



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO POR CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN MEMBRANAS Y EN PARTÍCULAS PERFUSIVAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

DIANA IVONNE FRANCO MEDRANO

DIRECTOR: DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN

Hermsillo, Sonora

Septiembre, 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACION DEL JURADO

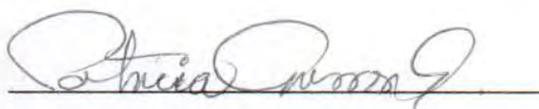
de la tesis presentada por:

Diana Ivonne Franco Medrano

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

11-septiembre- 2015

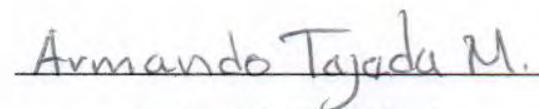
Fecha



Dra. Patricia Guerrero Germán

11-septiembre- 2015

Fecha



Dr. Armando Tejada Mansir

11-septiembre- 2015

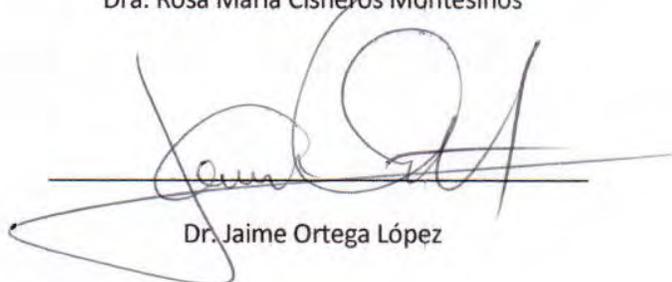
Fecha



Dra. Rosa María Cisneros Montesinos

11-septiembre- 2015

Fecha



Dr. Jaime Ortega López



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Septiembre 14 de 2015.

Por la presente se hace constar que la estudiante: **DIANA IVONNE FRANCO MEDRANO**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

DR. JESUS FERNANDO HINOJOSA PALAFOX
COORDINADOR
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

RESUMEN

En la actualidad la demanda de DNA plasmídico (pDNA) de alta pureza se ha incrementado en respuesta a los rápidos avances en su uso en terapias génicas y vacunas; éstas se basan en el mismo principio: la introducción de genes en células receptoras para restaurar, cancelar, mejorar o introducir una función bioquímica. El desarrollo de una operación unitaria eficiente y rentable de captura de las moléculas de pDNA de grandes volúmenes de lisado representan un gran reto. Existen varios protocolos y kits comerciales en escala de laboratorio, sin embargo, estos no son adecuados para la purificación de pDNA terapéutico en gran escala, debido a la utilización de materiales tóxicos y / o dificultades en el proceso de escalamiento. Un bioproceso típico consta de cuatro etapas: propagación celular, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. Esta última es crucial para obtener un producto de alta pureza libre de contaminantes. La cromatografía es la única operación unitaria aceptable para la captura y purificación del plásmido. De los tipos de cromatografía que existen, el intercambio iónico resulta favorable para la captura del DNA debido a su estructura química. Previo a la purificación final por cromatografía de intercambio iónico, es pertinente realizar estudios de pre-purificación de un lisado para recuperar y concentrar el pDNA, así que fue necesario describir el comportamiento de la ultrafiltración de flujo tangencial (TFF) en la recuperación intermedia del plásmido pVAX1-NH36 a partir de lisados de cultivos de *E.coli*. El principio de separación que se basa en la diferencia de tamaños, garantiza el paso de las moléculas de RNA, proteínas, endotoxinas, sales y otros contaminantes presentes en el lisado, a través de la membrana y reteniendo el pDNA. En esta investigación se utilizó una membrana de fibra hueca con tamaño de poro de 300 kDa. El objetivo de esta investigación fue describir y analizar el comportamiento de la pre-purificación de pVAX1-NH36 por ultrafiltración de flujo tangencial en modo batch; así como describir, analizar y comparar la purificación por cromatografía de intercambio iónico en columnas empacadas con membranas y con partículas perfusivas como fase estacionaria, utilizando gradientes salinos. Se utilizaron membranas Mustang Q con poros de 800

nm y partículas superporosas perfusivas POROS 50 HQ poros perfusivos de 600-800 nm y poros difusivos de 80-150 nm para determinar cuál promete más ventaja. Se alimentaron a las columnas en modo frontal lisados pre-purificados mediante ultrafiltración tangencial. Las columnas fueron eluidas mediante un gradiente salino que permitió obtener una fracción de pDNA purificado en cada caso, de acuerdo a los resultados de los análisis de electroforesis en gel de agarosa y Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofóbica de Alta Resolución (HPLC-HIC).

ABSTRACT

Nowadays the demand for plasmidic DNA (pDNA) of high purity has increased in response to the rapid advances in use in gene therapies and vaccines, these are based on the same principle: the introduction of genes into recipient cells to restore, cancel, improve a biochemical function. The development of an efficient and profitable unit operation for capturing pDNA molecules of large volumes of lysate represent a great challenge. Several protocols and commercial kits on a laboratory scale, however, these are not suitable for the purification of therapeutic pDNA on a large scale-up due to the use of toxic materials and / or problems in the scaling process. A typical bioprocess involves four steps: fermentation, primary recovery, intermediate recovery and final purification. Final purification is crucial for achieve high purity product contaminants free. Chromatography is the only unit operation acceptable for capture and purification of the plasmid. There are many different types of chromatography; due to DNA chemical structure, the ion exchange chromatography is favorable for their capture. Prior to final purification step by ion exchange chromatography, pre-purification studies of lysates must be carried out to recover and concentrate the pDNA, consequently it was necessary to describe the behavior of the tangential flow filtration (TFF) of pVAX1-NH36 lysates in the intermediate recovery from *E.coli* cultures. Separation principle is based on size differences between RNA molecules, proteins, endotoxins, salts and others contaminants in the lysate through the membrane and retaining the pDNA. A 300 kDa pore size hollows fibers membrane was used in this investigation. This research was directed to describe and analyze the behavior of the plasmid pre-purification pVAX1-NH36 by tangencial flow filtration; as well as to describe, analyze and compare the purification by ion exchange chromatography on packed columns with membrane and beads as stationary phase using a salt gradients. There were used Mustang Q membranes with 800 nm pore-size and perfusive beads POROS 50 HQ with perfusives pores (600-800 nm) and diffusive pores (80-150 nm) pore-size, to determine which one promises more advantage. Pre-purified lysates pretreated by hollow-fiber tangential ultrafiltration were fed to the columns by frontal anion exchange membrane

chromatography. The capture of pDNA was performed using a salt gradient in each column; agarose gel electrophoresis and High Performance Hydrophobic Interaction Chromatography (HPLC-HIC) verified the results.

DEDICATORIA

Para los que siempre han estado...

Guadalupe, Mane, B. Ronaldo, Ernesto, RFG.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XVII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivo General	3
1.4 Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO 2.....	3
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
2.1 Terapia génica y vacunación	4
2.2 Características de los plásmidos	6
2.2.1 Características del pVAX1-NH36.....	7
2.3 Proceso de obtención de pDNA	9
2.3.1 Fermentación	13

2.3.2	Recuperación Primaria.....	14
2.3.3	Recuperación Intermedia.....	15
2.3.4	Purificación Final.....	18
2.4	Electroforesis en gel de agarosa.....	27
2.5	Cromatografía de interacción hidrofóbica	28
CAPÍTULO 3.....		30
MATERIALES Y MÉTODOS		30
3.1	Materiales y Equipos.....	30
3.2	Metodología	37
3.2.1.	Fermentación	37
3.2.2.	Recuperación primaria	38
3.2.3.	Recuperación intermedia	40
3.2.4.	Purificación final	42
3.2.5.	Análisis de muestras	47
CAPÍTULO 4.....		50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		50
4.1	Fermentación	50
4.2	Recuperación primaria.....	51
4.3	Recuperación Intermedia	54
4.3.1	Determinación de volúmenes de diafiltración de un lisado	54
4.3.2	Solución Base	57
4.4	Purificación Final	62
4.4.1	Determinación de las condiciones de operación en las columnas de intercambio iónico.....	62
4.4.2	Solución Base	66

CAPÍTULO 5.....	79
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
5.1 Conclusiones	79
5.2 Recomendaciones	81
CAPÍTULO 6.....	83
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXOS	90
Anexo A: Curva de calibración	90
Anexo B: Purificación de Solución Atípica de Baja Concentración (Solución A)	91
Recuperación Primaria	91
Recuperación Intermedia	92
Purificación Final	96
Anexo C: Análisis de inóculos	104
Anexo D: Preparación de Soluciones.....	105
Anexo E: Cursos y participaciones	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de las vacunas de DNA.....	5
Figura 2. Representación esquemática de la estructura del DNA.....	7
Figura 3 . pVAX1-NH36.....	8
Figura 4 . Impurezas eliminadas en todas las etapas del proceso de purificación del plásmido.....	10
Figura 5 . Esquema general del bioproceso para la obtención del pDNA.....	12
Figura 6 . Esquema general de la lisis alcalina para la obtención del plásmido.....	15
Figura 7 . Modo de operación estándar para ultrafiltración de flujo tangencial.....	16
Figura 8. Principales tipos de separación por cromatografía	18
Figura 9. Equilibración de la columna con buffer de equilibrio.....	20
Figura 10 . Aplicación de la muestra en la columna	21
Figura 11 . Etapa de elución de las especies	21
Figura 12. Comparativo entre los sitios de adsorción en las partículas y membranas de intercambio iónico.....	23
Figura 13 . Representación de las interacciones del pDNA con una partícula porosa	24
Figura 14 . Modo de operación estándar en cromatografía frontal de intercambio iónico en membranas.....	25
Figura 15 . Micrografía de de una partícula perfusiva, distribución del flujo sobre y a través de partículas perfusivas de intercambio iónico.....	27
Figura 16 . Método de electroforesis en gel de agarosa.....	28
Figura 17 . Método de cuantificación de pDNA por HIC.....	29
Figura 18 . Incubadora, Orbital Shaker Incubator. VWR.....	31
Figura 19. Biorreactor Applikon® de 2L acoplado al software ez-Control.....	31
Figura 20. Centrifuga Thermo Fisher Scientific®.....	32
Figura 21. Sistema de Ultrafiltración tangencial.....	33
Figura 22. Columna Tricorn	34

Figura 23. Columna de interacción hidrofóbica HIC Source 15PHE	34
Figura 24. Sistema Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare®.....	35
Figura 25. Cámara de electroforesis, Multi-Doc	36
Figura 26. Diagrama general del bioproceso para la producción de plásmido pVAX1-NH36	37
Figura 27. Preparación del inóculo y fermentación para la producción de plásmido pVAX1-NH36	38
Figura 28. Procedimiento general para la ruptura celular y la obtención de una solución clarificada.....	39
Figura 29. Sistema de ultrafiltración para diafiltración de solución clarificada	41
Figura 30. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la etapa de purificación final de pDNA.....	42
Figura 31. Membranas Mustang Q coin	43
Figura 32. Ajuste de tamaño de membranas para poder ser empacadas en la columna Tricorn.	43
Figura 33. Empaque de columna intercalando membranas y soporte de propileno. ...	44
Figura 34. Partículas perfusivas POROS 50 HQ	45
Figura 35. Lavado Partículas perfusivas en una solución de NaCl 1M y 0.5 M.	45
Figura 36. Empaque de columna Tricorn intercalando membranas y soporte de propileno.	46
Figura 37 . Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC	49
Figura 38. Cinética de crecimiento celular en modo batch.....	50
Figura 39. Tinción gram del cultivo de <i>E. coli</i> DH5α.	51
Figura 40. Biomasa obtenida por centrifugación, flóculos formado de restos celulares e impurezas después de lisis alcalina y neutralización	52
Figura 41. Gel de electroforesis del lisado clarificado por centrifugación.....	53
Figura 42. Análisis del lisado clarificado por centrifugación por HIC-HPLC.....	54
Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa del clarificado alimentado, retenidos y filtrados en cada lavado	55
Figura 44. Cromatograma analítico del lisado alimentado en la ultrafiltración tangencial y de retenido en cada volumen de lavado.....	56
Figura 45. Cuantificación de plásmidos e impurezas en retenidos de la Solución B en cada VD en la etapa de purificación por TFF.	58

Figura 46. Relación de la concentración de pDNA y pureza de 100 mL de solución B, concentrado FC = 2, en el procesamiento por TFF usando 3 L de Tris 10 mM-HCl pH 7.5.	59
Figura 47. Cuantificación de plásmidos e impurezas en filtrados de cada VD en la etapa de prepurificación por TFF.	61
Figura 48. Electroforesis en gel de plásmido e impurezas en la etapa de prepurificación por TFF.	62
Figura 49. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas. ..	63
Figura 50. Perfil de concentración adimensional en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.	64
Figura 51. Análisis HPLC-HIC del pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas.	66
Figura 52. Curva de ruptura en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.	67
Figura 53. Curva de ruptura en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas; gel de electroforesis de la las fracciones a la salida de la columna	68
Figura 54. Curva de ruptura en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con membranas; gel de electroforesis de la las fracciones a la salida de la columna	69
Figura 55. Curva de ruptura en forma normalizada en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.	70
Figura 56. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando el método B en columnas empacadas con partículas y membranas.	72
Figura 57. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando el método B en columnas empacadas con membranas; análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa.	73

Figura 58. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando el método B en columnas empacadas con partículas; análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa.....	74
Figura 59. Análisis HPLC-HIC del lisado, pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas (solución B1).	76
Figura 60. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del lisado, pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas (solución B1).....	77
Figura 61. Curva de calibración estándar obtenida por análisis HIC-HPLC.....	90
Figura 62. Análisis del lisado clarificado A por centrifugación por electroforesis en gel de agarosa.	91
Figura 63. Cromatograma analítico del lisado clarificado por centrifugación (Solución A).	92
Figura 64. Cuantificación de plásmidos e impurezas en la etapa de prepurificación por TFF (Solución A).....	93
Figura 65. Cuantificación de plásmidos e impurezas en la etapa de pre-purificación por TFF (Solución A) 4VD-6VD.	94
Figura 66. Electroforesis en gel de plásmido e impurezas en la etapa de prepurificación por TFF.....	96
Figura 67. Análisis HPLC-HIC de la solución alimentada en las columnas de intercambio iónico.	97
Figura 68. Electroforesis en gel de la solución alimentada a las columnas	98
Figura 69. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas. ..	99
Figura 70. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con membranas; análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa.	100
Figura 71. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas; análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa	101

Figura 72. Análisis HPLC-HIC del lisado, pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas (solución B1).	103
Figura 73. Análisis HPLC-HIC inóculos congelados disponibles.....	104

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas de las vacunas de DNA.....	6
Tabla 2. Composición típica de lisado de células bacterianas y características físicoquímicas de los principales componentes.	11
Tabla 3. Programas de Cromatografía de intercambio iónico utilizados en la experimentación.....	46
Tabla 4. Análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD.....	57
Tabla 5. Análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD.....	60
Tabla 6. Balance de masa en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.	65
Tabla 7. Balance de masa en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.	71
Tabla 8. Balance de masa en las etapas de adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas (Solución B1)	75
Tabla 9. Análisis de concentración y pureza del lisado, pre-purificado y fracciones eluidas purificadas.....	78
Tabla 10. Análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD.....	95
Tabla 11. Balance de masa en las etapas de adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas (Solución A)	102

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS), al Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia (DIQM), al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) y al CONACYT por los apoyos otorgados, Proyecto CB2012/179779.

A mi directora de tesis, Dra. Patricia Guerrero por el apoyo siempre brindado durante este trabajo de investigación, por su tiempo, conocimientos y paciencia, siempre han sido de mucha ayuda.

Al Dr. Armando Tejeda Mansir por facilitarme el uso del Laboratorio de Bioprocesos en la realización de la etapa experimental de la investigación, igualmente agradezco su tiempo y conocimientos compartidos.

A mi comité de tesis, conformado por la Dra. Rosa María Montesinos y el Dr. Jaime Ortega, por su apoyo y contribuciones brindadas.

Sin olvidar a mis compañeros en el Laboratorio de Bioprocesos, Cindy, Adriana, Jesús Iván, Alonso y Aurora por estar a mi lado durante los experimentos realizados, por compartir las buenas y malas experiencias, muchísimas gracias a todos.

Finalmente quiero agradecer a las personas que siempre han estado apoyándome en el transcurso de mi vida, a mis amigos Vania, Tania y Gonzalo, por darme tres hermanos más; a mi padre Roberto, que desde pequeña siempre alentó mis ideas y actividades; a mi madre Guadalupe por ser tan fuerte y siempre estar al pendiente de sus hijos en todos los detalles, por sacar adelante mi educación y fomentarla; a mi adorada Mane, que siempre ha estado como apoyo incondicional en todos los sentidos, siendo siempre mi otra mamá; a mis hermanos Gabriela y Roberto; a José Ángel por esas pláticas tan agradables en los desayunos donde intercambiábamos puntos de vista; a José Ronaldo, que siempre ha sido un gran apoyo; a Ronaldo, que

aunque ya no esté aquí, no existen palabras para agradecerle todo lo que siempre hizo, siempre serás uno de mis mayores ejemplos, abuelo; a mi compañero de vida que siempre ha apoyado mis decisiones, por ser la persona que admiro todos los días y por ser el eje fundamental de este proyecto de vida que emprendimos hace más de una década contra de viento y marea. Gracias a todos.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

La demanda de DNA plasmídico (pDNA) de alta pureza se ha incrementado en respuesta a los rápidos avances en su uso en terapias génicas y vacunación. Ambas técnicas se basan en la introducción de genes en células receptoras para restaurar, cancelar, mejorar o introducir una función bioquímica (Duarte y col., 2007). Tanto los vectores virales y no virales pueden llevar a cabo el transporte de los genes terapéuticos hacia los núcleos de las células blanco, sin embargo los vectores pDNA, que son vectores no virales, son considerados más seguros, simples de usar y fáciles de producir a gran escala (Prazeres y col., 2001). Consecuentemente el uso de vectores pDNA en tratamientos preclínicos y clínicos de terapia génica y vacunas de DNA ha incrementado la necesidad de producción de grandes cantidades de pDNA, altamente puro, es decir con grado terapéutico o farmacéutico (Diogo y col., 2005).

El desarrollo de un bioproceso eficiente de captura de las moléculas de pDNA de grandes volúmenes de lisado representan un gran reto (Zhang y col., 2003). Mientras que hace unos años las expectativas de producción anual de plásmidos eran en gramos, ahora las cantidades en kilogramos o toneladas se consideran posibles (Prather y col., 2003). Existen varios protocolos y kits comerciales para la purificación de plásmidos en escala de laboratorio, sin embargo, estos no son adecuados para la purificación de pDNA terapéutico en gran escala, debido a la utilización de materiales tóxicos y/o dificultades en el proceso de escalamiento (Sofer y Hagel 1997). Deben evitarse los materiales utilizados en protocolos de biología molecular para el aislamiento del pDNA, tales como enzimas de origen animal (por

ejemplo, RNasa, lisozima); disolventes tóxicos (por ejemplo, cloroformo, fenol) (European Medicines Agency, EMEA).

Un bioproceso típico consta de cuatro etapas: propagación celular, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación final. Esta última es crucial para obtener un producto de alta pureza, libre de contaminantes. La cromatografía es la única operación unitaria aceptable para la captura y purificación del plásmido (Diogo y col., 2005). De los tipos de cromatografía que existen, el intercambio iónico resulta favorable para la captura del DNA debido a su estructura química (Diogo y col., 2005). Las membranas de intercambio aniónico tienen grandes poros convectivos que permiten al pDNA acceder fácilmente en todos los sitios activos, incluso con velocidades de flujo de flujo muy altas. De igual manera, el uso de una fase estacionaria de intercambio aniónico en forma de partículas, puede simplificar la purificación de plásmidos a gran escala (Zhang y col., 2003).

Existen estudios del uso de la cromatografía de intercambio aniónico con membranas perfusivas (Montesinos y col., 2007, Gutiérrez 2011) y con partículas superporosas perfusivas (Tianen y col., 2007, Posadas 2012), en ambos casos se han obtenido resultados muy efectivos para purificar plásmido de grado farmacéutico. Sin embargo es necesario realizar una comparación cuantitativa y cualitativa entre estos procedimientos para determinar cual ofrece más ventaja en cuanto a la recuperación de pDNA.

1.2 Justificación

Es pertinente realizar estudios de pre-purificación de un lisado para recuperar y concentrar el pDNA y a partir de esta solución, evaluar el comportamiento de la purificación por medio de cromatografía de intercambio iónico, utilizando como fase estacionaria membranas y partículas perfusivas, para analizar ambas matrices en cuanto a la adsorción y recuperación de plásmido superenrollado para que pueda ser una propuesta para un proceso escalable.

1.3 Objetivo General

Describir y analizar el comportamiento de la pre-purificación de pVAX1-NH36 por ultrafiltración de flujo tangencial; así como describir, analizar y comparar la purificación por cromatografía de intercambio iónico en columnas empacadas con membranas y con partículas perfusivas utilizando gradientes salinos.

1.4 Objetivos Específicos

- Estudiar el comportamiento de un lisado clarificado por medio de ultrafiltración de flujo tangencial a través de su concentración y pureza.
- Obtener las curvas de ruptura de los sistemas pVAX1-NH36 – membranas y pVAX1-NH36 – partículas de intercambio iónico.
- Determinar las condiciones de operación en las fases de lavado y elución por cromatografía frontal, tanto en membranas como en partículas perfusivas de intercambio iónico.
- Comparar en base a la concentración de plásmido obtenido y su calidad, el comportamiento de ambos sistemas.
- Determinar el rendimiento global del proceso en ambos sistemas.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Terapia génica y vacunación

Las vacunas tradicionales se basan en la administración de antígeno producido ex vivo en huéspedes. Sin embargo, el hallazgo en 1993 de que los ratones inyectados con un plásmido que codifica un antígeno viral podría desarrollar tanto las respuestas humorales y celulares (Figura 1), abrió el camino para el desarrollo de un nuevo tipo de vacunas (Prazeres y col., 2007). Las vacunas y medicamentos de DNA son tecnologías novedosas que ofrecen la promesa de una nueva forma de tratar a los seres humanos y animales con materiales que son enteramente basados en genes. El pDNA puede encontrar aplicación como vacunas preventivas (para las enfermedades virales, bacterianas o parasitarias), agentes inmunizantes (para la preparación de productos de globulina hiperinmune), vacunas terapéuticas (enfermedades infecciosas, alergia, autoinmune), vacunas contra el cáncer, o vectores de terapia génica (Carnes y Williams, 2007). El pDNA puede ser transportado por sistemas de vectores virales (por lo general relacionados con adenovirus) o no virales; éstos últimos incluyen el uso de vectores sintéticos y/o la aplicación directa de pDNA (Brand y col., 2012). El desarrollo de una vacuna de DNA es un proceso complejo, multidisciplinario, que requiere la investigación básica y aplicada y presenta muchas oportunidades a los científicos e ingenieros (Prazeres y col., 2007). Su implementación requiere de continuos esfuerzos en investigación básica, investigación aplicada y desarrollo del producto (Diogo y col., 2001).

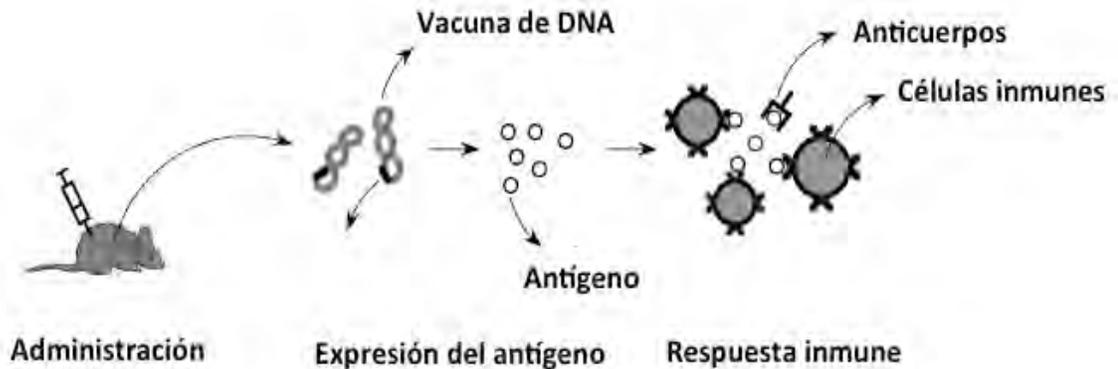


Figura 1. Modo de acción de las vacunas de DNA (Prazeres y col., 2007).

La capacidad de diseñar moléculas de DNA racionalmente hace posible omitir años de desarrollo para la producción de vacunas eficaces. Literalmente, nuevas vacunas pueden crearse en días y producirse en masa en 2-3 semanas contra los nuevos agentes biológicos. En contraste, las vacunas tradicionales basadas en virus requieren de aproximadamente 6 meses (Williams y col., 2009). Por lo tanto, las vacunas de DNA tienen el potencial de ser la plataforma más utilizada de vacunación para la aplicación en pandemias (Carnes y col., 2007). Es claro que la demanda de grandes cantidades de pDNA será grande, en vista del gran potencial de la aplicación y bajo costo en la producción de vacunas y terapia génica (Diogo y col., 2001, Freitas y col., 2007). Sin embargo, es importante conservar la forma superenrollada del plásmido y adicionalmente reducir el contenido de endotoxinas, en consecuencia, son necesarios pasos extra de purificación y pulido (Stadler y col., 2004).

Tabla 1. Ventajas de las vacunas de DNA (Ghanem y col., 2013)

-
- El DNA es de bajo costo en comparación con las proteínas aisladas o a los organismos utilizados para las vacunas convencionales.
 - Las vacunas de DNA pueden dar lugar a la producción antígenos de más larga duración, ya no son necesarios las vacunas de refuerzo.
 - Produce respuestas inmunes más fuertes que las vacunas convencionales.
 - Estabilidad de la vacuna para el almacenamiento y el envío.
 - Vacunación sin riesgo por infección.
 - Facilidad de desarrollo y producción.
-

2.2 Características de los plásmidos

Los plásmidos son grandes moléculas de DNA extra-cromosómico de doble hélice circulares cerradas, cada hebra de una molécula de pDNA es un polímero lineal de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, cargadas muy negativamente en valores de pH mayor a 4 y coeficientes de difusión bajos (Sum y col., 2014). El interior de la doble hélice es altamente hidrófobo debido al empaquetamiento de las bases aromáticas.

Los plásmidos se biosintetizan por la replicación autónoma en *Escherichia coli* recombinante, una bacteria con un historial de uso seguro en la bioindustria como productor de muchas proteínas recombinantes (Ghanem y col., 2013, Diogo y col., 2005); y por lo general llevan genes que codifican para resistencia a los antibióticos, la producción de toxinas y la descomposición de los productos naturales; de éstos, la resistencia a la kanamicina es utilizado en muchos de los vectores (Carnes y Williams, 2007). Hay tres formas posibles de un plásmidos: superenrollado, circular abierto y lineal, independiente del DNA cromosómico y DNA genómico (Figura 2). El plásmido superenrollado es un DNA de doble cadena circular que se enrolla helicoidalmente sobre sí misma para formar una super hélice. La forma superenrollada presenta mayor actividad biológica, y por lo general viaja el más rápido en un gel de agarosa debido a su forma compacta (Iuliano y col., 2002). La producción del pDNA en *E. coli* depende de muchos factores, incluyendo la interacciones entre el huésped, el vector del

plásmido y condiciones de crecimiento, tal como los componentes del medio y la estrategia utilizada en la fermentación (Sánchez-Casco y col., 2013).

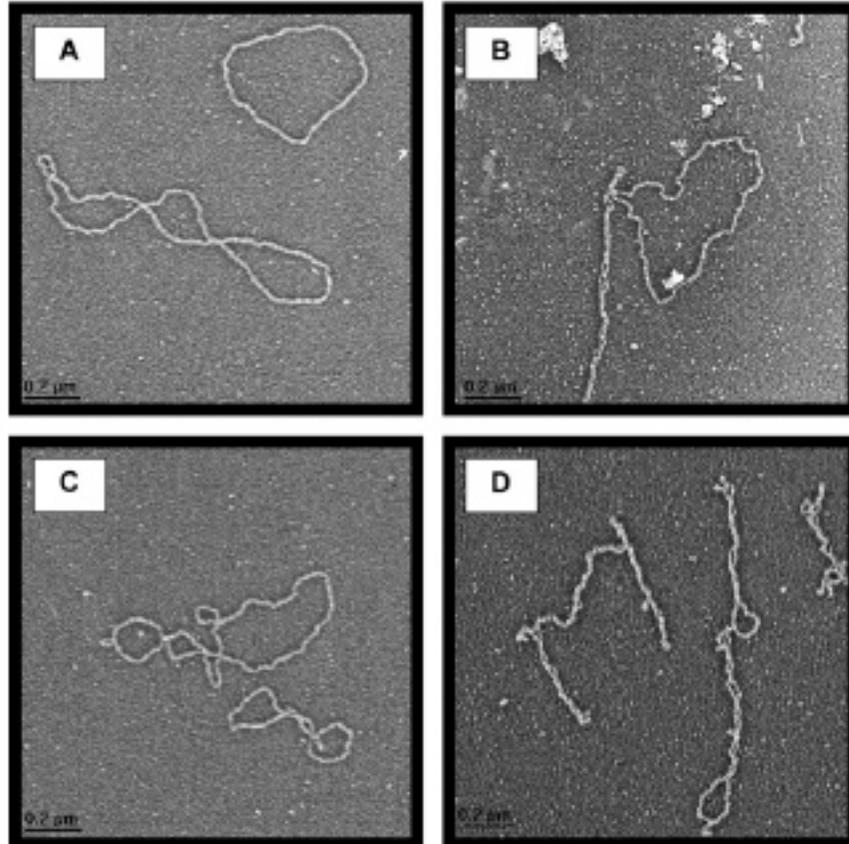


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del DNA a) Concatómeros de pDNA circular abierto; b) Catenano con pDNA superenrollado y circular abierto; c) Catenanos relajados; d) Concatómero superenrollado (Smith y col., 2007).

2.2.1 Características del pVAX1-NH36

El plásmido fue obtenido clonando un fragmento de DNA de NH36 en un vector pVAX (Invitrogen) (Sánchez-Casco y col., 2013). El pVAX1 es un plásmido vector de 3.0 kilo pares de bases (kpb) diseñado para su uso en el desarrollo de vacunas de DNA. El vector fue construido para cumplir con los requerimientos de la FDA. Las

características del vector permiten alto número de copias en la replicación en *E. coli* y la expresión transitoria de alto nivel de la proteína de interés.

El plásmido pVAX1-NH36 tiene un tamaño de 3936 pares de bases (pb) conteniendo un fragmento de DNA que codifica para la glicoproteína nucleósido hidrolaza (NH36) antígeno para *L. donovani*, expresada por la mayoría de las especies de *Leishmania*. La leishmaniasis es una enfermedad causada por los parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Sánchez-Casco y col., 2013, Aguilar-Be y col., 2005). Esta enfermedad puede ser clasificada en leishmaniasis visceral, si involucra la infección del hígado, el bazo, la médula espinal e inmunosupresión, causando severos daños y hasta la muerte de no ser atendida, o en leishmaniasis cutánea que se caracteriza por lesiones crónicas en la piel (Aguilar-Be y col., 2005). Ver Figura 3.

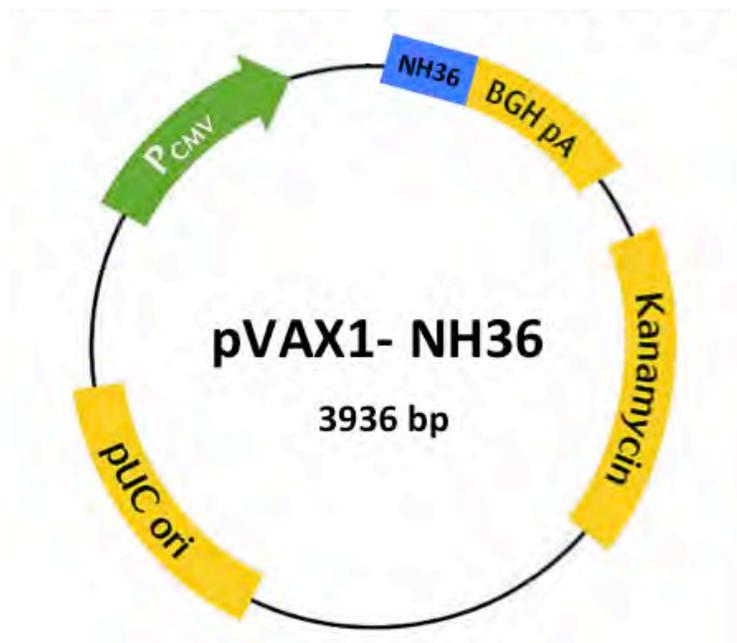


Figura 3 . pVAX1-NH36.

