



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**Estudio de Ultrafiltración Tangencial de Lisados
Mecánicos de *E. coli* para la Recuperación de
Plásmido**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

JENNIFER SELENA RAMÍREZ PUERTA

DIRECTORA: DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN

Hermosillo, Sonora

Julio, 2022

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:

Jennifer Selena Ramírez Puerta

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

27/06/22

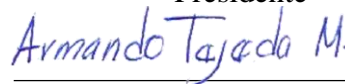
Fecha



Dra. Patricia Guerrero Germán
Presidente

27/06/22

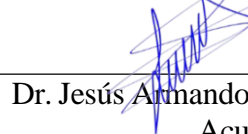
Fecha



Dr. Armando Tejeda Mansir
Secretario

27/06/22

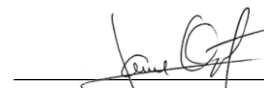
Fecha



Dr. Jesús Armando Lucero
Acuña Vocal

27/06/22

Fecha



Dr. Jaime Ortega López
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

27 de Junio de 2022.

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

DR. ABRAHAM ROGELIO MARTÍN GARCÍA

COORDINADOR DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA:
INGENIERÍA QUÍMICA

RESUMEN

La efectividad de las vacunas y la inmunización en la prevención de las enfermedades infecciosas es uno de los grandes avances de la medicina. En la actualidad, el acceso a la tecnología en el área de la genómica ha hecho posible acelerar el desarrollo de nuevos modelos de vacunas con características mejoradas en aspectos fundamentales, como la inmunogenicidad y la seguridad. Las vacunas de ADN plasmídico, (ADNp), es una metodología relativamente simple que ha abierto una nueva era en la inmunología, con un alto potencial como vacunas profilácticas y terapéuticas. El gran potencial de las vacunas de ADN reside en su gran versatilidad, ya que pueden diseñarse plásmidos de acuerdo con el tipo de enfermedad o patógeno contra el cual se quiera inducir una respuesta inmunitaria. Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de ADN de cadena cerrada, de doble hélice que se caracterizan por que se pueden replicar de manera independiente del ADN genómico. Por medio del ADNp se puede aislar y estudiar genes, así como transferir material genético. También actualmente se utiliza el ADNp como plataforma en la síntesis de ARNm en la producción de vacunas contra Covid-19. Los plásmidos se obtienen mediante cultivo celular de microorganismos preparados genéticamente para hospedarlos, como *Escherichia coli*. La producción de ADN plasmídico sigue las etapas: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación. Al realizar la lisis alcalina, se producen flóculos y precipitados, que es necesario eliminar para obtener un lisado clarificado. Tradicionalmente esta clarificación se realiza por centrifugación, pero se ha encontrado que hay pérdida de ADNp. Recientemente se han estado utilizado métodos mecánicos de ruptura celular para obtener un lisado sin la utilización de agentes químicos. Es pertinente estudiar la clarificación de un lisado mecánico para eliminar los restos celulares, por lo que en este trabajo se propone evaluar la etapa de clarificación de lisados mecánicos por medio tecnología de membranas para la recuperación de plásmido, así como estudiar la clarificación de lisados mecánicos de *E. coli* por medio de ultrafiltración tangencial para la recuperación de plásmido.

ABSTRACT

The effectiveness of vaccines and immunization in the prevention of infectious diseases is one of the great advances in medicine. Today, access to technology in genomics has made it possible to accelerate the development of new vaccine models with improved characteristics in key aspects such as immunogenicity and safety. Plasmid DNA vaccines, (pDNA), is a relatively simple methodology that has opened a new era in immunology, with high potential as prophylactic and therapeutic vaccines. The great potential of DNA vaccines lies in their great versatility since plasmids can be designed according to the type of disease or pathogen against which an immune response is to be induced. Plasmids are extrachromosomal, closed-stranded, double-helix DNA molecules characterized by the fact that they can replicate independently of genomic DNA. Some of their applications are that they can transfer genetic material, thanks to which genes can be isolated and studied. Plasmids are also currently used as a platform for mRNA synthesis in the production of vaccines against Covid-19. Plasmids are obtained by cell culture of microorganisms genetically prepared to host them, such as *Escherichia coli*. The production of plasmid DNA follows the stages: fermentation, primary recovery, intermediate recovery, and purification. When alkaline lysis is performed, floccs and precipitates are produced, which must be removed to obtain a clarified lysate. Traditionally this clarification is performed by centrifugation, but it has been found that there is a loss of pDNA. Recently, mechanical methods of cell disruption have been used to obtain a lysate without the use of chemical agents. It is pertinent to study the clarification of a mechanical lysate to eliminate cellular debris, so in this work we propose to evaluate the clarification stage of mechanical lysates by means of membrane technology for plasmid recovery, as well as to study the clarification of mechanical lysates of *E. coli* by means of tangential ultrafiltration for plasmid recovery.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo quiero dedicar especialmente a mis padres quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más. Gracias por sus consejos y sus grandes enseñanzas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	V
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS	XII
NOMENCLATURA	XIII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
Introducción	1
Justificación	2
Objetivo General	2
Objetivos Específicos.....	2
CAPÍTULO 2.....	3
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
2.1. Los Plásmidos.....	3
2.2. Producción de ADNp	4

2.2.1. Fermentación	5
2.2.2. Rompimiento celular	5
2.2.3. Filtración	8
2.2.4. Cromatografía.....	14
2.3. Vacunas	16
2.3.1. Vacunas de ADNp	17
2.3.2. Vacunas de ARNm	18
CAPÍTULO 3.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Materiales.....	20
3.2. Equipos	21
3.3. Metodología	26
3.3.1 Fermentación	26
3.3.2 Cosecha celular.....	27
3.3.3 Lisis alcalina	27
3.3.4 Cinética de ruptura celular	27
3.3.5. Lisis mecánica	28
3.3.6. Filtración de lecho profundo	29
3.3.7. Filtración con tierra de diatomeas.....	30
3.3.8. Ultrafiltración tangencial	31
3.3.9. Determinación de la calidad y cantidad de plásmido	33
CAPÍTULO 4.....	36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Cinética de crecimiento celular y velocidad específica de crecimiento.	36
4.2. Cinética de ruptura celular	37
4.3. Comparación de filtros para clarificar el lisado mecánico	38
4.4. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación.	40
4.5. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución.....	40
4.6. Ultrafiltración tangencial por lote con dilución.....	42
4.7. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.	44
CAPÍTULO 5.....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
5.1. Conclusiones.....	49
5.2. Recomendaciones.....	50
CAPÍTULO 6.....	51
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	59
Anexo A:.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia electrónica de transmisión de plásmidos: A) plásmido circular abierto, B) plásmido superenrollado y circular abierto, C) plásmido relajado, D) plásmido superenrollado. (Smith et al., 2007)	4
Figura 2: Esquema de un proceso de producción de ADN plasmídico Adaptado de García et al., 2019.	4
Figura 3: Lisis alcalina para liberación de plásmido.	7
Figura 4: Mecanismos de filtración a) filtración con formación de torta, b) filtración de lecho profundo y c) filtración con membrana. Adaptado de Tejada et al., 2011	9
Figura 5: Filtración profunda (Sutherland, 2008).	9
Figura 6: Fibras de celulosa, tierra de diatomeas y aglutinante polimérico. Adaptado de Nejatishahidein et al., 2020.....	10
Figura 7: Filtración convencional versus proceso de filtración tangencial. Adaptado de Aires-Barros & Azevedo, 2017.....	11
Figura 8: Solutos retenidos por varios tipos de membranas. Adaptado de Aires-Barros & Azevedo, 2017	13
Figura 9: Mecanismo de la vacuna de ADN para la inducción de inmunidad humoral y mediada por células. Adaptado de Lim et al., 2020.....	18
Figura 10. Pasos de desarrollo de procesos de ARNm. Adaptado de Cytiva, 2021	19
Figura 11. The Hirayama HVE-50 autoclave sterilizer.	21
Figura 12. Espectrofotómetro UV Thermo Scientific	21
Figura 13. Centrifuga BioFuge Stratos Thermo Fisher Scientific.....	22
Figura 14. Molino mezclador Retsch MM 400.....	22
Figura 15. Filtros Sartoclear	23
Figura 16. Turbidímetro Oakton T-100.....	23
Figura 17. Bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex L/X.....	24
Figura 18. Sistema de filtración tangencial KrosFlo Research II	24
Figura 19. MultiDoc Digital System.....	25
Figura 20. Cromatógrafo Äkta Purifier 10-UPC de GE Healthcare.....	25

Figura 21. Filtración por lecho profundo	29
Figura 22. Filtro Sartoclear con tierra de diatomeas.	30
Figura 23. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación.	31
Figura 24. Cinética de crecimiento celular y velocidad específica de crecimiento... 36	
Figura 25. Cinética de ruptura celular.	37
Figura 26: Electroforesis de muestras de permeados provenientes de lecho profundo y tierra de diatomeas..	38
Figura 27: Cromatogramas de lisados mecánicos clarificados mediante filtración en lecho profundo y tierra de diatomeas.	39
Figura 28: Electroforesis de muestras de permeados con distintos flujos de alimentación.	40
Figura 29: Cromatogramas de muestras de permeados tomados a distintos tiempos para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución..	41
Figura 30: Cromatogramas de muestras de permeados tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.....	42
Figura 31: Cromatogramas de muestras de retenidos tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.....	43
Figura 32: Permeados y retenidos de una ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.....	45
Figura 33: Cromatogramas de muestras de retenidos tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.	45
Figura 34: Cromatogramas de muestras de permeados tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.	46
Figura 35: Cromatogramas de un lisado alcalino y el retenido final.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de rompimiento celular. Adaptada de Tejeda et al., 2011.	6
Tabla 2. Clasificación de tecnologías de separación de membrana impulsada por presión. Adaptada de Aires-Barros & Azevedo, 2017.	12
Tabla 3. Clasificación de técnicas cromatográficas basadas en el principio de separación. Adaptada de Aires-Barros & Azevedo, 2017.	15
Tabla 4. Comparación de lisados mecánicos clarificados mediante filtración en lecho profundo y tierra de diatomeas.	39
Tabla 5. Análisis de muestras de permeados a distintos tiempos para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución.	41
Tabla 6. Análisis de muestras de permeados tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.	43
Tabla 7. Análisis de muestras de retenidos tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.	44
Tabla 8. Análisis de muestras de retenidos tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.	46
Tabla 9. Análisis de muestras de permeados tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.	47
Tabla 10. Análisis de un lisado alcalino y el retenido final.	48

NOMENCLATURA

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNp	Ácido Desoxirribonucleico plasmídico
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
TB	Terrific Broth
FFT	Filtración de Flujo Tangencial
DO	Densidad Óptica

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a mi directora de tesis, la Dra. Patricia Guerrero Germán, por su disposición, por su paciencia y por los valiosos consejos que me brindó durante la elaboración de este trabajo.

A mis sinodales. Le agradezco de antemano al Dr. Armando Tejeda Mansir por permitirme trabajar en su laboratorio, y por sus cruciales enseñanzas. Al Dr. Jesús Armando Lucero Acuña y al Dr. Jaime Ortega López por sus aportaciones en la elaboración de este trabajo y por su disposición.

Agradezco al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) por prestarme sus instalaciones y laboratorios para llevar a cabo mis experimentos, al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por prestarme los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme apoyo económico durante esta investigación.

Agradezco también a mis compañeras de laboratorio por sus consejos, y a mi novio Alejandro por su apoyo incondicional.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Introducción

La efectividad de las vacunas y la inmunización en la prevención de las enfermedades infecciosas es uno de los grandes avances de la medicina (Mota-Sánchez, 2009). Las vacunas de ADN surgen como una estrategia prometedora para la prevención y terapia de numerosas enfermedades, ya que están diseñadas para generar inmunidad mediada por células, en lugar de producir sólo anticuerpos neutralizantes como las vacunas convencionales (Hasson et al., 2015). Los plásmidos se obtienen mediante cultivo celular de microorganismos preparados genéticamente para hospedarlos, como *Escherichia coli* (Anderson & Schneider, 2007). Los pasos involucrados en el proceso de producción de ADN plasmídico (ADNp) son: fermentación, recuperación primaria, recuperación intermedia y purificación (Prazeres et al., 2001). Después de la etapa de fermentación, se sigue una secuencia de operaciones para romper las células hospedadoras, recuperar el ADNp y eliminar los restos celulares e impurezas del lisado. Al realizar la lisis alcalina de la bacteria *E. coli*, para extraer el ADNp, se producen flóculos y precipitados, que es necesario eliminar para obtener un lisado clarificado. Tradicionalmente esta clarificación se realiza por centrifugación, también se ha estudiado la microfiltración de lecho profundo y se ha encontrado que cierta cantidad de ADNp se queda retenido en el filtro (Padilla-Zamudio et al., 2015). Otro método probado para la clarificación de lisados alcalinos es la ultrafiltración tangencial, como opción para sustituir a la centrifugación y por ser de flujo tangencial se encontró que no hay pérdida de ADNp. Recientemente se han estado utilizando métodos mecánicos de ruptura celular para obtener un lisado sin la utilización de agentes químicos (Padilla et al., 2017). Un

lisado mecánico contiene entre los contaminantes, restos celulares, además de las perlas con las que se realiza la ruptura celular. Se considera pertinente estudiar la clarificación de un lisado mecánico para eliminar los restos celulares y recuperar las perlas, por ello en este trabajo se propone estudiar la filtración de lecho profundo y la ultrafiltración tangencial con un filtro con tamaño de poro adecuado para clarificar el lisado y eliminar los restos celulares y perlas.

Justificación

Se propone evaluar la etapa de clarificación de lisados mecánicos por medio de tecnología de membranas para la recuperación de plásmido.

Objetivo General

Estudiar la clarificación de lisados mecánicos de *E. coli* por medio de ultrafiltración tangencial para la recuperación de plásmido.

Objetivos Específicos

- Estudiar el comportamiento de la ultrafiltración tangencial en la recuperación de plásmido de lisados mecánicos, variando el flujo de alimentación.
- Evaluar la calidad y concentración de los lisados clarificados y retenidos.
- Evaluar la recuperación de plásmido de un lisado mecánico con la técnica propuesta y comparar con la recuperación de plásmido por centrifugación de un lisado alcalino.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Los Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que se replican de forma autónoma en bacterias (Srinivasan et al., 2017). Los plásmidos pueden replicar el ADN cromosómico principal de forma independiente y proporcionar una herramienta sencilla para transferir genes entre células, se han utilizado como herramientas para clonar, transferir y manipular genes. Debido a esto, se utilizan ampliamente en ingeniería genética (Ndwandwe & Wiysonge, 2021).

Los plásmidos confieren importantes caracteres fenotípicos a las bacterias como resistencia a los antibióticos, producción de toxinas y síntesis de enzimas específicas implicadas en la biodegradación (Srinivasan et al., 2017). Actualmente, el desarrollo de nuevas vacunas y terapias génicas utilizando ADN plasmídico ha generado una gran demanda de estas macromoléculas biológicas en condiciones de alta pureza, de acuerdo con los lineamientos de los organismos reguladores para su administración en seres vivos (Freitas et al., 2006).

Los plásmidos pueden existir en diferentes conformaciones topológicas (Figura 1) estas son: ADNp lineal, ADNp circular abierto (oc) y ADNp superenrollado (sc) (Prazeres et al., 2001). Las isoformas son diferentes en carga, tamaño e hidrofobicidad (Abdulrahman & Ghanem, 2018). Hoy en día, la forma de plásmido más deseable para la terapia génica y la vacunación con ADN es la isoforma superenrollada, debido a su estabilidad y mayor eficiencia de transfección sobre otras topologías de plásmidos (Sousa et al., 2012).

