



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 421**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04016802 .3**

96 Fecha de presentación : **16.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1533377**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Purificación de ADN plasmídico por filtración.**

30 Prioridad: **20.11.2003 US 523629 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

72 Inventor/es: **Antoniou, Chris**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Purificación de ADN plasmídico por filtración.

5 La presente invención se refiere a un sistema y método para utilizar el sistema para clarificar ADN plasmídico. Más particularmente, se refiere a un sistema de filtración de flujo normal y al método para utilizar el sistema para clarificar ADN plasmídico de lisados celulares.

Antecedentes de la invención

10 El ADN plasmídico es un producto importante para las aplicaciones de terapia génica. Se propaga en células anfitrionas que se lisan para liberar el ADN plasmídico. El lisado se clarifica y el ADN plasmídico se recupera utilizando varios regímenes tales como cromatografía y semejantes.

15 Los métodos para clarificar las corrientes de lisado que contienen ADN plasmídico se han descrito en WO 00/05358 y WO 97/23601. En ambos, el lisado se somete a una etapa de centrifugación que separa el ADN plasmídico y los sólidos y partículas más pequeños de los sólidos más grandes tales como restos de la pared celular y semejantes. El sobrenadante que contiene el ADN plasmídico se recoge cuidadosamente de la centrífuga y se somete a una serie de etapas de filtración comprendidas por un filtro basto formado por una serie de telas de filtro (tamaño medio de poro 20 micrómetros) seguido de una etapa de prefiltración (1-2 micrómetros) y una etapa final de filtración (aproximadamente 0,2 micrómetros).

20 Otros han sugerido la utilización de filtros de almohadilla tales como fibras celulósicas que contienen varias rellenos tales como tierra de diatomeas, arcillas, etc. o la utilización de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) para clarificar la corriente de lisado después de la centrifugación.

25 Ninguno de estos sistemas es óptimo para la recuperación del ADN plasmídico. El ADN plasmídico representa típicamente menos del 1%, más típicamente menos del 0,5% en peso de la corriente del lisado, lo que hace que sea importante la necesidad de una alta recuperación del ADN plasmídico.

30 La centrifugación aplica una fuerza de cizalla a los constituyentes de la corriente del lisado que puede dañar el ADN plasmídico. Además, la recuperación de la parte de la corriente que contiene el ADN plasmídico es subjetiva y bien es menor que la cantidad disponible total o incluye sólidos y partículas adicionales que afectan de manera adversa las etapas de filtración aguas abajo (típicamente, obstruyendo los filtros prematuramente). Además, la centrifugación requiere una inversión en equipos grandes que son caros, difíciles de higienizar según los estándares de la FDA y requiere que el sistema se opere en un formato discontinuo.

35 La serie de filtraciones propuesta de la técnica anterior tiene múltiples etapas y tiene un rendimiento relativamente bajo de ADN plasmídico, típicamente menos de aproximadamente 80%. En condiciones óptimas de laboratorio, estos sistemas han rendido menos del 90% del ADN plasmídico disponible. Esto se debe a varios factores. Los elementos de filtración seleccionados tienden a interactuar con el ADN plasmídico, uniéndose parte de él a su sistema. Además, cada sistema tiene un volumen de retención mínimo que retiene parte del ADN plasmídico y nunca lo pasa a la siguiente etapa de filtración.

40 Las almohadillas de los filtros no han sido una alternativa aceptable ya que absorben irreversiblemente un nivel relativamente alto de ADN plasmídico, dando lugar a rendimientos bajos.

45 La utilización de TFF ha sido mínima porque el sistema TFF con su lavado constante del ADN plasmídico a lo largo de la cara de la membrana y su recirculación a través de una o más bombas aplica una fuerza de cizalla alta al ADN plasmídico dando lugar a rendimientos reducidos y eficacia reducida del ADN plasmídico que se recupera. Además, el rendimiento de los dispositivos de TFF se ve afectado de manera adversa por el alto volumen de retención de los dispositivos de TFF.

50 Lo que se necesita es un sistema y método de clarificación que reduzca la pérdida de rendimiento y mantenga la eficacia del ADN plasmídico recuperado.