2.3 Proceso de obtención de pDNA

La purificación de pDNA de *E. coli* ha planteado desafíos únicos en comparación con la purificación de proteínas. Estos retos surgen debido a las similitudes químicas y físicas del pDNA con ácidos nucleicos de la célula huésped (Carnes y Williams, 2007). Un requisito para el éxito de las terapias basadas en plásmidos es el desarrollo de procesos rentables y producción genérica de pDNA. La introducción de pDNA en el ser humano presenta algunas consideraciones y retos especiales; el material debe estar disponible como preparaciones de pDNA circular superenrollado (sc) altamente puras (Stadler y col., 2004). Existen varias organizaciones encargadas de la protección de la salud pública que garantizan que los medicamentos y vacunas para uso humano sean seguros y eficaces; tal como, Organización Mundial de la Salud (OMS), la US Food and Drug Administration (FDA), la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) (Carnes y col., 2009, Freitas y col., 2009). Todo el proceso de producción de pDNA puede dividirse en diferentes etapas, la optimización en una sola etapa podría tener efectos negativos para la siguiente; por lo que, la purificación del pDNA es el resultado de la optimización de los procesos de upstream y downstream (Brand y col., 2012).

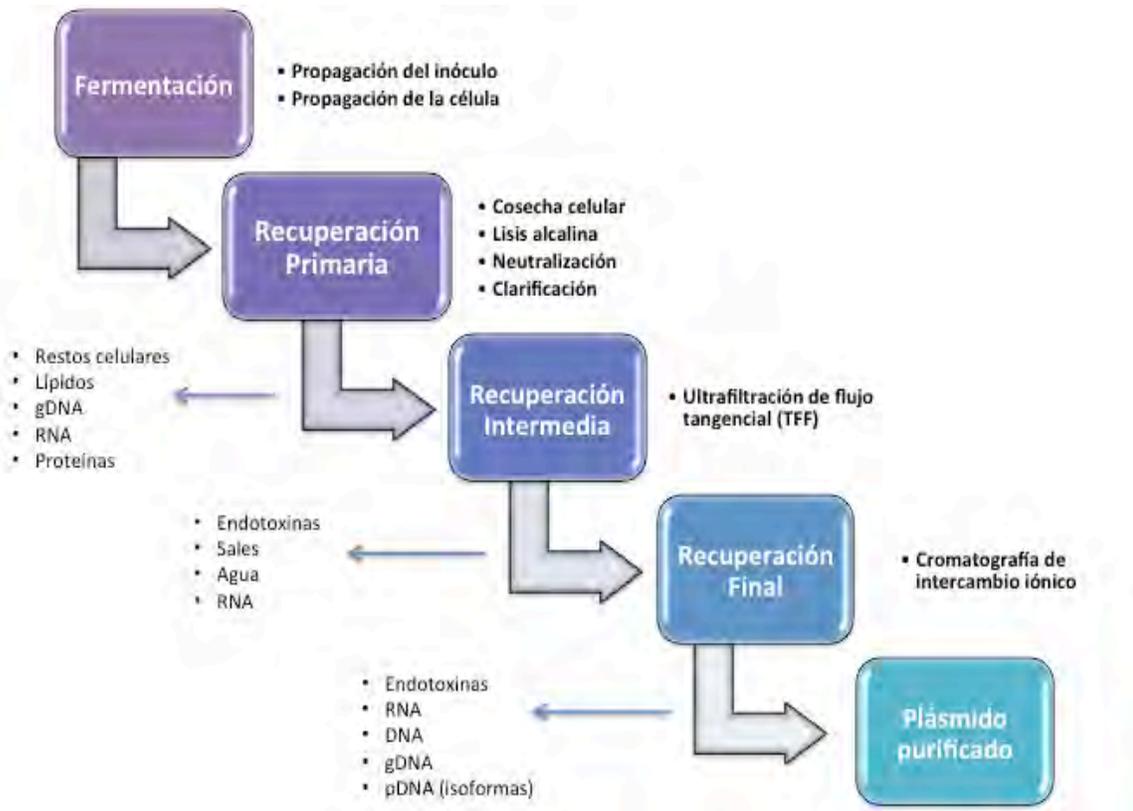


Figura 4. Impurezas eliminadas en todas las etapas del proceso de purificación del plásmido.

La mayoría de los contaminantes críticos están cargados negativamente (RNA, gDNA, endotoxinas), tienen similitud en tamaño (gDNA) e hidrofobicidad (endotoxinas) (Figura 4). El pDNA representa no más del 3% del lisado clarificado (Stadler y col., 2004), por lo que, la separación del pDNA de las impurezas de la célula huésped en sus características físicas y químicas es un gran desafío para la ingeniería de bioprocesos (Schleef y col., 2009). En la Tabla 2 se muestran los componentes de una bacteria de *E. coli*.

Tabla 2. Caracterización de los ácidos nucleicos y otros componentes en una bacteria *E.coli*. Adaptado de Diogo y col., (2005) y Prazeres y Ferrerira, (2004).

Molécula	Especies diferentes por célula	(%) en peso húmedo	Peso molecular (PM) (kDa)	Observaciones
Agua	1	70	0.018	
Ácidos nucleicos				
pDNA	1	< 1	3.3 – 13.2 x 10 ³ b	Polianiónico, cadena doble
RNA			28 – 1 000	Polianiónico, cadena sencilla
tRNA	40	4.8	28	
rRNA	3	0.9	500 – 1 000	
mRNA	400 – 800	0.3	660 – 90	
gDNA	1 ^a	0.5	2.8 x 10 ⁶	Polianiónico, altamente fragmentado, cadena doble o sencilla
Proteínas	1 100	15	8 – 200	Aniónica, catiónica, neutra, hidrofóbica, hidrofílica
Endotoxinas		5	10	Aniónica, parte lipídica
Iones y moléculas pequeñas	800 - 2000	3	< 1	

a Las células de *E. coli* en crecimiento rápido tienen, en promedio, 4 moléculas de gDNA.

b Moléculas de pDNA con tamaño promedio de 5 a 20 kbp.

Para aplicaciones clínicas, generalmente es preferible evitar el uso de RNasa, típicamente de origen bovino, debido a la posibilidad de contaminación con el agente de la encefalitis espongiforme bovina. Los productos bacterianos de uso farmacéutico son mejor tratados bajo condiciones libres de productos derivados de animales. La RNasa se acumula en el espacio periplásmico y se mezcla con RNA en la lisis. Sin embargo, no es recomendable la adición de enzimas (como proteinasa K o RNasa) a la solución que contiene el plásmido, ya que las enzimas tienen que ser eliminadas posteriormente. De igual manera, los agentes tóxicos como por ejemplo, CsCl, CsBr o fenol deben ser evitados, éstos no están certificados para su aplicación en el ser humano (Guerrero y col., 2008, Brand y col., 2012).

El proceso para la producción de pDNA implica los siguientes pasos: fermentación, recuperación primaria, purificación intermedia y purificación final. Es necesario reducir la cantidad de impurezas antes de la etapa de cromatografía utilizando diversos protocolos (Figura 5). El número y la complejidad de las etapas de procesamiento en la extracción, aislamiento, purificación y formulación de pDNA inducen un tipo de estrés

estructural que puede resultar en daños a las moléculas de pDNA (Ghanem y col., 2013).



Figura 5. Esquema general del bioproceso para la obtención del pDNA (Adaptado de Prazeres y col., 2007).

Antes del desarrollo de un bioproceso, se recomienda una evaluación crítica del plásmido, por lo que debe asegurarse que en la fermentación exista un rendimiento y calidad aceptable del plásmido. La lisis alcalina, reportada por primera vez por Birnboim y Doly en 1979, suele ser la mejor opción en la producción de pDNA en el rompimiento de las células bacterianas. Cuando se desarrolla un proceso de purificación pDNA a gran escala es necesario reducir el volumen rápidamente (Stadler

y col., 2004, Sum y col., 2014), esto puede lograrse mediante ultrafiltración, lo cual incrementa rápidamente la productividad cuando las etapas cromatográficas que siguen dependen del volumen. Las técnicas cromatográficas se emplean principalmente en la purificación final para alcanzar la pureza deseada.

2.3.1 Fermentación

El objetivo principal en el diseño de un proceso de fermentación para pDNA es maximizar tanto el rendimiento volumétrico (mg/L) así como el rendimiento específico (mg/g) de plásmido superenrollado. La optimización del rendimiento volumétrico permite fermentaciones más pequeñas y más económicas, mientras que la optimización del rendimiento específico mejora la pureza del plásmido en las etapas posteriores del proceso (Carnes y Williams, 2007). La composición del medio afecta decisivamente la calidad y rendimiento del plásmido. Generalmente las bacterias que contienen el plásmido se crecen en un medio líquido, el medio de cultivo tiene gran impacto en el crecimiento y rendimiento del plásmido (Carnes, 2005).

Los siguientes factores deben ser considerados en la formulación de los medios de crecimiento para la producción de DNA plasmídico terapéutico:

- Efecto de los componentes en el rendimiento y calidad del plásmido
- El rendimiento de biomasa
- Consistencia de lote a lote
- Las posibles interferencias con las etapas posteriores del proceso
- Requerimientos regulatorios

2.3.2 Recuperación Primaria

Después del crecimiento de la cepa de *E. coli* uno de los métodos más utilizados para el rompimiento de las células bacterianas es la lisis alcalina. Se basa en la ruptura de las células a pH alto con hidróxido de sodio (NaOH) y en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), esto conduce a la liberación del contenido celular y la desnaturalización de DNA genómico (gDNA), el material de la pared celular y la mayoría de las proteínas celulares. El pDNA y sus isoformas también se desnaturalizan debido al relajamiento de los puentes de hidrógeno a consecuencia del alcali, si se mantiene el pH por debajo de 12.5, los pares de bases de anclaje permanecen, lo que previene la separación completa de cadenas complementarias. Estas bases de anclaje sirven como núcleos para la renaturalización completa de moléculas de pDNA durante una etapa de neutralización subsiguiente (Diogo y col., 1999).

Después de la etapa de lisis, se neutraliza la solución con acetato de potasio, el cual precipita el SDS junto con gDNA desnaturalizado y restos celulares. El lisado clarificado alcalino resultante típicamente contiene proteínas, RNA, lipopolisacáridos (LPS), fragmentos de gDNA y pDNA, Figura 6, (Diogo y col., 2005). Los restos precipitados se separan por centrifugación o filtración produciendo lisados clarificados (Haberl y col., 2013). Aunque en la mayoría de los procedimientos de lisis se elimina una gran parte del DNA genómico, todavía existen grandes cantidades de contaminantes solubles en el lisado, como proteínas del huésped, endotoxinas (lipopolisacáridos), y las impurezas estructuralmente relacionadas, tales como RNA y DNA genómico restante (Brand y col., 2012). La eliminación de RNA es importante, ya que su presencia reduce la capacidad en la cromatografía de intercambio aniónico.

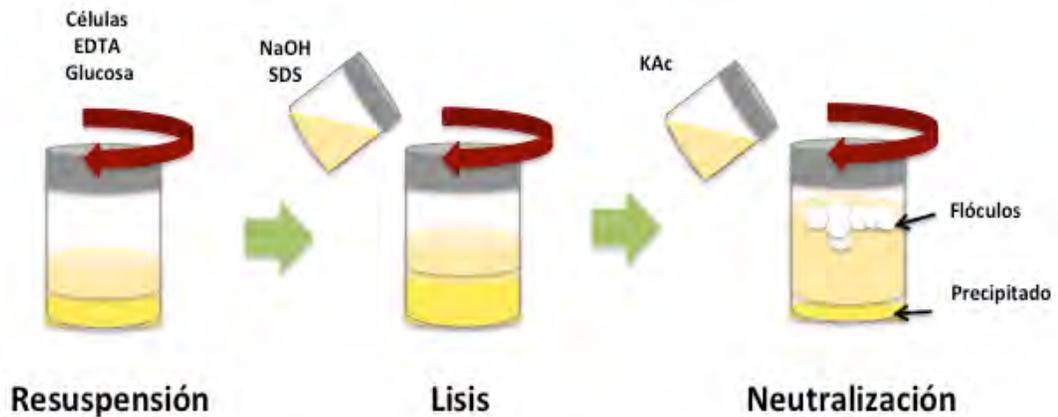


Figura 6. Esquema general de la lisis alcalina para la obtención del plásmido (Adaptado de Diogo y col., 2001).

2.3.3 Recuperación Intermedia

El objetivo de los pasos de recuperación intermedia purificación de moléculas de pDNA a partir del lisado celular clarificado es actuar sobre los lisados clarificados de células de *E. coli* para concentrar pDNA y reducir las impurezas más abundantes (RNA, proteínas), las cuales representan más del 90% de la masa total de soluto. La recuperación intermedia de pDNA se ha realizado utilizando toda una serie de técnicas (Freitas y col., 2009, Ager y col., 2009); muchos de estos protocolos no pueden escalarse o no pueden utilizarse agentes químicos, tales como fenol, bromuro de etidio, cloruro de cesio o enzimas derivadas de animal que no son compatibles con las recomendaciones de las agencias reguladoras para la fabricación de productos terapéuticos (Prazeres y Ferreira, 2004). Otras desventajas incluyen la capacidad limitada, baja recuperación y alto costo. La precipitación con sales, alcoholes, o detergentes antes de la etapa de purificación final (cromatografía de membrana de intercambio aniónico) ha demostrado ser eficaz, sin embargo existe un bajo rendimiento de pDNA (Orr y col., 2013, Guerrero y col., 2008).

Los procesos de membrana tienen un gran potencial para la purificación del plásmido a gran escala, ya que son fácilmente escalables y están sólo débilmente afectados por limitaciones difusionales (Latulippe y col., 2007). La filtración es adecuada para procesos farmacéuticos a gran escala ya que se evitan los agentes no certificados para

su aplicación en seres humanos. La ultrafiltración de flujo tangencial (TFF) comúnmente es utilizado en el proceso de purificación de proteínas para la concentración y el intercambio de buffer, se ha introducido recientemente para purificar pDNA directamente de lisado clarificado en un solo paso. Numerosos estudios han reportado la ultrafiltración de flujo tangencial como una técnica prometedora para la recuperación de pDNA a partir de lisados alcalinos; aprovecha la diferencia de tamaño en el lisado entre pDNA y moléculas tales como proteínas, endotoxinas y RNA de bajo peso molecular (Eon-Duval y col., 2003, Figueroa y col., 2013). El pDNA permanece en el retenido, mientras que el RNA fluye a través de la membrana y se acumula en el permeado (Figura 7).

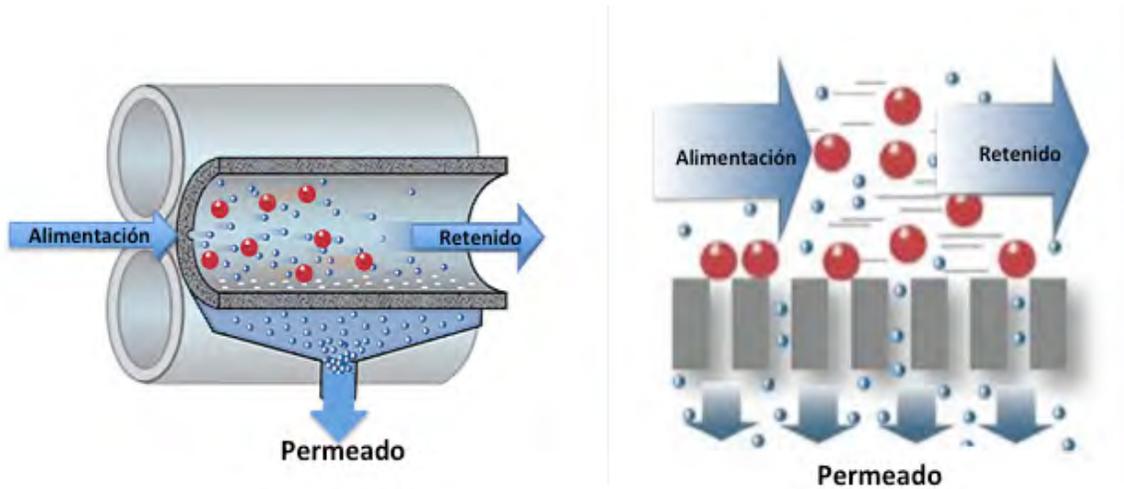


Figura 7. Modo de operación estándar para ultrafiltración de flujo tangencial.

La patente US6011148 (Bussey y col., 2000), también describe el uso de ultrafiltración de flujo tangencial para la purificación de pDNA, donde recomienda membranas con un tamaño de corte de 300 kDa para plásmidos en el intervalo de tamaño de 2-15 kb, y un tamaño de corte de 500 kDa para plásmidos en el rango de tamaño de 15-50 kb; también afirma la importancia de una recirculación inicial del filtrado durante al menos 10 a 15 minutos para permitir que una capa de gel se forme para una pérdida mínima de plásmido al filtrado (Carnes y Williams, 2007, Eon-Duval y col., 2003); además debe prestarse mucha atención a la velocidad de flujo, ya que estudios recientes realizados

han demostrado que la transmisión del DNA plásmido superenrollado a través de pequeños poros de las membranas de ultrafiltración se produce por el elongamiento del plásmido; a bajo flux en el filtrado, el pDNA superenrollado no se ve afectado, sin embargo, a alto flux la molécula de pDNA se estira y es por tanto capaz de pasar con relativa facilidad a través de la poro de la membrana a la solución de filtrado. (Latulippe y col., 2011).

En algunos casos, especialmente cuando se trabaja con una solución diluida de pDNA, puede ser una ventaja empezar concentrando la solución por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF). Se ha mostrado que utilizando membranas de fibras huecas se alcanza una rápida y delicada reducción de volumen, la cual aumenta drásticamente la productividad para trabajar con subsecuentes pasos de cromatografía. Al mismo tiempo, puede intercambiarse buffer y/o para disminuir la conductividad de la solución si es necesario. El tiempo de operación no debe exceder de una hora, ya que los lisados clarificados son inestables a temperatura ambiente (Stadler y col., 2004).

En la ultrafiltración, la concentración es un paso previo, donde un volumen inicial V_0 es concentrado a un volumen de retenido V , de forma que se define el factor de concentración FC :

$$FC = \frac{V_0}{V} \quad (1)$$

Durante la ultrafiltración en modo diafiltración, el factor de diafiltración (VD) es una medida de las veces que se ha lavado el retenido. Si una diafiltración se realiza a un volumen constante, donde al volumen de retenido (V) se le agrega un volumen de buffer (V_d) entonces (Russell y col., 2007):

$$VD = \frac{V_d}{V} \quad (2)$$

2.3.4 Purificación Final

Los desafíos en los bioprocesos se encuentran en la eliminación de los componentes celulares, por ejemplo, RNA, DNA genómico, proteínas y lipopolisacáridos, para conseguir un producto muy puro de acuerdo con las exigencias reglamentarias. Típicamente, la solución final de pDNA debe estar libre de gDNA del huésped (<0.05 µg/µg pDNA), proteínas del huésped (indetectables), RNA (indetectable) y endotoxinas (<0.1 UE/µg pDNA) (Prazeres y col., 2001). Además, más de 90% de la pDNA debe estar en su forma superenrollada (SC), por lo tanto, al considerarse un método de alta resolución, la cromatografía se prefiere como una técnica de purificación debido a su capacidad de proveer un producto de alta pureza en uno o varios pasos.

Las biomoléculas que son purificadas utilizando técnicas de cromatografía se clasifican de acuerdo a sus propiedades específicas: cromatografía de exclusión por tamaño o filtración en gel (SEC), de interacción hidrofóbica (HIC), intercambio aniónico (AEC), de fase reversa (RPLC), y de afinidad (AC), (Figura 8), estas técnicas se han integrado en varios procesos para la fabricación de pDNA terapéutico (Ferreira y col., 1998; Prazeres y Ferrerira, 2004).

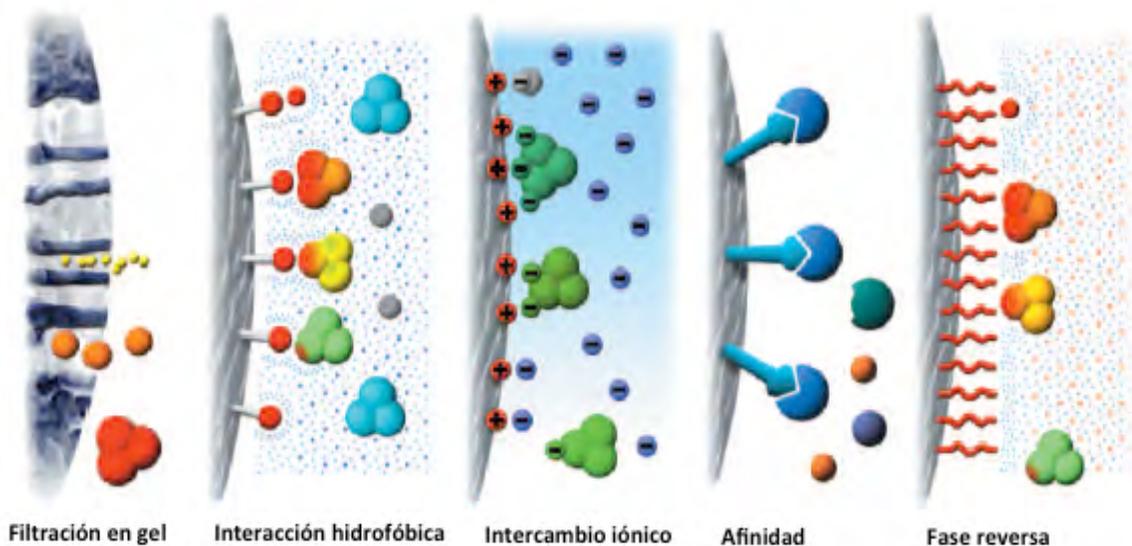


Figura 8. Principales tipos de separación por cromatografía (Adaptado de Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing).

De los diferentes tipos de cromatografía, la cromatografía de intercambio iónico junto con la cromatografía de exclusión de tamaño se consideran como caballo de batalla (Tiainen y col., 2007). La cromatografía de intercambio iónico es un método comúnmente utilizado para la captura y purificación de pDNA, separa las biomoléculas de acuerdo a las diferencias en su carga neta en la superficie, tanto a escala preparativa como analítica; ofrece en principio, una buena selectividad para pDNA en la presencia de RNA, endotoxinas y proteínas residuales. Por otro lado, la eficiencia es muy dependiente tanto en composición de la muestra de acuerdo con su tratamiento previo y el origen (como cepa huésped, el número de copias, ultrafiltración previa, el uso de la RNasa, la separación del grupo, agentes de compactación). Es evidente que la presencia de altas cantidades de RNA compite con pDNA para la unión de los grupos funcionales disponibles (Stadler y col., 2004). Si no se aplica un pretratamiento al lisado, el RNA de alto peso molecular es adsorbido por en la fase estacionaria, reduciendo la adsorción de DNA plasmídico y afectando seriamente la eficiencia en la cromatografía (Bo y col., 2013).

Pasos en la purificación por cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio aniónico sigue siendo una de las técnicas más utilizadas para la captura y purificación de DNA, ya que ofrece la ventaja de una separación rápida, sin necesidad de solventes. Los grupos fosfato cargados negativamente en la cadena DNA interactúan con grupos cargados positivamente de la fase estacionaria de la matriz de cromatografía de intercambio aniónico. A concentraciones de sal adecuadas y con un gradiente de elución optimizado, el pDNA se une a la matriz de intercambio aniónico, mientras que las impurezas fluyen a través de la columna (Prazeres y col., 1998).

La matriz está compuesta de partículas esféricas sustituidas con grupos iónicos que son positivamente cargados. La matriz suele ser porosa para dar una mayor área de contacto. El medio se empaqueta en una columna para formar un lecho. La cama es equilibrada a con buffer a una concentración suficientemente de sal (típicamente >0.5M NaCl, ya que reduce significativamente los niveles de impurezas) que llena los poros

de la matriz y el espacio entre las partículas, así como se muestra en la Figura 9 (Ferreira y col., 2000).



Figura 9 . Equilibración de la columna con buffer de equilibrio (Adaptado de Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing).

La fuerza iónica del buffer de equilibrio se selecciona para garantizar que, cuando se carga la muestra, el plásmido de interés se adsorba al medio y la mayor cantidad de impurezas salgan de la columna. El plásmido adsorbido se concentra de manera efectiva en la columna mientras que las impurezas que no tienen la carga superficial correcta pasan a través de la columna a la misma velocidad que el flujo del buffer, eluyendo durante o justo después de la aplicación de la muestra, dependiendo del volumen total de la muestra cargada. Cuando toda la muestra se carga, la columna se lava de manera que todas las impurezas no adsorbidas pasen a través de la columna (Diogo y col, 2005).

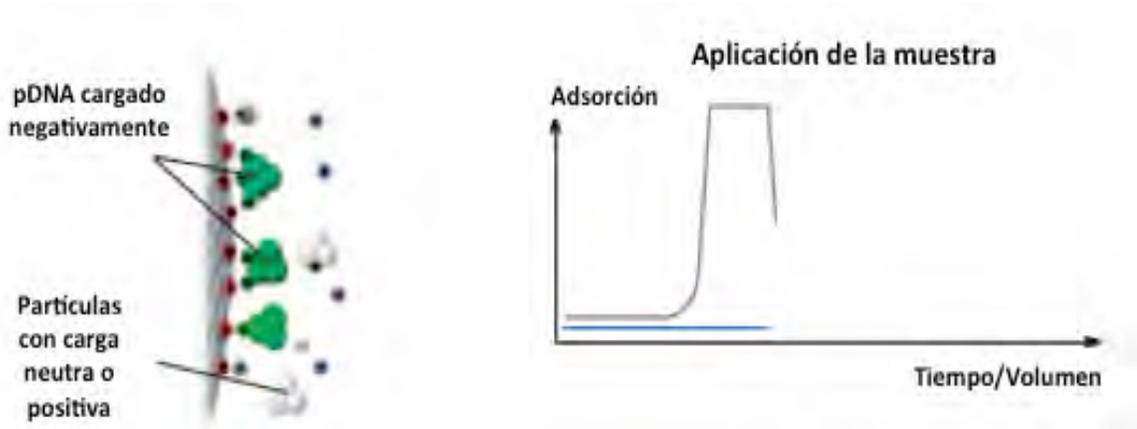


Figura 10. Aplicación de la muestra en la columna (Adaptado de Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing).

El pDNA se eluye mediante el aumento de la fuerza iónica (concentración de sal) del buffer. A medida que aumenta la fuerza iónica, los iones de sal (Na^+ o Cl^-) compiten con los componentes adsorbidos por cargas en la superficie del medio y uno o más de las especies unidas comienzan a desprenderse y eluir la columna. Los componentes con la carga neta más baja serán los primeros en eluir de la columna, cuanto mayor sea la carga neta del componente, mayor será la fuerza iónica que se necesita para la elución. Mediante el control de los cambios de gradiente, el pDNA e impurezas se eluyen diferencialmente en una forma purificada y concentrada. La columna es entonces re-equilibrada en buffer de inicio antes de la siguiente corrida.

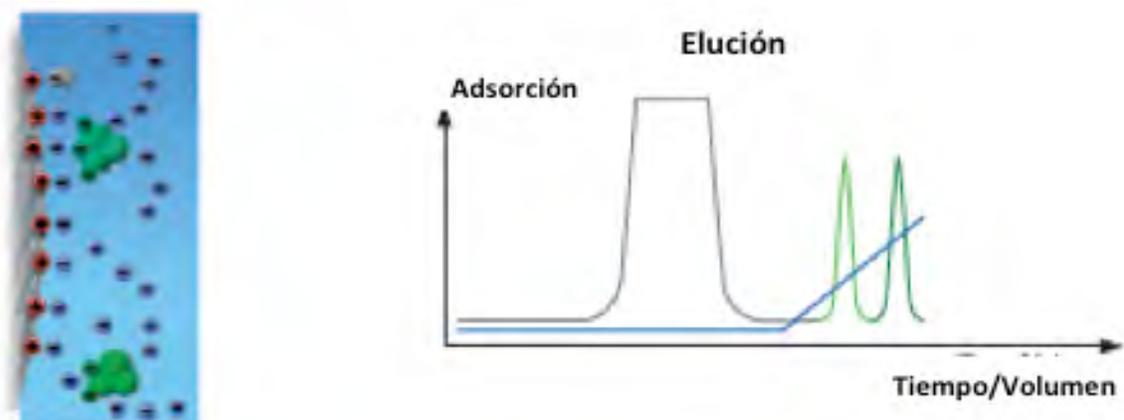


Figura 11. Etapa de elución de las especies (Adaptado de Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing).

La cromatografía tiene un papel importante en la purificación de pDNA ya que es una operación unitaria escalable y reproducible y utiliza sólo productos químicos que se consideran seguros, además de que es suficientemente robusto para soportar con las condiciones de limpieza con abrasivos requeridos para la aprobación del proceso y la validación.

Las matrices convencionales porosas parecen tener poros demasiado pequeños para permitir que las grandes moléculas de pDNA que se difundan en ellos; por lo que nuevos materiales de intercambio iónico están siendo desarrollados específicamente para aplicaciones de DNA, algunos de los cuales pueden ser utilizados para la purificación del plásmido. Sin embargo, estos no son óptimas para la eliminación de gDNA (Carnes y Williams, 2007). Existen alternativas prometedoras con el uso fases estacionarias con poros muy grandes "superporos" o poros convectivos (>200 nm). La superporosidad no sólo mejora el acceso del pDNA en los huecos internos, si no también permite el flujo convectivo a través del poro, y, en consecuencia, mejora la transferencia de masa interna (Gustavsson y Larsson, 1996; Tiainen y col., 2007); además de aumentar la capacidad dinámica del pDNA para la unirse a partículas y membranas de intercambio aniónico confirma claramente la ventaja de su uso (Figura 12). La cromatografía sobre fases estacionarias porosas, es adecuada para purificación de plásmido a escala de laboratorio, así como para aplicaciones a gran escala. Se han desarrollado protocolos en ambos modos de operación (Eon-Duval y col., 2004).

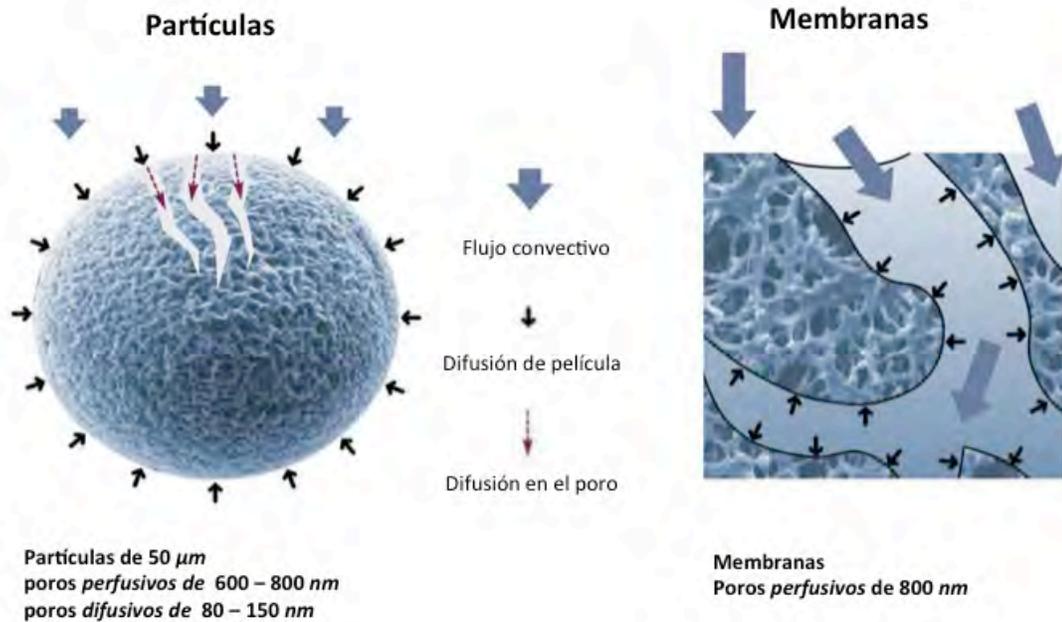


Figura 12. Comparativo entre los sitios de adsorción en las partículas y membranas de intercambio iónico (Adaptado de Ghosh, 2002).

