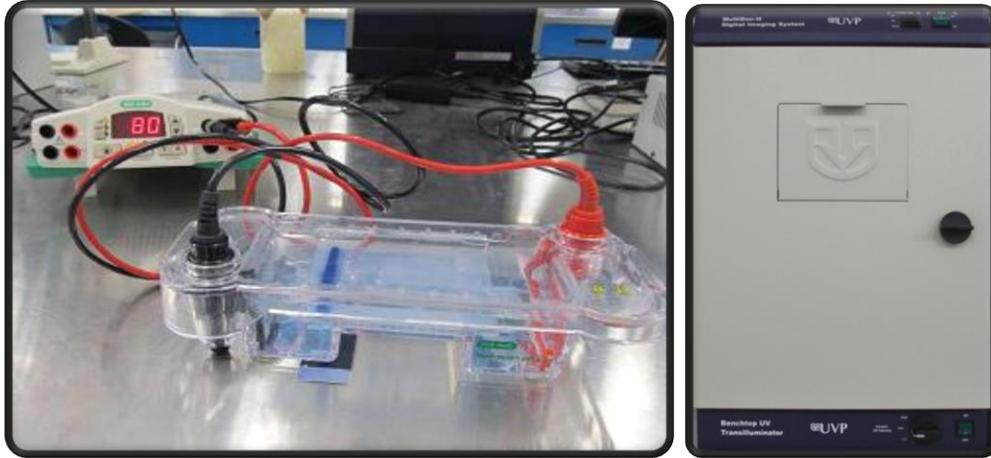


Figura 14. (Izquierda) Cámara de Electroforesis y (Derecha) MultiDocUnit.



Figura 15. Sistema AktaPurifier 10UPC.

Para la conservación de las muestras previo y post experimentación se guardaron en un congelador de alta capacidad Revco Ultima II Series (ThermoScientific, USA) a -40°C .



Figura 16. Congelador de Alta Capacidad Ultima II Series, ThermoScientific.

NOTA: Todos los equipos mencionados están localizados en el Laboratorio de Bioprocesos del DICTUS de la Universidad de Sonora, a excepción del Cromatógrafo el cual se encuentra en el Laboratorio de Biotecnología del DIQyM de la Universidad de Sonora.

3.3 Metodología

En la Figura 17 se presenta un esquema de la experimentación que se llevó a cabo en una primera fase de experimentos, utilizando una sustancia pura, en este caso agua desionizada con el fin de obtener la resistencia de membrana.

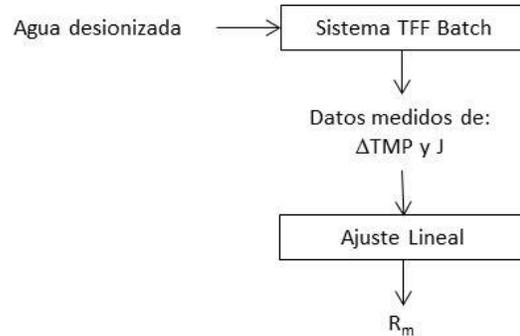


Figura 17. Diagrama de flujo de experimentación con agua desionizada

En una segunda fase de experimentos se realizaron estudios a muestras de lisado lavado, como se observa en la Figura 18.

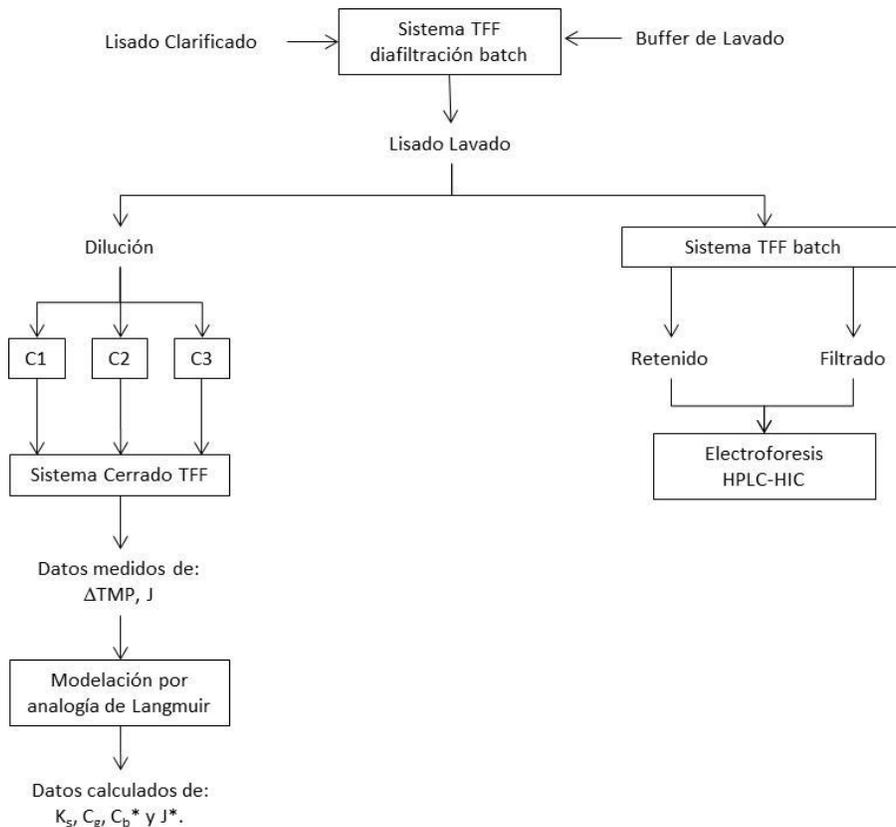


Figura 18. Diagrama de flujo de experimentación con soluciones de lisado lavado

3.3.1. Determinación de la resistencia de la membrana en el sistema experimental de ultrafiltración

Se configuró el sistema de ultrafiltración que se muestra en la Figura 19. Este sistema consta de una membrana de ultrafiltración de 300 kDa, 3 transductores de presión ubicados en la entrada y salidas de la membrana y una bomba peristáltica de 600 rpm conectada a un regulador de flujo. Todas las tuberías utilizadas son manguera flexible calibre 14 (1.6mm de diámetro interior).

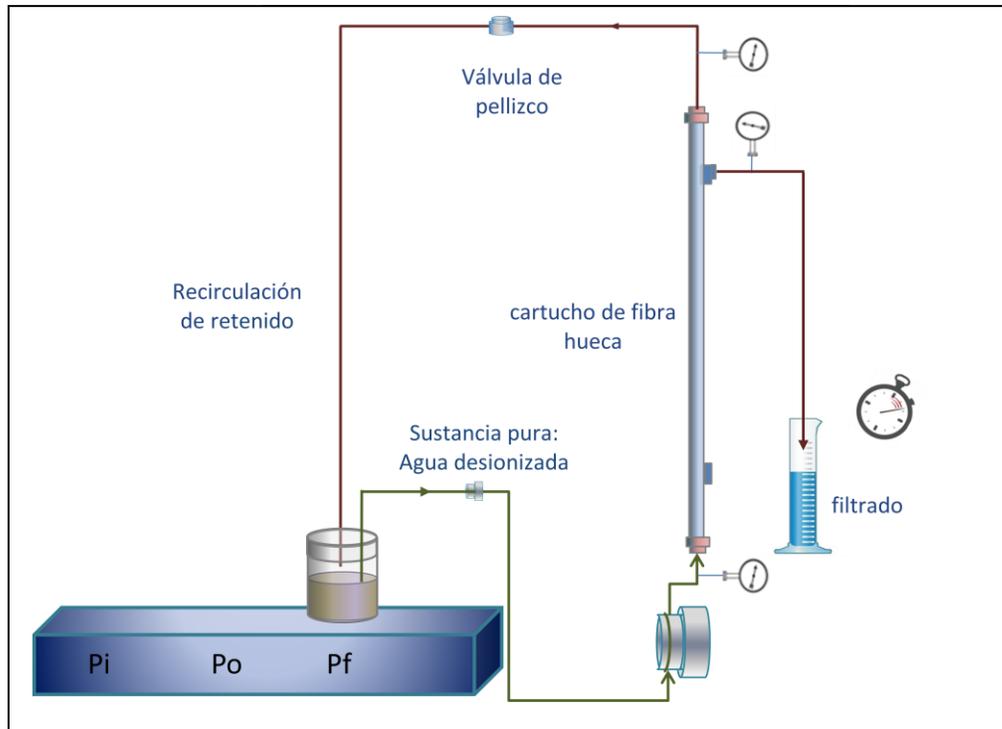


Figura 19. Sistema de Ultrafiltración para Cálculo de R_m .

Con la ayuda de una probeta y un cronómetro en la salida del permeado se obtienen datos de cambio de volumen en el tiempo y de acuerdo con las especificaciones del fabricante, esta membrana cuenta con un área de 16 cm^2 por lo tanto con la Ecuación (14) nos es fácil determinar el flux de permeado

$$J = \frac{V}{tS} \quad (14)$$

Donde V es el volumen en mL, t el tiempo en segundos y S el área superficial de membrana.

Los transductores de presión son conectados a la unidad digital de monitoreo, que nos brinda datos puntuales de presión en la ubicación del transductor. Haciendo uso de la Ecuación (1), descrita en el Capítulo 2, es posible determinar el cambio de presión transmembrana ΔTMP .

