



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 189**

(51) Int. Cl.:

C07H 1/08 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01997500 .2**

(86) Fecha de presentación : **20.11.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1335926**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2003**

(54) Título: **Procedimiento de separación de ADN extracromosómico de otros componentes celulares.**

(30) Prioridad: **21.11.2000 GB 0028361**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(73) Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

(72) Inventor/es: **Charlton, Henry;**
Eon-Duval, Alex y
MacDuff, Robert

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento de separación de ADN extracromosómico de otros componentes celulares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de separación de ADN extracromosómico de otros componentes celulares, por ejemplo, ARN, ADN genómico, proteínas y endotoxinas. Más particularmente se refiere a un procedimiento para producir ADN extracromosómico de calidad farmacéutica sin someter el ADN extracromosómico a un digesto de ARN. La invención también se refiere a ADN extracromosómico producido mediante el procedimiento y productos farmacéuticos derivados de tal ADN extracromosómico, por ejemplo, vacunas de ADN o productos de terapia génica. La invención también se refiere a un procedimiento de generación de ADN extracromosómico con alta pureza y con buenos rendimientos.

15 **Antecedentes de la invención**

El ADN extracromosómico, tal como, por ejemplo, ADN de plásmido se está volviendo cada vez más importante como producto biofarmacéutico por derecho propio. Como consecuencia, hay una necesidad de generar grandes cantidades de tal ADN extracromosómico con alta pureza y con buenos rendimientos.

Los esquemas de purificación que suponen el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos inflamables (por ejemplo, etanol e isopropanol), y productos químicos tóxicos (por ejemplo, bromuro de etidio, fenol y cloroformo), o técnicas tales como, ultracentrifugación y "columnas de centrifugación" (*spin columns*), si bien son adecuados para generar pequeñas cantidades del material en investigación, generalmente no son adecuados para generar las cantidades de material necesarias para las aplicaciones biofarmacéuticas.

Además muchos procedimientos de purificación de plásmidos actuales suponen la adición de ARNasa, normalmente de origen bovino. Los materiales derivados de fuentes bovinas son cada vez menos deseados en la fabricación de productos farmacéuticos debido a problemas referentes a encefalopatías espongiformes bovinas (EEB).

En general, puede considerarse que los procedimientos de purificación de plásmidos comprenden dos fases diferenciadas:

Una primera fase que supone la liberación del ADN de plásmido de sus células para formar un lisado; y

Una segunda fase que supone separar y purificar el ADN de plásmido de los demás componentes celulares del lisado.

La forma más común de poner en práctica la primera fase (véase la figura 1a) es liberar el ADN de plásmido mediante cualquiera de:

i) Llevar a ebullición; o

ii) Usar un pH alcalino y solubilización mediada por detergente de las membranas celulares bacterianas.

La segunda fase (véase la figura 1b) normalmente supone una etapa de clarificación en la que se eliminan las partículas insolubles, tales como, restos celulares, seguido por una pluralidad de etapas de purificación o refinamiento en las que, por ejemplo, se eliminan componentes celulares solubles tales como ADN genómico, ARN, proteínas y endotoxinas. Por tanto, una purificación típica puede comprender una combinación de diferentes etapas de purificación, tales como, por ejemplo:

Ultracentrifugación a través de un gradiente de cloruro de cesio;

Precipitación selectiva;

Cromatografía en columna por ejemplo de intercambio iónico; y

Separación en dos fases.

Una técnica usada para purificar ADN es la ultrafiltración de flujo tangencial. El documento PCT/US97/13494 enseña la purificación de un ácido nucleico a partir de una disolución que comprende filtrar la disolución a través de una unidad de ultrafiltración que comprende una capa de gel para proporcionar una disolución de permeado y una disolución de material retenido. El ácido nucleico queda retenido en la disolución de material retenido. Con el fin de eliminar el ARN, se trata en primer lugar el lisado con ARNasa para digerirlo hasta un tamaño que permita la separación que ha de lograrse mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico.

