

INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO
“JOSÉ ANTONIO ECHEVERRÍA”
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL
PLÁSMIDO pIDKE2 PRINCIPIO ACTIVO DE UNA
VACUNA CONTRA LA HEPATITIS C**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas

Miladys Limonta Fernández

**LA HABANA
2011**

INSTITUTO SUPERIOR POLITÉCNICO
“JOSÉ ANTONIO ECHEVERRÍA”
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL
PLÁSMIDO pIDKE2 PRINCIPIO ACTIVO DE UNA
VACUNA CONTRA LA HEPATITIS C**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas

Autor: Ing. MSc. Miladys Limonta Fernández

**Tutores: Dr. Lourdes Zumalacárregui de Cárdenas
Dr. Santiago Dueñas Carrera**

**LA HABANA
2011**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme dado la vida, la educación y su ejemplo.

A Manuel no sólo por los claveles sino también por juntar sus manos y sus ojos a los míos y atreverse a desafiar los tiempos duros.

A Melba y a todos aquellos que con su sangre buena hoy son postura, rocío y abono de esta obra grande que llamamos Revolución.

A Fidel por ser “Fidel”, y por ser el primero que me habló del CIGB justo 3 días después de su inauguración.

A mis maestros todos, desde la primaria hasta la universidad.

A Cremata por recibirme en la puerta del CIGB cuando apenas era una estudiante de Pre; y a los que de una forma u otra me han acompañado en el duro bregar diario del CIGB.

A mis compañeros de Desarrollo, sin dudas este trabajo resume el trabajo de todos, en especial a Odalys y Jorge Valdés por el apoyo, el destacamento de Purificación y a Eduardo por el reto.

A Lourdes y Santiago por sus sabios consejos.

DEDICATORIA

a Celia Melba y Carolina porque sus vidas fertilizan la inspiración de mis días

a Celia Sánchez y Ernesto Guevara, siempre

SÍNTESIS

En el trabajo se desarrolla el proceso de purificación del ADN plasmídico pIDKE2, componente principal del candidato vacunal CIGB 230.

Por primera vez se describe el uso de la filtración tangencial en combinación con las cromatografías de fase reversa y exclusión molecular para la obtención de un plásmido con rendimiento de 0,76 mg por gramo de biomasa húmeda, con una pureza del 94 \pm 2% y un recobrado total del 14%. Se realizó la modelación del proceso de purificación del plásmido pIDKE2, y se verificó la factibilidad económica del proyecto. Además se estableció una metodología a partir del uso de herramientas como el diseño experimental y la modelación para identificar los factores que tienen mayor influencia sobre el costo de producción y la cantidad de plásmido anual.

Se demostró que el proceso de purificación del plásmido pIDKE2, puede ser escalado y cumple con las regulaciones vigentes. Los reactivos utilizados no representan reglamentaciones especiales, ya que no son tóxicos, mutagénicos ni inflamables.

Por vez primera la autoridad regulatoria nacional autorizó el inicio de un estudio clínico en humanos de una formulación líquida que contiene un plásmido.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Nomenclatura.....	9
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA.....	19
2.1. El virus de la hepatitis C	19
2.2. Vacunas de ADN plasmídico	21
2.2.1 Producción de vacunas de ADN plasmídico	22
2.2.2 Operaciones unitarias y opciones de procesos para el recobrado y la purificación de plásmidos.....	25
2.3 Cromatografía de perfusión y su aplicación en las matrices POROS y membranas adsorbentes.....	30
2.3.1 Matrices de soporte POROS.....	30
2.3.2 Membranas adsorbentes	31
2.4 Capacidad de las matrices cromatográficas	32
2.5 Fenómenos básicos que ocurren durante la adsorción cromatografía ..	35
2.6 Resumen de las tecnologías reportadas en la literatura para la purificación de ADN plasmídico	37
2.7 Consideraciones sobre el análisis de la bibliografía	39

3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 Reactivos, materiales y equipos empleados.....	41
3.2 Características de los plásmidos pIDKE2 y pVEGF ₁₂₁	41
3.3 Obtención de la biomasa	42
3.4 Procedimientos empleados para el desarrollo del proceso de purificación	42
3.4.1 Ruptura celular.....	42
3.4.2 Purificación primaria y purificación final	44
3.5 Métodos analíticos para el control de proceso y la liberación del producto terminado	52
3.6 Diseño experimental, análisis estadístico y modelación de proceso	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1. Establecimiento de las condiciones de operación de la ruptura celular.	55
4.2 Establecimiento de la etapa de purificación primaria.....	58
4.3 Establecimiento de la etapa de purificación	63
4.3.1 Evaluación de la matriz POROS R1 50 para la purificación de ADN plasmídico.....	63
4.3.2. Determinación de la capacidad dinámica de adsorción de la matriz POROS R1 50	67

4.3.3 Establecimiento de las condiciones de elución del plásmido pIDKE2 en la matriz POROS R1 50	70
4.3.4 Estudios preliminares de adsorción empleando el sistema Sartobind Q 75 – plásmido pIDKE2.....	74
4.4 Establecimiento de la etapa de purificación final y análisis global del proceso en la escala de banco	76
4.5 Escalado de las cromatografías GF1, fase reversa y GF2 para la purificación del plásmido pIDKE2	83
4.6 Modelación del proceso de purificación del plásmido pIDKE2 y análisis económico	91
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	99
5.1 Conclusiones	99
5.2 Recomendaciones.....	100
Referencias Bibliográficas.....	101
Anexos	117

Nomenclatura

°C	Grados Celsius
a.a	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico cromosomal
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
ADNp _{ca}	Ácido desoxirribonucleico plasmídico circular abierto
ADNp _l	Ácido desoxirribonucleico plasmídico lineal
ADNp _{se}	Ácido desoxirribonucleico plasmídico superenrollado
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico transferencial
BCA	Ácido bicinconínico
c	Concentración de soluto en solución (mg/mL)
c*	Concentración en equilibrio en la fase líquida (mg/mL)
CCH	Cromatografía con Hidroxiapatita
CECMED	Centro estatal para el control de medicamentos, autoridad regulatoria nacional
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
CFR	Cromatografía de fase reversa
CIGB	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
CIGB 230	Proyecto del CIGB candidato vacunal basado en el plásmido pIDKE2
CIH	Cromatografía de hidrofobicidad
CII	Cromatografía de intercambio iónico
CTAB	bromuro de cetil trimetilamonio

<i>E.coli</i>	Bacteria <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Sal disódica etilendiaminotetracético dihidratada
EU	Unidades de endotoxinas
EUA	Estados Unidos de América
FDA	Autoridad regulatoria de los Estados Unidos para alimentos y drogas
<i>g</i>	Gravedades
GF1	Cromatografía de exclusión molecular 1
GF2	Cromatografía de exclusión molecular 2
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
ka	Constante de asociación de enlace (mg/mL)
KAc	Acetato de potasio
kd	Constante de disociación de enlace (mg/mL)
kp _b	Kilo pares de base
LAL	Lisado de <i>Limulus amoebocitus</i>
MM	Masa molar
NHANES	Sistema nacional de salud y nutrición de los Estados Unidos
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pIDKE2	Plásmido que codifica para los primeros 650 aminoácidos de la poliproteína de un aislamiento cubano de genotipo 1b del virus de la Hepatitis C; que incluye la cápsida, la E1 y una porción de la E2: 1951 pb
pVEGF ₁₂₁	Plásmido que codifica para el gen del factor de crecimiento epidérmico vascular truncado en el aminoácido 121
q*	Concentración en equilibrio la fase sólida (mg/mL)
qmáx	Capacidad máxima de soluto adsorbida por volumen de gel (mg/mL)

rps	Revoluciones por segundo
SDS	Sodio dodecil sulfato
USD	Unidad monetaria de Dólares americanos
VC	Volumen de columna
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
λ	Longitud de onda

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) constituye un grave problema de salud en el ámbito mundial, ya que se estima que infecta aproximadamente al 3% de la población de todo el orbe. Este virus causa infección crónica en la mayoría de los infectados y es uno de los principales motivos de trasplante hepático **[Sum09]**. Hasta el momento no existe vacuna preventiva o terapéutica alguna contra este virus y los mejores tratamientos antivirales disponibles, basados en la combinación del interferón pegilado y la ribavirina, además de conllevar numerosos efectos adversos, son efectivos generalmente sólo en el 50% de los casos **[Sum09]**. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos tratamientos e intervenciones profilácticas es una prioridad del presente. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se trabaja en la combinación de un ADN plasmídico (ADNp) que expresa los antígenos estructurales del VHC, con una variante recombinante de la proteína de la cápsida de este virus, que ha ofrecido evidencias de inmunogenicidad en modelos animales **[Alv06]**. Dichas evidencias han promovido su evaluación en estudios clínicos para investigar la capacidad de este candidato vacunal Terap C (denominado CIGB 230) para modificar la respuesta inmune en pacientes crónicamente infectados por el VHC, que no responden a la terapia antiviral y su impacto en el curso de la infección.

El empleo de vectores virales en la terapia génica, ha conllevado al incremento de las cuestiones relacionadas con su regulación y seguridad, debido a su

toxicidad e inmunogenicidad, así como por su posible papel en la activación de genes cancerígenos o la desactivación de genes supresores de tumores.

Por tal razón, es necesario buscar vías alternativas para su producción y purificación que satisfagan las necesidades regulatorias y éticas. La obtención de ADNp ha sido una práctica rutinaria a nivel de laboratorio desde hace más de 20 años empleando reactivos no aceptados por las regulaciones vigentes para uso en humanos. Sin embargo, la obtención a escala industrial de este tipo de molécula ha significado un reto. Los plásmidos de ADN deben ser producidos por procesos de fabricación escalables, reproducibles, que cumplan con los estrictos criterios de calidad en términos de pureza, potencia, eficacia y seguridad **[FDA07]**. En general los métodos de aislamiento utilizados en el laboratorio emplean elementos orgánicos, reactivos mutagénicos, compuestos tóxicos y además requieren el uso de enzimas derivadas de animales, constituyendo una limitante para su establecimiento a escala industrial **[Dio00]**.

Por otra parte, debido a la similitud en la composición química y la estructura entre el ácido ribonucleico (ARN) y el ADNp, la eliminación del ARN representa un verdadero desafío sobre todo si se tiene en cuenta que el ADNp representa menos del 1% del total de componentes de la célula hospedera, mientras que el ARN representa el 21% **[Sha03]**.

El ADN plasmídico está formado por ADN circular abierto (ADNp_{ca}), lineal (ADNp_l) o superenrollado (ADNp_{se}), siendo este último el producto de interés

para cualquiera de los procesos a emplear para su extracción y purificación. Por lo general, el ADNp_{se} es liberado de la célula por un procedimiento de ruptura alcalina, diseñado para lograr la desnaturización del ADN cromosomal y las proteínas, pero manteniendo la estructura del ADNp, compacta.

El uso de los procedimientos convencionales de fermentación y purificación para la producción industrial de esta molécula ha resultado un problema debido a su tamaño molecular, que generalmente se encuentra entre los 200 y 300 10^6 g/mol, por lo que empleando las matrices cromatográficas convencionales el ADNp_{se} se adsorbe sólo en la superficie externa de las partículas de la matriz y por lo tanto las capacidades suelen ser del orden de cientos de microgramos de ADNp_{se} por mililitro de soporte cromatográfico. Por consiguiente, pocas empresas biotecnológicas han desarrollado tecnologías propias para producir ADNp_{se} de calidad farmacéutica para su aplicación en ensayos clínicos y hasta el momento no existe en el mercado ningún producto que emplee como componente principal ADNp_{se}.

Por lo tanto, en este trabajo se formula el problema científico siguiente: El inicio de un estudio clínico en humanos empleando el candidato vacunal CIGB 230 demanda la producción de ADNp_{se}, no contándose con el proceso de purificación apropiado para ello.

El objeto de investigación del trabajo es el proceso de purificación del ADNp_{se} pIDKE2 y el campo de acción son los métodos no cromatográficos y

cromatográficos empleados para la purificación de biomoléculas, que deberán ser evaluados para el ADNp_{se}. Como hipótesis se propone que: es posible obtener ADNp_{se} de calidad inyectable a partir de la combinación de métodos chromatográficos ortogonales con la filtración tangencial. Para demostrar la validez de esta hipótesis se formula como objetivo general: Establecer un proceso de purificación para la obtención de ADNp_{se} que cumpla con las regulaciones vigentes para su uso en humanos y por lo tanto pueda ser empleado en los estudios clínicos en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C. Para el cumplimiento de este se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Conocer la influencia del tiempo de mezclado, la relación de volumen por gramo de biomasa húmeda y el uso de la glucosa sobre la cantidad de producto de ADN plasmídico que se obtiene en la etapa de ruptura celular.
2. Establecer una etapa de semipurificación del ADNp_{se} en la que se eliminen los principales contaminantes: el ARN y las proteínas.
3. Evaluar matrices de perfusión y obtener las condiciones de purificación para el plásmido pIDKE2.
4. Obtener un proceso de purificación que pueda ser escalado y que permita alcanzar los niveles de pureza y homogeneidad requeridos por las regulaciones vigentes para su uso en humanos.

5. Modelar el proceso de purificación desarrollado y determinar la factibilidad técnica – económica del proyecto.

El desarrollo de esta investigación se basó en la aplicación de métodos teóricos y experimentales, los cuales se enumeran a continuación:

1. Método hipotético-deductivo: Se empleó para la elaboración de la hipótesis de la investigación y desarrollar una tecnología novedosa que garantice la calidad del producto final según las exigencias de las autoridades regulatorias.
2. Método de modelación: A partir del uso de herramientas computacionales se modeló el proceso de purificación del ADNp_{se} para reproducir el fenómeno estudiado, realizar el análisis de factibilidad económica del proyecto y los estudios de sensibilidad.
3. Método de la observación científica: Se empleó para la definición del problema, el planteamiento y la comprobación de la hipótesis, la elaboración del marco teórico y el informe de los resultados.
4. Método de medición: Se realizaron las determinaciones de propiedades para la caracterización de las diferentes corrientes que forman parte de la tecnología desarrollada.

Actualidad y novedad científica

En la actualidad no existe una vacuna preventiva o terapéutica contra la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). En el CIGB se han realizado

estudios en animales empleando el plásmido pIDKE2 que sugieren que la inmunización con este plásmido en humanos puede ocasionar una prometedora respuesta celular y humoral contra el VHC lo cual lo convierte en un candidato a evaluar en estudios clínicos. La novedad del trabajo está dada por el desarrollo de un proceso de purificación del plásmido pIDKE2, que puede ser escalado y se fabrica en correspondencia a las especificaciones reguladoras vigentes. Los reactivos utilizados no requieren ninguna reglamentación especial, ya que no son tóxicos, mutagénicos ni inflamables. Tampoco se emplean aditivos orgánicos ni enzimas de origen animal.

Como novedad científica se reporta el uso de la matriz POROS R1 50 para la purificación de plásmidos, así como por primera vez se describe la isoterma de adsorción para un sistema formado por una matriz de fase reversa y un plásmido. Además se describe la combinación de los métodos ortogonales exclusión molecular y fase reversa para la purificación de un plásmido de ADN.

Otro aporte del trabajo es el uso combinado de diseños experimentales con una herramienta informática para la modelación de operaciones de purificación lo cual permitió realizar análisis de factibilidad técnico – económica y de sensibilidad de los parámetros obtenidos.

Impacto Económico

El desarrollo del proceso de obtención del plásmido pIDKE2 permitirá disponer del componente principal del candidato vacunal CIGB 230 para los estudios

clínicos que se realicen en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C. El valor del proyecto desarrollado es económicamente factible y la inversión puede recuperarse en 1,34 años; con una tasa interna de retorno de 39,7 %.

Impacto Social

Por primera vez la autoridad regulatoria nacional autorizó el inicio de un estudio clínico en humanos de un producto que contiene en su formulación un plásmido y que será empleado en pacientes infectados con el virus de la hepatitis C. El plásmido pIDKE2 forma parte del candidato vacunal Terap C (CIGB 230), que ha sido aplicado en pacientes con lesiones hepáticas causadas por el virus de la hepatitis C. Los resultados de los estudios clínicos fase I y fase II han demostrado que el producto es seguro y que tiene un impacto positivo en el curso de la infección.

2. ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA

2.1. El virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un patógeno, que puede ser transmitido a través de la exposición parenteral con sangre contaminada o fluidos corporales **[Sum09]**. Los factores más fuertemente asociados con la infección por el VHC son las transfusiones de sangre (56%), abuso de drogas intravenosas (31%), y el consumo de alcohol (44%) **[Bar07; Sum09.]**. Existen otros factores de riesgo como el uso de equipos médicos inadecuadamente esterilizados, los comportamientos sexuales de alto riesgo, y las prácticas sociales o culturales, tales como perforaciones en el cuerpo, la circuncisión y el tatuaje. La transmisión perinatal ocurre pero no es muy frecuente, con excepción de las madres con infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Aunque el VHC puede ser recuperado de la saliva de personas infectadas, el contacto casual no se ha asociado con la transmisión **[Sum09]**.

El VHC es un agente infeccioso común, que afecta a cerca de 170 millones de individuos en el mundo **[Sum09]**. En los Estados Unidos, el Sistema Nacional de Salud y Nutrición (NHANES) realizó un estudio desde 1999 hasta el 2002 en el que mostró que la prevalencia de virus de la hepatitis C fue de 1,6%, correspondiente a 4,1 millones de personas que han sido infectadas con el VHC en los Estados Unidos, y de estos, 3,2 millones padecen de infección crónica, figura 2.1a **[Arm06]**. En Cuba la incidencia está entre 0,5 – 1% **[Due04]**.

La infección con el VHC es uno de los mayores problemas de salud en el mundo y frecuentemente causa cirrosis hepática y/o cáncer de hígado. Las actuales terapias tienen precios elevados y generalmente son efectivas en menos del 50% de los casos.

Las recomendaciones actuales para el tratamiento de la hepatitis C se basan en la combinación de preparaciones de interferón con ribavirina **[Bar07] [Sum09]**.

Se conoce que el establecimiento de la inmunidad celular es particularmente relevante en la resolución de la infección causada por el VHC. La inmunización con ADN puede inducir tanto respuesta humoral como celular por lo tanto constituye un elemento a tener en cuenta para el desarrollo de nuevas vacunas contra el VHC **[Sum09]**.

Varios enfoques prometedores han sido evaluados para desarrollar una vacuna contra el VHC, la inmunización con ADN ha sido una de las estrategias más exploradas. El foco principal para el desarrollo de una vacuna ha sido en base a plásmidos de ADN empleando los antígenos estructurales del núcleo, y las proteínas de la envoltura E1 y E2; una representación esquemática del virus se muestra en la figura 2.1b.

En el CIGB se han realizado estudios en animales empleando el plásmido de ADN pIDKE2 que sugieren que la inmunización con este plásmido en humanos puede ocasionar una prometedora respuesta celular y humoral contra el VHC lo cual lo convierte en un candidato a evaluar en estudios clínicos **[Due04]**.

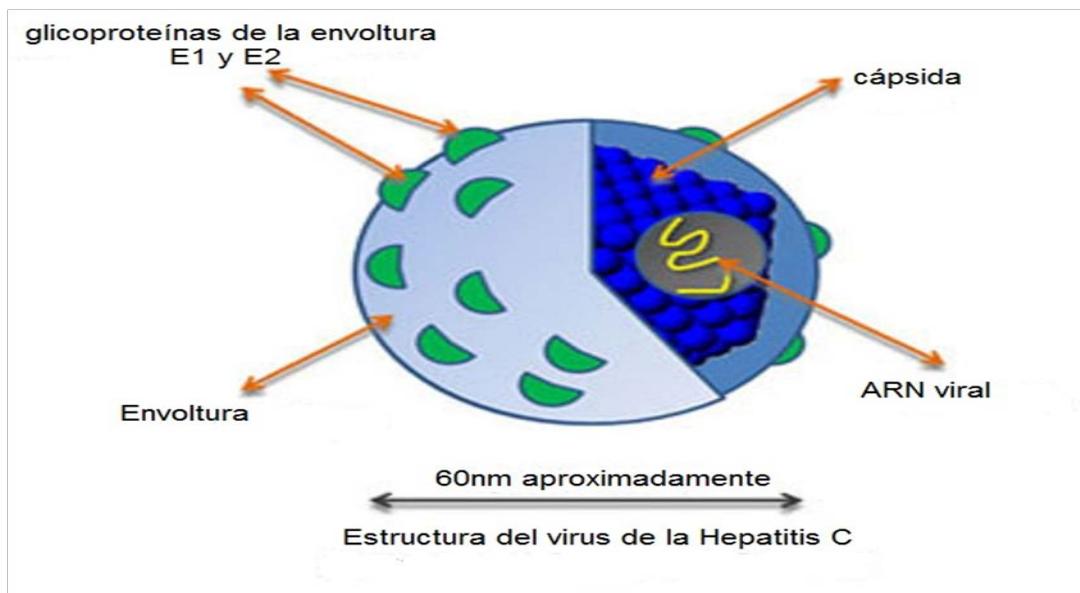


Figura 2.1a: Representación esquemática del VHC en el que se muestran las proteínas que lo conforman.

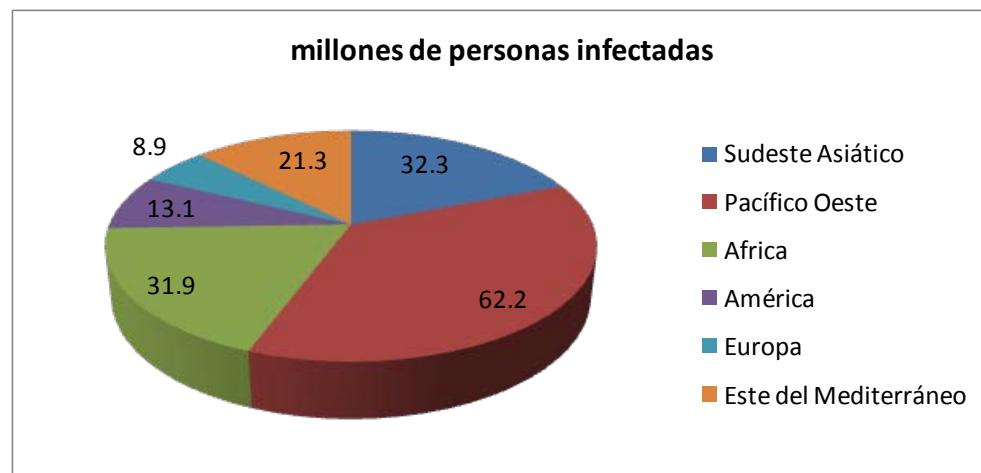


Figura 2.1b Prevalencia del Virus de la Hepatitis C a nivel mundial, teniendo en cuenta que existen 170 millones de personas infectadas

2.2. Vacunas de ADN plasmídico

Las vacunas de ADN son plásmidos construidos para expresar una proteína codificada. Una vez que ha ocurrido la administración *in vivo* ocurre la transfección de células. Inicialmente, se pensaba que la función de estos plásmidos era simplemente como un sistema de transporte para el gen, resultando la producción del antígeno *in situ*, en el caso de las vacunas, o de la proteína terapéutica para las aplicaciones de terapia génica **[Sha03]**.

La inmunización con plásmidos tiene varias ventajas en comparación con otras estrategias de vacunación; mientras que la inmunización con las proteínas principalmente induce respuestas de anticuerpos, la vacunación con ADNp eficiente promueve la generación de antígenos específico de las células T, así como la producción de anticuerpos. Del mismo modo, mientras que las inyecciones con péptidos sólo activan un número limitado de células T que expresan los correspondientes receptores, la inmunización con ADNp puede activar la respuesta inmune en un amplio repertorio de epítopos **[Nor10]**.

En la actualidad se ha demostrado que un plásmido que codifica una proteína viral puede resultar en un aumento de la inmunidad celular y de anticuerpos; esto ha provocado que este tipo de tecnología se haya utilizado para nuevas aplicaciones desde el laboratorio, la licencia de vacunas de uso veterinario, y en fase de desarrollo una variedad de aplicaciones biomédicas en humanos.

2.2.1 Producción de vacunas de ADN plasmídico

El plásmido terapéutico (ADNp) es normalmente producido en células de *E. coli* debido a que este microorganismo ofrece un método simple para obtenerlo en grandes cantidades. Una vez producido el ADNp, es importante separar el ADNp superenrollado (ADNp_{se}) de las impurezas relacionadas con su estructura, tales como la forma lineal (ADNp_l), plásmido circular abierto (ADNp_{ca}) y otras isoformas las cuales constituyen los contaminantes más difíciles de eliminar por la similitud que existe entre ellos y el ADNp_{se}. Otros contaminantes son las proteínas, las endotoxinas, el ARN y el ADN cromosomal (ADNc); estos dos últimos tienen cargas negativas al igual que el ADNp **[Sch99] [Cic98]**.

Las bajas concentraciones de ADNp (0 - 3% del peso seco), el tamaño del plásmido y del número de copias en las células de *E. coli* implican un reto económico para el desarrollo de una tecnología eficiente para la producción de grandes cantidades de ADNp con fines terapéuticos **[Sha03]**.

El ADNp es una macromolécula de diámetro hidrodinámico entre 150 - 600 nm dependiendo de su masa molar que puede ser entre 3 - 200 MDa. El ADNc presenta una masa molar de 2 700 MDa sin embargo, posee propiedades similares al ADNp, por lo que se convierte en un contaminante difícil de separar **[Lev00]**.

Existen reportes que describen dos etapas fundamentales: la primera, incluye la construcción y discriminación apropiada de la expresión del vector, así como la

elección de la cepa hospedera, seguida por la selección y optimización de las condiciones de fermentación **[Sch99]**.

La segunda, contiene el aislamiento del plásmido y los posteriores pasos para la purificación del mismo, y será el objeto de esta investigación.

La estrategia consiste en seleccionar e integrar apropiadamente los pasos para la operación de purificación: el primero, la clarificación y concentración, ocurre a continuación de la ruptura, con el objetivo de eliminar las impurezas y los restos celulares; simultáneamente se desarrolla la concentración y el acondicionamiento para la posterior purificación del plásmido eliminando los mayores contaminantes como son el ARN y las proteínas. Las etapas finales de purificación, se diseñan haciendo uso de los medios cromatográficos y de esta forma separar al ADNp_{se} de las impurezas relacionadas con su estructura, las endotoxinas y proteínas restantes **[Sch99] [Cic98]**.

Las autoridades regulatorias, reconocen que el ADNp_{ca}, ADNp_l así como otras isoformas son menos efectivas terapéuticamente que el ADNp_{se} **[FDA07] [Lah96] [Mar97]**.

Los productos biofarmacéuticos basados en el uso de ADNpse son analizados química, bioquímica y físicamente **[Sch99]**. Para el desarrollo de su validación y aprobación se requiere inicialmente del monitoreo del proceso de ejecución así como los ensayos de calidad realizados al producto final comparado con las especificaciones que debe tener el producto terminado **[FDA07] [Pra98] [Sch99] [Mar97]**.

El control de la calidad incluye análisis como la esterilidad, pureza, homogeneidad, identidad, estabilidad, potencia y contenido de endotoxinas al ingrediente farmacéutico activo (IFA) y producto final. También las autoridades regulatorias recomiendan una serie de controles para los productos intermedios generados en las etapas de fermentación y purificación como: cantidad de ADN plasmídico, identidad, pureza y homogeneidad. Con la aplicación de técnicas sencillas y rápidas como electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría a 260 y 280 nm se pueden realizar algunos de estos controles. Las especificaciones recomendadas por las agencias regulatorias se describen en la tabla 2.1 [Nor10] [Sta04].

Tabla 2.1: Especificaciones y recomendaciones de los niveles de pureza para el ADN con fines terapéuticos

Especificación	Criterios de aceptación	Métodos Analíticos
Apariencia	Limpia	Inspección visual
Identidad	Homología en la secuencia, restricción de mapeo esperada	Reacción en cadena de la polimerasa
Homogeneidad	>90 % ADNp _{se}	Electroforesis en gel de agarosa
Concentración	De acuerdo a la aplicación	Absorbancia a 260 nm, Cromatografía líquida de alta presión
Potencia	De acuerdo a la aplicación	Transfección de la célula
Proteínas	No detectables, < 0,01 µg/dosis	Ácido bicinconílico
ARN	No detectables	Electroforesis en gel de agarosa 0,8%
ADNc	< 0,05 µg/µg plásmido, <0,01 µg/dosis	Reacción en cadena de la polimerasa, método fluorescente
Endotoxinas	< 0,1 EU/µg plásmido, <5 EU/kg peso del cuerpo	Lisado de <i>Limulus amoebocitus</i>

De lo anteriormente planteado, puede deducirse que la utilización de ADNp_{se} con propósitos terapéuticos, está estrictamente controlada por un conjunto de organizaciones internacionales, con miras a regular el nivel de pureza que debe tener. La presencia de impurezas y contaminantes, son las principales razones para tomar estas precauciones, por las incidencias que en el ámbito de la salud humana puede tener, de ahí que se establezcan un conjunto de requisitos durante el desarrollo del proceso de ejecución y el control de calidad del producto, una vez obtenido.

2.2.2 Operaciones unitarias y opciones de procesos para el recobrado y la purificación de plásmidos

La ruptura de las células para la liberación del ADNp, es la primera de todas las operaciones unitarias durante los procesos de semipurificación y purificación. La mayor cantidad posible del ADNp_{se}, deberá ser obtenida para garantizar un proceso de alto rendimiento. Conjuntamente se liberan componentes celulares tales como: ácidos nucleicos (ADN cromosomal, ARN transferencia, ARN ribosomal, ARN mensajero), endotoxinas, proteínas, agua y moléculas pequeñas como iones **[Atk91]**.

La ruptura química de la célula fue descrita por primera vez por Birnboim y Doly **[Bir79]**. El rompimiento alcalino de la bacteria, logra la ruptura de la pared celular y de la membrana. De este modo, se inicia la liberación de los productos intracelulares; con posterioridad se adiciona acetato de potasio obteniéndose como precipitados los restos celulares y las proteínas **[Bir79]**.

Los protocolos de ruptura varían teniendo en cuenta la concentración de la sal, el volumen de la muestra, el pH, la temperatura y el tiempo individual de cada paso. Existen varios factores que pueden influir en la obtención del ADNp_{se}. Estos incluyen el número de copias del vector, el inserto de ADN, la célula huésped, las condiciones de crecimiento y el medio **[Rui09]**.

Es válido destacar que la duración de este paso puede afectar el rendimiento y la pureza del ADNp_{se}. Levy y colaboradores encontraron que flujos en régimen laminar, mayores que $1 \cdot 10^5$ rps, eran requeridos para romper el ADNp_{se} y que según su tamaño tomaría un mayor o menor tiempo la ruptura de la célula, o la tendencia a asociarse con otros materiales celulares y el dodecil sulfato de sodio (SDS) que se emplea como componente del tampón de ruptura alcalina **[Lev00]**.

La ruptura de la célula ocurre en cuanto los componentes se mezclan, debido a la solubilización de la membrana celular en la disolución alcalina que contiene SDS. Este proceso toma de 20 a 40 segundos para completarse, en dependencia de las condiciones de mezclado. Estudios han demostrado que el recobrado por cantidad de células usadas en el paso de ruptura, depende significativamente del volumen de disolución utilizado para el tratamiento de las células **[Mea03]**.

La homogeneización de la muestra juega un papel importante, el mezclado debe ser logrado con suficiente intensidad para alcanzar un adecuado grado de distribución de los reactivos químicos. Esta operación se hace difícil debido a los cambios en las propiedades reológicas de la disolución, de fluido Newtoniano a no-Newtoniano **[Cic98]** **[Ste93]**.

En la segunda etapa del proceso de ruptura, el pH se reduce bruscamente por la adición de acetato de potasio. El cambio en las condiciones físico-químicas causa la floculación del ADNc así como la precipitación de un complejo formado por las proteínas, el SDS y otras especies de elevada masa molar como el ARN.

En la literatura consultada se encontraron diferencias en cuanto a la composición de la disolución Liso⁻ **[Hor95]** **[Sha03]**, descrita en el anexo 1, el tiempo de mezclado una vez añadido el tampón de ruptura **[Mea03]** **[Sha03]**, así como la relación de cantidad de volumen empleado de las tres disoluciones por gramo de biomasa **[Qia01]** **[Mea03]** **[Hor95]**. Lograr el ajuste de las condiciones del proceso de ruptura es importante para obtener un mayor recobrado del ADN_{se} que deberá ser purificado en las siguientes etapas.