La estructura polianiónica de los ácidos nucleicos puede ser explotada por cromatografía de intercambio iónico debido a que la carga global de los ácidos nucleicos dependen del número de bases que componen la molécula (una carga negativa por base) y los perfiles de elución esperados dependen del tamaño molecular (Diogo y col., 2005). El pDNA superenrollado es más compacto comparado con su isoforma lineal o circular abierta (Figura 13), por lo que presenta densidades de carga más altas y un mejor ajuste con la curvatura de los poros de las partículas (Ferreira y col., 2000).

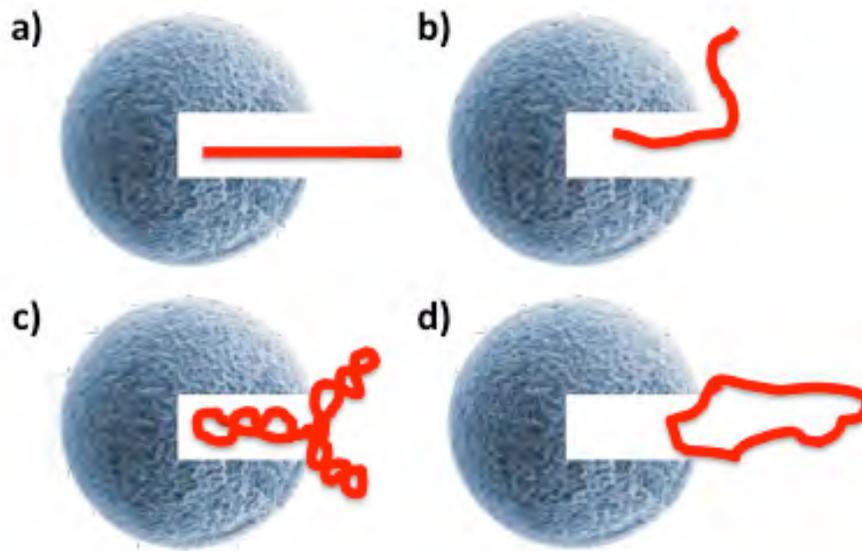


Figura 13. Representación de las interacciones del pDNA con una partícula porosa con a) DNA lineal, b) fragmentos de DNA, c) pDNA superenrollado, d) pDNA circular abierto (Adaptado de Ferreira y col., 2000).

Purificación por cromatografía de intercambio iónico en membranas

Las limitaciones en la purificación de pDNA por cromatografía en fases estacionarias convencionales surgen de la inaccesibilidad de la solución con la superficie de unión además de los procesos de difusión lenta. Estas restricciones se pueden superar mediante el uso de cromatografía en membranas (Zhang y col, 2003). Los absorbentes de cromatografía en membranas, por otro lado, tienen grandes poros convectivos y se han promovido como una tecnología mucho más apropiada para la purificación de biomoléculas de gran tamaño, como pDNA (Guerrero y col., 2008; Montesinos y col., 2007; Zhang y col., 2003). El poro debe ser suficientemente grande para permitir el acceso suficiente de los ligandos de la biomolécula con la mínima exclusión en la entrada de los poros (Li y col., 2008), lo que resulta en una mejor accesibilidad a los sitios de unión y permiten flujo convectivo. Esto proporciona una caída de presión inferior y permiten una mayor velocidad. La consecuencia es una mayor productividad.

La cromatografía en membranas ha emergido como una alternativa rentable y ha captado mucha atención particularmente para procesar grandes cantidades de soluciones diluidas, de pulido en la producción de proteínas terapéuticas y anticuerpos. Una de las mayores ventajas de la cromatografía en membranas es su reducida resistencia a la transferencia de masa (Orr y col., 2013), además de que las membranas son simples de manufacturar, por lo que el costo de la fase estacionaria se reduce.

Los adsorbentes de membrana han mostrado proporcionar una excelente capacidad de unión con el plásmido debido a la gran área de contacto directo con el flujo de convectivo a través de la membrana. Por lo tanto, columna empacadas con membranas de intercambio iónico, con un tamaño de poro nominal de 800 nm, han resultado en capacidades de adsorción máxima entre 6 y de 15 mg/mL del volumen del lecho para plásmidos entre 4.5 y 6.3 kpb (Diogo y col., 2005; Montesinos y col., 2007; Tianen y col., 2007_b). Finalmente, aunque las membranas pueden ser reutilizadas, en general son promovidas como adsorbentes desechables, eliminando la necesidad de limpieza y regeneración de la columna; estas ventajas hacen de la cromatografía con membranas un método común en aplicaciones industriales (Orr y col., 2013).

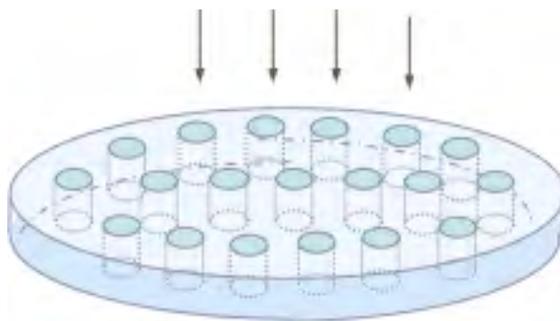


Figura 14. Modo de operación estándar en cromatografía frontal de intercambio iónico en membranas (Adaptada de Montesinos y col., 2007).

Purificación por cromatografía de intercambio iónico en partículas perfusivas

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de la mayoría fases estacionarias convencionales en usadas en cromatografía para la purificación de pDNA resulta en un bajo rendimiento, debido al gran tamaño del pDNA que tiende a adsorberse predominantemente en el exterior de las superficie de la matriz reduciendo la capacidad de enlace (Urthaler y col., 2005). El uso de fases estacionarias con partículas perfusivas con poros más grandes puede mejorar la transferencia de masa debida al flujo convectivo, lo que resulta en una transferencia muy rápida entre la fase móvil y la fase estacionaria, esto es posiblemente debido al carácter macroporoso, en el que la fase móvil se ve obligada a fluir a través de los grandes poros. Una ventaja adicional es una caída de presión reducida. Por otra parte, la separación de las diferentes isoformas del pDNA es posible. Esto llama la atención debido a la importancia que tiene la forma superenrollada del plásmido para aplicaciones terapéuticas (Brand y col., 2012). También pueden mostrar un alta capacidad de unión además que cuentan con poros difusivos que transportan el pDNA y se difunden lentamente en el interior de la partícula por el flujo convectivo. El intercambiador de aniones Poros 50HQ cuenta con esas características.

Debido a las estructura y tamaño del sc pDNA (200 nm), éste puede pasar a través de los poros perfusivos (600–800 nm) del adsorbente; sin embargo, la adsorción del plásmido en los poros pequeños difusivos (80–150 nm) de la partícula puede ser muy difícil. Se ha reportado una capacidad máxima de adsorción de 29 mg/mL para pDNA de 4 kpb en partículas Poros 50 HQ (Pérez-Martínez y col., 2015).

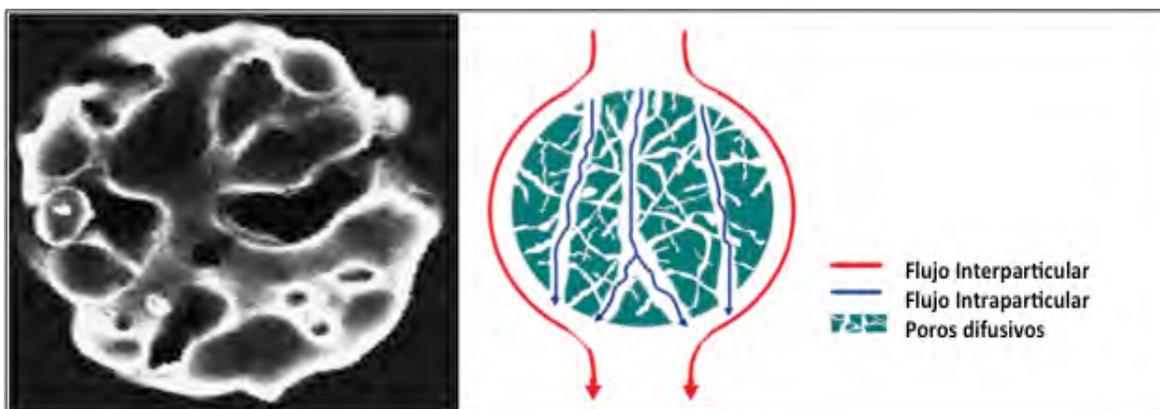


Figura 15. Micrografía de una partícula perfusiva (Tianen y col., 2007) (izquierda), Distribución del flujo sobre y a través de partículas perfusivas de intercambio iónico (derecha).

2.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel convencional en un campo constante se puede utilizar para la separación de lineal, DNA superenrollado e isoformas del mismo peso molecular. El orden de la migración del DNA superenrollado depende de la concentración de gel, el tamaño del DNA y la intensidad de campo eléctrico. Es la técnica analítica más usada y descrita ampliamente que permite una comparación de las muestras en paralelo en una misma corrida. Es una técnica de laboratorio común utilizada para identificar, cuantificar, y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, ya que es una técnica sencilla, no tóxica que ofrece una amplia gama de separación. El tamaño de los poros del gel se puede controlar simplemente ajustando la concentración de agarosa. Las muestras se cargan en pocillos de un gel de agarosa o acrilamida y se someten a un campo eléctrico, causando que los ácidos nucleicos cargados negativamente migren hacia el electrodo positivo. Los fragmentos de DNA más cortos se desplazarán más rápidamente, mientras que los fragmentos más largos permanecerán más cercano al origen del gel, lo que resulta en la separación basada en el tamaño (Åkerman y col., 2002). La electroforesis en gel de agarosa convencional no es suficientemente reproducible o precisa para fines cuantitativos, además que para el análisis de pureza el método sólo es generalmente aceptado para una evaluación cualitativa de contaminación RNA (Diogo y col., 2003). Ver Figura 16.

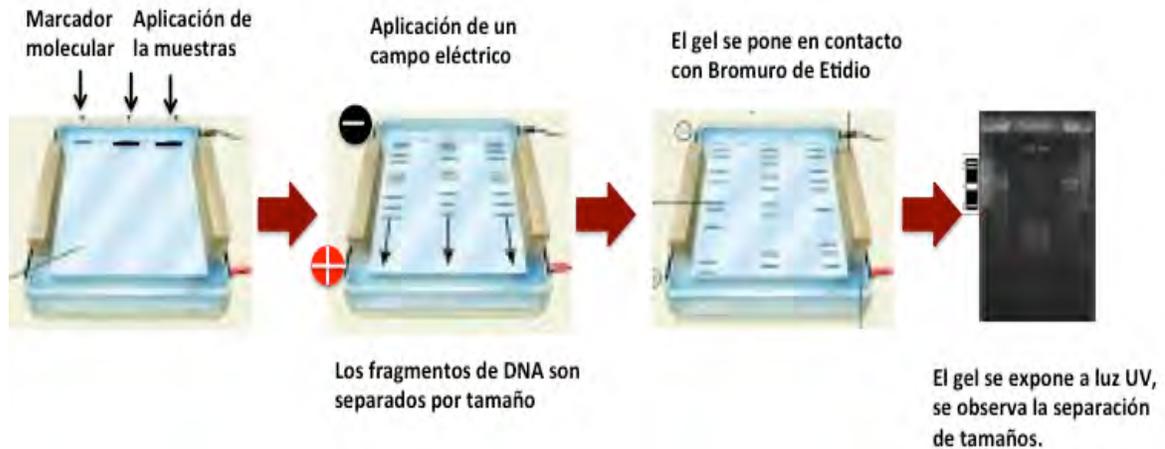


Figura 16. Método de electroforesis en gel de agarosa.

2.5 Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía líquida también es muy útil como una herramienta analítica para inspeccionar la producción y control de calidad del pDNA durante el proceso, así como en las formulaciones finales. Este tipo de análisis es fundamental para garantizar la producción de un producto consistente que cumple con la especificación deseada (Diogo y col., 2005).

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se ha utilizado en la purificación preparativa del plásmido de DNA para aplicaciones terapéuticas. La purificación de pDNA por cromatografía de interacción hidrofóbica utiliza las diferencias en la hidrofobicidad entre pDNA, las impurezas de una sola hebra de ácido nucleico (RNA, gDNA desnaturizado, oligonucleótidos e isoformas de plásmidos desnaturizados) y endotoxinas (Diogo y col., 2003, Iuliano y col., 2002). En presencia de sulfato de amonio 1.5 M el total del pDNA eluye a través de los poros vacíos, mientras que las impurezas eluyen más tarde, separando el pico de pDNA. Este comportamiento se explica por el hecho de que las bases hidrofóbicas del pDNA se empaquetan y protegen dentro de la doble hélice, por lo tanto, la interacción hidrofóbica con la matriz es mínima (Figura 17). La cromatografía de interacción hidrofóbica analítica ha sido descrita para la evaluación de pureza y cuantificación de pDNA en soluciones del

proceso (Diogo y col., 2003). El método es rápido (cada análisis toma 7 min), reproducible, fácil de realizar y no requiere la digestión previa de RNA en las muestras con RNasa u otro tratamiento previo. Además, es capaz de manejar muestras altamente contaminadas, con menos de 5% de pDNA constituyendo así una buena alternativa a otras técnicas analíticas menos robustas actualmente en uso. Se utiliza una columna de HPLC HIC (Fenil Sepharose Source 15PHE PE 4.6/100, Amersham Biosciences) para separar las moléculas de DNA plasmídico de doble cadena de las impurezas más hidrofóbicas presentes en las corrientes de proceso.

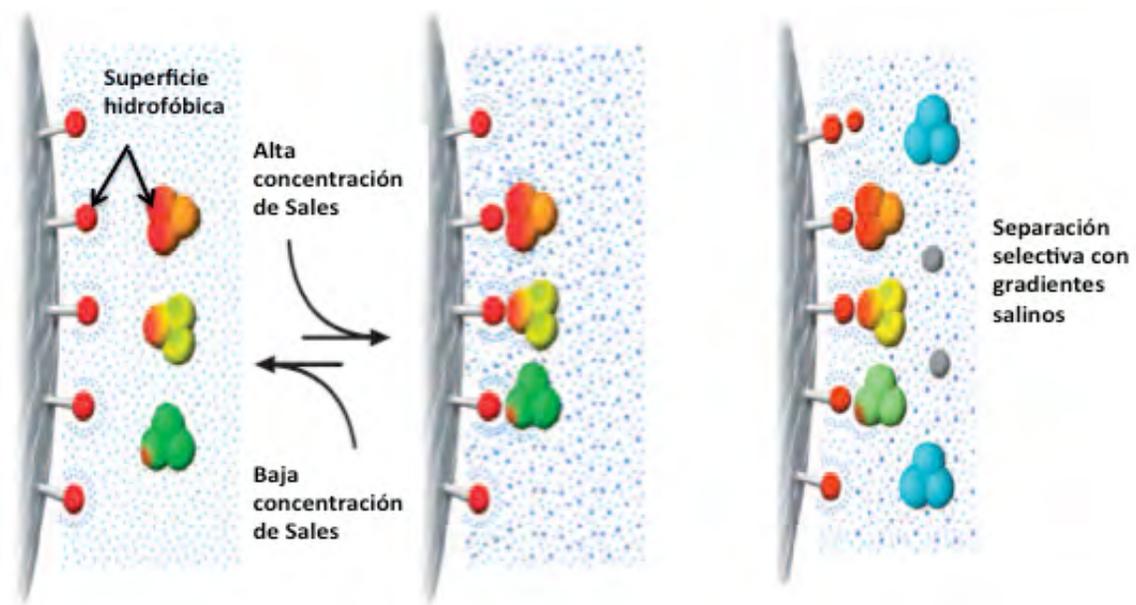


Figura 17. Método de cuantificación de pDNA por HIC (Adaptado de Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y Equipos

En esta investigación se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α hospedando al plásmido pVAX1-NH36, de peso molecular aproximado de 4 kpb proporcionada por CINVESTAV de IPN.

En la fermentación se utilizó medio Terrific Broth (TB) enriquecido en sales, vitaminas y glicerol (glicerol 13 g/L; vitaminas: extracto de levadura 24g/L, triptona 12 g/L; sales: KH₂PO₄ 2.31 g/L, K₂HPO₄ 12.54 g/L), se adicionó kanamicina (50 μ g/mL) para prevenir el crecimiento de otras cepas. Para la preparación de cultivos en placa y matraz se utilizó una incubadora Orbital Shaker Incubator, VWR. La propagación de la células de *E. coli* con el plásmido pVAX1-NH36 se realizó en un biorreactor Applikon® (Holanda) de 2L de capacidad, acoplado a un sistema de control, ez-control (Applikon®, Holanda). El crecimiento celular se midió a una absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer.

En la cosecha celular se realizó por centrifugación en una centrífuga refrigerada BioFuge Stratos, Thermo Scientific. La etapa de recuperación primaria, fue hecha por medio de lisis alcalina para extraer el plásmido de la biomasa. Se utilizaron los siguientes agentes químicos para preparar las soluciones: glucosa, Tris base, ácido etildiaminotetraacético (EDTA), NaOH, dodecil sulfato de sodio (SDS), acetato de potasio, ácido acético glacial; todos de Sigma Aldrich. La solución pre-clarificada por centrifugación se microfiltró al vacío en microfiltros de 0.45 μ m (Millipore), para eliminar la presencia de sólidos en suspensión remantes.

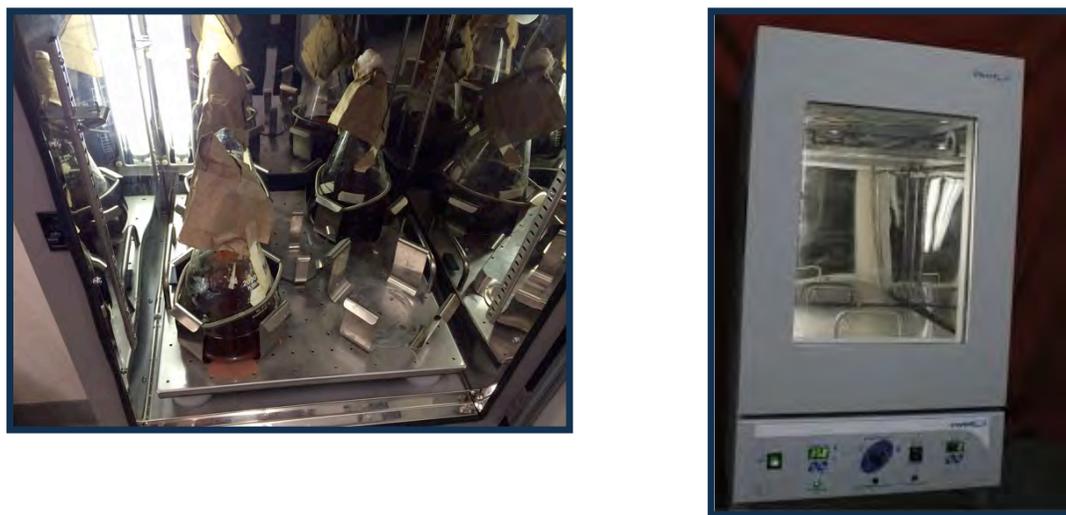


Figura 18. Incubadora, Orbital Shaker Incubator. VWR.



Figura 19. Biorreactor Applikon® (Holanda) de 2L acoplado al software ez-Control.



Figura 20. Centrifuga Thermo Fisher Scientific®

La etapa de recuperación intermedia se utilizó buffer Tris (10 mM Tris – HCl pH 7.5) como buffer de lavado. La limpieza de la membrana de ultrafiltración se realizó con un lavado con NaOH 0.5 M y etanol al 30%, según las especificaciones del fabricante. Para realizar los experimentos por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF), se acopló el sistema Midjet Benchop System (GE Healthcare, USA), a una membrana ultrafiltración tangencial con cartuchos de fibras huecas de polisulfona de tamaño de corte 300 kDa. Se le acopló una unidad digital de monitoreo de presión MidJet (GE Healthcare, USA), así como una bomba peristáltica de 600-6000 rpm y un controlador de flujo (Cole Palmer, USA) para alimentar la membrana a un flujo constante.



Figura 21. Sistema de Ultrafiltración tangencial.

La etapa de purificación final de pDNA por intercambio iónico, se realizó en un sistema Akta Purifier 10-UPC y un colector de fracciones F-950 de GE Healthcare®; se empleó una columna Tricorn (Amersham Biosciences) con diámetro interior de 0.5 cm empacada con membranas Mustang Q (Pall) y otra columna empacada con partículas perfusivas POROS 50 HQ (Applied Biosystems). Se utilizó buffer TE (10 mM Tris – HCl pH 8, 1mM EDTA) como buffer de lavado (0.5M NaCl en TE) y de elución (2M NaCl en TE). Las membranas y partículas perfusivas se acondicionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La cuantificación del pDNA del purificado se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con columna de Interacción Hidrofóbica (HIC) en un equipo Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare® con una columna HIC Source 15PHE (Fenil-Poliestireno) de 0.46 x 10 cm marca GE Healthcare® y un auto-muestreador A-900 de GE Healthcare®, siguiendo la metodología de Diogo y col., (2003). Se utilizó como buffer de adsorción 1.5 M Sulfato de Amonio en Tris (10 mM Tris – HCl pH 8), y Tris como buffer de elución. Para la limpieza de la columna se utilizó etanol al 20%; todas las soluciones fueron filtradas (0.45 μm Millipore) y desgasificadas para evitar interferencias en los resultados.



Figura 22. Columna Tricorn (Amersham Biosciences)



Figura 23. Columna de interacción hidrofóbica HIC Source 15PHE



Figura 24. Sistema Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare®

Las pruebas cualitativas de electroforesis se realizaron en gel de agarosa 0.8% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, CH₃COOH 20 mM, EDTA 1mM, pH 7.6), utilizando un marcador DNA Ladder, Invitrogen® y una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/cm³) para teñir el gel. Se utilizó una cámara horizontal de electroforesis GT mini gel casting system de Biorad y Equipo Multi-Doc, para la fotografía del gel Digital Imaging System Trans UV de Biorad.



Figura 25. Cámara de electroforesis (izq.), Multi-Doc (der.)

3.2 Metodología

En la Figura 26 se muestra el diagrama general del bioproceso para la producción y purificación del plásmido pVAX1-NH36 en el laboratorio.

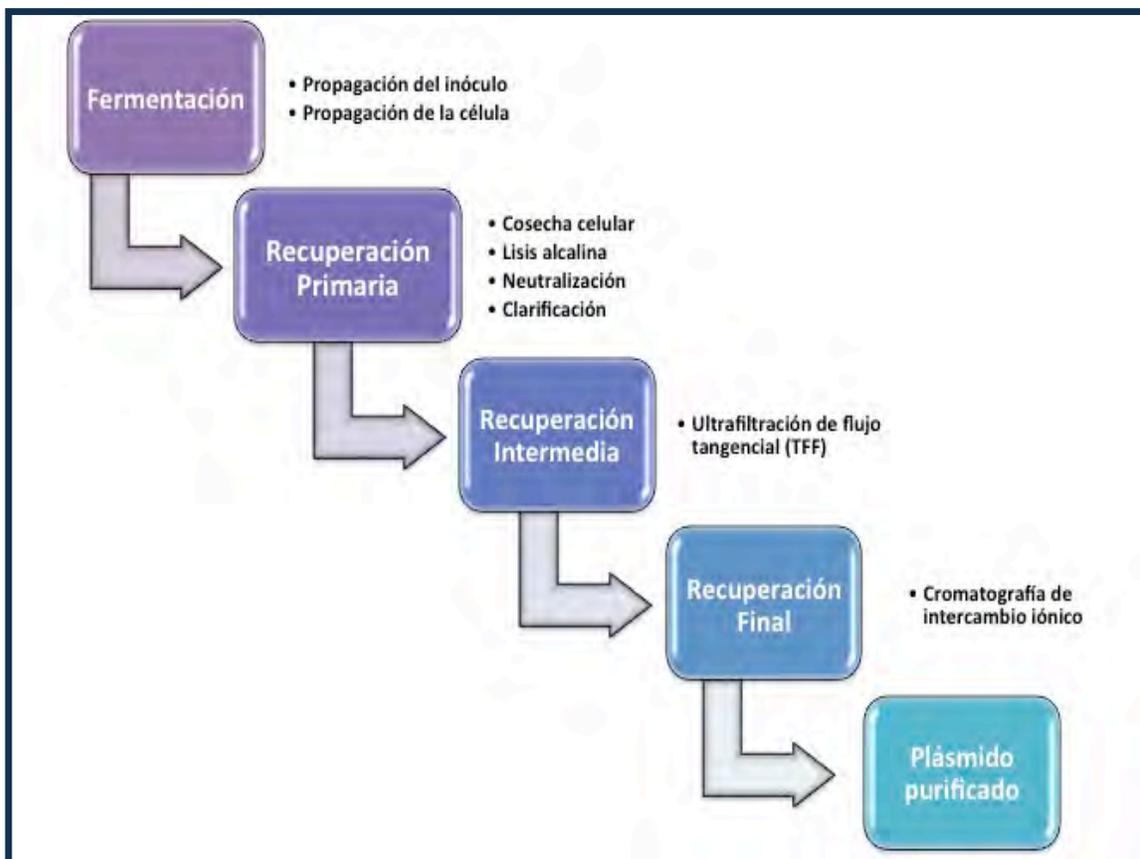


Figura 26. Diagrama general del bioproceso para la producción de plásmido pVAX1-NH36

3.2.1. Fermentación

Para la producción de células se utiliza la cepa *E. coli* DH5 α como vector, que contiene al plásmido pVAX1-NH36, se utiliza medio TB (glicerol 13 g/L; vitaminas: extracto de levadura 24 g/L, triptona 12 g/L; sales: KH₂PO₄ 2.31 g/L, K₂HPO₄ 12.54 g/L), para el crecimiento en matraz y biorreactor, en modo batch y condiciones estériles. Para la

preparación del inóculo se realizó una fermentación en matraz con 250 mL de medio, agregando kanamicina de concentración 50 mg/mL hasta lograr una concentración en el medio de 50 $\mu\text{g/mL}$, la cepa *E.coli* con el plásmido y se mantuvo en la incubadora durante 12 horas a 37°C y 250 rpm. Éste se utilizó para la propagación celular inyectándolo en el biorreactor que contenía el mismo medio en condiciones estériles por un período aproximado de 9 h como se muestra en la Figura 27.

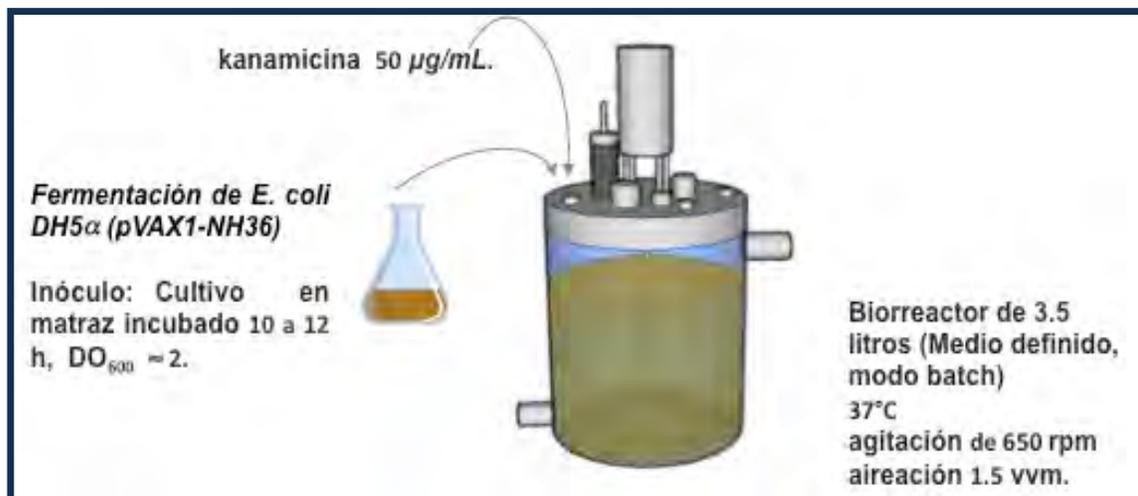


Figura 27. Preparación del inóculo y fermentación para la producción de plásmido pVAX1-NH36

3.2.2. Recuperación primaria

Al finalizar el cultivo se recuperaron las células obtenidas durante la fermentación por medio de centrifugación a 3500 g a 4°C por 15 minutos, se recolectó el sólido y desechó el sobrenadante. Se pesó la masa celular húmeda obtenida.

Posteriormente, se agregó a la biomasa 8 mL de la solución resuspensión *P1* (50mM glucosa, 25mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, pH 8); por gramo de células húmedas, se agitó suavemente hasta resuspender el paquete celular. Inmediatamente se agregó un volumen igual que el anterior (8 mL/g cel) de la solución de lisis alcalina *P2* (0.2 M NaOH, 1% SDS), y así romper las células, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregó la solución de

neutralización P3 (3 M Acetato de Potasio - Ácido cético glacial pH 5.5) en la misma proporción que las anteriores a una temperatura de 4°C, se agitó suavemente y se dejó en hielo 10 minutos.

El lisado conteniendo el plásmido se clarificó mediante la remoción de flóculos (restos celulares, gDNA, lípidos RNA y proteínas) por centrifugación a 12000 g por 45 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se repitió el paso anterior (Diogo y col, 2005). El lisado clarificado se filtró a vacío con un filtro de 0.22 µm y después se filtró a vacío con un filtro 0.45 µm para asegurar la remoción completa de partículas suspendidas (ver Figura 28).

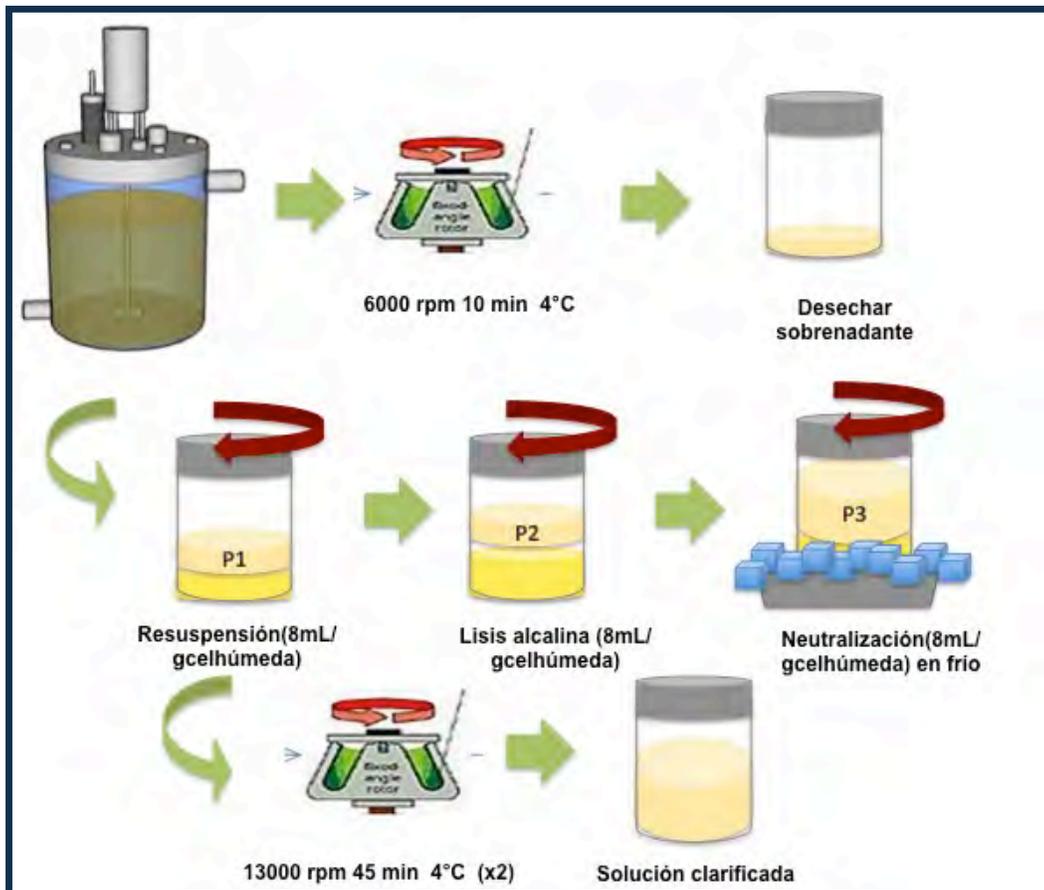


Figura 28. Procedimiento general para la ruptura celular y la obtención de una solución clarificada.