El utilizar una sustancia pura nos permite eliminar la adsorción de una capa de solutos sobre la pared de la membrana y si consideramos la resistencia de la membrana, R_m , constante, J variara linealmente con

Δ TMP. Por ello se manejó agua como fluido de alimentación. Esta se hizo recircular a través del sistema a una tasa constante de 25 mL/min, dejando abierta la válvula de salida de permeado hasta llenar por completo el cartucho de la membrana y la línea de salida. Una vez eliminados los errores por retraso, se procede a variar la presión. Utilizando la válvula de pellizco ubicada en la salida del retenido, se fijaron distintos valores de presión transmembrana. Una vez estabilizados los valores de presión se midió el flujo de permeado y se registraron los valores. Así para cada valor de Δ TMP dado obtuvimos un valor de flux particular.

En este caso al terminar la experimentación no es necesario llevar a cabo el protocolo de limpieza, sin embargo, es recomendable almacenar la membrana en una solución de etanol al 30%.

3.3.2. Efecto de la concentración de la solución de plásmido sobre el flux

Preparación de lisado clarificado

Para estudiar el efecto de la concentración de plásmido en la alimentación se procesaron muestras de lisado clarificado, como se describe a continuación:

Fermentación y cosecha celular. Las células fueron cultivadas a 37 °C en un medio definido con glicerol como fuente de carbono, pH 6.4 y una concentración de oxígeno disuelto del 30%. Siendo cosechadas por medio de centrifugación a 3500 g y 4 °C, obteniéndose el pellet celular.

Recuperación primaria. El pellet fue resuspendido con 8.0 mL de la solución de resuspensión por cada gramo de célula húmeda. Para el rompimiento celular se utilizó un volumen igual de la solución de lisado a la cual finalmente se le agregó la solución de neutralización en la misma proporción que las soluciones anteriores. Se procedió a clarificar la solución por medio de centrifugación a 6000 g, 4 °C y se filtra a vacío con un filtro de membrana de 0.45 μ m.

Lavado del lisado clarificado

Una vez obtenido el lisado clarificado, se procedió a utilizar un sistema de diafiltración en modo batch para realizar un intercambio de buffer, utilizando cinco volúmenes de la solución de lavado Tris 20mM pH 7.5. Como se describe a continuación:

Se configuró el sistema de la Figura 20. El cual consta de una membrana de ultrafiltración de 300 kDa, una bomba peristáltica de 600 rpm conectada a un regulador de flujo, una segunda bomba ubicada en la salida del permeado, para garantizar una tasa de permeado constante. Todas las tuberías utilizadas son manguera flexible calibre 14 (1.6mm de diámetro interior).

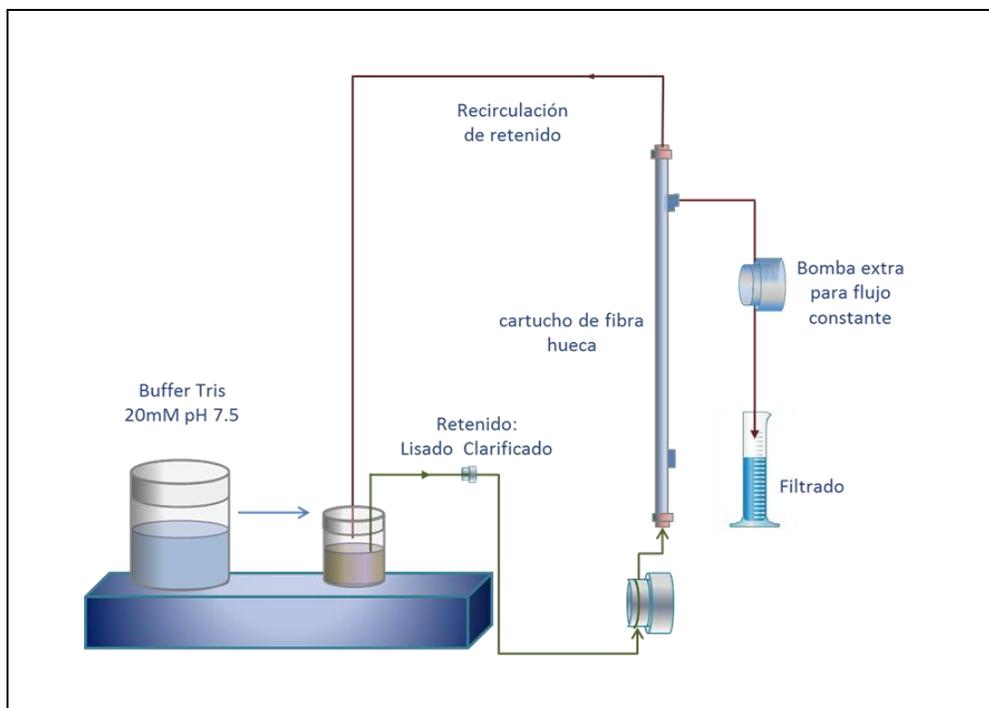


Figura 20. Sistema de ultrafiltración para lavado de soluciones lisadas.

Se fijó una tasa de alimentación U constante de 25 mL/min, y un flujo de permeado de 1.0 mL/min. Se alimentaron 200 mL de solución lisado clarificado y 100 mL de solución buffer. Una vez que se permearon 100 mL, se procedió a agregar otros 100 mL de solución buffer, así sucesivamente hasta haber permeado una cantidad equivalente a 5 volúmenes de lavado (1000 mL).

Preparación de soluciones modelo de plásmido

Una vez obtenida la solución de lisado lavado, se procedió a preparar 3 soluciones de concentración diferente (C1, C2 y C3). A estas soluciones se les determinó la concentración de pDNA por medio de HIC, con el método propuesto por Diogo *et. al* (2003).

Efecto de la concentración de pDNA sobre el flux de permeado

Se configuró el sistema para trabajar a concentración constante, como se muestra en la Figura 21. En este sistema se acoplaron nuevamente 3 transductores de presión en la entrada y salidas de la membrana de ultrafiltración de 300 kDa, una unidad digital de monitoreo de presión, una bomba peristáltica de 600 rpm conectada a un controlador de flujo analógico, una válvula de pellizco para llevar a cabo la variación de presión transmembrana. Sin embargo la característica principal de este sistema es que la salida de retenido y de filtrado de la membrana, se regresan al tanque de alimentación, de esta manera se convierte en un sistema cerrado en el cual la concentración de la solución de alimentación no varía con el tiempo.

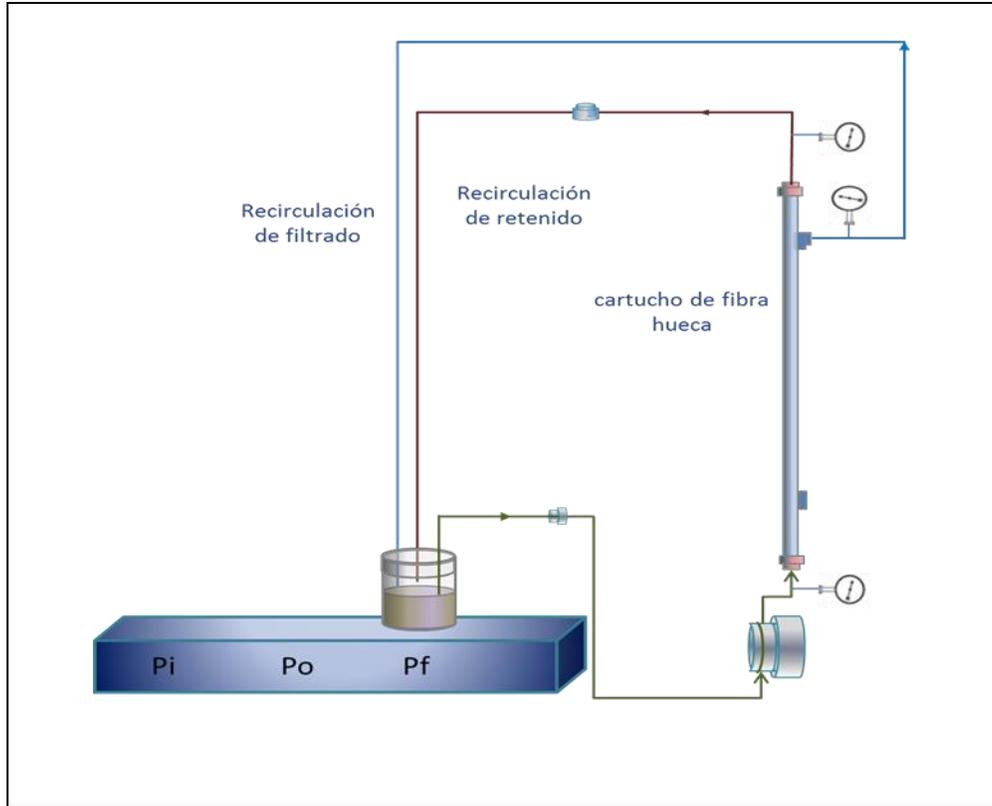


Figura 21. Configuración UF - Concentración Constante.

Se hizo pasar la solución a analizar (C1, C2, C3) a través del sistema a una tasa constante de 25 mL/min dejando abierta la válvula de salida del permeado hasta lograr que la cámara de la membrana este completamente llena (para evitar errores por retraso).

Utilizando la válvula de pellizco se obtuvieron diferentes valores de presión transmembrana, los cuales son calculados utilizando la Ecuación 1 como se describe en el experimento anterior. De la misma manera se esperó a que se estabilizaran los valores de presión y fueron registrados los datos obtenidos.