Las condiciones del procedimiento especificado incluyen:

1. El uso de un tampón de diafiltración de Tris-HCl con un pH de 8,5 pero de concentración no especificada. Sin embargo, puesto que el material retenido se carga en una columna de cromatografía rellena con una resina de cromatografía de intercambio aniónico, puede suponerse que el tampón de diafiltración tiene una concentración salina típica de 10-50 mS. Esto está respaldado por el comentario de que cuando va a complejarse ADN con un vehículo lipídico para su uso en terapia génica, es deseable intercambiar el ADN en un tampón de baja conductividad, preferiblemente mediante diafiltración. Se dice que un tampón de baja conductividad incluye cualquier tampón inferior a 10 mS, preferiblemente inferior a 1 mS;

2. El uso de aproximadamente 50 intercambios de volumen de un tampón de diafiltración;

3. El uso de un cartucho de canales abiertos con un tamaño de poro de 300 K; y

4. Una carga de plásmido de 1,076 g de ácido nucleico/m² de membrana.

Este procedimiento tiene la desventaja de que se requiere ARNasa para digerir el ARN con el fin de que el ARN pueda separarse del ADN de plásmido.

Más recientemente, Kahn *et al*, Biotechnology and Engineering, Vol. 60, n° 1, 5 de julio de 2000 describe un procedimiento de flujo tangencial para la purificación de plásmidos que evita el uso de ARNasa. Sin embargo, con el fin de eliminar el ARN tuvieron que digerirlo en primer lugar usando una lisis alcalina prolongada que duró 24 horas.

Existen dos desventajas principales en este procedimiento:

1. En primer lugar el tiempo global para llevar a cabo el procedimiento aumenta significativamente y, de hecho, es potencialmente una etapa limitante de la velocidad; y

2. En segundo lugar, la lisis prolongada lleva en sí misma el riesgo de dañar el ADN extracromosómico.

Según el artículo, se preparó ADN de plásmido mediante flujo tangencial en las siguientes condiciones:

1. El tampón era un tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,6;

2. El procedimiento usó 8-10 intercambios de volumen de tampón de diafiltración;

3. La membrana tenía un tamaño de poro de 500 o bien 1000 K; y

4. Las cargas de plásmido fueron de 10-15 g de células/0,0464 m² de membrana. (Aproximadamente 0,172 g de plásmido/m².)

Otros puntos de interés incluyen el hecho de que el tamaño del plásmido varió desde entre 5,6 Kb y 7,9 Kb para una membrana con un tamaño de poro de 500 KDa y fue de 10,0 Kb para una membrana con un tamaño de poro de 1000 KDa.

En ambos procedimientos, es necesario digerir en primer lugar el ARN con el fin de que pueda separarse del ADN extracromosómico mediante ultrafiltración de flujo tangencial.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para separar ADN de ARN sin ARNasa, procedimiento que es simple, fácilmente modificable a escala y no tiene las desventajas asociadas al procedimiento de Kahn *et al*.

Sumario de la invención

El solicitante ha determinado que puede obtenerse un ADN libre de ARN, por ejemplo un ADN extracromosómico, simplemente y de manera fácilmente modificable a escala usando ultrafiltración de flujo tangencial mediante el control cuidadoso de una o más de las condiciones operativas.

Aunque se obtienen los mejores resultados mediante el control cuidadoso de varias condiciones operativas, debe reconocerse que la optimización de una cualquiera o más de las condiciones operativas puede proporcionar la eliminación significativa de ARN y, en consecuencia, se reivindica cada condición optimizada individualmente así como en combinación con una o más de las otras condiciones operativas.

Por tanto, el solicitante ha determinado que, al contrario de lo que sugiere la técnica, es posible, mediante el control cuidadoso de una o más de las condiciones operativas del procedimiento de ultrafiltración, separar ADN extracromosómico de ARN, sin haber digerido en primer lugar el ARN mediante tratamiento con ARNasa o bien realizando una lisis prolongada.

Estos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

1. Seleccionar el tampón basándose en su fuerza iónica, fuerza iónica que puede definirse en cuanto a su conductividad;

2. Proporcionar suficientes intercambios de volumen de tampón de diafiltración para lavar el ARN a través de la membrana;

3. Seleccionar una membrana apropiada con un tamaño de poro apropiado para el ADN extracromosómico que se esté purificando;

4. Seleccionar una presión transmembrana apropiada; y

5. Controlar las cargas.

Más particularmente optimizando tanto la fuerza iónica y proporcionando suficientes intercambios de volumen del tampón de diafiltración, y más preferiblemente todavía seleccionando adicionalmente una membrana apropiada con un tamaño de poro apropiado para el ADN extracromosómico que se está purificando, es posible efectuar una eliminación sustancial de ARN sin la necesidad de un digesto de ARNasa o una lisis prolongada.