3.2.3. Recuperación intermedia

La etapa de recuperación intermedia de pDNA se realizó en un sistema de diafiltración Mldjet Benchtop System de GE acoplado a una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial de 300 kDa y 30 cm de largo con un área total de filtración de 16 cm² en modo batch (Guerrero-Germán y col., 2008). Se acopló una unidad digital de monitoreo de presión, además de una bomba peristáltica de 600-6000 rpm y un controlador de flujo para mantener un flujo de alimentación constante (Figura 29). Al inicio la experimentación la membrana de fibra hueca se equilibró con buffer Tris 10 mM-HCl pH 7.5. Posteriormente, se recirculó la solución del lisado durante 50 min con el fin de crear una película en la membrana que evitara pérdidas del pDNA (Freitas y col., 2007(a)). El lisado clarificado conteniendo el pDNA se alimentó una velocidad de flujo constante de 24 mL/min y de 1 mL/min en el flujo de permeado. Primeramente, se concentró la solución de clarificado al 50% del volumen original, ($FC = 2$) se agregó un (VD) volumen de buffer Tris 10mM/HCl igual al volumen de filtrado ($VD = 1$), esta operación se repitió hasta diafiltrar la solución con $6VD$. Se tomaron muestras de retenidos y filtrados cada 1 VD y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y por cromatografía líquida de alta resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC). La membrana fue lavada recirculando NaOH 0.5M durante 30 minutos.

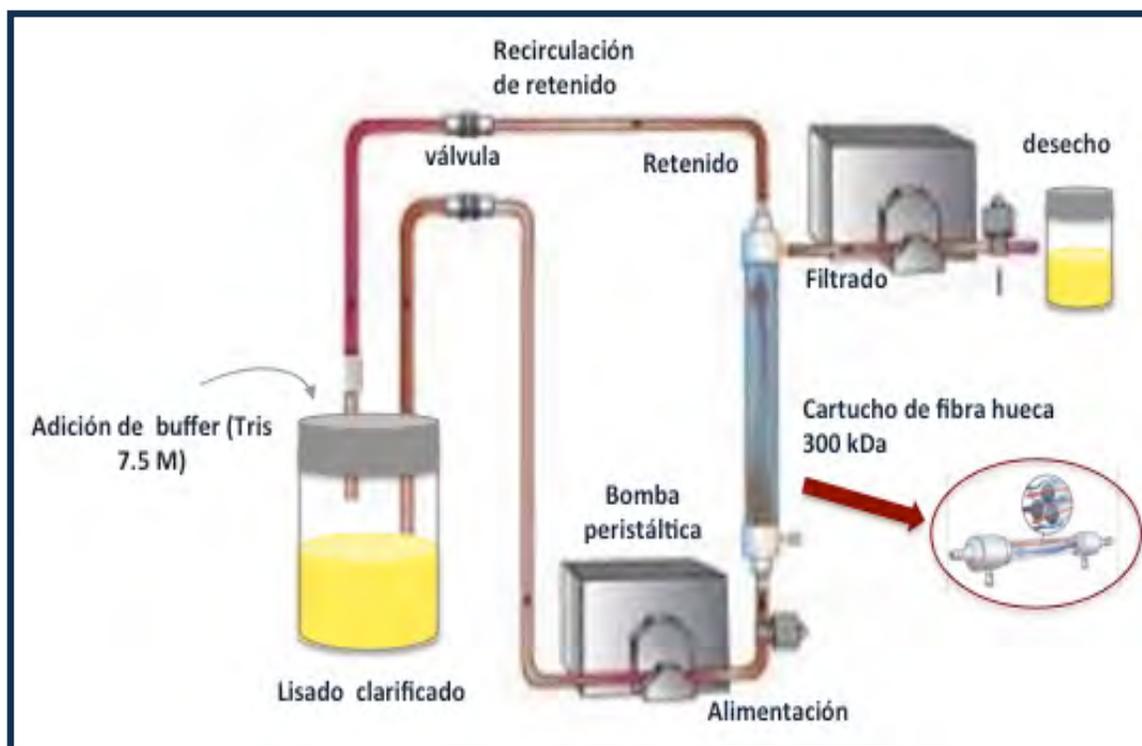


Figura 29. Sistema de ultrafiltración para diafiltración de solución clarificada.

3.2.4. Purificación final

La etapa de purificación final de pDNA se realizó por cromatografía de intercambio iónico utilizando el procedimiento descrito en la Figura 30.

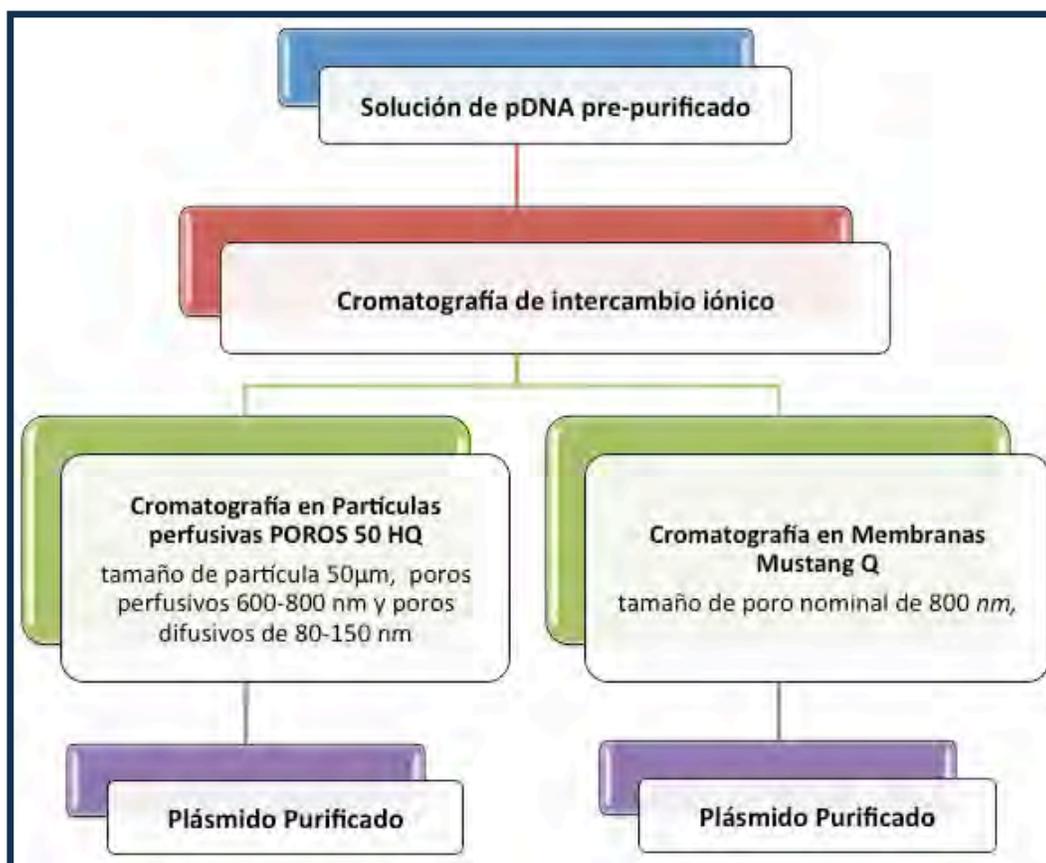


Figura 30. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la etapa de purificación final de pDNA

En la purificación con membranas de intercambio iónico, se empleó una columna Tricorn (Amersham Biosciences) empacada con membranas Mustang Q (Pall Biopharmaceuticals) como adsorbente; estas membranas cuentan con soportes de intercambio aniónico de polietersulfona (PES) y un revestimiento polimérico reticulado de grupos funcionales de amina cuaternaria, con un tamaño de poro nominal de 800 nm intercaladas con soportes de polipropileno.

Las membranas fueron cortadas con ayuda de un sacabocados de tamaño 0.476 cm de diámetro y se acondicionaron de acuerdo a las especificaciones del fabricante: se lavaron en una solución de NaOH 1M durante 5 min, después fueron enjuagadas en una solución NaCl 1M durante 5 min agitando suavemente, finalmente se sumergen en buffer TE durante 12 h. Para el empaque de la columna se utilizaron 30 membranas, es necesario comprimir bien las membranas para evitar que se encapsule aire en ella; una vez empacada se conecta sistema Akta Purifier 10-UPC de GE Healthcare® y se hace pasar buffer TE a un flujo de 0.5 mL/min, verificando la ausencia de burbujas de aire en la columna.



Figura 31. Membranas Mustang Q coin (Pall Biopharmaceuticals)



Figura 32. Ajuste de tamaño de membranas para poder ser empacadas en la columna Tricorn.



Figura 33. Empaque de columna intercalando membranas y soporte de propileno.

En la purificación con partículas de intercambio iónico, se empleó una columna Tricorn empacada con partículas perfusivas POROS 50 HQ (Applied Biosystems) como adsorbente. Estas partículas de 50 μ m de diámetro tienen una superficie recubierta con polietilenimina cuaternaria, que es un intercambiador aniónico fuerte con una superficie de ionización en un rango de pH de 1 a 14, con poros perfusivos de 600-800 nm y poros difusivos de 80-150 nm; para el empaque de la columna, se acondicionaron 0.1495 mL (1.8 veces el volumen deseado) de adsorbente siguiendo el protocolo especificado por el fabricante; las partículas se lavaron en una solución de NaCl 1M durante 3h aproximadamente (hasta que las partículas se asentaron por gravedad), después fueron lavadas en una solución NaCl 0.5 M, este paso se repitió tres veces. Se empacó la columna permitiendo un flujo por gravedad hasta alcanzar aproximadamente 0.5 cm de altura de lecho. Con el objeto de que el adsorbente sedimentara se dejó reposar la columna toda la noche. Posteriormente la columna se instaló en el cromatógrafo y se equilibró con buffer de adsorción a un flujo de 0.5 mL/min, verificando la ausencia de burbujas de aire en la columna.

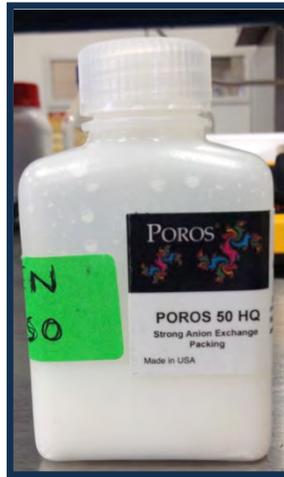


Figura 34. Partículas perfusivas POROS 50 HQ (Applied Biosystems).



Figura 35. Lavado de partículas perfusivas en una solución de NaCl 1M y 0.5 M.



Figura 36. Empaque de columna Tricorn intercalando membranas y soporte de propileno.

En cada una de las experimentaciones, la columna empacada (con membranas o con partículas) se equilibró previamente con buffer 0.5 M de NaCl en TE. La solución pre-purificada (equilibrada a 0.5 M de NaCl) se alimentó a la columna en modo frontal con una velocidad de flujo constante de 0.5 mL/min. La absorbancia del eluato se monitoreó a 260 nm. La etapa de adsorción se realizó alimentando el volumen de la solución de retenido. La etapa de lavado se llevó a cabo con buffer TE, variando el volumen utilizado en cada uno. La etapa de elución fue realizada por gradiente, con NaCl en buffer TE, variando su molaridad y volumen, en cada método, (Tabla 3).

Tabla 3. Programas de Cromatografía de intercambio iónico utilizados en la experimentación

Método	Adsorción		Lavado		Elución			
	Vol (mL)	Molaridad (NaCl)	Vol (mL)	Molaridad (NaCl)	I		II	
					Vol (mL)	Molaridad (NaCl)	Vol (mL)	Molaridad (NaCl)
Inicial	5	0.5	7.5	0.6	10	0.6 - 2	***	***
A	4	0.5	5	0.5	6	0.6M - 0.725	7.5	0.725M - 1.1
B	4	0.5	4	0.5	7.5	0.6M - 0.725	7.5	0.725M - 1.1

Al finalizar la etapa de elución se incrementó la fuerza iónica hasta 2M de NaCl en TE con el objetivo de limpiar los poros de cualquier molécula remanente. Finalmente se

equilibró la columna dejándola en la salinidad inicial (0.5 M de NaCl en TE). Se tomaron muestras de la solución a la salida de la columna en las etapas de adsorción, lavado y elución para analizar la calidad y concentración del plásmido. Al final de cada experimentación se hizo pasar por las columnas agua desionizada y etanol al 30% hasta llegar a una conductividad de 0.020 mS para ser almacenadas.

3.2.5. Análisis de muestras

Todas las muestras obtenidas durante la experimentación fueron analizadas cualitativa y cuantitativamente por electroforesis en gel de agarosa y cromatografía líquida de alta resolución en una columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).

Electroforesis

Para evaluar el estado del plásmido se analizan todas las muestras obtenidas del bioproceso. Para los estudios de electroforesis se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE (Tris 40 mM-Ácido acético 20 mM-EDTA 1mM, pH 8), y se colocó en la cámara de electroforesis cubriéndolo con buffer TAE.

Cada muestra se prepara agregando 5 μ L de la muestra a analizar más 1 μ L de colorante de carga 6x, se cargan las muestras en el gel dentro de la placa de electroforesis colocando en el primer pozo el marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder, Invitrogen®). Se conecta poniendo el electrodo negativo arriba (donde se encuentra la muestra), se ajusta el voltaje a 60 Volts durante 90 min, se saca la placa con el gel y se sumerge en bromuro de etidio (0.5 μ g/ cm^3) 25 minutos para después ser sumergido en agua (15 min) para lavar, el gel se pasa al equipo Multi-Doc para fotografiar en luz UV.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

Para determinar la concentración del pDNA se utilizó cromatografía líquida de alta resolución en columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC) en el equipo Äkta Purifier con una columna HIC Source 15PHE (Fenil-Poliestireno) de 0.46 x 10 cm marca GE Healthcare®, siguiendo la metodología de Diogo y col. (2003). Inicialmente la columna

se equilibra con una solución de sulfato de amonio 1.5 M en Tris 10 mM-HCl, pH = 8. Subsecuentemente, 30 μ L de una muestra apropiadamente diluida en buffer de equilibrio fue inyectada y eluida a 1 mL/min. Después de ese paso, la concentración de sal se mantuvo en 0 M de sulfato de amonio por 0.5 min para eluir las especies ligadas débilmente en la matriz. La columna fue entonces reequilibrada con 1.5 M de sulfato de amonio por 5.5 min. La absorbancia fue monitoreada a 260 nm. En esta metodología se muestra que en un cromatograma analítico el pico a los 0.71 min de retención corresponde a la elución pDNA (todas las isoformas), los picos (1.28 y 1.98 min) se atribuyen a las impurezas menos hidrofóbicas como RNA de bajo peso molecular, gDNA y proteínas y el pico a los 3.54 min corresponde a las impurezas más hidrofóbicas como RNA de alto peso molecular y gDNA (Diogo y col., 2003). El porcentaje de pureza HPLC del plásmido en una muestra, se definió como la razón porcentual del área del pico de plásmido, entre el área total (la suma de las áreas de todos los picos en el cromatograma). El área total en los cromatogramas de las muestras se corrigió restando el área total de los correspondientes blancos (buffers), preparados igual que las muestras

La concentración del pDNA fue determinada por medio de una curva de calibración (Anexo A) construida con estándares de plásmido purificado con un kit comercial, con concentraciones de 0.05 a 60 μ g/mL, asociando la concentración de una muestra, al área del pico eluido a los 0.7 min. La recuperación de plásmido fue determinada haciendo un balance de masa en cada etapa del proceso.

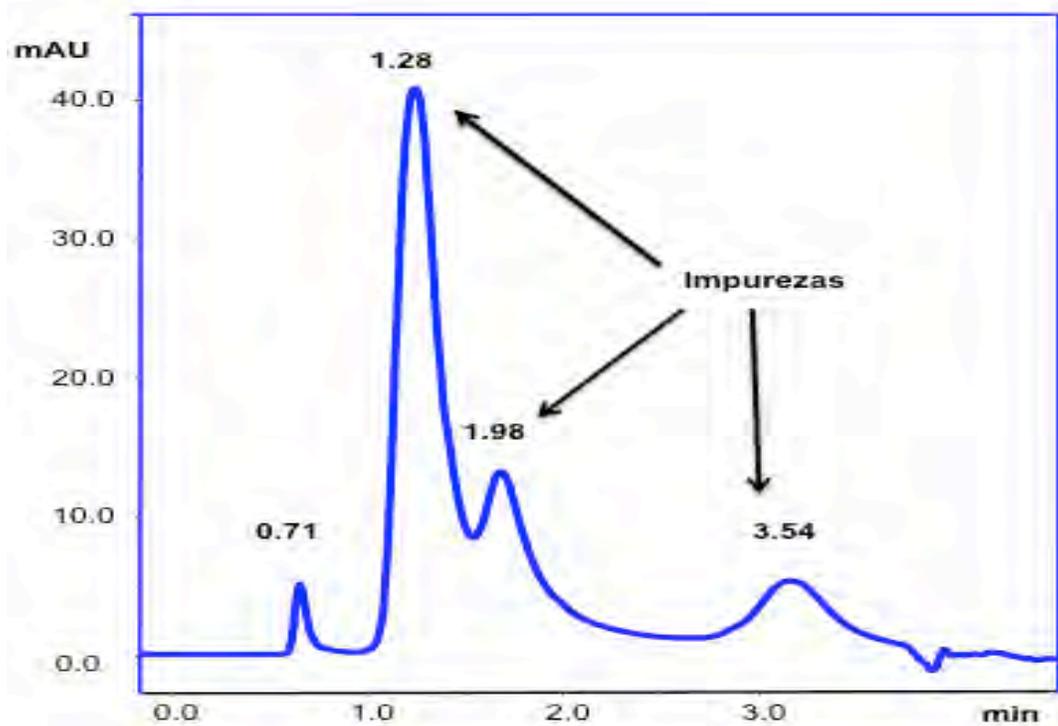


Figura 37. Cromatograma típico de análisis HIC-HPLC (muestra analizada: lisado alcalino). (Diogo y col., 2003).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fermentación

Para la elección del inóculo se analizaron por HPLC-HIC y electroforesis en gel de agarosa diferentes stocks de células congeladas; se realizó una propagación celular en matraz en medio definido alcanzando una $OD_{600} \approx 8.96$ en 12 horas; el crecimiento en el bioreactor operado en modo batch alcanzó un $OD_{600} \approx 12.95$ en 11 horas. Con los datos de OD_{600} se realizó una cinética de crecimiento (Figura 38) y se calculó la velocidad de crecimiento específica, obteniéndose un valor de $\mu = 0.57 \text{ h}^{-1}$, típico de este tipo de cultivos.

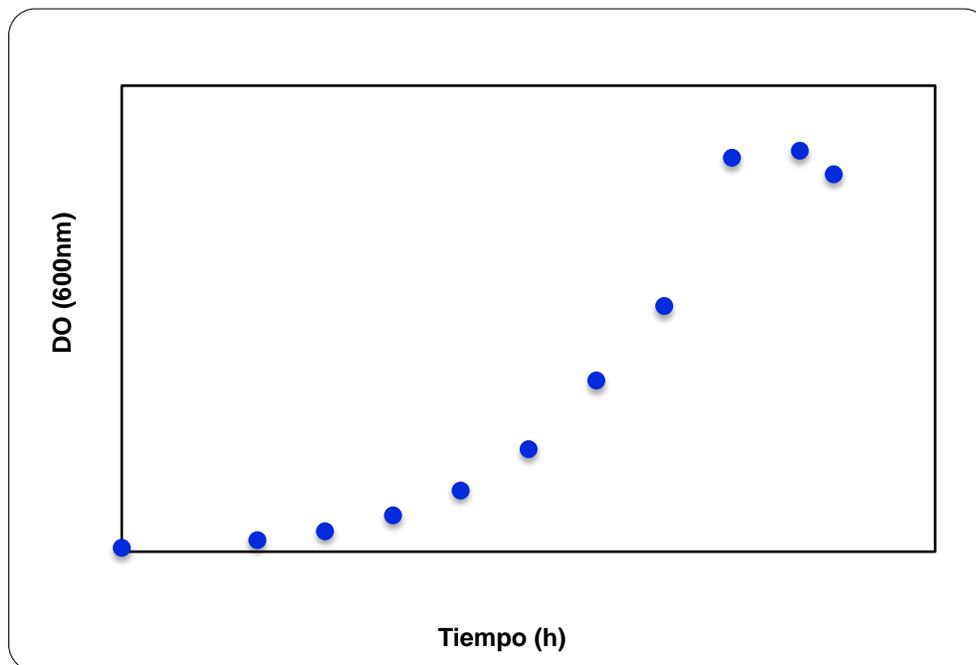


Figura 38. Cinética de crecimiento celular en modo batch.

Con la finalidad de corroborar la existencia de alguna contaminación en el medio de cultivo y morfología de la bacteria, se realizó una tinción Gram del medio (Figura 39).



Figura 39. Tinción gram del cultivo de *E. coli* DH5 α . (100X)

Se observan en la Figura 39 únicamente bacilos gram negativos característicos a *E. coli*, por lo que puede asumirse que el cultivo está libre de contaminantes y que sólo creció la bacteria modificada de interés, debido a la adición de kanamicina.

4.2 Recuperación primaria

Se cosecharon las células por centrifugación obteniéndose un total de 23.36 g de biomasa del volumen total de caldo de cultivo (3 litros), con un rendimiento de 7.79 g/L. Después de la centrifugación, se desechó el sobrenadante; las células fueron resuspendidas para ser lisadas y neutralizadas con las soluciones correspondientes según la metodología utilizada, la solución fue centrifugada para retirar los flóculos y precipitados. Se obtuvieron un total de 560 mL de lisado clarificado.



Figura 40. Biomasa obtenida por centrifugación (izquierda), flóculos formado de restos celulares e impurezas después de lisis alcalina y neutralización (derecha).

Se realizó un análisis por HPLC-HIC para determinar la concentración del pDNA en el lisado clarificado y un análisis electroforético para verificar el estado del pDNA y sus isoformas cualitativamente, así como las impurezas contenidas (Figura 41-42) en la solución clarificada obtenida.

En la Figura 41 se observa el análisis por electroforesis del lisado clarificado. En la figura puede observarse en los carriles 4 y 5 la banda del pDNA superenrollado (sc), pDNA circular abierto (oc), gDNA y RNA en las muestras de lisado de la solución Base.

En la Figura 42 se observa en el cromatograma analítico por HPLC-HIC de las muestras del lisado clarificado y contiene: el pDNA (0.71 min de retención) con 54.2 $\mu\text{g/mL}$ de concentración y 3.87% de pureza HPLC, dentro del rango esperado para cultivos similares (3 a 5 % (Freitas y col., 2007; Gomes y col., 2008)), además de una gran cantidad de impurezas (1.28min, 1.98 min y 3.54min de retención). Esta solución clarificada que en adelante se llamó Solución Base (solución B) se procesó por la metodología propuesta para obtener plásmido purificado.

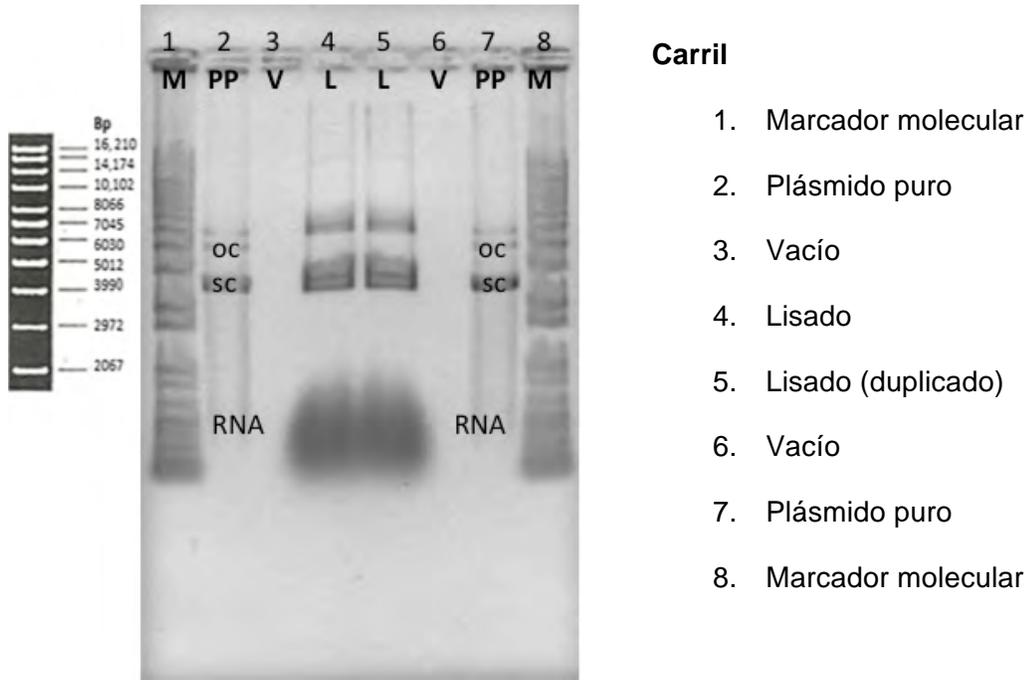


Figura 41. Gel de electroforesis del lisado clarificado por centrifugación.

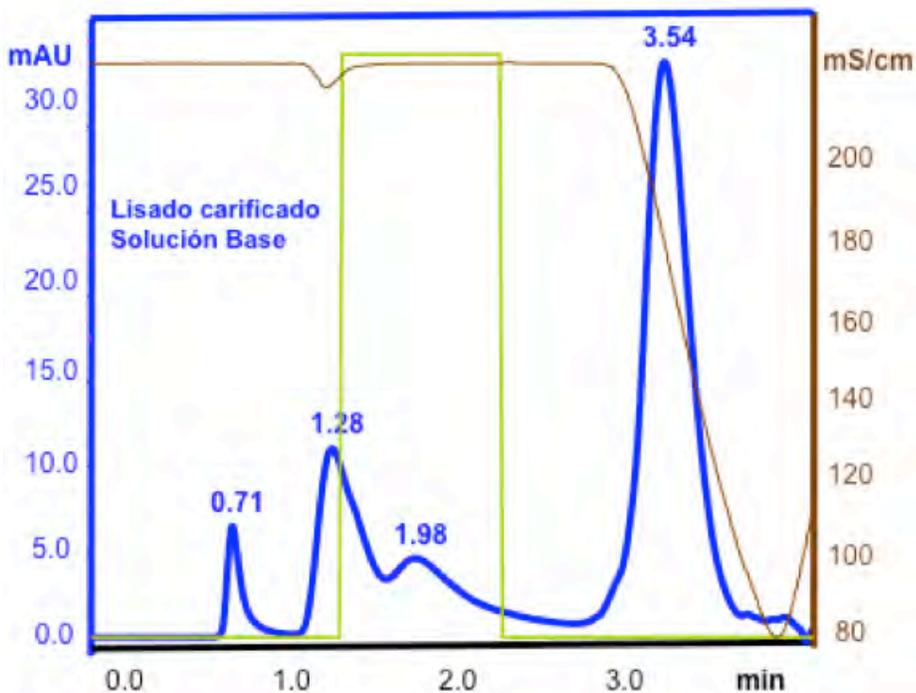


Figura 42. Análisis del lisado clarificado por centrifugación por HIC-HPLC de la solución Base con 54.2 $\mu\text{g/mL}$ de concentración y 3.87% de pureza.

4.3 Recuperación Intermedia

4.3.1 Determinación de volúmenes de diafiltración de un lisado

Se realizó un análisis para determinar el número de volúmenes de diafiltración necesarios para diafiltrar un lisado clarificado obtenido de estudios previos, por medio de ultrafiltración tangencial en una membrana de polisulfona de fibras huecas de 300 kDa y 30 cm de largo con un área total de filtración de 16 cm^2 en modo batch. Se mantuvieron las condiciones de operación durante las corridas: flujo de diafiltración de 24 mL/min, flujo en el permeado de 1 mL/min, además la presión fue monitorada para evitar que pDNA pudiera elongarse y pasar a través de la membrana.

Se alimentó una solución clarificada con 32.56 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA y 2.2% de pureza HPLC al sistema de ultrafiltración de flujo tangencial, se analizaron las muestras

colectadas del retenido y filtrado en cada volumen de lavado por electroforesis y por HPLC-HIC, se compararon con la solución de lisado clarificado alimentado.

En la Figura 43 se muestra el análisis por electroforesis de muestras de retenidos y filtrados cada volumen de lavado, se observó la presencia de pDNA en los retenidos, mientras que en los filtrados sólo se está presente el RNA y conforme avanzan los lavados la cantidad de RNA disminuye, indicando que se ya han filtrado este tipo de impurezas de tamaño menor a 300 kDa con 6 VD.

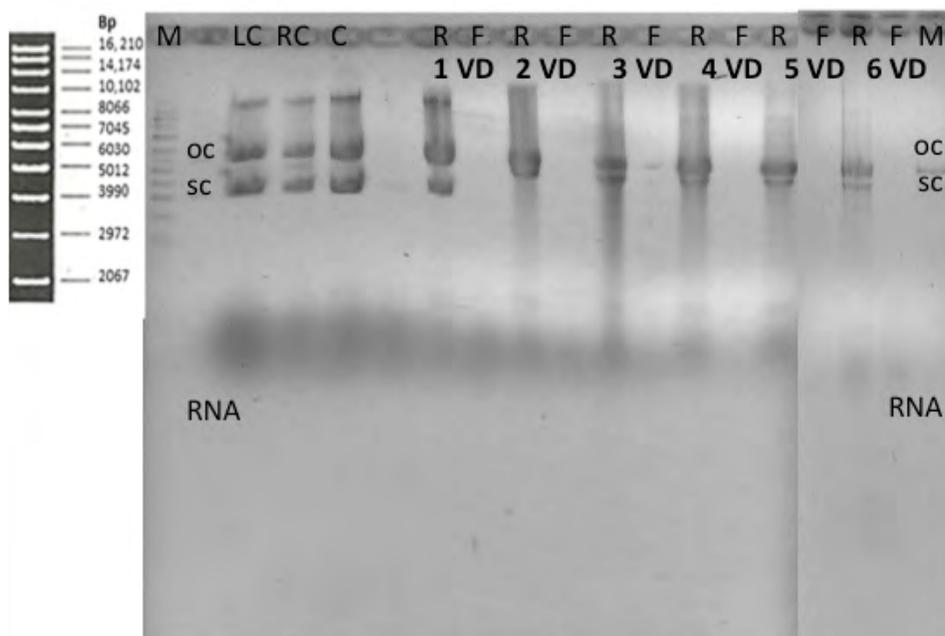


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa del clarificado alimentado, así como muestras de retenidos y filtrados en cada lavado. M: marcador molecular, LC: lisado clarificado, RC: recirculado, C: concentrado, R: retenido, F: filtrado.