Al final de la ruptura alcalina se forma un precipitado que contiene restos celulares, proteínas desnaturizadas y ácidos nucleicos, los cuales deben ser eliminados, haciendo uso de una operación unitaria de separación sólido-líquido, ya sea por medio de la centrifugación o por filtración o por la combinación de una de estas operaciones con la precipitación.

La centrifugación con rotor de ángulo fijo es la operación comúnmente utilizada a escala de laboratorio **[Fer99]** **[Pra98]** **[Lah96]**. Sin embargo, la misma no resulta adecuada para la producción a gran escala del ADN_{se}. Las centrífugas industriales generalmente operan con un flujo de alimentación continuo. La aceleración centrífuga del líquido causa el cizallamiento y consecuentemente, la ruptura del material precipitado y las moléculas de ADN.

La filtración constituye la mejor operación a gran escala en el proceso de producción del plásmido **[The97] [Mar95]**. Marquet y Theodossiu en sus estudios, después de eliminar el 99% del precipitado recuperaron más del 67% del ADNp_{se}, con un 46% de pureza del total de este, empleando un filtro con diámetro de poro de 5 µm. El empleo de esta operación unitaria ayudaría a reducir la presión de filtración, con el objetivo de evitar el cizallamiento del precipitado y la redisolución de los fragmentos del ADNc **[The97] [Mar95]**.

El uso de la precipitación para la purificación de ADNp_{se} se describe con la utilización de precipitantes naturales y químicos como la sal cloruro de calcio, después de realizado el paso de ruptura alcalina para lograr la precipitación selectiva del ADNc y el ARN. Existen también reportes de uso de otros agentes con los que se logra una reducción del volumen por concentración y la eliminación de ácidos nucleicos de baja masa molar empleando agentes como el isopropanol, polietilenglicol (PEG) o bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) **[Rib02] [Hor98]** **[Hor95] [Lan02]**.

La precipitación con etanol e isopropanol es favorable a escala de laboratorio; pero no sucede así a gran escala, pues implica un elevado costo de inversión. Por otra parte, la precipitación con el detergente catiónico CTAB ofrece una buena selectividad y eliminación del ADNc. El uso del CTAB y del PEG está considerado como opción ventajosa para la precipitación, sin embargo en ninguno de los casos citados se elimina totalmente el ARN. Otro aspecto a considerar es que tiene que incluirse en los ensayos de liberación del producto final una técnica en la que se

demuestren los niveles remanentes de cualquiera de los agentes de precipitación empleados.

La ultrafiltración y la microfiltración son también consideradas como una opción en los primeros pasos de purificación [Ken02] [But01] [Kah00]. El uso de flujos tangenciales en ultrafiltración empleando membranas de polietersulfona con diámetro de poro para la separación de biomoléculas de tamaño molecular entre $1 \cdot 10^5$ g/mol y $5 \cdot 10^5$ g/mol, logra eliminar un 70% de ARN y un 90% de proteínas [But01] [Kah00].

Bussey reportó el uso de flujo tangencial en la ultrafiltración para la purificación del ADNp_{se} [Bus98]. Propone el uso de membranas con un diámetro de poro para separar biomoléculas de tamaño entre $3 \cdot 10^5$ g/mol y $5 \cdot 10^5$ g/mol.

Un método descrito recientemente para eliminar el ARN es a través de la cromatografía de exclusión molecular (SEC) o de gel filtración. Sandberg y colaboradores demostraron que es posible modificar las propiedades hidrodinámicas del ADNp empleando diferentes concentraciones de sal [San04].

El uso de alta concentración salina influye sobre la doble cadena del ADN actuando sobre la conformación hidrodinámica de las moléculas de ácido nucleico, ya sean las diferentes conformaciones de ADN: lineal (ADNp_l) o la superenrollada (ADNp_{se}) o sobre el ARN. La consecuencia directa es que aumenta el tamaño hidrodinámico, duplicándose en el caso específico del ADNp, por lo tanto en la cromatografía de exclusión molecular se logra una diferencia en el volumen de elución entre el ADNp y el ARN [San04].

Los productos biofarmacéuticos elaborados a partir de ADN_{se} requieren niveles de pureza superiores de este componente al 90% y son usualmente logradas por la inclusión en la etapa de pulido de la combinación de dos o tres procesos cromatográficos. El objetivo fundamental es separar el ADN_{se} de las impurezas (en términos de composición y estructura). Las operaciones cromatográficas descritas en la literatura para la purificación de plásmidos a escala de laboratorio incluyen propiedades tales como: el tamaño del plásmido, la carga, la hidrofobicidad, conformación y accesibilidad a un grupo molecular específico. Entre las técnicas más empleadas para la obtención de ADN_{se} se encuentran: la cromatografía de intercambio iónico (CII), la cromatografía de interacciones hidrofóbicas (CIH), la cromatografía de afinidad y la cromatografía de exclusión por masa molar (CEM) [Fra02] [Sta04].

2.3 Cromatografía de perfusión y su aplicación en las matrices POROS y membranas adsorbentes

2.3.1 Matrices de soporte POROS

La cromatografía de perfusión es una operación de transferencia de masa, la cual se ha convertido en una de las vertientes más estudiadas y utilizadas en estos momentos debido a sus grandes ventajas para la purificación de biomoléculas. La misma presenta ultraporos (0,6 - 0,8 μm) que le permiten un rápido transporte de masa intrapartícula (convectivo) y dentro de los mismos poros difusivos ($\leq 1 \mu\text{m}$, 0,05 μm -0,15 μm), lo que proporciona una elevada área superficial de contacto y capacidad de enlace [Afe90].

La combinación del transporte de masa convectivo y el difusivo trae como resultado una alta capacidad, alta resolución, gran velocidad y una alta eficiencia en la separación de biomoléculas. También proporciona la ventaja de que cuando se aumentan los flujos de trabajo, la caída de presión que provoca es baja y no afecta al soporte cromatográfico **[Per96] [Afe90]**.

La introducción de la tecnología de perfusión en el soporte POROS de la compañía PerSeptive Biosystem se realizó en los años 90. Su estructura permite que la corrida cromatográfica sea de 10 - 100 veces más rápida que con los soportes convencionales sin sacrificar la resolución o capacidad de la cromatografía **[Per96] [Afe90]**.

2.3.2 Membranas adsorbentes

Las membranas están formadas por celulosa regenerada estabilizada como material base con un tamaño de poro nominal de 0,45 y 3 μm formado por un número determinado de capas (15, 30, 60), cada una con un espesor promedio de 275 μm . Estas membranas tienen una capacidad de enlace estática de 0,5 - 1 mg/cm² equivalente a 20 - 40 mg/mL.

Las membranas utilizadas para los procesos cromatográficos poseen características tales como: elevada estabilidad química, no requieren empaque y trabajan a elevados flujos volumétricos lo que implica un aumento considerable de la productividad. Las propiedades antes mencionadas hacen que el escalado de procesos en membranas sea sencillo y viable **[Got04]**. El mecanismo de la

cromatografía de perfusión en membranas se puede observar con mejor claridad en la figura 2.2.

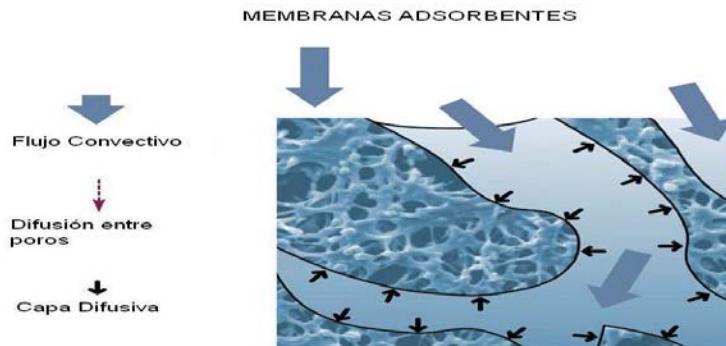


Figura 2.2. Vista parcial de las membranas Sartobind en la que se observan cómo ocurren los procesos de transferencia de masa por convección y difusión

Teniendo en cuenta que el ADNp_{se} está cargado negativamente, en este trabajo se evaluará la membrana aniónica amino cuaternaria Sartobind Q para su purificación.

2.4 Capacidad de las matrices cromatográficas

La capacidad es una medida que puede ser expresada como: capacidad iónica, capacidad disponible o capacidad dinámica. La capacidad disponible, es la cantidad de grupos cargados que se sustituyen por mililitro de gel, la capacidad iónica es la cantidad de soluto que se puede enlazar al intercambiador y la capacidad dinámica, la cantidad de soluto enlazado, cuando las condiciones experimentales incluyen el flujo.

El funcionamiento de los procesos de purificación bajo condiciones variables (flujo, tamaño de partículas y de poros) es dependiente de la velocidad de transferencia

de masa, adsorción, desorción y la dispersión sobre el eje axial. La posición general de la curva de ruptura depende de la capacidad de la columna con respecto a la concentración de la alimentación, la cual es determinada por el equilibrio. Para esto es necesario conocer algunos aspectos esenciales, y cómo realizar la curva de equilibrio [Dor94]. La adsorción es un fenómeno que ocurre en la superficie, donde un componente, ya sea un gas o un líquido, se concentra en la parte superior de una partícula sólida o en la interfase del fluido [Dor94].

El análisis de la adsorción depende en alguna medida de la relación de equilibrio, la cual determina la extensión del material que puede adsorberse sobre una superficie. Cuando el adsorbato y el adsorbente están en equilibrio, existe una distribución definida del soluto entre el sólido y la fase líquida, por lo que no se adsorbe más en la red. Los datos del equilibrio de la adsorción son expresados como las isotermas de adsorción [Lan01] [Mon05] [Gui06] [Mon07].

Isotermas de adsorción

La interacción de proteínas a un ligando ocurre principalmente en el interior de la estructura porosa de la partícula adsorbente. Esta interacción en el equilibrio en matrices cromatográficas de intercambio iónico y de afinidad ha sido descrita por la isoterma de Langmuir, ecuación 2.1 [Lan01] [Mon05] [Gui06] [Mon07].

$$q^* = \frac{q_{\max} c^* K_A}{1 + K_A c^*} = \frac{q_{\max} c^*}{Kd + c^*} \quad (2.1)$$

Siendo q^* y c^* las concentraciones de la proteína en equilibrio en la fase sólida y en la líquida respectivamente, k_A la constante de asociación y k_D la de disociación del enlace.

Esta ecuación se puede expresar de las siguientes formas:

$$\frac{q^*}{c^*} = -\frac{1}{k_D} q^* + \frac{q_{\max}}{k_D} \quad (2.2)$$

$$\frac{1}{q^*} = \frac{k_D}{q_{\max}} \frac{1}{c^*} + \frac{1}{q_{\max}} \quad (2.3)$$

$$\frac{c^*}{q^*} = \frac{1}{q_{\max}} c^* + \frac{k_D}{q_{\max}} \quad (2.4)$$

Las expresiones (2.2), (2.3) y (2.4) son transformaciones lineales de la ecuación (2.1), conocidas como representaciones gráficas de Scatchard, doble recíproca y semirecíproca, respectivamente. Si los datos experimentales muestran una dependencia lineal según estas transformaciones, entonces el sistema sigue un comportamiento de acuerdo con la isoterma de Langmuir. De esta forma, es posible determinar los parámetros q_{\max} y k_D o k_A por medio de la recta que mejor se ajuste a los datos **[Lan01] [Mon05] [Gui06] [Mon07]**.

La capacidad de equilibrio del adsorbente no estará influenciada por la configuración experimental que se emplee para su determinación, ya sea en columna empacada o en un proceso a templa, en tanque agitado o en una columna de lecho fluidizado, ya que está determinada por la naturaleza de la interacción ligando - proteína. El modelo de isoterma de Langmuir presupone adsorción monocapa, homogeneidad de los sitios de enlace y su afinidad por el

adsorbato, interacción de un sitio enlace con solo un adsorbato y no interacción de moléculas adsorbidas en sitios colindantes **[Gui06]**.

Otro modelo empleado para describir la interacción de la biomolécula con el ligando en el equilibrio es la isoterma de Freundlich, ecuación 2.5; esta considera igualmente adsorción monocapa del adsorbato sobre los sitios de adsorción, pero se le atribuye una distribución heterogénea de los sitios de adsorción. Es un modelo fundamentalmente empírico **[Gui06]**.

$$q^* = K * c^n \quad (2.5)$$

Donde: n es una constante adimensional y K es una constante de equilibrio cuyas unidades dependen de n. Las constantes n y K se determinan experimentalmente. En esencia, la velocidad a la que ocurre cada uno de los fenómenos básicos antes descritos va a determinar el paso limitante de la adsorción de una proteína a las perlas cromatográficas en el interior de una columna **[Gui06]**.

2.5 Fenómenos básicos que ocurren durante la adsorción cromatográfica

Los efectos de ensanchamiento de las señales relacionadas con la transferencia de masa y con la dispersión axial están vinculados a las etapas que se muestran en la figura 2.3. Las partículas del adsorbente del lecho empacado están rodeadas por una capa de contorno, que puede suponerse como una película de líquido estancada en la fase líquida. El grosor de la película depende de la distribución del fluido en la fase móvil del lecho empacado. El transporte de la molécula hacia la capa de contorno de la partícula por convección o difusión es la primera etapa

del proceso de separación (1), determinado por el coeficiente de dispersión axial D_{ax} .

La segunda etapa es el transporte por difusión de la molécula a través de la película de la capa, llamado difusión en la película líquida (2) y se establece una diferencia de concentración del soluto en el fluido y en la superficie del adsorbente, caracterizado por un coeficiente de transferencia de masa en la película k_s .

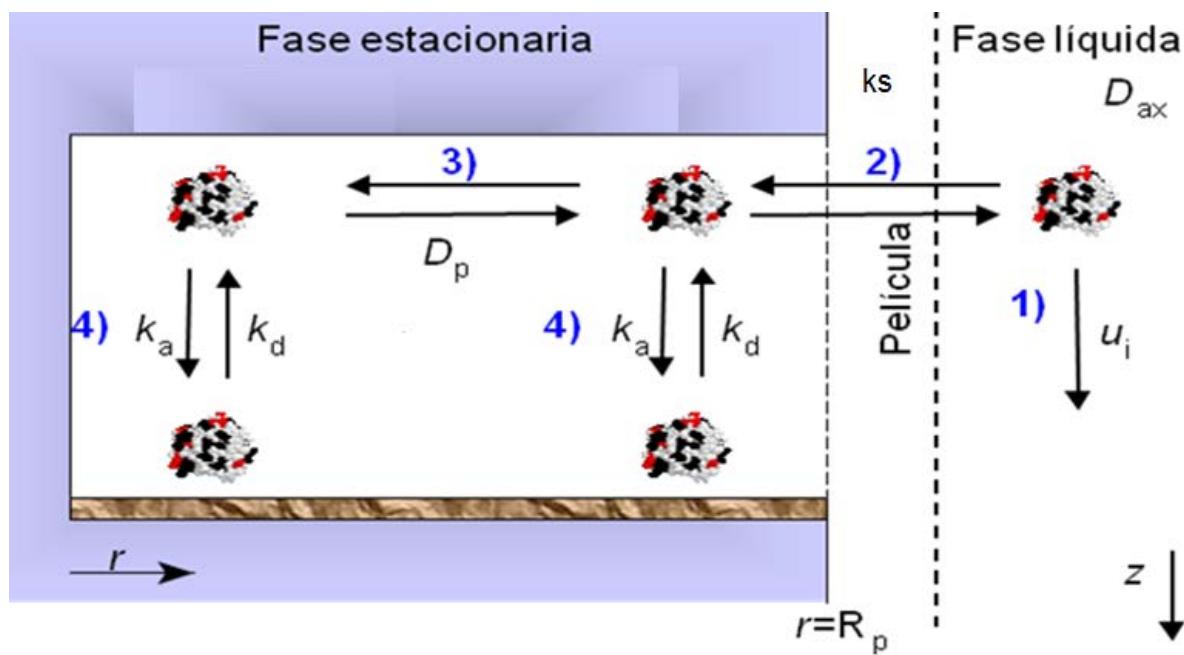


Figura 2.3: Fenómenos que tienen lugar durante la adsorción – desorción de una biomolécula en una partícula cromatográfica [Gui06]

En la tercera etapa ocurre el transporte de las moléculas hacia los sitios de adsorción dentro de los poros de las partículas del adsorbente, donde la molécula de soluto es adsorbida y transportada a lo profundo del poro por un movimiento a

lo largo de la superficie del mismo. Este fenómeno está caracterizado por el coeficiente de difusión efectivo en el poro (D_p). Una vez que la molécula de soluto alcance un sitio de adsorción libre en la superficie, el proceso de adsorción tiene lugar y se presentará la etapa (4) que estará determinada por las constantes de asociación y disociación de enlace k_a y k_d [Gui06]. Si el proceso de adsorción es lento comparado con el flujo convectivo del fluido a través del lecho empacado, las señales de elución mostrarán un ensanchamiento asimétrico, debido al lento movimiento de las moléculas de soluto al penetrar en lo profundo del poro [Gui06].

Teniendo en cuenta lo explicado anteriormente para garantizar el buen desempeño de una columna cromatográfica existen parámetros de operación que están relacionados con los fenómenos de adsorción – desorción que deberán ser controlados, por ejemplo: el tamaño de las partículas del adsorbente, la altura de la columna del adsorbente, la naturaleza del disolvente, la velocidad lineal de operación y la cantidad de material de interés en la alimentación [Gui06].

2.6 Resumen de las tecnologías reportadas en la literatura para la purificación de ADN plasmídico

Es importante tener en cuenta en este análisis que en el campo de la biotecnología con fines industriales, la mayor parte de la información científico tecnológica, que incluye los indicadores de proceso, las metodologías y los procedimientos específicos, no es pública ya que constituye conocimiento propio de las empresas. Por lo que el estudio detallado de la información se realiza a

través de los trabajos publicados, lo cual en ocasiones no muestra el detalle de los recobrados de cada una de las etapas de los procesos descritos. No obstante permite realizar los análisis de las principales desventajas de cada uno.

Solamente se informa el recobrado del proceso de Horn **[Hor95]**, donde a partir de 180 g de biomasa que contienen 21,05 mg de ADNp al final del proceso se recupera el 50% con una pureza superior al 90%. La desventaja fundamental de este proceso y el reportado por Diogo y colaboradores **[Dio00]** es que se realizan diferentes pasos de precipitación, tres de ellos con solventes orgánicos, incluso en las etapas iniciales. Esto genera grandes volúmenes a manipular durante la operación y puede constituir un riesgo desde el punto de vista de bioseguridad y afectaciones al medio ambiente. Por otra parte durante la etapa de diseño del edificio de construcción se deberán tener en cuenta estos elementos para emplear los materiales específicos para este tipo de condición, lo cual contribuye a elevar los costos tanto de la edificación como del equipamiento. Es de destacar que no se encontraron datos de aplicación de este proceso a una escala superior, lo cual valida lo dicho anteriormente.

En el proceso descrito por Ferreira **[Fer00]**, durante la lisis alcalina se añade la enzima RNasa para remover el ARN; esto constituye un elemento no deseado para cualquier proceso industrial de la industria biotecnológica actual. El origen animal de esta enzima, la convierte en un contaminante que tiene que ser eliminado y las autoridades regulatorias exigen la demostración por técnicas analíticas de que no existen elementos trazas en el producto final **[FDA07]**.

Además en el recobrado intermedio se emplea una cromatografía en modo lecho expandido. En este tipo de operación la capacidad descrita para las proteínas, que son biomoléculas de menor tamaño que el ADNp_{se}, es de un 30 % menos que en las matrices convencionales [Pra98].

2.7 Consideraciones sobre el análisis de la bibliografía

En la actualidad no se ha registrado ninguna vacuna de ADNp_{se} para humanos, sin embargo existen varios candidatos que están en diferentes fases de estudios clínicos. También existen evidencias de que el plásmido pIDKE2 obtenido por métodos analíticos produce una respuesta inmuno- específica contra las proteínas del núcleo y de la envoltura del virus de la hepatitis C en conejos y en monos, por lo que resultaría muy novedoso desarrollar una tecnología propia para la obtención de ADN plasmídico.

El desarrollo de la tecnología deberá tener en cuenta la baja concentración del ADNp_{se} en el material de partida proveniente de la etapa de fermentación, la necesidad de eliminar las cantidades de material celular no deseado: proteínas, ADNc, ARN y endotoxinas. Además el tamaño molecular del ADNp_{se}, motiva que solamente se adsorba en la superficie de las matrices cromatográficas convencionales, logrando capacidades del orden de los microgramos de ADNp_{se} por mililitro de soporte cromatográfico, por lo que es necesario encontrar nuevas alternativas de matrices con las que se logren capacidades superiores.

En general el desarrollo de una tecnología de producción que permita un rendimiento óptimo del material de interés y que cumpla con los parámetros de

calidad establecidos por las entidades regulatorias para el uso del ADN plasmídico con fines terapéuticos resulta un reto donde intervienen de forma combinada elementos tecnológicos, regulatorios y bioquímicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos, materiales y equipos empleados

Los reactivos y materiales empleados son de calidad aprobada para uso en la producción de productos farmacéuticos. El equipamiento que se utilizó estuvo apto para su uso según las especificaciones establecidas por el Departamento de Metrología de la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del CIGB. Se emplearon sistemas cromatográficos modulares compuestos por una bomba peristáltica, un detector para registrar la absorbancia a una longitud de onda de 254 nm con una sensibilidad de 0,05 unidades de absorbancia y una computadora, como registrador, con el software BioCrom.

La descripción de los reactivos, composición de disoluciones, matrices, insumos y equipos empleados se muestra en el anexo 1.

3.2 Características de los plásmidos pIDKE2 y pVEGF₁₂₁

Se utilizaron los plásmidos pIDKE2 y pVEGF₁₂₁ en los experimentos de ruptura celular y semipurificación. Las características fundamentales son:

Plásmido pIDKE2: Tamaño aproximado 5 525 pb, equivalente a 3,6 10⁶ g/mol. Compuesto por los siguientes genes: gen de resistencia a la Kanamicina, promotor inmediato - temprano del citomegalovirus humano hCMVIE, gen codificante para los primeros 650 aminoácidos (a.a) de la poliproteína de un aislamiento cubano de genotipo 1b del virus de la hepatitis C; que incluye la

cápsida y las proteínas de la envoltura E1 y una porción de la E2, terminador de la transcripción: SV40 y terminador del virus de Simio 40 **[Her00] [Due02]**.

Plásmido pVEGF₁₂₁: Tamaño aproximado del plásmido de 4 039 pb, equivalente a $2,6 \cdot 10^6$ g/mol. Compuesto por los siguientes genes: gen de resistencia a la Kanamicina, promotor inmediato - temprano de citomegalovirus humano (pCMV), gen codificante para el VEGF₁₂₁, señal de empalmado del virus vesicular de Simios 40 (SV40), señal de poliadenilación del ARNm de SV40, origen de replicación del pUC19 (Ori) **[Che00]**.

3.3 Obtención de la biomasa

La cepa empleada fue la DH10B de *E. coli* transformada con el plásmido pIDKE2. Los materiales, reactivos y el procedimiento fueron descritos por Ruíz y colaboradores **[Rui09]**. La liberación de la biomasa se realizó teniendo en cuenta la relación entre la cantidad de ADN (mg) por cantidad de biomasa húmeda (g) que debe ser mayor o igual a 0,6. El peso húmedo de las biomassas empleadas fue de $83,7 \text{ g/L} \pm 12,2$ y el índice $1,7 \text{ mg ADN/g biomasa húmeda} \pm 0,7$.

3.4 Procedimientos empleados para el desarrollo del proceso de purificación

3.4.1 Ruptura celular

La ruptura celular se realizó según el procedimiento descrito por Birnboim y Doly **[Bir79]**. En la literatura consultada se encontraron diferencias en cuanto a la composición de la disolución Liso⁻, el tiempo de mezclado una vez añadida la disolución de ruptura, así como la relación de cantidad de volumen empleado de

las tres disoluciones por gramo de biomasa húmeda (mL/g biomasa). Por lo tanto la selección de los niveles de las variables independientes empleadas en el diseño experimental para establecer las condiciones de ruptura celular se basó en las condiciones recomendadas por cada uno de estos autores **[Hor95] [Qia01]**

[Mea03] [Sha03] [Pra04]. Se diseñó un experimento del tipo multifactor categórico en el cual se definieron tres factores con diferentes niveles para estudiar su influencia sobre el rendimiento de ADNp_{se} al final de la etapa. Los atributos del diseño se exponen en el anexo 2. En la tabla 3.2 se muestran los valores descritos por este grupo de autores.

Tabla 3.2. Descripción de las variables independientes estudiadas en el diseño experimental de multifactor categórico.

VARIABLES	NIVELES
- Uso de glucosa en la disolución de solubilización de la biomasa (Liso -)	1- No (0) 2- Sí (1)
- Tiempo de mezclado una vez añadida la disolución de ruptura a la biomasa solubilizada (tmz, s)	1- 30 2- 60 3- 120
- Relación gramo de biomasa húmeda por volumen de disolución de Liso-, ruptura y renaturalización (KAc) (p/v)	1- 1/16 (6,25 %) volumen final: 48 mL / g biomasa 2- 1/12 (8,33 %) volumen final: 36 mL / g biomasa 3- 1/8 (12,5 %) volumen final: 24 mL / g biomasa

El tiempo se consideró variable numérica, la relación gramo de biomasa por volumen de disolución y la adición o no de glucosa se consideraron variables categóricas. El diseño experimental para el establecimiento de las condiciones de ruptura se realizó empleando 1 g de biomasa. Posteriormente se realizó la ruptura de 200 g de biomasa en recipientes de 5 L empleando las condiciones que se establecieron en el diseño experimental. A esta escala se denominó “banco”, mientras que la escala “piloto” se realizó con 400 g de biomasa para lo cual se utilizaron tanques de 20 L. El cálculo de los volúmenes de disolución a utilizar se realizó por relaciones de proporcionalidad lineal.

Una vez concluida la ruptura, el material precipitado se eliminó empleando una centrífuga HITACHI modelo SCR 7BA, con el rotor RPR9-2-526 a 1618 g y una temperatura de 4°C. Al material resultante al final del procedimiento de separación se le llamó neutralizado clarificado.

3.4.2 Purificación primaria y purificación final

3.4.2.1 Concentración del neutralizado clarificado

Previo a las etapas de cromatografía, se realizó la concentración del neutralizado clarificado a 20°C, con el objetivo de reducir el volumen del material que se aplicará en el siguiente paso cromatográfico.

Se utilizó un sistema de filtración tangencial, empleando membranas de polietersulfona del proveedor Sartorius [[web1](#)], con un área de filtración de 0,1 m² y una porosidad para la retención de biomoléculas de tamaño molecular por encima

de 1×10^5 g/mol. La limpieza y acondicionamiento de la membrana se realizó según las recomendaciones del proveedor **[web1]**. En la escala de banco se utilizó una membrana, mientras que en la escala piloto se emplearon tres. La concentración se realizó manteniendo la presión transmembránica constante con una presión en la entrada de la membrana de 0,14 MPa y 0,02 MPa a la salida. El material resultante en esta etapa se denominó neutralizado concentrado.

3.4.2.2 Cromatografía de exclusión molecular empleando la matriz Sepharose CL 4B (GF1)

El procedimiento empleado fue el descrito por Stadler y colaboradores **[Sta04]** cuando utilizaron la matriz Sepharose CL 6B. En este trabajo se utilizó la matriz Sepharose CL 4B **[web2]**.

Los experimentos se realizaron en una columna de 1,6 cm de diámetro con una altura de 47 cm, a 20°C y una velocidad lineal de 15 cm/h, empleando las disoluciones de gel filtración 1 y el de higienización descritos en el anexo 1. Los estudios se realizaron utilizando los plásmidos pIDKE2 y el pVEGF₁₂₁. La calidad del empaque de la columna se verificó según lo sugerido por el fabricante de la matriz **[Ame02]**. La selección del intervalo de las variables independientes del diseño experimental se realizó teniendo en cuenta lo descrito por Stadler y colaboradores **[Sta04]**. Además se aplicaron criterios que mejoran la productividad y el ahorro por concepto de consumo del reactivo sulfato de amonio en la disolución empleada y por la cantidad de material aplicado a la columna (carga). El diseño experimental fue del tipo factorial multinivel 3¹ * 2². En la tabla

3.3 se describen los niveles de cada uno de los factores y en el anexo 5 se exponen los atributos del diseño.

Tabla 3.3: Descripción de los niveles de los factores estudiados para la optimización de la etapa de separación primaria

VARIABLES INDEPENDIENTES	NIVELES
- Carga aplicada a la columna (%)	-1- 30 0- 35 1- 40
- Concentración de sulfato de amonio en la disolución GF 1(mol/L)	-1- 1,5 mol/L 1- 2 mol/L
- Tamaño de plásmido (g/mol)	-1- $2,6 \times 10^6$ 1- $3,6 \times 10^6$

La cantidad de muestra aplicada a la columna depende del volumen de matriz empacado y del porcentaje de carga donde:

$$\text{Cantidad de muestra a aplicar} = \text{Volumen de matriz empacado} \times \% \text{ de carga}.$$

La escala de banco del proceso se estableció para 200 g de biomasa, en una columna de 11,3 cm de diámetro y una altura de 47 cm a 20°C. La escala piloto que se implementó fue en una columna de 20 cm de diámetro a 20°C y se mantuvieron constantes la velocidad lineal, la altura y el volumen de muestra por volumen de matriz.

La evaluación del factor de escala se realizó teniendo en cuenta la relación (R) que existe entre un volumen de columna (VC) y el volumen de columna en el cual eluye el ADN plasmídico VC_e [Dor94]:

$$R = \frac{VC}{VC_e} \quad (3.1)$$

Donde el VC_e se define como el producto de la velocidad lineal (v) y la variación del tiempo entre la aplicación de la muestra de neutralizado (t₀) y el tiempo de elución del ADN plasmídico (t_e) [Dor94]:

$$VC_e = v^* (t_e - t_0) \quad (3.2)$$

Una vez establecidas las condiciones de operación para el intervalo estudiado se realizaron los experimentos necesarios para el suministro de material y determinar las condiciones en las etapas siguientes. El material resultante en esta etapa se denominó GF1.

3.4.2.3 Estudios de adsorción con las matrices POROS R1 50 y Sartobind Q75

La determinación de la isoterma de adsorción del sistema POROS R1 50 - plásmido pIDKE2 se realizó según la metodología descrita por Hidalgo y Dorán [Vic09] [Dor94]. Los experimentos se realizaron con 3 réplicas a una temperatura de 20°C, la disolución de equilibrio que se utilizó fue GF1, descrita en el anexo 1.

Los estudios de capacidad dinámica se realizaron en una columna de 0,5 cm de diámetro y 5 cm de altura, lo que equivale a 1 mL de gel POROS R1 50 [web3].

Se aplicó la muestra, hasta la saturación visible por cromatograma, a diferentes

flujos 0,69; 1,67 y 3,33 mL/min, teniendo en cuenta las recomendaciones del suministrador **[web3]**.

También se realizaron estudios preliminares de capacidad dinámica empleando la membrana Sartobind Q 75, la cual tiene un volumen equivalente de 2,1 mL **[web4]**. Se utilizó un procedimiento similar con flujos de 3 y 5 mL/min a una temperatura de 20°C. Los experimentos se realizaron con muestras de plásmido pIDKE2 puro. En este caso se utilizó la disolución TE 1X.

3.4.2.4 Establecimiento de las condiciones de operación en la matriz POROS R1 50.

La selección de la condición de elución en la matriz POROS R1 50 se realizó por lote con un volumen de gel de 0,5 mL (1 VC). El coeficiente de hinchamiento del gel es de 0,252 g/mL. El gel se acondicionó según las recomendaciones del fabricante **[web3]**. Primeramente el gel se lavó con 10 VC de agua para inyección, seguidamente se equilibró con 3 VC en un agitador horizontal durante 5 minutos, con la disolución de equilibrio GF1, después se aplicó la muestra de interés y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se detuvo la agitación y se dejó reposar para eliminar el sobrenadante. Seguidamente se lavó con 10 VC de agua para inyección y seguidamente se aplicaron 3 solventes para la elución: etanol, acetonitrilo o metanol al 40% (v/v) en el tampón TE 1X.

Una vez seleccionado el mejor agente de elución se realizaron todas las operaciones en una columna de 1,6 cm de diámetro y 1 cm de altura lo que

equivale a 2 mL de gel, con flujo volumétrico de 2 mL/min, equivalente a velocidad lineal de 60 cm/h. Después del equilibrio, la aplicación y el lavado, para ajustar la condición de elución, se realizó un gradiente por paso en 15 VC con acetonitrilo utilizando en la posición A: agua para inyección y en la posición B: TE 1X acetonitrilo 40% (v/v). La regeneración de la matriz se realizó con isopropanol 90% (v/v), según lo sugerido por el fabricante **[web3]**.