Compendio de la invención

55 La presente invención se refiere a un sistema que recupera al menos el 90% del ADN plasmídico de una corriente de lisado celular. Utiliza una serie de tres capas de filtración que consisten en una capa de filtro basto formada por un tamiz de acero inoxidable que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 micrómetros, una etapa de prefiltro formada por un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 micrómetros y una etapa de filtro final de un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 micrómetros. Proporciona una clarificación con una buena recuperación de ADN plasmídico sin la utilización de centrifugación, lo que permite utilizar un proceso continuo.

60 La presente invención proporciona un proceso para la clarificación continua de una corriente de lisado celular según la reivindicación 1 y un sistema para la clarificación continua de una corriente de lisado celular según la reivindicación 3.

Preferiblemente, las capas de prefiltro y de filtro final son parte de un filtro compuesto de manera que la corriente pasa en primer lugar a través de la capa de prefiltro y después de la capa de filtro final en una etapa.

En los dibujos

La Figura 1 muestra un sistema de clarificación según una realización de la presente invención.

La Figura 2 muestra una segunda realización de la presente invención.

La Figura 3 muestra un gráfico del tamaño relativo y cantidad de partículas encontradas en una corriente de lisado celular antes y después de las diferentes etapas de la presente invención.

La Figura 4 muestra un análisis en gel de la recuperación de plásmido por los métodos y sistemas de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para clarificar una corriente de lisado celular que contiene ADN plasmídico sin la necesidad de centrifugación y con unos niveles altos de recuperación de ADN plasmídico.

La Figura 1 muestra un sistema de clarificación de la presente invención. Una corriente de lisado celular entra en primer lugar en la etapa de filtro 2 a través de un conducto de entrada 4. La primera etapa de filtro es un filtro basto 6 comprendido por un material de filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 micrómetros. La salida 8 del filtro basto 6 está en comunicación fluida con la entrada 10 de un prefiltro 12 formado por un filtro de flujo normal que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 micrómetros. La salida 14 del prefiltro 12 está en comunicación fluida con la entrada 16 del filtro final 18 que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,22 micrómetros. La salida 19 del filtro final 18 está en comunicación fluida con el resto del equipo de procesamiento 40 que se utiliza para purificar el ADN plasmídico mediante cromatografía, eliminación de virus, etc.

Un filtro basto adecuado es un tamiz de acero inoxidable que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 micrómetros, más preferiblemente aproximadamente 80 micrómetros. Dicho filtro lo fabrica Cole-Parmer de Vernon Hills, Illinois (parte no A029595-16). Otros filtros bastos que tienen el mismo intervalo de tamaño de poro pueden hacerse a partir de otros metales tales como níquel, titanio, paladio, cobre, aluminio y semejantes o vidrio, cerámica o plástico sinterizado. Es deseable que el filtro tenga la menor cantidad de capas posible, preferiblemente dos o menos capas de material, más preferiblemente una única capa, de manera que se minimice la pérdida de ADN plasmídico en el filtro y se reduzca el volumen de retención del sistema.

Una capa de prefiltro adecuada puede estar constituida por un filtro de profundidad o una combinación filtro de profundidad/filtro plano tal como filtro POLYSEP™ II disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts. El filtro POLYSEP™ II está formado por un filtro de profundidad de vidrio de borosilicato al que sigue una capa de membrana plana de ésteres mixtos de celulosa aguas abajo de la capa de vidrio. Un dispositivo preferido es uno que utiliza el filtro de vidrio con un tamaño de poro nominal de 1,0 micrómetros seguido de una membrana de ésteres mixtos con un tamaño de poro nominal de 1,2 micrómetros. También pueden utilizarse otros prefiltros y pueden estar constituidos por materiales seleccionados del grupo que consiste en polietileno, polipropileno, vidrio de borosilicato, ésteres mixtos de celulosa y combinaciones de éstos. El medio del filtro puede estar en la forma de un filtro de profundidad, tal como una malla de fibras, fibras hiladas, telas no tejidas o telas tejidas o en la forma de una membrana plana o en una combinación de las dos capas como se ha discutido anteriormente. Un prefiltro preferido tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 micrómetros, preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 2 micrómetros, más preferiblemente aproximadamente 1,2 micrómetros.

