

ESCALAMIENTO SUSTENTABLE DE LA RECUPERACIÓN INTERMEDIA POR UFFT DEL PLÁSMIDO PVAX1-NH36

Diana Ivonne Franco-Medrano^a, Patricia Guerrero-Germán^a, Armando Lucero-Acuña^a, Rosa María Montesinos-Cisneros^b, Jaime Ortega-López^c, Armando Tejeda-Mansir^d.

^aDepartamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, 83000, México. pguerrero@iq.uson.mx

^b Departamento de Matemáticas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas s/n, Hermosillo, Sonora, 83000, México.

^c Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. 0736, México.

^dDepartamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas s/n, Hermosillo, Sonora, 83000, México.

Palabras clave: pDNA, ultrafiltración tangencial, terapia génica y vacunación.

Introducción. La demanda de DNA plasmídico (pDNA) se ha incrementado por los avances en su uso en terapias génicas y vacunación (1). En los bioprocesos correspondientes, el objetivo de la recuperación intermedia es procesar el clarificado obtenido de lisados de células de *Escherichia coli* para concentrar pDNA y reducir la mayoría de las impurezas, que representan más del 90% de la masa total de soluto (2). Un enfoque probado a nivel laboratorio fue realizar estas operaciones mediante ultrafiltración de flujo tangencial (UFFT) en sistemas libre de agentes químicos, sin embargo, se requiere efectuar estudios a escala conforme a las demandas del mercado. En la presente investigación se realizó el escalamiento de la etapa de recuperación de pDNA por UFFT con módulo de fibras huecas.

Metodología. Se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α , hospedando pVAX1-NH36. Las etapas de fermentación y recuperación primaria se desarrollaron de acuerdo con lo reportado previamente (3). La etapa de recuperación intermedia de pDNA se realizó en un sistema de diafiltración KroFlo® Research Ili TFF System de SpectrumLabs acoplado a cartucho de UFFT 300 kDa y un área superficial de 75 cm² (escalamiento 1:5). El lisado clarificado obtenido en la recuperación primaria se alimentó a un sistema de UFFT por lote a una velocidad de flujo constante de 15,279 L/(min*m²) a una $\Delta P=7$ kPa, obteniéndose un flujo de permeado de 0.68 L/(min*m²). Se concentró la solución al 50% y posteriormente se diafiltró con 6 volúmenes de lavado (4). Se tomaron muestras de retenidos y filtrados en cada lavado y se analizaron por electroforesis y por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) para verificar la calidad y concentración del pDNA (5).

Resultados. En la Figura 1 se muestra el perfil absorbancia por HIC de algunas muestras de lisado alimentado y retenidos, donde se puede observar que el pDNA se concentró sin pérdidas apreciables durante el

proceso, ni desnaturalización. Asimismo, se observa la remoción de impurezas durante cada lavado. Las muestras obtenidas también se analizaron por electroforesis (Figura 2). Se puede apreciar la retención de prácticamente todo el pDNA en UFFT, mientras que en los filtrados se observa que la eliminación del RNA avanza conforme se realizan los lavados.

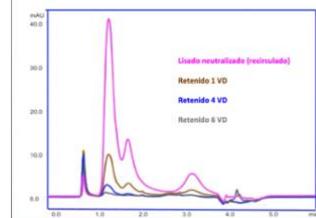


Fig. 1. Cuantificación de plásmido e impurezas en el retenido en cada lavado en la etapa de recuperación por UFFT.

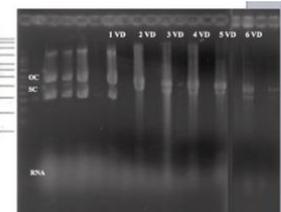


Fig. 2. Análisis cualitativo por electroforesis en gel de agarosa del clarificado alimentado, así como muestras de retenidos y filtrados en cada lavado.

Conclusiones. Mediante el procesamiento de lisados por UFFT a escala se logró recuperar prácticamente todo el pDNA, sin desnaturalización del mismo. Además, se eliminaron la mayoría de las impurezas presentes (RNA, proteínas, lípidos, endotoxinas, gDNA). Los resultados sugieren que el sistema UFFT es una alternativa sustentable para la recuperación intermedia de pVAX1-NH36.

Agradecimientos. Al Laboratorio de Bioprocesos del DICTUS y CONACYT por el proyecto CB2015-257411.

Bibliografía.

1. Duarte SP *et al.* (2007). *J Chromatogr A*. 164:105–112.
2. Freitas S *et al.* (2009). *Biotechnol. J.* 4, 265–278.
3. Diogo MM *et al.* (2001). *J Gene Med*. 3:577-584.
4. Franco *et al.* (2016). *Bioprocess Biosyst Eng.* 40(3):463-471.
5. Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF (2003). *J. Chromatogr. A*, 998,109–117.