Inmediatamente después se midió y registró el flux de permeado con ayuda de la Ecuación 14. Para determinar el flux de permeado fue necesario retirar la conexión de recirculación de filtrado por breves espacios de tiempo. Una vez registrado el volumen permeado, este era devuelto inmediatamente al frasco de alimentación. De esta manera se mantenía una concentración constante a lo largo de toda la experimentación.

Para procesar la siguiente muestra, fue necesario llevar a cabo una limpieza de la membrana con una solución caustica diluida (NaOH 0.5M) como lo especifica el fabricante. Una vez realizada la limpieza se llenan las líneas de alimentación y la columna con buffer tris 20mM para proseguir con la experimentación.

3.3.3. Ultrafiltración en modo batch

Con el fin de determinar si el plásmido puede o no atravesar la pared de la membrana bajo las condiciones típicas en que se ha analizado y trabajado este sistema, se procedió a configurar un sistema de ultrafiltración en modo batch como se muestra en la Figura 22. Este sistema cuenta con una membrana de 300kDa, una bomba peristáltica de 600 rpm acoplada a un controlador de flujo analógico, una segunda bomba conectada en la salida del permeado para garantizar un flujo de permeado constante.

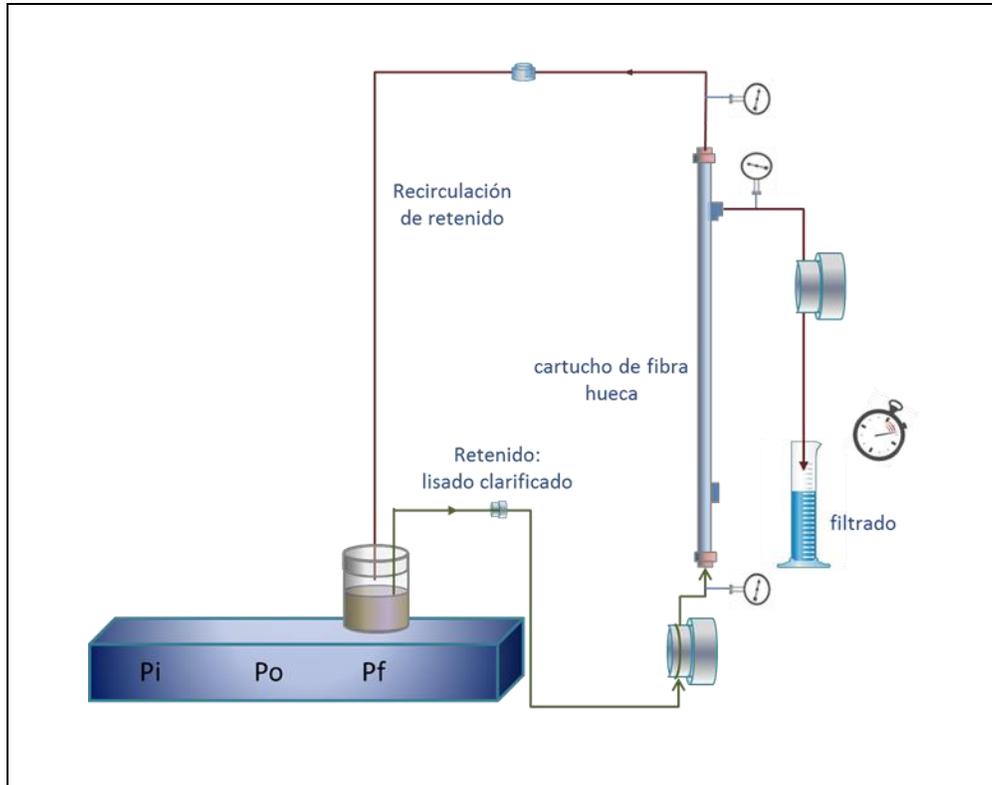


Figura 22. Modo Concentración a Tasa Constante.

En este sistema se alimentaron 100 mL de una solución de lisado clarificado y lavado como se describe en el apartado anterior. El cual fue alimentado a una tasa constante de 25 mL/min y una tasa de permeado de 0.5mL/min. Este sistema se dejó trabajar concentrando la solución hasta un volumen final de 50 mL.

La presión solo fue monitoreada como medida de control durante el ejercicio del sistema, sin embargo, los datos obtenidos no fueron registrados ya que no se consideraron influyentes en los resultados obtenidos.

Una vez que se obtuvieron 50 mL de permeado se procedió a tomar una muestra del mismo y de la solución retenida, a estas muestras se les realizaron análisis de electroforesis en gel de agarosa y de HPLC – HIC

3.3.4. Análisis de muestras

Electroforesis: Se coloca el gel de agarosa en la cámara horizontal de electroforesis con los pocillos junto al cátodo y se llena la cámara con Buffer TAE 1x hasta que este cubra el gel por completo. En cada uno de los pocillos se añaden un volumen de muestra de 5 μ L y 1 μ L de buffer de carga 6x. (En caso de utilizar marcador de peso molecular, puede ser agregado en una relación de 1 μ L de marcador y 1 μ L de buffer de carga).

Una vez cargado el gel, se enciende la cámara a 80 V durante 1.5 h. Al finalizar de correr las muestras, es necesario teñir el gel en la solución de bromuro de etidio durante 15 min. Se toma la fotografía en luz ultravioleta para visualizar las proteínas presentes

Cromatografía Líquida de Alta Resolución: A una tasa constante de 1 mL/min de la solución 1.5M Sulfato de Amonio/Tris 10mM se equilibró la columna de PHE PE conectada al sistema AktaPurifier de cromatografía. Por medio del automuestreador se inyectaron 30 μ L de muestra diluida (100 μ L de muestra y 400 μ L de buffer de inyección). Después de la inyección de la muestra, la columna se eluye por 1.4 min con el mismo buffer de equilibrio. Como las distintas isoformas del pDNA no son adsorbidas en la columna, eluyen como un solo pico. Una vez que se obtiene este pico se hace pasar el buffer de elución (Tris 10 mM/ pH 8 HCl) durante 0.9 min. Finalmente se re-equilibra la columna haciendo pasar nuevamente la solución buffer de sulfato de amonio durante 5.5 min, quedando la columna lista para la próxima inyección. La absorbancia de las muestras fue evaluada a 260 nm.

En los cromatogramas de muestras de lisados, en general, se obtienen 4 picos como se muestra en la Figura 23. El pico a los 0.68 min corresponde a pDNA total; el pico a los 3.58 min corresponde a RNA de alto peso molecular y gDNA y los otros picos (1.28 y 1.75 min) se atribuyen a RNA de bajo peso molecular y proteínas remanentes, de acuerdo al estudio hecho por Diogo *et al.*, (2003).

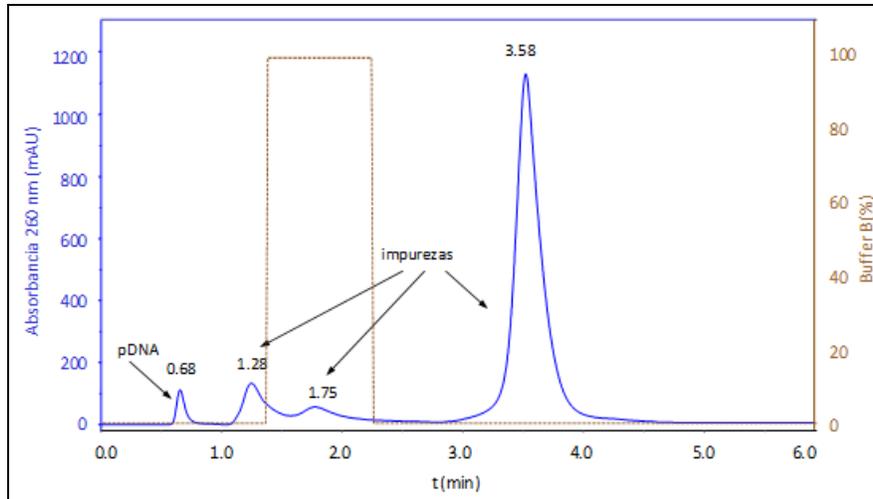


Figura 23. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada lisado alcalino). (Diogo et al, 2003)

La concentración de pDNA en una muestra colectada durante el proceso se cuantifica al relacionar el área del pico del plásmido con la Ecuación de la curva patrón (Anexo A), obtenida a partir de graficar la concentración muestras de plásmido puro de concentración conocida en función del área obtenida.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la resistencia de la membrana del sistema experimental de ultrafiltración

Debido a que el fluido que se hizo pasar a través de la membrana es una sustancia pura y no hay formación de torta ($R_s = 0$) la Ecuación 8 se transforma en;

$$J = \frac{\Delta TMP}{\mu R_m}$$

Graficando J en función de ΔTMP , es posible ajustar a una recta, donde la pendiente = $(\mu R_m)^{-1}$ y la ordenada en el origen = 0

Para obtener un manejo correcto de unidades, es necesario hacer uso de la constante de gravitación universal (g_c), aplicándola de la siguiente forma

$$R_m = \frac{g_c}{\mu m}$$

Con esta ecuación es posible determinar el valor de R_m para nuestra membrana de 300 kDa en unidades cm^{-1} .