El cálculo de las dimensiones de la columna utilizada en la escala de banco del proceso de purificación a partir de 200 g de biomasa, se realizó teniendo en cuenta la masa que se obtiene de la etapa precedente (mg de ADNp_{se}), la capacidad máxima ($q_{máx}$) y la dinámica determinadas en el acápite 3.4.2.3. Se utilizó una columna de 5 cm de diámetro y altura de matriz empacada de 3,5 cm (69 mL). El flujo volumétrico empleado fue de 19,6 mL/min equivalente a una velocidad lineal de 60 cm/h.

La escala piloto se diseñó manteniendo constante la capacidad (cantidad de ADNp_{se} por volumen de matriz). Se aumentó la cantidad de gel a 490 mL, equivalente a 25 cm de altura; no se varió el diámetro de la columna. Se calculó el tiempo de residencia 7 min y el flujo calculado fue de 70 mL/min equivalente a una velocidad lineal de 214 cm/h, lo cual se encuentra en el intervalo recomendado por el suministrador **[web3]**.

La fracción que se obtiene en esta etapa con el ADNp_{se} se denominó eluato de fase reversa.

3.4.2.5 Concentración del eluato de la cromatografía de fase reversa

Previo a la etapa de purificación final se realizó la concentración del eluato de fase reversa. Se utilizó un sistema de filtración tangencial de 200mL, con una membrana de polietersulfona que tiene un área de filtración de 0,1 m² y una porosidad para la retención de biomoléculas de tamaño molecular por encima de 1x10⁵ g/mol [web1]. La presión transmembránica se mantuvo constante, la presión en la entrada de la membrana fue de 0,14 MPa y a la salida 0,02 MPa. Es válido aclarar que la membrana utilizada en esta etapa es dedicada. La limpieza y acondicionamiento de la membrana se realizó según las recomendaciones del proveedor [web1]. El material resultante en esta etapa se denominó muestra inicial de GF 2 (MI GF2).

3.4.2.6 Cromatografía de gel filtración 2 (GF2)

Se realizó según el procedimiento descrito por Horn y colaboradores [Hor95] empleando la matriz “Sephacryl S-1000” [web5] y la disolución de corrida gel filtración 2, descrito en el anexo 1. La calidad del empaque de la columna se verificó según lo sugerido por el fabricante de la matriz [Ame02].

El proceso en la escala de banco para 200 g de biomasa se realizó en una columna de 5 cm de diámetro y 40 cm de altura, a un flujo de 4,8 mL/min. Se aplicó entre el 3 y el 5% del volumen de matriz. Una vez que se observó el aumento de la absorbancia se colectaron fracciones de 50 mL hasta que la señal alcanzó la línea base nuevamente.

La escala piloto se realizó en una columna de 10 cm de diámetro manteniendo la altura, la velocidad lineal y la carga aplicada constante, siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 3.4.2.2.

3.4.2.7 Concentración y filtración final

El procedimiento empleado fue similar al descrito en la etapa de concentración previa a la cromatografía de gel filtración 2. Sin embargo, antes de concentrar se añadió EDTA a una concentración de 372,4 g/L para garantizar la eliminación de endotoxinas **[Pet00]**. El material de interés se concentró hasta alcanzar $2 \pm 0,5$ mg/mL; posteriormente se diafiltró con siete volúmenes del tampón de gel filtración 2, para el cambio a la solución de formulación final. La muestra de salida de esta etapa se denominó fracciones concentradas de S 1000.

Como último paso se realizó la filtración esterilizante empleando filtros de tamaño de poro de 0,2 μm teniendo en cuenta el procedimiento recomendado por el fabricante **[web6]**.

El producto filtrado se envasó en tubos de polipropileno de 1 mL a razón de 0,5 mL por tubo; del total de bulbos 35 fueron separados para realizar los diferentes ensayos que exigen las autoridades regulatorias para productos biotecnológicos cuyo principio activo es un plásmido **[Sta04, FDA07]**.

3.5 Métodos analíticos para el control de proceso y la liberación del producto terminado

Durante el control del proceso se utilizaron los métodos de determinación de la concentración y la pureza de ADN_{se}. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm, en un espectrofotómetro uv/vis y la concentración se determinó teniendo en cuenta el valor de absorbancia, el factor de dilución y el factor asociado a la muestra de ADN_{se} donde 1 uDO es equivalente a 50µg/mL de ADN de doble cadena [Riv07].

*Concentración (µg/mL) = absorbancia 260 * 50 * factor de dilución [Riv07]*

La pureza se determinó a partir de electroforesis en geles de agarosa 0,8%; donde las moléculas de ADN y ARN resultan identificadas por la tinción con bromuro de etidio [Riv07]. Para la electroforesis se utilizó la disolución TAE, cuya composición se describe en el anexo 1. Previo a la corrida electroforética, se realiza un cambio de disolución a las muestras con elevado contenido de sales a TE 1X para evitar interferencias. Posteriormente estas muestras se precipitan, si es necesario, para lograr que la masa aplicada en el gel esté entre 1 y 10 ng, cantidad óptima que puede ser detectada por la observación en el transiluminador de luz ultravioleta. La pureza fue calculada empleando el software 1D Manager versión 2, 1999, Madrid, España.

Una vez que se estableció el proceso en la escala de banco se realizó la cuantificación de la cantidad de acetonitrilo presente en el producto terminado.

Las muestras y los patrones se inyectaron directamente a una columna Porapak Q con una temperatura de 120°C, instalada en un cromatógrafo gaseoso.

La liberación de los lotes de producto terminado se realizó a partir de las regulaciones vigentes para productos que contienen ADNp_{se}. Los ensayos realizados fueron: concentración y pureza del ADNp_{se}, determinación de proteínas totales, determinación del contenido de endotoxinas, análisis de restricción, identidad según tamaño molecular, actividad biológica, esterilidad, seguridad general, contenido de ARN, contenido de ADN hospedero, pH, volumen y características organolépticas **[Smi85] [Pet00] [Alv06] [Riv07] [FDA07]**.

3.6 Diseño experimental, análisis estadístico y modelación de proceso

Los diseños experimentales se realizaron con 2 réplicas y los análisis estadísticos se hicieron empleando el software *Statgraphics Centurion XV* (Virginia, EUA). Los cálculos y el procesamiento de los datos primarios se realizaron con el paquete de *Excel del Windows 7*. Para la modelación del proceso y el análisis técnico – económico se utilizó el software *SuperPro Designer Academic* versión 5.1 (Intelligen, MIT, EUA)

El diagrama de flujo se dividió por secciones según las etapas correspondientes a la purificación primaria, final y envase del producto terminado. El índice de Peter asociado a los costos de área por concepto de edificación se seleccionó según los requerimientos de clasificación de área y los cambios por hora de circulación del aire: 0,45 purificación primaria; 0,85 purificación final y 0,95 operaciones de

filtración final y envase **[Pet91]** **[Pet03]** **[web7]**. Es válido aclarar que el llenado y envase de los bulbos se realizó de forma manual en la misma área que se realizó la filtración final.

Parámetros como el tiempo de vida útil, la capacidad, la cantidad de material aplicado, volúmenes de disoluciones y volúmenes de cada una de las matrices cromatográficas fueron elementos a tener en cuenta de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo durante la escala de experimental, de banco y piloto. De igual forma se procedió para el diseño y selección de las dimensiones del equipamiento, número de membranas para los sistemas de filtración tangencial y materiales de construcción de los equipos e insumos. El cálculo de la depreciación se estimó por el método de la línea recta considerando 10 años como período de depreciación y un 5 % del costo de inversión inicial al final **[Pet03]**. Se tuvieron en cuenta además gastos por concepto de investigación- desarrollo en la etapa de purificación de 10 000 000 USD **[Dim07]**, un 10% de rechazo de producto y un impuesto sobre el 60% de las utilidades, conocido en Cuba como resultado patrimonial positivo **[Lim11]**. Los precios de los equipos, reactivos, matrices y misceláneas son los datos reales que existen en el CIGB según la dirección de logística **[Log11]**.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Establecimiento de las condiciones de operación de la ruptura celular

El estudio de la ruptura celular se realizó suponiendo la etapa como una “caja negra”, figura 4.1, en la cual el material de partida es la biomasa y el de salida el material neutralizado que contiene el ADNp_{se}, producto de interés; además están presentes otros contaminantes como son: proteínas, restos celulares, endotoxinas, ADNc y ARN.

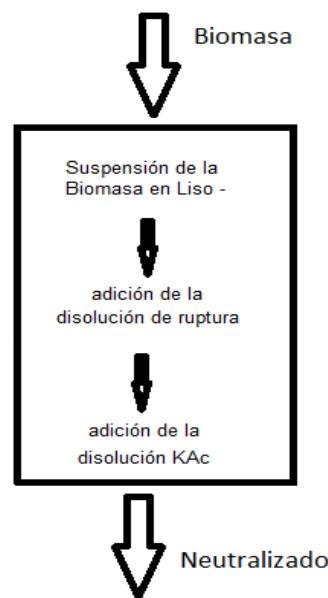


Figura 4.1: Esquema que representa la etapa de ruptura celular suponiendo una “caja negra”

En el acápite 3.4.1 se describe el procedimiento utilizado, así como los niveles de los tres factores estudiados uso de glucosa, tiempo de mezclado y relación volumen de disolución por gramo de biomasa.

Con los datos experimentales, anexo 3, se realizó el análisis de la interacción entre los factores para la cantidad de ADNp_{se} obtenido por gramo de biomasa. Se observó que el uso de la glucosa influye significativamente, con un 95 % de nivel de confianza, sobre el rendimiento de plásmido obtenido, así como las interacciones entre los tres factores estudiados, figuras 4.2 a y 4.2 b.

Los valores P del análisis de varianza, anexo 4, mostraron la significancia estadística del factor uso de glucosa y la interacción entre los factores estudiados en el diseño experimental con un nivel de confianza del 95 %. Los resultados indican que para obtener la mayor cantidad de plásmido super enrollado por gramo de biomasa al final de la ruptura celular se debe emplear glucosa en la disolución Liso⁻, un tiempo de mezclado después de añadida la disolución de ruptura de 120 s y en cuanto a la relación de volumen de disolución por gramo de biomasa puede ser empleada tanto la relación 2 como la 3. Sin embargo, el desarrollo del proceso se realizó con la relación 2 para evitar elevados volúmenes de disolución y por ende mayor consumo de reactivos, lo que implicaría un mayor costo por este concepto.

Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito con anterioridad por Meacle, Shamlou y Prazeres **[Mea03] [Sha03]**, donde el tiempo de mezclado de 120 s es el adecuado para disolver la pared de la membrana celular en la disolución alcalina con SDS. Por otra parte, la adición de glucosa se realiza con el objetivo de evitar el cizallamiento del plásmido super enrollado durante la resuspensión de la biomasa y su posterior procesamiento. Además, según Horn y colaboradores, el

uso de la glucosa pudiera contribuir a una mejor separación durante la centrifugación, favoreciendo a la separación de la fase líquida de la sólida **[Hor95]**.

A partir de los resultados obtenidos del diseño experimental se realizó un aumento de la escala de trabajo de la ruptura celular tal y como se describe en el acápite 3.4.1 para procesar 200 g de biomasa húmeda.

El rendimiento obtenido fue de 4,47 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa húmeda. Este resultado fue superior al descrito por Horn y colaboradores **[Hor95]**, cuando a partir de 180 g de biomasa obtuvieron 19,07 mg de ADNp_{se} resultando un rendimiento de 0,1 mg ADNp_{se} por gramo de biomasa húmeda.

El volumen promedio de neutralizado clarificado obtenido una vez concluida la ruptura celular fue de $7 \pm 0,2$ L, por lo que se hizo necesaria la introducción de un paso de concentración por filtración tangencial **[Kah00]** **[Ken02]** **[Duv03]**.

El procedimiento utilizado se describe en el acápite 3.4.2.1; el ADNp_{se} se obtuvo en la fracción concentrada recuperando el 65±5%, manteniendo la presión transmembránica constante. Similares resultados fueron descritos por Duval, Khan y colaboradores cuando utilizaron este procedimiento añadiendo previamente la sal CaCl₂ para reducir los niveles de ARN previo a una cromatografía de intercambio iónico **[Kah00]** **[Duv03]**.

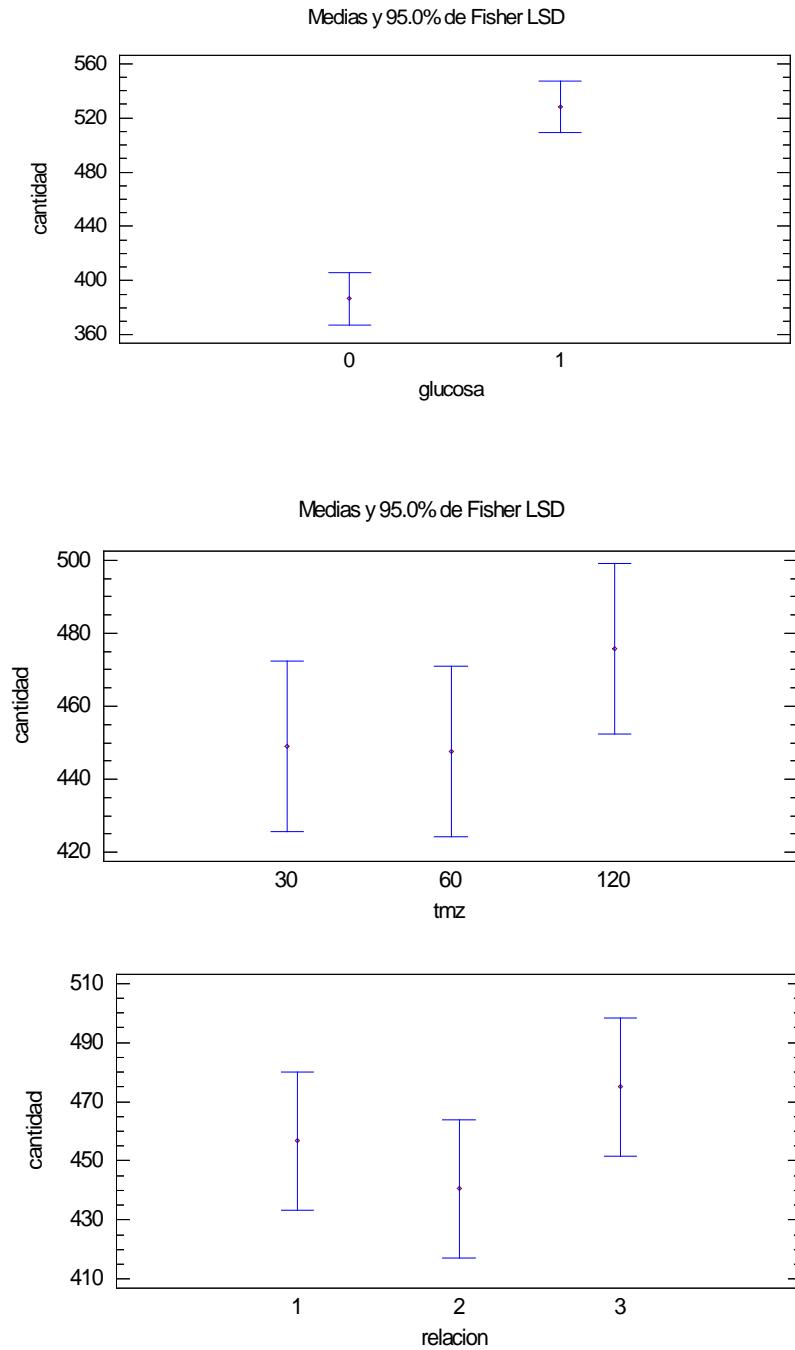


Figura 4.2 a) Gráfico de medias de cada una de las variables analizadas sobre la cantidad de ADNp_{se} (μg) que se obtuvo una vez realizada la ruptura celular

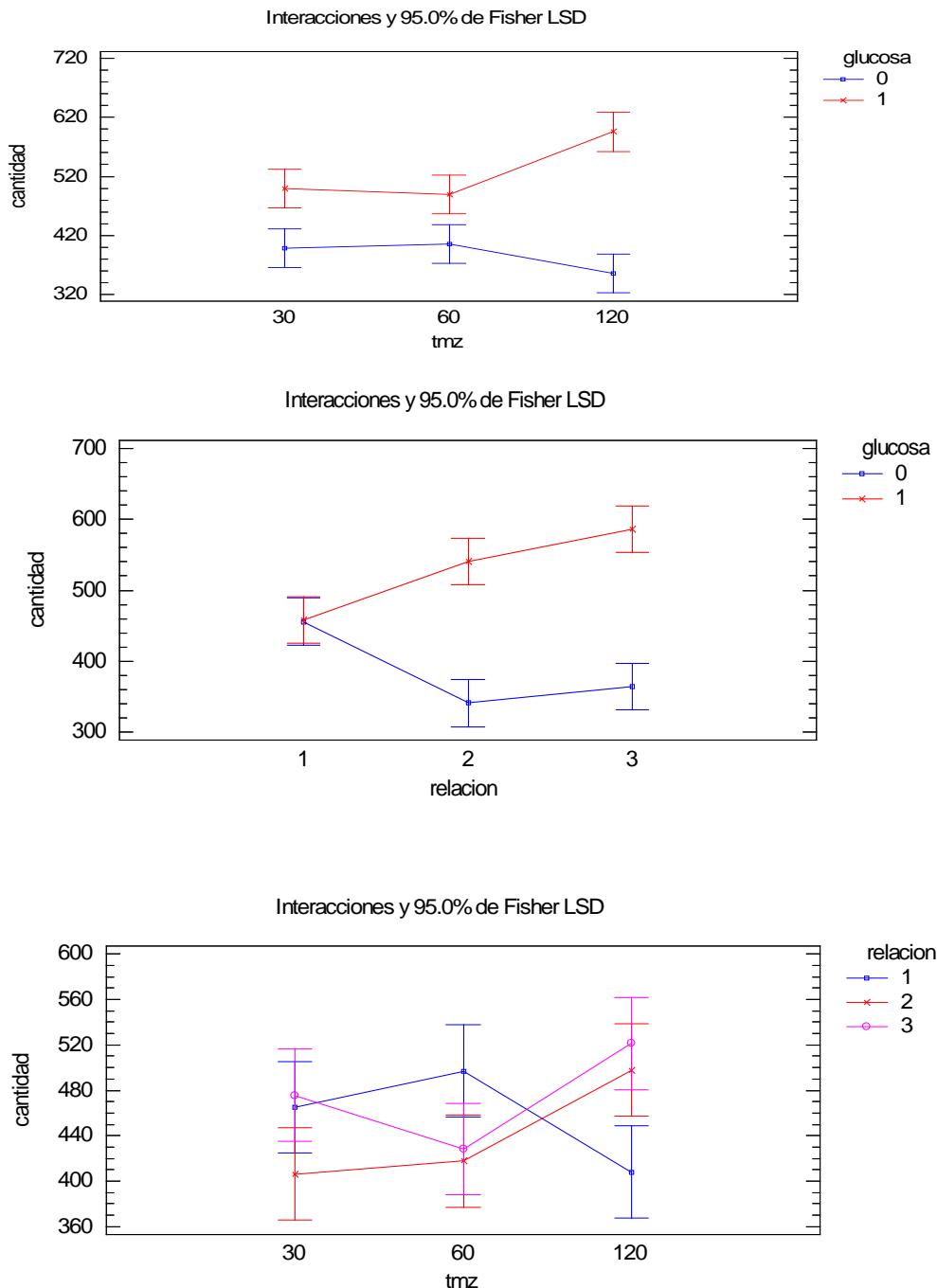


Figura 4.2 b) Gráfico de interacciones de cada una de las variables en el que se observa la influencia sobre la cantidad de plásmido super enrollado (μ g) obtenido al final de la etapa de ruptura para un nivel de confianza del 95%

4.2 Establecimiento de la etapa de purificación primaria

De acuerdo a lo que se expone en el acápite 2.2.2, después de la ruptura celular el ARN y las proteínas representan los mayores contaminantes del ADN_{se}. En ese capítulo también se explicó cómo a partir del uso de disoluciones con elevada concentración salina es posible lograr diferencias en los tiempos de elución del ADN_{se} y el ARN **[Dio00] [Sta04]**.

Una forma de eliminar estos contaminantes es mediante el uso de la cromatografía de exclusión molecular **[Sta04]**. Hasta el momento los trabajos previos describen el uso de la matriz Sepharose CL 6B la cual tiene un costo más elevado que la matriz Sepharose CL 4B debido al grado de entrecruzamiento que se logra durante la preparación química de ambas matrices **[Ame02]**.

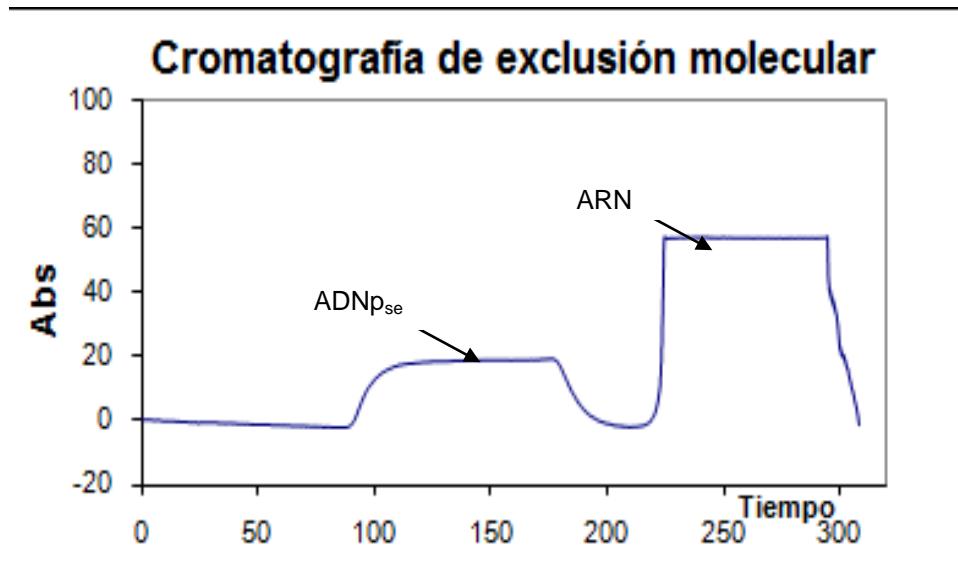
Previo a realizar los experimentos se comprobó la calidad del empaque ya que para cualquier resina cromatográfica, antes de su uso, se debe evaluar este parámetro para considerar un apropiado proceso de transferencia de masas durante la operación **[Jan98] [Ame02]**. El procedimiento utilizado fue el descrito en el acápite 3.4.2.2. Los resultados mostraron un factor de asimetría de 0,8, el cual se considera adecuado según lo establecido por el fabricante de la matriz **[Ame02]**.

El estudio de optimización se realizó según se describe en el acápite 3.4.2.2. Se consideraron los factores concentración de la sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la disolución de corrida y la cantidad de muestra inicial aplicada a la columna que contiene la

matriz y se evaluó la influencia de estos sobre la separación del ADN_{se} con respecto al ARN y la eliminación de las proteínas en el material de interés a la salida de la columna. Se empleó la matriz Sepharose CL 4B con dos plásmidos con una diferencia de tamaño de $1 \cdot 10^6$ g/mol. En cuanto a la separación del ADN_{se} y el ARN el análisis se basó en los registros de las corridas experimentales los cuales mostraron una separación del 100% entre el ADN_{se} y el ARN, cuando se utilizó una carga del 30%, figura 4.3a. Este resultado fue corroborado cuando se aplicaron las muestras de las fracciones obtenidas en los geles de agarosa al 0,8%, figura 4.3b.

Sin embargo, cuando se utilizó una carga del 40% la resolución entre el ADN_{se} y el ARN no fue la adecuada, tal y como se observa en el anexo 6. Este resultado se corresponde con lo descrito por Janson y Tejeda **[Jan98] [Tej95]**, los cuales plantean que la cantidad de muestra aplicada a una columna influye directamente sobre la resolución.

a)



b)

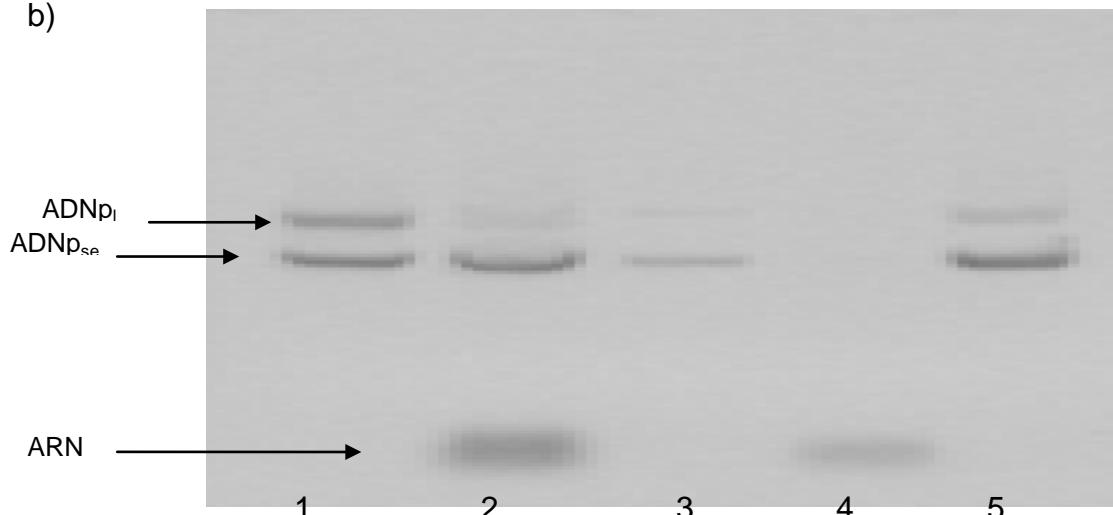


Figura 4.3: a) Registro típico de las corridas experimentales realizadas cuando se aplicó una cantidad de muestra inicial equivalente a una carga del 30%, el tiempo en minutos. b) Electroforesis en gel de agarosa 0,8% en la que se observa la separación entre el ARN y el ADNp_{se}. Líneas 1 y 5 controles positivos; línea 2 material neutralizado concentrado que se aplica a la chromatografía de exclusión molecular; línea 3 fracción que contiene el ADNp_{se}; línea 4 fracción que contiene el ARN.

En cuanto a la eliminación de las proteínas en el material resultante que contiene el ADNp_{se} a la salida de la cromatografía de exclusión molecular, se observó una influencia negativa del efecto cuadrático de la carga aplicada (AA), así como la combinación de la carga con el tamaño del plásmido (AC). Sin embargo, la carga (A) y la interacción de esta con la concentración de sulfato de amonio (AB) ejercen una influencia positiva. Mientras, el tamaño del plásmido (C) la concentración del sulfato de amonio (B) y la combinación de estos dos factores (BC) resultaron efectos no significativos, figura 4.4 a. El análisis de varianza se realizó con un 95 % de confianza y corroboró estos resultados, anexo 7. La ecuación general del modelo en el que se tienen en cuenta todos los factores se describe a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de proteínas} = & 0,06325 + 0,00788 * \text{Carga (A)} - 0,0005 * \text{ConcSulf (B)} + \\ & 0,003 * \text{tamaño (C)} - 0,014123 * \text{Carga}^2 \text{ (AA)} + 0,00713 * \text{Carga} * \text{ConcSulf (AB)} \\ & - 0,00613 * \text{Carga} * \text{tamaño (AC)} - 0,00233 * \text{ConcSulf} * \text{tamaño (BC)} \end{aligned}$$

$$R^2 = 96\%$$

El análisis del gráfico de los efectos principales para la variable cantidad de proteínas mostró la existencia de una condición donde es posible minimizarla, teniendo en cuenta los factores carga y tamaño de plásmido, figura 4.4 b. Además se corrobora el resultado del diagrama de Pareto de que la concentración de sulfato de amonio es un factor que no tiene influencia significativa.

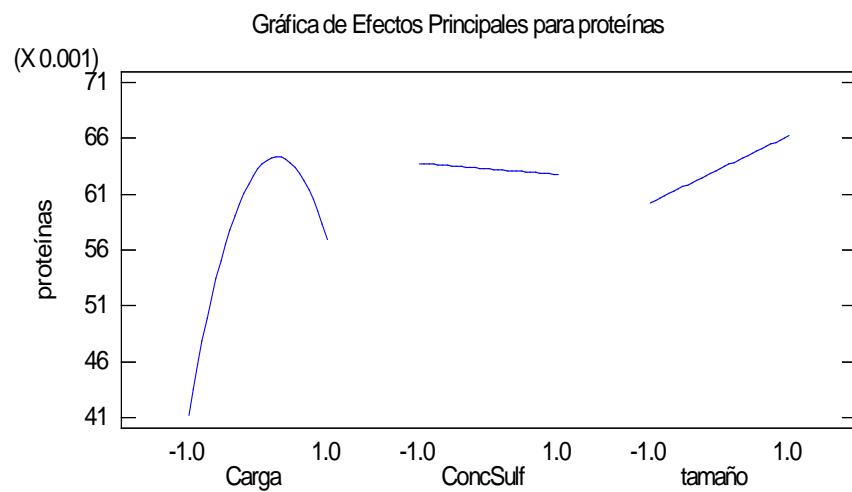
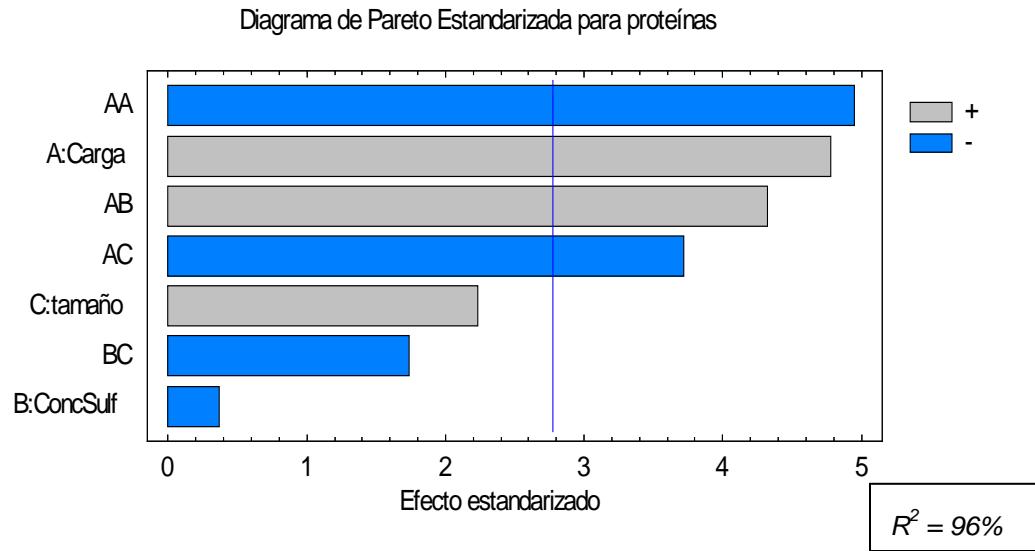


Figura 4.4: a) Diagrama de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores evaluados en la remoción de proteínas para una probabilidad del 95% y b) gráfico de efectos principales de los factores sobre la cantidad de proteínas a la salida de la columna previo a la optimización

La determinación del punto mínimo de la cantidad de proteínas se realizó con los factores que tienen una influencia significativa sobre esta variable, por lo que se eliminaron los efectos no significativos obteniéndose el siguiente modelo:

$$\text{Proteínas} = 0,0633 + 0,0079 * \text{Carga (A)} - 0,01413 * \text{Carga}^2 (\text{AA}) + 0,0071 * \text{Carga} * \text{ConcSulf (AB)} - 0,0061 * \text{Carga} * \text{tamaño (AC)}.$$

$$R^2 = 87,4\%$$

En la figura 4.5a se muestran los resultados de la superficie de respuesta obtenida para la cantidad de proteínas presentes en la fracción del ADNp_{se} teniendo en cuenta los factores que tienen una incidencia significativa, con un 95% de confianza.