Además, como consecuencia del procedimiento, puede reducirse el número o la complejidad de las etapas necesarias para conseguir un nivel deseable de purificación. Esta reducción en el número, o la complejidad de, las etapas de purificación es claramente beneficioso puesto que puede reducir los tiempos de procesamiento, costes y pérdidas de plásmido.

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de separación de ADN extracromosómico de ARN sin digerir en primer lugar el ARN, comprendiendo dicho procedimiento:

i) lisar células que comprenden ADN extracromosómico para formar un lisado;

ii) clarificar el lisado; y

iii) someter el lisado clarificado a ultrafiltración de flujo tangencial en condiciones que dejan que pase una cantidad sustancial del ARN presente en el lisado a través de una membrana, mientras que queda retenido la mayoría del ADN extracromosómico.

Por cantidad sustancial se quiere decir superior al 50%, más preferiblemente superior al 90%, más preferiblemente todavía superior al 95%, y lo más preferiblemente todavía superior al 98%.

La eliminación significativa de ARN lograda con la etapa de ultrafiltración significa que puede obtenerse ADN extracromosómico de calidad farmacéutica con tan sólo otra etapa individual de purificación o refinamiento.

Las una o más otras etapas de purificación o refinamiento pueden llevarse a cabo antes y/o bien tras la etapa de ultrafiltración. La(s) etapa(s) puede(n) ser para eliminar otro ARN u otros componentes celulares, tales como, por ejemplo, endotoxinas, proteínas y ADN genómico. Naturalmente, se apreciará que también se eliminará una gran proporción de estos otros componentes celulares durante el procedimiento de ultrafiltración. En una realización (figura 1b, ruta A) la etapa de ultrafiltración de flujo tangencial está seguida por una etapa de cromatografía, tal como, por ejemplo, con hidroxiapatita, etapa que se diseña para eliminar específicamente ARN de alto peso molecular. Por ARN de alto peso molecular, se quiere decir ARN con un peso molecular que se aproxima al del ADN extracromosómico del que se está separando.

Aún en otra realización (figura 1b, ruta B) se lleva a cabo otra etapa de eliminación de ARN tras la etapa de ultrafiltración. Preferiblemente, ésta es una etapa de precipitación con CaCl_2 diseñada para eliminar específicamente ARN de alto peso molecular.

La etapa de precipitación con CaCl_2 puede estar seguida por otra etapa de ultrafiltración y/o una etapa de desalación y/o una etapa de cromatografía en fase inversa, que a su vez puede estar seguida por una etapa de cromatografía, tal como, por ejemplo de intercambio iónico o con hidroxiapatita.

Aún en otra realización (figura 1b, ruta C) una etapa de eliminación de ARN, por ejemplo una etapa de precipitación con CaCl_2 , precede a la etapa de ultrafiltración. En esta realización, la etapa de ultrafiltración que sucede a la etapa de precipitación con CaCl_2 podría estar seguida por una etapa de cromatografía, tal como, por ejemplo, una etapa de intercambio iónico o una con hidroxiapatita.

El uso de una sal anticaotrópica, tal como, por ejemplo, sulfato de amonio, sulfato de sodio, citrato de potasio, cloruro de calcio, acetato de amonio o acetato de potasio, pero particularmente el cloruro de calcio puede afectar a la elección de la membrana para ultrafiltración.

Las condiciones que dan lugar a la eliminación sustancial de ARN incluyen las siguientes:

1. la selección de un tampón que tiene una fuerza iónica baja. Esta selección demostró ser crítica para maximizar la eliminación de ARN. Cuanto menor es la fuerza iónica, mayor es la eliminación de ARN. Por fuerza iónica baja normalmente se quiere decir que tiene una conductividad inferior a 10 mS, más preferiblemente inferior a 5 mS, más preferiblemente todavía inferior a 2 mS y lo más preferiblemente inferior a 1 mS. El tampón preferido es un tampón Tris-HCl o a tampón fosfato de sodio, aunque pueden ser adecuados otros tampones que funcionan en el intervalo de pH 6-10. Ejemplos de otros tampones de este tipo incluyen: carbonato de sodio/CO₂; imidazol; 2,4,6-trimetilpiridina; MOPS; dietilbarbiturato de sodio; N-etilmorfolina; HEPES; TRICINA; EPPS; 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol; BICINA; borato de sodio y glicina. El pH preferido es de entre aproximadamente 7,5 y 8,5.