Un filtro final adecuado está formado por material seleccionado del grupo que consiste en PVDF, tal como la membrana DURAPORE® disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts, poliétersulfona, tal como la membrana EXPRESS® o EXPRESS® PLUS disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts, polisulfona, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas, poliamidas y semejantes. Preferiblemente, el filtro seleccionado es hidrofílico bien de forma inherente debido al polímero seleccionado o por aplicación de un recubrimiento, un injerto, incluyendo un polímero hidrofílico tal como poli vinil pirrolidona (PVP) u otros métodos muy conocidos por el experto en la técnica de la fabricación de membranas.

La Figura 2 muestra una segunda realización de un sistema de clarificación de la presente invención. Una corriente de lisado celular entra en la primera etapa de filtro 20 a través de un conducto de entrada 22. La primera etapa de filtro es un filtro basto 24 tal como un material de filtro de acero inoxidable que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 micrómetros. La salida 26 desde el filtro basto 24 está en comunicación fluida con la entrada 28 de un dispositivo con una combinación prefiltro/filtro final 30 formado por un filtro de flujo normal que tiene una o más capas de material de prefiltro con un tamaño de poro de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 micrómetros y una o más capas aguas abajo del primer conjunto de capas que es un filtro final que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,22 micrómetros. La salida 32 de la combinación prefiltro/filtro final 30 está en comu-

ES 2 309 421 T3

nicación fluida con el resto del equipo de procesamiento 40 que se utiliza para purificar el ADN plasmídico mediante cromatografía, eliminación de virus, etc.

Esta realización de la Figura 2 es una realización preferida porque combina dos etapas de filtración en una, eliminando así la pérdida de fluido debida al volumen de retención en una en lugar de en dos etapas de filtración. Esto ayuda a incrementar el rendimiento del ADN plasmídico.

Una combinación adecuada prefiltro/filtro final se conoce como filtro Multimedia OPTICAP™ disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts. Es un filtro con dos capas en una configuración de cartucho desechable. La primera capa es una capa de ésteres mixtos celulósicos de 1,2 micrómetros y la capa final es una membrana de PVDF hidrofílica de 0,2 micrómetros. El fluido que contiene el ADN plasmídico pasa al cartucho, a través de la capa de prefiltro y después a través de la capa de filtro final rindiendo una corriente que contiene ADN plasmídico sin sólidos. Si se desea pueden utilizarse otras combinaciones de capas de filtros para formar otros filtros de capa multimedia en la presente invención siempre que proporcionen una buena clarificación y unos rendimientos altos de ADN plasmídico.

Ejemplo 1

Una corriente de lisado celular que contiene ADN plasmídico se procesó a través de un sistema como el mostrado y descrito en la Figura 2 utilizando un filtro basto de acero inoxidable de 80 micrómetros fabricado por Cole-Parmer de Vernon Hills, Illinois (parte no A029595-16) seguido de un filtro Multimedia OPTICAP™ (una membrana de ésteres mixtos de celulosa con un tamaño de poro nominal de 1,2 micrómetros seguida de una membrana de PVDF DURAPORE® de 0,22 micrómetros) disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

El tamaño de las partículas y la cantidad de partículas de esa corriente se analizó antes del procesamiento, después de la filtración basta y después de la etapa de la combinación prefiltro/filtro final. La Figura 3 muestra un gráfico de las partículas de hasta dos micrómetros de tamaño que se detectaron en la corriente durante el análisis. Como puede observarse claramente, el sistema según la invención clarificó la corriente de manera significativa.