De acuerdo a la optimización se estima que el mínimo de concentración de proteínas sea 0,028 mg/mL, que corresponde a un mínimo local para el intervalo estudiado. El modelo sugiere emplear la variable carga en la posición -1, correspondiente a 30%. Los factores carga y tamaño del plásmido no ejercen influencia significativa de forma independiente, empero las interacciones carga – concentración de sulfato de amonio y carga – tamaño de plásmido si, figura 4.5b. La selección de la concentración de sulfato de amonio se basó en el criterio de ahorro por concepto de consumo de este reactivo, mientras que el tamaño del plásmido aportó que es posible lograr una mínima cantidad de proteínas contaminantes para plásmidos con una diferencia de tamaño de $1 \cdot 10^6$ g/mol, empleando las condiciones de flujo volumétrico y carga estudiadas

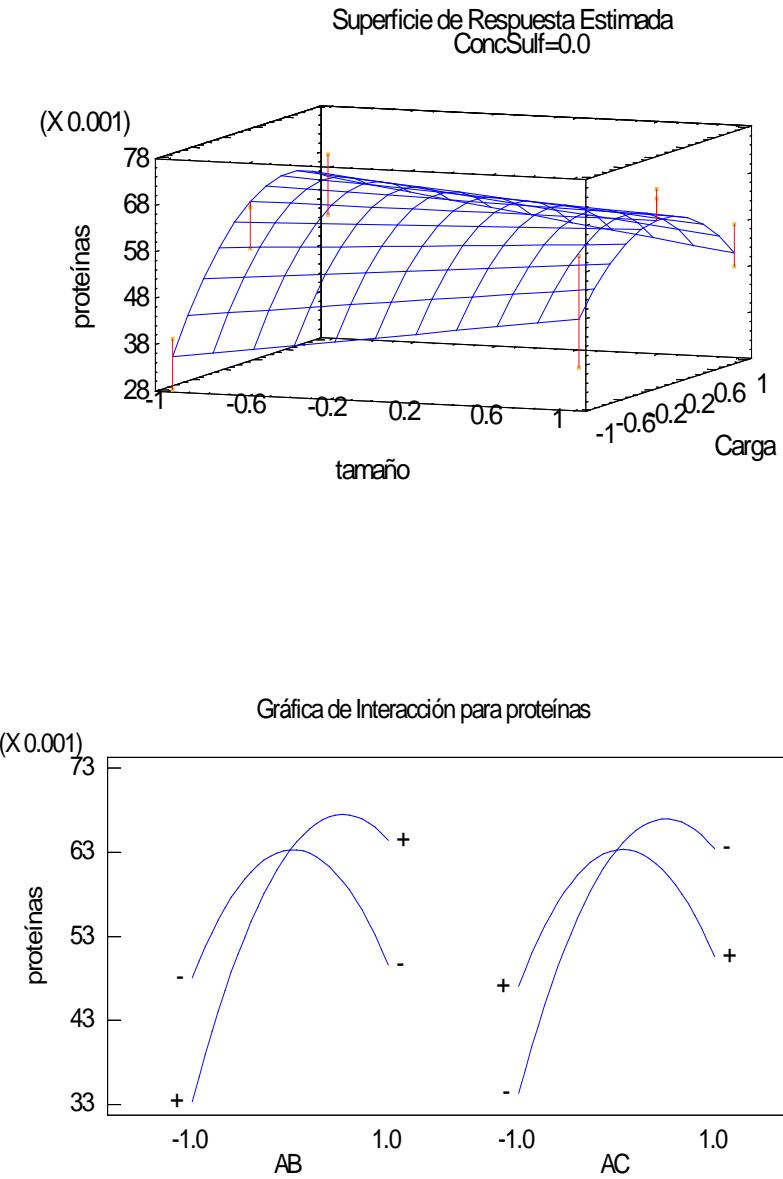


Figura 4.5 a) Superficie de respuesta estimada para la cantidad de proteínas que se obtienen en la fracción que contiene el ADNp_{se} en función de los factores que tienen influencia significativa para un 95% de probabilidad; b) gráfico de interacciones con incidencia significativa sobre la cantidad de proteínas

El experimento de verificación del óptimo se realizó para los dos plásmidos de diferente masa molar $2,6 \cdot 10^6$ g/mol y $3,6 \cdot 10^6$ g/mol; con una carga del 30% y una concentración de sulfato de amonio de 198,2 g/L en la disolución de corrida. Los resultados obtenidos de concentración de proteínas en la fracción de ADNp_{se} a la salida de la columna fueron de 0,024 mg/mL y de 0,026 mg/mL, respectivamente. Este resultado se corresponde con un error relativo con respecto al modelo por debajo del 10%; por lo que se pueden confirmar las condiciones del óptimo sugeridas por el modelo, para el intervalo estudiado.

Los resultados expuestos en este trabajo coinciden con lo descrito para la matriz Sepharose CL 6B, donde Stadler y colaboradores demostraron que los mejores resultados de separación entre el ADNp_{se} y el ARN se obtuvieron cuando se emplearon concentraciones de sulfato de amonio por debajo de 356,8 g/L, ya que a partir de esta concentración se produjo una pérdida de selectividad del gel, debido a que las moléculas se compactan y entran en los poros, por lo que no ocurre la separación deseada de las moléculas **[Sta04]**. También Sandberg y colaboradores **[San04]** obtuvieron resultados similares con la matriz Sepharose CL 6B para un plásmido de $4,0 \cdot 10^6$ g/mol. Por otra parte los resultados muestran que para el establecimiento de la cromatografía de gel filtración 1 los parámetros a controlar son: flujo volumétrico, altura del lecho empacado, la conductividad de la disolución de corrida, que es una medida de la concentración de la sal sulfato de amonio empleada en la disolución de corrida, y el volumen de muestra que se aplicará a la columna, que deberá ser el 30% del volumen de matriz empacada.

El establecimiento de la escala de banco se realizó tal y como se describe en el acápite 3.4.2.2 y se obtuvo un rendimiento de 1,26 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa, con un recobrado del 52%.

Resulta válido destacar que hasta el momento no existen trabajos previos en la literatura del uso de la matriz Sepharose CL 4B para la separación del ADNp_{se} y el ARN con un mínimo contenido de proteínas. Por cada litro que se utilice de la matriz Sepharose CL 4B se ahorran 316 USD comparado con la Sepharose CL 6B; por lo que esta nueva aplicación resulta un **aporte económico** de este trabajo.

4.3 Establecimiento de la etapa de purificación

4.3.1 Evaluación de la matriz POROS R1 50 para la purificación de ADN plasmídico

En la etapa precedente se utiliza la cromatografía de gel filtración en presencia de una disolución que contiene una alta concentración salina, la cual modifica las propiedades hidrodinámicas así como también la exposición de los grupos hidrofílicos del ADNp_{se}. Por lo que, se decidió evaluar la matriz de fase reversa POROS R1 50 para la purificación del plásmido pIDKE2 en la disolución de corrida gel filtración 1 descrito en el anexo 1 que contiene 198,2 g/L de sulfato de amonio pH 7 ± 0,2 .

Con el objetivo de estimar la capacidad máxima de adsorción y la constante de disociación se determinó la isoterma de adsorción, siguiendo el procedimiento

descrito en 3.4.2.3. Se utilizó el modelo de Langmuir por ser el más empleado para describir la interacción matriz – plásmidos de ADN y porque comparado con el modelo de Freundlich ajusta mejor **[Fer00]** **[Mon07]** **[Tar08]**.

En el anexo 8 se muestran los datos experimentales de la isoterma de adsorción obtenidos para el sistema POROS R1 50 – plásmido pIDKE2.

Varios investigadores realizan el análisis del modelo de Langmuir a partir de la linealización de la ecuación que lo describe, sin embargo, otros lo analizan como regresión no lineal **[Gui06]**. El problema con estos métodos es que la transformación distorsiona el error experimental. La regresión lineal supone que la dispersión de puntos alrededor de la línea sigue una distribución *Gaussiana* y que la desviación estándar es la misma en todos los valores de X. Estos supuestos son generalmente incorrectos después de la transformación de datos **[Gui06]**. En este trabajo se utilizaron ambos procedimientos para comparar la diferencia de los resultados. En el anexo 9 a) se muestra el gráfico correspondiente a la forma linealizada del modelo de Langmuir semi recíproca, así como el análisis de los residuos y en el anexo 9 b) el de la forma linealizada doble recíproca y sus residuos. El de mejor ajuste fue la forma semi recíproca, ya que el análisis de regresión mediante el método de los mínimos cuadrados resultó tener un coeficiente de regresión del 98,5% y una distribución homogénea de los datos, comprobándose de esta forma su linealidad. En el anexo 10 se muestran los resultados del análisis no lineal del modelo de Langmuir, el cual se realizó por la introducción de los datos experimentales en el paquete estadístico *Statgraphics*.

En la tabla 4.4 se resumen los resultados de los coeficientes a y b para cada uno de los modelos ajustados. Las observaciones experimentales mostraron que el análisis del modelo en regresión no lineal y en las formas linealizadas doble recíproca y semi recíproca se obtuvieron coeficientes de regresión por encima del 90% y una distribución homogénea de los residuos, con un error relativo por debajo del 15%.

Lo anterior permite afirmar que en el intervalo de concentraciones estudiadas las curvas de adsorción del plásmido pIDKE2 se ajustan al modelo de isoterma de Langmuir. Además, posibilita estimar los valores de la capacidad máxima (q_{max}) y de la constante de disociación (k_d), según las ecuaciones descritas en el acápite 2.4, para el sistema matriz POROS R1 50 – plásmido pIDKE2 y presentadas en la parte superior de la tabla 4.4.

Los valores de los parámetros q_{max} y k_d estimados a partir de los modelos descritos anteriormente se presentan en la tabla 4.5. Hasta el momento no se ha descrito el uso de la matriz POROS R1 50 para la purificación de plásmidos por lo que constituye una **novedad de este trabajo** la determinación de la capacidad máxima y la constante de disociación para el sistema POROS R1 50 - plásmido.

Tabla 4.4 Resumen de los coeficientes estimados del modelo de Langmuir a partir de la linealización de la ecuación que describe el modelo semi recíproca y doble recíproca y por regresión no lineal

	Modelo linealizado		Regresión no lineal
	Semi recíproca	Doble recíproca	
	$c^*/q^* \text{ vs } c^*$ $\frac{c^*}{q^*} = \frac{1}{q_{\max}} c^* + \frac{kd}{q_{\max}}$ $\frac{c^*}{q^*} = ac^* + b$	$1/q \text{ vs } 1/c^*$ $\frac{1}{q^*} = \frac{kd}{q_{\max}} \frac{1}{c^*} + \frac{1}{q_{\max}}$ $\frac{1}{q^*} = a \frac{1}{c^*} + b$	$q^* = \frac{q_{\max} c^*}{kd + c^*}$ $q^* = \frac{ac^*}{b + c^*}$
a	0,222	0,223	5,18
b	0,011	0,012	0,06
$R^2 (\%)$	98,58	98,25	93,91

Tabla 4.5. Estimación de los parámetros de la ecuación que describe el modelo de Langmuir q_{\max} y k_d para la interacción del plásmido pIDKE2 y la matriz POROS R1 50

	Regresión lineal		Regresión no lineal
	$c^*/q^* \text{ vs } c^*$	$1/q^* \text{ vs } 1/c^*$	
q_{\max}	4,50	4,49	5,18
k_d	0,05	0,05	0,06

Es válido destacar que no se encontró ningún trabajo que describiera estos parámetros para matrices de fase reversa empleadas para la purificación de plásmidos de ADN, por lo que la discusión de resultados se realizará sobre la base del tamaño de partícula de matrices convencionales de intercambio iónico.

La capacidad máxima obtenida en este trabajo para el sistema POROS R1 50 – plásmido igual a 5,1 mg/mL es superior a la obtenida por Prazeres y colaboradores cuando ajustaron la isoterma de Langmuir empleando diferentes matrices de intercambio iónico **[Pra98]**. Los resultados de las matrices Q-*Sepharose High Performance, Fast Flow, Big Beads* y *Streamline SL* con tamaños de poro 34, 90 y 200 μm , respectivamente, para la adsorción de un plásmido de $3,2 \cdot 10^6$ g/mol estuvieron entre 2,5 y 3 mg/mL **[Pra98]**. Montesinos y colaboradores tuvieron resultados de capacidad máxima de 2,46 mg/mL cuando emplearon un sistema compuesto por la matriz Q-Sepharose y un plásmido de $2,6 \cdot 10^6$ g/mol **[Mon05]**. Recientemente Tarmann y Jungbauer utilizaron igualmente el ajuste del modelo de Langmuir para un plásmido de $3,2 \cdot 10^6$ g/mol y capacidades para matrices Q Sepharose HP (90 μm) y Source 30Q (30 μm) entre 1,94 y 1,34 mg/mL sin la presencia de NaCl, aumentando a 2,56 y 2,42 mg/mL respectivamente, cuando adicionaron 0,4 mol/L de NaCl **[Tar08]**.

Sin embargo, la matriz POROS R1 50, a pesar de que tiene un diámetro de 50 μm , presenta una mayor área superficial de los poros debido al uso de una red de pequeños poros interconectados, entre 0,05 y 0,15 μm en su interior. Esta

característica favorece los fenómenos de transferencia de masa y por ende se refleja en una mayor capacidad de esta matriz.

Todos estos resultados se explican por el supuesto de que los plásmidos son excluidos de la partícula porosa, siendo adsorbidos en la superficie de las partículas de las matrices, además de que existe el impedimento estérico de sitios de unión por aquellas moléculas de plásmidos que han sido adsorbidas; por lo tanto, se obtienen capacidades bajas en comparación a las que se obtienen con proteínas, para las que se describen valores de 30 mg/mL hasta 111 mg/mL

[Lan01]

4.3.2. Determinación de la capacidad dinámica de adsorción de la matriz POROS R1 50

La determinación de la capacidad dinámica de adsorción a partir de las curvas de ruptura permite la evaluación del desempeño de la matriz en estudio. Por tal motivo, se determinaron las curvas de ruptura empleando tres flujos volumétricos 3,33 mL/min, 1,67 mL/min y 0,69 mL/min, según el procedimiento descrito en el acápite 3.4.2.3. En los tres casos se utilizó la muestra proveniente de la cromatografía de gel filtración en Sepharose CL 4B con una concentración de $0,166 \pm 0,05$ mg/mL.

La figura 4.6 muestra la curva de concentración del material de interés en el efluente de la columna con relación a la concentración inicial (C_0) en función de la

cantidad de plásmido aplicado en mg por volumen de gel en la columna (Q en mg/mL gel).

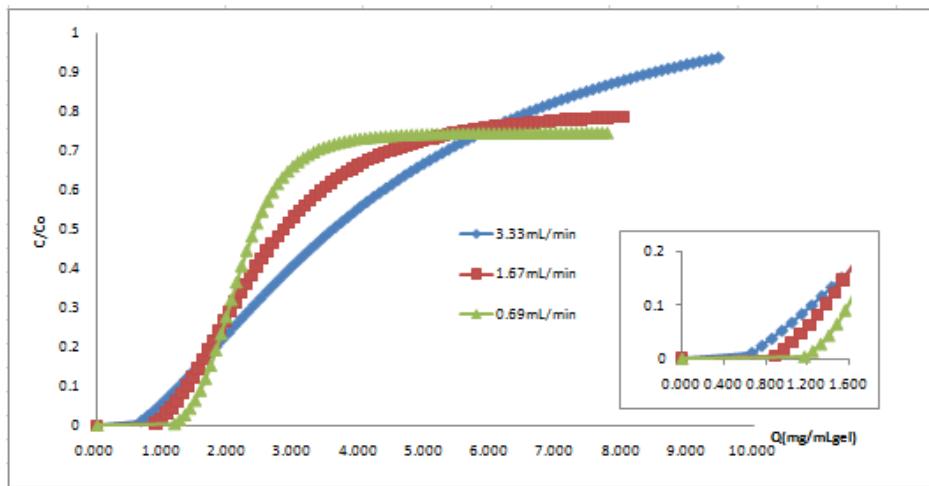


Figura 4.6. Curva de ruptura del plásmido pIDKE2 en POROS R1 50 empleando la disolución de equilibrio que contiene 264,8 g/L de sulfato de amonio a flujos volumétricos de 3,33; 1,67 y 0,69 mL/min

Las observaciones experimentales bajo las condiciones estudiadas mostraron capacidades dinámicas entre 1,24 y 2,32 mg/mL; el análisis de varianza demostró que no existieron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%, anexo 11.

Los resultados coinciden con lo descrito por Afeyan y colaboradores donde se permite favorecer la transferencia de masa de la fase móvil hacia la estancada, sin sacrificar la capacidad del adsorbente o necesitar una alta presión de operación. El soluto penetra en el interior de las partículas mediante un transporte convectivo. La razón del transporte del soluto está fuertemente relacionada con la velocidad de la fase móvil, de tal forma que el ensanchamiento de bandas, la resolución y la

capacidad dinámica no son afectadas por el aumento de la velocidad de esta fase **[Afe90]**.

Este resultado es superior al obtenido con matrices de intercambio iónico negativo convencionales empleadas para la purificación de plásmidos con las que se alcanzaron capacidades dinámicas de 1 mg/mL de resina empleando flujos entre 0,5 y 1 mL/min **[Syr07]**.

La eficiencia de operación o de enlace determinada por la relación que existe entre la capacidad dinámica y la capacidad máxima, para los tres flujos, estuvo entre el 27% y 45%. Se realizó el análisis de varianza y no existieron diferencias significativas entre ellas con un nivel de confianza del 95%, lo que equivale a decir que la columna no operará en condiciones de saturación cuando se trabaje a cualquiera de las condiciones de flujo estudiadas para una muestra que tenga una concentración inicial de $0,166 \pm 0,05$ mg/mL.

Este resultado es similar al obtenido por Montesinos y colaboradores **[Mon07]** cuando obtuvieron eficiencias de operación entre 37% y 38% empleando un material inicial de concentración de plásmido de 0,1 mg/mL a diferentes flujos 0,13; 0,25 y 0,52 mL/min.

La capacidad de enlace obtenida en la curva de ruptura fue menor que la capacidad máxima estimada a partir de la isoterma de adsorción. Este resultado se corresponde con lo esperado, ya que la isoterma de adsorción se determina en condiciones de equilibrio termodinámico donde están favorecidos los procesos

básicos de transferencia de masa: la dispersión en la fase líquida, la transferencia de masa en el fluido, la transferencia de masa en la partícula, y el equilibrio de interacción ligando - proteína **[Gui06] [Tej95]**.

4.3.3 Establecimiento de las condiciones de elución del plásmido pIDKE2 en la matriz POROS R1 50

Anteriormente ha sido descrito en la literatura que el ADN plasmídico es de naturaleza hidrofílica **[Str95]**, por lo que no debiera adsorberse a una matriz de fase reversa. Sin embargo, el ADN plasmídico bajo las condiciones estudiadas en este trabajo presenta un comportamiento similar al de una biomolécula hidrofóbica. Las bases púricas y pirimidínicas del ADN están situadas en el interior de la doble hélice del ADN mientras que el esqueleto azúcar fosfato está situado hacia el exterior lo que hace que el ADN sea una biomolécula muy hidrofílica por naturaleza **[Str95]**. Teniendo en cuenta que el ADN plasmídico se comporta como una proteína hidrofóbica, los estudios de las condiciones de elución se realizaron con los solventes etanol, metanol y acetonitrilo.

Se realizó un diseño experimental del tipo factor categórico individual en el cual se definió el tipo de solvente como factor a estudiar. Los atributos del diseño se exponen en el anexo 12. Se observaron diferencias significativas cuando se eluyó el plásmido pIDKE2 con el solvente acetonitrilo, mientras que con etanol y metanol los resultados fueron similares y por debajo de 0,01 mg/mL con un 95% de confianza, anexo 13.

Una vez seleccionado el solvente para la elución del plásmido pIDKE2, se realizaron experimentos en columna analítica para determinar la condición más adecuada según la metodología explicada en el acápite 3.4.2.4.

El gradiente se realizó entre el agua y la disolución de elución (TE 1X acetonitrilo 40% pH 7 ± 0,2). El contenido de sales en la disolución de equilibrio es elevado y puede obstruir el flujo en la columna, por lo que previo al gradiente se lavó la columna con 10 VC de agua para remover las sales del sistema y posteriormente realizar la elución. Se observó que en el agua eluye un 33% del material de interés según el dato de absorbancia, sin embargo en la electroforesis de agarosa no se observa una gran cantidad de plásmido superenrollado, figura 4.7.

En cuanto a la elución, entre 18% y 25% de la disolución de elución, se observó la recuperación del plásmido pIDKE2 con una pureza que oscila entre un 50% y 60%. Teniendo en cuenta que en esta disolución la concentración de acetonitrilo es de 40 %, se puede decir que el intervalo 18 % a 25 % se corresponde con una concentración de acetonitrilo de 7,2% - 10%. En estas fracciones se recuperó el 67% del plásmido pIDKE2; que no sea el 100% puede estar relacionado con interacciones inespecíficas del plásmido, que por naturaleza tiene carga negativa, a otras biomoléculas como las proteínas **[Str95]**.

La capacidad de la matriz empleando un flujo de 2 mL/min estuvo entre 2 mg y 3 mg del material inicial por mL de matriz, valor que está por debajo de la capacidad

máxima de la matriz determinada según la isoterma de adsorción cuando se utilizó el plásmido puro, según el acápite 4.3.1.

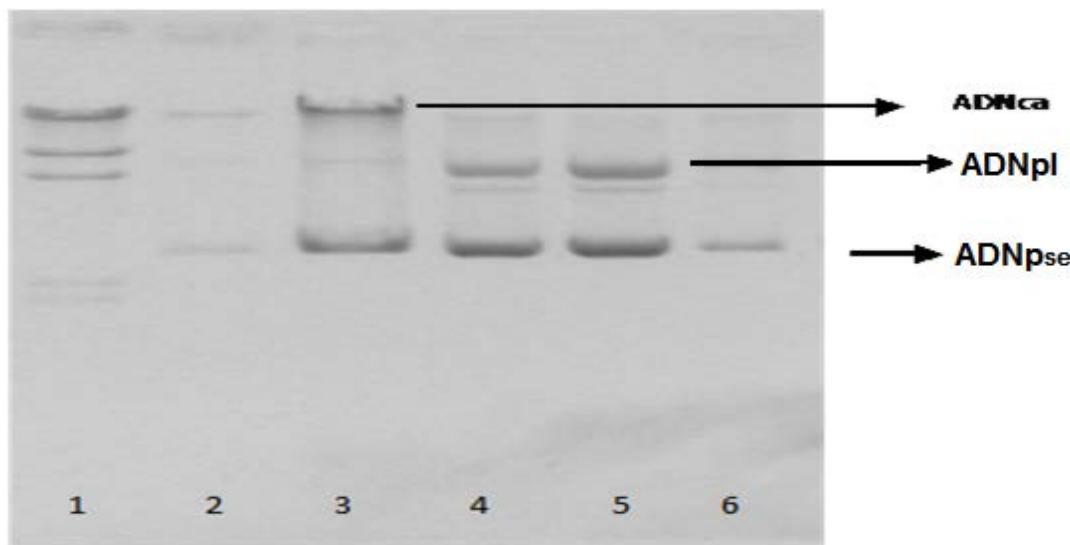


Figura 4.7: Electroforesis de agarosa 0,8% de las muestras correspondientes al gradiente que se realizó entre el agua (A) y la disolución TE 1X con acetonitrilo 40 % (B). Línea 1: patrón de masas molares; 2: muestra inicial; 3: lavado con agua; 4 – 6 eluciones del plásmido a diferentes concentraciones de acetonitrilo según el gradiente empleado

Una explicación a los resultados obtenidos en este trabajo sobre la adsorción del ADN_{se} a una matriz de fase reversa es que la interacción sea estructura dependiente. A partir de la adición de la sal sulfato de amonio a una concentración elevada se reduce la repulsión electrostática entre los grupos fosfatos del esqueleto del ADN_{se} [Str95], permitiendo la interacción de estos grupos con la matriz, cuya composición es poliestireno - divinilbenceno entrecruzado [web3].

Además, el sulfato de amonio promueve la adsorción de especies altamente hidrofílicas [Jan98] y contribuye a la retención diferencial de todas las especies de

ADN plasmídico como la circular abierta (ADNp_{ca}) y el superenrollado (ADNp_{se}), debido al efecto que provoca la sal con la topología porosa de la matriz **[San04]**.

Una vez que se disminuye la concentración salina por el lavado con agua se favorece la desorción del ADNp_{se} plasmídico obteniendo la máxima recuperación en presencia del solvente orgánico acetonitrilo.

La fracción que se obtiene en el lavado con agua no es la más adecuada, tal y como se observa en la figura 4.7 carril 3. Existe una fracción mayoritaria de ADN circular abierto (ADN_{ca}) que absorbe a 260 nm al igual que el ADN plasmídico. Esto se explica porque la liberación de las parejas de base se traduce en un incremento de la absorbancia, fenómeno que ha sido descrito con anterioridad como efecto hipocrómico **[Str95]**.

A partir de la observación de los fenómenos y procesos básicos que ocurren en esta cromatografía los parámetros que se decide controlar son: velocidad lineal, cantidad de material que se aplica a la matriz, el cual debe ser inferior a la capacidad máxima del gel POROS R1 50; concentración de la sal sulfato de amonio empleada en la disolución de equilibrio; concentración de acetonitrilo en la disolución de elución y la temperatura. Se estableció la escala de banco para 200 g de biomasa según el acápite 3.4.2.4 y en el anexo 14 se observa un cromatograma tipo. Se obtuvo un rendimiento de 1,16 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa recuperándose el 93% del material aplicado, proveniente de la cromatografía GF1 y una pureza del 85%. La cantidad de ADNp_{se} obtenido es

adecuada y similar a la alcanzada para este tipo de biomolécula cuando se emplearon matrices de intercambio iónico POROS 50 HQ [**Per96**].

4.3.4 Estudios preliminares de adsorción empleando el sistema Sartobind Q 75 – plásmido pIDKE2

Teniendo en cuenta las características del plásmido descritas en el acápite 2.2.1, las ventajas del uso de sistemas de membranas como alternativa a los sistemas porosos, basadas fundamentalmente en sus propiedades hidrodinámicas descritas en el acápite 2.3.2, y la disponibilidad de una muestra de membrana Sartobind Q 75 suministrada gentilmente por la compañía Sartorius se realizaron estudios preliminares para evaluar esta matriz como alternativa a la matriz POROS R1 50. El área de la membrana empleada es de 75 cm². Para realizar el análisis comparativo de la capacidad con las matrices convencionales es necesario conocer la equivalencia entre estas y las membranas. A partir de la información del proveedor 36,4 cm² equivale a 1 mL de matriz, por lo que la matriz empleada equivale a 2,1 mL [**web4**].

Se determinó la capacidad dinámica empleando el procedimiento descrito en el acápite 3.4.2.3. En el punto de ruptura (C/Co = 0,1) se observaron capacidades dinámicas de 6,91 mg de ADNp_{se} adsorbido por volumen de gel para un flujo de 3 mL/min y 2,38 mg/mL para 5 mL/min, figura 4.8.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por [Syr07] cuando utilizó membranas Sartobind D y Q 75 para plásmidos entre $1,7 \cdot 10^6$ y $7,6 \cdot 10^6$ g/mol y obtuvo una capacidad $4 \text{ mg de ADNp}_{\text{se}}$ por mL de gel.

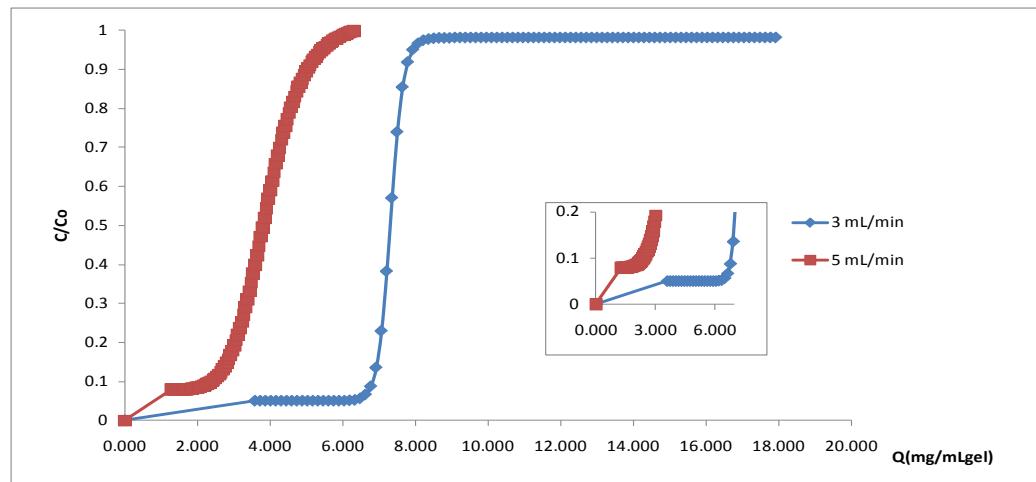


Figura 4.8. Curva de ruptura del plásmido pIDKE2 en la membrana Sartobind Q75 empleando la disolución de equilibrio TE 1X a flujos volumétricos de 3 y 5 mL/min

En los dos casos estudiados la capacidad dinámica fue superior a la que se obtuvo con la matriz POROS R1 50 por lo que la aplicación de este tipo de matriz pudiera resultar atractiva cuando se dispongan de las condiciones para realizar los estudios de establecimiento del proceso empleando la tecnología de membrana. Teniendo en cuenta de que existe la necesidad de iniciar los estudios clínicos con el plásmido pIDKE2 en el menor tiempo posible, se estableció el proceso con la matriz POROS R1 50 y como parte del desarrollo posterior del trabajo se realizarán los estudios con membranas para, de ser satisfactorios, presentar a la autoridad regulatoria el cambio de proceso.

4.4 Establecimiento de la etapa de purificación final y análisis global del proceso en la escala de banco

Anteriormente ha sido descrito el uso de la cromatografía de exclusión molecular como paso de purificación final para la obtención de plásmidos calidad inyectable [Hor95], [Dio00], [Fer00]. La razón fundamental de que sea el método más empleado es que permite realizar dos operaciones de una vez: aumentar la pureza del plásmido y realizar el cambio de disolución hacia la aquella en la que se formulará el producto terminado.

Previo a la cromatografía de gel filtración 2 se realizó la concentración del material que se obtuvo al final de la cromatografía de fase reversa, según se explica en el acápite 3.4.2.5, hasta alcanzar una concentración $1,2 \pm 0,2$ mg/mL. Además se determinó la calidad del empaque de la matriz según lo descrito en el acápite 3.4.2.6; el factor de asimetría determinado fue 1, el cual se encuentra en el intervalo establecido por el fabricante para la matriz Sephacryl S-1000 [Ame02].

Los experimentos en la cromatografía de exclusión 2 (GF2) se realizaron según la metodología descrita en acápite 3.4.2.6 empleando la matriz Sephacryl S-1000. Se colectaron fracciones por volumen de 50 mL y se determinaron las absorbancias de cada una y se aplicaron en gel de agarosa 0,8%. Los resultados mostraron que las fracciones aumentan su pureza del ADNp_{se} desde un 60% hasta alcanzar más de un 95%, figura 4.9.

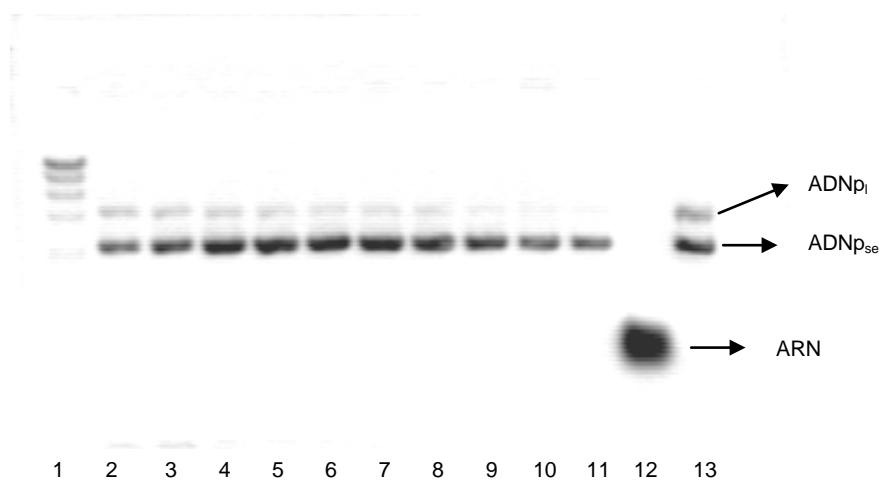


Figura 4.9: Fracciones obtenidas en la etapa de pulido utilizando la matriz Sephadex S-1000 analizadas en gel de agarosa 0,8%. Línea 1 patrón de masa molar, Líneas 2 - 5 fracciones con pureza por debajo del 89%, Líneas 6 – 11 fracciones con pureza superior al 90% Línea 12- RNA, Línea 13 control +

Las fracciones con una pureza superior al 90%, anexo 15, se unieron y se concentraron según la metodología descrita en el acápite 3.4.2.7, después se filtró y se envasó para obtener el ADNp_{se} final en forma líquida. El flujo de operaciones del proceso propuesto para la purificación del plásmido pIDKE2 en el que pueden observarse las entradas, salidas y desechos se encuentra en el anexo 16.