En la Figura 24 se presentan los resultados obtenidos durante los experimentos realizados con agua, donde se muestra la relación lineal entre el flux de permeado y la presión transmembrana, por medio de la siguiente expresión

$$J = 0.0058 \Delta TMP$$

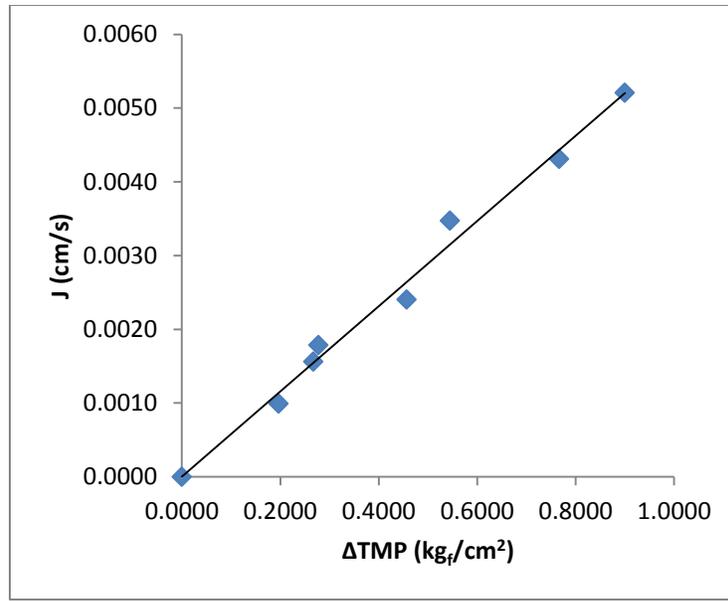


Figura 24. Gráfica J en función de ΔTMP para Agua Desionizada.

Por lo tanto, la pendiente de la recta obtenida es igual a $0.0058 \text{ cm}^3/\text{kg}_f\text{-s}$. Utilizando un valor promedio de viscosidad igual a 10^{-5} kg/cm-s . Se obtiene:

$$R_m = \frac{g_c}{\mu m} = \frac{980.7 \frac{\text{kg} * \text{cm}}{\text{kg}_f * \text{s}^2}}{10^{-5} \frac{\text{kg}}{\text{cm} * \text{s}} 0.0058 \frac{\text{cm}^3}{\text{kg}_f * \text{s}}}$$

$$R_m = 16.9 \times 10^9 \text{ cm}^{-1}$$

Actualmente en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad de Sonora, se está investigando el uso de membranas de ultrafiltración para la perfusión de células de *E. coli* durante la etapa de propagación celular. Por lo tanto se han realizado estudios similares de Resistencia de membrana (R_m), en los que se han obtenido los siguientes resultados:

Para una membrana de 100 kDa y un área de 145 cm^2 la resistencia calculada fue de $9.16 \times 10^9 \text{ cm}^{-1}$, mientras que para una membrana de 500 kDa y un área de 145 cm^2 la resistencia fue de $9.52 \times 10^9 \text{ cm}^{-1}$. A pesar de las diferencias obtenidas, se puede subrayar que la importancia de este valor radica en marcar la pauta para determinar la integridad de la membrana y decidir si es conveniente reemplazarla después de una serie de experimentos. Se sugiere que al alcanzar un valor de $R_m \leq 0.6 R_{m_{au}}$ es necesario el reemplazar la membrana a utilizar, siendo $R_{m_{au}}$ la resistencia de la membrana después de usarse con la solución de trabajo.

4.2 Efecto de la concentración de la solución de plásmido sobre el flux

A la solución de lisado clarificado, se le realizó un intercambio de buffer como fue descrito en la sección 3.3.2. En la Figura 23 se muestra el análisis de electroforesis de las soluciones de lisado clarificado y el lisado lavado con 5 volúmenes de buffer.

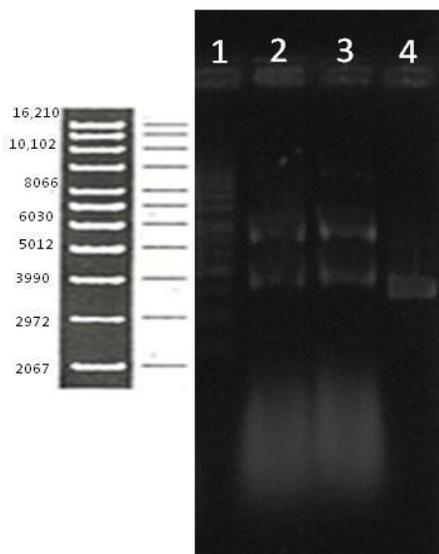


Figura 25. Gel de electroforesis de solución lisado clarificado y lavado. (1) Marcador de Peso Molecular, (2) Solución lisado lavado, (3) Solución lisado clarificado y (4) plásmido pVAX1-NH36

Los resultados mostrados en el estudio electroforético (Figura 25) muestran una ligera disminución de los contaminantes, conservándose el plásmido en la solución de retenido. En los estudios cromatográficos (Figura 26) se pueden apreciar claramente la alta proporción de contaminantes e impurezas en relación a la cantidad de plásmido (alrededor de 2% en relación al área total), como es común en este tipo de soluciones.

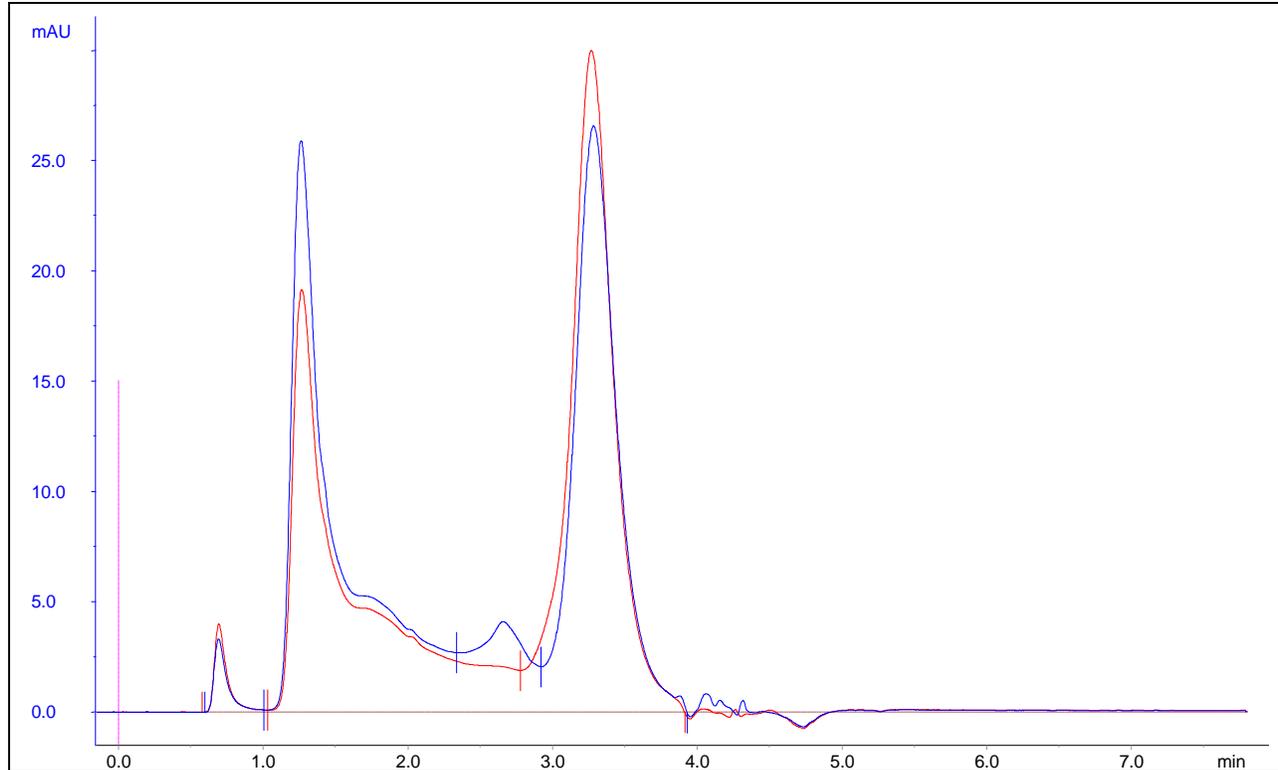


Figura 26. Cromatograma Intercambio de Buffer. (Azul) Solución inicial de lisado clarificado y (Rojo) Solución final de lisado Lavado.

Se puede observar como los picos del cromatograma de solución de retenido alcanzan un altura un poco mayor a la del lisado clarificado (alimentación), esto puede deberse a errores de medición en la cantidad permeada, lo que ocasionó una pequeña concentración de la solución y al tratarse de una técnica tan sensible se hacen evidentes este tipo de situaciones. Sin embargo, la finalidad de esta etapa era el lavar la solución de lisado por medio de un intercambio de buffer, lo que si se logró con la operación. La concentración de plásmido en el retenido fue de 6.6235 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Una vez obtenido el lisado lavado (retenido) se hicieron diluciones con él y se procedió a determinar por medio de HPLC-HIC la concentración de las soluciones y en base al área del pico de plásmido se obtuvieron los siguientes datos;

- C1 = 1.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- C2 = 3.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- C3 = 4.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Estos valores de concentración nos serán de utilidad posteriormente para la obtención de los parámetros K_s y C_g .

De los datos experimentales que se obtuvieron se realizó una analogía al ajuste de Langmuir para curvas de adsorción obteniéndose una ecuación modelo como la siguiente:

$$J = \frac{J_m \Delta TMP}{\Delta TMP^{++} + \Delta TMP} \quad (15)$$

Donde J_m es el valor máximo de flux para un sistema dado. ΔTMP^{++} es el valor de ΔTMP para el cual $J = 0.5 J_m$.