2. El uso de un número suficiente de intercambios de volumen durante la diafiltración para garantizar que el ARN se lava a través de la membrana. Preferiblemente, hay al menos 20 intercambios de volumen, más preferiblemente al menos 30 intercambios de volumen, más preferiblemente todavía al menos 40 intercambios de volumen y lo más preferiblemente 50 o más intercambios de volumen, por ejemplo entre 50 y 100.

3. La selección de una membrana apropiada. Preferiblemente, se selecciona una membrana de polietersulfona con un tamaño de poro de desde 300 KDa hasta 500 KDa aunque pueden usarse otras membranas adecuadas, incluyendo acetato de celulosa, polisulfona, polivinilideno, polipropileno, poliamida, PES modificada, polivinilidenpirrolidina, poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), nitrato de celulosa y triacetato de celulosa. La selección del tamaño de poro es importante puesto que si se selecciona un tamaño de poro demasiado grande, se perderá plásmido a través de la membrana y si se selecciona un tamaño de poro demasiado pequeño, el ARN no podrá pasar a través de la membrana. Por tanto, el tamaño de poro podría oscilar, de hecho, desde 50 KDa hasta 1000 KDa, más normalmente de 100 KDa a 1000 KDa dependiendo de si el ADN extracromosómico era particularmente grande o pequeño. Por tanto, la selección real dependerá del tamaño del plásmido y las condiciones operativas. Sorprendentemente, cuando se usa cloruro de calcio, se ha encontrado necesario usar una membrana con un tamaño de poro menor al que se prevería normalmente para un plásmido de un tamaño dado. Por tanto, una membrana con un tamaño de poro de 100 K ha demostrado ser particularmente eficaz para plásmidos de 5,9 kpb y 7,7 kpb.

4. También se ha encontrado que la presión transmembrana (PTM) inicial es significativa para lograr buenos rendimientos de plásmido. Preferiblemente, la PTM inicial es inferior a 68,95 kPa, más preferiblemente todavía inferior a 55,16 kPa, más preferiblemente todavía inferior a 41,37 kPa, y lo más preferiblemente de aproximadamente 34,47 kPa. Se prefiere mantener ésta a o inferior a 103,4 kPa lo más preferiblemente a o inferior a 68,95 kPa.

5. También se ha encontrado que las cargas de plásmido tienen un efecto significativo sobre el rendimiento y se prefiere que las cargas estén en los extremos inferiores de los siguientes intervalos:

Para membranas de 300 K, las cargas de ácidos nucleicos totales oscilaron desde 2,153-10,76 g/m² (0,107-0,538 g/m² de plásmido). Por tanto, para una membrana de 300 K, las cargas preferidas son inferiores a 0,323 g/m² de plásmido, más preferiblemente inferior a 0,215 g/m² de plásmido.

Para una membrana de 500 K, las cargas de ácido nucleico totales oscilaron desde 10,76-32,29 g/m² (0,538-1,615 g/m² de plásmido). Por tanto, para una membrana de 500 K, las cargas preferidas son inferiores a 1,076 g/m² plásmido, preferiblemente inferiores a 0,807 g/m² de plásmido.

Los niveles de carga parecieron menos significativos sobre la membrana de 100 K en presencia de cloruro de calcio.

En los experimentos que dan lugar a las observaciones 1 a 3 anteriores, se mantuvo generalmente una PTM a entre 68,95 y 137,9 kPa y se mantuvo generalmente un caudal transversal de entre 5,382 y 10,76 l/min/m². La combinación dio lugar a una velocidad de flujo del permeado de entre 16 y 26 l/h/m². Tal como se indicó en 4 anteriormente, se ha encontrado entonces que una PTM inferior mejora los rendimientos de plásmido.

Aunque se creía que era necesario polarizar la membrana (recirculando la línea de permeado durante un periodo suficiente para formar una capa de gel) para maximizar los rendimientos de plásmido se ha encontrado inesperadamente que esto no es necesario, en un procedimiento sin ARNasa, particularmente para una etapa de ultrafiltración UF1 de primera fase.

Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de generación de ADN extracromosómico con alta pureza y con buenos rendimientos en un procedimiento de ultrafiltración de flujo tangencial, procedimiento que comprende utilizar una pantalla diseñada para crear turbulencia en un canal de material retenido de un aparato de ultrafiltración.