Finalmente, se realizaron varios procesos, teniendo en cuenta las condiciones en cada etapa, para procesar 200 g de biomasa. El plásmido purificado se filtró por membranas de tamaño de poros de 0,22 µm [web6] para garantizar la esterilidad y el producto líquido final se envasó en bulbos de polipropileno para realizar los análisis correspondientes según los criterios establecidos por la FDA para productos líquidos que contienen un plásmido [FDA07].

Se realizó la cuantificación de acetonitrilo en tres lotes diferentes según el procedimiento descrito en el acápite 3.5 y se observó que el contenido de acetonitrilo en el producto final cumple con la especificación establecida para este solvente, que es por debajo de 0,035 g/L, tabla 4.6. La pureza del producto final en la escala de banco fue de un $93 \pm 2\%$ con un recobrado total del 10%. En la tabla 4.7 se describen los rendimientos y recobrados por etapas del proceso en la escala de banco.

Tabla 4.6 Resultados de la estimación de la cantidad de acetonitrilo presente en el producto final

Acetonitrilo (g/L)	Muestra
0,0014	Lote 1
0,0014	Lote 2
0,0024	Lote 3

El rendimiento final del proceso en la escala de banco fue de 0,72 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa, inferior al obtenido por Rivière y colaboradores de 1,1 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa [Riv07] cuando purificaron un plásmido de $4,3 \cdot 10^6$ g/mol. Las diferencias fundamentales entre el proceso descrito en este trabajo y el descrito por Rivière es el uso de la enzima RNasa para la remoción del ARN y en los tampones de corrida el uso de MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), el cual es conocido por su elevado costo en los

proceso de purificación, por lo que su uso está limitado a escala de laboratorio para la purificación.

Tabla 4.7 Rendimientos y recobrados del proceso en la escala de banco (200 g de biomasa). Las etapas se nombraron según fueron descritas en el capítulo de Materiales y métodos

Etapa	Rendimiento (mg ADNp _{se} /g biomasa)	Recobrado (%)	Pureza (%)
Ruptura	4,47	-	12 ± 5
Concentración 1	2,54	57 ± 7,2	13 ± 5
GF 1	1,26	52 ± 3,7	75 ± 2
Fase reversa	1,16	92 ± 8,81	85 ± 4
GF2	1,02	83 ± 4,7	88 ± 2
Concentración 2	0,74	65 ± 5,5	93 ± 2
Producto terminado	0,72	70 ± 3,6	93 ± 2

Por otra parte, Horn y colaboradores obtuvieron un rendimiento total de 0,06 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa [Hor95]. Los bajos rendimientos pueden estar asociados a que en este proceso se utilizan cuatro etapas de precipitación con solventes orgánicos como el etanol y el isopropanol y con acetato de amonio.

Además se realizó el estudio de inmunogenicidad con el producto final que contiene el plásmido pIDKE2 para demostrar la funcionalidad biológica y su

aplicación como candidato para una vacuna terapéutica contra el virus de la Hepatitis C. El candidato vacunal Terap C (CIGB 230) está formado por el plásmido pIDKE2 y la proteína del núcleo del virus que actúa como adyuvante y por lo tanto es un posible potenciador de la respuesta inmune **[Due07]**. El estudio de inmunogenicidad demostró que todos los animales inmunizados con pIDKE2 más la proteína del núcleo desarrollaron anticuerpos contra los antígenos estructurales del virus de la hepatitis C (Co.120, E1.340 y E2.680) en la semana 17 **[Due04] [Aco06]**.

Los lotes producidos fueron analizados en los laboratorios de Control de Calidad del CIGB. En el anexo 17 se muestran los resultados de un lote típico de la escala de banco.

La liberación se realizó teniendo en cuenta las regulaciones vigentes establecidas por las entidades internacionales como la FDA y el CECMED (autoridad nacional), para productos de ADN a ser utilizados con fines terapéuticos en humanos. Estas regulaciones establecen que la pureza del ADN_{ps} debe ser superior al 90%, mientras que las proteínas contaminantes deben ser reducidas a menos de 5 µg por dosis sin la presencia de ARN ni ADN del hospedero en geles de agarosa al 0,8% **[Smi85] [Pet00] [Alv06] [Riv07] [FDA07]**.

Los resultados de los estudios no clínicos realizados en animales no evidenciaron alteraciones sistémicas que comprometieran la seguridad de los pacientes. Por lo

anterior, el producto mostró un adecuado marco de seguridad para su empleo en estudios clínicos **[Bac09]**. (*Resultados no mostrados en este documento*).

Los reactivos utilizados no representan ninguna preocupación de reglamentación especial, ya que no son tóxicos, mutagénicos ni inflamables. Tampoco se emplean aditivos orgánicos ni enzimas de origen animal. El proceso presentado combina tecnologías nuevas y tradicionales de la purificación.

A partir de los resultados obtenidos, se conformó el expediente para la solicitud de aplicación de estudios clínicos en humanos a la autoridad regulatoria nacional. Por primera vez se autorizó el inicio de un estudio clínico en humanos de una formulación que contiene un plásmido, anexo 18. El ADNp_{se} será aplicado en pacientes con lesiones hepáticas causadas por el virus de la hepatitis C, lo cual constituye una **novedad científica y social de este trabajo**.

Conclusiones parciales

- 1- En el intervalo estudiado, el factor de mayor influencia sobre la cantidad de ADNp_{se} por gramo de biomasa húmeda es la adición de glucosa, empero la concentración y el tiempo de mezclado durante la ruptura no influyen de forma independiente.
- 2- La interacción entre los pares de variable glucosa - tiempo de mezclado y glucosa - concentración celular ejercen una influencia estadísticamente significativa sobre la cantidad de ADNp_{se}.

- 3- Es posible separar el ADNp_{se} del ARN con un mínimo contenido de proteínas empleando la matriz Sepharose CL 4B, lo que resulta un **aporte económico de este trabajo.**
- 4- La carga aplicada a la columna que contiene la matriz Sepharose CL 4B, así como su interacción con la concentración de la sal sulfato de amonio empleada en la disolución de equilibrio ejercen una influencia significativa sobre la cantidad de proteínas que se obtienen en la fracción que contiene el ADNp_{se} para plásmidos entre $2,6 \cdot 10^6$ y $3,6 \cdot 10^6$ g/mol.
- 5- Se obtuvo por primera vez la isoterma de adsorción para un sistema formado por una matriz de fase reversa y un plásmido, lo cual constituye una **novedad científica** de este trabajo.
- 6- El modelo ajustado para el sistema POROS R1 50 – pIDKE2 se ajusta a la isoterma de *Langmuir*.
- 7- La capacidad máxima para la matriz POROS R1 50 es de 1,7 a 2 veces superior a la descrita para las matrices de intercambio iónico que se utilizaron para la purificación de plásmidos de tamaño similar al pIDKE2.
- 8- La capacidad dinámica de la matriz POROS R1 50 se encuentra entre 1,24 y 2,32 mg de pIDKE2 por mL de matriz no existiendo diferencias significativas cuando se utilizan los flujos 0,69; 1,67 y 3,33 mL/min.
- 9- La capacidad dinámica de la matriz POROS R1 50 es de 1,2 – 2,3 veces superior a la informada para matrices de intercambio iónico que se utilizaron para la purificación de plásmidos de tamaño similar.

10-La capacidad de operación de la columna con una concentración inicial de 0,17 mg/mL no superó el 45% para flujos de trabajo de 0,69 mL/min; 1,67 mL/min y 3,33 mL/min.

11-Por primera vez se describe la combinación de la filtración tangencial con dos métodos ortogonales: la exclusión molecular y la fase reversa para la purificación de un plásmido de ADN, por lo que constituye un **aporte novedoso** de este trabajo.

12-Se estableció un proceso a escala de banco para la obtención de una formulación líquida que contiene el plásmido pIDKE2 con una pureza del 93% y un rendimiento de 0,72 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa.

13-Por primera vez la autoridad regulatoria nacional autorizó el inicio de un estudio clínico en humanos de una formulación que contiene un plásmido. El ADNp_{se} será aplicado en pacientes con lesiones hepáticas causadas por el virus de la hepatitis C, lo cual constituye una **novedad de científica y social de este trabajo**.

4.5 Escalado de las cromatografías GF1, fase reversa y GF2 para la purificación del plásmido pIDKE2

Una vez que la autoridad regulatoria aprobó el inicio del estudio clínico para satisfacer la demanda de ADNp_{se} se hizo necesario demostrar que el proyecto propuesto para la obtención del plásmido pIDKE2 es escalable y reproducible.

Previo al diseño del escalado de cada una de las etapas se tuvieron en cuenta todas las variables a controlar durante el proceso para garantizar la reproducción de los fenómenos y procesos básicos que ocurren en la escala banco. Además se realizaron estudios preliminares de la estabilidad del plásmido pIDKE2 según los tiempos de espera de las operaciones más críticas. Se determinó la concentración y pureza del material de salida de cada etapa, según el acápite 3.5, en el momento que termina la operación considerado como tiempo cero y en el tiempo máximo que puede demorar la operación. Para aquellas operaciones que la aplicación del material de interés puede demorar más de 15 días se establecieron especificaciones de calidad del producto, tal y como establece el sistema documental del CIGB, figura 4.10.

El escalado de las cromatografías de exclusión molecular empleando la matriz Sepharose CL4B y Sephacryl S1000 se realizó manteniendo constante: la velocidad lineal, el tipo de gel, la altura del lecho empacado y la cantidad de producto por volumen de gel o volumen de columna (VC), tal y como se describe en el acápite 3.4.2.2.

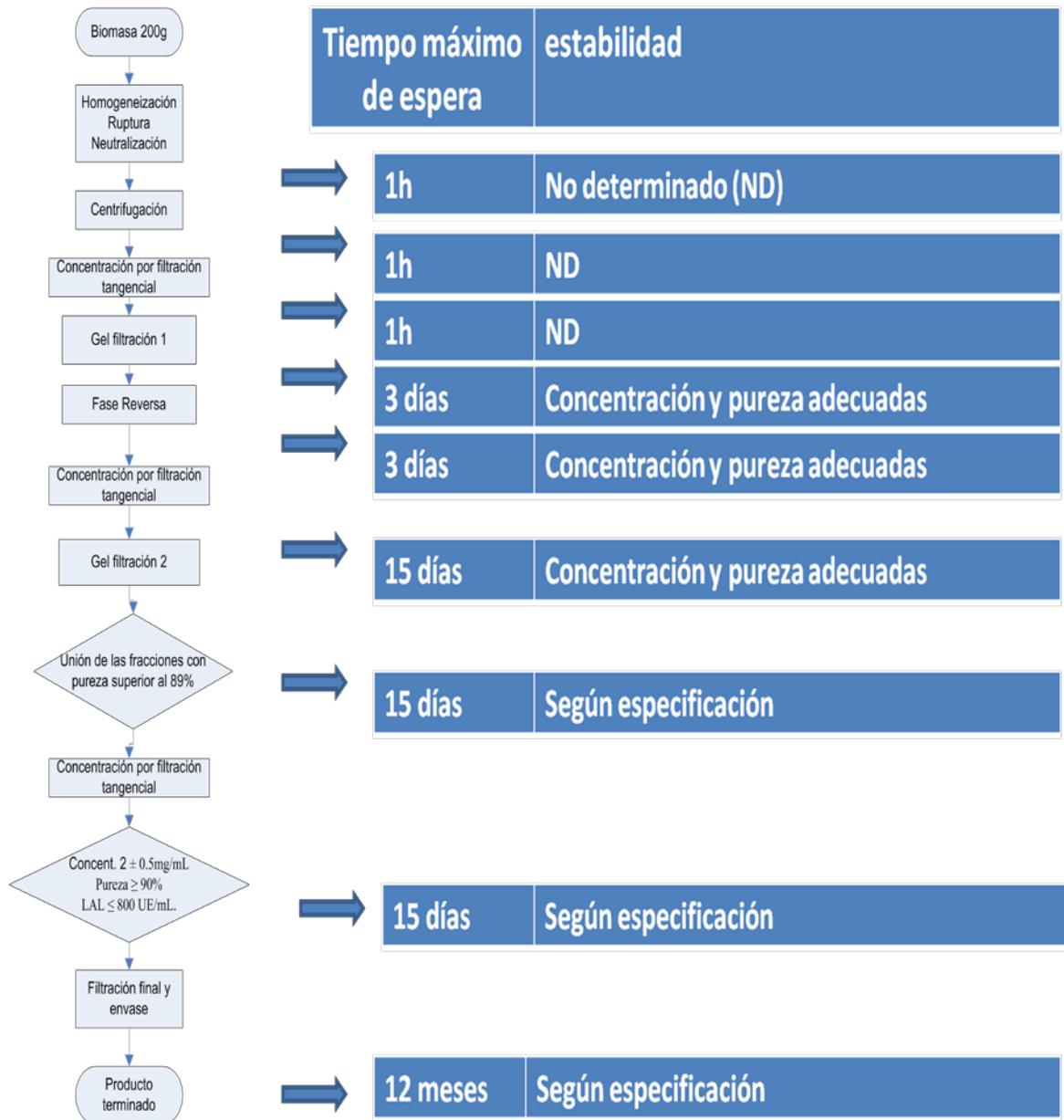


Figura 4.10: Estudios de estabilidad realizados en las diferentes etapas según los tiempos de espera de cada una de las operaciones

Los resultados mostraron que, tanto en la escala de banco como en la piloto, la relación entre el volumen de elución del ADN y el volumen de gel empacado (VC) se mantuvo constante, tabla 4.8.

Tabla 4.8: Parámetros de operación calculados a partir de los criterios aplicados para el escalado de la cromatografía de exclusión molecular (GF1)

Parámetros	Piloto	Banco
R	$0,47 \pm 0,027$	$0,44 \pm 0,003$
Altura de la columna (cm)	47	47
Volumen de columna (L)	14,7	4,7
Volumen de muestra inicial (L)	4,5 – 5,2	1,4 – 1,7
Factor de Escala	-	3,14
$\Delta t(min)$	$91,51 \pm 5,3$	$85,15 \pm 0,76$
$VCe (L)$	10,98	20,87

Resulta válido destacar que para la cromatografía de gel filtración 1 la relación de escala no se mantiene constante para el ARN ya que los tiempos de retención no son iguales; esto puede estar relacionado con los tiempos de cultivo de la escala piloto. Anteriormente ha sido descrito que un aumento del tiempo de cultivo y el modo de operación está directamente relacionado con las cantidades de ADN plasmídico, ARN ribosomal, de transferencia y mensajero [Kes03]. Se observó que estos cambios no afectaron el escalado, ni tampoco el objetivo de la

operación que es separar el ADNp_{se} del ARN. Esta precisamente es la ventaja del proceso desarrollado con respecto a los que utilizan cromatografías de intercambio iónico ya que esta no remueve completamente el ARN y por lo tanto la robustez de la cromatografía se ve afectada. En el proceso descrito esto no ocurre ya que la GF1 elimina completamente el ARN, figura 4.11.

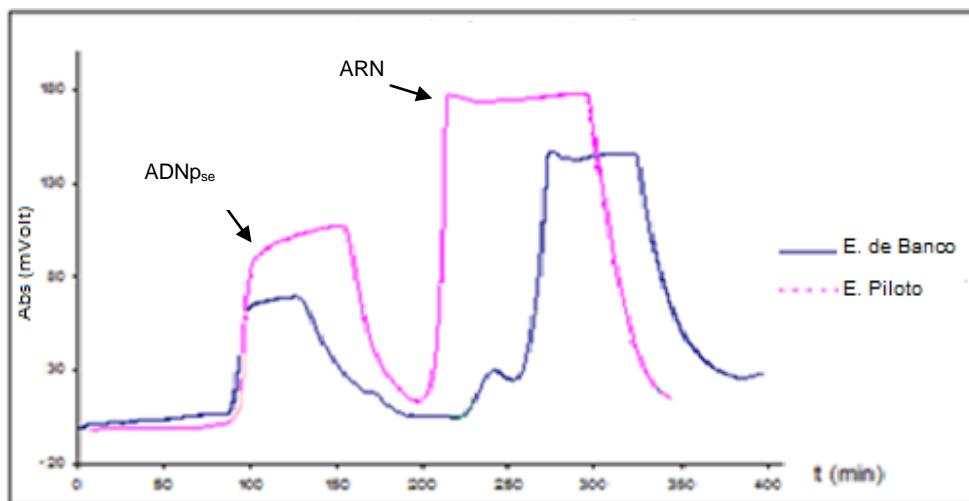


Figura 4.11: Cromatograma tipo del escalado de la cromatografía de gel filtración 1: — escala de banco y escala piloto

El escalado de la cromatografía de fase reversa se realizó manteniendo constante la cantidad de ADNp_{se} por volumen de matriz y manteniendo el tiempo de residencia constante, tal y como se describe en el acápite 3.4.2.4. La cromatografía de exclusión molecular 2 se escaló siguiendo igual procedimiento al descrito para la cromatografía de gel filtración 1, anexo 19.

La tabla 4.9 muestra un resumen de los resultados obtenidos en la escala piloto; el producto terminado obtenido cumple con las especificaciones de calidad, anexo

20. Disponer de este proceso permitió suministrar el plásmido pIDKE2 para nuevos ensayos clínicos autorizados por la autoridad regulatoria, anexo 21.

Tabla 4.9 Rendimientos y recobrados del proceso realizado en la escala piloto (400 g de biomasa). Las etapas se nombraron según fueron descritas en el capítulo de Materiales y métodos

Etapa	Rendimiento (mg ADNp _{se} /g biomasa)	Recobrado (%)	Pureza (%)
Ruptura	3,33	-	12 ± 5
Concentración 1	2,40	63 ± 1,2	13 ± 5
GF 1	1,51	62 ± 1,7	80 ± 2
Fase reversa	1,10	73 ± 4,2	85 ± 4
GF2	0,83	76 ± 10	88 ± 2
Concentración 2	0,76	69 ± 4,6	93 ± 2
Producto terminado	0,76	92 ± 1	94 ± 2

Los resultados del escalado de las etapas cromatográficas coinciden con lo obtenido anteriormente por Janson y Doran [Jan01] [Dor94], donde describen el uso de la velocidad lineal, el diámetro de las partículas del gel, así como la altura del lecho empacado, como parámetros críticos a tener en cuenta para la realización de escalados en los que se mantengan la resolución y el recobrado del producto de interés constantes, tanto a escala de laboratorio como a escala piloto y/o industrial. El recobrado total del proceso y el rendimiento en la escala de

banco fueron de un 10% y 0,72 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa húmeda respectivamente, mientras que en la escala piloto fueron 14% y 0,76 mg de ADNp_{se} por gramo de biomasa húmeda respectivamente. El análisis de varianza realizado con los resultados obtenidos en cada etapa mostró que existieron diferencias significativas entre las etapas, pero no existieron diferencias significativas entre la escala de banco y la piloto con un 95% de confianza, anexo 22. En la figura 4.12 se muestran los resultados de las interacciones del recobrado por etapas.

□

Figura 4.12: Análisis de las interacciones entre los resultados obtenidos en la escala de banco y la piloto. 1- Concentración por filtración tangencial 1; 2- cromatografía GF1; 3- elución de la cromatografía de fase reversa; 4- concentración filtración tangencial 2; 5- mezcla de fracciones cromatografía GF2; 6- producto terminado

Se observó variabilidad de los resultados de recobrado en operaciones de etapas similares: 3 y 6, correspondientes a la cromatografía de fase reversa y producto terminado respectivamente. La cromatografía de fase reversa en la escala de banco se realizó con una matriz con un tiempo de uso inferior a la escala piloto. Anteriormente ha sido descrito por Tejeda y colaboradores que el tiempo de vida útil de las matrices cromatográficas debe ser estudiado previo al establecimiento de los procesos en escalas productivas ya que este puede influir directamente en los recobrados y rendimientos de los procesos **[Tej95]**. En cuanto a la etapa de producto terminado la causa fundamental está relacionada con los filtros empleados; en la escala de banco las pérdidas son mayores por el diseño y los volúmenes de trabajo. Las interacciones del rendimiento por etapas se ilustran en la figura 4.13.

En este análisis también se observa una discreta variabilidad en los resultados de rendimientos en las etapas 1 y 2; lo cual puede estar relacionado con la cantidad de ADNp_{se} que proviene de la etapa de fermentación **[Kes03]** **[Rui09]**. Es válido destacar que estos resultados no influyeron en la comparabilidad de ambos procesos, ya que la calidad del producto terminado en ambos casos es la misma y cumple con las regulaciones vigentes, anexos 17 y 20.

□

Figura 4.13: Análisis de las interacciones entre los resultados obtenidos en la escala de banco y la piloto. 1- Concentración por filtración tangencial 1; 2- cromatografía GF1; 3- elución de la cromatografía de fase reversa; 4- concentración filtración tangencial 2; 5- mezcla de fracciones cromatografía GF2; 6- producto terminado

Conclusiones parciales

- 1- Los resultados de pureza y rendimiento del proceso de purificación del plásmido pIDKE2 son similares en la escala de banco y en la piloto.
- 2- La calidad del producto terminado en la escala de banco y en la piloto es similar y cumple con las regulaciones vigentes.
- 3- Se demostró que el proceso es escalable manteniendo constante los parámetros de velocidad lineal, tiempo de retención, diámetro de las partículas del gel y altura del lecho empacado.

4.6 Modelación del proceso de purificación del plásmido pIDKE2 y análisis económico

En la actualidad el 90% de los proyectos en desarrollo no llegan a ser comercializados, por lo que la evaluación económica preliminar de un proyecto para la producción de un producto biológico usualmente implica la estimación y análisis del capital de inversión, el costo de producción y de rentabilidad **[Pet03]** **[Dim07]**.

Una vez desarrollado el proceso de purificación del plásmido pIDKE2 se realizó la modelación en el SuperPro Designer de las operaciones de separación a partir de la metodología descrita en el acápite 3.6. El diagrama de flujo se muestra en la figura 4.14. Las secciones fundamentales se identificaron con diferentes colores en rojo ruptura, en amarillo purificación primaria, en verde purificación final y en azul filtración final.

Las operaciones correspondientes a la escala piloto se modelaron teniendo en cuenta los parámetros de operación, los consumos de disoluciones así como los resultados de recobrado, pureza y rendimiento obtenidos en los acáپites 4.4 y 4.5. Se utilizó un fondo de tiempo de 7 200 horas correspondientes a 300 días de operación en una planta dedicada solo a este producto.

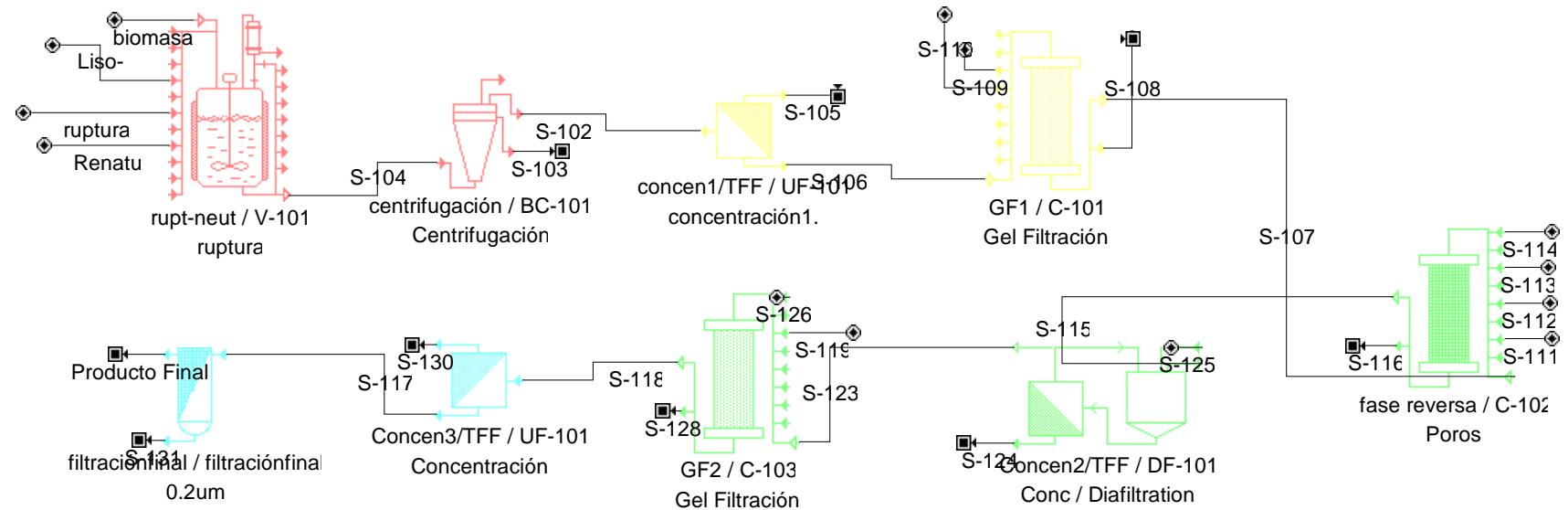


Figura 4.14: Diagrama de flujo del proceso desarrollado para la purificación del plásmido pIDKE2. Modelación de las operaciones de separación en el SuperPro Designer

El análisis económico mostró que pueden realizarse 517 lotes al año y producir 179 g de plásmido pIDKE2 anuales; el costo unitario de producción es de 1,9 USD el mg de ADN_{se} con un costo de operación de 338 000 USD anuales, anexo 23. Es válido señalar que no es común encontrar en publicaciones el costo de un producto biotecnológico en la fase de desarrollo, pues se considera conocimiento propio de las empresas, sin embargo el costo unitario obtenido está en el intervalo descrito por Petrides, él plantea que este valor puede oscilar entre 0,01 y 10 USD por mg **[Pet03]**.

Por otra parte Dimasi en sus trabajos realiza el análisis económico de los proyectos en la fase de investigación - desarrollo a partir de datos ponderados según las fases por las que transitaron los proyectos, desde los estudios no clínicos hasta la etapa de registro y comercialización **[Dim03]**. Este tipo de análisis tiene como desventaja que no permite conocer con claridad los costos por concepto de la tecnología empleada y solamente tiene en cuenta los riesgos asociados al éxito de la funcionalidad biológica de la molécula **[Dim03]**. En este trabajo se realiza el análisis a partir del conocimiento del rendimiento y recobrado del proceso desarrollado el cual satisface las necesidades que serán empleadas en los estudios clínicos fase 1 y 2 de ADN_{se}. Estas cantidades representan el alcance actual de este proyecto y permitirán además la acumulación de datos para la caracterización biológica del candidato vacunal en humanos.

Se aprecia que en caso de realizarse alguna inversión para este proyecto la capacidad de obtener ganancias con margen de rentabilidad es de 98,4% y la

inversión se recuperará en un plazo de 1,34 años. Si se analiza el flujo de caja expresado como valor actual neto (VAN), se observa que para 10 años de horizonte temporal los dividendos del proceso ascienden a 47 399 000 USD con una tasa de retorno (TIR) de 39,7% después de los impuestos y considerando gastos de investigación desarrollo de 10 000 000 de USD para el período de tiempo analizado, anexo 23.

El examen de los costos de operación mostró que el mayor componente está dado por el mantenimiento de las facilidades y equipos, figura 4.15.

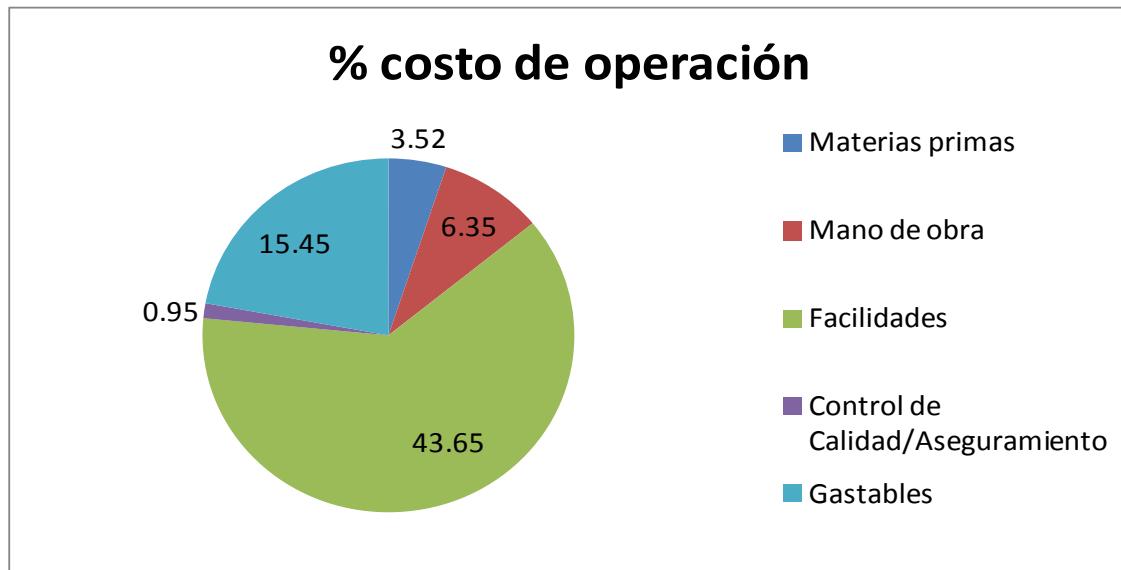


Figura 4.15: Distribución de los costos de operación del proceso desarrollado para la purificación del plásmido pIDKE2

Este resultado coincide con lo descrito por otros autores para productos de alto valor que son producidos en pequeñas cantidades [Pet03]. El costo de material gastable y el costo por materias primas resultan ser el segundo y el tercer

componente, respectivamente, que más aportan a los costos de producción debido al consumo de matrices cromatográficas y elementos filtrantes que son empleados en el proceso desarrollado. En cuanto a los costos de producción se observó que la etapa de mayor incidencia es la de purificación, seguida de la etapa de semipurificación figura 4.16, lo cual coincide con lo descrito por otros autores para productos biofarmacéuticos [Far07] [Got09].

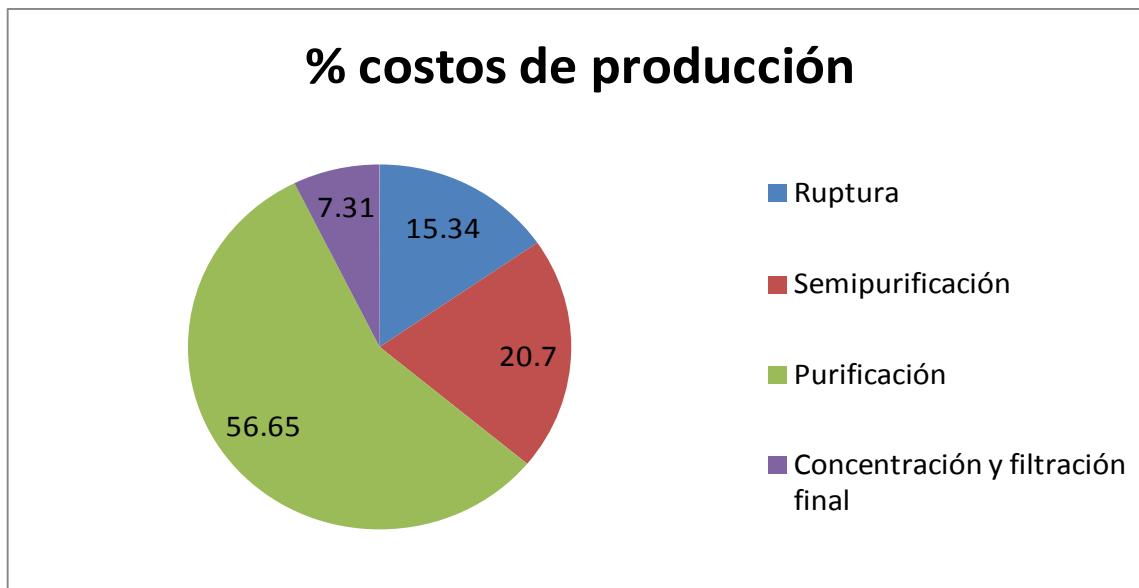


Figura 4.16: Distribución de los costos de producción del proceso desarrollado para la purificación del plásmido pIDKE2

Este resultado está relacionado fundamentalmente con el consumo de matrices cromatográficas, las cuales se modelaron con diferentes tiempos de vida de acuerdo a la experiencia acumulada durante el desarrollo del proceso de purificación de plásmidos. La matriz POROS R1 50 (fase reversa) se modeló con un ciclo de vida de 10 corridas, mientras que la Sepharose CL 4B (gel filtración 1) y Sephacryl S1000 (gel filtración 2) con 200 y 100 corridas respectivamente. Se

realizó un análisis de sensibilidad para evaluar la influencia del tiempo de vida útil de estas matrices sobre el costo de producción. Por debajo de un tiempo de vida de 20 corridas, la matriz de fase reversa influye sobre el costo de producción, mientras que las de gel filtración 1 y 2 inciden en menor medida, figura 4.17.