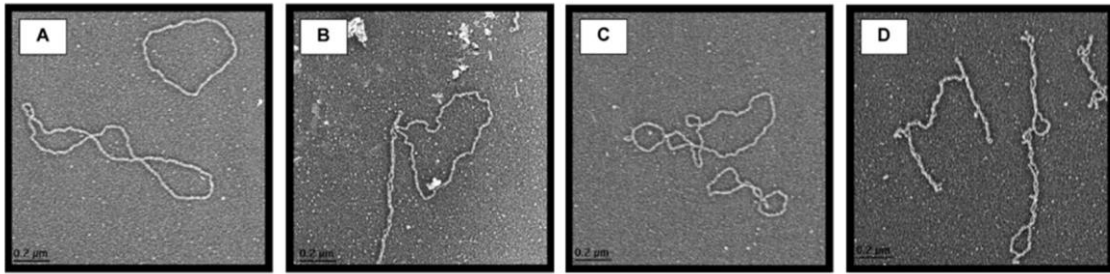


Figura 1: Microscopia electrónica de transmisión de plásmidos: A) plásmido circular abierto, B) plásmido superenrollado y circular abierto, C) plásmido relajado, D) plásmido superenrollado. (Smith et al., 2007)

2.2. Producción de ADNp

La fabricación biotecnológica de plásmidos se divide en dos etapas: el procesamiento previo, durante el cual el ADNp es producido por células modificadas genéticamente para contener el gen de interés, y el procesamiento posterior, en esta etapa el ADNp producido se aísla y purifica, como se presenta en la Figura 2 (Tejeda & Montesinos, 2008).

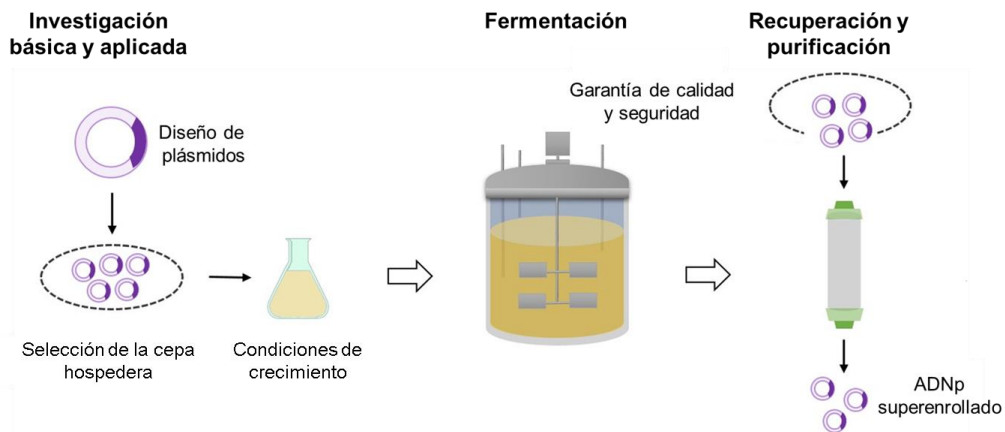


Figura 2: Esquema de un proceso de producción de ADN plasmídico Adaptado de García et al., 2019.

2.2.1. Fermentación

La fermentación es la primera operación para la producción de ADNp en la cual inicia la propagación del inóculo. Factores como el medio de cultivo, temperatura, suministro de oxígeno y la densidad celular deben optimizarse y controlarse. Cada uno de estos parámetros tienen un impacto en la cosecha celular, así como en la recuperación primaria, el rendimiento y calidad del ADNp (Islas-Lugo et al., 2016). El objetivo principal al diseñar un proceso de fermentación para plásmidos es maximizar tanto el rendimiento volumétrico (mg/L) como el rendimiento específico (mg/g) del plásmido superenrollado (Carnes & Williams, 2008).

Una consideración importante durante el proceso de producción de ADNp es la configuración y la estrategia operativa del fermentador (Munguía et al., 2015). Este determinará, por ejemplo, la concentración del producto, el grado de conversión del sustrato y si se puede conseguir un rendimiento sostenible y fiable (Shuler & Kargi, 1991). Los biorreactores suelen funcionar en uno de los siguientes modos: por lotes, continuo o por lotes alimentados. La elección del modo de funcionamiento influye en los parámetros operativos, como el flujo volumétrico de entrada y salida, el volumen de operación y la tasa de dilución (Merchuk & Gluz, 2002).

2.2.2. Rompimiento celular

El rompimiento celular es el primer paso y el más crítico en el bioproceso, ya que este paso influye en el rendimiento y la calidad del producto (Prazeres, 2011). El rompimiento celular es crucial para la liberación de componentes intracelulares como ácidos nucleicos, metabolitos o proteínas (Otto et al., 2014). Para liberar los productos intracelulares primero hay que romper la pared celular (Aires-Barros & Azevedo, 2017). La elección del método más adecuado para romper la pared celular depende de varios factores como: la resistencia de la pared celular a la desintegración, que es variable según el tipo de célula (tamaño y cepa), la edad de la célula y la estructura de las membranas y las paredes, la localización del producto (orgánulos, espacio periplásmico, citoplasma), la facilidad de recuperación del producto y la cantidad de células de procesamiento (Aires-Barros & Azevedo, 2017).

Los métodos de rompimiento celular pueden ser divididos en métodos químicos y métodos mecánicos como se muestra en la Tabla 1 (Tejeda et al., 2011). Los métodos de lisis celular comúnmente utilizados (no mecánicos: químicos, físicos o enzimáticos) demuestran ser eficientes solo a escala de laboratorio (Byreddy et al., 2015), pero no satisfacen las necesidades de los procesos de rompimiento celular a gran escala (Haque et al., 2016). Los métodos mecánicos, por otro lado, son prometedores ya que pueden ampliarse con un mínimo o ningún pretratamiento y pueden usarse en modo discontinuo o continuo (Liu et al., 2016).

Tabla 1. Métodos de rompimiento celular. Adaptada de Tejeda et al., 2011.

Método	Técnica	Principio
Químicos	Choque osmótico	Ruptura osmótica de membrana
	Disolución lipídica	Desestabilización de la pared celular por solventes orgánicos
	Digestión enzimática	Digestión de la pared celular
	Tratamiento alcalino	Solubilización de membranas por saponificación de lípidos
Mecánicos	Molido en molinos de perlas	Las células son prensadas entre perlas de vidrio
	Homogenización	Las células se rompen por fuerzas de corte al pasar por un pequeño orificio

Lisis Alcalina

La técnica de rompimiento celular más utilizada es el tratamiento alcalino originalmente descrito por (Birnboim & Doly J., 1979). El paso previo a la lisis alcalina es la resuspensión de la biomasa obtenida del cultivo, con este fin se utiliza un buffer capaz de romper los enlaces iónicos o enlaces de hidrógeno entre lípidos y proteínas en la

pared celular. La remoción de cationes divalentes (principalmente de Ca y Mg) de la pared celular desestabiliza su estructura, facilitando la ruptura. Típicamente se utiliza ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante y se adiciona glucosa o sacarosa en el buffer con el fin de proteger al plásmido de su ruptura en el proceso de lisis (Prazeres et al., 2001).

La siguiente operación está diseñada para romper las células y desnaturalizar el ADN genómico (ADNg) y las proteínas que luego se precipitan junto con los restos celulares y otras impurezas. La lisis se inicia mediante la adición de un reactivo de lisis a la suspensión de células (Figura 3). Este reactivo suele contener un álcali (NaOH) y un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS). La función del detergente es solubilizar el material de las membranas celulares, eliminando las interacciones interfaciales no covalentes entre las proteínas y los lípidos (Prazeres et al., 2001). El álcali eleva el valor del pH, promoviendo así la desnaturalización irreversible del ADNg, pero manteniendo la desnaturalización del plásmido como reversible (Ciccolini et al., 1999). El siguiente paso en el procedimiento de lisis es la adición de una solución de neutralización con acetato de potasio, que provoca la renaturalización de las moléculas de plásmido que permanecen en la solución (Prazeres et al., 2001). En esta etapa se forman precipitados, materiales altamente gelatinosos por naturaleza que tienden a formar flóculos. Estos flóculos son removidos mediante centrifugación a nivel laboratorio, pero se prefiere la filtración para removerlos en procesos a gran escala (Nunes et al., 2012).

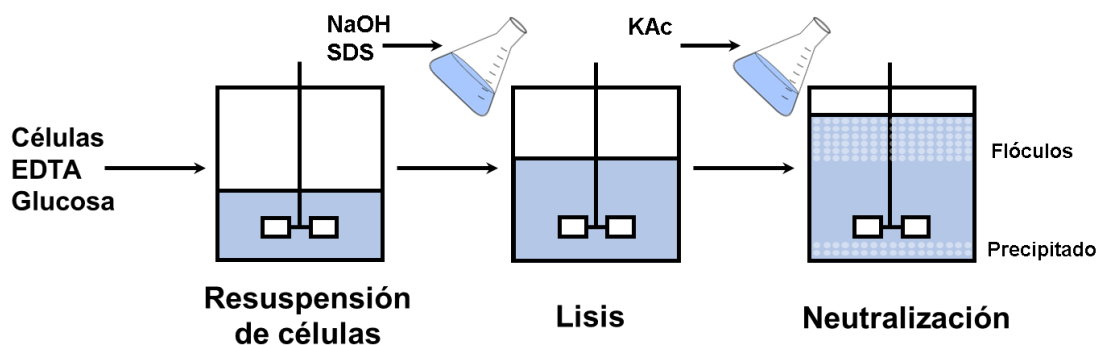


Figura 3: Lisis alcalina para liberación de plásmido.

Lisis Mecánica

Las principales ventajas de la molienda de perlas son la alta eficiencia de rompimiento celular, los bajos costos operativos y la facilidad de ampliación, lo que genera potencial para la industrialización (Lee et al., 2017). El principio común de un molino de perlas es que las células se someten a un alto estrés producido por la abrasión durante la agitación rápida con perlas de vidrio, lo que resulta en la rotura de la membrana y la pared celular, liberando todos los componentes intracelulares (Geciova et al., 2002).

La eficacia de la desintegración celular en los molinos de perlas depende de varios parámetros, como la geometría de la cámara y del agitador, la concentración de biomasa, el caudal de suspensión, la relación de llenado de la perla, el tipo de perla y el diámetro de la perla (Postma et al., 2017). Según (Montalescot et al., 2015) se encontró que una relación de llenado de perlas alta (> 55% v/v) era óptima para el rompimiento celular. (Doucha & Lívanský, 2008) encontraron que las perlas de óxido de circonio (ZrO₂) son más eficientes que las perlas de vidrio debido a su mayor densidad específica.

El proceso de molienda de perlas genera mucho calor que es directamente proporcional a la cantidad de perlas presentes en la cámara de molienda, la velocidad de agitación y el tiempo de molienda. Por lo tanto, las optimizaciones de lisis celular deben centrarse en acortar el tiempo de ejecución y minimizar la cantidad de perlas cargadas, sin comprometer o incluso aumentar la productividad del proceso (Haque et al., 2016).

2.2.3. Filtración

La filtración consiste en la separación de un sólido de un fluido por acción de un medio filtrante y un gradiente de presión. En los procesos biotecnológicos se utilizan tres tipos de mecanismos de filtración (Figura 4): filtración con formación de torta o filtración convencional, filtración de lecho profundo y filtración con membranas (Tejeda et al., 2011).

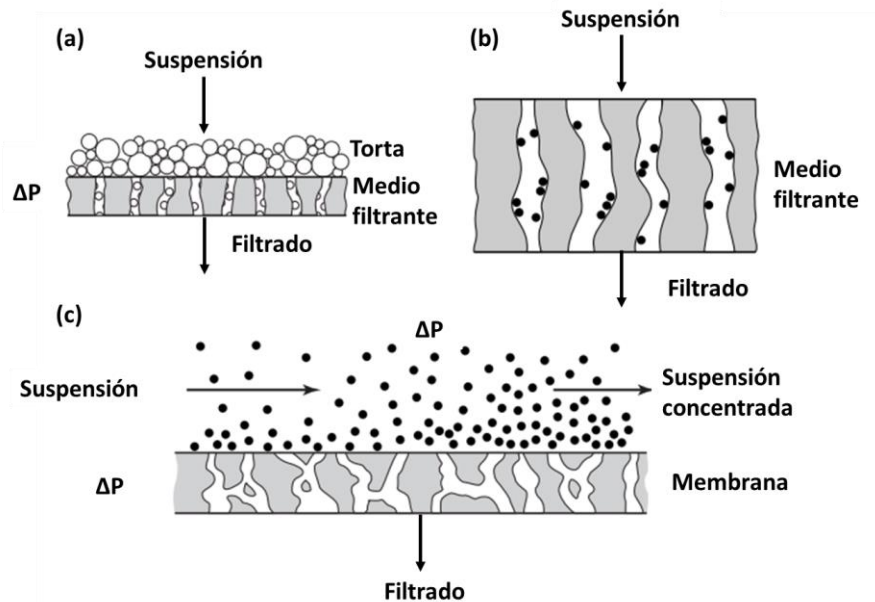


Figura 4: Mecanismos de filtración a) filtración con formación de torta, b) filtración de lecho profundo y c) filtración con membrana. Adaptado de Tejeda et al., 2011

Filtración de Lecho Profundo

Los filtros de profundidad están hechos de medios fibrosos y no tienen una estructura o un tamaño de poro definido. Las partículas que pasan a través de los filtros de profundidad quedan atrapadas o adsorbidas debido al camino tortuoso que deben recorrer para salir del filtro como se presenta en la Figura 5 (Sutherland, 2008).

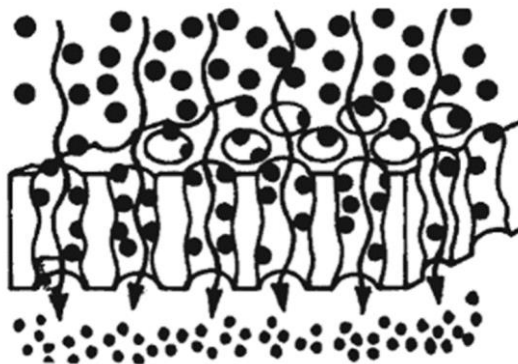


Figura 5: Filtración profunda (Sutherland, 2008).

La mayoría de los filtros de profundidad son estructuras heterogéneas que constan de una matriz de fibra, una ayuda filtrante apropiada (por ejemplo, tierra de diatomeas o carbón activado) y un aglutinante (Figura 6). La matriz suele ser una matriz no tejida de fibras de celulosa o polipropileno, cuyo diámetro y densidad de empaquetamiento determinan el tamaño efectivo de los poros del filtro. El aglutinante se utiliza para mantener la estabilidad física de la estructura general del filtro, aunque también hay pruebas de que el aglutinante puede proporcionar una importante eliminación por adsorción de proteínas y ADN en algunos filtros (Zydney, 2021).