En la Figura 44 se muestra el cromatograma analítico del lisado alimentado y retenido a diferentes volúmenes de lavado. Puede observarse que el lisado alimentado contiene el pDNA (0.71 min) además de una gran cantidad de impurezas (1.28min, 1.98 min y 3.54min). En los análisis de los retenidos muestran que conforme avanzan los lavados de la solución el pDNA se concentró y se mantiene constante en cada lavado, mientras que las impurezas se eliminaron en el filtrado, prácticamente quedando buffer.

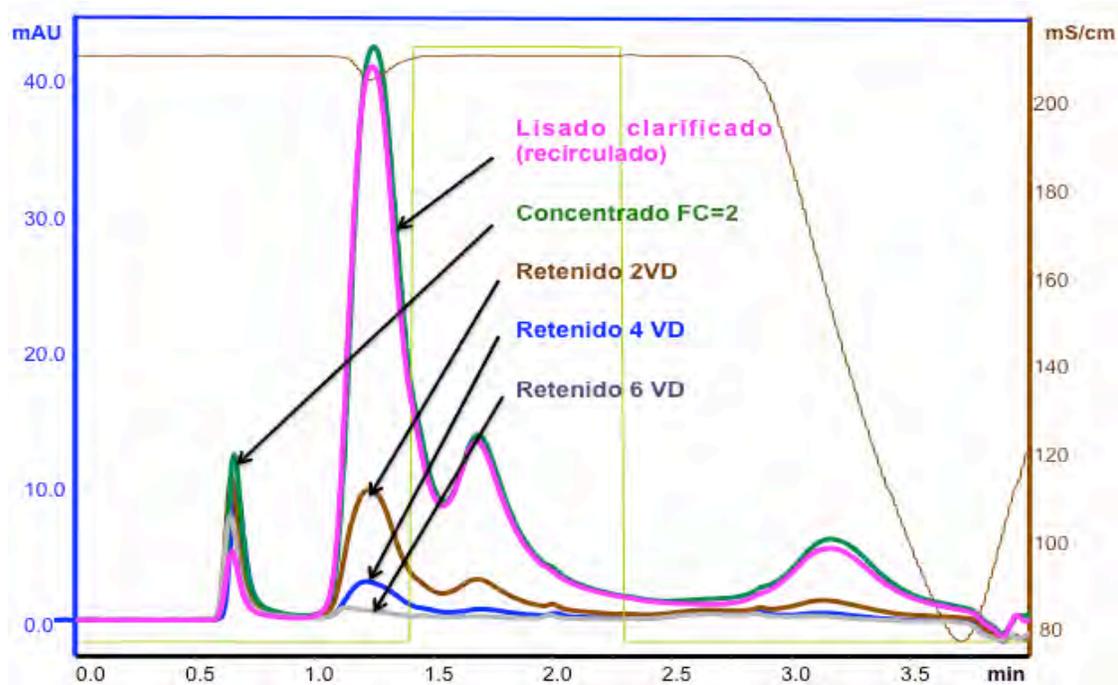


Figura 44. Cromatograma analítico del lisado alimentado en la ultrafiltración tangencial y de retenido en cada volumen de lavado (Solución alimentada con 32.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pDNA y 2.2% de pureza).

En la Tabla 4 se resumen los análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD. Se obtuvo una concentración de 51.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pDNA con pureza de 63.7% al final del sexto lavado, se aumentó 29 veces la pureza de la solución.

Tabla 4. Análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD

Solución	Concentración de	%	Aumento de pureza
	pDNA μg/mL	Pureza HPLC	
Alimentación	32.56	2.2	
Concentrado	77.92	4.9	2.2
Retenido en 2VD	68.26	16.6	7.5
Retenido en 4VD	63.97	40.3	18
Retenido en 6VD	51.06	63.7	29

4.3.2 Solución Base

Se alimentó la Solución Base (Solución B), que es un lisado clarificado con 54.2 μg/mL de pDNA y 3.87% de pureza al sistema de ultrafiltración de flujo tangencial, se analizaron las muestras colectadas del retenido y filtrado en cada volumen de lavado por electroforesis y por HPLC-HIC, se compararon con la solución de lisado clarificado alimentado. Se mantuvieron las mismas condiciones de operación de los experimentos anteriores.

En la Figura 45 se muestra el cromatograma analítico por HPLC-HIC de la solución alimentada y muestras de retenidos de cada volumen de lavado, se observó la presencia de pDNA en todos los retenidos (0.71 min de retención) además de impurezas (1.28min, 1.98 min y 3.54min de retención). Los análisis de los retenidos presentan el mismo comportamiento de estudios previos: conforme avanzan los lavados, la solución se concentró en el pDNA y se mantuvo constante en cada lavado, las impurezas se eliminaron en el filtrado. Se observó que en el concentrado los picos de impurezas no equivalen al doble de la solución alimentada, esto se debe a las impurezas de tamaño pequeño que se eliminan en el filtrado mientras se concentra la solución.

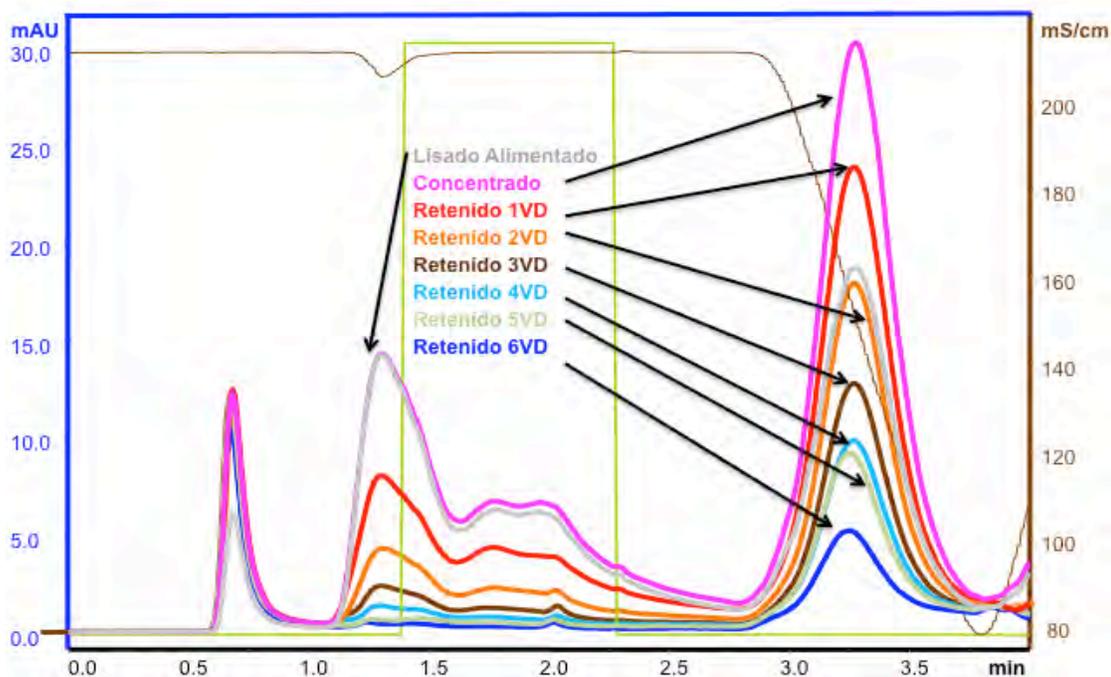


Figura 45. Cuantificación de plásmidos e impurezas en retenidos de la Solución B, en cada VD en la etapa de pre-purificación por TFF (Lisado clarificado alimentado con 54.2 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA y 3.87% de pureza).

En la Figura 46 y la Tabla 5 se resume el comportamiento de la concentración y pureza del retenido en cada VD durante del desarrollo de la TFF. Se obtuvo una concentración de 87.89 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA con pureza de 40.9% al final del sexto lavado, se aumentó 10.6 veces la pureza de la solución.

En la Figura 46 se muestra el comportamiento de la concentración de pDNA y pureza HPLC con los volúmenes de lavado de 100 mL de solución B. Se observa en la figura una ligera disminución de la concentración de pDNA en el retenido, durante el lavado, esto puede atribuirse a un error en la medición de volúmenes de retenido. También se aprecia en la figura que la pureza aumenta en una relación lineal con los volúmenes de lavado ($R^2 = 0.96$). Este comportamiento coincide con el obtenido por Freitas, 2007(a) para el escalamiento de un sistema de TFF.

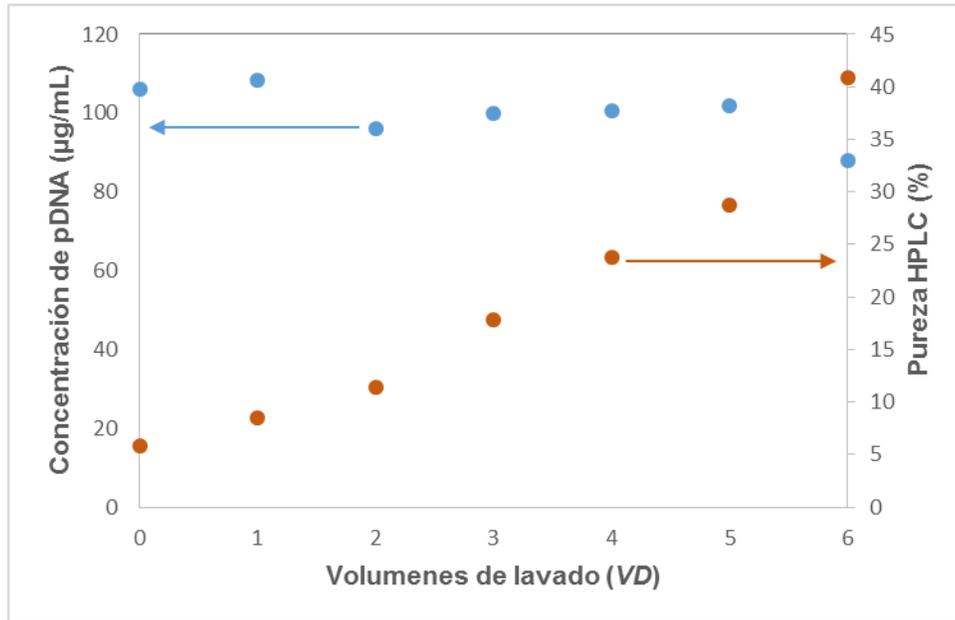


Figura 46. Relación de la concentración de pDNA y pureza HPLC de 100 mL de solución B, concentrado FC = 2, en el procesamiento por TFF usando 3 L de Tris 10 mM-HCl pH 7.5.

Tabla 5. Análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD

Solución	Concentración µg/mL	Pureza HPLC %	Aumento de pureza
Lisado	54.2	3.9	
Concentrado	106.1	5.8	1.5
Retenido en 1VD	108.3	8.5	2.2
Retenido en 2VD	96.2	11.5	3.0
Retenido en 3VD	99.8	17.8	4.6
Retenido en 4VD	100.7	23.8	6.2
Retenido en 5VD	101.9	28.7	7.4
Retenido en 6VD	87.9	40.9	10.6

En la Figura 47 se observa el cromatograma analítico por HPLC-HIC de muestras de filtrado de cada volumen de lavado, donde se puede confirmar que en no hay pérdida de pDNA conforme evoluciona la diálisis.

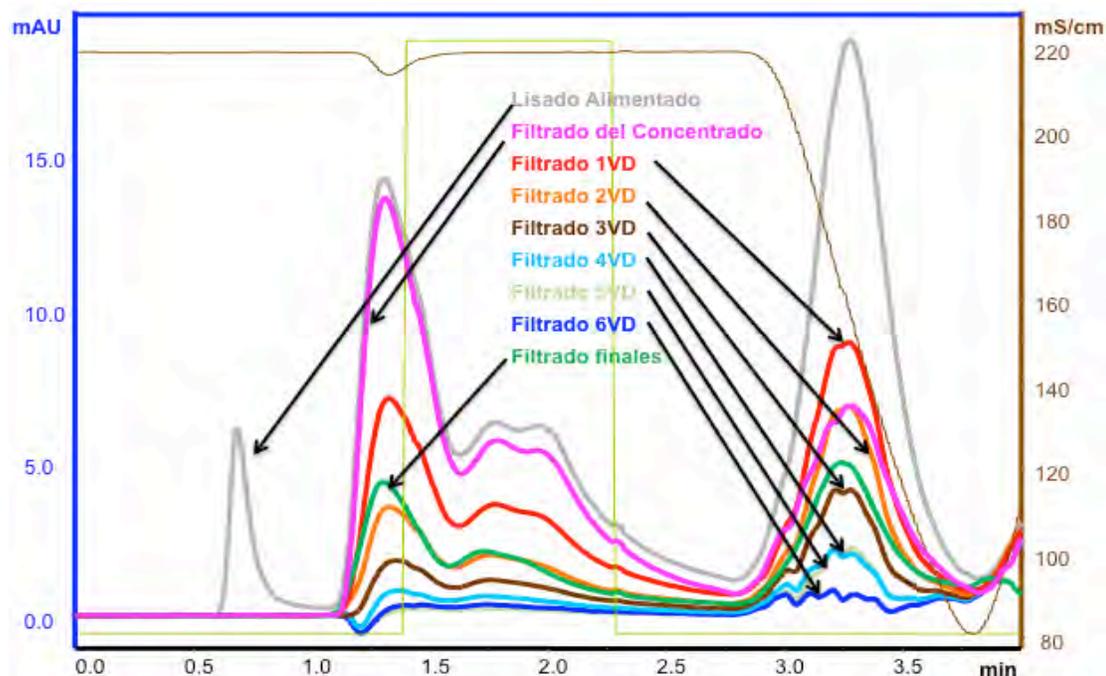


Figura 47. Cuantificación de plásmidos e impurezas en filtrados de cada VD en la etapa de prepurificación por TFF comparada con el cromatograma analítico del lisado clarificado alimentado.

En la Figura 48 se muestra el análisis por electroforesis de muestras de retenidos y filtrados en cada volumen de lavado, se observó la presencia de pDNA en los retenidos y se conserva, mientras que en los filtrados sólo hay impurezas de tamaño menor a 300 kDa que disminuyen conforme avanza la diálisis, no existiendo pérdidas de pDNA. En el proceso de TFF del lisado clarificado, se logró disminuir el 70 % de los contaminantes, obteniéndose una solución de retenido de buena calidad para alimentarse a las columnas de purificación.

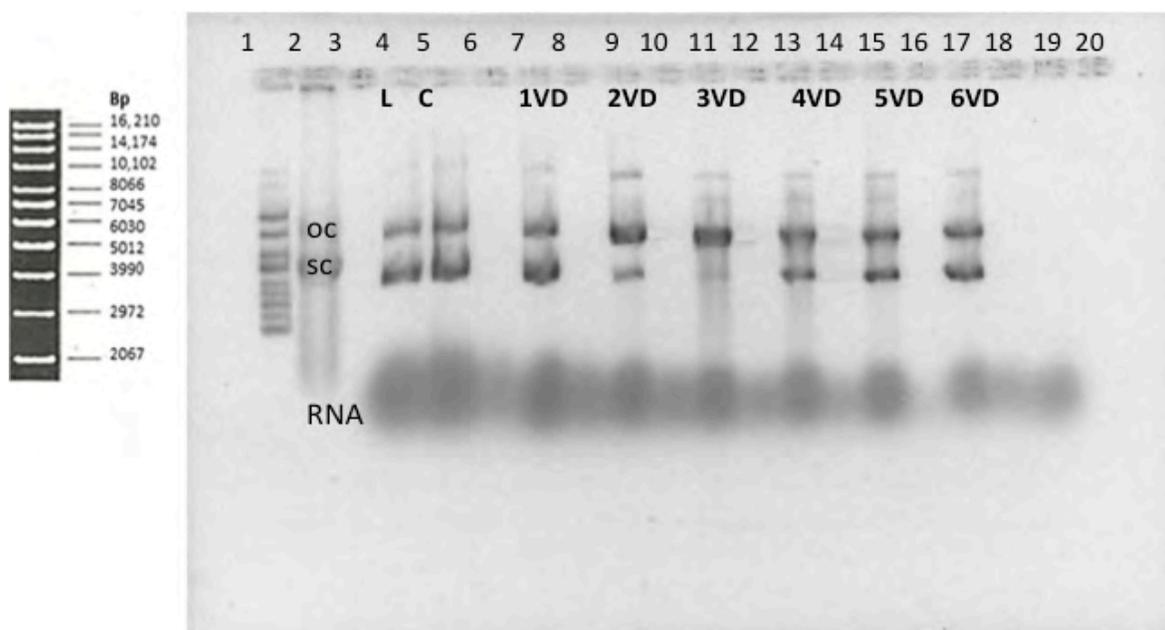


Figura 48. Electroforesis en gel de plásmido e impurezas en la etapa de pre-purificación por TFF. Carril:

1. Marcador molecular, 2. pDNA purificado de kit, 3. Vacío, 4. Lisado, 5. Concentrado, 6. Filtrado del concentrado, 7. 1VD Retenido, 8. 1VD Filtrado, 9. 2VD Retenido, 10. 2VD Filtrado, 11. 3VD Retenido, 12. 3VD Filtrado, 13. 4VD Retenido, 14. 4VD Filtrado, 15. 5VD Retenido, 16. 5VD Filtrado, 17. 6VD Retenido, 18. 6VD Filtrado, 19. Filtrados finales, 20. Vacío.

4.4 Purificación Final

4.4.1 Determinación de las condiciones de operación en las columnas de intercambio iónico

Las condiciones experimentales utilizadas en las columnas empacadas con membranas y con partículas perfusivas fueron las mismas (volumen de lecho, se utilizó la misma solución en la alimentación y condiciones de adsorción, lavado y elución). Se alimentó una solución pre-purificada de concentración 59.11 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA acondicionada en 0.5M NaCl en TE utilizando el método inicial descrito en la Tabla 3. La solución se alimentó a cada una de las columnas obteniéndose los perfiles de adsorción lavado y elución de ambos sistemas mostrados en la Figura 49.

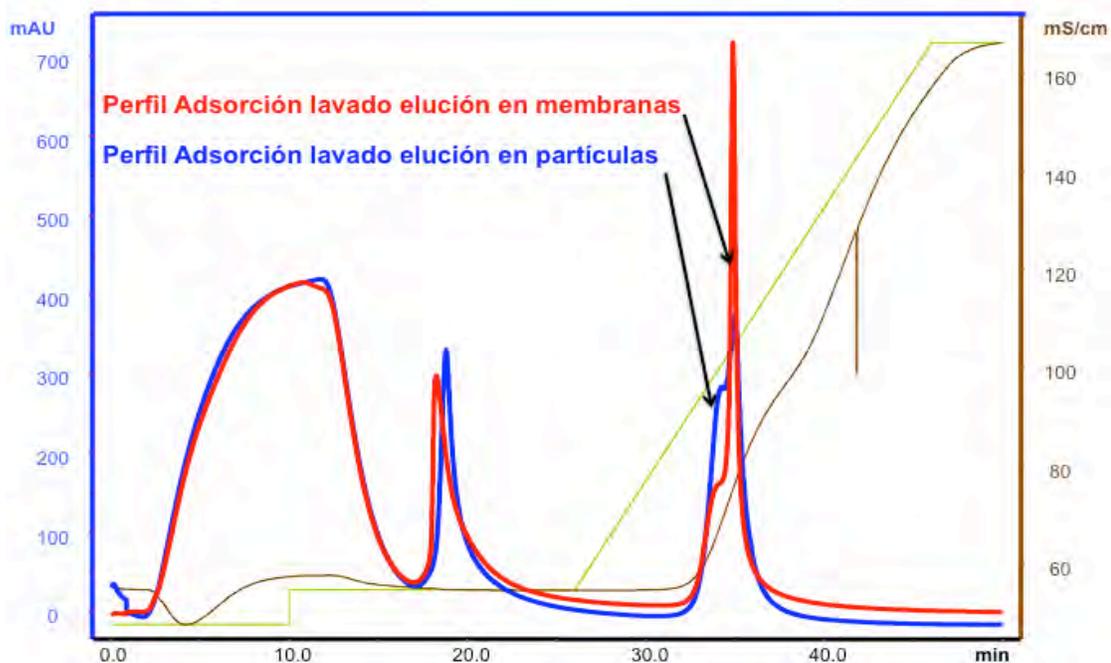


Figura 49. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

Puede observarse en la Figura 49 que la etapa de adsorción tuvo una duración de 10 minutos, la masa de pDNA alimentado en 5 mL fue de 295.6 μg en cada columna, con un comportamiento prácticamente igual en ambas (en unidades de absorbancia mAU). En la etapa de lavado se observa un pico que se supone contiene cantidad apreciable de impurezas, también semejante para ambas matrices. En la etapa de elución se aprecia otro pico con altura diferente para cada columna. La determinación de las concentraciones de pDNA en las fracciones del cromatograma de la Figura 49 empleando HPLC-HIC, se utilizó para obtener la curva de ruptura y el balance de masa en esta etapa.

Las curvas de ruptura obtenidas para cada matriz (en forma adimensional C/C_0 , donde C es la concentración de pDNA a la salida de la columna y C_0 la concentración en la solución alimentada) se muestran en la Figura 50. Puede observarse en la figura que el perfil expresado en C/C_0 no presenta un comportamiento similar para ambas columnas,

así como al perfil expresado en mAU. Al inicio de la etapa de adsorción la concentración de pDNA a la salida de ambas columnas es muy baja, esto implica que existe adsorción de pDNA de la solución pre-purificada hacia la matriz.

En el caso de la columna empacada con membranas, después de los primeros 5 mL de alimentación, la concentración a la salida es $C = 2.22 \mu\text{g/mL}$ ($C/C_0 = 0.04$) y calculando la masa de plásmido no adsorbido, como el área bajo la curva (1.7 μg), se tiene 294 μg adsorbidos de los 295.6 μg de pDNA alimentado, lo que indica que hay una completa adsorción de plásmido, (99.4%).

En tanto, que en la columna empacada con partículas, después del mismo volumen alimentado, la concentración a la salida es $C = 11.5 \mu\text{g/mL}$ ($C/C_0 = 0.19$), calculando la masa de plásmido no adsorbido (7.2 μg) se obtiene 288.4 μg adsorbidos de los 295.6 μg de pDNA alimentado esto da el 97.6 % de adsorción. Estos cálculos se muestran en la Tabla 7.

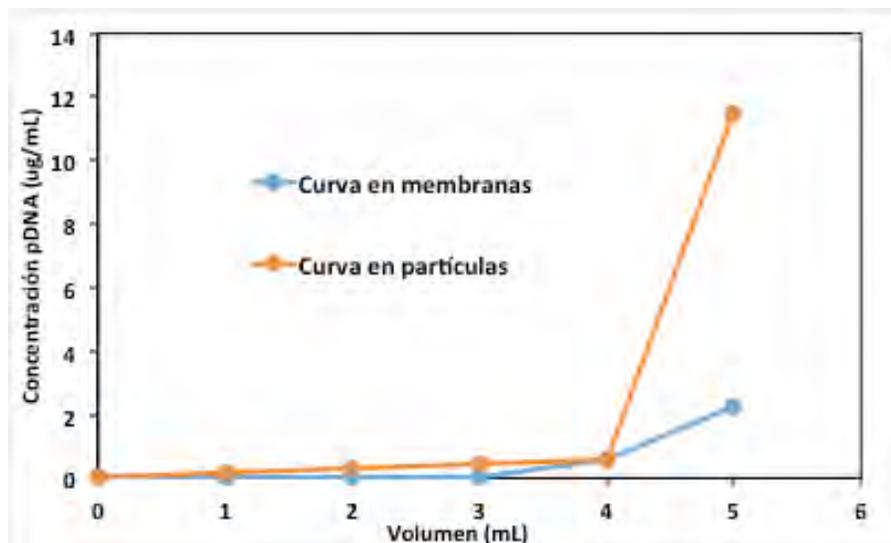


Figura 50. Perfil de concentración adimensional en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

Tabla 6. Balance de masa en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

	Membranas	Partículas
	Masa (μg)	Masa (μg)
pDNA alimentado	295.6	295.6
pDNA no adsorbido	1.7	7.2
pDNA adsorbido	288.4	294
% de adsorción	99.4	97.6

De acuerdo a los datos de la Tabla 6 en la columna empacada con membranas se adsorbió 99.4 % de la masa de pDNA alimentada, cuando C/C_0 alcanzó un valor de 0.04, mientras que en la columna empacada con partículas adsorbió el 97.6% de la masa de pDNA alimentada cuando C/C_0 fue de 0.19. Este análisis puede indicar que existe una mayor velocidad de transferencia de plásmido en la columna de membranas. Este fenómeno podría atribuirse a que las membranas poseen sólo canales perfusivos que permiten el acceso directo del pDNA los sitios de adsorción.

Se comparó la concentración y pureza del plásmido en la solución alimentada y en fracciones eluidas con mayor concentración de pDNA, en ambas columnas. Estos resultados se muestran en la Figura 51. Las fracciones de mayor concentración se obtuvieron a los 35 min de corrida, cuando el buffer de elución tenía una concentración de 1.25 M NaCl en TE. En la columna empacada con partículas, la fracción eluida tuvo un aumento de pureza de 5.5 veces, sin embargo la concentración disminuyó casi a la mitad respecto a la solución alimentada. En la columna empacada con membranas, la fracción eluida tuvo un aumento de pureza de 7.5 veces y la concentración de pDNA aumentó 2 veces con respecto a la solución alimentada. Este resultado sugiere que la matriz de membranas logró adsorber, eluir y concentrar más el pDNA que la matriz de partículas.

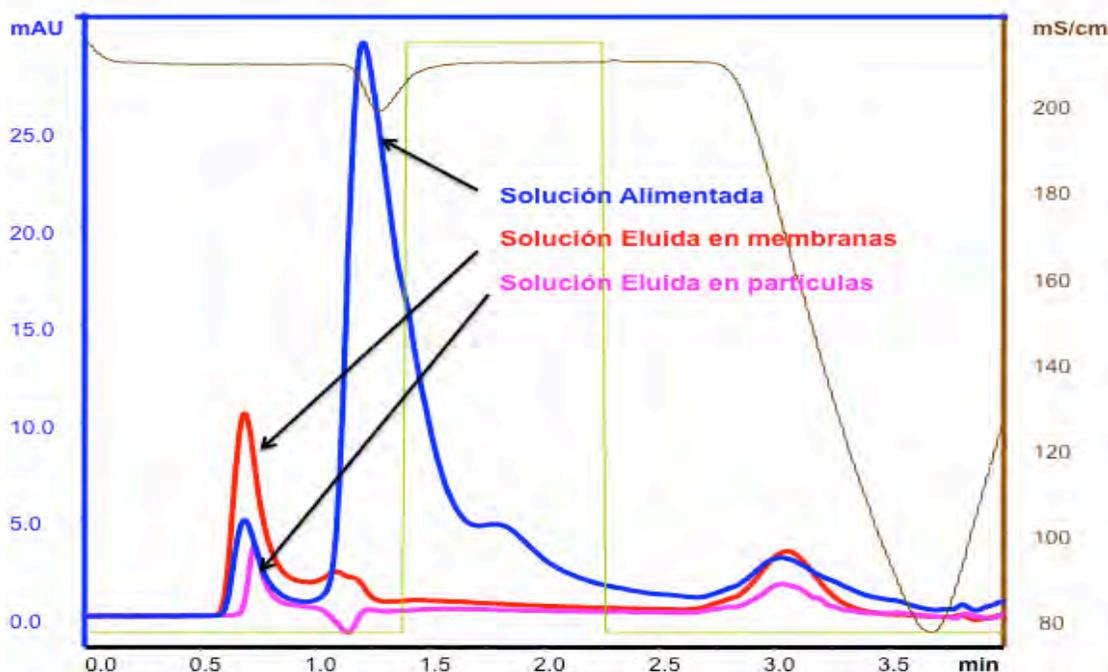


Figura 51. Análisis HPLC-HIC del pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas.

4.4.2 Solución Base

La solución Base es un pre-purificado por TFF con concentración de 87.9 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA con pureza HPLC de 40.9%. Esta solución se agotó durante la elaboración de las curvas de ruptura, por lo que se procedió a utilizar otra del mismo lisado, ahora con 63.6 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA, pureza HPLC de 57.8% y 300 mUA total. Con ésta (Solución B1) se alimentó a las columnas en los estudios de purificación final.

Las curvas de ruptura obtenidas cuando se alimenta la Solución B1 a las columnas empacadas con cada matriz se muestran en la Figura 52. Puede observarse en la figura que en la columna empacada con membranas mantiene una adsorción completa del plásmido durante los primeros 21 minutos, la columna está equilibrada; después aumenta drásticamente, lo que muestra que la columna se comienza a saturar hasta llegar al máximo de absorbancia y permanece constante al minuto 45 aproximadamente; en la columna empacada con partículas, la adsorción se da de

manera más rápida y puede suponerse que el plásmido sale de la columna, llegando a su máximo de absorbancia a un tiempo mucho menor que en la columna empacada con membranas.

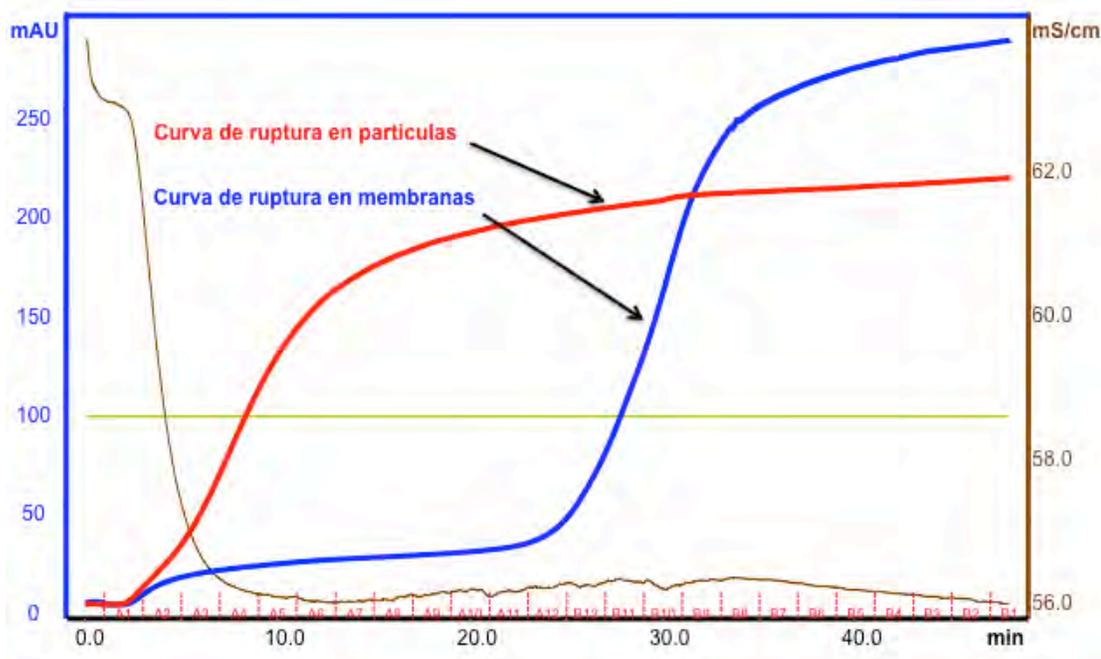


Figura 52. Curva de ruptura en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

Para observar si existen pérdidas de plásmido durante la adsorción se realizó un estudio electroforético para determinar en qué fracciones sale el plásmido de las columnas y poder determinar las condiciones de operación en la adsorción, en las Figuras 53 y 54 se comparan las especies que salen o se retienen en la columna durante toda la adsorción por su análisis electroforético.

En la curva de ruptura en partículas de la Figura 53 se observa que a partir del minuto 4 (fracción A2) el plásmido sale de columna, en cambio en la curva de ruptura en membranas el plásmido sale de la columna hasta el minuto 28 (fracción B10) como se observa en la Figura 54, por lo que se supone que la columna con membranas adsorbe mayor cantidad de plásmido.