Ejemplo 2

Una corriente de lisado celular que contiene ADN plasmídico se procesó a través de un sistema como el mostrado y descrito en la Figura 1 utilizando un filtro basto de acero inoxidable de 80 micrómetros fabricado por Cole-Parmer de Vernon Hills, Illinois (parte no A029595-16) seguido de un filtro POLYSEP™ II (filtro de vidrio con un tamaño de poro nominal de 1,0 micrómetros seguido de una membrana de ésteres mixtos con un tamaño de poro nominal de 1,2 micrómetros) disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts seguido de un filtro final (una membrana de PVDF hidrofílica DURAPORE® de 0,22 micrómetros en formato de cartucho) disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

Una corriente de lisado celular que contiene ADN plasmídico se procesó a través de un sistema como el mostrado y descrito en la Figura 2 utilizando un filtro basto de acero inoxidable de 80 micrómetros fabricado por Cole-Parmer de Vernon Hills, Illinois (parte no A029595-16) seguido de un filtro Multimedia OPTICAP™ (una membrana de ésteres mixtos de celulosa con un tamaño de poro nominal de 1,2 micrómetros seguida de una membrana de PVDF DURAPORE® de 0,22 micrómetros) disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

El rendimiento del ADN plasmídico se determinó mediante análisis en gel como se muestra en la Figura 4. Como puede observarse, el plásmido recuperado de los sistemas de filtración de la presente invención fue relativamente alto y superó el 90% en cada caso (determinado por cálculo a partir del análisis en gel).

La presente invención proporciona un sistema que tiene una capacidad alta, cambio positivo máximo en la turbidez del fluido procesado (lo que evidencia una alta eliminación de sólidos), número pequeño de partículas y mínima pérdida en el rendimiento del ADN plasmídico, todo esto sin la necesidad de una etapa de centrifugación. Permite reducir el volumen de retención del sistema mediante la eliminación de etapas de procesamiento (incrementando el rendimiento potencial) y operar el sistema y el proceso como un proceso de formato continuo en lugar de discontinuo.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la clarificación continua de una corriente de lisado celular que contiene ADN plasmídico, que consiste en aplicar la corriente de lisado a una entrada de un filtro basto que tiene un tamaño de poro de 50 a 200 micrómetros, hacer fluir la corriente a través del filtro basto hacia una salida del filtro basto en comunicación fluida con una entrada de un prefiltro que tiene un filtro que tiene un tamaño de poro de 1 a 2 micrómetros, hacer fluir la corriente a través del prefiltro hacia una salida del prefiltro en comunicación fluida con una entrada de un filtro final formado por un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 micrómetros hacer fluir la corriente a través del filtro final hacia una salida del filtro final.

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que la corriente de lisado celular no se ha sometido a una etapa de centrifugación.

3. Un sistema para la clarificación continua de una corriente de lisado celular que contiene ADN plasmídico, que consiste en una entrada para la corriente del lisado para entrar en el sistema, estando conectada la entrada a un filtro basto que tiene un tamaño de poro de 50 a 200 micrómetros, una salida desde el filtro basto en comunicación fluida con una entrada de un prefiltro que tiene un tamaño de poro de 1 a 2 micrómetros, una salida desde el prefiltro en comunicación fluida con una entrada de un filtro final formado por un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 micrómetros y una salida desde el filtro final.

4. El sistema de la reivindicación 3, en el que el filtro de la primera etapa de filtración es un tamiz de acero inoxidable con un tamaño de poro de 80 micrómetros y el filtro de la segunda etapa de filtración es una capa de prefiltro de ésteres mixtos de celulosa de 1,2 micrómetros y un filtro final está compuesto por un material seleccionado del grupo que consiste en PVDF, poliétersulfona, polisulfona, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas y poliamidas.

5. El sistema de la reivindicación 3, en el que las etapas de prefiltro y filtro final están combinadas en un filtro compuesto que tiene una primera capa de prefiltro seguida de una capa de filtro final.

6. El sistema de la reivindicación 3, en el que la capa de filtración basta es un tamiz de acero inoxidable que tiene un tamaño de poro de 80 micrómetros.

7. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 y 6, en el que el prefiltro tiene un tamaño de poro de 1,2 micrómetros.

8. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 7, en el que el prefiltro tiene un tamaño de poro de 1,2 micrómetros y está formado por un material seleccionado del grupo que consiste en polietileno, polipropileno, ésteres celulósicos mixtos, vidrio de borosilicato y combinaciones de éstos.

9. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 8, en el que el filtro de la filtración final está formado por un material seleccionado del grupo que consiste en PVDF, poliétersulfona, polisulfona, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas y poliamidas.

10. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5 a 9, en el que el filtro de la filtración final está formado por un material seleccionado del grupo que consiste en PVDF, poliétersulfona, polisulfona, poliarilsulfonas, polifenilsulfonas y poliamidas y en el que el filtro tiene un recubrimiento hidrofílico.

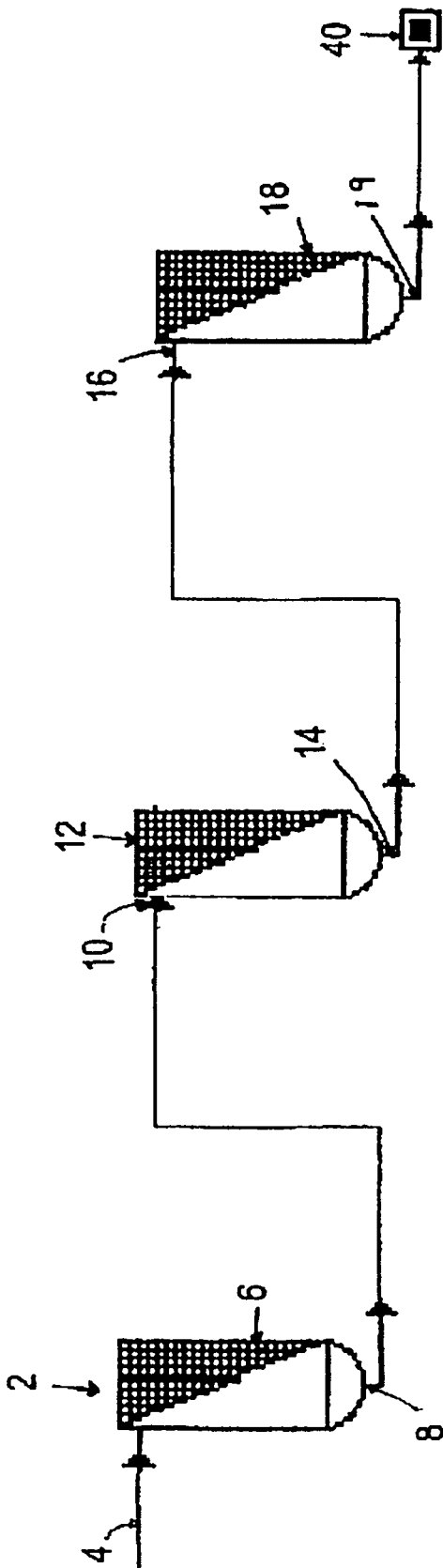


Figura 1

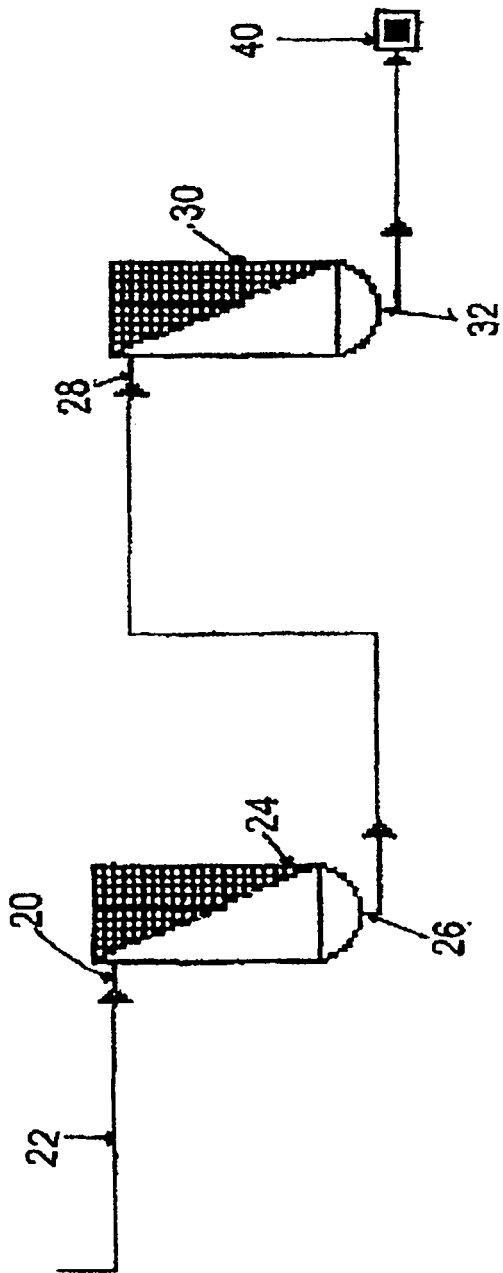
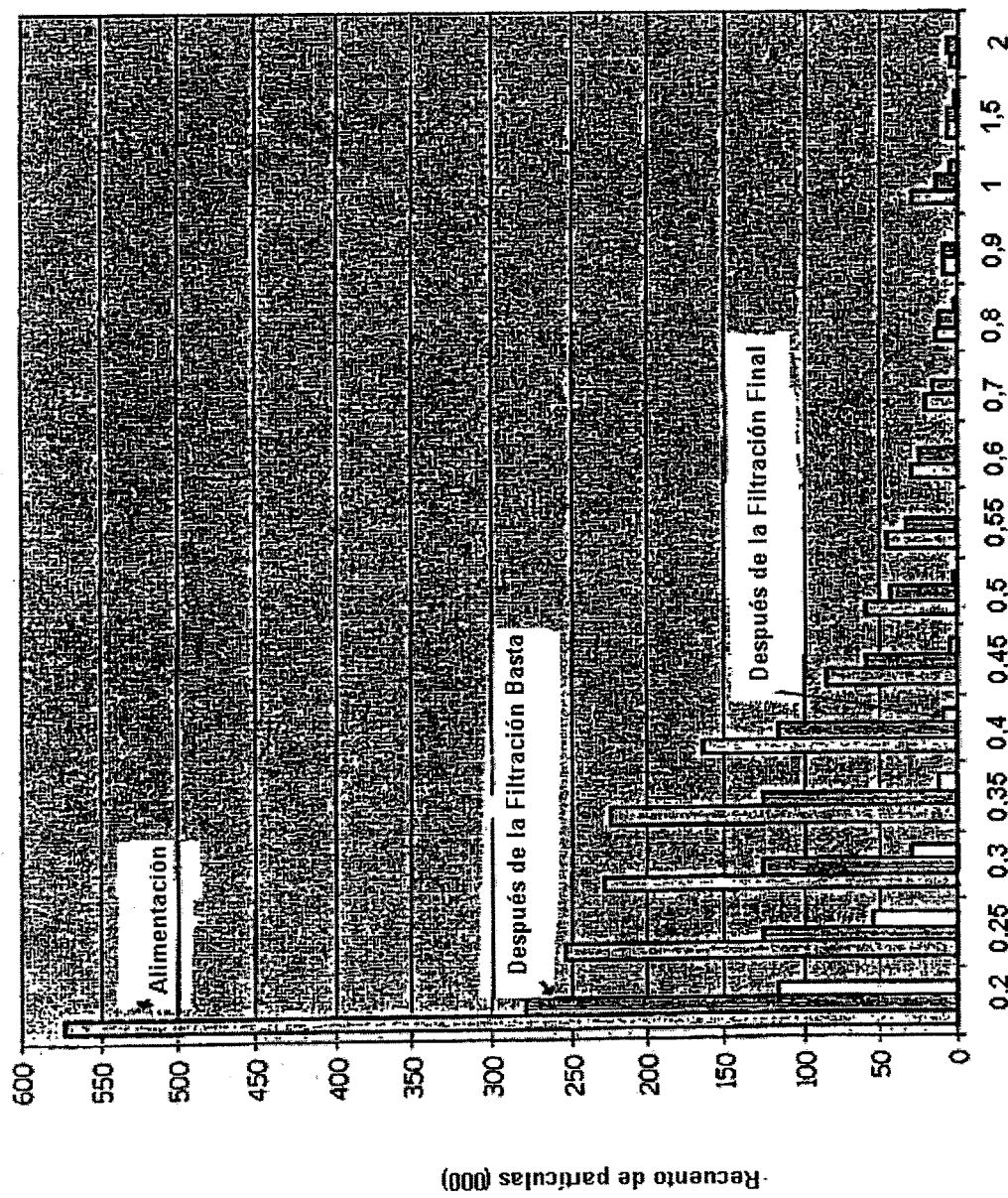