□

Análisis de sensibilidad: tiempo de vida de las matrices

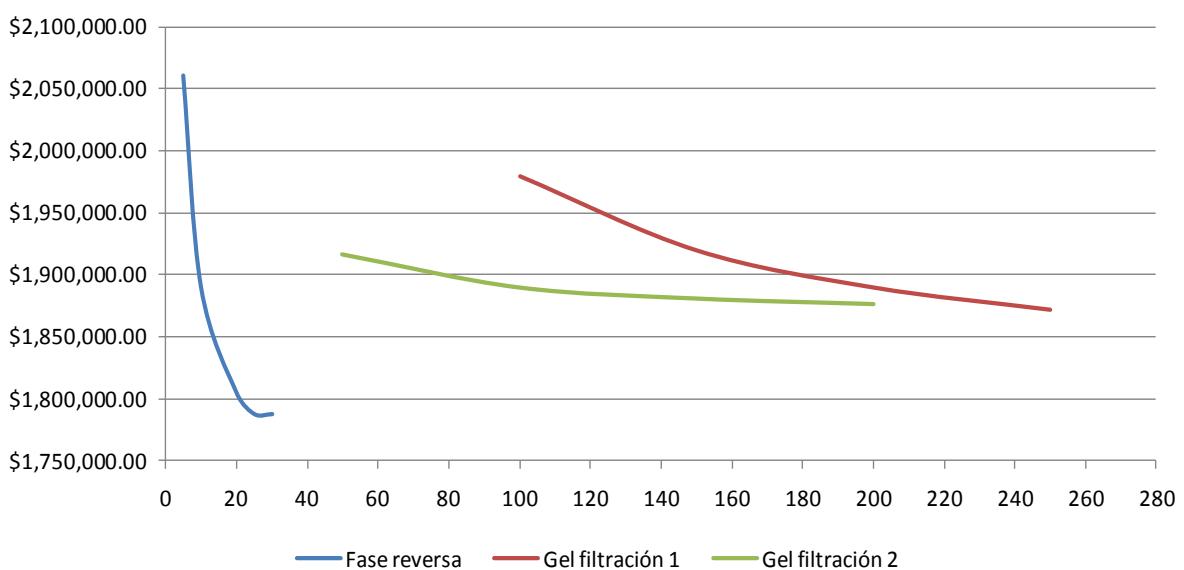


Figura 4.17: Análisis de sensibilidad en el que se estudió el tiempo de vida de las matrices cromatográficas sobre el costo de producción

El recobrado de la biomolécula de interés es otro factor que incide directamente sobre el costo de producción [Far07] [Got09]. A partir de un análisis crítico de los resultados de recobrado de la escala piloto se observó que en las etapas de concentración 1, en la que se obtiene el neutralizado concentrado, y la cromatografía de gel filtración 1 se obtienen los menores recobrados. Se realizó un análisis de sensibilidad en el que se estudió la influencia del recobrado sobre la

cantidad de producto terminado y el costo de producción a partir de un diseño del tipo factor categórico. Las características de este diseño, así como los datos y los resultados de la modelación se exponen en el anexo 24.

Los resultados del análisis de varianza mostraron que los dos factores estudiados: recobrado en la etapa de concentración 1 y GF1 influyen significativamente sobre la cantidad de producto terminado y el costo de producción anual con un 95% de confianza, anexo 25. En la medida que el recobrado de ambas etapas aumente se obtendrá una mayor cantidad de ADNp_{se} anual, figura 4.18, y un menor costo de producción, figura 4.19. Durante el ejercicio de modelación se observó que la mejora del proceso desarrollado deberá comenzar con los estudios de recobrado en la etapa de concentración 1 ya que es la que mayor sensibilidad tiene sobre las variables respuestas estudiadas. Otro elemento que se evidenció es que la matriz de fase reversa no podrá operar en la condición en la que el recobrado de concentración 1 y GF1 son 75% y 85% respectivamente, ya que la cantidad de producto que se obtiene en GF1 excede la capacidad dinámica determinada en este trabajo por lo que se requerirá aumentar la cantidad de matriz para este caso.

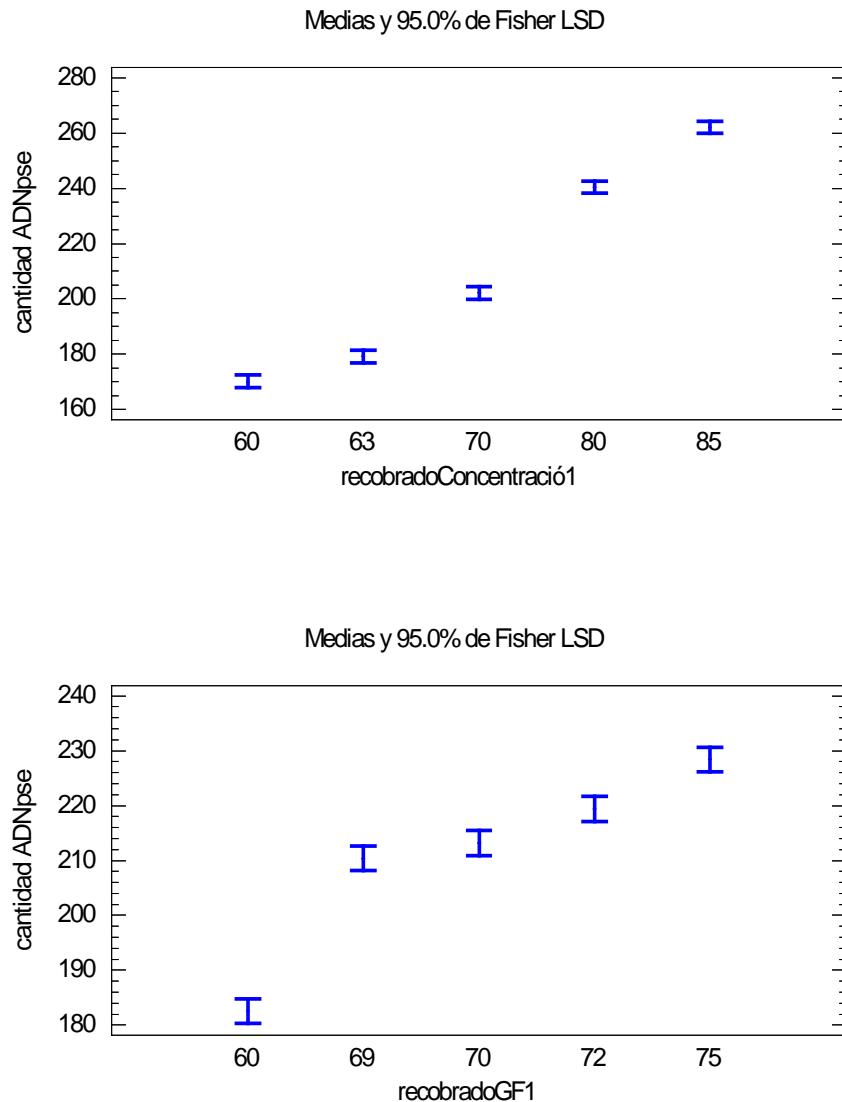


Figura 4.18: Influencia del recobrado de las etapas de concentración 1 y GF1 sobre la cantidad de ADNp_{se} anual

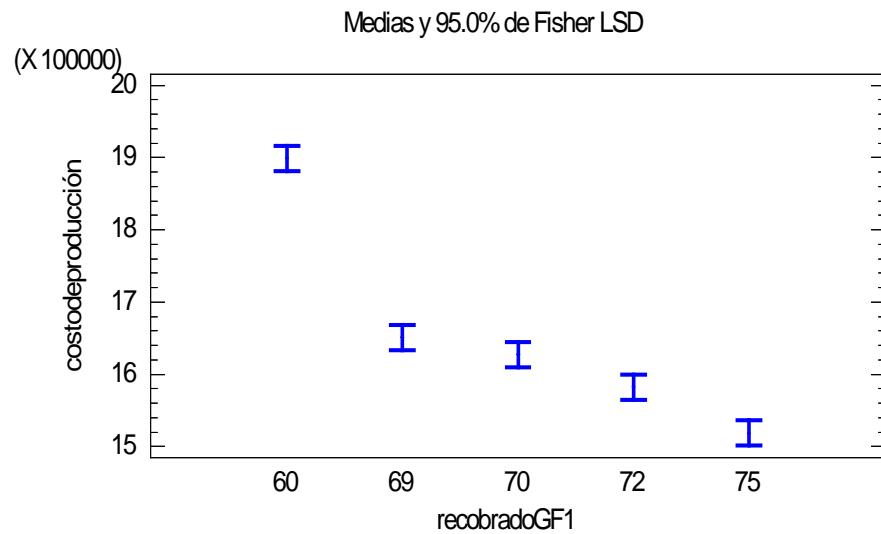
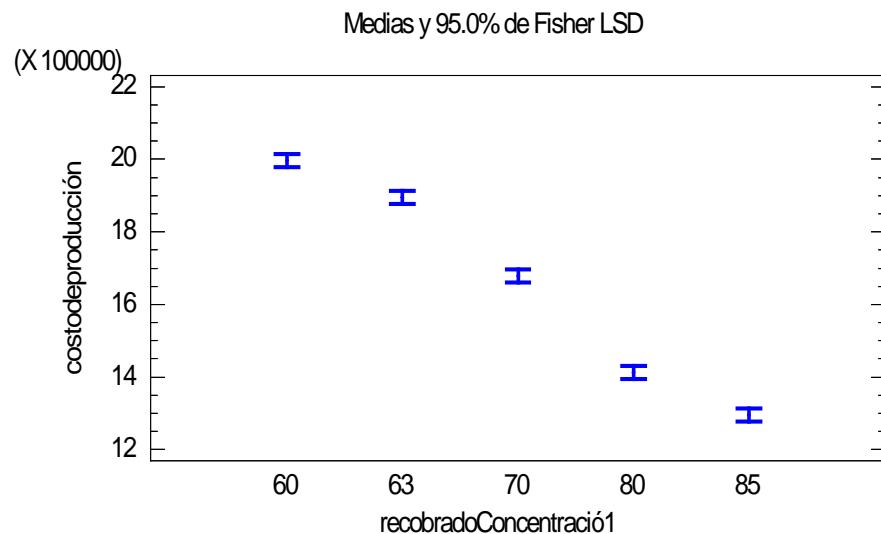


Figura 4.19: Influencia del recobrado de las etapas de concentración 1 y GF1 sobre el costo de producción anual

La modelación del proceso de purificación desarrollado permitió identificar el procedimiento de separación y el equipamiento que constituye el paso limitante o “cuello de botella” para dar inicio a un nuevo lote. A partir del diagrama de *Gantt*, figura 4.20 se identifica que el equipo de ultrafiltración UF-101, en el que se realiza la operación de concentración 2, es el limitante. La causa es porque cuando se realizó la modelación se consideró que este equipo se utiliza también en el siguiente paso de concentración, resultando que en 33,18 h pueden realizarse hasta 2 lotes equivalente a una capacidad productiva anual de 179 g de ADNp_{se}, anexo 23.

Empero, si el proceso se diseña con 3 equipos de filtración tangencial, aumenta el costo de operación anual a 414 000 USD y aumenta la cantidad de ADNp_{se} que se produce anualmente a 306 g ya que en 36,28 h pueden realizarse 3 lotes, figura 4.21, mientras que disminuye el costo unitario de producción a 1 352 934 USD, anexo 26.

El análisis de los diagramas de *Gantt* para las condiciones evaluadas coinciden con lo descrito anteriormente por Petrides; el esquema de proceso está relacionado con la capacidad anual de una planta por lo que es otro motivo de estudio para obtener una mayor cantidad de producto o disminuir los costos de producción [Pet03]. Los resultados obtenidos permiten confirmar que la modelación constituye una herramienta de trabajo útil para el análisis del proceso de purificación desarrollado.

Conclusiones parciales

- 1- El proceso de purificación desarrollado es económicamente factible y garantiza el suministro de producto para la realización de los estudios clínicos en Cuba.
- 2- La combinación de la modelación del proceso de purificación del plásmido pIDKE2 con el diseño experimental permitió identificar los factores que más inciden en el costo de producción y la cantidad de producto anual.
- 3- El tiempo de vida útil de la matriz de fase reversa y el recobrado de la etapa de concentración 1 son los parámetros que deben ser evaluados para mejorar los resultados del proceso desarrollado.

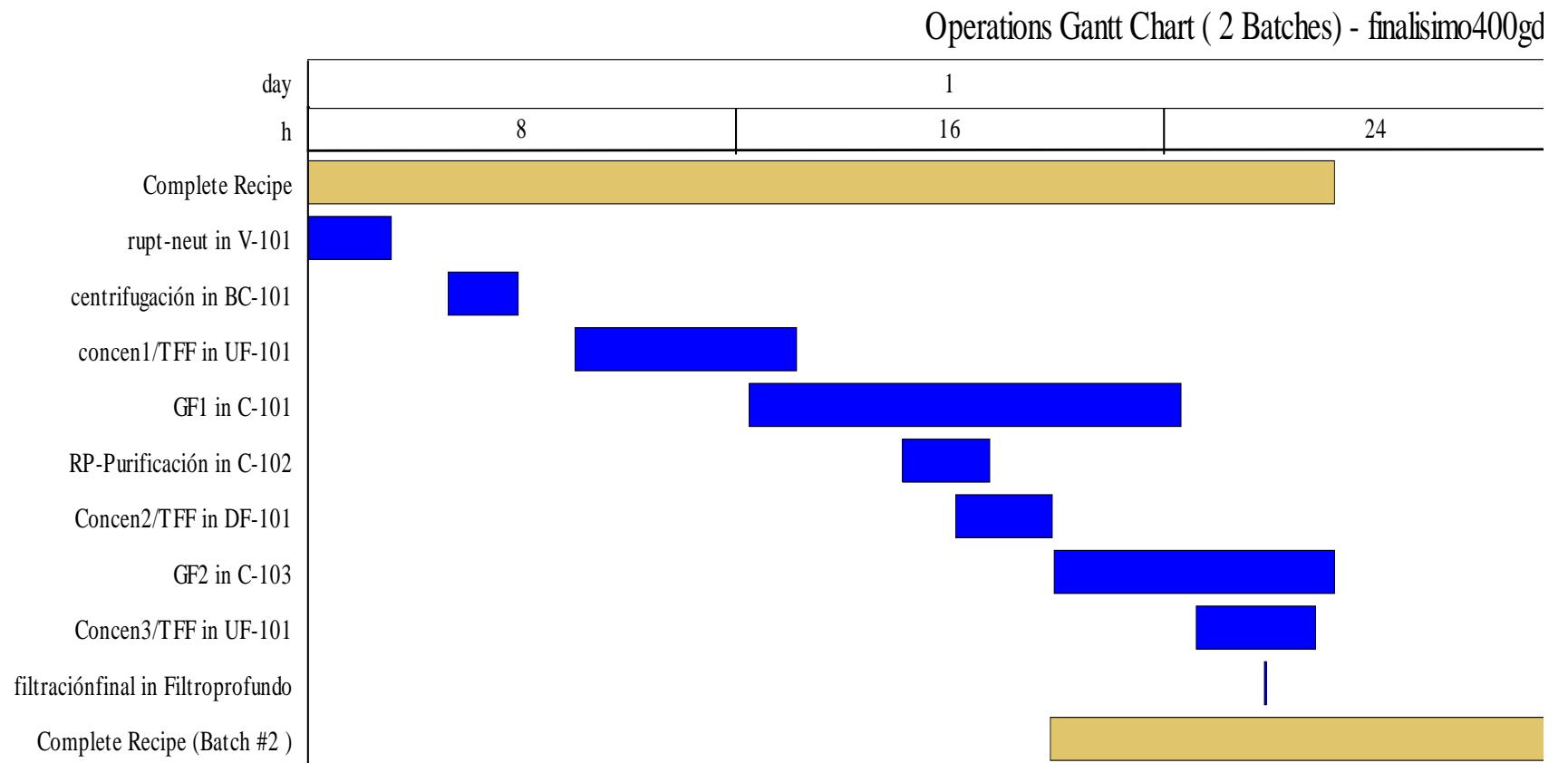


Figura 4.20: Diagrama de Gantt en el que se observa la secuencia de operaciones y el esquema de uso del equipamiento.

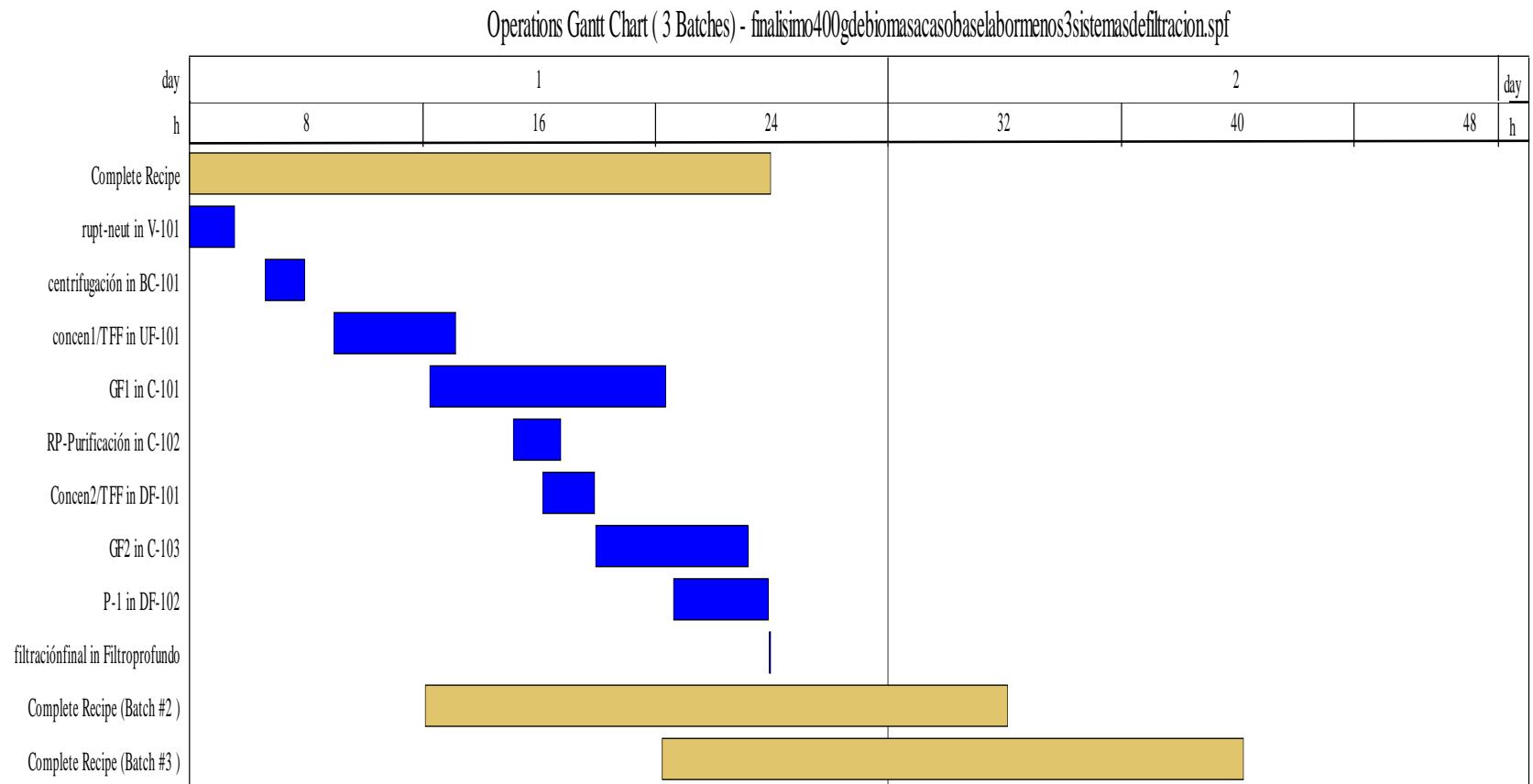


Figura 4.21: Diagrama de Gantt en el que se observa la secuencia de operaciones y el esquema de uso del equipamiento cuando se emplearon 3 sistemas de filtración tangencial.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- 1- Se demostró que la glucosa y la interacción entre los pares de variables glucosa – tiempo de mezclado y glucosa – concentración celular ejercen una influencia estadísticamente significativa, sobre la cantidad de ADNp_{se} que se obtiene en la etapa de ruptura.
- 2- Se determinó una condición en la que es posible separar el ADNp_{se} del ARN con un mínimo contenido de proteínas empleando la matriz *Sepharose CL 4B*.
- 3- Las matrices Sartobind Q75 y POROS R1 50 pueden ser empleadas para la purificación de plásmidos.
- 4- Mediante el uso de la filtración tangencial en combinación con la cromatografía de fase reversa y la exclusión molecular es posible obtener el plásmido pIDKE2 de acuerdo a las regulaciones vigentes para uso en humanos empleando un proceso escalable.
- 5- La modelación del proceso de purificación desarrollado permitió determinar que el proyecto es económicamente factible y permite garantizar el suministro del plásmido pIDKE2 para los estudios clínicos que se realicen en Cuba.

5.2 Recomendaciones

- 1- Optimizar las condiciones de operación de la concentración 1 para incrementar el recobrado de la etapa.
- 2- Determinar el tiempo de vida de las matrices de fase reversa y cromatografía de gel filtración.

Referencias Bibliográficas

- [Aco06]** Acosta-Rivero N., Aguilera Y., Falcon V., Poutou J., Musacchio A., Alvarez-Lajonchere A., Guerra I., Alvarez-Obregón J.C., Amador-Cañizares Y., Martinez-Donato G., Marante J., Aguilar J.C., Soria Y., Alvarez F., Perez A., de la Rosa M.C., Morales J., Kouri J.B., Dueñas-Carrera S. "Ultrastructural and Immunological Characterization of Hepatitis C Core Protein-DNA Plasmid Complexes". *Am J Immunol*, 2: 67-72, 2006.
- [Afe90]** Afeyan N. B., Gordon N. F., Mazsaroff I., Varady L., Fulton S. P., Yang Y.B. y Regnier F. E., "Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: perfusion chromatography" *J. Chromatography*, 519: 1-29, 1990.
- [Alv06]** Alvarez-Lajonchere L., González M., Alvarez-Obregón J.C., Guerra I., Viña A., Acosta-Rivero N., Musacchio A., Morales J. y Dueñas-Carrera S. "Hepatitis C virus (HCV) core protein enhances the immunogenicity of a co-delivered DNA vaccine encoding HCV structural antigens in mice". *Biotechnol Appl Biochem* 44:9-17, 2006.
- [Ame02]** Amersham Biosciences. "Sepharose and Sepharose CL instructions, handbook" Edition AB-71-7098-00, Uppsala, Sweden, 2002.
- [Arm06]** Armstrong G.L., Wasley A., Simard E.P., McQuillan G.M., Kuhnert W.L., Alter M.J. "The Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in the United States, 1999 through 2002". *Annals of internal medicine*, Vol 144 (10) 705-714, 2006.

[Atk91] Atkinson B. y Mavituna F. "Biochemical Engineering and Biotechnology" Handbook, Editor Macmillan, New York, USA. 1991.

[Bac09] Bacardí D., Amador-Cañizares Y., Cosme K., Urquiza D., Suárez J., Marante J., Viña A., Vázquez A., Concepción J., Pupo M., Aldana L., Dueñas-Carrera S. "Toxicology and biodistribution study of CIGB-230, a DNA vaccine against hepatitis C virus". *Hum Exp Toxicol*, vol. 28 (8) 479-491, August 2009.

[Bar07] Barazani Y., Hiatt J.R., Tong M.J., Busuttil R.W. "Chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma". *World Journal Surgery*, 31: 1243–1248, 2007.

[Bir79] Birboim H. C. y Doly J. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic acid Res.* 7: 1513-1523, 1979.

[Bus98] Bussey I. y colaboradores. "Methods for purifying nucleic acids" International Patent Application WO 98/05673.

[But01] Butler M. y colaboradores. "Purification of plasmid DNA" US Patent 6,313,285, 2001.

[Che00] Cherng J.M., Lin C.M., Lin C.L., Huang S.M., Chang H.L., Lee C.C., Chiang L.C., Chang P.Y. "Effects of VEGF121 and/or VEGF165 gene transfection on collateral circulation development". *J Formos Med Assoc*. Aug; 99(8):603-11, 2000.

[Cic98] Ciccolini L.A.S., Shamlou P.A., Titchener-Hooker N.J., Ward J.M., Dunnill P., "Time course of SDS-alkaline lysis of recombinant bacterial cells for plasmid release" *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 6: 768-770, 1999.

[Dim03] DiMasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G. "The price of innovation: new estimates of drug development costs" *Journal of Health Economics* 22: 151–185, 2003

[Dim07] DiMasi J.A., Grabowski H.G. "The Cost of Biopharmaceutical R&D: Is Biotech Different?" *Manage. Decis. Econ.* 28: 469–479, 2007.

[Dio00] Diogo M.M., Queiroz J.A., Monteiro G.A., y colaboradores. "Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography" *Biotechnol Bioeng.*, 68, 576-583, 2000.

[Dor94] Doran, M. P. "Bioprocess Engineering Principles" Elsevier Science & Technology Books, Sidney Australia, 1995.

[Due02] Dueñas-Carrera S., Alvarez-Lajonchere L., Alvarez J.C., Perez A., Acosta-Rivero N., Vazquez D.M., Martinez G., Viña A., Pichardo D. y Morales J. "Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids". *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**, 205–212, 2002.

[Due04] Dueñas-Carrera S., Viña A., Martínez R., Alvarez-Lajonchere L., Alvarez-Obregón J.C., Marante J., Pérez A., Mosqueda O., Martínez G. y Morales J. "Immunization with a DNA vaccine encoding the hepatitis-C virus structural antigens elicits a specific immune response against the capsid and envelope proteins in rabbits and *Macaca irus* (crab-eating macaque monkeys)". *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39**, 249–255, 2004

[Due07] Dueñas-Carrera S., Alvarez-Lajonchere L., Musacchio A., Acosta-Rivero N., Falcón V., Martínez G., Amador-Cañizares Y., Guerra I., Alvarez-Obregón J.C., Pérez A., Linares M., Limonta M. "New alternatives for the development of vaccine preparations: contributions to the knowledge on the interaction of recombinant protein viral antigens with nucleic acids". *Biotecnología Aplicada*, 24:311-314, 2007.

[Duv03] Eon – Duval A., MacDuff R.H., Fisher C.A., Harris M.J., Brook C. "Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process". *Anal Biochem*, May 1;316(1):66-73, 2003.

[Far07] Farid S.S. "Process economics of industrial monoclonal antibodies manufacture" *Journal of chromatography B*, 848: 8 – 18, 2007.

[FDA07] Food and Drug Administration. "Guidance for Industry, considerations for plamsmid DNA vaccines for infectious disease indications". USA, 2007.

[Fer00] Ferreira G.M., Monteiro G.A., Prazeres D.M., Cabral J.M.S., "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications". *TIBTECH*, 18: 380-388, 2000.

[Fer99] Ferreira G.M. y colaboradores. "Development of process flowsheets for the purification of plasmid vectors for gene therapy applications," *Biotechnol. Prog.*, 15: 725-731, 1999.

[Fra02] Franklin F. y colaboradores. "Acetate-free purification of plasmid DNA on hidroxyapatite" International patent WO 02095047, 2002.

- [Got04]** Gottschalk U., Fischer-Fruhholz S., Reif O. "Membrane Adsorbers A Cutting Edge Process Technology at the Threshold". Bioprocess International. May: 56 – 65, 2004.
- [Got09]** Gottschalk U. "Process scale purification of antibodies", John Wiley & Sons, INC publications; USA, 2009
- [Gui06]** Guiochon G. "Fundamental of preparative and Non linear chromatography". Elsevier. Second Edition, London, UK,2006.
- [Her00]** Herrera A.M., Rodriguez E.G., Hernández T., Sández B., Duarte C.A. "A family of Compact Plasmid Vectors for DNA Immunization in Humans". Biochemical and Biophysical Research Communications 279: 548-51, 2000.
- [Hor95]** Horn N.A. y colaboradores. "Cancer gene therapy using plasmid DNA for human clinical trials" Hum Gene Therapy, 6: 565-573, 1995.
- [Hor98]** Horn N., y colaboradores. "Purification of plasmid DNA during column chromatography". US Patent 5, 707, 812, 1998.
- [Jan98]** Janson J. y Rayden I. "Protein Purification. Principles, high resolution. Methods and application". Second edition, John Wiley and Sons, USA, 1998.
- [Kah00]** Kahn D.W. y colaboradores. "Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration". Biotechnol. Bioeng., 69, 101-106, 2000.

[Ken02] Kendal D., y colaboradores. “Purification of plasmid DNA by an integrated operation comprising tangential flow filtration and nitrocellulose adsorption”.

Biotechnol. Bioeng., 79, 816-822, 2002.

[Kes03] Keshavarz M.E., Ward J.M., O'Kennedy R.D. “Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production” Biotechnol. Appl.

Biochem. 37: 83–90, 2003

[Lah96] Lahijani R. y colaboradores. “High yields production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing temperature controllable point mutation”. Hum. Gene. Ther., 7: 1971-1980, 1996.

[Lan01] Lan Q., Bassi A., Zhu J.X., Margaritis A. “A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents.” Chemical Engineering Journal, 81 179 – 186, 2001.

[Lan02] Lander R.J. y colaboradores. “Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB” Biotechnol. Bioeng., 79, 776-784, 2002.

[Lev00] Levy M., Ronan D., O'Kennedy P.A. Shamlou P.A. y Dunnill P. “Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA”, Trends Biotechnol. 18, 296-305, 2000.

[Lim11] Lima F. Director de Economía del CIGB. Comunicación personal, 2011.

[Log11] Dirección de logística del CIGB. Comunicación personal, 2011.

- [Mar95]** Marquet M. y colaboradores. "Process development for manufacture of plasmid DNA vectors for use in gene therapy". *BioPharm.*, 9: 26-37, 1995.
- [Mar97]** Marquet M. y colaboradores. "Characterization of plasmid DNA vectors for use in Human gene therapy, Part 1". *Biopharmaceutics*, May, 42-50, 1997.
- [Mea03]** Meacle F.J., Lander R., Shamlou P. A. y Titchener-Hooker N.J., "Impact of Engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations". *Biotechnology and Bioengineering*, 87 No. 3: 293-302, 2004.
- [Mon05]** Montesinos – Cisneros RM, Guzmán R, Ortega J, Tejeda-Mansir "Cromatografía frontal de plásmidos: estimación de parámetros y simulación". *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol 4. No 1: 47 – 58, 2005.
- [Mon07]** Montesinos – Cisneros R.M., De la Vega Olivas J., Ortega J., Guzmán R., Tejeda-Mansir A. "Breakthrough Performance of plasmid DNA on Ion – Exchange membrane columns." *Biotechnology Progress*. 23: 881 – 887, 2007.
- [Nor10]** Norell H., Poschke I., Charo J., Wei W.Z., Erskine C., Piechocki M.P., Knutson K.L., Bergh J., Lidbrink E., Kiessling R. "Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/ neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial". *J Transl Med*. Jun 7;8:53, 2010.
- [Per96]** PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA, Rapid, Preparative purification of plasmid DNA by Anion Exchange Perfusion Chromatography Technology, 1, 9-11 1996.

[Pet91] Peters M.S., Timmerhaus K.D. "Plant design and economics for chemical engineers", fourth edition, McGraw-Hill Chemical Engineering Series, 1991.

[Pet00] Petsch D., Anspach F.B. "Endotoxin removal from protein solutions" Journal of Biotechnology, 76: 97–119, 2000.

[Pet03] Petrides D. "Bioseparations sciences and engineering." In Harrison RG, editor, 1st ed. Oxford University Press, USA, 2003.

[Pra98] Prazeres D.M.F. y colaboradores, "Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography" J. Chromatog., 806: 31-45, 1998.

[Qia01] Qiagen "Kit Handbook Qiagen", Valencia, CA, USA, 2001.