Aunque la precipitación con CaCl₂ de ARN es una forma simple y eficaz de eliminar contaminantes de ARN y ADN genómico de disoluciones de plásmido, la presencia de CaCl₂ da como resultado pérdidas de plásmido cuando se concentra o se somete a diafiltración la disolución de plásmido mediante la ultrafiltración de flujo tangencial.

Se cree que CaCl₂ compacta el plásmido dando como resultado pérdidas a través de la membrana de ultrafiltración.

Eliminando el CaCl_2 (y también el ARN) usando una matriz y agente de formación de par iónico adecuados, se encontró que una etapa posterior de cromatografía en fase inversa proporciona una separación particularmente eficaz (buena pureza y altos rendimientos de plásmido).

5 Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de generación de ADN extracromosómico de alta pureza con buenos rendimientos en un procedimiento de purificación que comprende una etapa de precipitación con CaCl_2 , caracterizado porque una etapa de cromatografía en fase inversa sigue a la etapa de precipitación con CaCl_2 .

10 Empleando una etapa de cromatografía en columna en fase inversa tras la etapa de precipitación con CaCl_2 , puede reducirse el procedimiento a una única etapa tras CaCl_2 .

15 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de purificación de ADN de otros componentes celulares caracterizado porque se separa el ADN usando cromatografía con hidroxipatita a un pH de desde 7,3 hasta 8,3.

20 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ADN extracromosómico purificado; una composición farmacéutica, una vacuna de ADN o producto de terapia génica obtenidos mediante un procedimiento de cualquiera de las invenciones reivindicadas.

Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ADN extracromosómico purificado que comprende:

- 25 menos del 0,13% en peso de proteína cuando se somete a prueba usando un kit BCA;
- menos del 0,11% en peso de ADN genómico cuando se somete a prueba usando un procedimiento de Q-PCR
- menos de 5 UE/mg de endotoxina cuando se somete a prueba usando una prueba LAL; y
- 30 menos del 1,0% en peso de ARN residual cuando se somete a prueba usando un ensayo de HPLC

Ahora se describirán las invenciones, sólo a modo de ejemplo, con referencia a la siguiente descripción detallada y los ejemplos:

35 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1a es un esquema de las etapas de procesamiento implicadas en la obtención de un lisado;

40 La figura 1b es un esquema que muestra tres rutas alternativas de obtención de ADN extracromosómico de calidad farmacéutica usando un procedimiento según la invención;

La figura 2a es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado del ejemplo 1;

45 La figura 2b es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de diafiltración del ejemplo 1;

La figura 2c es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del ejemplo 1;

50 La figura 3a es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado que va a someterse a diafiltración frente al tampón 500 mM, pH 7,5, del ejemplo 2;

La figura 3b es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido obtenida con el tampón 500 mM, pH 7,5, del ejemplo 2;

55 La figura 3c es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado que va a someterse a diafiltración frente al tampón 100 mM, pH 7,5, del ejemplo 2;

La figura 3d es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del tampón 100 mM, pH 7,5, del ejemplo 2;

60 La figura 3e es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado que va a someterse a diafiltración frente al tampón 10 mM, pH 7,5, del ejemplo 2;

La figura 3f es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del tampón 10 mM, pH 7,5, del ejemplo 2;

65 La figura 4a es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado que va a someterse a diafiltración frente al tampón 10 mM, pH 6,0, del ejemplo 3;

ES 2 287 189 T3

La figura 4b es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del tampón 10 mM, pH 6,0, del ejemplo 3;

5 La figura 4c es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado que va a someterse a diafiltración frente al tampón 10 mM, pH 9,0, del ejemplo 3;

La figura 4d es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del tampón 10 mM, pH 9,0, del ejemplo 3;

10 La figura 5 es una representación gráfica del flujo de permeado frente a los volúmenes de diafiltración para los tampones del ejemplo 4;

La figura 6 es una representación gráfica de PTM frente a los volúmenes de diafiltración para los tampones del ejemplo 4;

15 La figura 7a es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado del ejemplo 5;

La figura 7b es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del ejemplo 5;

20 La figura 8a es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado del ejemplo 6;

La figura 8b es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de concentración del ejemplo 6;

25 La figura 8c es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de diafiltración (10 equivalentes en volumen) del ejemplo 6;

La figura 8d es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de diafiltración (20 equivalentes en volumen) del ejemplo 6;

30 La figura 8e es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de diafiltración (30 equivalentes en volumen) del ejemplo 6;

La figura 8f es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de diafiltración (40 equivalentes en volumen) del ejemplo 6;