Con la forma recíproca de la Ecuación 15 y los datos experimentales se obtiene que la pendiente está dada por $\Delta TMP^{++} / J_m$ y la ordenada en el origen $= J_m^{-1}$

Experimentalmente obtuvimos el valor de J_m para cada una de las concentraciones y con ayuda de la herramienta Solver de Excel se reajusto el valor de ΔTMP^{++} . La estrategia en este ajuste consiste en minimizar la suma de los cuadrados de los residuos (Ecuación 16) entre los valores medidos y calculados con el modelo lineal. Los parámetros obtenidos son mostrados en la Tabla 8.

$$S_r = \sum_{i=1}^n (J_{i,medida} - J_{i,modelo})^2 \quad (16)$$

Tabla 8. Obtención de parámetros de ajuste para modelo de ultrafiltración.

	C1	C2	C3
C (µg/mL)	1.04	3.81	4.69
J_m (cm ³ /cm ² -s)	0.0035	0.0025	0.0020
ΔTMP^{++} (kg/cm ²)	0.21	0.21	0.17
S_r	4.03×10^{-7}	7.72×10^{-8}	1.01×10^{-7}

Debido a que ΔTMP^{++} es un valor dado para un sistema el cual representa la frontera de la región de formación de gel y la región del flux independiente de la presión. Se calculó un valor promedio para este sistema de $\Delta TMP^{++} = 0.2$. Con estos valores se modeló el comportamiento del sistema y por medio del modelo se obtuvieron valores de flux a una TMP dada para cada una de las concentraciones.

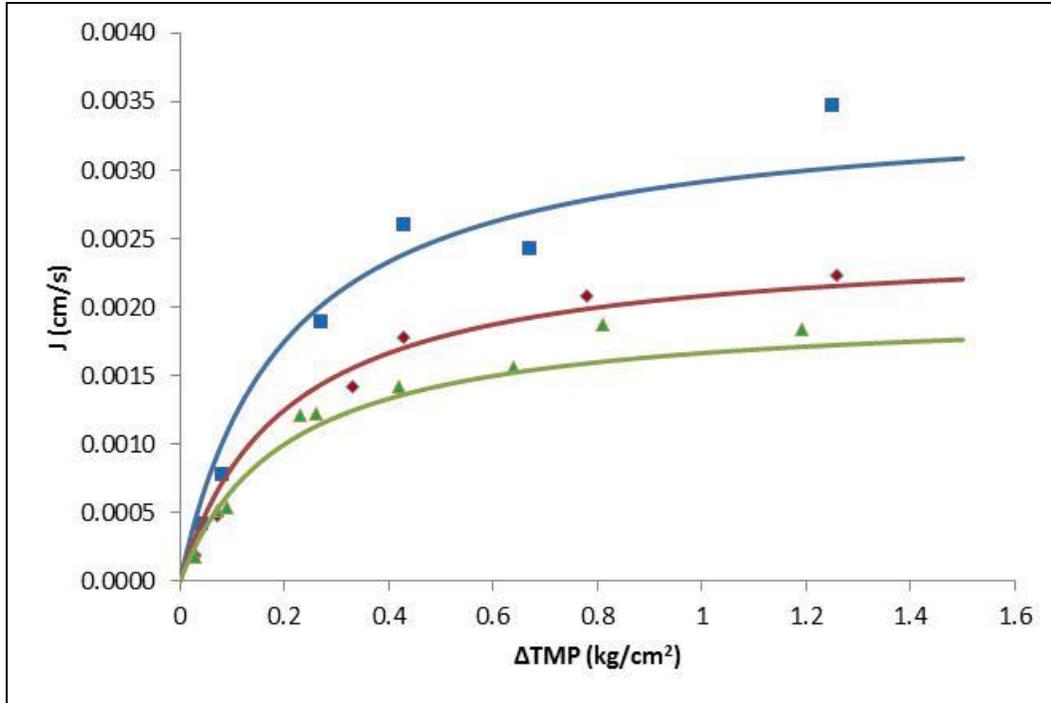


Figura 27. Modelo del Sistema de Ultrafiltración. (Cuadro Azul) Valores experimentales y (Continua Azul) modelados para 1.04 µg/mL; (Rombo Rojo) Valores experimentales y (Continua Rojo) modelados para 3.81 µg/mL; (Triangulo Verde) Valores experimentales y (Continua Verde) modelados para 4.69 µg/mL.

En la Figura 27 se puede observar que el modelo utilizado (Ecuación 15) proporciona un buen ajuste a los datos experimentales, por lo tanto se puede proceder a obtener datos de flux a una presión transmembrana dada para cada una de las concentraciones, y de esta manera podemos construir una gráfica de flux en función de la concentración, como la que se muestra en la Figura 28;

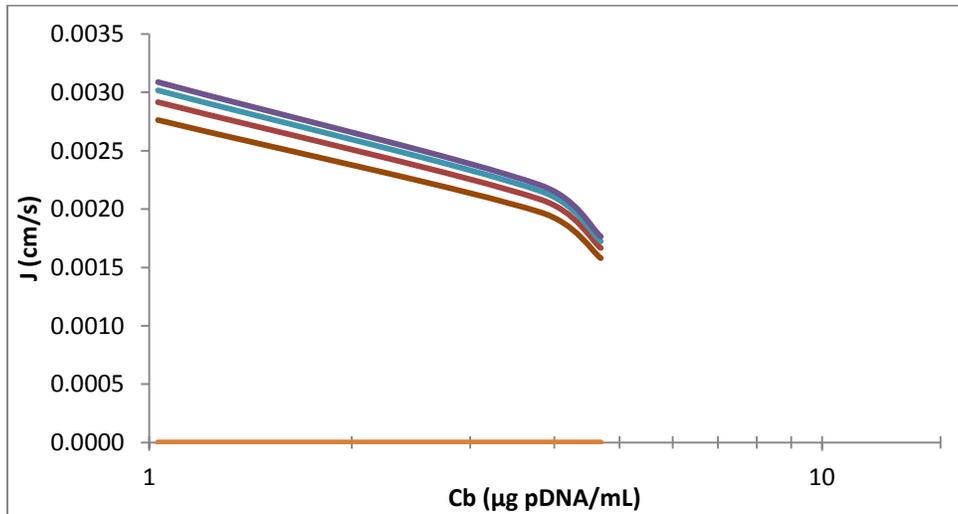


Figura 28. Flux en función de C_b en escala logarítmica. Línea naranja: Isóbara 0.00 kg/cm². Línea café: Isóbara 0.75 kg/cm². Línea roja: Isóbara 1.00 kg/cm². Línea azul: Isóbara 1.25 kg/cm². Línea morada: Isóbara 1.50 kg/cm².

La extrapolación del valor de $J = 0$ gráficamente, podría dar una mayor incertidumbre debido a los errores de enfoque que podrían presentarse, por ello, se optó por calcular la pendiente m_i utilizando dos puntos en la región de formación de gel. Con el valor de la pendiente m_i es posible calcular en punto de intersección ($C_{gi}, 0$) por medio la ecuación siguiente;

$$C_{g,i} = x_{1,i} - \frac{y_{1,i}}{m_i}$$

Tabla 9. Cálculo de C_g .

		C1	C2	C3		
		1.03 µg/mL	3.81 µg/mL	4.69 µg/mL	m	C_g
P1	0.00 kg/cm ²	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
P2	0.75 kg/cm ²	0.0028	0.0020	0.0016	-0.0004	8.2100
P3	1.00 kg/cm ²	0.0029	0.0021	0.0017	-0.0005	8.2100
P4	1.25 kg/cm ²	0.0030	0.0022	0.0017	-0.0005	8.2100
P5	1.50 kg/cm ²	0.0031	0.0022	0.0018	-0.0005	8.2100
				MEDIA	-0.0005	8.2100

Al hacer uso de la herramienta solver, obtenemos un valor ajustado de $K_s=0.0019$ cm/s.

La expresión de flux en la región II es por lo tanto,

$$J = 0.0019 \ln \left(\frac{8.21}{C_b} \right)$$

De acuerdo a las Ecuaciones 12 y 13, (Ng, 1976), obtenemos los parámetros óptimos para la operación de diafiltración:

$$C_b^* = \frac{C_g}{e} = \frac{8.21}{2.718} = 3.0203 \frac{\mu g}{mL}$$

$$J^* = k_s = 0.0019 \frac{cm}{s}$$

No se puede presentar un valor de ΔTMP óptimo debido a que este sería particular de cada sistema. Sin embargo este puede ser calculado como el valor de ΔTMP para el cual $J = J^*$.

4.3 Análisis de la ultrafiltración en modo batch

A continuación se muestra los resultados obtenidos durante la concentración de soluciones de retenido por medio de la membrana de ultrafiltración de 300 kDa.