Figura 6: Fibras de celulosa, tierra de diatomeas y aglutinante polimérico. Adaptado de Nejatishahidein et al., 2020

Los filtros de profundidad a pequeña escala se alojan como hojas planas en pequeñas cápsulas selladas (Kim et al., 2021). Es muy difícil plisar eficazmente la mayoría de los materiales de los filtros de profundidad; por lo tanto, los filtros de profundidad a escala piloto y comercial suelen utilizar un conjunto paralelo de estas hojas, con el flujo distribuido entre las capas (Kim et al., 2021). Los filtros de profundidad eliminan las células y los desechos celulares tanto en la superficie externa como en la profundidad del filtro, debido principalmente a la retención basada en el tamaño por parte de la matriz porosa (Zydney, 2021).

Procesos con Membranas

El uso de la tecnología de membranas para la separación de biomoléculas y para la concentración de fluidos de proceso se ha expandido en los últimos años. La membrana en sí es una barrera que separa dos fases y restringe el transporte de varios compuestos de manera selectiva. Puede ser de composición homogénea o heterogénea, de estructura simétrica o asimétrica, de naturaleza sólida o líquida y de carga neutra,

positiva o negativa. En una separación típica basada en membranas, una corriente afluente que fluye tangencialmente a la membrana se separa en dos corrientes efluentes denominadas permeado y retenido como se presenta en la Figura 7 (Aires-Barros & Azevedo, 2017).

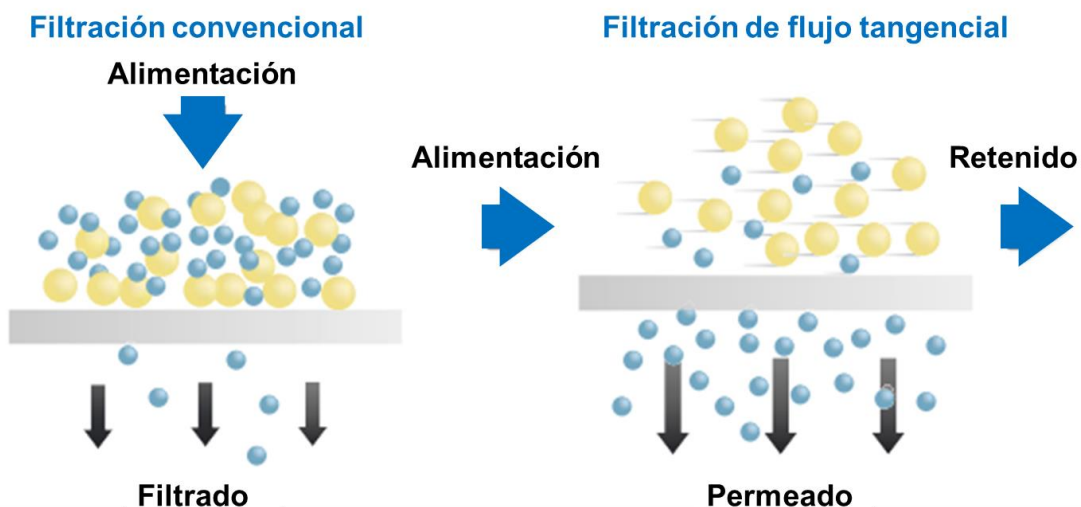


Figura 7: Filtración convencional versus proceso de filtración tangencial. Adaptado de Aires-Barros & Azevedo, 2017.

El permeado es la parte del fluido que pasa a través de la membrana y el retenido es la porción que ha sido rechazada. Durante la separación, la membrana semipermeable actúa como una barrera selectiva, reteniendo las biomoléculas más grandes que el tamaño del poro mientras permite que las moléculas más pequeñas penetren a través de los poros. Las separaciones impulsadas por presión son las más relevantes para la separación y purificación de productos biológicos y normalmente se clasifican según el tamaño de sus poros como microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa y, por lo tanto, según el tipo de soluto retenido como se muestra en la Tabla 2 (Aires-Barros & Azevedo, 2017).

Tabla 2. Clasificación de tecnologías de separación de membrana impulsada por presión. Adaptada de Aires-Barros & Azevedo, 2017.

Tipo de proceso	Presión típica de funcionamiento (bar)	Tamaño de poro	Peso molecular de corte (Da)
Microfiltración	0.5 - 2	0.1 - 10 μm	-
Ultrafiltración	1 - 5	1 - 50 nm	> 1000
Nanofiltración	3 -15	0.2 -10 nm	50 - 250
Osmosis inversa	10 - 70	< 1 nm	< 50

Microfiltración

Las separaciones por presión son las más relevantes para la separación y purificación de productos biológicos y suelen clasificarse según su tamaño de poro en microfiltración, ultrafiltración (UF), nanofiltración y ósmosis inversa y, por tanto, en función del tipo de soluto retenido como se presenta en la Figura 8 (Aires-Barros & Azevedo, 2017). La microfiltración se emplea generalmente para separar de caldos biológicos partículas mayores de 1.0 μm como coloides y células. Las presiones de funcionamiento típicas oscilan entre 0.1 y 2 bar (Tejeda et al., 2011). En el proceso de microfiltración tangencial, la alimentación fluye de manera paralela a la membrana y se caracteriza por tener una corriente de permeado, constituida por partículas que por su tamaño pueden pasar la membrana, y una corriente de retenido que es tangencial a la superficie de la filtración, la cual se diferencia por poseer sustancias que no pueden pasar por los poros (Smith, 2012). Tanto las membranas de ultrafiltración como las de microfiltración separan compuestos en gran parte por tamaño. Básicamente, la membrana actúa como un tamiz al rechazar aquellas moléculas demasiado grandes para pasar por los poros, mientras permite que las moléculas más pequeñas crucen hacia la corriente de permeado. El cambio de presión a través de la membrana es la fuerza impulsora (Smith, 2012). Todos

los tipos de módulos de membrana constan de al menos una entrada para la alimentación a separar y dos salidas para los componentes filtrados y retenidos (Hausmann et al., 2012).

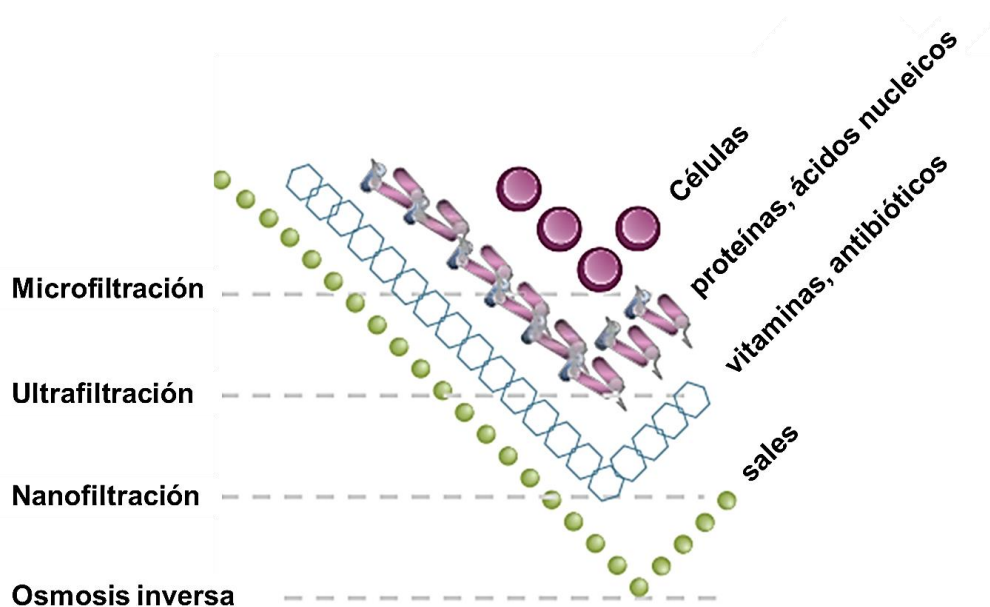


Figura 8: Solutos retenidos por varios tipos de membranas. Adaptado de Aires-Barros & Azevedo, 2017

Ultrafiltración

La ultrafiltración (UF) es un proceso de presión media que ofrece retención de proteínas, ácidos nucleicos, coloides y material biológico, incluidas partículas de 2 nm o más (masa molecular superior a 1000 Da). Las presiones de funcionamiento típicas oscilan entre 1 y 5 bar. Las membranas son asimétricas y normalmente contienen una capa activa ultrafina colocada encima de una subcapa (100-200 mm de espesor) (Aires-Barros & Azevedo, 2017). Las membranas utilizadas en UF se caracterizan por su peso molecular de corte (PMC), el cual es el peso molecular del soluto globular que es retenido en un 90 % por la membrana. La teoría de la ultrafiltración está orientada a tratar de predecir el flux en un sistema dado en función de los parámetros de operación como son: presión, temperatura, concentración de la solución y velocidad tangencial (Tejeda et al., 2011). Es importante señalar que la teoría de la ultrafiltración es de aplicación limitada, pero es

útil en la interpretación y extrapolación de los datos experimentales, así como de guía para la operación de los equipos (Kovácsa *et al.*, 2009).

2.2.4. Cromatografía

La cromatografía es la separación de una mezcla de compuestos en sus componentes individuales en función de sus interacciones relativas con una matriz inerte (Moustafa & Morsi, 2013). La cromatografía es una de las operaciones clave en el procesamiento posterior del ADN plasmídico (Pereira *et al.*, 2010). Muchos métodos cromatográficos se utilizan solos o combinados como técnicas de purificación de ADNp (Ghanem *et al.*, 2013). El paso de purificación cromatográfica generalmente enfrenta numerosos desafíos debido a las semejanzas de las propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la hidrofobicidad y la carga entre el ADNp y los otros componentes del lisado, lo que puede complicar el proceso de separación (Stadler *et al.*, 2004). En consecuencia, la purificación de ADNp puede requerir más de un solo paso cromatográfico para obtener la pureza de ADNp deseada (Sun *et al.*, 2013). En la cromatografía, los componentes a separar se distribuyen entre una fase estacionaria y otra móvil. La fase estacionaria, generalmente compuesta por partículas de tamaño uniforme, se empaqueta en una columna y se equilibra con una fase móvil adecuada que se filtra a través de la fase estacionaria. Las interacciones entre los analitos y la fase estacionaria son no covalentes y pueden ser de naturaleza iónica o no iónica, según el tipo de cromatografía utilizada.

Los componentes que exhiben interacciones más débiles con la fase estacionaria pasan a través de la columna más rápido que aquellos que interactúan fuertemente (Moustafa & Morsi, 2013). La mezcla por separar se carga en la columna seguida de la fase móvil. La elución de los componentes se logra en un modo isocrático, es decir, se mantiene la misma fase móvil en todo momento y la separación de los componentes depende de las diferencias en el tiempo de retención en la columna, o mediante elución en gradiente en la que la fase móvil se cambia continuamente para facilitar la liberación de los componentes ligados a la fase estacionaria (Bhatia, 2005).

Existen varios tipos de cromatografía para la separación de productos biológicos los cuales se presentan en la Tabla 3. La selección del tipo de procedimiento cromatográfico

empleado depende de la naturaleza del ADNp, así como de los otros componentes del lisado (Sousa et al., 2012). Estas separaciones pueden basarse en el tamaño (cromatografía de exclusión por tamaño), la carga (cromatografía de intercambio iónico), la hidrofobicidad (cromatografía de interacción hidrofóbica) o las propiedades de reconocimiento (cromatografía de afinidad). Cada técnica cromatográfica tiene sus ventajas y desventajas y un solo paso de cromatografía rara vez es capaz de proporcionar la calidad deseada en términos de homogeneidad y pureza (Aires-Barros & Azevedo, 2017).

Tabla 3. Clasificación de técnicas cromatográficas basadas en el principio de separación. Adaptada de Aires-Barros & Azevedo, 2017.

Cromatografía	Principio de separación
Cromatografía de exclusión por tamaño	Tamaño
Cromatografía de intercambio aniónico	Carga
Cromatografía de intercambio catiónico	Carga
Cromatografía de interacción hidrofóbica	Hidrofobicidad
Cromatografía de fase inversa	Hidrofobicidad
Cromatografía de interacción hidrofílica	Hidrofobicidad
Cromatografía de afinidad	Reconocimiento molecular

La cromatografía por intercambio iónico se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos de carga contraria de los adsorbentes. La cromatografía por afinidad está basada en interacciones altamente específicas entre el soluto de interés y el adsorbente. Por su parte la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) se basa en la interacción entre las regiones hidrofóbicas de las biomoléculas y los grupos hidrofóbicos de los adsorbentes empleados (Tejeda et al., 2011). HIC funciona mediante la unión promovida por sal; por lo tanto, puede usarse más convenientemente después de la cromatografía de intercambio de aniones, o cuando el grupo de plásmidos

tiene un alto contenido de sal (Carnes & Williams, 2008). Las separaciones HIC se realizan en cuatro pasos; equilibrio, aplicación de muestras, elución y regeneración. El paso de equilibrio consiste en preparar la fase estacionaria para la separación pasando un buffer que contiene sal (generalmente fosfato de sodio o sulfato de amonio). La aplicación de la muestra y el paso de lavado se llevan a cabo para introducir la muestra en la fase estacionaria y lavar las impurezas débilmente unidas mediante una concentración moderada de la sal. La etapa de elución se lleva a cabo mediante la disminución del gradiente de la concentración de sal para separar las isoformas de ADNp. El paso final es la regeneración de la fase estacionaria, para eliminar todas las moléculas fuertemente unidas (McCue, 2014).

2.3. Vacunas

Desde el desarrollo de la vacuna contra la viruela en 1798 y la vacuna contra la rabia en 1885, la tecnología de la vacuna avanzó desde el uso de patógenos inactivados y atenuados hasta el uso de subunidades que solo contienen aquellos componentes patógenos que pueden desencadenar una respuesta inmunológica (Sousa et al., 2021). Las vacunas salvan 6 millones de vidas cada año y son una de las principales responsables del aumento de la longevidad humana (Plotkin, 2014). Su impacto sobre la viabilidad económica del sistema sanitario es también muy grande, dado que las vacunas reducen los costos de tratamiento de las enfermedades (Kennedy, 2020) y reducen el impacto y el riesgo de brotes (Bloom et al., 2018).

A pesar de la eficacia probada de las vacunas actuales, hay margen de mejora en el campo de la tecnología de las vacunas. Las vacunas tradicionales atenuadas e inactivadas todavía se utilizan ampliamente hoy por su robustez y estabilidad. Sin embargo, presentan problemas de seguridad debido al uso de patógenos y, en muchos casos, no tienen una composición definida (Sousa et al., 2021). Para entregar vacunas efectivas, precisas y consistentes, es importante utilizar equipos, instalaciones y procedimientos que cumplan con buenas prácticas de fabricación. Sin embargo, esto es costoso y difícil de implementar a gran escala. Por tanto, son necesarios nuevos

enfoques de tecnología de vacunas para mejorar nuestra respuesta a los brotes y permitir la vacunación en todo el mundo (Sousa et al., 2021).

2.3.1. Vacunas de ADNp

Las vacunas de ADN surgen como una estrategia prometedora para la prevención y terapia de numerosas enfermedades, ya que están diseñadas para generar inmunidad mediada por células, en lugar de producir sólo anticuerpos neutralizantes como las vacunas convencionales (Hasson et al., 2015). Las vacunas de ADN tienen un costo de producción bajo en comparación con las vacunas de proteínas y una mayor estabilidad para el transporte y el almacenamiento (Lee et al., 2018). Las tecnologías de vacunas de ADN presentan una plataforma de vacuna alternativa prometedora que tiene el potencial de tratar muchas enfermedades, como el cáncer, la aterosclerosis y la diabetes (Kutzler & Weiner, 2008).