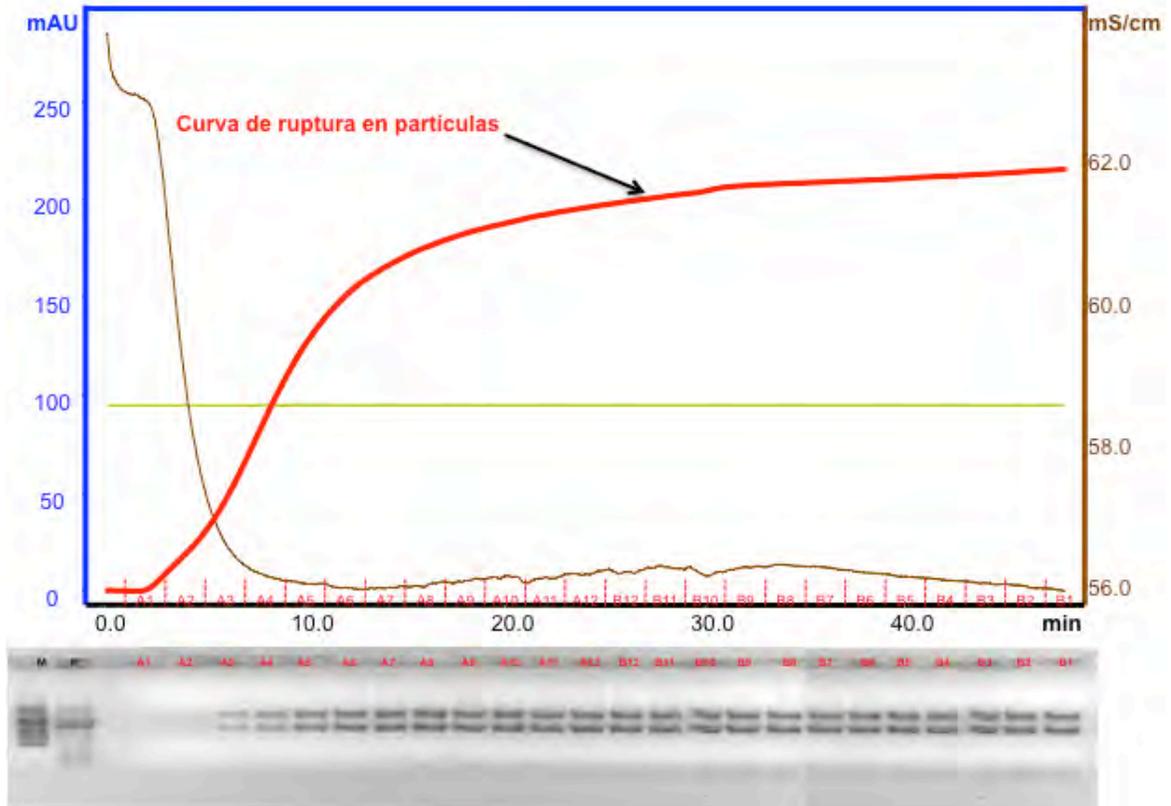


Figura 53. Curva de ruptura en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas (Arriba); gel de electroforesis de la las fracciones a la salida de la columna (Abajo).

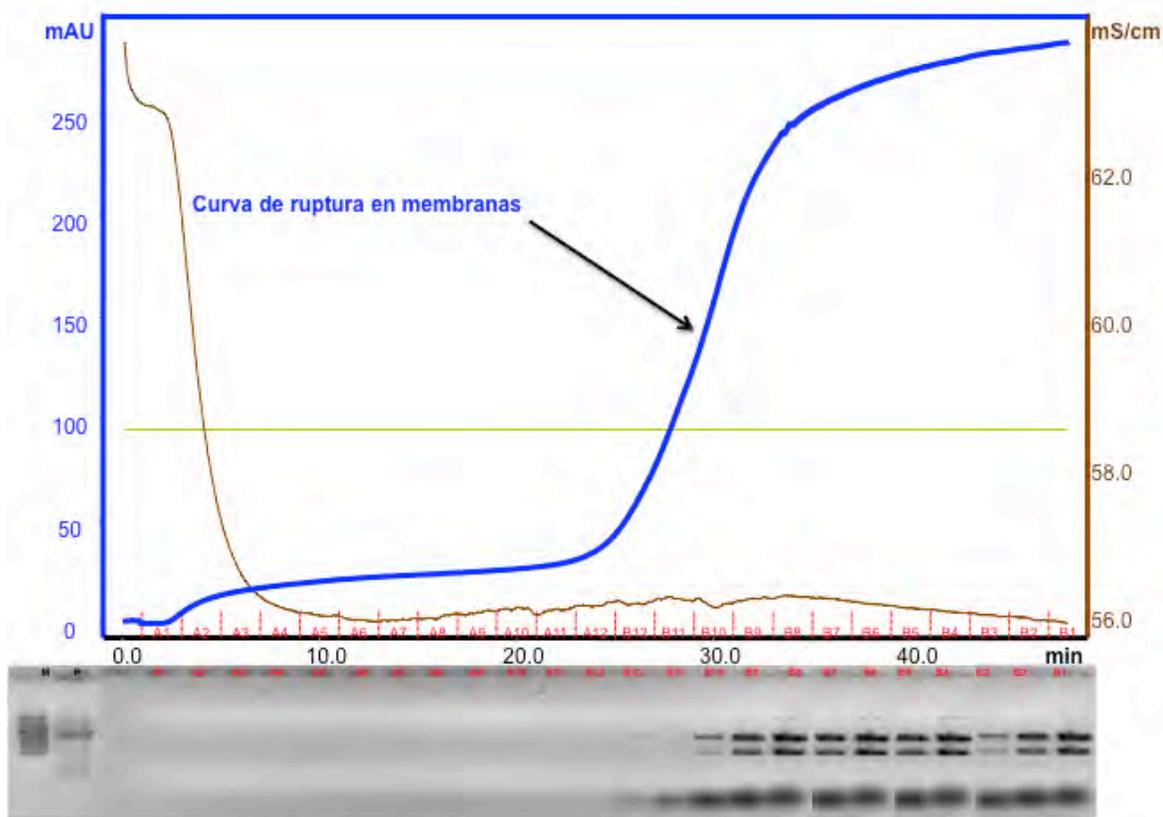


Figura 54. Curva de ruptura en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con membranas (Arriba); gel de electroforesis de las fracciones a la salida de la

Las curvas de ruptura obtenidas para cada matriz (en forma adimensional C/C_0) se muestran en la Figura 55. Puede observarse en la figura que el perfil expresado en C/C_0 presenta un comportamiento muy diferente para ambas columnas, así como el perfil expresado en mAU (Figura 52).

En el caso de la columna empacada con membranas, al alimentar 14 mL de solución en la etapa de adsorción, la concentración de pDNA a la salida de la columna es cero, esto implica que existe completa adsorción de pDNA de la solución pre-purificada hacia la matriz, después de 24 mL de alimentación, la concentración a la salida es $C = 42.9 \mu\text{g/mL}$ ($C/C_0 = 0.72$). Por lo anterior se obtiene que la masa de pDNA alimentado es 1421.7 μg , calculando la masa de plásmido no adsorbido, como el área bajo la curva es

289.8 μg , por lo cual se tiene que 1131.9 μg adsorbidos de los de pDNA alimentado, lo que indica que hay una adsorción de plásmido de 80%.

En tanto, en la columna empacada con partículas, después del mismo volumen alimentado, la concentración a la salida es $C = 53.4\mu\text{g/mL}$ ($C/C_0 = 0.90$). Se obtiene la misma masa de pDNA alimentado, 1421.7 μg , la masa de plásmido no adsorbido es 966.4 μg , por lo cual se tiene que 455.4 μg de pDNA adsorbido, lo que indica que hay 32% de adsorción.

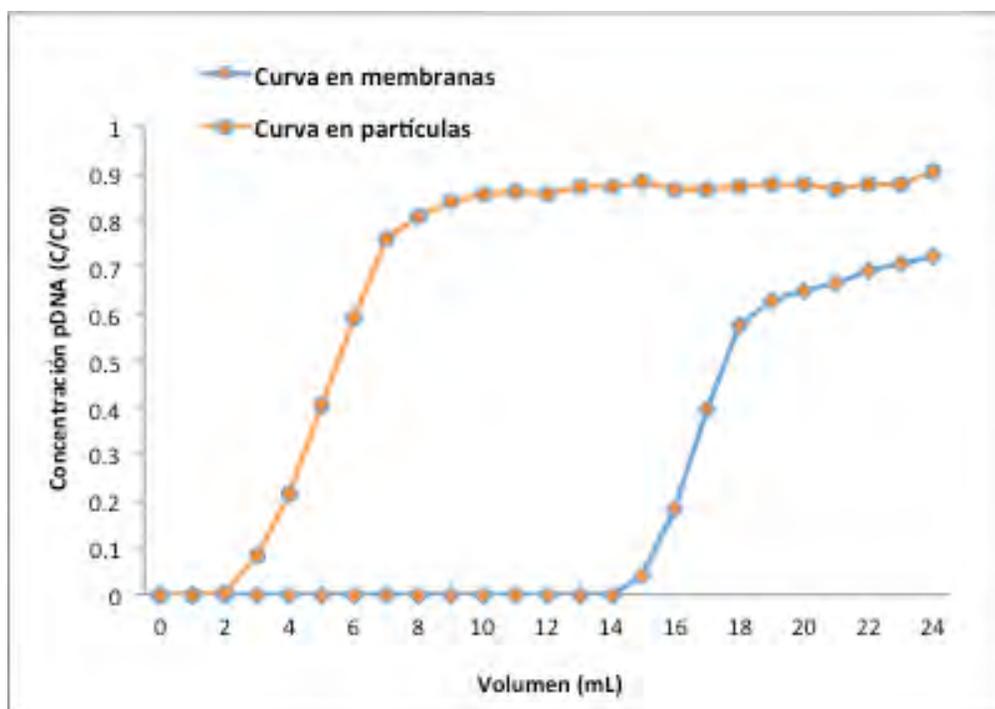


Figura 55. Curva de ruptura en forma normalizada en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

Tabla 7. Balance de masa en la etapa de adsorción en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

	Membranas	Partículas
	Masa (μg)	Masa (μg)
pDNA alimentado	1421.7	1421.7
pDNA no adsorbido	289.8	966.3
pDNA adsorbido	1131.9	455.4
% de adsorción	80.0	32.0

De acuerdo a los datos de la Tabla 7 en la columna empacada con membranas se adsorbió 80 % de la masa de pDNA alimentada, cuando C/C_0 alcanzó un valor de 0.72, mientras que en la columna empacada con partículas adsorbió el 32% de la masa de pDNA alimentada cuando C/C_0 fue de 0.90. Este análisis apoya la observación descrita anteriormente sobre la mayor velocidad de transferencia de plásmido en la columna de membranas a los canales perfusivos que permiten el acceso directo del pDNA los sitios de adsorción.

Es importante señalar que el comportamiento de la concentración a la salida de la columna es similar al mostrado en la Figura 50, en cuanto a que la matriz de membranas adsorbió un mayor porcentaje del pDNA alimentado, que la matriz de partículas. Sin embargo en el caso anterior (Figura 50), el perfil de concentración fue calculado a partir de la fase de adsorción al alimentar un volumen pequeño de pre-purificado alcanzando $C/C_0 = 0.04$ en membranas y $C/C_0 = 0.2$ en partículas y en este último caso (Figura 55) el perfil de concentración se obtuvo a partir de la adsorción por medio de las curvas de ruptura, en donde se alimenta la solución a las columnas hasta casi alcanzar la absorbancia de la solución pre-purificada (las columnas se equilibran) y el pDNA sale de las columnas, por esta razón fue $C/C_0 = 0.72$ en membranas y $C/C_0 = 0.90$ en partículas.

No obstante, los diferentes los perfiles de adsorción, se alimentó la Solución B1 a la columna empacada con membranas y la empacada con partículas, bajo las mismas

condiciones, con la finalidad de comparar el comportamiento de ambas matrices. La solución pre-purificada por TFF, alimentada tenía de concentración 63.6 μg pDNA/mL y 57.8% de pureza HPLC.

Se aplicó el método B descrito en la Tabla 3, obteniéndose los perfiles de adsorción lavado y elución de ambos sistemas mostrados en la Figura 56, el estudio se hizo por duplicado.

Puede observarse en la Figura 56 que la etapa de adsorción tuvo una duración de 8 minutos, con un comportamiento muy diferente entre las columnas, aunque resultado similar al de sus curvas de ruptura.

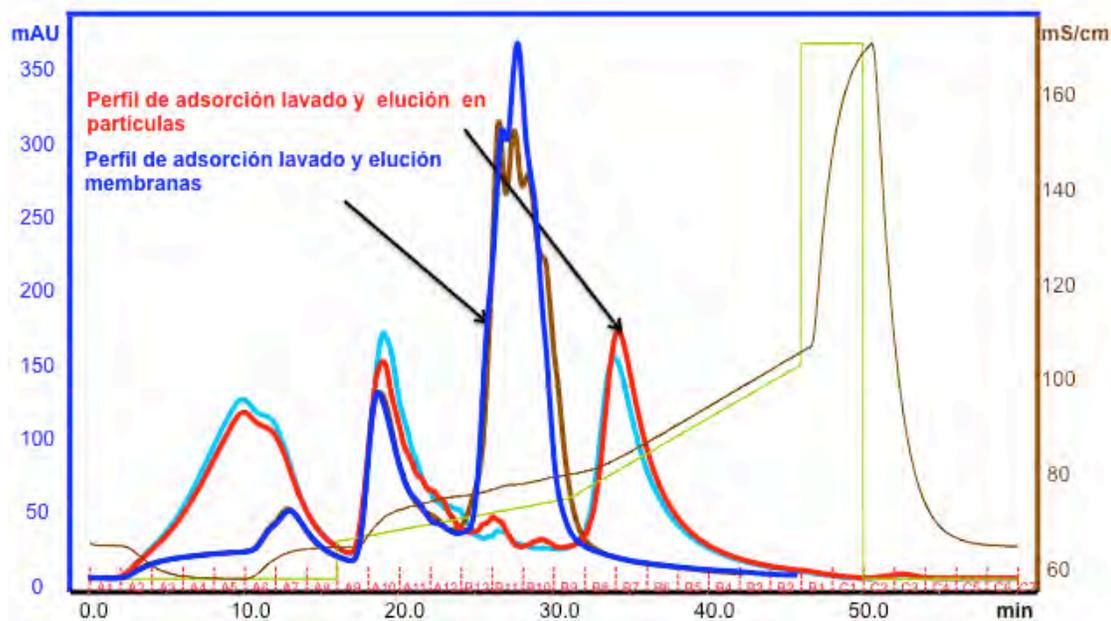


Figura 56. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando el método B en columnas empacadas con partículas y membranas.

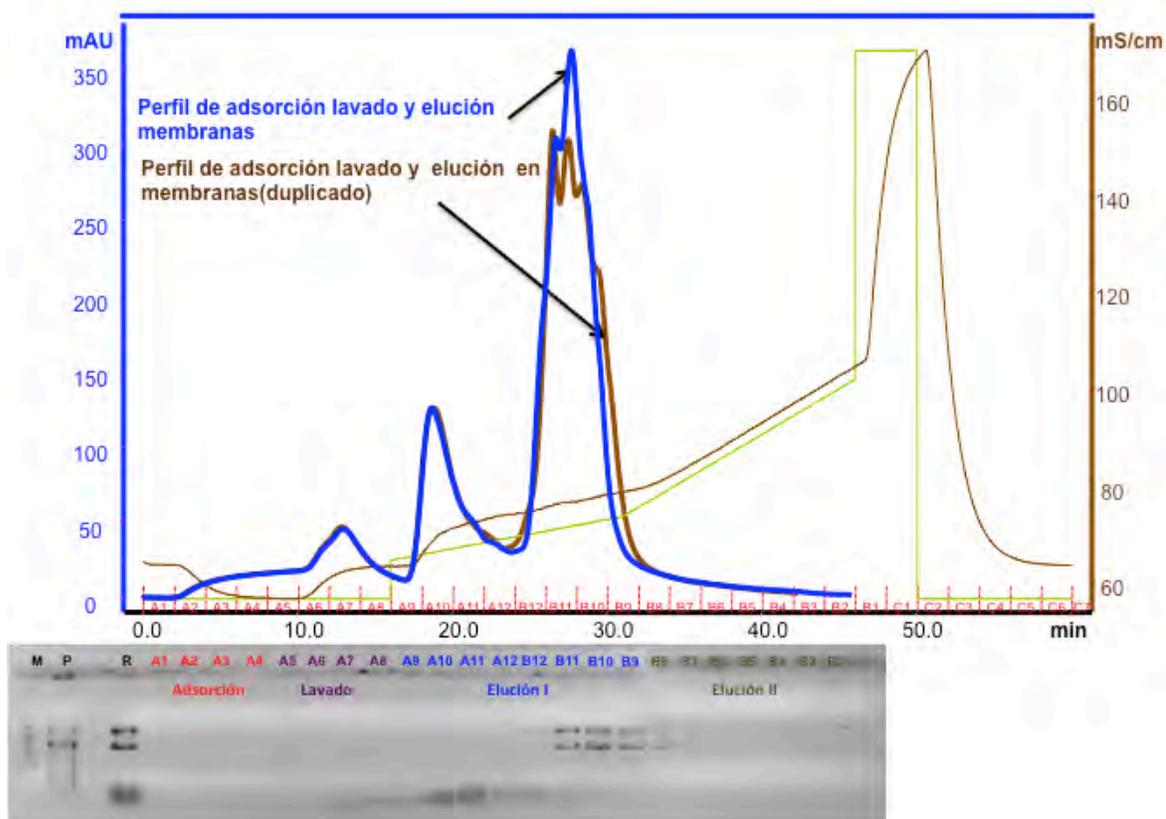


Figura 57. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando el método B en columnas empacadas con membranas (Arriba); análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa (Abajo).

En las Figuras 57 y 58 se observan de manera independientes los perfiles de adsorción lavado elución en ambas columnas junto con el análisis electroforético de las fracciones obtenidas.

En la Figura 57 se observa que en la etapa adsorción, el pDNA se adsorbe por completo en la matriz. En la etapa de lavado y elución parte I se desprende el RNA desde la fracción A6 a la B12, esto se ve favorecido al lavar con buffer 0.5 M NaCl en TE y aumentar la fuerza iónica hasta 0.6M. Al continuar el gradiente de elución hasta 0.7 M eluye pDNA de la columna purificado.

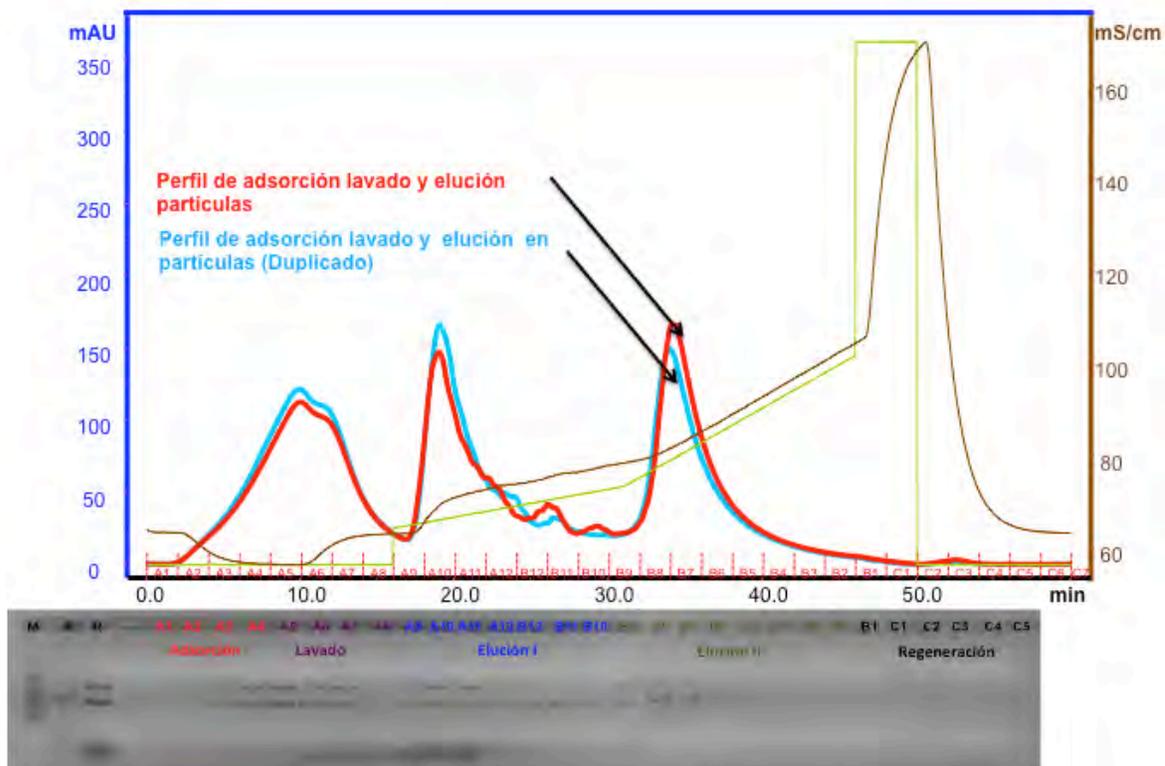


Figura 58. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando el método B en columnas empacadas con partículas (Arriba); análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa (Abajo).

En la Figura 58 se observa que en la etapa de adsorción el plásmido sale de la columna, desde la segunda fracción (A2), según se muestra en el análisis de electroforesis. En la etapa de lavado (fracciones A5-A8) y elución parte I (fracciones A9-B10) el pDNA coeluye junto con las impurezas eliminadas. En la elución parte II (fracciones B8-B4) se observa que eluye el pDNA purificado. En la columna empacada con partículas se ve favorecida la elución de con la fuerza iónica del buffer de 0.7 a 1.1 M NaCl en TE.

Tabla 8. Balance de masa en las etapas de adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas (Solución B1)

	Col. con Membranas	Col. con Partículas
Masa de pDNA (μg)		
Alimentado a la columna	254.5	254.5
Adsorbido	254.5	246.9
No adsorbido	0	7.6
Lavado	0	76.4
Eluído I	195.6	37.2
Eluído II	28.1	122.1
Eluído en la fracción concentrada	100.9	42.4
Concentración de la solución alimentada ($\mu\text{g/mL}$)	63.6	63.6
Concentración de la fracción recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	100.9	42.4
% Recuperación en la fracción concentrada	39.7	16.7
% Recuperación total	87.9	62.6

En la Tabla 8 se observa la recuperación de pDNA en la etapa de elución, respecto a la masa alimentada, fue del 87.9% en la columna empacada con membranas, mientras que en la columna con partículas la recuperación fue del 62.6%. La pureza HPLC obtenida en las fracciones concentradas en cada columna fue de 94.1% en membranas y 81.9 % en partículas (Tabla 9). Se propone en la columna empacada con membranas, juntar las fracciones eluídas de mayor concentración y someterlas a una segunda etapa de cromatografía con el fin de aumentar la recuperación. De acuerdo a los datos obtenidos en el balance de masa se obtendría, al juntar las fracciones B11, B10 y B9, se obtendría un purificado de concentración promedio de 65.21 $\mu\text{g/mL}$ y pureza promedio de 87% .

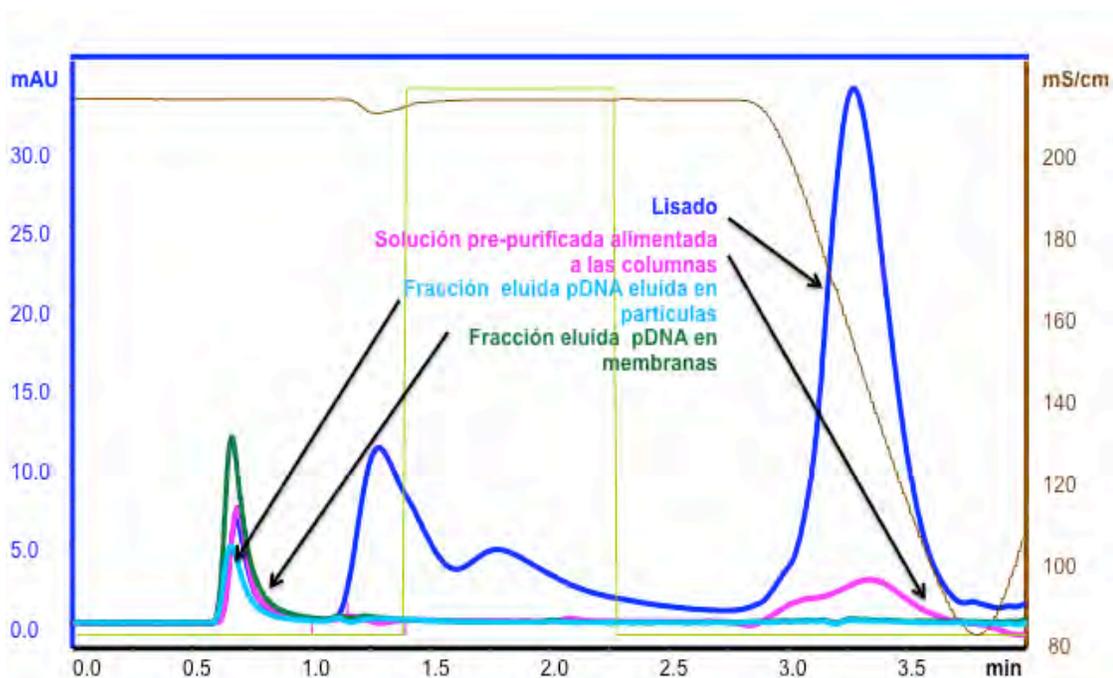


Figura 59. Análisis HPLC-HIC del lisado, pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas (solución B1).

Se compararon los cromatogramas analíticos del plásmido en el lisado, la solución alimentada y en fracciones eluidas con mayor concentración de pDNA, en ambas columnas. Estos resultados se muestran en la Figura 59. En la figura se observa claramente la reducción de impurezas durante las diferentes etapas de purificación, además de que en la fracción eluida en la columna con membranas la solución se concentró, mientras que en la de partículas se diluyó.

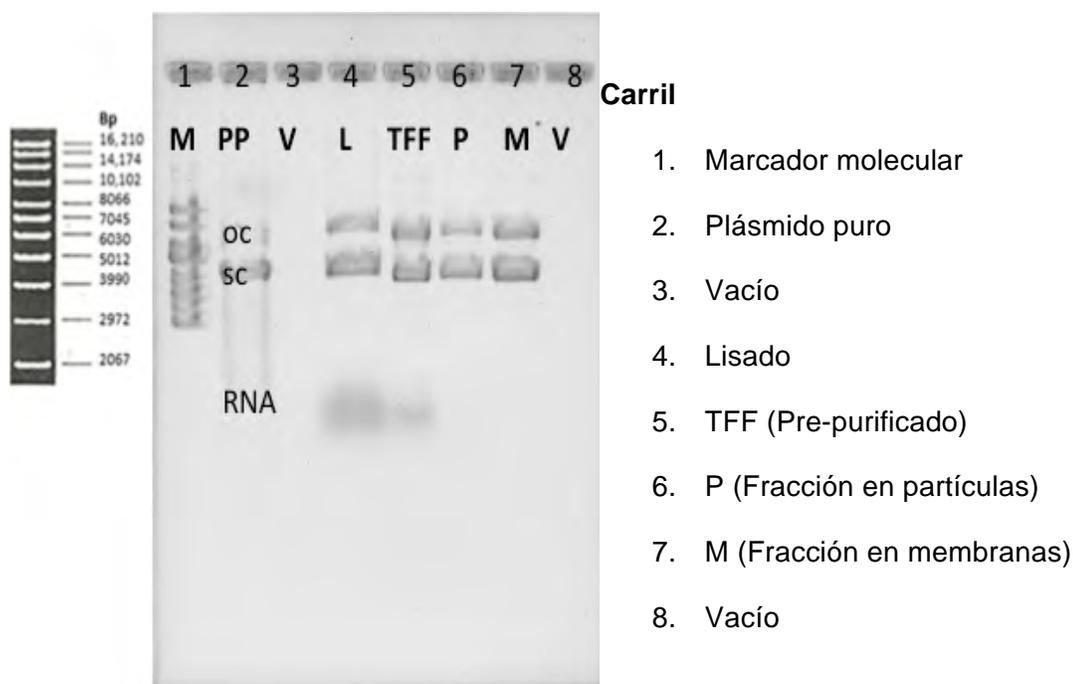


Figura 60. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del lisado, pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas (solución B1).

En la Figura 60 se observa el análisis por electroforesis de muestras de lisado clarificado, el pre-purificado obtenido por ultrafiltración de flujo tangencial, además las fracciones recuperadas en las columnas. Se observó en el lisado la presencia de pDNA en su forma superenrollada y circular abierta, también una gran cantidad de RNA; en el pre-purificado, el pDNA se mantiene pero la cantidad de RNA disminuye como resultado de la ultrafiltración, finalmente en las fracciones recuperadas de la cromatografía se observa que la cantidad de RNA es imperceptible, lo que exhibe una purificación exitosa.

Tabla 9. Análisis de concentración y pureza del lisado, pre-purificado (Solución B1) y fracciones eluidas purificadas.

	Concentración de pDNA Pureza HPLC	
	$\mu\text{g/mL}$	%
Solución		
Lisado	54.2	3.9
Retenido TFF	63.6	57.8
Fracción purificada en membranas	100.9	94.1
Fracción purificada en partículas	42.4	81.9

En la Tabla 9 se muestran las concentraciones de pDNA en todas las etapas del proceso, puede observarse que a partir de un lisado de concentración de 54.2 $\mu\text{g/mL}$ y pureza HPLC 3.9%, se logró obtener en la etapa de purificación final, en la columna empacada con membranas, la concentración de pDNA purificado de 100.9 $\mu\text{g/mL}$ aumentando casi el doble y alcanzando una pureza HPLC de 94.1%, mientras que en la columna empacada con partículas, concentración de 42.4 $\mu\text{g/mL}$, menor a la del lisado, sin embargo su pureza HPLC aumentó significativamente hasta 81.9% . Estos resultados sugieren que las condiciones de operación resultaron favorables para la columna empacada con membranas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se logró la recuperación intermedia del plásmido pVAX1-NH36 a partir de lisados clarificados de cultivos de *E.coli* con un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial utilizando membranas de tamaño de corte 300 kDa. Durante esta operación se logró duplicar la concentración del plásmido, la remoción de contaminantes, principalmente RNA, aumentando 8 veces la pureza de solución y se mantuvo una buena calidad del plásmido en su isoforma superenrollado.

Se obtuvieron las curvas de ruptura de los sistemas pVAX1-NH36 en membranas y en partículas de intercambio iónico, permitiendo determinar la cantidad de masa óptima para alimentar en las columnas en la etapa de adsorción. Se encontró que la columna empacada con membranas se adsorbió 80 % de la masa de pDNA alimentada, mientras que en la columna empacada con partículas adsorbió el 32% de la misma cantidad de masa de pDNA alimentada. Este resultado sugiere una mayor velocidad de transferencia de plásmido en la columna de membranas posiblemente a que los canales perfusivos permiten el acceso directo del pDNA a los sitios de adsorción.

En esta investigación las columnas tuvieron volúmenes de lecho iguales y se operaron bajo las mismas condiciones de adsorción, lavado y elución previamente establecidas. Se encontró que en la etapa de adsorción, la matriz de membranas adsorbió una mayor cantidad de masa de pDNA, debido a una mayor velocidad de transferencia de masa, así mismo se observó que en la columna empacada con partículas el pDNA coeluyó con el RNA en la etapa de lavado, conjuntamente en la etapa de adsorción el pDNA salió en las primeras fracciones de la columna, lo que sugiere que el plásmido no

penetró los poros difusivos del adsorbente y estaba débilmente unida a la matriz lo que refleja una baja recuperación.

Se pudo comparar en base a la concentración de plásmido obtenido y su calidad, el comportamiento de ambos sistemas, además con los datos obtenidos en los balances de masa se determinó el rendimiento global del proceso en ambos sistemas.