Figura 2



Tamaño de las partículas (micrómetros)

Figura 3

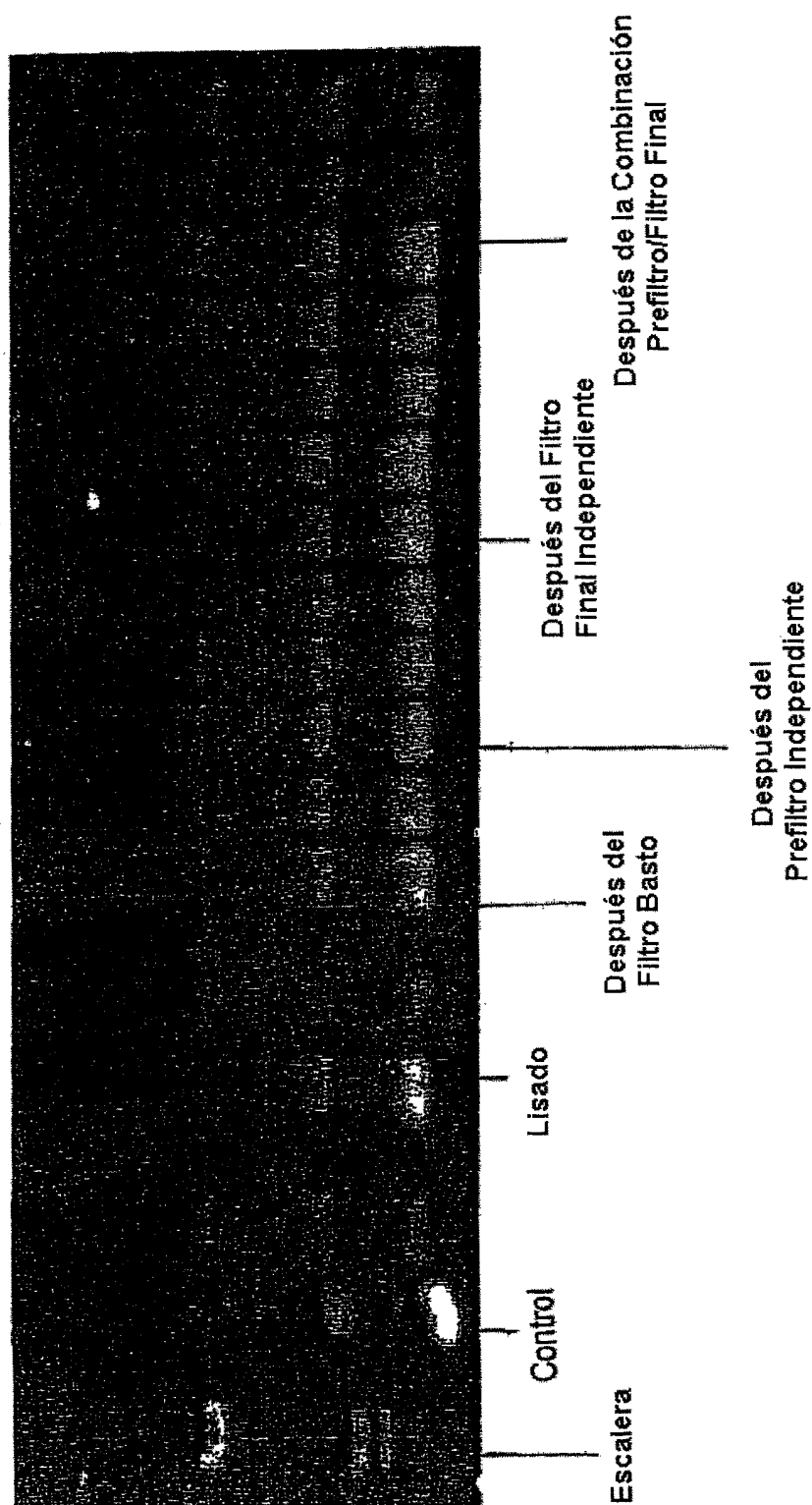


Figura 4