Actualmente se utiliza el ADNp como plataforma en la síntesis de ARNm para la producción de vacunas contra Covid-19. Las vacunas de ADN funcionan codificando antígenos proteicos en ADN, que luego se entregan a las células para la producción de proteínas específicas (Zhang et al., 2017). Las células presentadoras de antígenos (APC) procesan estas proteínas y las presentan a los linfocitos que son capaces de matar patógenos y células infectadas. Estos antígenos estimulan una respuesta inmunitaria que simula infecciones vivas y pueden inducir tanto inmunidad humoral específica de antígeno como mediada por células (Zhang et al., 2017). Las moléculas de ADN se translocan a través de la membrana nuclear, iniciando la transcripción de genes y la subsiguiente síntesis de las proteínas codificadas como se presenta en la Figura 9 (Lim et al., 2020).

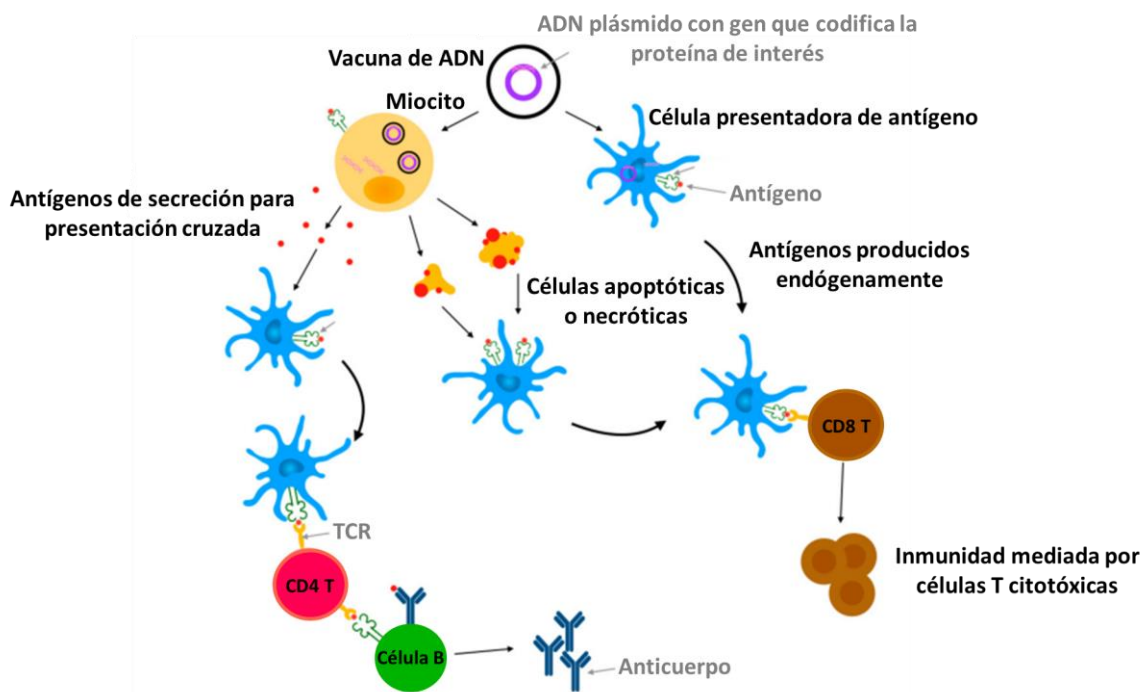


Figura 9: Mecanismo de la vacuna de ADN para la inducción de inmunidad humoral y mediada por células. Adaptado de Lim et al., 2020.

2.3.2. Vacunas de ARNm

La tecnología de ARNm presenta varias ventajas que la convierten en una alternativa atractiva frente a las vacunas tradicionales. A diferencia de las vacunas atenuadas o inactivadas, el ARNm es preciso ya que solo expresará un antígeno específico e inducirá una respuesta inmune dirigida. Además, promueve la respuesta inmunitaria humoral y celular e induce el sistema inmunológico innato (Sousa et al., 2021). La construcción de vacunas de ARNm requiere la inserción del antígeno codificado en un molde de ADN desde donde se transcribe el ARNm *in vitro*. De esta manera, se puede diseñar, producir *in vitro* y administrar cualquier secuencia deseada a cualquier tipo de célula (Maruggi et al., 2019). El ARNm se produce en un sistema libre de células y no utiliza materias primas de origen animal. Las impurezas derivadas de las células o las contaminaciones adventicias están, por tanto, ausentes, lo que hace que la fabricación de estas moléculas sea más segura (Pardi et al., 2018). Una materia prima integral para las terapias y vacunas basadas en ARNm es el ADN plasmídico (ADNp), que actúa como molde para

el ARNm. Después de fabricar el ADNp en *E. coli* basado en el proceso de fermentación, se cosecha, linealiza, purifica y utiliza como plantillas para el proceso de transcripción enzimática *in vitro*, produciendo la molécula de ARNm deseada (Cytiva, 2021). En la Figura 10 se presentan los pasos para el desarrollo del proceso de ARNm.

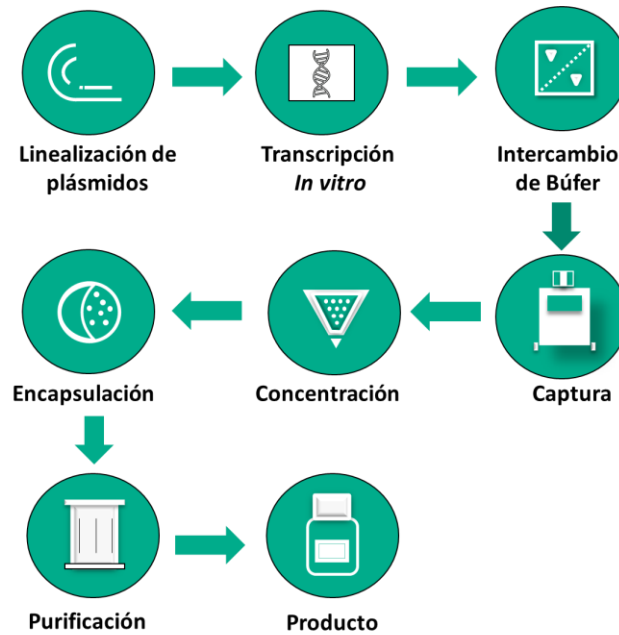


Figura 10. Pasos de desarrollo de procesos de ARNm. Adaptado de Cytiva, 2021

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

En los estudios se utilizó la cepa *E. coli* hospedera del plásmido PVAX1-NH36.

Para el proceso de fermentación se utilizó medio Terrific Broth (TB) el cual es un medio rico en nutrientes, este consta de glicerol, levadura, triptona, fosfato monopotásico y fosfato dipotásico. También se agregó kanamicina para evitar contaminación en el cultivo.

Para el rompimiento celular se utilizaron los siguientes buffers:

Buffer de resuspensión: se utiliza para resuspender las células, este se compone de glucosa (50 mM), Tris-HCl (25 mM) y EDTA (10 mM).

Buffer de resuspensión para el molino: se utiliza para resuspender las células en la lisis mecánica, consta de Tris-HCl (25 mM) y EDTA (10 mM, pH = 8).

Buffer de lisis alcalina: se compone de NaOH (0.2 M) y SDS (1%, pH= 8). Este buffer produce la ruptura celular, permitiendo que el plásmido quede expuesto para su posterior recuperación.

Buffer de neutralización: se utiliza para evitar la desnaturalización del plásmido causada por la ruptura celular. Consta de acetato de potasio y ácido acético glacial.

3.2. Equipos

Para el procedimiento se requiere trabajar con medios estériles, para ello se utiliza la autoclave The Hirayama HVE-50 que se presenta en la Figura 11.



Figura 11. The Hirayama HVE-50 autoclave sterilizer.

Para medir la densidad óptica en los cultivos se utilizó un espectrofotómetro UV Thermo Scientific como el mostrado en la Figura 12.



Figura 12. Espectrofotómetro UV Thermo Scientific

Al término del cultivo se recupera la biomasa por medio de una centrifuga BioFuge Stratos Thermo Fisher Scientific como la que se muestra en la Figura 13.



Figura 13. Centrifuga BioFuge Stratos Thermo Fisher Scientific.

Para realizar la lisis por molienda se utiliza un Molino mezclador Retsch como el que se presenta en la Figura 14.



Figura 14. Molino mezclador Retsch MM 400

Para clarificar lisado mecánico se utilizaron filtros Sartoclear de lecho profundo a base de celulosa, con tamaños de poro de 4 μm , 8 μm , 1.2 μm y 0.65 μm como los que se muestran en la Figura 15.



Figura 15. Filtros Sartoclear, con tamaños de poro de 4 μm , 8 μm , 1.2 μm y 0.65 μm .

En el análisis de muestras mediante turbidez de algunas etapas del proceso, se utilizó el turbidímetro Oakton T-100 como el que se muestra en la Figura 16.



Figura 16. Turbidímetro Oakton T-100

La alimentación para la filtración en lecho profundo fue suministrada por una bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex L/X como la que se presenta en la Figura 17.



Figura 17. Bomba peristáltica Cole-Parmer Masterflex L/X.

Un volumen de lisado mecánico se clarifica por ultrafiltración tangencial en un sistema de filtración con flujo tangencial KrosFlo Research como el mostrado en la Figura 18.



Figura 18. Sistema de filtración tangencial KrosFlo Research II

Los análisis de electroforesis se realizaron en una cámara horizontal de electroforesis GT Minigel Casting System, se utilizó el equipo MultiDoc Digital System, Trans-UV de Biorad. Figura 19.



Figura 19. MultiDoc Digital System

Para determinar la concentración del ADNp se utilizó cromatografía de alta resolución en una columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC). Se utilizó una columna HIC Source 15 PHE de 0.46 x 10 cm acoplada al sistema Äkta Purifier 10-UPC de GE Healthcare, Figura 20.



Figura 20. Cromatógrafo Äkta Purifier 10-UPC de GE Healthcare

3.3. Metodología

3.3.1 Fermentación

La cepa *E. coli* hospedera del plásmido pVAX1-NH36 fue propagada con un medio de cultivo Terrific Broth (TB), el cual es un medio rico en nutrientes para que la bacteria crezca, este consta de 13 g de glicerol, 24 g de levadura, 17.143 g de triptona, 2.31 g de fosfato monopotásico y 12.54 g de fosfato dipotásico.

Una vez preparado el medio se vertió en un matraz y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos en la autoclave. Por consiguiente, el medio de cultivo se dejó enfriar hasta que este alcanzo una temperatura manejable y se le agrego kanamicina en un ambiente estéril para evitar el crecimiento de bacterias no deseadas. Se utilizó kanamicina a concentración de 50 mg/mL en proporción de 1 µL por cada mL de medio.

El cultivo se realizó a 37°C y 300 rpm en una incubadora agitada alrededor de 12 horas. Se llevó a cabo un monitoreo a cada hora, midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro para obtener una curva de crecimiento.

Se utilizó la ecuación logística Ec. (1) (Shuler & Kargi, 1991) para modelar el comportamiento del crecimiento celular y determinar los parámetros de crecimiento de la bacteria *E. coli*.

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

Donde:

X = Concentración celular [g/L]

X_∞ = Concentración celular máxima [g/L]

X_0 = Concentración celular inicial [g/L]

t = Tiempo [h]

c = Coeficiente de capacidad de carga [h^{-1}]

Y se utilizó la Ec. (2) (Shuler & Kargi, 1991) para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ):

$$\mu = c \left(1 - \frac{X}{X_{\infty}} \right) \quad (2)$$

3.3.2 Cosecha celular

Al término del cultivo se recuperó la biomasa por medio de una Centrifuga BioFuge Stratos esto se llevó a cabo por 15 minutos a 4°C y 3500 g. La biomasa obtenida se dividió en 2 partes: una para ser sometida a lisis por medio de molienda y la otra para ser sometida a lisis alcalina.

3.3.3 Lisis alcalina

Se utilizó una proporción de 8 mL de buffer por gramo de célula húmeda. Primeramente, la biomasa se resuspendió en buffer de resuspensión (pH=8, Tris 25 mM, Glucosa 50mM y EDTA 10 mM). Enseguida se agregó buffer de lisis (Hidróxido de sodio 0.2 M y 1% de SDS) el cual ayuda con la desintegración de la pared y la membrana celular dejando como resultado el lisado alcalino, la suspensión se agitó suavemente y se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como último paso se añadió solución de buffer neutralizante (pH = 5.5, acetato de potasio 3M) la mezcla se resguardo durante 15 minutos a temperatura de 0 a 4 °C, para evitar la desnaturalización del plásmido y así obtener el lisado neutralizado. Al finalizar los pasos anteriores el lisado fue centrifugado dos veces por 30 minutos a 4°C y 12000 g. Posteriormente el lisado clarificado se filtró utilizando un filtro de 45 μ m para así desechar los restos celulares.

3.3.4 Cinética de ruptura celular

Se determino la liberación de ADNp en distintos momentos de una molienda con perlas. Se utilizo una concentración celular de 20 g/L, una velocidad de agitación de 15 Hz y perlas de zirconio de (200-400) μ m.

La liberación de ADNp se describió con la cinética de primer orden que se muestra en la Ec. (3) (Tejeda et al., 2011):

$$V_M \frac{dR}{dt} = k(R_m - R)V_M \quad (3)$$

Donde:

V_M = Volumen de suspensión celular [mL]

R_m = Concentración máxima de ADNp [mg ADNp/ g dcw]

R = Concentración de ADNp en un tiempo t [mg ADNp/ g dcw]

t = Tiempo de proceso [min]

k = Constante de velocidad específica para el proceso [min^{-1}]

La integración de la Ec. (3) da como resultado la Ec. (4)

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

Los parámetros de concentración máxima, R_m , y la constante de velocidad específica, k , se determinaron a partir de datos experimentales utilizando la función *nlinfit* en el programa Matlab.

3.3.5. Lisis mecánica

Para realizar la lisis por molienda se preparó una suspensión celular de concentración celular de 20 g/L con biomasa y buffer de resuspensión (pH=8, Tris 25 mM y EDTA 10 mM). Se utilizó un molino mezclador Retsch y perlas de zirconio (OPS Diagnostics) con un tamaño entre 200 y 400 micras. La velocidad de agitación fue de 30 Hz y el tiempo de molienda fue de 4 minutos por muestra, con una relación de 0.5 mL de perlas por 1 mL de solución. En cada cámara de acero inoxidable de 50 mL se colocaron 20 mL de suspensión celular y 10 mL de perlas para someter la biomasa a una agitación y producir así la lisis celular. Se realizaron varias corridas hasta acumular un volumen de 150 mL de lisado mecánico.

3.3.6. Filtración de lecho profundo

Antes de llevar a cabo la etapa de la ultrafiltración tangencial, se realizó una filtración previa con el fin de remover restos celulares del lisado mecánico. Se probaron distintos filtros de lecho profundo con el fin de encontrar el que brindara una mayor concentración de plásmido y una menor cantidad de impurezas en el permeado. Los filtros utilizados son a base de celulosa y cuentan con un área de filtración de 25 cm² cada uno. Con tamaño de poro de 0.65, 1.2, 4 y 8 μm respectivamente.