En cuanto a la concentración y pureza de la solución obtenida de ambos sistemas, se encontró que en la columna empacada con membranas, estos parámetros aumentaron significativamente, podría atribuirse a que el pDNA se adsorbe con mayor facilidad en los poros perfusivos. En la columna empacada con partículas, la fracción eluída aumentó de pureza, sin embargo no fue muy buena. Para soluciones de concentraciones bajas de pDNA ambas matrices resultaron en una buena purificación de pDNA, sin embargo la columna empacada con partículas presentó menor recuperación, esto podría deberse a que el pDNA no penetra con facilidad y se adsorbe en canales difusivos del adsorbente.

Los métodos desarrollados constituyen una buena alternativa para la concentración y purificación de pDNA, ambas matrices pueden escalarse obteniendo una buena recuperación; no obstante, como método de purificación de pDNA a nivel industrial, de acuerdo a los resultados en esta investigación, se recomienda el uso de membranas de intercambio aniónico debido a su capacidad de adsorber mayor cantidad de pDNA gracias a la estructura de sus poros que facilitan la transferencia de masa, además de recuperarse en menos fracciones y de mayor concentración que en la partículas perfusivas; también la membranas suelen ser desechables lo que evitan la limpieza y regeneración de adsorbente. Es importante recordar que ambos sistemas se compararon utilizando las mismas condiciones de operación y solución de alimentación, resultando favorable la concentración, recuperación y pureza en la matriz de membranas, sin embargo es probable que estudiando otras condiciones de lavado y elución para la matriz de partículas se mejore la recuperación y pureza en la solución purificada, de acuerdo a los resultados obtenidos por Posadas (2012).

5.2 Recomendaciones

Según los resultados y la experiencia obtenida a lo largo de esta investigación se recomienda optimizar todas las etapas del bioprocesos previas a la purificación final, ya que se necesitan grandes cantidades de solución con pDNA para las diferentes corridas, la evaluación de parámetros y metodología, además de los costos en reactivos, electricidad, equipo, horas hombre innecesarios en caso de errores; por lo que en cada etapa es necesario:

Fermentación:

Antes de comenzar, es de suma importancia elegir bien el inóculo que se utilizará en la propagación celular y verificar su viabilidad; esto puede hacerse analizándolo por HPLC-HIC y por electroforesis en gel de agarosa y determinar la concentración de plásmido, así como cualitativamente observar la cantidad de sc pDNA e isoforma que se encuentran en la bacteria. Debe hacerse un stock suficiente con el que puedan hacerse todos los experimentos y evitar que el pDNA se diluya.

Recuperación Primaria:

Durante la lisis celular debe cuidarse el tiempo de contacto con la solución alcalina, determinado en investigaciones previas, no debe agitarse la solución en exceso, ya que el plásmido puede desnaturalizarse y convertirse en una isoforma de pDNA indeseable en la solución además de causar dificultades en las etapas posteriores de purificación.

Recuperación intermedia:

Se propone escalar el sistema de ultrafiltración tangencial a una membrana con mayor área de filtración para disminuir el tiempo de operación y obtener la cantidad necesaria de solución pre-purificada para la etapa de purificación final; así mismo, debe determinarse periódicamente la resistencia de la membrana, para verificar su estado y garantizar su adecuado funcionamiento durante experimentos posteriores y evitar bajas recuperaciones.

Recuperación final:

Es importante hacer pruebas de estrés (variar la fuerza iónica del buffer, hacer repetidas corridas en las columnas y comparar los perfiles de adsorción y su concentración en las fracciones) a las columnas para determinar el número óptimo de regeneraciones que pueden hacerse sin comprometer el rendimiento, así mismo sería de utilidad determinar una concentración de alimentación en las columnas, de acuerdo al volumen de lecho, para que puedan ser utilizadas las mismas condiciones de adsorción, lavado y elución en purificaciones de diferentes lisados, dato sería muy útil para el escalamiento.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Be, I.; Da Silva, R.; Paraguai, E.; Borja-Cabrera, G.P.; Rosado-Vallado, M.; Mut-Martin, M.; García-Miss, M.R.; Palatnik, C.B.; Dumonteil, E. Cross protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and Visceral and Cutaneous Murine Leishmaniasis, *Infection And Immunity. Infect. Immun.* **2005**, 73 (2), 812–819.
- Ager, K.; Latulippe, D.R.; A Zydney, A.L. Plasmid DNA transmission through charged ultrafiltration membranes. *J. Membr Sc.*, **2009**, 344, 123–128.
- Åkerman, B.; Kenneth, D.; Cole, K.D. Electrophoretic capture of circular DNA in gels. *Electrophoresis*, **2002**, 23, 2549–2561.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 7, 1513 – 1523.
- Bo, S.; XiangHui, Y., Yuhe, Y., Xintao, L.; Yongge, Wu.; Yan, C., Xizhen, Z.; Chunlai, J.; Weng, K. Large-scale purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA using tangential flow filtration and multi-step chromatography. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, 116, 281-286.
- Brand, E.; Ralla, K.; Neubauer P. Strategies for Plasmid DNA Production in *Escherichia coli*. *Biopharmaceutical Production Technology*, **2012**, Volume 1 & Volume 2.
- Bussey, LB., Adamson, R., Atchley, A. U.S. Patent 6,011,148, 2000.
- Carnes, A.E. Fermentation designs for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *BioProcess Int.* **2005**, 36-42.

- Carnes, A.E.; Williams, J.A. Plasmid DNA Manufacturing Technology. *Recent Pat. on Biotechnol.*, **2007**,1(2), 151-166.
- Carnes, A.E.; Williams, J.A.; Hodgson, C.P. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27(4), 353-70.
- Diogo, M.M.; Queiroz, J.A.; Prazeres, D.M.F. Purification of plasmid DNA vectors produced in *Escherichia coli* for gene therapy and DNA vaccination applications. *Methods in Biotechnology*, **2005**, 18, 165-178.
- Diogo, M.M.; Queiroz, J.A.; Prazeres, D.M.F. Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, 998, **2003**, 109–117.
- Diogo, M.M.; Queiroz, J.A.; Monteiro, G.A.; Prazeres, D.M.F. Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography. *Anal. Biochem.* **1999**, 275, 122-124.
- Diogo, M.M.; Queiroz, J.A.; Prazeres, D.M.F. Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A*, **2005**,1069, 3–22.
- Diogo, M.M.; Ribeiro, S.C.; Queiroz, J.A.; Monteiro, G.A.; Tordo, N.; Perrin, P., Prazeres, D.M.F. Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J. Gene Med.*, **2001**, 3, 577–584.
- Duarte, S.P.; Fortes, A.G.; Prazeres, D.M.F.; Marcos, J.C. Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by two-step aqueous two-phase extraction process. *J. Chromatogr. A*, **2007**,164:105–112.
- Eon-Duval, A.; Burke, G. Purification of pharmaceuticalgrade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J. Chromatogr. B.*, **2004**, 204, 327–335.

- Eon-Duval, A.; MacDuff, R.H.; Fisher, C.A.; Harris, M.J.; Brook, C. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Anal. Biochem.*, **2003**, 316, 66–73.
- Ferreira, G.N.M.; Cabral, J.M.S.; Prazeres, D.M.F. Alternatives for intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnol. J.*, **2009**, 4, 265-278.
- Ferreira, G.N.M.; Cabral, J.M.S.; Prazeres, D.M.F. Anion exchange purification of plasmid DNA using expanded bed adsorption. *Bioseparation*, **2000**, 9, 1–6.
- Ferreira, G.N.M.; Cabral, J.M.S.; Prazeres, D.M.F. Purification of supercoiled plasmid DNA using chromatographic processes. *J. Mol. Recognit.*, **1998**, 11, 250–251.
- Ferreira, G.N.M.; Cabral, J.M.S.; Prazeres, D.M.F. Studies on the batch adsorption of plasmid DNA on to anion exchange chromatographic supports. *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16, 416–424.
- Figueroa-Rosette, J.A.; Guerrero-Germán, P.; Montesinos-Cisneros, R.M.; Martín-García, A.R.; Tejeda-Mansir, A. A straightforward method to scale-up plasmid DNA intermediate recovery by tangential flow ultrafiltration. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, **2013**, 27 (4), 4014–4017.
- Freitas, S.; Canário, S.; Santos, J.A.L.; Prazeres, D.M.F. Alternatives for the intermediate recovery of plasmid DNA: Performance, economic viability and environmental impact. *Biotechnol. J.*, **2009(a)**, 4, 265–278.
- Freitas, S.S.; Azzoni, A.R.; Santos, J.A.L.; Monteiro, G.A.; Prazeres, D.M.F. On the stability of plasmid DNA vectors during cell culture and purification. *Mol Biotechnol.*, **2007**, 36,151-158.
- Freitas, S.S. Development and optimization of a scalable production process based on hydrophobic interaction chromatography and aiming at gene therapy and DNA vaccination. *Tesis de Doctorado en Biotecnología, Instituto Superior Técnico, Lisboa*, **2007(a)**.

- Freitas, S.S; Santos, J.A.L; Prazeres, D.M.F. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep. Purif. Technol.*, **2009**, 65, 95-104.
- Ghanem, A.; Healey, R.; Adly, F.G. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. *Anal. Chim. Acta.*, **2013**, 760, 1-15.
- Ghosh, R.; Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *J Chromatogr A.*, **2002**, 952, 13–27.
- Gomes, G.A.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R., Prazeres, D.M.F. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Sep. Purif. Technol.*, **2008**, 65, 22-30.
- Guerrero-Germán, P.; Prazeres, D.M.F.; Guzmán, R.; Montesinos-Cisneros, R.M.; Tejedá-Mansir, A. Purification of plasmid DNA using tangential flow filtration and tandem anion-exchange membrane chromatography. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2008**,32, 615–623.
- Gustavsson, P.E.; Larsson, P.O. Superporous agarose, a new material for chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 734, 231-240.
- Gutiérrez Obeso, A. Estudio de la etapa de purificación final en el proceso de producción de ADN plasmídico aplicando cromatografía en membranas de intercambio iónico. *Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora, Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia*, **2011**.
- Haberl, S.; Jarc, M.; Strancar, A.; Peterka, M.; Hodzic, D.; Miklavcic, D. Comparison of Alkaline Lysis with Electroextraction and Optimization of Electric Pulses to Extract Plasmid DNA from *Escherichia coli*. *J Membrane Biol.*, **2013**, 246, 861–867.
- Iuliano, S.; Fisher J.R.; Chen, M., Kelly, W.J. Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. *J. of Chromatogr A.*, **2002**, 972, 77–86.

- Latulippe, D.R.; Ager, K.; Zydney, A.L. Flux-dependent transmission of supercoiled plasmid DNA through ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.*, **2007**, 294,169–177.
- Latulippe, D.R.; Zydney, A.L. Separation of plasmid DNA isoforms by highly converging flow through small membrane pores. *J. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 357, 548–553.
- Li, Y.; Chung, T.S.; Chan, S.Y. High-affinity sulfonated materials with transition metal counterions for enhanced protein separation in dual-layer hollow fiber membrane chromatography. *J Chromatogr A.*, **2008**, 1187, 285–8.
- Montesinos-Cisneros, R.M.; de la Vega-Olivas, J.; Ortega, J.; Guzmán, R.; Tejeda-Mansir, A. Breakthrough Performance of Plasmid DNA on Ion-Exchange Membrane Columns. *Biotechnol. Prog.*, **2007**, 23, 881-887.
- Orr, V.; Zhong, L.; Moo-Young, M.; Chou, C.P. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography. *Biotechnol. Adv.*, **2013**, 31, 450–465.
- Pérez-Martínez, Y.; Montesinos-Cisneros, R.M., Guerrero-Germán, P., Guzman, R., Tejeda-Mansir, A. Batch Equilibrium and Kinetic Studies of Plasmid pCI Adsorption on to Perfusion Particles. *J. Liq. Chromatogr. Related Techn.*, **2015**, 38(2), 196-200.
- Posada-Borbón, A. Purificación de plásmidos por cromatografía frontal de intercambio iónico en columnas empacadas con matrices superporosas. Tesis de Licenciatura, Unversidad de Sonora, Departamento de investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, **2012**.
- Prather, K.J., Sagar, S.; Murphy, J.; Chartrain, M. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: Plasmid design, production, and purification. *Enzyme Microb. Technol.*, **2003**, 33, 865–883.
- Prazeres, D.M.F., Ferreira, G.N.M. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chem. Eng. Process.*, **2004**, 43, 609-624.
-

- Prazeres, D.M.F.; Monteiro, G.A.; Ferreira, G.N.M.; Diogo, M.M.; Ribeiro, S.C.; Cabral, J.M.S. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol. Annual Review*, **2001**, 7, 1-30.
- Prazeres, D.M.F.; Monteiro, G.A. DNA Vaccines. *A Portrait of State-of-the-Art Research at the Technical University of Lisbon*, **2007**, 219-232.
- Prazeres, D.M.F.; Schlupe, T.; Cooney, C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **1998**, 806, 31–45.
- Russell, E.; Wang, A.; Rathore, A.S. Harvest of a Therapeutic Protein Product from High Cell Density Fermentation Broths: Principles and Case Study. Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry, Editores Shukla A.A., Etzel M.R., Gadam S. Ed. Taylor & Francis Group, 2007, pp 25-33.
- Sanchez-Casco, M.; Dumonteil, E.; Ortega-López, J. Production optimization of a DNA vaccine candidate against leishmaniasis in flask culture. *Afr. J. Biotechnol.*, **2013**, 12, 4874-4880.
- Schleef, M.; Blaesens, M. Production of Plasmid DNA as a Pharmaceutical. *Methods Mol. Biol.*, **2009**, 542, 471-495.
- Smith, C.R.; DePrince, R.B.; Dackor, J.; Weigl, D.; Griffith, J.; Persmark, M. Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA. *J. Chromatogr B.*, **2007**, 854, 121–127.
- Sofer, G and Hagel, L (eds). *Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale-up, and Validation*, San Diego: Academic Press, 1997.
- Stadler, J, Lemmens, Nyhammar, T. Plasmid DNA purification. *J Gene Med.*, **2004**, 6, S54–S66.
- Sum, C.H.; Chong, J.Y.; Wettig, S.; Slavcev, R.A. Separation and purification of linear covalently closed deoxyribonucleic acid by Q-anion exchange membrane chromatography. *J. of Chromatogr A.*, **2014**, 1339, 214-218.

- Tiainen, P.; Galaev, I.; Larsson, P.O. Plasmid adsorption to anion-exchange matrices: Comments on plasmid recovery. *Biotechnol. J.*, **2007**, 2, 726-735.
- Tiainen, P.; Gustavsson, P.E.; Ljunglöf, A.; Larsson, P.O. Superporous agarose anion exchangers for plasmid isolation. *J. Chromatogr. A.*, **2007_b**, 1138, 84–94.
- Urthaler, J.; Buchinger, W.; Necina, R. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochim. Pol.*, **2005**, 52, 703–711.
- Williams, J.A.; Carnes, A.E. and Hodgson, C.P. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.*, **2009**, 27, 353–370.
- Zhang, S.; Krivosheyeva, A.; Nochumson, S. Large-scale capture and partial purification of plasmid DNA using anion exchange membrane capsules. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2003**, 37:245– 249.

ANEXOS

Anexo A: Curva de calibración

La curva de calibración construida con estándares de plásmido purificado con un kit comercial, con concentraciones de 0.05 a 60 $\mu\text{g/mL}$, asociando la concentración de una muestra, al área del pico eluido a los 0.7 min de retención. Una muestra estándar de DNA plasmídico se cuantificó por UV a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA plásmido.

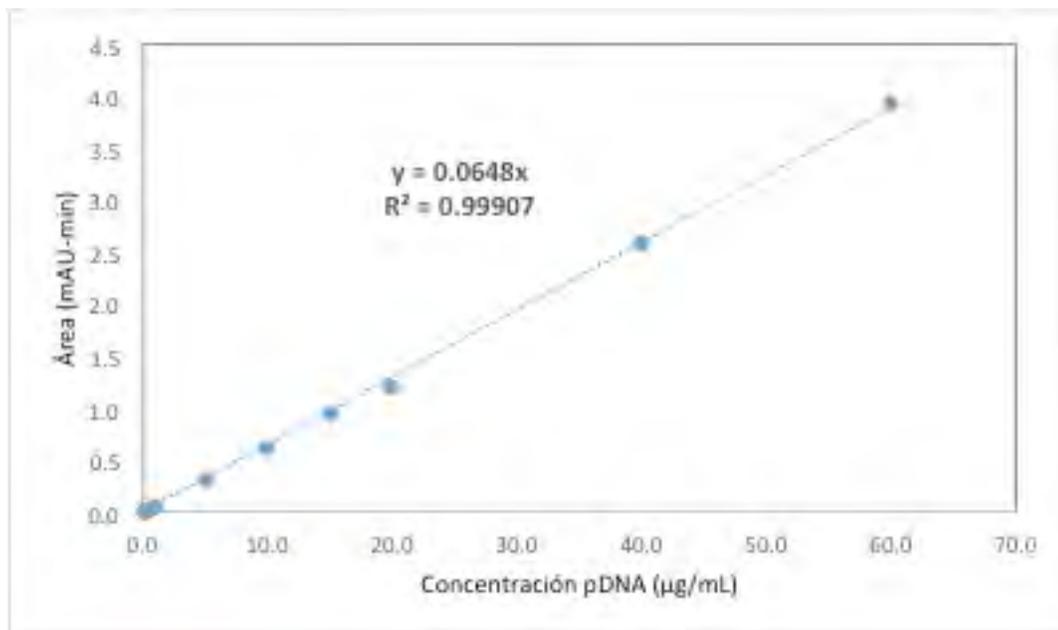


Figura 61. Curva de calibración estándar obtenida por análisis HPLC-HIC.

Anexo B: Purificación de Solución Atípica de Baja Concentración (Solución A)

Recuperación Primaria

En la Figura 62 se muestra el análisis de electroforesis del lisado de la Solución A. En la figura puede observarse en los carriles 4 y 5 la banda del pDNA superenrollado (sc), pDNA circular abierto (oc), gDNA y RNA en las muestras de lisado de la Solución A.

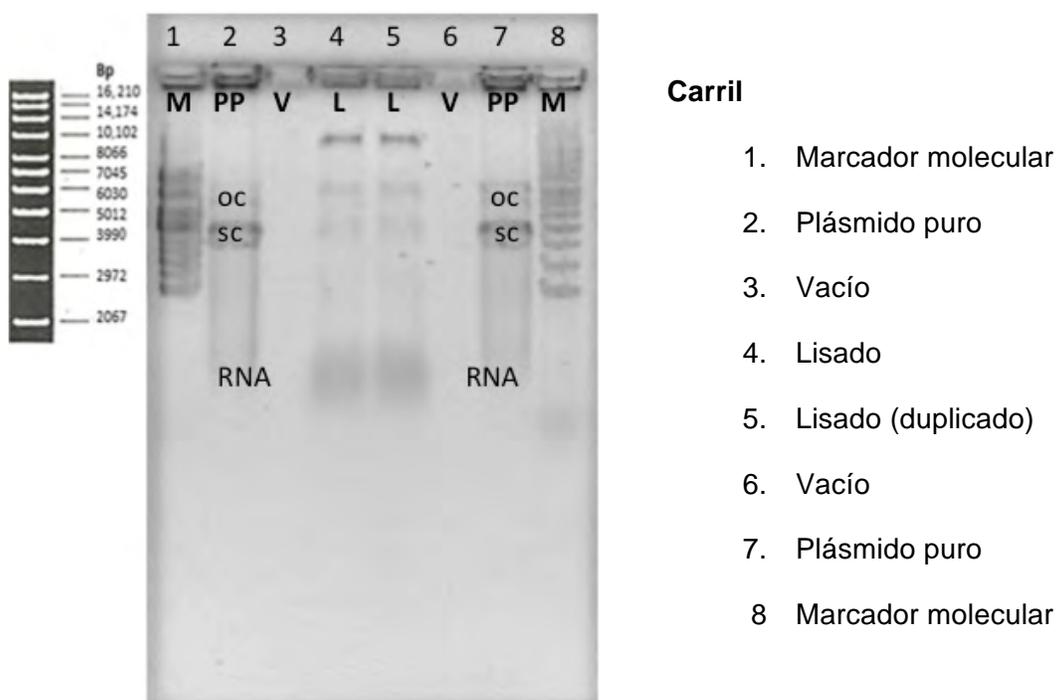


Figura 62. Análisis del lisado clarificado A por centrifuga

En la Figura 63 se aprecia en el cromatograma analítico de HPLC-HIC de las muestra de la solución A. Se observa que contiene el pDNA (pico a los 0.71 min de retención), el área de este pico corresponde a una concentración de 2.52 $\mu\text{g/mL}$, calculada con una curva curva de calibración (Anexo A); además de una gran cantidad de impurezas

(1.28min), el lisado no presentó un comportamiento típico dado que el pico a los 1.98 min y 3.54 min son menores en proporción al pico de 1.28 min de retención. Por la relación de áreas de pDNA y área de impurezas (después de restar el correspondiente blanco) se calculó un 0.71% de pureza, esta pureza es más baja que la esperada, alrededor de 3 a 5 % para cultivos similares (Freitas y col., 2007; Gomes y col., 2008) La solución clarificada contiene una concentración muy baja de pDNA, sin embargo, se purificó por la metodología utilizada.

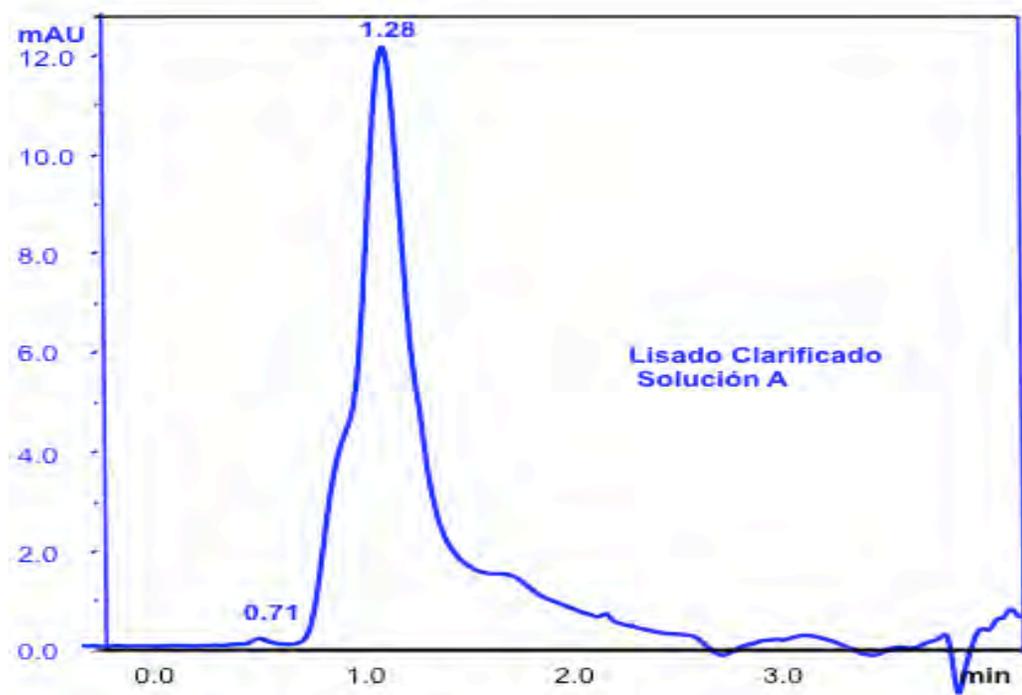


Figura 63. Cromatograma analítico del lisado clarificado por centrifugación (Solución A: concentración de 2.52 $\mu\text{g/mL}$, pureza de 0.71%)

Recuperación Intermedia

Se alimentó la solución clarificada A con 2.52 $\mu\text{g/mL}$ de pDNA y 0.71% de pureza al sistema de ultrafiltración de flujo tangencial, se analizaron las muestras colectadas del retenido y filtrado en cada volumen de lavado por electroforesis y por HPLC-HIC, se

compararon con la solución de lisado clarificado alimentado. Se mantuvieron las mismas condiciones de operación de acuerdo al estudio previo.

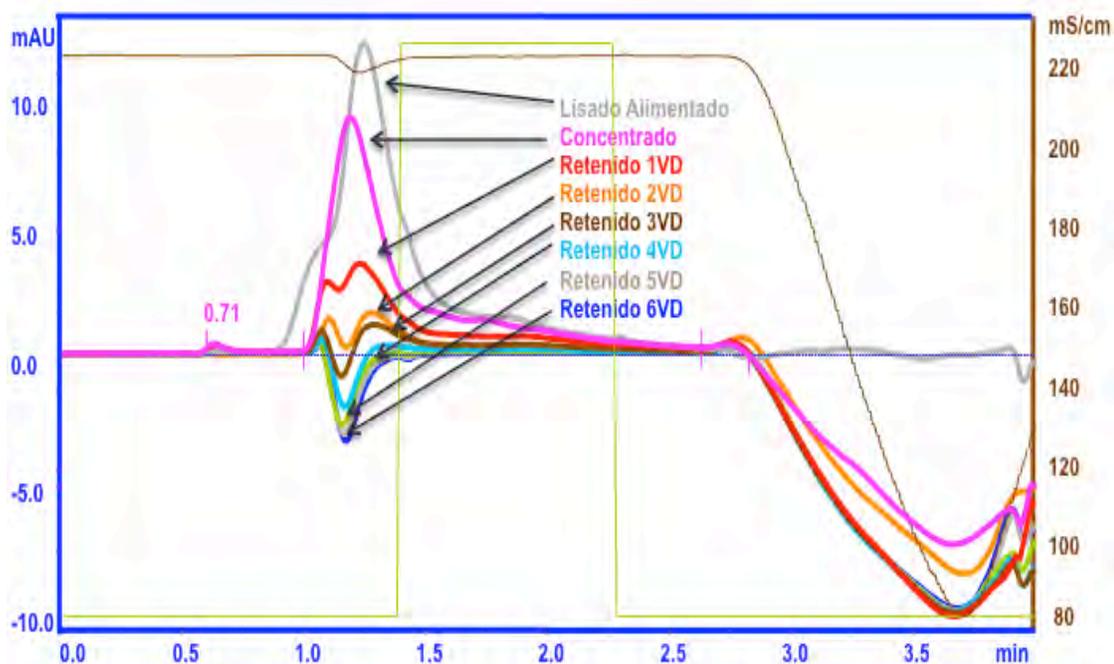


Figura 64. Cuantificación de plásmidos e impurezas en la etapa de prepurificación por TFF (Solución A).

En la Figura 64 se muestra el cromatograma analítico por HPLC-HIC de la solución alimentada y muestras de retenidos de cada volumen de lavado, se observó la presencia de pDNA; la solución contiene pDNA en bajas concentraciones, además de mostrar un comportamiento atípico, ya que no presenta el pico de impurezas en el tiempo de retención de 3.54 min, de igual forma, al ser una solución de baja concentración, tiene el comportamiento del buffer en el que se encuentra (Tris 10 mM, pH 7.5), por lo que a partir del tercer minuto los retenidos tienen un comportamiento negativo. En la Figura 65 se muestran los cromatogramas analíticos de 4VD a 6VD con más detalle.

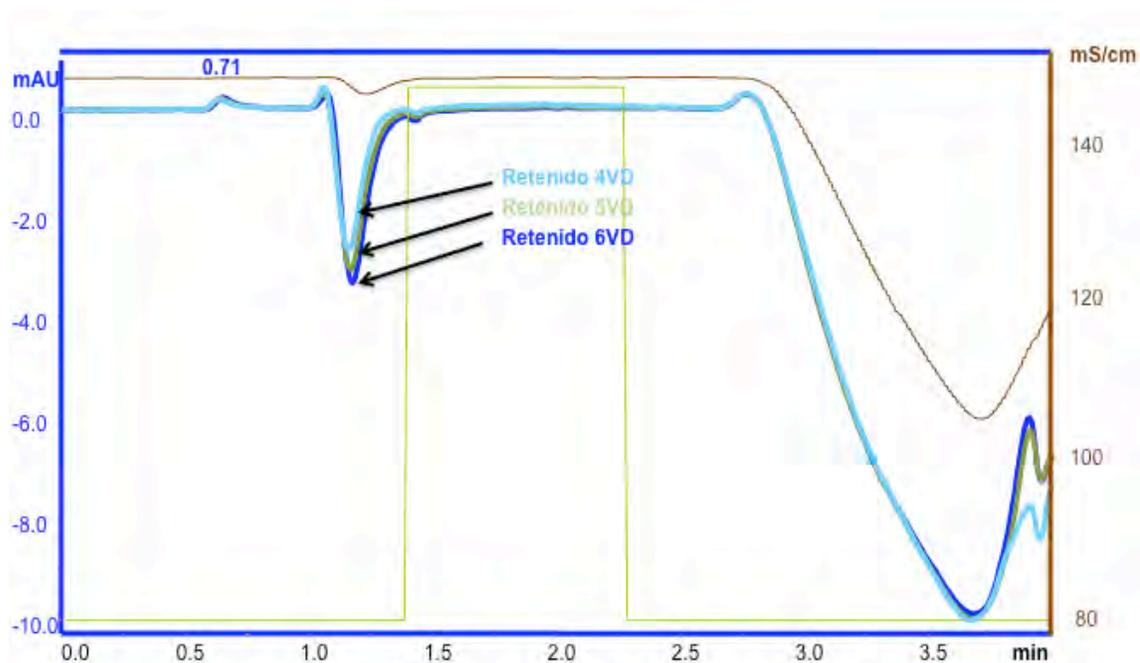


Figura 65. Cuantificación de plásmidos e impurezas en la etapa de pre-purificación por TFF (Solución A) 4VD-6VD.

En la Tabla 10 se resumen los análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD. Se obtuvo una concentración de $4.27 \mu\text{g/mL}$ de pDNA con pureza de 45.75 % al final del sexto lavado, se aumentó 64.2 veces la pureza de la solución.

Tabla 10. Análisis de concentración y pureza del retenido en cada VD

Solución	Concentración µg/mL	Pureza HPLC %	Aumento de pureza
Lisado	2.52	0.71	
Concentrado	5.79	2.18	3.1
Retenido en 1VD	5.02	3.45	4.8
Retenido en 2VD	4.43	8.08	11.3
Retenido en 3VD	3.96	14.35	20.1
Retenido en 4VD	4.13	44.03	61.8
Retenido en 5VD	4.24	46.3	65
Retenido en 6VD	4.27	45.75	64.2

En la Figura 66 se muestra el análisis por electroforesis de muestras de retenidos y filtrados en cada volumen de lavado, se observó la presencia de pDNA en los retenidos, mientras que en los filtrados sólo está presente el RNA que conforme avanzan los disminuye, indicando que se ya han filtrado este tipo de impurezas de tamaño menor a 300 kDa con 6 VD.

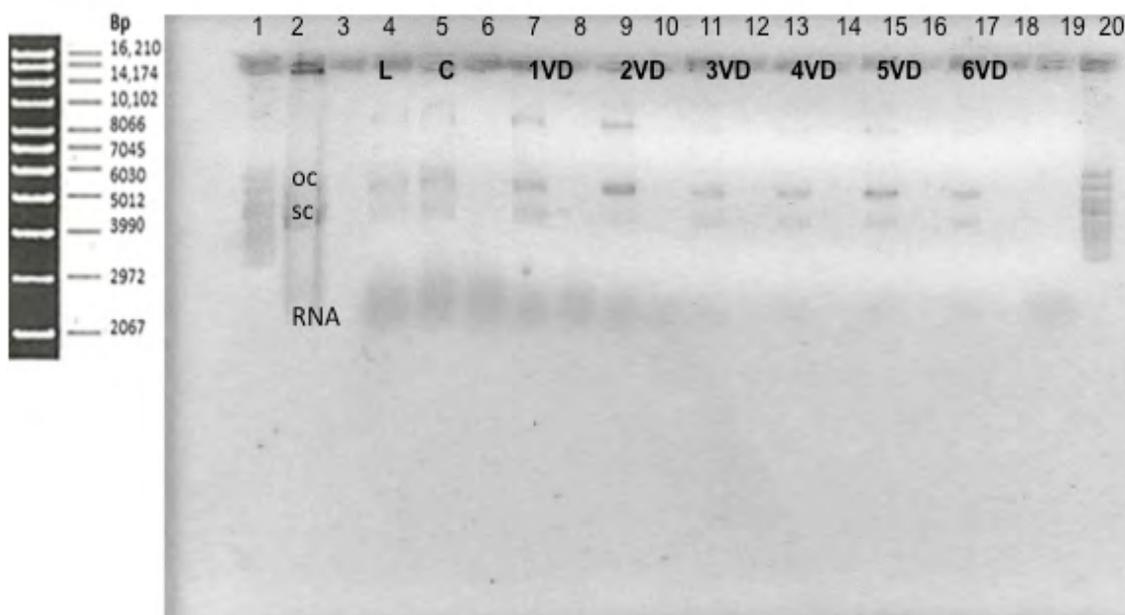


Figura 66. Electroforesis en gel de plásmido e impurezas en la etapa de prepurificación por TFF. Carril: 1. Marcador molecular, 2. pDNA purificado de kit, 3. Vacío, 4. Lisado, 5. Concentrado, 6. Filtrado del concentrado, 7. 1VD Retenido, 8. 1VD Filtrado, 9. 2VD Retenido, 10. 2VD Filtrado, 11. 3VD Retenido, 12. 3VD Filtrado, 13. 4VD Retenido, 14. 4VD Filtrado, 15. 5VD Retenido, 16. 5VD Filtrado, 17. 6VD Retenido, 18. 6VD Filtrado, 19. Filtrados finales, 20. Marcador molecular.