[Rib02] Ribeiro S. C., y colaboradores. "Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems" Biotechnol. Bioeng., 78, 376-384, 2002.

[Riv07] Rivière I., Przybylowsk M., Bartido S., Borquez-Ojeda A. y Sadelain M. "Production of clinical-grade plasmid DNA for human Phase I clinical trials and large animal clinical studies." Vaccine, 25: 5013 – 5024, 2007.

[Rui09] Ruíz O., Pérez M., Pupo M., Limonta M., Torres D., Macías K., Martínez S., Proenza Y., Valdés J., Martínez E. "High-Cell-Density Culture to produce plasmid DNA for Gene therapy in E.coli." Biopharm International. 22: 38 -41, 2009.

- [San04]** Sandberg L.M., Asa B., Philippe B., Jozsef V., Lemmens R. "Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification." 109: 193-199, 2004.
- [Sch99]** Schleef M. "Issues of large-scale plasmid DNA manufacturing." A. Mountain, U. Ney, D. Schomburg (Eds.), Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies and Therapeutic genes, Wiley, Weinheim, 443-469, 1999.
- [Sha03]** Shamlou P.A. "Scalable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA." Biotechnol. Appl. Biochem., 37:207-218, 2003.
- [Smi85]** Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. "Measurement of protein using bicinchoninic acid" Anal. Biochem 150: 76 – 85, 1985.
- [Sta04]** Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T., "Plasmid DNA purification" Journal of Gene Medicine, 6: S54 – S66, 2004.
- [Ste93]** Stepheson D., Norman F., Cumming R.H.M. "Shear Thickening of DNA in SDS Lysates." Bioseparation, 3: 285-289, 1993.
- [Str95]** Stryer L. "Biochemistry", Fourth Edition Editorial Reverté S.A.1995.
- [Sum09]** Sumalee T. y McConville J.T. "Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C." International Journal of Pharmaceutics, 369: 121–135, 2009.

[Syr07] Syren P.O., Rozkov A., Schmidt S.R., Stromberg P. “Milligram scale parallel purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules and a multi-channel peristaltic pump.” *Journal of Chromatography B*, 856: 68–74, 2007.

[Tar08] Tarmann C. y Jungbauer A. “Adsorption of plasmid DNA on anion exchange chromatography media”. *J. Sep. Sci.* 31: 2605 – 2618, 2008.

[Tej95] Tejeda A., Montesinos R.M., Guzmán R. “Bioseparaciones”. Editorial Unison, Hermosillo, Sonora, México, 1995.

[The97] Theodossiu I. y colaboradores. “The processing of plasmid based gene from *Escherichia coli*: primary recovery by filtration.” *Bioprocess Eng.*, 16: 175-183, 1997.

[Vic09] Vicente Y., Zumalacárregui L., Borrego Y. “Caracterización de geles cromatográficos utilizados en la purificación de eritropoyetina”. *Revista Electrónica Bioprocessos (CIM)*, No 1, 2009.

[web1] <http://www.sartorius-stedim.com/WW/en/Crossflow-Consumables/Polyethersulfone-Ultrafilter/3061466801E--SG-Sartocon-Slice-Disp.-PESU-100kD,-0,1m%C2%B2/ro5n5kzsvg/a3xbkav8l4n/q5jz1urn6we/article.htm?view=description>

[web2] <http://www.biocompare.com/ProductDetails/827986/Sepharose-CL-4B.html>

[web3]

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_support/documents/general_documents/cms_041646.pdf

[web4] <http://www.biocompare.com/ProductDetails/954214/Sartobind-Q-75-reusable-downscale-unit.html>

[web5] <http://www.biocompare.com/ProductDetails/38834/Sephacryl-S-1000-SF.html>

[web6] <http://www.sartorius-stedim.com/WW/en/Sartobran-P-0.2-%CE%BCm/Sartobran-P-0.2-%C2%B5m-MidiCaps/5235307H9--FF--A-Sartobran-P-MidiCaps,0.2um,size9,4--pc/q4wxljm2bia/fdsko7ix2aw/kbiescbjqmt/article.htm?view=description>

[web7] http://www.advancetecllc.com/cleanroom_spec.html

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA AUTORA

Publicaciones

Limonta M. y col. "Accelerated Stability of plasmid pVEGF₁₂₁ stored in polypropylene and siliconized bulbs". LabCiencia Noticias Técnicas de Laboratorio, Vol 1. 2006.

Dueñas S., Alvarez L., Musacchio A., Acosta N., Falcón V., Martínez G., Amador Y., Guerra I., Alvarez J.C., Pérez A., Linares M., **Limonta M.**, y col. "New alternatives for the development of vaccine preparations: contributions to the knowledge on the interaction of recombinant protein viral antigens with nucleic acids". Biotecnología Aplicada; 24:311-314. 2007.

Limonta M. y col. "Plasmid DNA recovery using size exclusion chromatography and Perfusion chromatography". Biopharm International. Septiembre 21(9). 2008

Ruiz O., Pérez M., Pupo M., **Limonta M.**, Torres D., Martínez S., Macías K., Proenza Y., Valdés J., Martínez E. "High-Cell-Density Culture to produce plasmid DNA for Gene therapy in E.coli". Biopharm International, 22 (7). 2009.

Castellanos M., Cinza Z., Dorta Z., Veliz G., Vega H., Lorenzo I., Ojeda S., Dueñas S., Alvarez L., Martínez G., Ferrer E., **Limonta M.**, Linares M., Ruiz O., Acevedo B., Torres D., Marquez G., Herrera L., Arus E. "Immunization with a DNA vaccine candidate in chronic hepatitis C patients is safe, well tolerated, and does not impair immune response induction after anti-hepatitis B vaccination". The Journal of Gene Medicine Volume 12, Issue 1, pages 107–116. 2010.

Limonta M. y col. "Purification of Plasmid DNA for Clinical Trials Using Membrane Chromatography". Biopharm International, V 23 issue 2. 2010.

Ruiz O. **Limonta M.** y col. "Scalable Technology to Produce Pharmaceutical Grade Plasmid DNA for Gene Therapy". Capítulo del libro "Gene Therapy - developments and future perspectives", ISBN 978-953-307-240-1. 2011.

Limonta M. y Zumalacárregui L. "Adsorption behavior of Plasmid DNA onto Perfusion Chromatographic matrix", en revisión, Biopharm International.

Premios Otorgados:

1. Premio Nacional de Salud 2010, modalidad mejor artículo científico. Co-Autora.
2. Logro de la Academia de Ciencias 2001: Ensamblaje y Caracterización de partículas recombinantes de la proteína del core similares a la cápsida del VHC y sus aplicaciones. **Colaboradora**
3. Logro de la Academia de Ciencias 2006: Nuevas alternativas para el desarrollo de preparaciones vacunales: contribuciones al conocimiento sobre la interacción de proteínas virales con ácidos nucleicos. **Co autora**
4. XVI Forum de Base de Ciencia y Técnica. Mención: Tecnología Alternativa para la producción de ADN con fines terapéuticos. **Autora Principal**
5. XVI Forum de Base de Ciencia y Técnica. Mención: Monitoreo analítico por electroforesis, espectrofotometría y HPLC de los procesos de producción de ADN. **Autora Principal**

6. XVI Forum de Base de Ciencia y Técnica (Segunda etapa). “Nuevo Método de purificación de ADN plasmídico para el uso en pruebas clínicas en humanos.” Destacado a nivel Municipal. **Autora Principal**
7. Premio BTJ Municipal, 2006 Nuevo Método de purificación de ADN plasmídico para el uso en pruebas clínica sen humanos.” **Autora Principal**

Informes Técnicos Arbitrados:

1. Diseño de un medio de cultivo incrementado para la obtención de la proteína del núcleo del virus de la Hepatitis C en E. Coli. 2004. **Coautora.**
2. Estudio comparativo de Sistemas de dos fases acuosas y Cromatografía de Exclusión Molecular en la purificación de ADN plasmídico. 2005. **Autor Principal**
3. Mejoras tecnológicas en las etapas de Exclusión Molecular y Fase Reversa del proceso de obtención de ADN plasmídico calidad inyectable. 2005. **Autor Principal**
4. Diseño de un proceso de fermentación por lotes para la obtención de ADN plasmídico para uso terapéutico y vacunal. 2005. **Coautora.**
5. Influencia del Extracto de levadura en los costos de Materias Primas del cultivo incrementado para obtener ADN plasmídico en una fermentación de 5 litros. 2006. **Coautora.**
6. Validación de la técnica de cuantificación del ADN de la vacuna terapéutica contra la hepatitis C (pIDKE2) por espectrofotometría a 260 nm en muestras de producto terminado. 2007. **Coautora.**

7. Validación del método de cuantificación del ADN de la vacuna terapéutica contra la hepatitis C (pIDKE2) por electroforesis en gel de agarosa en muestras de biomasa húmeda y producto terminado. 2007. **Coautora.**
8. Influencia de la estrategia de fermentación en la producción de ADN plasmídico del factor de crecimiento de endotelio vascular a partir de *E.coli*. 2007. **Coautora.**

Presentación en eventos

- Biotecnología Habana 2006, 4 carteles.
- 6th International Congress on Chemistry and Chemical Engineering, Cuba. 2006, cartel.
- Biotecnología Habana 2007. 3 carteles.
- Biotecnología Habana 2007. 1 Presentación Oral.
- Recovery of Biological Products 13. Presentación Oral, Québec City, Canadá, 2008.

Trabajo de tutoría en Tesis de Diploma y Maestría :

- Eneida Roca, Ingeniería Química "Estudio comparativo de Sistemas de dos fases y cromatografía de exclusión para la purificación de ADN plasmídico." 2005.
- Joandiet Castañeda, Ingeniería Química "Mejoras Tecnológicas en el proceso de Obtención del ADN plásmidico con Calidad Inyectable."2005.

- Jorge Luis López, Máster en Procesos Biotecnológicos “Evaluación de un paso alternativo en la tecnología del proceso de purificación de ADN.” 2008.

Anexos

Anexo 1: Descripción de los reactivos, composición de las disoluciones, matrices, insumos y equipos empleados para el desarrollo del proceso de purificación del plásmido *pIDKE2*

Reactivos	Casa commercial, País
Hidrógenofosfato de Sodio (Na_2HPO_4)	Merck, Alemania
Tris(hidroximetil)aminometano	Merck, Alemania
Ácido Acético (HAc)	Caledón, Canadá
Ácido Clorhídrico (HCl)	Merck, Alemania
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Merck, Alemania
Cloruro de Sodio (NaCl)	Merck, Alemania
Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck, Alemania
Dihidrógenofosfato de Sodio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Alemania
Acetonitrilo	Caledón, Canadá
D(+) Glucosa	Merck, Alemania
Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	Merck, Alemania
2-Propanol	Caledón, Canadá
sal disódica Etilendiaminotetraacético (EDTA óTritriplex III)	Merck, Alemania
Acetato de potasio (KAc)	Merck, Alemania
Agua para inyección	Farmacopea vigente americana

Disolución	Composición
TE 1X	EDTA 1,86 g/L; Tris 1,5 g/L, pH 7
Liso ⁻	Glucosa 4,5 g/L; EDTA 1,86 g/L; Tris 1,5 g/L, pH 7
Neutralización	Acetato de potasio 294,45 g/L (KAc 3 mol/L), pH 5,5
Dodecilsulfato de sodio	SDS 20% p/v
Gel filtración 1 (GF1)	Ácido etilendiaminotetracético sal disódica dihidratada (EDTA) 3,24 g/L; (NH ₄) ₂ SO ₄ 198,2 g/L; Tris 3,24 g/L; pH 7
Elución de POROS R1 50	Acetonitrilo 10% (v/v), EDTA 3,24 g/L, Tris-HCl 3,24 g/L, pH 7,2
Regeneración de POROS R1 50	Isopropanol 90% (v/v)
Gel filtración 2 (GF2)	EDTA 0,02 g/L; NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O 2,87 g/L; Na ₂ HPO ₄ 2,37 g/L; NaCl 8,7 g/L pH 6,7
Higienización de las matrices de gel filtración	NaOH 8 g/L
Corrida electroforesis agarosa 0,8% (TAE)	EDTA 1,86 g/L; Tris 1,5 g/L; Bromuro de etidio 5x10 ⁻⁶ g/L; pH 8

Equipamiento	Casa commercial, País
Sistema de filtración tangencial escala	Sartorius, Alemania
Sistema de filtración tangencial de 200mL	Sartorius; Alemania
Agitador vertical de paleta	IKA, Alemania
Detector ultravioleta	General Electric, EUA
Registrador	Pentium, Tecún Cuba
Bomba	Watson Marlow, Inglaterra
Membrana de filtración tangencial	Sartorius, Alemania
Medidor de pH y conductividad	Radiometer, Alemania
Centrífuga	Hitachi, Japón
Balanza técnica	Sartorius, Alemania
Balanza analítica	Sartorius, Alemania
Espectrofotómetro UV/Vis	Especkronic, EUA
Agitador magnético	IKA, Alemania
Agitador horizontal	IKA, Alemania
Transiluminador para el procesamiento de geles de agarosa	Kisker, Alemania
Cromatógrafo de gases	Shimadzu, Japón

Matrices e insumos	Casa commercial, País
Matriz de gel filtración Sepharose CL 4B	General Electric, EUA
Matriz de fase reversa POROS R1 50	Applied Biosystems, EUA
Matriz de gel filtración Sephacryl S-1000	General Electric, EUA
Matriz de intercambio iónico Sartobind Q-75	Sartorius, Alemania
Filtro para soluciones	Sartorius, Alemania
Membrana de filtración tangencial	Sartorius, Alemania
Filtro estéril	Sartorius, Alemania
Recipientes de envase de producto final (1mL)	Nalgene, EUA
Columna Porapak Q	Sigma, EUA

Anexo 2: Atributos del diseño de ruptura

Atributos del Diseño de Mezclas

Clase de diseño: Multi-factor Categórico

Nombre del archivo: C:\Users\miladys\Documents\My Documents\Miladys\2011\personal\doctorado\doctorado\tesis\2011\experimentosOK\ruptura.sfx

Diseño Base

Número de factores experimentales: 3

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 36

Grados de libertad para el error: 22

Aleatorizar: Sí

Factores	Niveles	Unidades
tmz	3	
Relación	3	
glucosa	2	

Respuestas	Unidades
cantidad	µg

El StatAdvisor

Usted ha creado un diseño experimental el cual estimará los efectos de 3 factores categóricos.

El diseño es un factorial estándar que consiste en todas las combinaciones de los niveles de los factores. Hay un total de 36 corridas en el diseño.

Anexo 3: Resultados experimentales del diseño multifactor categórico para establecer las condiciones de la ruptura celular

tmz(s)	relación	glucosa	Cantidad (□g)
30	3	0	362
30	1	0	487
120	3	1	718
60	1	1	534
60	1	1	495
30	2	1	479
60	3	1	492
30	3	0	336
60	2	0	323
30	1	0	508
120	3	1	701
30	2	0	352
30	2	1	448
120	2	0	335
60	3	0	399
120	1	1	410
30	3	1	609
120	2	0	353
60	1	0	504
60	3	1	402
120	1	1	442
60	2	1	418
120	3	0	315
60	2	0	333
120	1	0	400
120	2	1	630
60	1	0	455
30	2	0	346
120	1	0	380
30	1	1	427
60	3	0	420
120	2	1	673
120	3	0	351
30	3	1	595
30	1	1	438
60	2	1	597

Anexo 4: Análisis de varianza para experimento realizado durante la ruptura celular

Análisis de Varianza para cantidad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	df	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:tmz	6004,5	2	3002,25	0,99	0,3891
B:relación	7117,17	2	3558,58	1,17	0,3295
C:glucosa	180483	1	180483	59,25	0,0000
INTERACCIONES					
AB	47426,3	4	11856,6	3,89	0,0154
AC	43986,7	2	21993,4	7,22	0,0039
BC	88425,7	2	44212,9	14,51	0,0001
RESIDUOS	67012,9	22	3046,04		
TOTAL (CORREGIDO)	440457	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de cantidad en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 4 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre cantidad con un 95,0% de nivel de confianza.

Anexo 5: Atributos del diseño para el establecimiento de la etapa de purificación primaria

Atributos del Diseño de Mezclas

Clase de diseño: Factorial Multilevel

Nombre del archivo: C:\Users\miladys\Documents\My Documents\Miladys\2011\personal\doctorado\doctorado\tesis\2011\experimentosOK\semipurific aCl4B.sfx

Diseño Base

Número de factores experimentales: 3

Número de bloques: 1

Número de respuestas: 2

Número de corridas: 12

Grados de libertad para el error: 4

Aleatorizar: Sí

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
Carga	-1.0	1.0	3	%
ConcSulf	-1.0	1.0	2	
tamaño	-1.0	1.0	2	kb

Respuestas	Unidades
proteínas	mg/mL
separación	%

El StatAdvisor

Usted ha creado un diseño factorial multinivel que consiste de 12 corridas. El diseño deberá ser corrido en un solo bloque. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

Anexo 6: Registro de las corridas experimentales correspondientes al diseño realizado con la matriz “Sephadex G-25” con una carga aplicada a la columna del 40%.

Condiciones de corrida:

Diámetro de columna: 1,6 cm

Volumen de matriz: 94 mL

Velocidad lineal: 15 cm/h equivalente a 0,5 mL/min

Disoluciones empleadas: equilibrio: GF1, higienización: NaOH 8g/L

Volumen de muestra: 40% volumen de matriz

Temperatura: 20°C

1 unidad de absorbancia = 1 mVolt

$\lambda = 254 \text{ nm}$

Anexo 7: Análisis de varianza para determinar la cantidad mínima de proteínas en el eluato de la cromatografía de exclusión molecular empleando la matriz Sepharose CL 4B

Análisis de Varianza para proteínas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Carga	0,000496125	1	0,000496125	22,83	0,0088
B:ConcSulf	0,000003	1	0,000003	0,14	0,7291
C:tamaño	0,000108	1	0,000108	4,97	0,0897
AA	0,000532042	1	0,000532042	24,49	0,0078
AB	0,000406125	1	0,000406125	18,69	0,0124
AC	0,000300125	1	0,000300125	13,81	0,0205
BC	0,0000653333	1	0,0000653333	3,01	0,1579
Error total	0,0000869167	4	0,0000217292		
Total (corr.)	0,00199767	11			

R-cuadrada = 95,6491 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 88,035 porciento

Error estándar del est. = 0,00466146

Error absoluto medio = 0,002125

Estadístico Durbin-Watson = 1.07023 (P=0,1170)

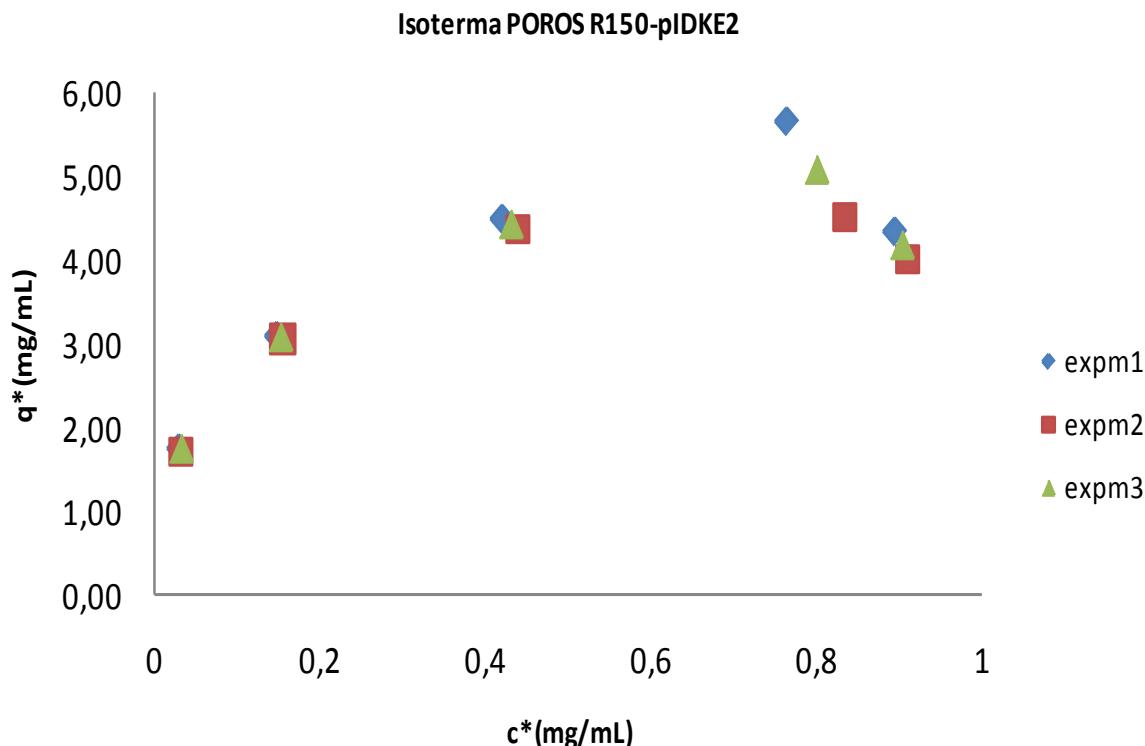
Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,373602

El StatAdvisor

La tabla ANOVA partitiona la variabilidad de proteínas en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 4 efectos tienen una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo 8: Gráfico que muestra los resultados experimentales de la isoterma de adsorción en el sistema POROS R150 – plásmido pIDKE2. Expm1, 2 y 3 se corresponden con las réplicas del experimento realizados a una temperatura de 20°C.

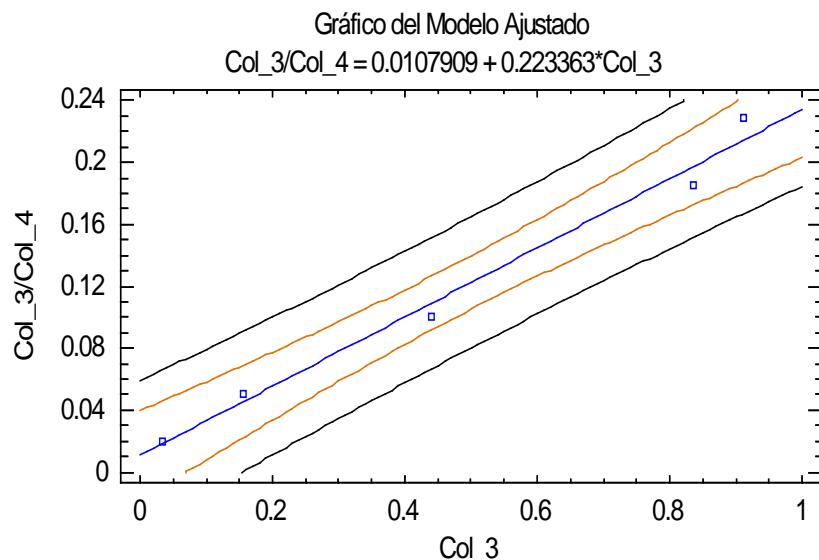
□



Anexo 9: a) *Modelo ajustado y residuos de la variante linealizada del modelo de Langmuir Semi recíproca que describe la isoterma de equilibrio del sistema POROS R1 50 – plásmido pIDKE2. Donde Col_3/Col_4 = c*/q* y Col_3 = c**

Regresión Simple – semirecíproca

Variable dependiente: $Col_3/Col_4 = c^*/q^*$



Variable independiente: $Col_3 = c^*$

Lineal: $Y = a + b^*X$

Coeficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,0107909	0,00912731	1,18227	0,3223
Pendiente	0,223363	0,0154338	14,4723	0,0007

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,0308906	1	0,0308906	209,45	0,0007
Residuo	0,000442456	3	0,000147485		
Total (Corr.)	0,031333	4			

Coeficiente de Correlación = 0,992914

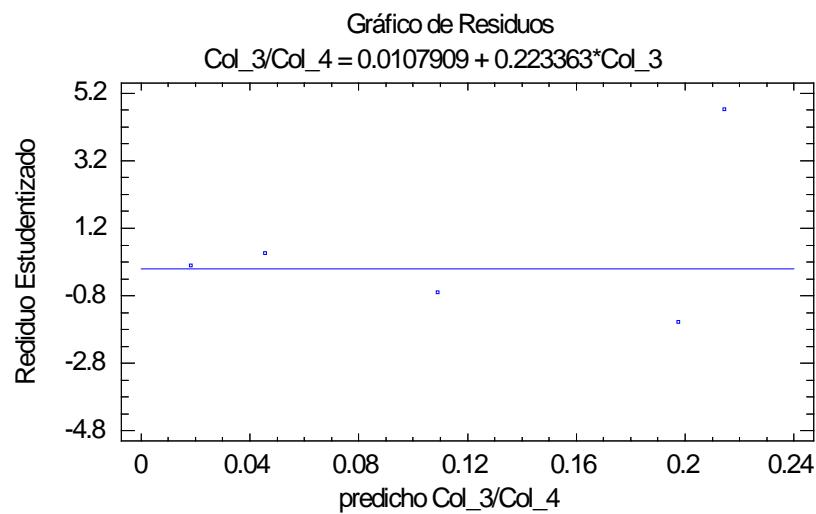
R-cuadrada = 98,5879 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,1172 porciento

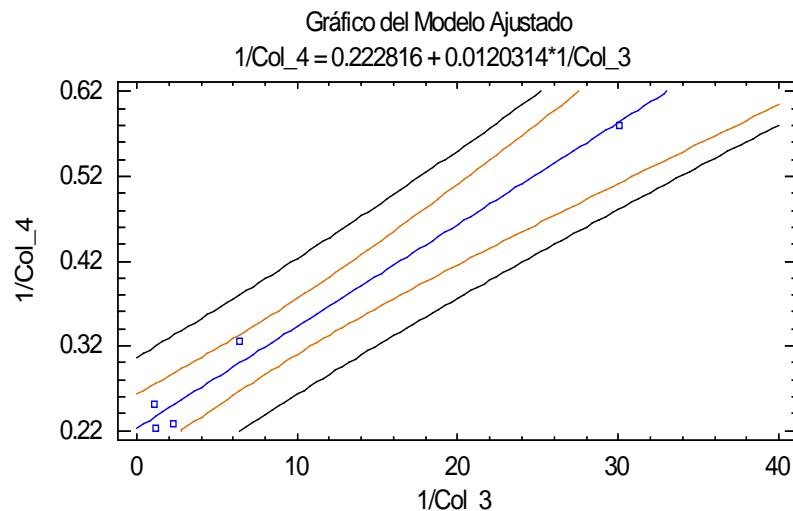
Error estándar del est. = 0,0121444

Error absoluto medio = 0,00815971

Estadístico Durbin-Watson = 2,02804 (P=0,1999)



Anexo 9: b) Modelo ajustado y residuos de la variante linealizada del modelo de Langmuir doble recíproca que describe la isoterma de equilibrio del sistema POROS R1 50 – plásmido pIDKE2. Donde: $1/\text{Col}_4 = 1/q^*$ y $1/\text{Col}_3 = 1/c^*$



Regresión Simple – doblereciproca
 Variable dependiente: $1/\text{Col}_4 = 1/q^*$
 Variable independiente: $1/\text{Col}_3 = 1/c^*$
 Lineal: $Y = a + b^*X$

Coeficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0,222816	0,0127838	17,4295	0,0004
Pendiente	0,0120314	0,000926992	12,979	0,0010

Análisis de Varianza

Fuente	Suma Cuadrados	de G.I	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,0889284	1	0,0889284	168,45	0,0010
Residuo	0,00158373	3	0,000527908		
Total (Corr.)	0,0905121	4			

Coeficiente de Correlación = 0,991213

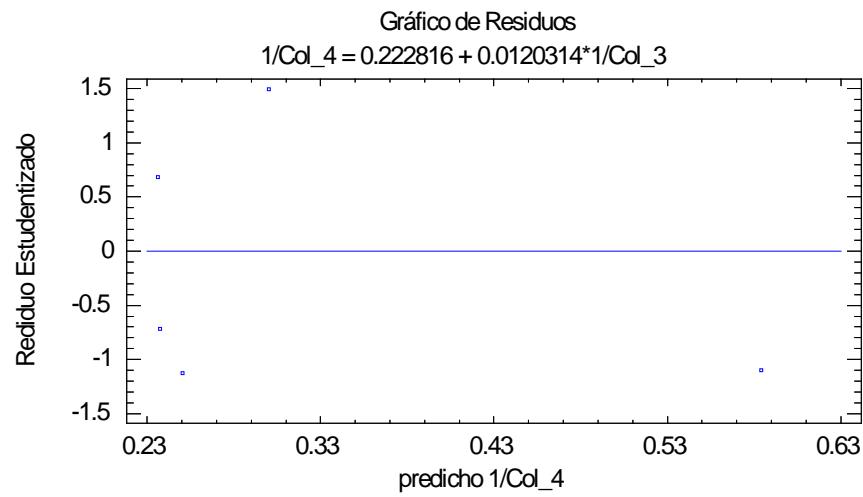
R-cuadrada = 98,2503 porcientos

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97,667 porcientos

Error estándar del est. = 0,0229763

Error absoluto medio = 0,0161854

Estadístico Durbin-Watson = 2,54468 (P=0,5906)



Anexo 10: Análisis del modelo ajustado de Langmuir por regresión no lineal. Donde
Col_4 = q* y Col_3 = c*

Variable dependiente: Col_4 = q*

Variables independientes: Col_3 = c*

Función a estimar: $a \cdot Col_3 / (b + Col_3)$

Estimaciones iniciales de parámetros:

a = 5,18

b = 0,06

Método de estimación: Marquardt

La estimación se detuvo debido a la convergencia de la suma de cuadrados de residuos.

Número de iteraciones: 3

Número de llamadas de la función: 11

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio
Modelo	67,3748	2	33,6874
Residuo	0,325638	3	0,108546
Total	67,7005	5	
Total (Corr.)	5,34725	4	

R-Cuadrada = 93,9102 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 91,8802 porciento

Error estándar del est. = 0,329463

Error medio absoluto = 0,240392

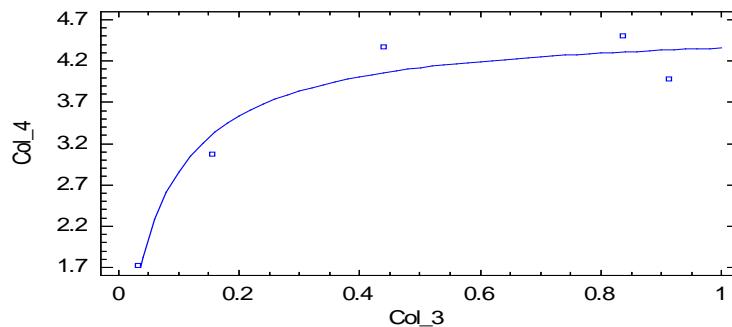
Estadístico Durbin-Watson = 2,2633

Autocorrelación residual de retardo 1 = -0,3293

Análisis de Residuos

	Estimación
n	5
CME	0,108546
MAE	0,240392
MAPE	6,81798
ME	0,00561445
MPE	0,200325

Gráfica del Modelo Ajustado



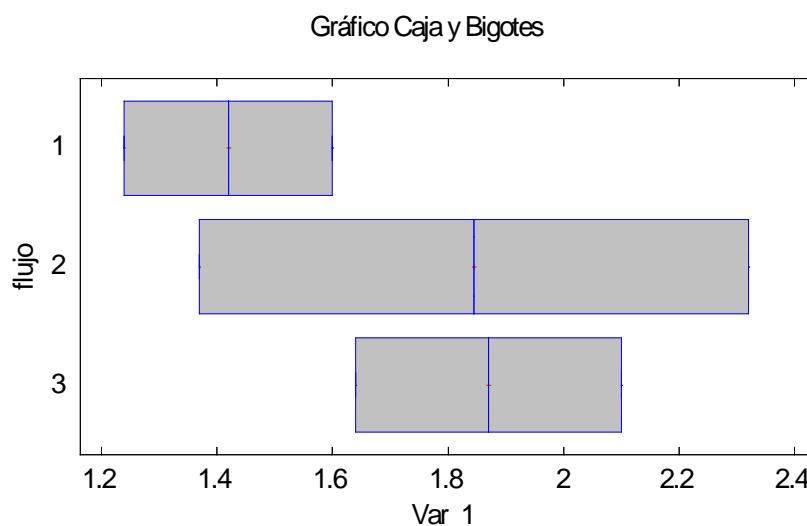
Anexo 11: Análisis de varianza de los resultados obtenidos en el estudio de capacidad dinámica a diferentes flujos volumétricos y gráfico de cajas bigotes

Tabla ANOVA para Var_1 por flujo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,255833	2	0,127917	0,62	0,5964
Intra grupos	0,62185	3	0,207283		
Total (Corr.)	0,877683	5			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de Var_1 en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,61711, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Var_1 entre un nivel de flujo y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.