El procedimiento empleado con cada uno de los filtros se muestra en la Figura 21. Principalmente se adicionó un volumen de lisado mecánico en un vaso de precipitado, este volumen de lisado se hizo pasar a través de un filtro de lecho profundo con ayuda de una bomba peristáltica (Cole-Parmer Masterflex L/X) a un flujo constante de 4 mL/min. A diferentes tiempos se tomaron muestras del permeado para sus posteriores análisis. El proceso culminó una vez que se terminó el volumen de alimentación.

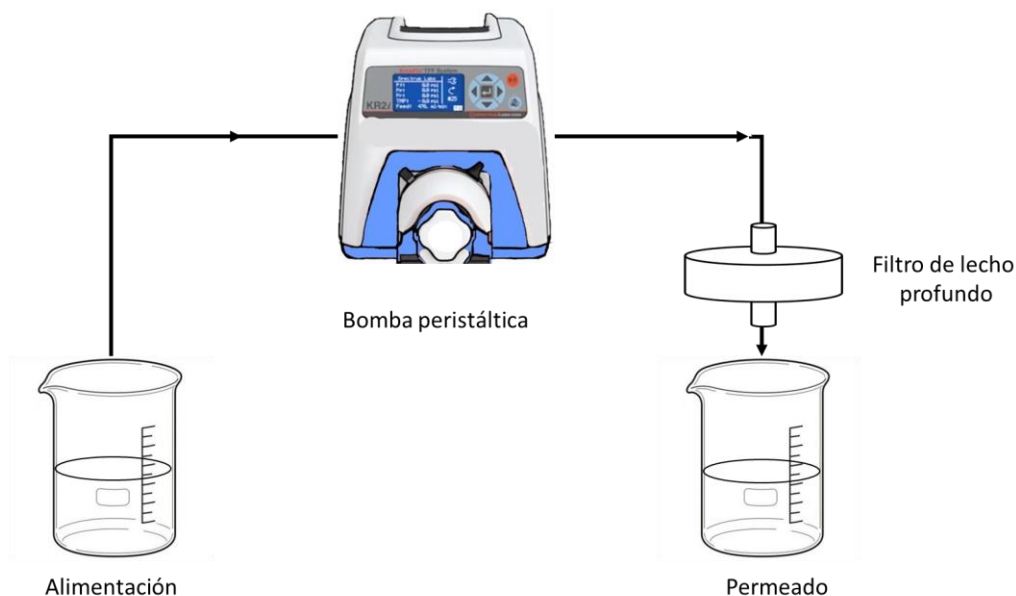


Figura 21. Filtración por lecho profundo

3.3.7. Filtración con tierra de diatomeas

Se clarificó un volumen de lisado mecánico utilizando tierra de diatomeas, esto con el fin de remover restos celulares del lisado antes de llevar a cabo la etapa de ultrafiltración tangencial. Se utilizó un kit de filtración (Sartoclear) como el que se presenta en la Figura 22, este consta de una unidad de filtración y tierra de diatomeas de alta pureza con una tasa de retención $0.22\ \mu\text{m}$. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se emplearon $0.04\ \text{g}$ de tierra de diatomeas por cada mililitro de lisado.

El procedimiento empleado para filtrar se efectuó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Principalmente, se ensambló la unidad de filtración. Por consiguiente, se conectó la unidad de filtración a una bomba de vacío (Millipore). En un contenedor por separado se mezclaron $5.2\ \text{g}$ de tierra de diatomeas con $130\ \text{mL}$ de lisado mecánico (siguiendo la relación de utilizar $0.04\ \text{g}$ de tierra de diatomeas por cada mililitro de lisado). Una vez que la mezcla se homogeneizó se vertió a la unidad de filtración y se encendió la bomba de vacío. El tiempo de filtrado fue de 10 minutos. A diferentes tiempos se tomaron muestras del permeado para sus posteriores análisis.



Figura 22. Filtro Sartoclear con tierra de diatomeas.

Corrida 1: Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación.

En esta corrida se buscó analizar el efecto que tiene el flujo de alimentación en el permeado. El procedimiento empleado fue el siguiente: se alimentaron 120 mL de lisado clarificado en el sistema de filtración de flujo tangencial. Se utilizaron los siguientes flujos de alimentación: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL/min. Se tomó una muestra de permeado para cada flujo para posteriormente realizar un análisis por electroforesis en gel de agarosa.

Corrida 2: Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución.

Se estudio el efecto de diluir el lisado. Desde esta corrida se acondiciono una segunda bomba peristáltica (Cole-Parmer Masterflex L/X) al sistema para controlar el flujo de permeado. El procedimiento empleado fue el siguiente: se mezclaron 60 mL de lisado clarificado con 60 mL de búfer Tris 10 mM. Por consiguiente, esta mezcla se alimentó al sistema de filtración de flujo tangencial. Se utilizó un flujo constante de alimentación de 50 mL/min y un flujo de permeado de 5 mL/min. Se tomaron muestras de permeados a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos para realizar posteriormente un análisis por cromatografía líquida de alta resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).

Corrida 3: Ultrafiltración tangencial por lote con dilución.

En esta corrida se estudió el efecto de la dilución sin recirculación. Se utilizó un flujo constante de alimentación de 50 mL/min, un flujo de permeado de 5 mL/min y una presión transmembrana de 3 psi. El procedimiento empleado fue el siguiente: se mezclaron 60 mL de lisado clarificado con 60 mL de búfer tris 10 mM. Por consiguiente, esta mezcla se alimentó al sistema de filtración de flujo tangencial. Por ende, se filtró todo el volumen de alimentación. En un contenedor se recolecto el permeado y en otro contenedor se recolecto el retenido. El volumen de retenido que fue obtenido se mezcló con un mismo volumen de búfer Tris. Esta mezcla se volvió a alimentar al sistema de filtración tangencial. Este proceso se repitió 3 veces. Por cada lavado se tomaron muestras de permeados y de retenidos para realizar posteriormente un análisis por

cromatografía líquida de alta resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).

Corrida 4: Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.

Se alimentaron 120 mL de lisado clarificado en el sistema de filtración de flujo tangencial. Se utilizó un flujo constante de alimentación de 50 mL/min, un flujo de permeado de 5 mL/min y una presión transmembrana de 3 psi. El procedimiento empleado fue el siguiente: primeramente, se dejó recircular el volumen de alimentación durante 10 minutos, transcurrido este tiempo, se extrajeron 20 mL de permeado y al mismo tiempo se agregaron al tanque de alimentación 20 mL de búfer Tris 10 mM. Es decir, el volumen de permeado que fue extraído fue devuelto al sistema con un mismo volumen de búfer. Esta operación se repitió 8 veces. Por cada corrida se tomaron muestras de permeados y retenidos respectivamente para sus posteriores análisis por electroforesis en gel de agarosa y por cromatografía líquida de alta resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).

3.3.9. Determinación de la calidad y cantidad de plásmido

Se analizó la calidad del plásmido en los lisados por electroforesis y la concentración de plásmido por cromatografía de interacción hidrofóbica. También se realizaron análisis de turbidez a los lisados.

Análisis de turbidez

Para medir la turbidez se utilizó un turbidímetro Oakton T-100. La turbidez es reportada en unidades nefelométricas de turbidez (por sus siglas en inglés NTU). El procedimiento empleado para medir la turbidez fue el siguiente: primeramente, se calibró el turbidímetro utilizando las cuatro soluciones estándar que ya vienen proporcionadas con el equipo. Una vez calibrado el equipo, se tomaron 10 mL de la muestra a analizar y se colocaron dentro de uno de los viales con ayuda de una micropipeta. Se cuidó que el vial estuviera limpio y siempre se manejó por la tapa. Por consiguiente, el vial se colocó dentro del muestreador y se oprimió la tecla READ, en consecuencia, se mostró el valor medido.

Se midió la turbidez a lisados mecánicos clarificados con filtros de lecho profundo y también al lisado clarificado con tierra de diatomeas.

Electroforesis en gel de agarosa

Para evaluar la calidad del plásmido en los lisados se llevaron a cabo electroforesis en gel de agarosa. El procedimiento que se empleó es el siguiente: principalmente se preparó una solución de agarosa al 0.8% disuelta en buffer TAE 1x (Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM con pH=7.6), se diluyó y se calentó para disolver. Por consiguiente, se dejó enfriar un poco hasta que alcanzó una temperatura manejable y se vació a la cámara de electroforesis evitando que quedaran burbujas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para dejar solidificar. El espesor del gel alcanzó aproximadamente 1 cm de grosor.

Una vez que solidificó el gel se cubrió con buffer TAE 1X (pH=7.6), llenando la cámara hasta cubrir el gel. Enseguida se procedió a llenar los pozos con las muestras a analizar. En el primer pozo se depositó 5 μ L de marcador de peso molecular (DNA Ladder, Sigma-Aldrich) y 5 μ L de tinte. Los demás pozos fueron llenados con muestras de lisados (estos últimos se llenaron con 15 μ L de muestra y 3 μ L de tinte). Todo el procedimiento se realizó con puntas de pipeta estériles.

Después se encendió la cámara y se llevó a cabo la electroforesis durante 110 minutos a 60 volts y 70 Amperes. Una vez que terminó la electroforesis se reveló el gel, para ello el gel se colocó en un recipiente y se sumergió en una solución de bromuro de etidio al 0.5 μ g/mL durante 24 horas. Para finalizar se visualizaron los fragmentes de ADNp para ello el gel se introdujo a una cámara de rayos UV y se sacaron fotografías.

Cromatografía de interacción hidrofóbica de alta resolución

Para determinar la concentración del ADNp se utilizó cromatografía de alta resolución en una columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC). Se utilizó una columna HIC Source 15 PHE de 0.46 x 10 cm acoplada al sistema Äkta Purifier. Para llevar a cabo este procedimiento se adaptó la metodología descrita por (Diogo et al., 2003). Primeramente, para equilibrar la columna fue requerida una solución de 1.5 M de sulfato

de amonio en Tris (10 mM/HCL, pH=8). Enseguida un volumen de 30 μ L de una muestra diluida en el mismo buffer de equilibrio (1:5) fue inyectada por el automuestrador con un flujo de 1 mL/min. Después de este paso la concentración de sulfato de amonio es disminuida a cero, eluyendo la columna con buffer Tris (10 mM/HCL, pH=8) durante 0.5 minutos para eluir las especies absorbidas. Después de este tiempo la concentración de sulfato de amonio fue incrementado para equilibrar nuevamente la columna por 5.5 min. La absorbancia fue monitoreada a 260 nm. En los cromatogramas de muestras, en general se obtienen 4 picos: el pico a los 0.68 minutos corresponde a ADNp total; el pico a los 3.58 minutos corresponde a RNA de alto peso molecular y ADNg y los otros picos (1.28 y 1.75 minutos) se atribuyen a RNA de bajo peso molecular y proteínas remanentes, de acuerdo con el estudio realizado por (Diogo et al., 2003). El ADNp se cuantificó usando una curva de calibración construida con estándares del plásmido purificado preparado en el rango de concentración de 10-50 μ g/mL la cual se presenta en el Anexo A. Para calcular la concentración de ADNp en cada muestra, el área de los blancos correspondientes se restó del área total de todos los picos en el cromatograma. El grado de pureza de HPLC del ADNp se definió como el porcentaje del plásmido en el área total.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cinética de crecimiento celular y velocidad específica de crecimiento.

Se llevó a cabo un monitoreo a cada hora del cultivo de *E. coli* y se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro para obtener una curva de crecimiento. En la Figura 24 se muestran los datos experimentales de DO en función del tiempo, la cinética de crecimiento celular fue determinada por la Ec. (1) y la velocidad específica de crecimiento fue determinada por la Ec. (2). El monitoreo se llevó cabo durante 10 horas y se alcanzó una $DO_{600} = 13.97$. Para el modelo logístico: $c = 0.55 \text{ h}^{-1}$ y $X_{\infty} = 16$.

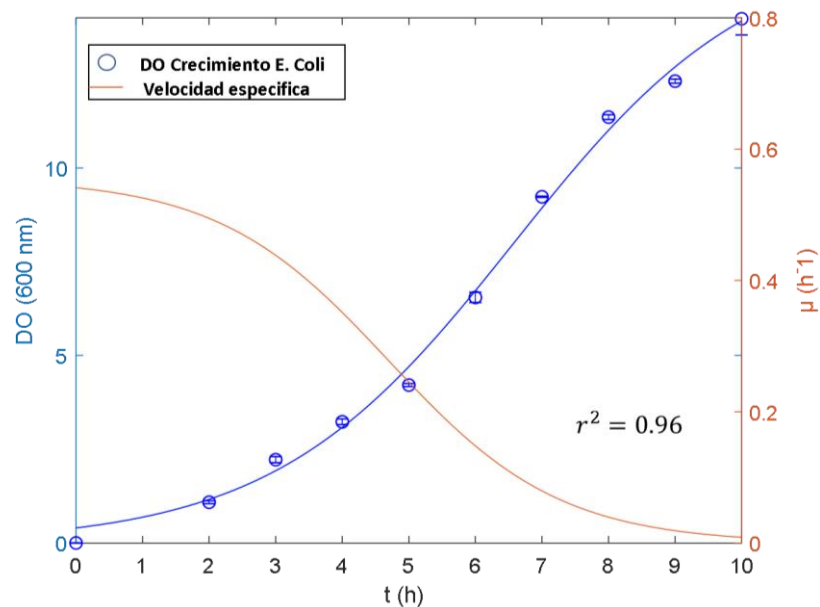


Figura 24. Cinética de crecimiento celular y velocidad específica de crecimiento.

4.2. Cinética de ruptura celular

En la Figura 25 se presenta una cinética de ruptura celular. Se utilizó una concentración celular de 20 g/L, una velocidad de agitación de 15 Hz y perlas de zirconio de (200-400) μm .

Se graficaron los datos experimentales y el modelo utilizando la Ec. (4). Resultando la concentración máxima liberada (R_m) = 923.12 ($\mu\text{g ADNp/gdcw}$) y la constante de velocidad (k) = 0.15 min^{-1} .

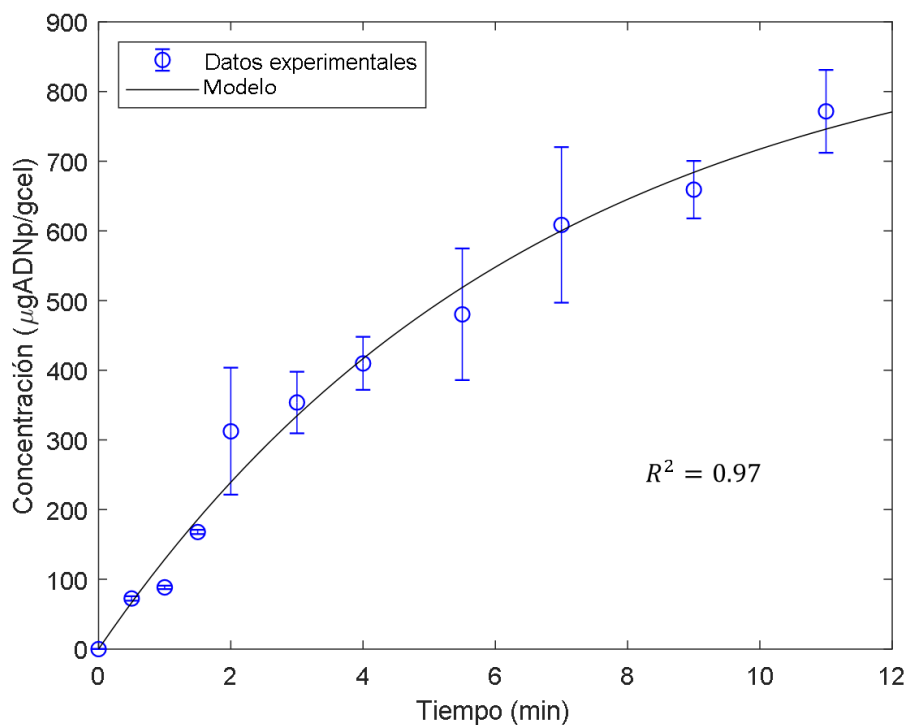


Figura 25. Cinética de ruptura celular. (Concentración celular 20 g/L, velocidad de agitación de 15 Hz, $k=0.15 \text{ min}^{-1}$).