En esta solución de baja concentración no existieron cambios significativos en la concentración y pureza entre los lavados 4VD-6VD, por lo que 4 volúmenes de diafiltración son suficientes.

Purificación Final

Las condiciones experimentales utilizadas (volumen de lecho, solución en la alimentación y condiciones de adsorción, lavado y elución) en las columnas empacadas con membranas y con partículas perfusivas fueron las mismas. Debido a la baja concentración de pDNA en la solución, se decidió trabajar con un concentrado de la solución final obtenida en la etapa de recuperación intermedia; en la Figura 67 y 68 se muestra el cromatograma analítico por HPLC-HIC de la solución alimentada y el

análisis por electroforesis en gel de agarosa de la solución, respectivamente, en este último se observa sc pDNA, oc pDNA y pDNA lineal, además de RNA.

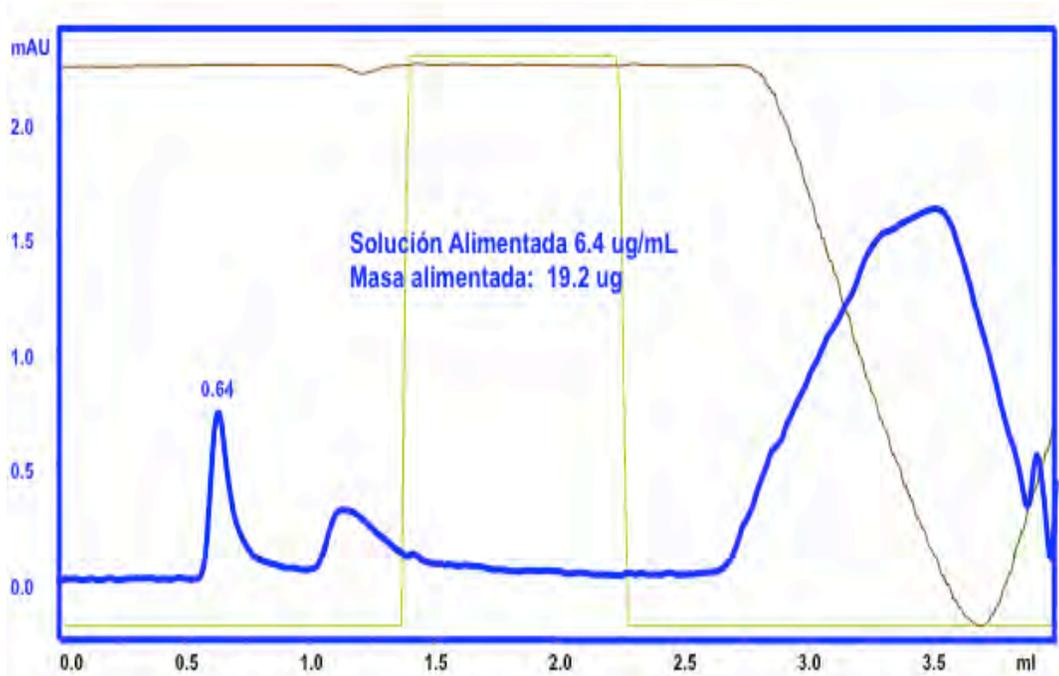


Figura 67. Análisis HPLC-HIC de la solución alimentada en las columnas de intercambio iónico.

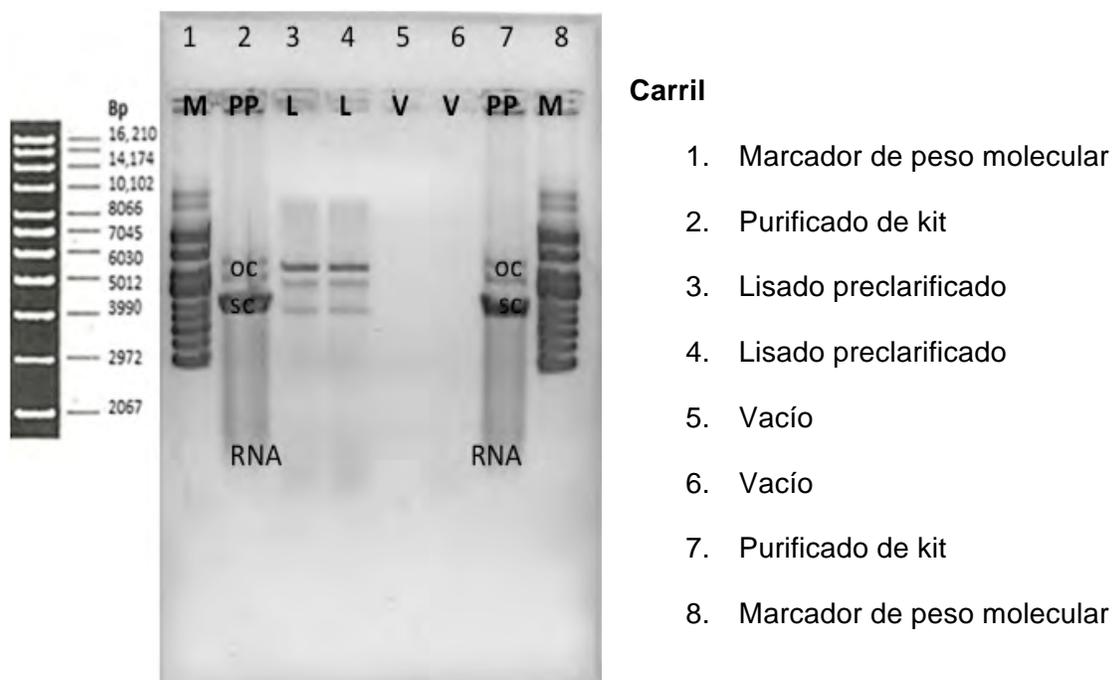


Figura 68. Electroforesis en gel de la solución alimentada a las columnas.

Se alimentó la Solución A de concentración $6.4 \mu\text{g pDNA/mL}$ acondicionada en 0.5M NaCl en TE a cada una de las columnas aplicando el método A, descrito en la Tabla 3. Se obtuvieron los perfiles de adsorción lavado y elución de ambos sistemas mostrados en la Figura 69. Puede observarse que la etapa de adsorción tuvo una duración de 8 minutos, con un comportamiento semejante en ambas columnas, este tiempo se determinó al obtener la curva de ruptura. En la etapa de lavado se observa un pico de impurezas, mayor en la matriz con membranas. En la etapa de elución parte I se observa otro pico de impurezas semejantes en ambas columnas. En la etapa de elución parte II se aprecia otro pico con altura diferente para cada columna, según los datos reportados en la bibliografía este pico contiene pDNA, la columna empacada con membranas eluyó antes.

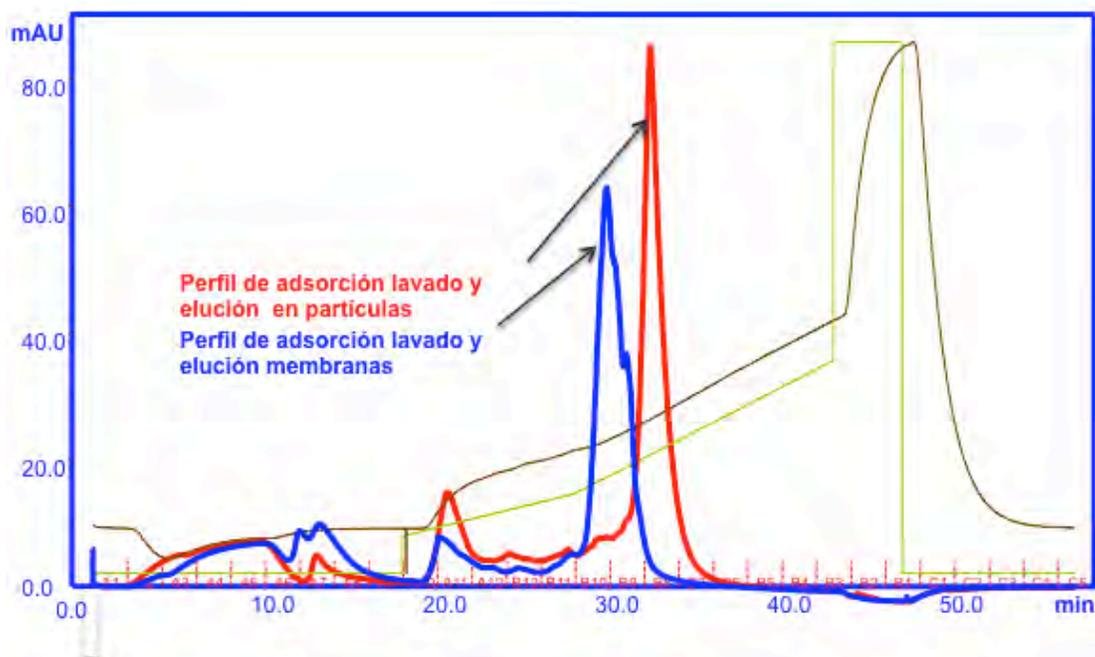


Figura 69. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas.

Los datos obtenidos de concentración de pDNA en las fracciones del cromatograma de la Figura 69 empleando HPLC-HIC se utilizaron para realizar balances de masa y calcular el porcentaje de recuperación, definido éste como la masa eluida entre la masa alimentada. Estos resultados se presentan en la a Tabla 10. Se realizaron análisis cualitativos de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa.

La Figura 70 muestra el perfil de adsorción, lavado y elución en la columna empacada con membranas junto con el correspondiente gel de electroforesis de muestras de las fracciones de salida de la columna. En la figura se muestra que durante la etapa de adsorción (fracciones A1-A4) y la etapa de lavado (fracciones A5-A9) no hay presencia de pDNA a la salida de la columna, por lo que se sugiere que toda la masa alimentada a las columnas quedó adsorbida. Durante la elución parte I al aumentar la fuerza iónica de 0.6M a 0.725M NaCl en TE (fracciones A10-B11) se distingue un pico en el

cromatograma, sin embargo en el análisis de electroforesis en estas fracciones no se detecta pDNA ni RNA a la salida de la columna. El pico que se observa en

la etapa de elución parte II de 0.725M a 1.1M NaCl en TE (fracciones B10-B3) corresponde al plásmido eluido.

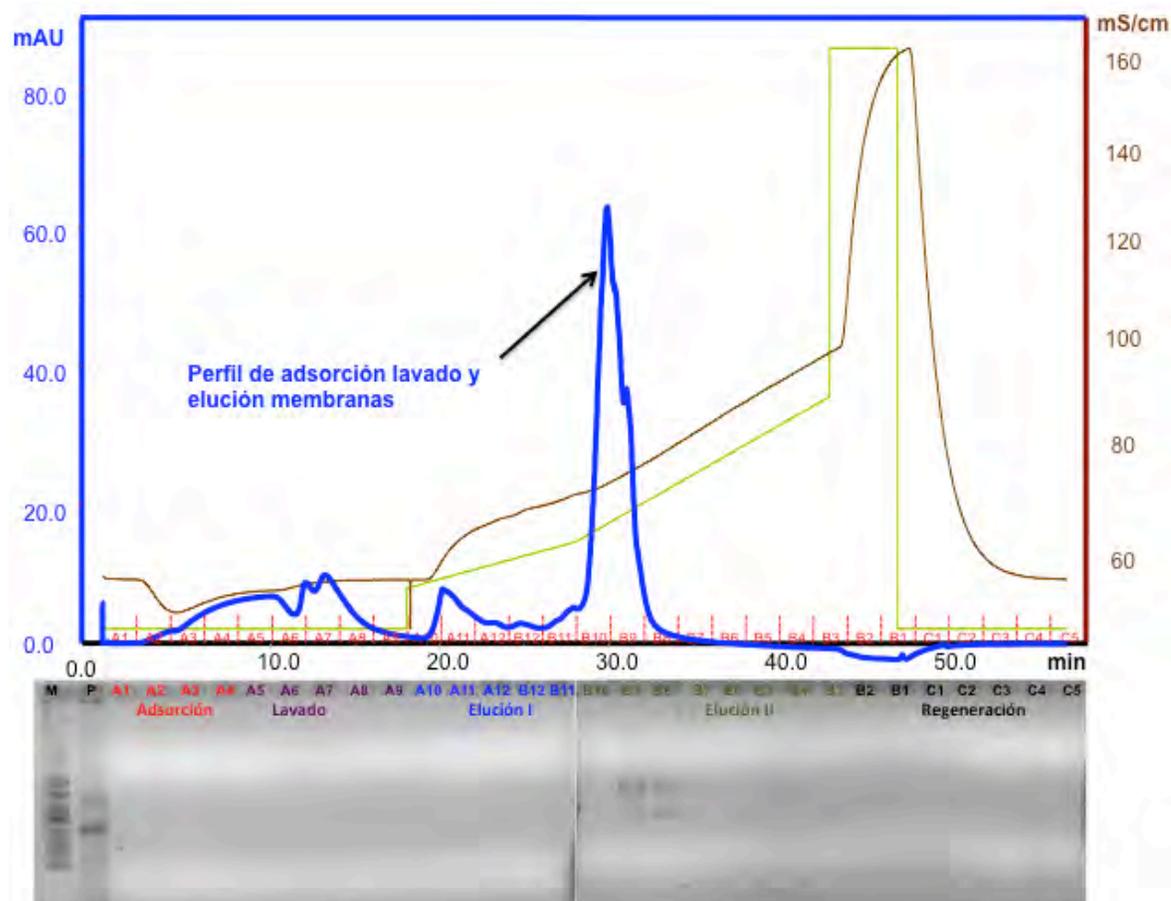


Figura 70. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con membranas (Arriba); análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa (Abajo).

La Figura 71 muestra el perfil de adsorción, lavado y elución en la columna empacada con partículas junto con el correspondiente gel de electroforesis de muestras de las fracciones de salida de la columna. En la figura se muestra que durante la etapa de adsorción (fracciones A1-A4) y la etapa de lavado (fracciones A5-A9) no hay presencia

de pDNA a la salida de la columna, por lo que se sugiere que toda la masa alimentada a las columnas quedó adsorbida. Durante la elución parte I al aumentar la fuerza iónica de 0.6M a 0.725M NaCl en TE (fracciones A10-B11) se distingue un pico en el cromatograma, sin embargo en el análisis de electroforesis en estas fracciones no se observa pDNA ni RNA a la salida de la columna. El pico que se observa en la etapa de elución parte II de 0.725M a 1.1M NaCl en TE (fracciones B10-B3) corresponde al plásmido eluido, donde las fracciones B7 y B6 contienen el pDNA concentrado.

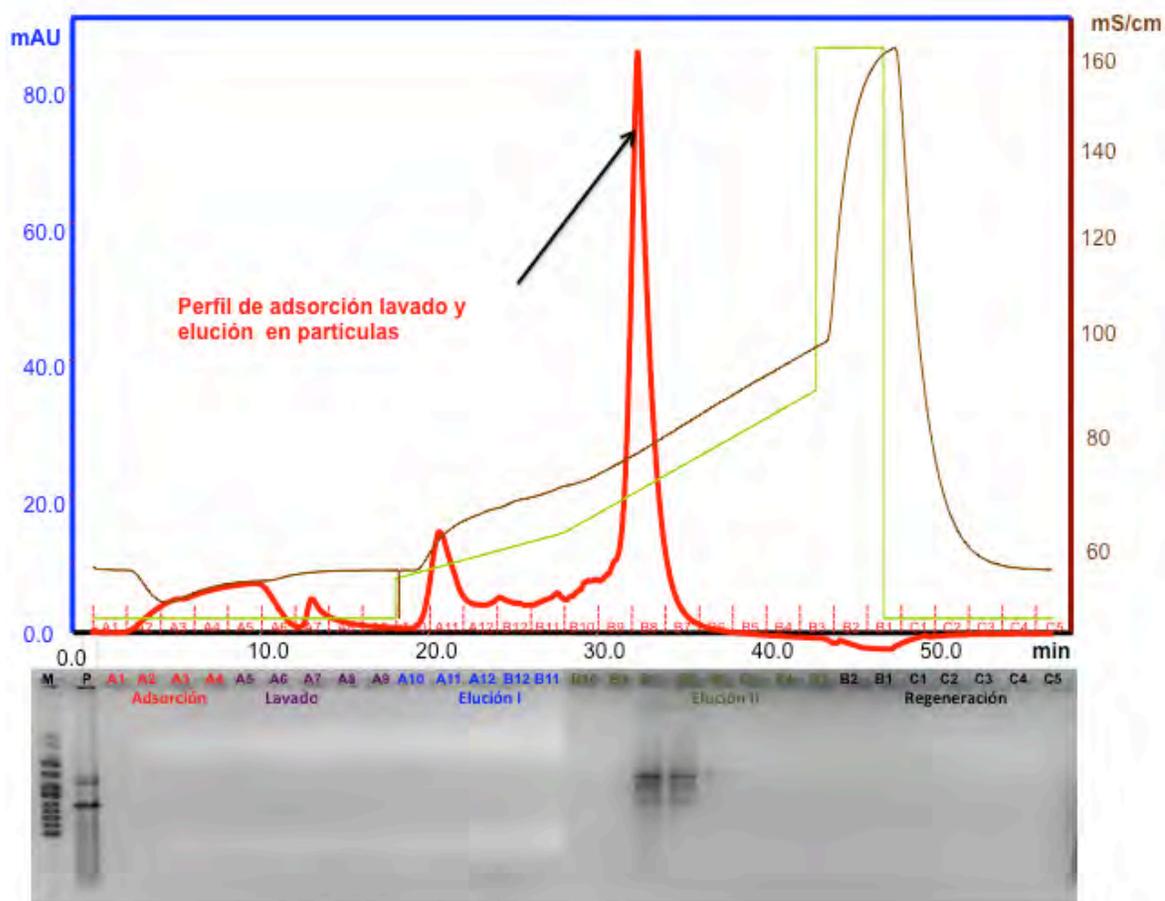


Figura 71. Perfil de Adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas (Arriba); análisis de las fracciones por electroforesis en gel de agarosa (Abajo).

Tabla 11. Balance de masa en las etapas de adsorción lavado y elución en cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas empacadas con partículas y con membranas (Solución A)

	Col. con Membranas	Col. con Partículas
Masa de pDNA (μg)		
Alimentado a la columna	19.2	19.2
Adsorción	19.2	19.2
No adsorbido	0	0
Lavado	0	0
Eluído total	15.5	18.25
Concentración de la fracción recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	9.75	10.38
Recuperación total (%)	80.8	95.24

En la Tabla 11 se observa la recuperación de pDNA en la etapa de elución, respecto a la masa alimentada, fue del 80.80% en la columna empacada con membranas, mientras que en la columna con partículas la recuperación fue del 95.24%.

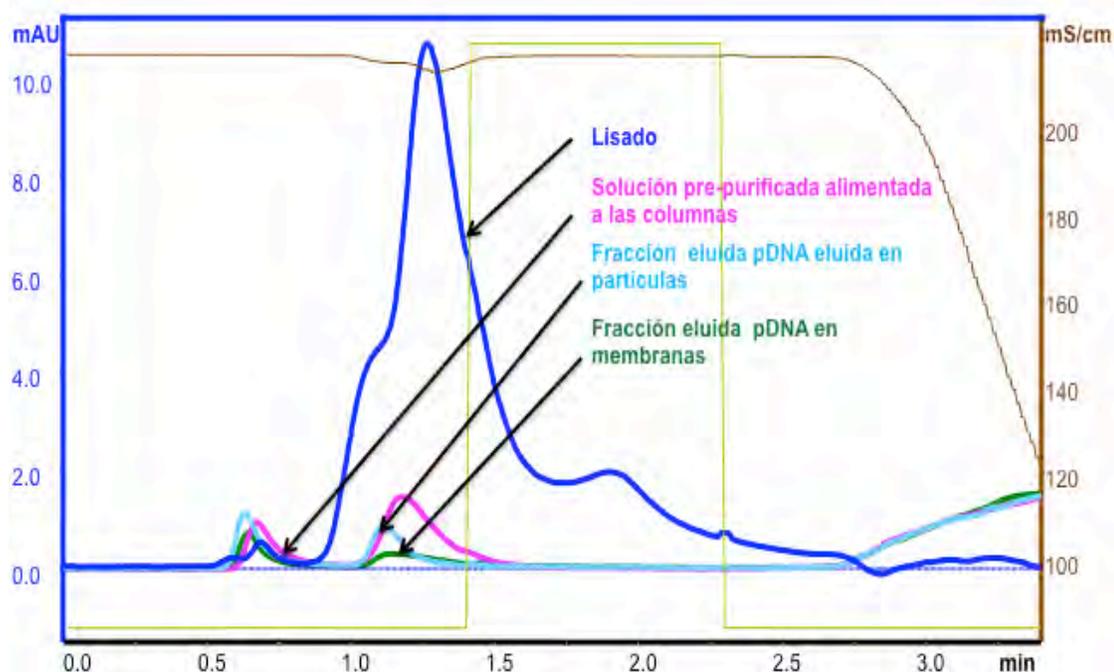


Figura 72. Análisis HPLC-HIC del lisado, pre-purificado alimentado en cada columna, y de las muestras de mayor concentración eluidas (solución B1).

Se compararon los cromatogramas analíticos del plásmido en el lisado, la solución alimentada y en fracciones eluidas con mayor concentración de pDNA, en ambas columnas. Estos resultados se muestran en la Figura 72. En la figura se observa claramente la reducción de impurezas durante las diferentes etapas de purificación, además de que ambas fracciones eluidas en las columnas mantienen una concentración semejante.

A partir de esta solución se tomó la decisión de analizar los inóculos antes de iniciar el proceso para verificar desde la etapa de upstream la integridad de la biomasa.

Anexo C: Análisis de inóculos

Se analizaron por HIC-HPLC diferentes inóculos disponibles, las muestras de pDNA se obtuvieron por lisis alcalina. El análisis se muestra en la Figura 73.

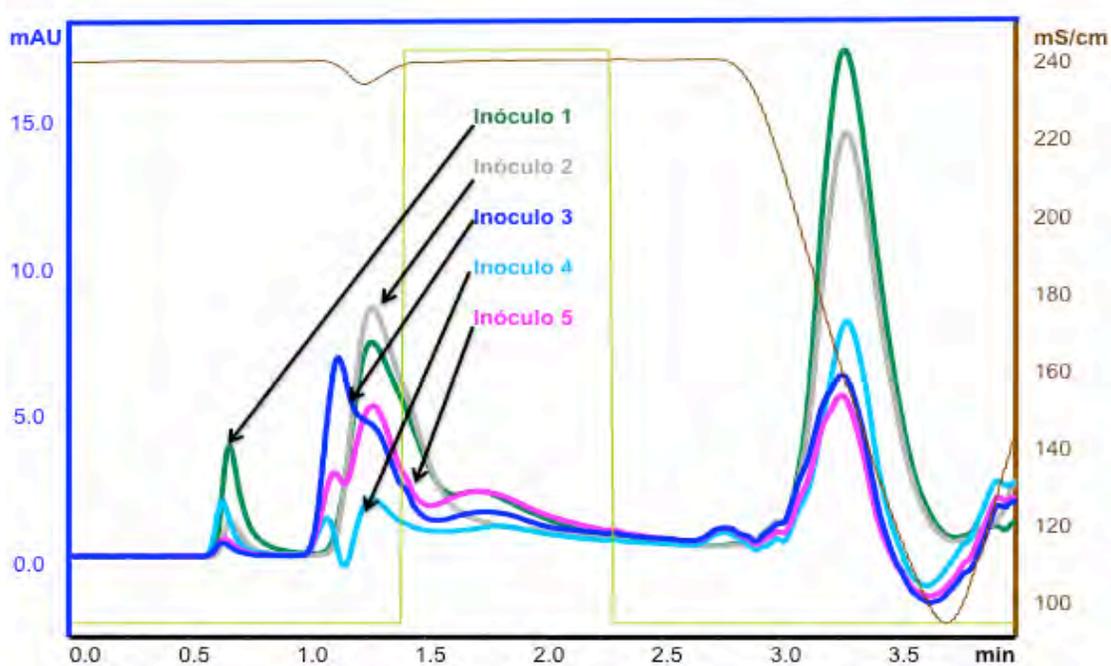


Figura 73. Análisis HPLC-HIC inóculos congelados disponibles.

Como se muestra en la figura los inóculos presentan diferentes concentraciones de pDNA, además que los picos de impurezas son diferentes. Se eligió trabajar con el inóculo 1, ya que es el que muestra el pico de mayor altura de pDNA.

Anexo D: Preparación de Soluciones

Lisis alcalina:

Buffer de resuspensión P1. Buffer 25 mM Tris/ 10 mM EDTA / 50 mM Glucosa, pH 8.0. Se pesaron 3.029 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), y 2.923 g de EDTA (PM= 292.24 g/mol), se disolvieron en 900 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8 con HCl 1M y se aforó a 1L. Se pesaron 9 g de Glucosa (PM= 180 g/mol) y se disolvieron en 900 ml de solución Tris 25 mM/EDTA 10 mM; la solución se aforó a 1L.

Buffer de lisis P2. NaOH 0.2M/SDS 1%. Se pesaron 4 g de NaOH (PM= 40 g/mol) y 5g de SDS y se disolvieron en 400 mL de agua desionizada; la solución se aforó a 500 mL.

Buffer de resuspensión P3. CH₃COOK 3M/ CH₃COOH pH=5.5. Se prepara una solución 5M (73.61g) de CH₃COOK (PM= 98. 15 g/mol) en 150 mL de agua, se agregan 28.25 mL de CH₃COOH y 71.25 mL de agua desionizada.

Ultrafiltración:

Buffer 10 mM Tris pH= 7.5. Se pesaron 1.2114 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), se disolvieron en 900 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH con HCl 1M hasta pH=7.5. La solución se aforó a 1L y se filtró en vacío con un filtro con tamaño de poro 0.45 µm.

Cromatografía de intercambio iónico:

Buffer 10 mM Tris/ 1.0 mM EDTA pH= 8.0. Se pesaron 1.2114 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), y 0.2923 g de EDTA (PM= 292.24 g/mol), se disolvieron en 900 ml de agua desionizada.y se ajustó el pH a 8 con HCl 1M. La solución se aforó a 1L y se filtró en vacío con un filtro de 0.45 µm y se desgasificó.

Buffer 10 mM Tris/ 1.0 mM EDTA pH= 8.0/ 0.5M NaCl. Se pesaron 1.2114 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), y 0.2923 g de EDTA (PM= 292.24 g/mol), se disolvieron en

900 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8 con HCl 1M y se aforó a 1L. Se pesaron 29.22 g de NaCl (PM= 58.44 g/mol) y se disolvieron en 900 ml de solución Tris 10mM/EDTA 1 mM. La solución salina se aforó a 1L y se filtró en vacío con un filtro de 0.45 μm y se desgasificó.

Buffer 10 mM Tris/ 1.0 mM EDTA pH= 8.0/ 2M NaCl.. Se pesaron 1.2114 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), y 0.2923 g de EDTA (PM= 292.24 g/mol), se disolvieron en 900 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8 con HCl 1M y se aforó a 1L. Se pesaron 116.88 g de NaCl (PM= 58.44 g/mol) y se disolvieron en 900 ml de solución Tris 10mM. La solución salina se aforó a 1L y se filtró en vacío con un filtro de 0.45 μm y se desgasificó.

HPLC-HIC:

Buffer 10 mM Tris pH=8 Se pesaron 1.2114 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), se disolvieron en 900 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH con HCl 1M has llegar a un pH=8. La solución se aforó a 1L y se filtró en vacío con un filtro con tamaño de poro 0.45 μm y se desgasificó.

Buffer 10 mM Tris/ 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH= 8.0. Se pesaron 1.2114 g de Tris base (PM= 121.14 g/mol), y 0.2923 g de EDTA (PM= 292.24 g/mol), se disolvieron en 900 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 8 con HCl 1M y se aforó a 1L. Se pesaron 198.195 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (PM= 132.14 g/mol) y se disolvieron en 900 ml de solución Tris 10mM. La solución salina se aforó a 1L y se filtró en vacío con un filtro de 0.45 μm y se desgasificó.

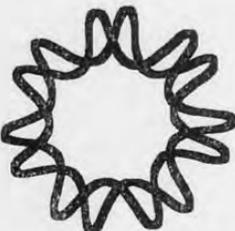
Electroforesis en gel de agarosa:

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

Gel de agarosa al 0.8%. Se pesaron 0.8 g de agarosa y se disolvieron en 100 ml de buffer TAE, se calentó un poco y por último se dejó enfriar.

Bromuro de Etidio. Para preparar bromuro de etidio 1 x, se tomaron 100 μ L de la solución stock de bromuro de etidio 1000 X y se aforaron en 100 mL de agua desionizada.

Anexo E: Cursos y participaciones



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD DE ESCALAMIENTO Y PLANTA PILOTO

CONFIERE EL PRESENTE

DIPLOMA
A

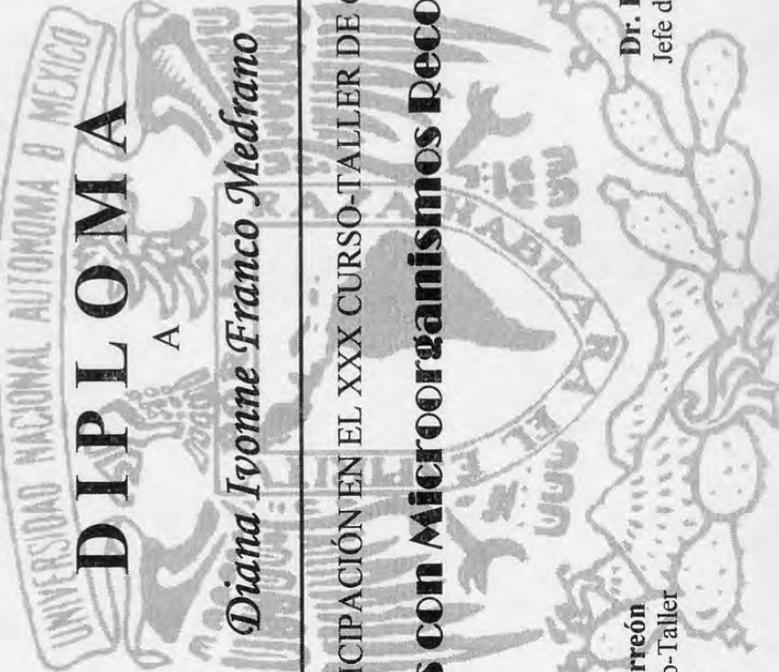
Diana Ivonne Franco Medrano

POR SU PARTICIPACIÓN EN EL XXX CURSO-TALLER DE 60 HORAS DE:

Bioprocesos con Microorganismos Recombinantes

Dr. Leobardo Serrano Carreón
Coordinador General del Curso-Taller
Jefe de la Planta Piloto

Dr. Enrique Galindo Fentanes
Jefe del Departamento de Ingeniería
Celular y Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, del 20 – 26 de Octubre del 2013.