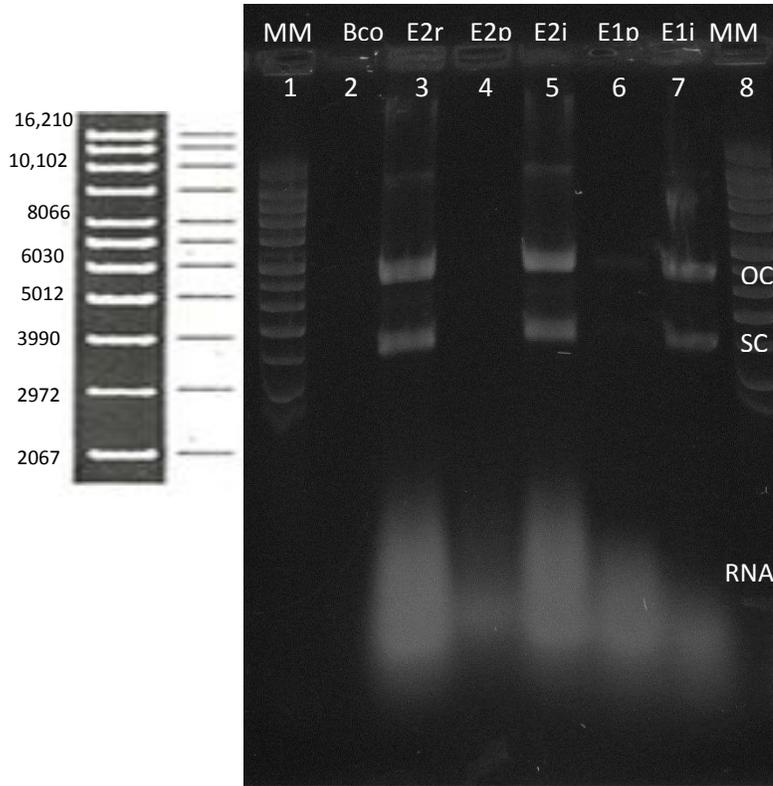


Figura 29. Gel de Electroforesis de muestras de filtrado y retenido utilizando la membrana de 300 kDa. (1) Marcador de peso molecular. (2) Muestra Blanco Tris 20 mM. (3) Solución Retenida de Experimento 2. (4) Solución Filtrada de Experimento 2. (5) Solución de Alimentación Experimento 2. (6) Solución de Filtrado Experimento 1. (7) Solución Alimentación Experimento 1. (8) Marcado de peso molecular.

Durante la operación de concentración se muestra que la membrana de 300 kDa presenta una buena barrera para evitar el paso de moléculas de pDNA a través de ella, (Figura 29, carril 3) y la eliminación de impurezas como RNA en la solución de filtrado (Figura 29, carriles 4 y 6). Con la finalidad de cotejar y expandir la información brindada en la electroforesis, se realizaron los estudios cromatográficos correspondientes. De los cuales se muestran los resultados obtenidos

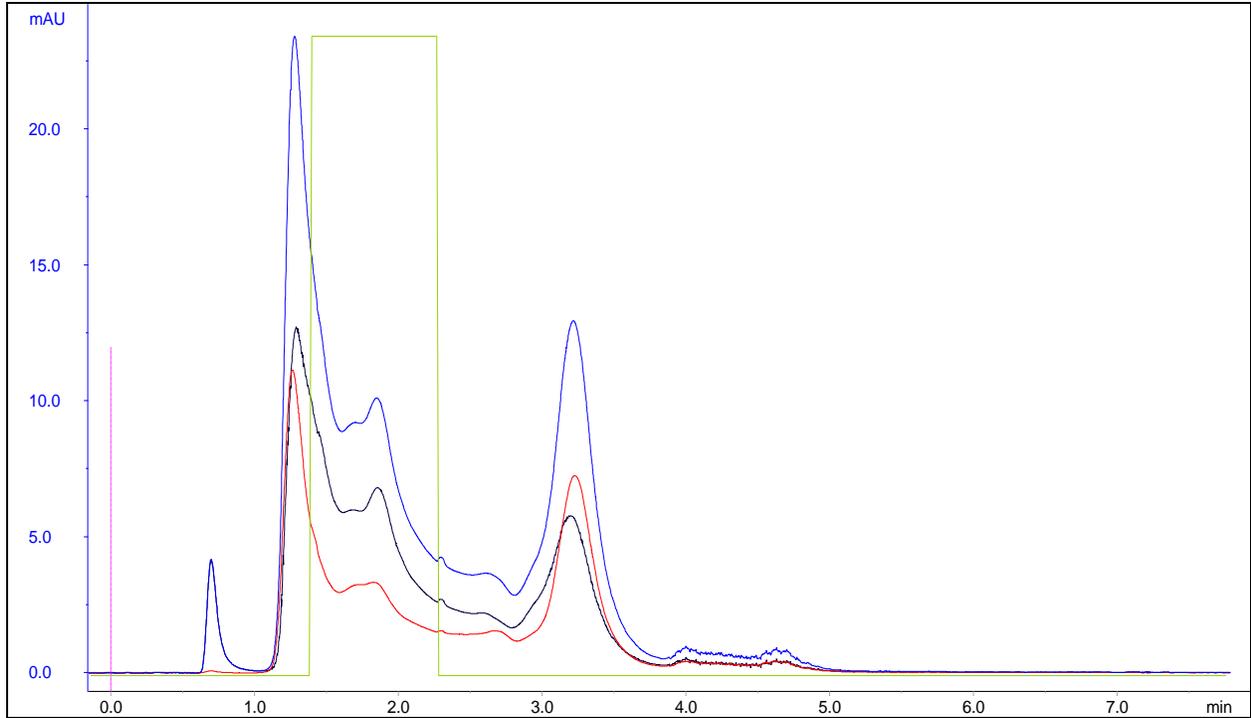


Figura 30. Cromatograma concentración de lisado lavado E1. (Azul) Solución de alimentación, (Rojo) Solución de filtrado y (Negro) Solución de retenido.

En la Figura 30 se puede observar claramente que en la solución filtrada no se encontró plásmido presente, y sin embargo, un 41.81% de contaminantes fue eliminado a través de la membrana (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de las áreas de integración E1

Solución	Área pDNA	Área Contaminantes	%Remoción
Alimentación	0.4024	18.8718	
Retenido	0.4024	11.1492	
Filtrado	N/D	7.7226	41.81

De igual manera se presentan los resultados de un segundo ejercicio de concentración E2 que se realizó con la finalidad de reafirmar lo reportado en los resultados anteriores.

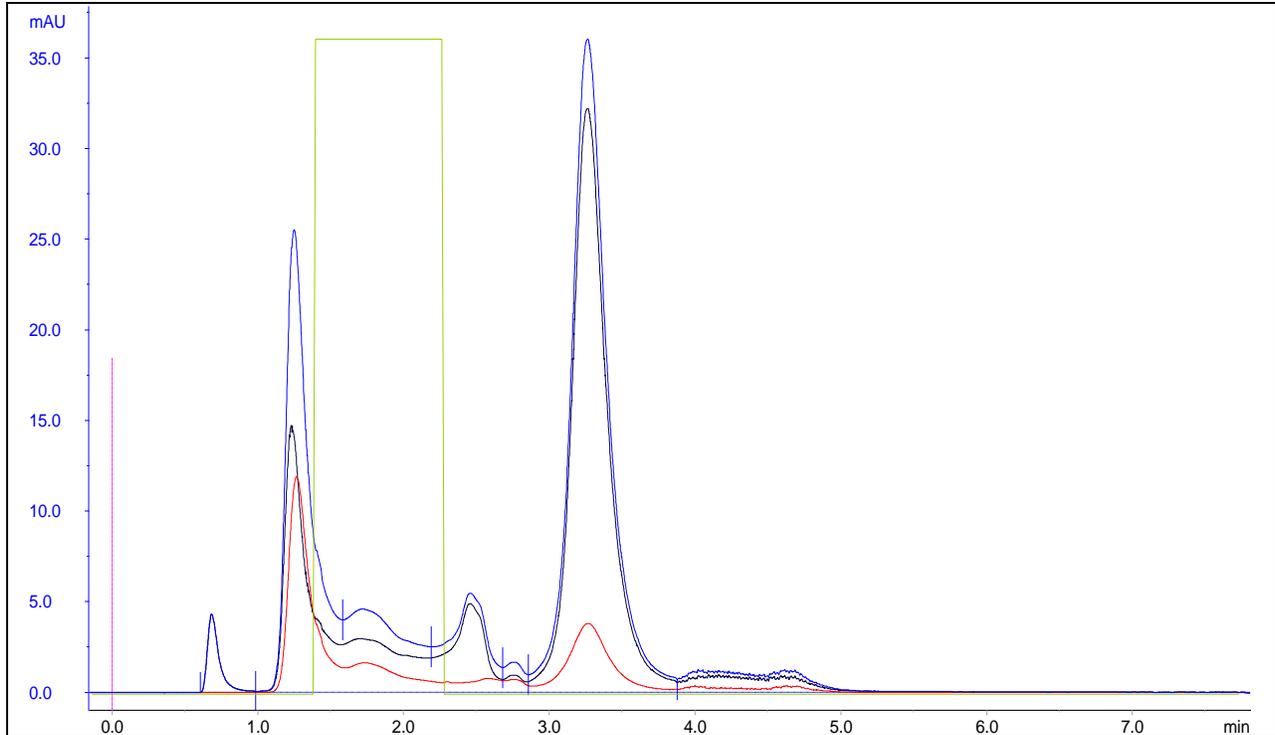


Figura 31. Cromatograma concentración de lisado lavado E2. . (Azul) Solución de alimentación, (Rojo) Solución de filtrado y (Negro) Solución de retenido.

En la Figura 31 se puede observar claramente que en la solución filtrada no se encontró plásmido presente, y un 23.55% de contaminantes fue eliminado a través de la membrana (Tabla 11). Esto corrobora satisfactoriamente el ejercicio anterior.