4.3. Comparación de filtros para clarificar el lisado mecánico

En la Figura 26 se presenta una electroforesis en gel de agarosa con lisados clarificados mediante filtros de lecho profundo con tamaño de poro de 0.65, 1.2, 4 y 8 μm respectivamente. También se muestra un lisado clarificado mediante tierra de diatomeas. En el gel se observa la presencia de ADNp superenrollado y ADNp circular abierto en todas las muestras de los permeados. Por lo que se confirma la presencia de plásmido al clarificar un lisado con cualquiera de los filtros utilizados en esta investigación.

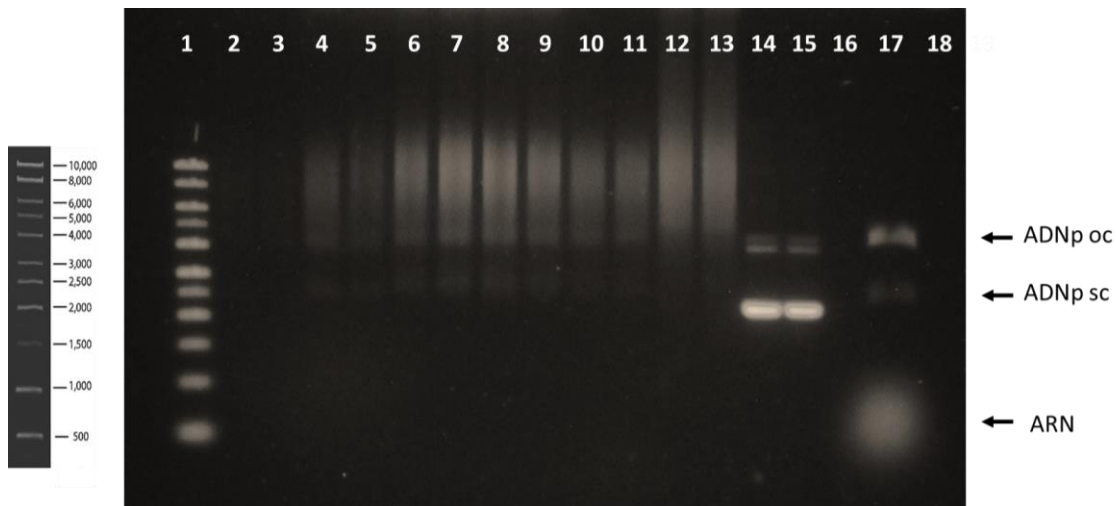


Figura 26: Electroforesis de muestras de permeados provenientes de lecho profundo y tierra de diatomeas. Línea 1 Ladder (SIGMA), (líneas 4 y 5) filtro 8 μm , (líneas 6 y 7) filtro 1.2 μm , (líneas 8 y 9) filtro 0.65 μm , (líneas 10 y 11) tierras de diatomeas (0.22 μm), (líneas 12 y 13) lisado centrifugado, (líneas 14 y 15) purificado, (línea 17) lisis alcalina.

En la Figura 27 se presentan cromatogramas de lisados que fueron clarificados mediante los filtros de lecho profundo mencionados anteriormente y también se presenta el lisado clarificado mediante tierra de diatomeas. Se observa que todos los lisados clarificados presentan ADNp. De acuerdo con la Tabla 4 el filtro que presentó una mayor recuperación de ADNp fue el filtro de lecho profundo con tamaño de poro de 1.2 μm , presentando una recuperación del 87.5%, además se observó que el lisado clarificado con este filtro presentó una disminución significativa en la turbidez en comparación con el lisado mecánico. Por lo que para las corridas posteriores con ultrafiltración tangencial se empleó este filtro para clarificar el lisado mecánico.

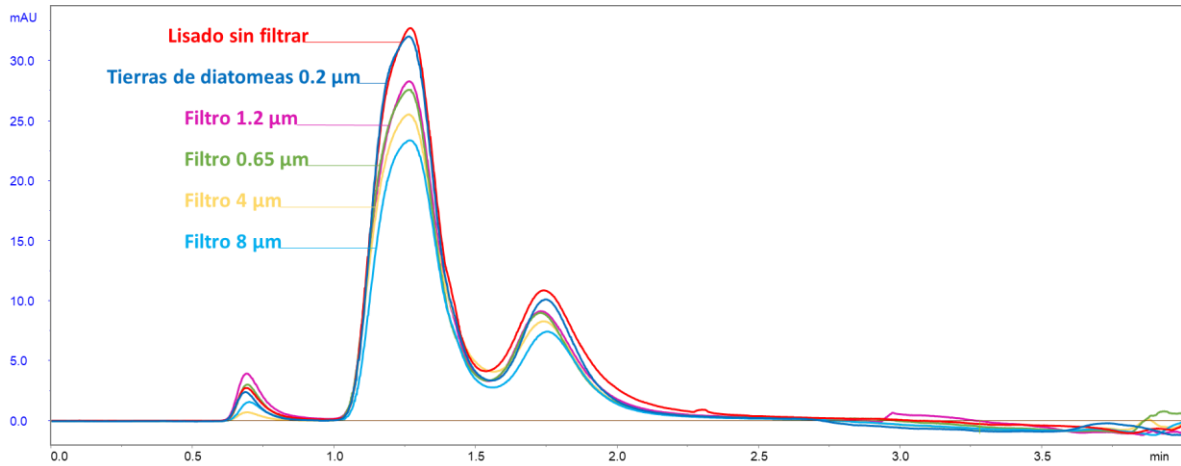


Figura 27: Cromatogramas de lisados mecánicos clarificados mediante filtración en lecho profundo y tierra de diatomeas.

Tabla 4. Comparación de lisados mecánicos clarificados mediante filtración en lecho profundo y tierra de diatomeas.

	Área (mAU-min)	Concentración ADNp (µg/mL)	Masa ADNp (µg)	Recuperación ADNp %	Turbidez NTU
Lisado mecánico	0.3135	24.18	1209.3	-	1490
Tierra de diatomeas	0.2553	19.70	591	49	3.46
Filtro 1.2 µm	0.4576	35.30	1059	87.5	482
Filtro 0.65 µm	0.3330	25.69	770.7	64	264
Filtro 4 µm	0.0824	6.36	190.8	16	522
Filtro 8 µm	0.1829	14.14	432	35	689

4.4. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación.

Esta corrida fue la primera que se llevó a cabo en el sistema de filtración de flujo tangencial utilizando una membrana de ultrafiltración de 750 kDa. Se buscó analizar el efecto del flujo de alimentación en el permeado. Para ello se variaron los flujos de alimentación utilizando los siguientes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL/min. Se tomó una muestra de permeado para cada flujo.

En la Figura 28 se observa el análisis por electroforesis de los permeados antes mencionados. En las líneas donde se depositaron las muestras de permeados no se observó la presencia de plásmido. Por lo que se concluyó que el plásmido no estaba fluyendo a la corriente de permeado como se esperaba. En la línea 12 se colocó una muestra de retenido, en ella si se observó la presencia de plásmido, con lo que se concluyó también que el plásmido se estaba quedando en la corriente del retenido.

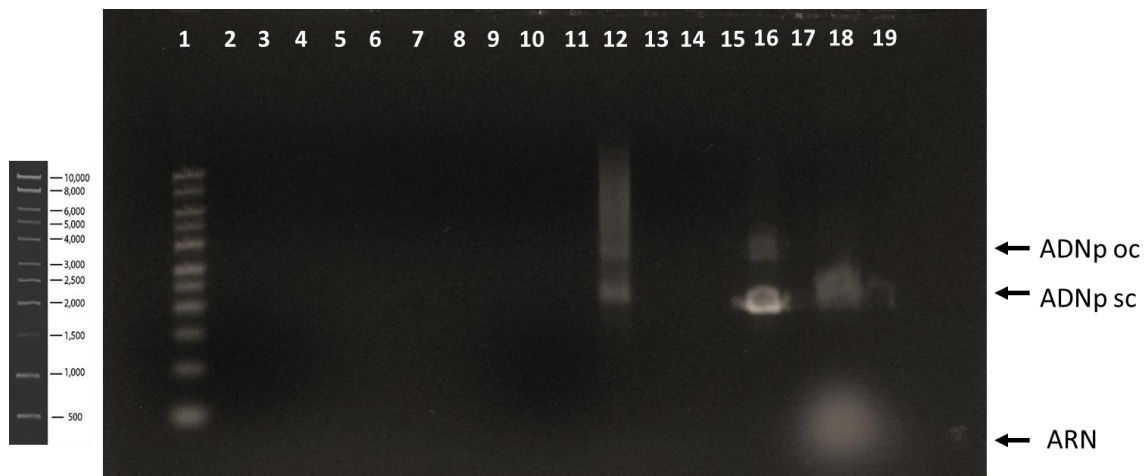


Figura 28: Electroforesis de muestras de permeados con distintos flujos de alimentación. (Línea 1) Ladder (SIGMA), (línea 2) flujo 5 mL/min, (línea 3) flujo 10 mL/min, (línea 4) flujo 15 mL/min, (línea 5) flujo 20 mL/min, (línea 6) flujo 25 mL/min, (línea 7) flujo 30 mL/min, (línea 8) flujo 35 mL/min, (línea 9) flujo 40 mL/min, (línea 10) flujo 45 mL/min, (línea 11) flujo 50 mL/min, (líneas 12) retenido final, (línea 16) purificado, (línea 18) lisis alcalina.

4.5. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución.

En esta corrida se optó por diluir el volumen de alimentación. Se mezcló lisado clarificado con búfer Tris 10 mM con una relación de volúmenes (1:1) esto antes de ser alimentado

al sistema de filtración de flujo tangencial. Se tomaron muestras de permeados a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. En la Figura 29 se presenta un análisis por cromatografía de los permeados tomados a distintos tiempos. Se observa la presencia de plásmido en la alimentación inicial. Sin embargo, en las muestras de los permeados no se presenta plásmido, solo se observa una ligera disminución en las impurezas. De acuerdo con el análisis de impurezas en los permeados, después de los 30 min, se disminuyó en un 14 % las impurezas, con respecto a la alimentación inicial (Tabla 5).

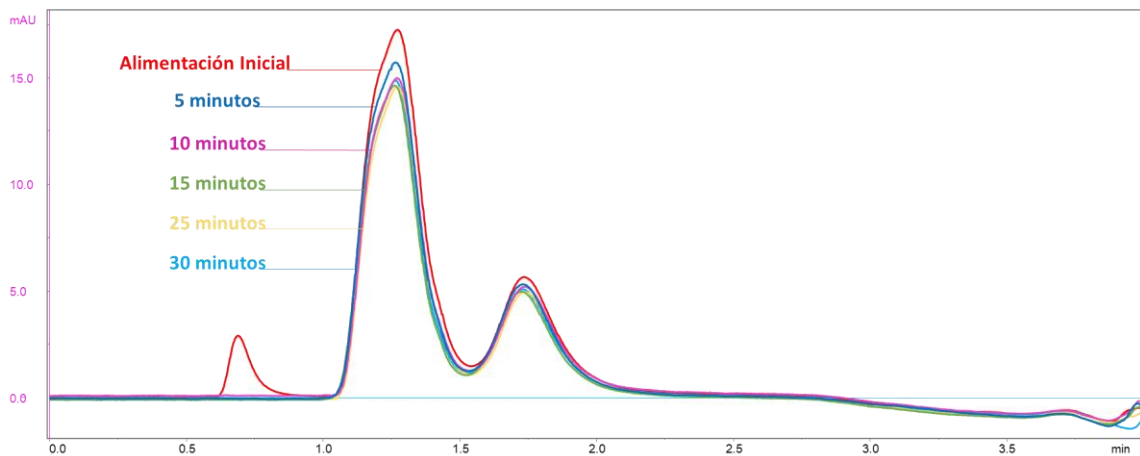


Figura 29: Cromatogramas de muestras de permeados tomados a distintos tiempos para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución.

Tabla 5. Análisis de muestras de permeados a distintos tiempos para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y dilución.

Muestra	Área impurezas (mAU-min)	Disminución de impurezas (%)
Alimentación inicial	5.83	-
Permeado inicial	5.23	10
Permeado final	4.9629	14

4.6. Ultrafiltración tangencial por lote con dilución.

En esta corrida se estudió el efecto de la dilución alimentándose un volumen de lisado clarificado y búfer Tris 10 mM al sistema de filtración de flujo tangencial. Se filtró todo el volumen de alimentación. Separando el permeado y el retenido. El volumen de retenido que fue obtenido se mezcló con un mismo volumen de búfer Tris. Esta mezcla alimentó al sistema de filtración tangencial, produciéndose así un lavado. Este proceso se repitió 3 veces. Para cada lavado se tomaron muestras de permeados y retenidos.

En la Figura 30 se presenta un análisis por cromatografía de los permeados tomados en cada lavado. Se observa la presencia de plásmido en la alimentación inicial. Sin embargo, en las muestras de permeados no se presenta plásmido, solo se observa una disminución en las impurezas. Las impurezas en el permeado final disminuyeron en un 72 % con respecto a la alimentación inicial después de llevarse a cabo los 3 lavados (Tabla 6). En la Figura 31 se presenta un análisis por cromatografía de los retenidos tomados en cada lavado. Se observa la presencia de plásmido tanto en la alimentación inicial como en los retenidos. La recuperación de ADNp en el retenido final fue del 81% con respecto a la alimentación inicial, (Tabla 7). Lo que confirmó que el plásmido se queda en la corriente de retenido.

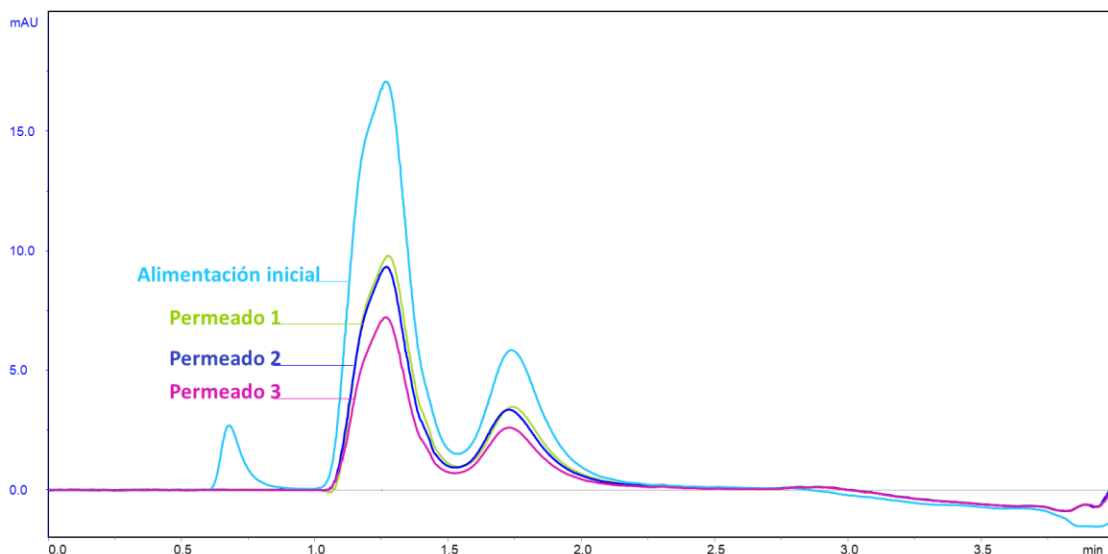


Figura 30: Cromatogramas de muestras de permeados tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.