Anexo 12: Atributos del diseño experimental y datos obtenidos para la selección del solvente a emplear en la elución del plásmido pIDKE2

Atributos del Diseño de Mezclas

Clase de diseño: Factor Categorío Individual

Nombre del archivo: C:\Users\miladys\Documents\My Documents\Miladys\2011\personal\doctorado\doctorado\tesis\2011\experimentosOK\porosbatchresults.sfx

Diseño Base

Número de factores experimentales: 1

Número de bloques: 1

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 6

Grados de libertad para el error: 3

Aleatorizar: Sí

Factores	Niveles	Unidades
Solvente	3	40%

Respuestas	Unidades
ADNp _{se}	μg

El StatAdvisor

Usted ha creado un diseño \tesis\2011\experimentosOK\p que consiste de 6 corridas. El diseño deberá ser corrido en un solo bloque. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

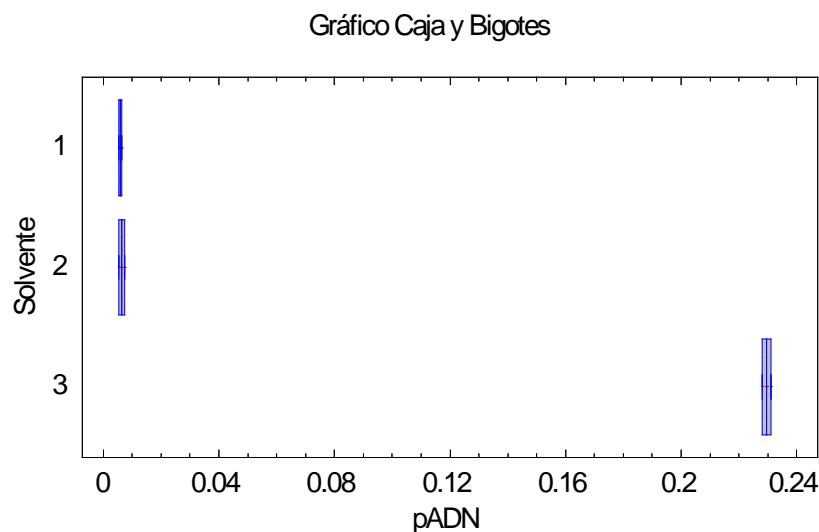
Anexo 13: Análisis de varianza de los resultados obtenidos en la selección del solvente para la elución del plásmido pIDKE2 y gráfico de cajas y bigotes

Tabla ANOVA para pADN por Solvente

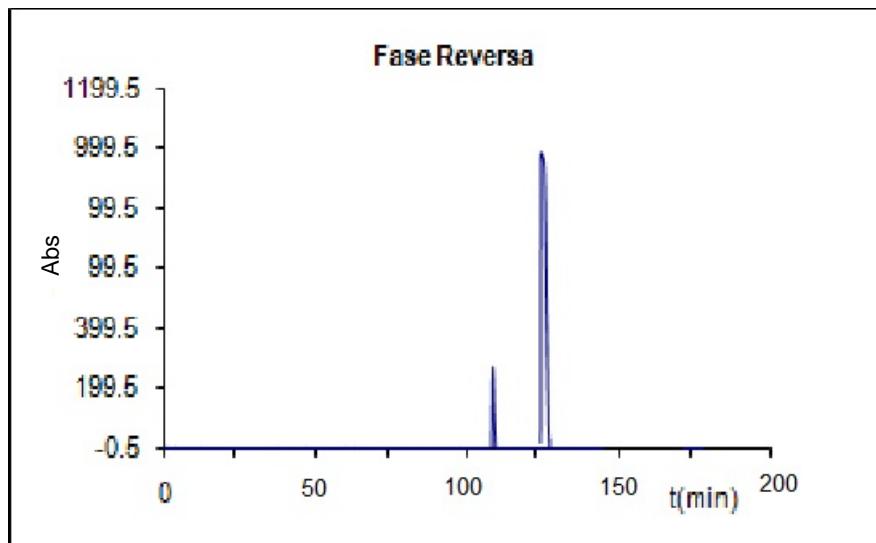
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0665376	2	0,0332688	14175,43	0,0000
Intra grupos	0,0000070408	3	0,0000023469		
Total (Corr.)	0,0665446	5			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de pADN en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 14175,4, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pADN entre un nivel de Solvente y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, seleccione Pruebas de Múltiples Rangos, de la lista de Opciones Tabulares.



Anexo 14: Cromatograma típico correspondiente a la escala de banco de la cromatografía de fase reversa con la matriz POROS R1 50



Condiciones de corrida:

Diámetro de columna: 5 cm

Volumen de matriz: 69 mL

Velocidad lineal: 60 cm/h equivalente a 19,6 mL/min

Disoluciones empleadas: equilibrio: GF1; lavado: agua para inyección; elución: TE 1X + Acetonitrilo 10%, regeneración: isopropanol 90%

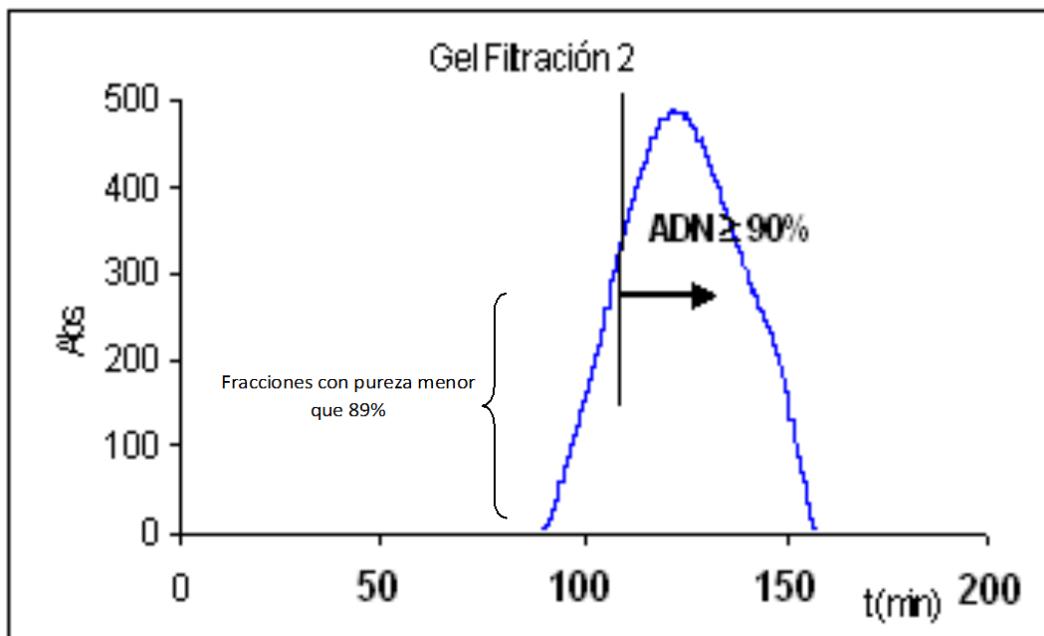
Volumen de muestra en la escala de banco: 1100 mL – 1400 mL

Temperatura: 20°C

1 unidad de absorbancia = 1 mVolt

$\lambda = 254 \text{ nm}$

Anexo 15: Cromatograma tipo de la etapa de Gel filtración 2 escala de banco, se utilizó la matriz Sephadex S-1000, y se obtuvieron fracciones con pureza desde 65 % hasta más del 95% en la disolución gel filtración 2



Condiciones de corrida:

Volumen de matriz: 780 mL

Diámetro de columna: 5 cm

Velocidad lineal: 14,5 cm/h equivalente a 4,8 mL/min

Disoluciones empleada GF2, higienización: NaOH 8 g/L

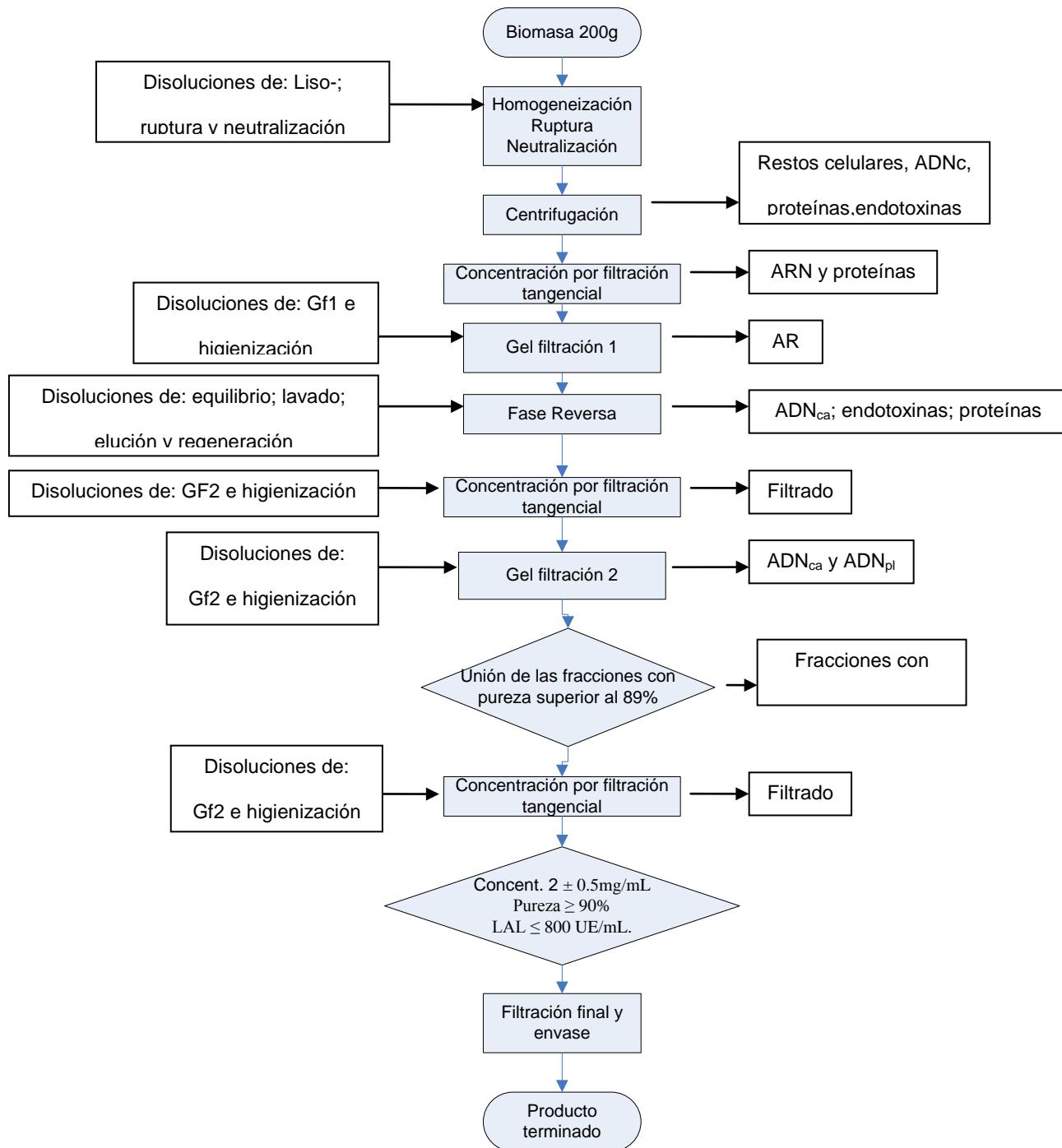
Volumen de muestra aplicado: entre el 3% – 5% del volumen de la matriz

Temperatura: 20°C

1 unidad de absorbancia = 1 mVolt

$\lambda = 254 \text{ nm}$

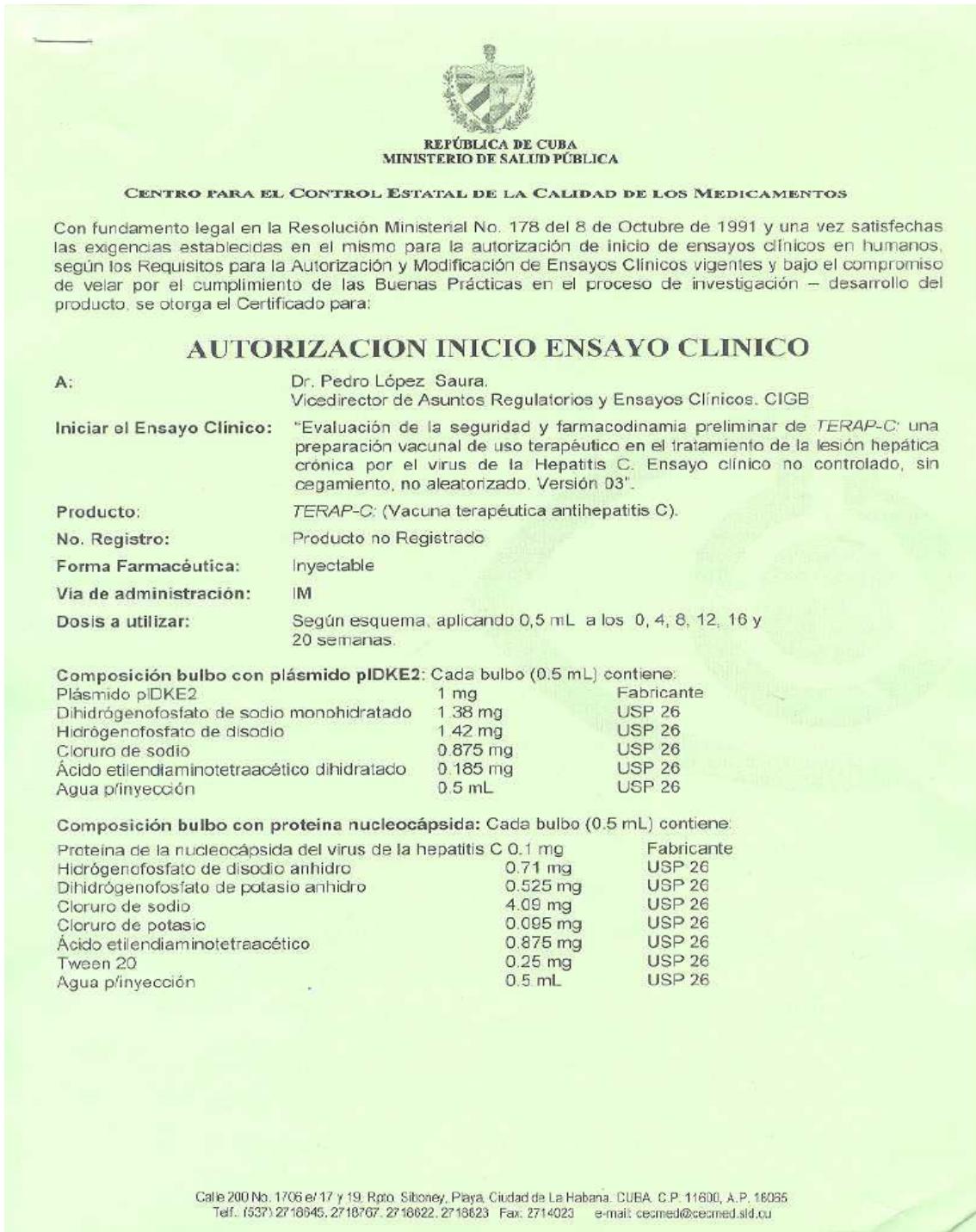
Anexo 16: Diagrama del proceso establecido en la escala de banco para la obtención del plásmido pIDKE2 a partir de 200 g de biomasa



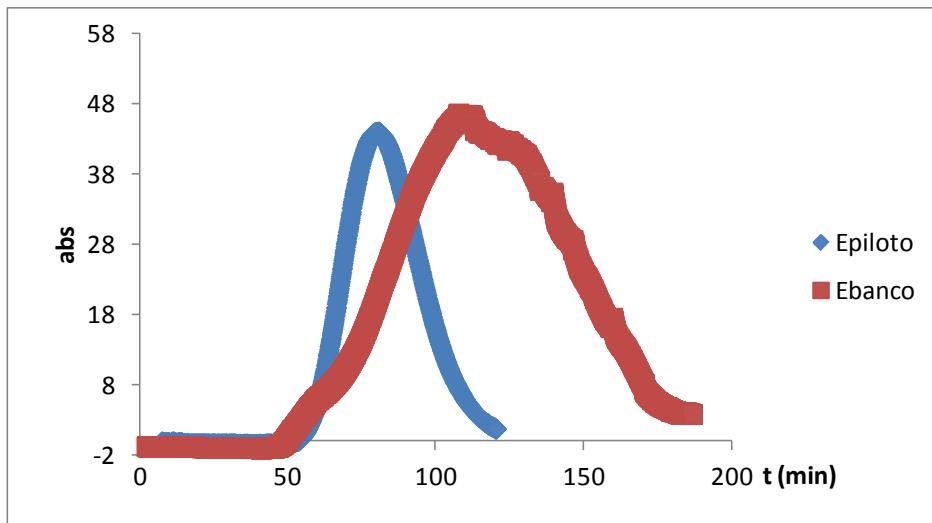
Anexo 17: Informe analítico típico de los lotes realizados a escala de banco (200 g de biomasa)

CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA DIRECCIÓN DE CONTROL DE LA CALIDAD		SIC - 0092 Edición 03	PPO 4.09.144.99 Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS			FOLIO: 1262
PRODUCTO: ADN de la Vacuna terapéutica contra la Hepatitis C.			MUESTRA: Producto final.
Nº de control: 3094-4001-4092	Nº de lote: AHC805 F	Presentación: -	Fecha de Fabricación: 08/2008
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS	RESULTADOS	
Características Organolépticas	Líquido Incoloro, transparente y libre de partículas en suspensión. PPO 4.09.140.98	Líquido Incoloro, transparente y libre de partículas en suspensión.	
IDENTIDAD (Talla)	5541pb Electroforesis PPO 4.09.349.06	5541pb	
ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	Las bandas observadas coinciden con las reportadas según la talla del plasmado. PPO 4.09.349.06	Las bandas observadas coinciden con las reportadas según la talla del plasmado.	
ACTIVIDAD BIOLÓGICA	> 25 % de seroconversión contra las proteínas core y la E ₂ o la E ₁ del VHC PPO 5.66.001.05	> 25 % de seroconversión contra las proteínas para core 100 % y para E ₁ 100 %.	
ESTERILIDAD	Pasa la prueba USP 30	Pasa la prueba	
ENDOTOXINAS	< 350 UE/dosis LAL USP 27	25.15 UE/dosis	
SEGURIDAD GENERAL	Conforme (Dosis ratón / curie 100 µg/animal) BP 07	Conforme	
% SUPERENROLLADO	≥ 90 % Electroforesis PPO 1.34.606.03 ó PPO 4.09.349.06	> 90 %	
CONTENIDO DE ARN	No visible en geles de agarosa. Electroforesis PPO 1.34.606.03 ó PPO 4.09.349.06	No visible en geles de agarosa.	
CONCENTRACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	Entre 1.5 y 2.5 mg/mL Electroforesis PPO 1.34.610.04	1.59 mg/mL	
ADN (CONTAMINANTE)	≤ 5 ng / dosis Electroforesis PPO 1.34.606.03 ó PPO 4.09.349.06	< 5 ng / dosis	
PROTEÍNAS CONTAMINANTES	≤ 5 µg / dosis PPO 1.34.616.03 / PPO 1.34.610.04	0 µg/dosis	
pH	6.7 ± 0.2 PPO 4.09.068.92 USP 30	6.73	
OBSERVACIONES: CONFORME			
REALIZADO POR:	NOMBRES Y APELLIDOS Dayna Rodríguez Martel	FIRMA <i>Dayna Rodríguez Martel</i>	FECHA 9/12/08
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano	<i>Lourdes Costa Anguiano</i>	15-12-08
RECIBIDO POR:	<i>lourdes costa</i>		22-01-09

Anexo 18: Autorización de inicio de estudio clínico fase I entregada por el CECMED para el uso del candidato vacunal Terap C (CIGB 230) en pacientes con hepatitis C



Anexo 19:a) Cromatograma tipo y b) parámetros del escalado de la cromatografía gel filtración 2 (GF2)

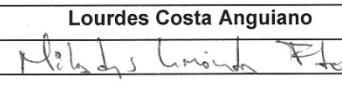


Anexo 19 a: Cromatograma tipo del escalado realizado para la cromatografía de gel filtración 2 E de banco (escala de banco), E piloto escalado a columna de 10 cm de diámetro, empacada con 3,14 L de “Sephacryl S-1000”

Anexo 19 b: Parámetros de operación calculados a partir de los criterios aplicados para el escalado de la cromatografía de exclusión molecular 2 (GF2).

Parámetros	Piloto	Banco
R	$3 \pm 0,02$	$3 \pm 0,63$
Altura de la columna (cm)	40	40
Diámetro de la columna (cm)	10	5
Volumen de columna (L)	3,14	0,78
Volumen de muestra inicial (mL)	92 – 120	23 – 40
Factor de Escala	-	2
$\Delta t(min)$	55 ± 2	42 ± 2
$VCe (L)$	13	11

Anexo 20 Informe analítico típico de los lotes realizados con el proceso de piloto (400g de biomasa)

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA DIRECCION DE CONTROL DE LA CALIDAD		SIC-0092	PPO 4.09.144.99		
		Edición 03	Pág. 1 de 2		
INFORME DE ANALISIS		FOLIO: 873			
PRODUCTO: ADN de la vacuna terapéutica contra la Hepatitis C (pIDKE2)		MUESTRA: Producto Final			
Nº DE CONTROL: 557-565	Nº DE LOTE: AHC1003F	PRESENTACION: -	FECHA DE FABRICACION: 03/2010		
ENsayos	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS		RESULTADOS		
Características Organolépticas	Líquido incoloro, transparente y libre de partículas en suspensión. PPO 4.09.140.98 ¹		Líquido transparente, libre de partículas en suspensión		
Identidad (Talla)	5541 pb Electroforesis, PPO 4.09.349.06 ¹		5541 pb		
Análisis de Restricción	Las bandas observadas coinciden con las reportadas según la talla del plásmido. PPO 4.09.349.06 ¹		Las bandas observadas coinciden con las reportadas según la talla del plásmido.		
Actividad Biológica	> 25% de seroconversión contra las proteínas del core y la E ₂ o la E ₁ del VHC. PPO 5.66.001.05 ¹		42.86 % de seroconversión contra la proteína del core y % 64.29 % de seroconversión contra la E ₂ del VHC.		
Esterilidad	Pasa la prueba PPO 4.09.274.94 USP 30		Pasa la prueba		
Endotoxinas	< 350 UE / dosis LAL PPO 4.32.081.95 ¹ , PNOT 02.013.0501 ²		57.17 UE / dosis		
Seguridad General	Conforme Dosis ratón / curiel 100 µg/animal BP 10 , PNO 07.001		Conforme		
% Superenrrollado	≥ 90% Electroforesis PPO 4.09.349.06 ¹ , PPO 1.34.606.03 ¹		96 %		
Contenido ARN	No visible en geles de agarosa Electroforesis PPO 4.09.349.06 ¹ , PPO 1.34.606.03 ¹		No visible en geles de agarosa		
Concentración ADN plasmídico	Entre 1.5 – 2.5mg/mL Electroforesis , PPO 1.34.610.04 ¹		1.8 mg/mL		
ADN contaminante	≤ 5 ng / dosis Electroforesis PPO 4.09.349.06 ¹ ó PPO 1.34.606.03 ¹		< 5 ng / dosis		
Proteínas contaminantes	≤ 5 µg / dosis Ácido Bisinconínico PPO 1.34.616.03 ¹ ó PPO 4.09.610.04 ¹		≤ 1 µg / dosis		
pH	6.7 ± 0.2 PPO 4.09.068.92 ¹ , USP 31		6.72		
Volumen	≥ 0.5 mL PPO 4.09.271.02 ¹		0.52 mL		
OBSERVACIONES: CONFORME					
¹ Técnica del fabricante.					
² Procedimiento de LIORAD, donde se realiza el ensayo.					
REALIZADO POR:	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA		
REALIZADO POR:	María de los Angeles Cruz		14/07/10		
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		14/07/10		
RECIBIDO POR:			14/07/10		

Anexo 21 Autorización de inicio de Estudio clínico fase II entregada por el CECMED para uso del candidato vacunal Terap C (CIGB 230) en pacientes con Hepatitis C



REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

Con fundamento legal en la Resolución Ministerial No. 178 del 8 de Octubre de 1991 y una vez satisfechas las exigencias establecidas en el mismo para la autorización de inicio de ensayos clínicos en humanos, según los Requisitos para la Autorización y Modificación de Ensayos Clínicos vigentes y bajo el compromiso de velar por el cumplimiento de las Buenas Prácticas en el proceso de investigación – desarrollo del producto, se otorga el Certificado para:

AUTORIZACION INICIO ENSAYO CLINICO

A: Dr. Pedro López Saura.
Vicedirector de Asuntos Regulatorios y Ensayos Clínicos, CIGB

Iniciar el Ensayo Clínico: "Evaluación de la seguridad y farmacodinamia de TERAP-C: una preparación vacunal de uso terapéutico en el tratamiento de la Hepatitis crónica por el virus de la Hepatitis C. Ensayo clínico fase II, controlado, aleatorizado, con cegamiento, Versión 01".

Producto: TERAP-C (Vacuna terapéutica antib hepatitis C).

No. Registro: Producto no Registrado

Forma Farmacéutica: Inyectable

Vía de administración: IM

Dosis a utilizar: 0,5 mL, según esquema.

Composición bulbo con plásmido pIDKE2: Cada bulbo (0,5 mL) contiene:

Plásmido pIDKE2	1 mg	Fabricante
Dihidrógenofosfato de sodio monohidratado	1.38 mg	USP 26
Hidrógenofosfato de disodio	1.42 mg	USP 26
Cloruro de sodio	0.875 mg	USP 26
Ácido etilendiaminotetraacético dihidratado	0.185 mg	USP 26
Agua p/inyección	0.5 mL	USP 26

Composición bulbo con proteína nucleocápsida: Cada bulbo (0,5 mL) contiene:

Proteína de la nucleocápsida del virus de la hepatitis C	0.1 mg	Fabricante
Hidrógenofosfato de disodio anhídrico	0.71 mg	USP 26
Dihidrógenofosfato de potasio anhídrico	0.525 mg	USP 26
Cloruro de sodio	4.09 mg	USP 26
Cloruro de potasio	0.095 mg	USP 26
Ácido etilendiaminotetraacético	0.875 mg	USP 26
Tween 20	0.25 mg	USP 26
Agua p/inyección	0.5 mL	USP 26

Calle 200 No. 1706 entre 17 y 19, Rpto. Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, CUBA, C.P. 11600, A.P. 16065
Tel.: (537) 2718645, 2718787, 2718622, 2718823 Fax: 2714023 e-mail: cecmed@cecmed.sld.cu

Anexo 22: Análisis de varianza para el rendimiento y recobrado de cada una de las etapas en las escalas de banco y piloto

Análisis de Varianza para recobrado - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:etapa	3788.92	5	757.783	9.39	0.0000
B:escala	46.6944	1	46.6944	0.58	0.4529
RESIDUOS	2339.14	29	80.66		
TOTAL (CORREGIDO)	6174.75	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de recobrado en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre recobrado con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:etapa	2.09632	5	0.419265	104.88	0.0000
B:escala	0.002025	1	0.002025	0.51	0.4823
RESIDUOS	0.115925	29	0.00399741		
TOTAL (CORREGIDO)	2.21428	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de rendimiento en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre rendimiento con un 95.0% de nivel de confianza.

Anexo 23: *Reporte del SuperPro Designer en el que se presenta un resumen ejecutivo económico de la modelación del proceso de purificación en la escala piloto para obtener el plásmido pIDKE2*

Resumen ejecutivo

TOTAL CAPITAL INVESTMENT	11376000 \$
CAPITAL INV. CHARGED TO THIS PROJECT	11376000 \$
OPERATING COST	338000 \$/year
PRODUCTION RATE	0.179 kg/year of ADN (in
Producto Final)	
UNIT PRODUCTION COST	1889864 \$/kg of ADN (in Producto
Final)	
TOTAL REVENUES	21269000 \$/year
GROSS MARGIN	98.41 %
RETURN ON INVESTMENT	74.69 %
PAYBACK TIME	1.34 years
IRR AFTER TAXES	39.77 %
NPV (at 7.0 % interest)	47399000 \$

Anexo 24: a) Características del diseño experimental para evaluar la sensibilidad de los recobrados de las etapas de concentración y gel filtración 1 sobre el costo de producción y la cantidad de producto anual.

Atributos del Diseño Multi-factor Categórico

Clase de diseño: Multi-factor Categórico

Nombre del archivo: <Sin Título>

Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de respuestas: 2

Número de corridas: 25

Grados de libertad para el error: 0

Aleatorizar: Sí

Factores	Niveles	Unidades
recobradoGF1	5	%
recobradoConcentración1	5	%

Respuestas	Unidades
costodeproducción	\$/año
cantidad ADNpse	g/año

El StatAdvisor

Usted ha creado un diseño experimental el cual estimará los efectos de 2 factores categóricos. El diseño es un factorial estándar que consiste en todas las combinaciones de los niveles de los factores. Hay un total de 25 corridas en el diseño. NO hay grados de libertad disponibles para estimar el error experimental. Por lo tanto, no será capaz de hacer ninguna prueba estadística a los resultados.

Anexo 24: b) Datos y resultados de la modelación para evaluar la sensibilidad de los recobrados de las etapas de concentración y gel filtración 1 sobre el costo de producción y la cantidad de producto anual.

recobrado Gf1 (%)	recobrado Concentració1(%)	costodeproducción \$/año	cantidad ADNpse g/año
60	60	\$2,288,986.00	148
72	80	\$1,350,088.00	250
60	80	\$1,620,102.00	208
72	60	\$1,907,491.00	177
70	60	\$1,961,990.00	172
69	63	\$1,889,864.00	179
69	70	\$1,674,539.00	202
60	85	\$1,485,995.00	227
70	80	\$1,388,661.00	243
75	85	\$1,188,798.00	284
60	63	\$2,173,341.00	155
75	80	\$1,296,085.00	261
72	70	\$1,604,767.00	210
69	60	\$1,990,424.00	170
69	80	\$1,408,787.00	240
70	63	\$1,862,866.00	181
70	85	\$1,273,712.00	265
75	60	\$1,831,191.00	184
75	70	\$1,540,577.00	219
70	70	\$1,650,617.00	205
72	85	\$1,238,331.00	273
60	70	\$1,925,717.00	175
69	85	\$1,292,171.00	261
72	63	\$1,811,120.00	187
75	63	\$1,738,676.00	194

Anexo 25: Resultados del análisis de varianza del estudio de sensibilidad de los recobrados de las etapas de concentración y gel filtración 1 sobre el costo de producción y la cantidad de producto anual.

Análisis de Varianza para costodeproducción - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:recobradoGF1	4.19856E11	4	1.04964E11	151.36	0.0000
B:recobradoConcentració1	1.81136E12	4	4.52839E11	652.99	0.0000
RESIDUOS	1.10958E10	16	6.93485E8		
TOTAL (CORREGIDO)	2.24231E12	24			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de costodeproducción en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre costodeproducción con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de Varianza para cantidad ADNpse - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:recobradoGF1	5924.4	4	1481.1	130.78	0.0000
B:recobradoConcentració1	31092.4	4	7773.1	686.37	0.0000
RESIDUOS	181.2	16	11.325		
TOTAL (CORREGIDO)	37198.0	24			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de cantidad ADNpse en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre cantidad ADNpse con un 95.0% de nivel de confianza.

Anexo 26: Reporte del SuperPro Designer en el que se presenta un resumen ejecutivo económico de la modelación del proceso de purificación en la escala piloto para obtener el plásmido pIDKE2 con 3 sistemas de filtración tangencial

EXECUTIVE SUMMARY (2011 prices)

TOTAL CAPITAL INVESTMENT	11450000 \$
CAPITAL INV. CHARGED TO THIS PROJECT	11450000 \$
OPERATING COST	414000 \$/year

PRODUCTION RATE	0.306 kg/year of ADN (in Producto Final)
-----------------	--

UNIT PRODUCTION COST	1352934 \$/kg of ADN (in Producto Final)
----------------------	--

TOTAL REVENUES	36434000 \$/year
----------------	------------------

GROSS MARGIN	98.86 %
RETURN ON INVESTMENT	126.97 %
PAYBACK TIME	0.79 years
IRR AFTER TAXES	56.48 %

NPV (at 7.0 % interest)	89309000 \$
-------------------------	-------------