Tabla 11. Comparación de las áreas de integración E2

Solución	Área pDNA	Área Contaminantes	% Remoción
Alimentación	0.4064	19.6486	
Retenido	0.4064	15.0204	
Filtrado	N/D	4.6282	23.55

En este caso la cantidad de contaminante removido fue menor a la alcanzada durante la filtración de la solución E1, esto puede ser atribuido a que en la solución E2 estaba presente una mayor cantidad de contaminantes de alto peso molecular, indicado por el pico obtenido a los 3.54 min de elución, lo que dificultó su traspaso a través de la membrana.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se estableció con éxito un sistema experimental de ultrafiltración estable que permitió determinar la resistencia de la membrana. Con este parámetro es posible verificar que, después de cierto tiempo de uso, la membrana puede ser reutilizada al aplicarle el protocolo de limpieza. A nivel industrial este dato es útil para determinar el momento en que se debe reemplazar la membrana y evitar resultados indeseables a causa de una membrana en mal estado.

El análisis del efecto de la concentración de plásmido sobre el flux de permeado en el sistema reafirma el hecho que el flux es inversamente proporcional a la concentración. También permitió constatar el efecto de polarización de la membrana en las curvas de flux contra Δ TMP, donde se aprecia la curvatura que muestra que se ha formado la capa de gel.

Los resultados obtenidos con los experimentos de concentración constante permitieron determinar el coeficiente de transferencia de masa y la concentración de polarización de la membrana, que son parámetros que pueden ayudar a escalar el sistema.

Los parámetros óptimos para llevar a cabo la diafiltración sugieren que la solución de plásmido debe ser concentrada previamente a su diafiltración. El flux de permeado óptimo representa un valor intermedio al manejable por la membrana y puede ser alcanzado dentro de la caída de presión permisible por la membrana.

Los estudios de electroforesis y de cromatografía muestran que no hay pérdidas de plásmido durante la operación de ultrafiltración y que parte de los contaminantes son permeados a través de la membrana. La operación cumple satisfactoriamente con su objetivo de eliminar impurezas antes de continuar con las etapas de alta resolución, mientras se mantiene la presencia de nuestro producto de interés.

5.2 Recomendaciones

Durante la operación de diafiltración sería interesante el analizar el comportamiento de la concentración de especies en el retenido durante el tiempo de operación, para determinar la cantidad de volúmenes de diafiltración necesarios para lavar por completo a una solución dada.

Particularmente se sugiere analizar el comportamiento de la concentración de RNA durante el tiempo de operación.

Es recomendable antes de cada reuso de la membrana determinar su resistencia, para garantizar su adecuado funcionamiento durante experimentos posteriores. De igual manera se debe monitorear mensualmente que esta se encuentre en una solución de etanol al 30%. La membrana nunca debe estar seca.

Se recomienda utilizar un sistema de control en la medición de las variables para garantizar y facilitar la obtención de valores utilizando flux o presión transmembrana constantes durante la operación.

Se podría implementar estudios en este sistema, como una etapa de alta resolución, encaminados a separar las isoformas del plásmido, aprovechando los diferentes volúmenes entre las isoformas circular abierto, lineal y superenrollado, comparando membranas de diferente PMC.

CAPÍTULO VI

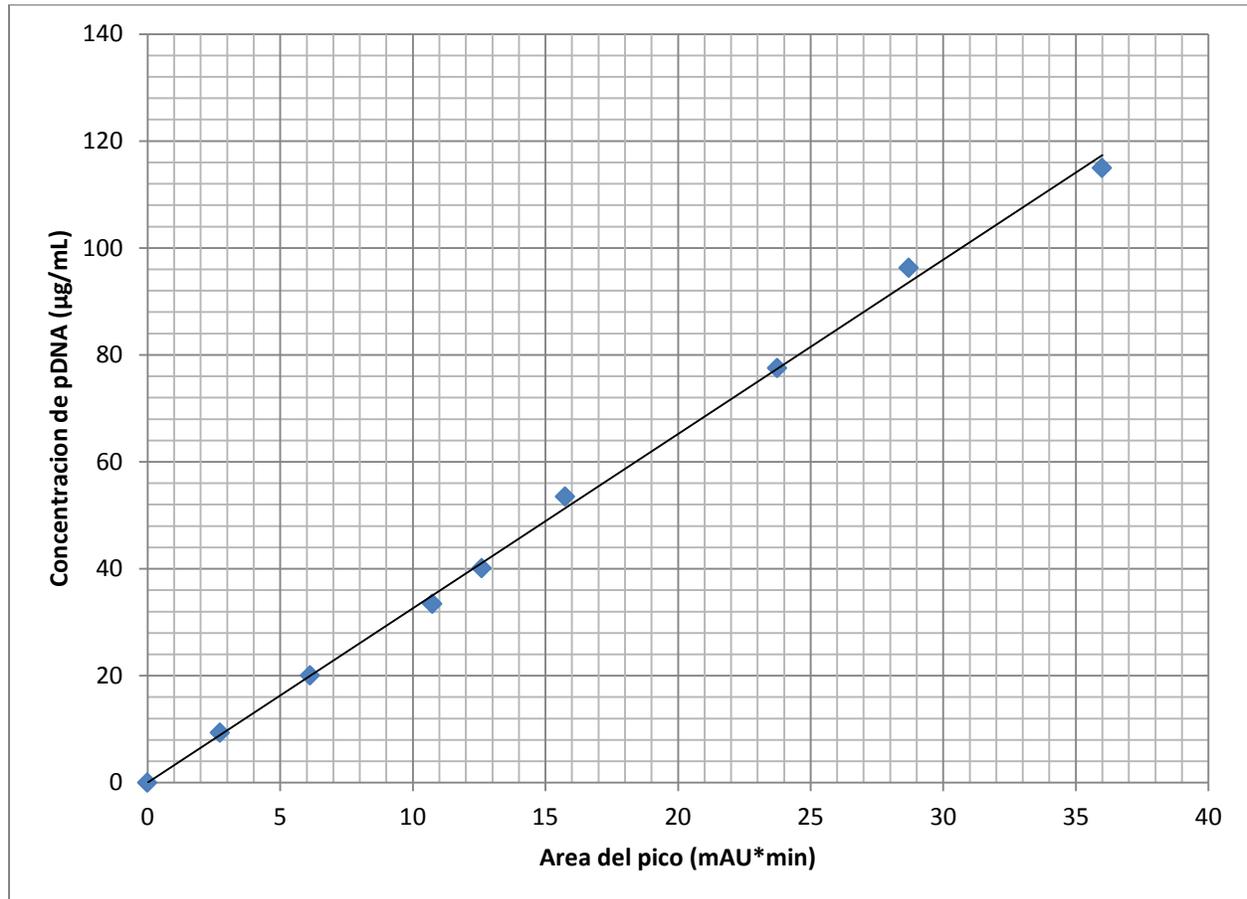
BIBLIOGRAFÍA

- AGER, K., LATULIPPE, D. R., ZYDNEY, A. L. 2009. Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 344, 123-128.
- ARKHANGELSKY, E., STEUBING, B., BEN-DOV, E., KUSHMARO, A., GITIS, V. 2008. Influence of pH and ionic strength on transmission of plasmid DNA through ultrafiltration membranes. *Desalination*, 227, 111-119.
- BENNEMO, M., BLOM H., EMILSSON A., LEMMENS R. 2009. A chromatographic method for determination of supercoiled plasmid DNA concentration in complex solutions. *Journal of Chromatography B*, 877, 2530-2536.
- BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7, 1513-23.
- CHARCOSSET, C. 2006. Membrane processes in biotechnology: An overview. *Biotechnology Advances*, 24, 482-492.
- CHARCOSSET, C. 2012. Ultrafiltration. *Membrane Processes in Biotechnologies and Pharmaceutics*. Amsterdam Elsevier, 44-99.
- DIOGO, M. M., QUEIROZ, J. A., PRAZERES, D. M. F. 2003. Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 998, 109-117.
- DIOGO, M. M., QUEIROZ, J. A., PRAZERES, D.M.F. 2005. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 1069, 3-22.
- EON-DUVAL, A., MACDUFF, R. H., FISHER, C. A., HARRIS, M. J., BROOK, C. 2003. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Analytical Biochemistry*, 316, 66-73.
- FREITAS, S., CANARIO, S., SANTOS, J. A. L., PRAZERES, D. M. F. 2009. Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnology Journal*, 4, 265-278.
- GHANEM, A., HEALEY, R., ADLY, F. G. 2012. Current Trends in Separation of Plasmid DNA Vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*, 760, 1-15.
- HAN, Y., LIU, S., HO, J., DANQUAH, M. K., FORDE, G. M. 2009. Using DNA as a drug-Bioprocessing and delivery strategies. *Chemical Engineering Research and Design*, 87, 343-348.
- HOLMES, D. S., QUIGLEY, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114, 193-197.
- KELLY, W. J. 2003. Perspectives on plasmid-based gene therapy: challenges for the product and the process. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 219-223.
- KENDALL, D., LYE, G. J., LEVY, M. S. 2002. Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption. *Biotechnology and bioengineering*, 79, 816-22.
- LATULIPPE, D. R., AGER, K., ZYDNEY, A. L. 2007. Flux-dependent transmission of supercoiled plasmid DNA through ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 294, 169-177.