Tabla 6. Análisis de muestras de permeados tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.

Muestra	Área impurezas (mAU-min)	Disminución de impurezas (%)
Alimentación inicial	5.9286	-
Permeado inicial	2.1442	64
Permeado final	1.6329	72

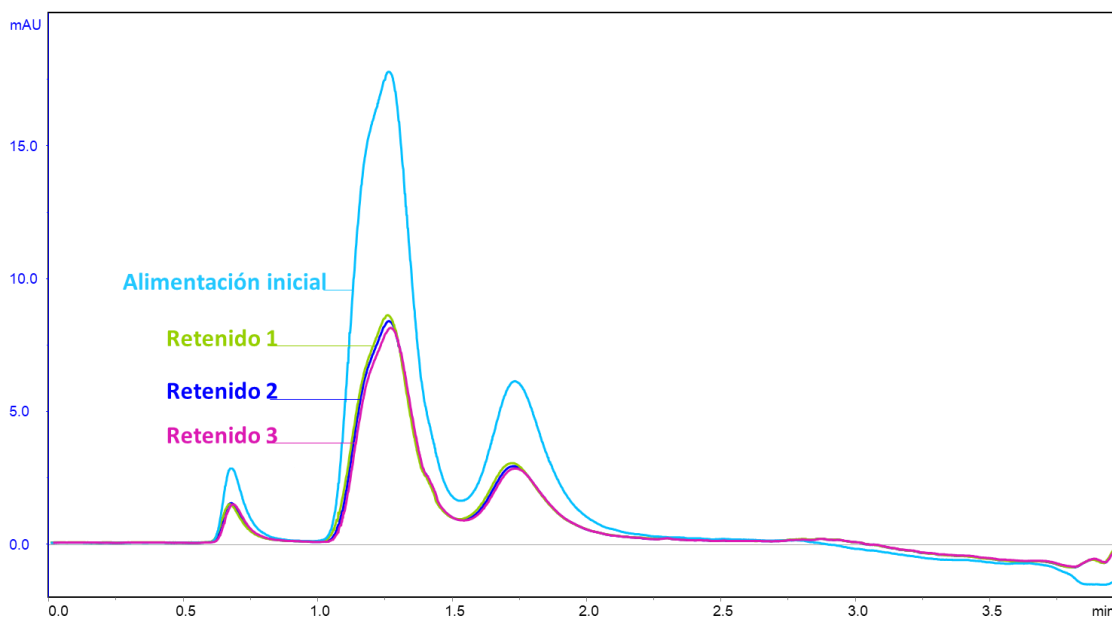
**Figura 31:** Cromatogramas de muestras de retenidos tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.

Tabla 7. Análisis de muestras de retenidos tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con dilución.

	Área (mAU-min)	Concentración ADNp (µg/mL)	Masa ADNp (µg)	Recuperación ADNp %
Alimentación inicial	0.2687	20.733	2487.963	-
Retenido inicial	0.1446	11.157	2209.167	89
Retenido final	0.147	11.343	2007.639	81

4.7. Ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.

En esta corrida se estudió el efecto de volumen de lavado. Se alimentaron 120 mL de lisado clarificado en el sistema de filtración de flujo tangencial. Primeramente, se dejó recircular el volumen de alimentación durante 10 minutos, transcurrido este tiempo, se extrajeron 20 mL de permeado y al mismo tiempo se agregaron al tanque de alimentación 20 mL de búfer Tris 10 mM. Es decir, el volumen de permeado que fue extraído fue devuelto al sistema con un mismo volumen de búfer Tris 10 mM. Esta operación se repitió 8 veces. Por cada corrida se tomaron muestras de permeados y retenidos respectivamente.

Con base en el estudio por electroforesis mostrado en la Figura 32, se confirma la presencia de plásmido superenrollado en los retenidos y en la alimentación inicial. Sin embargo, en los permeados no se presentó plásmido. En el gel no se observa una disminución en las impurezas, no obstante, de acuerdo con la Tabla 8 en la que se llevó a cabo un análisis de concentración se confirma que la cantidad de masa de ADNp presente en los retenidos permaneció casi igual durante toda la corrida y se nota una disminución en las impurezas. Este comportamiento también se observa en la Figura 33 donde se muestran cromatogramas de muestras de retenidos tomados en cada volumen de lavado.

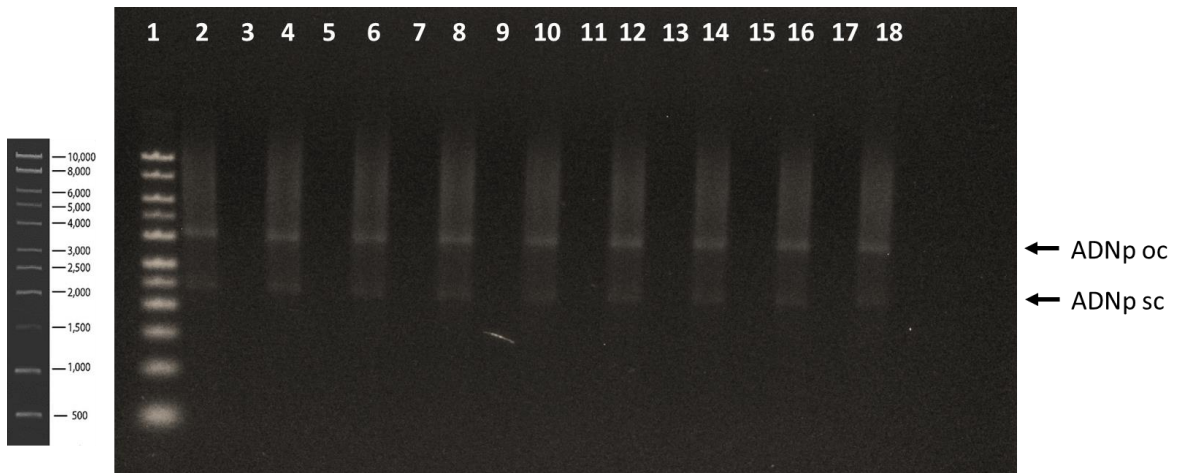


Figura 32: Permeados y retenidos de una ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración. (Línea 1) Ladder (SIGMA); (línea 2) alimentación inicial; (líneas 4,6,8,10,12,14,16 y 18) retenidos; (líneas 3,5,7,9,11,13,15 y 17) permeados.

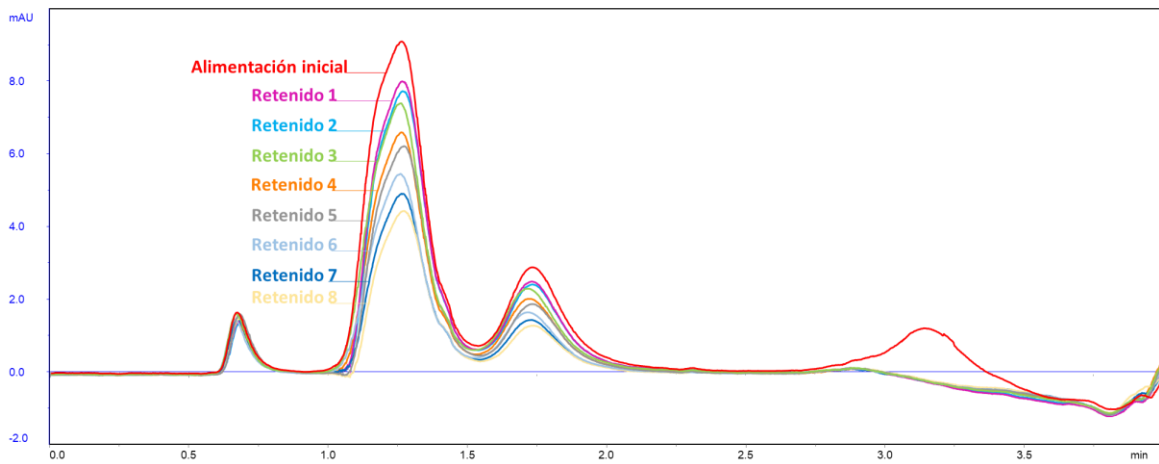


Figura 33: Cromatogramas de muestras de retenidos tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.

Tabla 8. Análisis de muestras de retenidos tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.

	Área (mAU-min)	Concentración ADNp ($\mu\text{g/mL}$)	Masa ADNp (μg)	Recuperación ADNp %
Alimentación inicial	0.150	11.62	1394	-
Retenido inicial	0.149	11.56	1388	98
Retenido final	0.147	11.38	1367	97

En la Figura 34 se presentan cromatogramas de muestras de permeados tomados para cada volumen de lavado. De acuerdo con el análisis de cromatografía no se presenta plásmido en los permeados, pero si se observa una disminución en las impurezas. De acuerdo con la Tabla 9 las impurezas en el permeado final disminuyeron en un 65 % con respecto a la alimentación inicial después de llevarse a cabo 8 lavados.

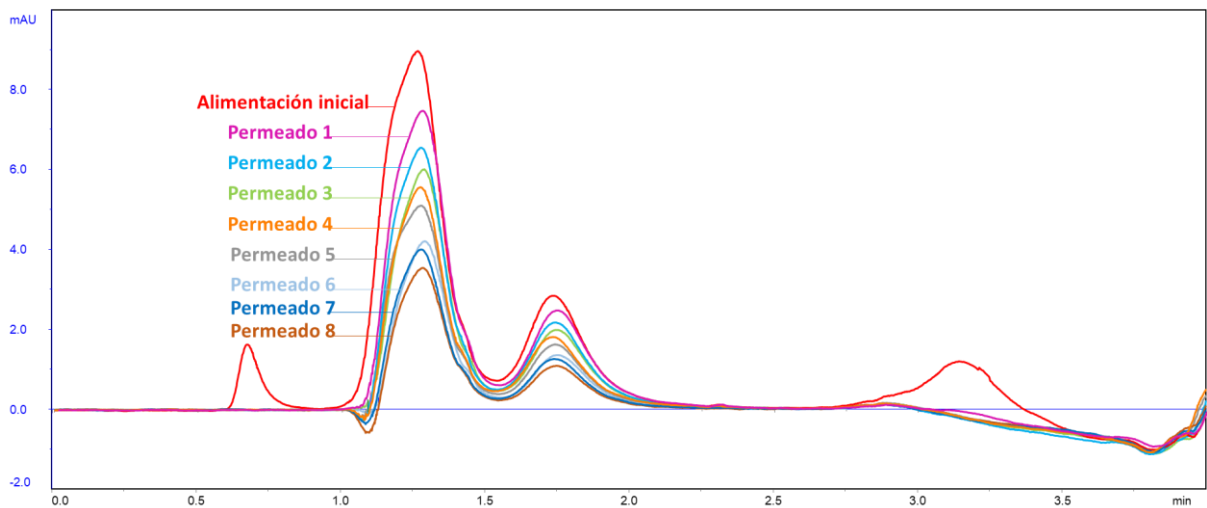
**Figura 34:** Cromatogramas de muestras de permeados tomados en cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.

Tabla 9. Análisis de muestras de permeados tomados para cada volumen de lavado para la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración.

Muestra	Área impurezas (mAU-min)	Disminución de impurezas (%)
Alimentación inicial	2.90	-
Permeado inicial	2.85	2
Permeado final	1.00	65

En la Figura 35 se presentan los cromatogramas de un lisado alcalino y el retenido final obtenido de la corrida de ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración. En análisis por cromatografía se observa que el lisado alcalino y el retenido final presentan una cantidad similar de ADNp, sin embargo, el lisado alcalino presenta una mayor cantidad de impurezas en comparación con el retenido final. Es importante aclarar que el lisado alcalino y el retenido final de la clarificación de un lisado mecánico, no provienen del mismo cultivo de *E. coli*, solo es para fines comparativos. En la Tabla 10 se presenta que el retenido final presenta una pureza del 9.5 % y el lisado alcalino presenta una pureza de 4.5%.

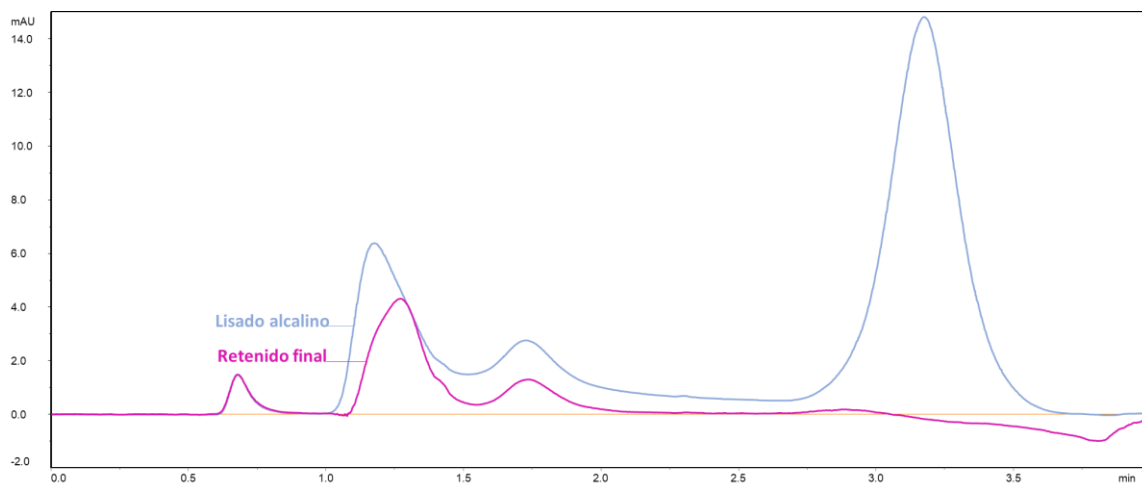
**Figura 35:** Cromatogramas de un lisado alcalino y el retenido final.

Tabla 10. Análisis de un lisado alcalino y el retenido final.

	Área de ADNp (mAU-min)	Área impurezas	Pureza (%)
Lisado alcalino	0.141	3.009	4.5
Retenido final	0.147	1.323	9.5

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En la clarificación por medio de lecho profundo se logró tener una buena recuperación de plásmido. Se probaron filtros con distintos tamaños de poro y de acuerdo con los análisis de concentración, el filtro que brindó una mayor recuperación de plásmido fue uno a base de celulosa con un tamaño de poro de 1.2 μm .

La clarificación mediante tierra de diatomeas se produjo un permeado con apariencia más clara en comparación con los filtros de lecho profundo, sin embargo, en los análisis de concentración los lisados clarificados mediante las tierras resultaron con una mayor cantidad de impurezas en contraste con los lisados que fueron clarificados mediante los filtros de lecho profundo. De acuerdo con los análisis de turbidez, se lograron disminuir los sólidos en suspensión en los permeados obtenidos en las filtraciones de lecho profundo y en la filtración mediante tierra de diatomeas.

En las corridas de la ultrafiltración tangencial efectuadas con dilución se obtuvo plásmido en la corriente de retenido.

En la ultrafiltración tangencial por lote con recirculación y diafiltración, se realizaron varias corridas y de acuerdo con los análisis la masa del plásmido en los retenidos se mantuvo casi igual a lo largo del experimento. Y en los análisis de los permeados se notó una disminución en las impurezas en un 65% con respecto a la alimentación inicial sin salida de plásmido.

Al momento de comparar un lisado alcalino centrifugado con un lisado mecánico clarificado por ultrafiltración resultó que este último presenta menos impurezas, lo que sugiere la ultrafiltración como un método viable de clarificación.

Se concluye que el plásmido no logra transitar al permeado posiblemente la membrana se tapa con fragmentos de ADN_g, por lo que el plásmido se mantiene en los retenidos, sin embargo, se logra la disminución de impurezas en los permeados.

El resultado de esta investigación ha sido un avance en la estandarización de la clarificación de lisados mecánicos por medio de ultrafiltración tangencial. Es necesario profundizar en los estudios, así como probar más filtros y membranas.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda estudiar las condiciones de molienda que produzcan menos fragmentación en el ADN_g, ya que si el ADN_g no se fragmenta se podría separar del ADN_p al tener este un menor tamaño.

Se recomienda seguir probando filtros de lecho profundo para encontrar un filtro indicado con el que se obtenga un permeado con mayor recuperación de plásmido y menor cantidad de impurezas en comparación con los utilizados en esta investigación.

Así mismo se podría reducir el ADN_g del lisado mecánico utilizando una membrana con un tamaño de corte más grande antes de llevar a cabo el proceso de ultrafiltración con la membrana de 750 kDa.

Se recomienda seguir estudiando la ultrafiltración tangencial variando la presión transmembrana, el flujo de alimentación y tamaños de corte de la membrana, así como estudiar la naturaleza de las impurezas presentes en el lisado mecánico que se observan en los análisis de cromatografía.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrahman, A., & Ghanem, A. (2018). Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1025, pp. 41–57). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.001>
- Aires-Barros, M. R., & Azevedo, A. M. (2017). Fundamentals of Biological Separation Processes. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63668-3.00007-X>
- Anderson, R. J., & Schneider, J. (2007). Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. In *Vaccine* (Vol. 25, Issue SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.030>
- Bhatia, S. C. (2005). *Textbook of Biotechnology*. Atlantic.
- Birnboim, H. C., & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6).
- Bloom, D. E., Fan, V. Y., & Sevilla, J. P. (2018). The broad socioeconomic benefits of vaccination. *Science Translational Medicine*, 10(441). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2345>
- Byreddy, A. R., Gupta, A., Barrow, C. J., & Puri, M. (2015). Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from thraustochytrid strains. *Marine Drugs*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/md13085111>

- Carnes, A., & Williams, J. (2008). Plasmid DNA Manufacturing Technology. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(2). <https://doi.org/10.2174/187220807780809436>
- Ciccolini, L. A. S., Ayazi Shamlou, P., Titchener-Hooker, N. J., Ward, J. M., & Dunnill, P. (1999). Rheological properties of chromosomal and plasmid DNA during alkaline lysis reaction. *Bioprocess Engineering*, 21(3). <https://doi.org/10.1007/s004490050669>
- Cytiva. (2021, September 8). *Key Insights Into Overcoming mRNA Process Challenges*. Bioprocess .
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., & Prazeres, D. M. F. (2003). Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 998(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00618-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00618-6)
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2008). Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3). <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1660-6>
- Freitas, S. S., Santos, J. A. L., & Prazeres, D. M. F. (2006). Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnology Progress*, 22(4). <https://doi.org/10.1021/bp060052d>
- García-Rendón, A., García-Rendón, A., Guzmán, R., & Tejeda-Mansir, A. (2019). Substrate-source flexibility of an exponential-fed perfusion process to produce plasmid DNA for use as leishmaniasis vaccine. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1). <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1560232>
- Geciova, J., Bury, D., & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. In *International Dairy Journal* (Vol. 12, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00038-9)

- Ghanem, A., Healey, R., & Adly, F. G. (2013). Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 760). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.006>
- Haque, S., Khan, S., Wahid, M., Dar, S. A., Soni, N., Mandal, R. K., Singh, V., Tiwari, D., Lohani, M., Areeshi, M. Y., Govender, T., Kruger, H. G., & Jawed, A. (2016). Artificial intelligence vs. statistical modeling and optimization of continuous bead milling process for bacterial cell lysis. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01852>
- Haque, S., Khan, S., Wahid, M., Mandal, R. K., Tiwari, D., Dar, S. A., Paul, D., Areeshi, M. Y., & Jawed, A. (2016). Modeling and optimization of a continuous bead milling process for bacterial cell lysis using response surface methodology. *RSC Advances*, 6(20). <https://doi.org/10.1039/c5ra26893a>
- Hasson, S. S. A. A., Al-Busaidi, J. K. Z., & Sallam, T. A. (2015). The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 5, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30366-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30366-X)
- Hausmann, A., Duke, M. C., & Demmer, T. (2012). Principles of Membrane Filtration. In A.Y. Tamime (Ed.), *Membrane Processing Dairy and Beverage Applications* (1st ed., Vol. 1).
- Islas-Lugo, F., Vega-Estrada, J., Alvis, C. A., Ortega-López, J., & del Carmen Montes-Horcasitas, M. (2016). Developing strategies to increase plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5 α using batch culture. *Journal of Biotechnology*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.025>
- Kennedy, J. (2020). Vaccine Hesitancy: A Growing Concern. *Pediatric Drugs*, 22(2). <https://doi.org/10.1007/s40272-020-00385-4>
- Kim, M., Nejatishahidein, N., Borujeni, E. E., Roush, D. J., Zydney, A. L., & Borhan, A. (2021). Flow and residence time distribution in small-scale dual-layer depth filter capsules. *Journal of Membrane Science*, 617. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118625>

- Kutzler, M. A., & Weiner, D. B. (2008). DNA vaccines: Ready for prime time? In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 9, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrg2432>
- Lee, J., Arun Kumar, S., Jhan, Y. Y., & Bishop, C. J. (2018). Engineering DNA vaccines against infectious diseases. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 80). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.033>
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y. K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 244). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Lim, M., Badruddoza, A. Z. M., Firdous, J., Azad, M., Mannan, A., Al-Hilal, T. A., Cho, C. S., & Islam, M. A. (2020). Engineered nanodelivery systems to improve dna vaccine technologies. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010030>
- Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.017>
- Maruggi, G., Zhang, C., Li, J., Ulmer, J. B., & Yu, D. (2019). mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. In *Molecular Therapy* (Vol. 27, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.020>
- McCue, J. T. (2014). Use and application of hydrophobic interaction chromatography for protein purification. In *Methods in Enzymology* (Vol. 541). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00005-7>
- Merchuk, J. C., & Gluz, M. (2002). Bioreactors, Air-lift Reactors. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1002/0471250589.ebt029>
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., & Marchal, L. (2015). Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium*

- cruentum and Nannochloropsis oculata. *Bioresource Technology*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>
- Mota-Sánchez, J. (2009). Vacunas de ADN: Inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Publica de Mexico*, 51(SUPPL.3). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900012>
- Moustafa, Y. M., & Morsi, R. E. (2013). Ion Exchange Chromatography - An Overview. In Martin Dean F. & Martin Barbara B. (Eds.), *Colum Chromatography*. Viktorija Zgela, InTech.
- Munguía, R., García, A., Garibay, A., Guerrero, P., & Tejeda, A. (2015). Segregated growth kinetics of *E. coli* DH5 α -NH36 in exponential-fed perfusion culture for pDNA vaccines production. *Biotechnol Appl Biochem*, 62, 796–805.
- Ndwandwe, D., & Wiysonge, C. S. (2021). COVID-19 vaccines. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 71, pp. 111–116). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.003>
- Nejatishahidein, N., Borujeni, E. E., Roush, D. J., & Zydney, A. L. (2020). Effectiveness of host cell protein removal using depth filtration with a filter containing diatomaceous earth. *Biotechnology Progress*, 36(6). <https://doi.org/10.1002/btpr.3028>
- Nunes, J. C., Morão, A. M., Nunes, C., Pessoa de Amorim, M. T., Escobar, I. C., & Queiroz, J. A. (2012). Plasmid DNA recovery from fermentation broths by a combined process of micro- and ultrafiltration: Modeling and application. *Journal of Membrane Science*, 415–416. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.04.055>
- Otto, A., Becher, D., & Schmidt, F. (2014). Quantitative proteomics in the field of microbiology. In *Proteomics* (Vol. 14, Issues 4–5). <https://doi.org/10.1002/pmic.201300403>

- Padilla-Zamudio, A., Guerrero-Germán, P., & Tejeda-Mansir, A. (2015). Plasmid DNA primary recovery from *E. coli* lysates by depth bed microfiltration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(6). <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1351-5>
- Padilla-Zamudio, A., Lucero-Acuña, J. A., Guerrero-Germán, P., Ortega-López, J., & Tejeda-Mansir, A. (2017). Efficient disruption of *Escherichia coli* for plasmid DNA recovery in a bead mill. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/app8010030>
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Pereira, L. R., Prazeres, D. M. F., & Mateus, M. (2010). Hydrophobic interaction membrane chromatography for plasmid DNA purification: Design and optimization. *Journal of Separation Science*, 33(9), 1175–1184. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900844>
- Plotkin, S. (2014). History of vaccination. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 111, Issue 34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1400472111>
- Postma, P. R., Suarez-Garcia, E., Safi, C., Olivieri, G., Olivieri, G., Wijffels, R. H., & Wijffels, R. H. (2017). Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. *Bioresource Technology*, 224, 670–679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.071>
- Prazeres, D. M. F. (2011). Plasmid Biopharmaceuticals: Basics, Applications, and Manufacturing. In *Plasmid Biopharmaceuticals: Basics, Applications, and Manufacturing*. <https://doi.org/10.1002/9780470939918>
- Prazeres, D. M. F., Monteiro, G. A., Ferreira, G. N. M., Diogo, M. M., Ribeiro, S. C., & Cabral, J. M. S. (2001). Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology Annual Review*, 7. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(01\)07031-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(01)07031-4)

- Rosa, S. S., Prazeres, D. M. F., Azevedo, A. M., & Marques, M. P. C. (2021). mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. In *Vaccine* (Vol. 39, Issue 16). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038>
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (1991). *Bioprocess Engineering Basic Concepts Second Edition. Advances in Chemical Engineering.*
- Smith, C. R., DePrince, R. B., Dackor, J., Weigl, D., Griffith, J., & Persmark, M. (2007). Separation of topological forms of plasmid DNA by anion-exchange HPLC: Shifts in elution order of linear DNA. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.04.005>
- Smith, K. (2012). Development of Membrane Processes. In A.Y. Tamime (Ed.), *Membrane Processing Dairy and Beverage Applications* (1st ed., Vol. 1).
- Sousa, Â., Sousa, F., & Queiroz, J. A. (2012). Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. In *Journal of Separation Science* (Vol. 35, Issue 22). <https://doi.org/10.1002/jssc.201200307>
- Srinivasan, S., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2017). Fundamentals of Molecular Biology. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63668-3.00003-2>
- Stadler, J., Lemmens, R., & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. In *Journal of Gene Medicine* (Vol. 6, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/jgm.512>
- Sun, B., Yu, X. H., Yin, Y., Liu, X., Wu, Y., Chen, Y., Zhang, X., Jiang, C., & Kong, W. (2013). Large-scale purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA using tangential flow filtration and multi-step chromatography. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.015>
- Sutherland, K. (2008). *Filters and Filtration Handbook, Fifth Edition.* In *Elsevier.*

- Tejeda, M. A., Montesinos C.R.M., & Guzmán Z.R. (2011). *Bioseparaciones. Segunda Edición*.
- Tejeda-Mansir, A., & Montesinos, R. (2008). Upstream Processing of Plasmid DNA for Vaccine and Gene Therapy Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(3).
<https://doi.org/10.2174/187220808786241015>
- Zhang, M., Hong, Y., Chen, W., & Wang, C. (2017). Polymers for DNA Vaccine Delivery. In *ACS Biomaterials Science and Engineering* (Vol. 3, Issue 2).
<https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.6b00418>
- Zydney, A. L. (2021). New developments in membranes for bioprocessing – A review. In *Journal of Membrane Science* (Vol. 620).
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118804>

ANEXOS

Anexo A:

Curva estándar para análisis de cromatografía líquida de alta resolución con columna de interacción hidrofóbica (HPLC-HIC).

La curva estándar se construyó con soluciones de concentración conocida de pVAX1-NH36 purificado por medio de un kit comercial y analizadas por cromatografía de interacción hidrofóbica. Se relaciona la concentración conocida de cada solución inyectada con el área del pico correspondiente al ADNp, como se muestra en la Figura 36. La pendiente de la recta obtenida se utiliza para calcular la concentración en muestras, mediante la siguiente relación:

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

Donde:

c = Concentración de ADNp [$\mu\text{g/mL}$]

a = Área del pico de ADNp [mAU-min]

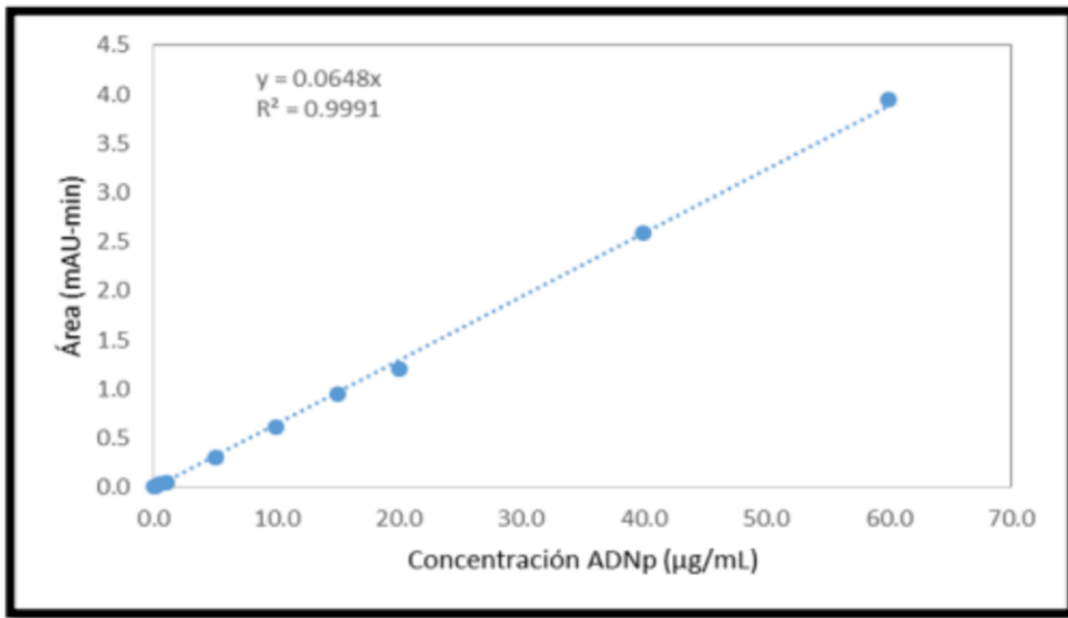


Figura 36. Curva estándar para análisis de muestras en HPLC-HIC para pVAX1-NH36.