- LATULIPPE, D. R., ZYDNEY, A. L. 2011. Separation of plasmid DNA isoforms by highly converging flow through small membrane pores. *Journal of Colloid And Interface Science*, 357, 548-553.
- LIU, M. A. 1996. Overview of DNA Vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 772, 15.
- MANOJ, S., BABIUK, L., DEN HURK, S. 2004. Approaches to Enhance the Efficacy of DNA Vaccines. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41, 1-39.
- MARQUET, M., HORN, N. A., MEEK, J. A. 1997. Characterization of Plasmid DNA Vectors for Use in Human Gene Therapy, Part 1. *BioPharm*, 10, 42-51.
- NG, P. LUNDBLAT, J., MITRA, G. 1976. Optimization of Solute Separation by Diafiltration. *Separation Science Separation Science*, 11, 499-502.
- ORR, V., SCHARER, J., MOO-YOUNG, M., HONEYMAN, C. H., FENNER, D., CROSSLEY, L., SUEN, S.-Y., CHOU, C. P. 2012. Simultaneous clarification of Escherichia coli culture and purification of extracellularly produced penicillin G acylase using tangential flow filtration and anion-exchange membrane chromatography (TFF-AEMC). *Journal of Chromatography B*, 900, 71-78.
- PRAZERES, D.M.F., MONTEIRO, G.A. 2007. DNA Vaccines; Construction, Production and *in vivo* Testing. PEREIRA, M. (ed.) *A Portrait of State-of-the-Art Research at the Technical University of Lisbon*. Springer Netherlands, 220-232.
- PRAZERES, D. M., MONTEIRO, G. A., FERREIRA, G. N., DIOGO, M. M., RIBEIRO, S. C., CABRAL, J. M. 2001. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology annual review*, 7, 1-30.
- PRAZERES, D. M. F., FERREIRA, G. N. M., MONTEIRO, G. A., COONEY, C. L., CABRAL, J. M. S. 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in Biotechnology*, 17, 169-174.
- PRAZERES, D. M. F., SCHLUEP, T., COONEY, C. 1998. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 806, 31-45.
- ROBINSON, H. L., GINSBERG, H. S., DAVIS, H. L., JOHNSTON, S. A., LIU, M. A. 1997. The scientific future of DNA for immunization. *The American Academy of Microbiology Colloquium*, 1-34.
- SCHLEEF, M., BLAESSEN, M. 2009. Production of plasmid DNA as a pharmaceutical. *Methods in Molecular Biology*, 542, 471-95.
- SCHLEEF, M., SCHMIDT, T. 2004. Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *The journal of gene medicine*, 6, 45-53.
- SHAMLOU, P. A. 2003. Scaleable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37, 207-18.
- STADLER, J., LEMMENS, R., NYHAMMAR, T. 2004. Plasmid DNA purification. *The Journal of Gene Medicine*, 6, S54-S66.
- TEJEDA M, A., MONTESINOS C, R. M., GUZMAN Z, R. 1995. Ultrafiltración. *Bioseparaciones*, Hermosillo, Sonora, Unison.
- ULMER, J. B., SADOFF, J. C., LIU, M. A. 1996. DNA vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 8, 531-536.
- URTHALER, J., BUCHINGER, W., NECINA, R. 2005. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta biochimica Polonica*, 52, 703-11.
- VAN REIS, R., GHADAM, S., FRAUTSCHY, L. N., ORLANDO, S., GOODRICH, E. M., SKAND, S., KURIYEL, R., SIMPSON, C. M., PEARL, S., ZYDNEY, A. L. 1997. High performance tangential flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 71-82.
- VAN REIS, R., ZYDNEY, A. 2007. Bioprocess membrane technology. *Journal of Membrane Science*, 297, 16-50.

ANEXOS

Anexo A. Curva Patrón para Cálculo de Concentración de pVAX1-NH36.



$$C_{pDNA} = 3.259A \quad (15)$$

Donde C_{pDNA} es la concentración de pDNA en $\mu\text{g/mL}$ y A es el área del pico del cromatograma a los 0.68min ($\text{mAU}\cdot\text{min}$).

Anexo B. Protocolo de limpieza de la membrana de ultrafiltración GE

Enjuague/Purgado: Antes de limpiar, es necesario purgar nuestra membrana de los residuos de alimentación presentes en el cartucho, esto se puede llevar a cabo con una solución tibia (50°C) de Agua desionizada, solución salina o amortiguadora.

Calidad del agua: El agua para limpieza y enjuague debe contener <0.05 ppm hierro, <25 ppm calcio y magnesio. Debe estar libre de partículas, aceites y grasas. Es ideal utilizar agua destilada, o ultrafiltrada.

Temperatura: La limpieza a temperatura ambiente NO es recomendable. La limpieza debe ser realizada a una temperatura de 50°C, con el fin de disminuir los enlaces entre la membrana y las superficies adheridas, así como para aumentar la solubilidad de los residuos de la alimentación. Se recomienda un aumentar la temperatura gradualmente a una tasa de 1°C/min.

Tiempo: El tiempo que se recomienda para una limpieza por recirculación es de 1 hora. La reducción o ampliación de este intervalo, dependerá del grado de incrustación de la membrana. En muchos casos, el sumergir la membrana en la solución de limpieza durante la noche incrementa la efectividad del ciclo de limpieza.

Ciclos de lavado con hipoclorito de sodio: El hipoclorito de sodio es muy volátil, por lo que al realizar lavados con esta solución es necesario monitorear la concentración presente y reponerlo cuando sea necesario.

Seguridad: Las soluciones causticas y acidas, así como el hipoclorito de sodio y otras sustancias químicas de limpieza deben ser manejadas con precaución. Es necesario utilizar las medidas de seguridad indicadas para cada una de estas sustancias.

Anexo C. Tablas de registro de datos experimentales

Tabla 12. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración con agua desionizada en alimentación

#	P inlet (psig)	P outlet (psig)	P filtrate (psig)	Δ TMP (psig)	Δ TMP (kg/cm ²)	V filtrate (mL)	Time (s)	Q (mL/s)	J (mL/cm ² s)
1	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0000	0.0	60	0.00000	0.00000
2	5.1	0.5	0.0	2.80	0.20	1.0	63	0.01587	0.00099
3	5.8	1.8	0.0	3.80	0.27	1.5	60	0.02500	0.00156
4	5.4	2.5	0.0	3.95	0.28	1.0	35	0.02857	0.00179
5	6.8	6.2	0.0	6.50	0.46	0.5	13	0.03846	0.00240
6	8.0	7.5	0.0	7.75	0.55	2.0	36	0.05556	0.00347
7	11.3	10.5	0.0	10.90	0.77	2.0	29	0.06897	0.00431
8	13.0	12.6	0.0	12.80	0.90	1.0	12	0.08333	0.00521

Tabla 13. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración para la solución C1

#	P inlet (psig)	P outlet (psig)	P filtrate (psig)	Δ TMP (psig)	Δ TMP (kg/cm ²)	V filtrate (mL)	Time (s)	Q (mL/s)	J (mL/cm ² s)
1	1.0	0.0	0.0	0.50	0.04	1.0	147	0.00680	0.00043
2	1.8	0.5	0.0	1.15	0.08	1.0	80	0.01250	0.00078
3	4.3	3.3	0.0	3.80	0.27	1.0	33	0.03030	0.00189
4	6.7	5.5	0.0	6.10	0.43	1.0	24	0.04167	0.00260
5	10.0	9.0	0.0	9.50	0.67	0.7	18	0.03889	0.00243
6	18.0	17.2	0.0	17.6	1.25	1.0	18	0.05556	0.00347

Tabla 14. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración para la solución C2

#	P inlet (psig)	P outlet (psig)	P filtrate (psig)	Δ TMP (psig)	Δ TMP (kg/cm ²)	V filtrate (mL)	Time (s)	Q (mL/s)	J (mL/cm ² s)
1	0.8	0.0	0.0	0.40	0.03	1.0	325	0.00308	0.00019
2	1.5	0.5	0.0	1.00	0.07	1.0	129	0.00775	0.00048
3	5.5	4.0	0.0	4.75	0.33	1.0	44	0.02273	0.00142
4	6.7	5.7	0.0	6.20	0.43	1.0	35	0.02857	0.00179
5	11.7	10.5	0.0	11.10	0.78	1.0	30	0.03333	0.00208
6	19.0	17.0	0.0	18.00	1.26	0.5	14	0.03571	0.00223

Tabla 15. Datos experimentales del sistema de ultrafiltración para la solución C3

#	P inlet (psig)	P outlet (psig)	P filtrate (psig)	Δ TMP (psig)	Δ TMP (kg/cm ²)	V filtrate (mL)	Time (s)	Q (mL/s)	J (mL/cm ² s)
1	0.8	0.0	0.0	0.40	0.03	1.0	345	0.00290	0.00018
2	1.5	0.5	0.0	1.00	0.07	1.0	120	0.00833	0.00052
3	1.8	0.8	0.0	1.30	0.09	0.4	46	0.00870	0.00054
4	3.8	2.7	0.0	3.25	0.23	1.2	62	0.01935	0.00121
5	4.5	3.0	0.0	3.75	0.26	1.0	51	0.01961	0.00123
6	6.5	5.5	0.0	6.00	0.42	1.0	44	0.02273	0.00142
7	9.8	8.5	0.0	9.15	0.64	1.0	40	0.02500	0.00156
8	12	11.0	0.0	11.50	0.81	1.2	40	0.03000	0.00188
9	17.5	16.5	0.0	17.00	1.19	0.5	17	0.02941	0.00184