35 La figura 8g es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado de diafiltración (50 equivalentes en volumen) del ejemplo 6;

La figura 8h es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del ejemplo 6;

40 La figura 8i es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del ejemplo 6 a carga doble comparado con la figura 8h;

45 La figura 9a es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado del ejemplo 8 tras una recirculación de 20 minutos;

La figura 9b es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lisado del ejemplo 8;

50 La figura 9c es un perfil de HPLC de intercambio iónico del material retenido del ejemplo 8 tras una recirculación de 20 minutos;

La figura 9d es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado durante la concentración del ejemplo 8;

55 La figura 9e es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado durante la diafiltración, primeros 150 ml, del ejemplo 8;

La figura 9f es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado durante la diafiltración, segundos 150 ml, del ejemplo 8;

60 La figura 9g es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado durante la diafiltración, terceros 150 ml, del ejemplo 8;

La figura 9h es un perfil de HPLC de intercambio iónico del permeado durante la diafiltración, cuartos 150 ml, del ejemplo 8;

65 La figura 9i es un perfil de HPLC de intercambio iónico de la combinación de material retenido del ejemplo 8 tras la concentración y la diafiltración;

ES 2 287 189 T3

La figura 9j es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lavado 1 del ejemplo 8;

La figura 9k es un perfil de HPLC de intercambio iónico del lavado 2 del ejemplo 8;

5 La figura 10a es un perfil de elución que muestra la separación de ADN de plásmido con Na_2HPO_4 10-500 mM a pH 6,8;

10 La figura 10b es un perfil de elución que muestra la separación de ADN de plásmido con Na_2HPO_4 10 -500 mM a pH 7,6;

La figura 10c es un perfil de elución que muestra la separación de ADN de plásmido con Na_2HPO_4 10 -500 mM a pH 7,8; y

15 La figura 10d es un perfil de elución que muestra la separación de ADN de plásmido con Na_2HPO_4 10-500 mM a pH 8,8.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 Habiéndose descubierto inesperadamente que el ARN podría separarse del ADN en un procedimiento de ultra-filtración de flujo tangencial sin llevar a cabo en primer lugar un digesto de ARN, se concibió un protocolo básico y se modificaron uno o más factores en un intento de determinar qué factores tenían un efecto significativo sobre la eliminación de componentes celulares, particularmente ARN.

25 Se expone un esquema que ilustra varias rutas de separación alternativas (1A, 1B y 1C) en las figuras 1a y 1b y se describen detalles de procesamiento más completos a continuación con más detalle:

Protocolo de purificación de plásmidos sin ARNasa: escala de 300 g

1. Resuspensión de células

30 Se añadieron 2,5 l de tampón de resuspensión (Tris 25 mM/EDTA 10 mM/dextrosa 55 mM pH 8,0.) a 300 g de pasta celular para resuspender las células.

2. Lisis alcalina

35 Se añadió tampón de lisis (4,17 l de NaOH al 0,96%, 830 ml de SDS al 6%) a la suspensión celular y se mezcló hasta homogeneidad, formando así un lisado.

3. Precipitación con acetato de potasio

40 Se añadieron 2,5 l de acetato de potasio 3 M al lisado, se agitó durante 25-35 minutos y se centrifugó a 4600 rpm durante 20 min. Se eliminó por decantación el sobrenadante a través de una doble capa de Miracloth. Se pesó y desechó el sedimento celular. Se hizo pasar el sobrenadante a través de filtros Sartopure PP de 1 x 1,2 μm y Sartobran P de 1 x 0,45/0,2 μm . El filtrado es el lisado clarificado.

4. Ultrafiltración

Materiales

50 Dispositivo Millipore con membranas de canales abiertos, Omega Centrasette, de PES de 300 K de 0,279 x 0,464 m^2 .

Esto se almacena en NaOH 0,1 M entre ejecuciones.

55 Bomba peristáltica Millipore Masterflex.

Tampón de diafiltración: Tris 20 mM pH 7,5.

Preparación del sistema

60 Se vacía el contenido del recipiente y los cartuchos de membrana a través de la línea de permeado. Se llena el depósito con 2 l de tampón de diafiltración y se recircula a través de la línea de material retenido con la línea de permeado cerrada. Se vacía el contenido del recipiente y los cartuchos de membrana a través de la línea de cerrada. Se llena el recipiente con 2 l de tampón de diafiltración, se conecta la botella de tampón al recipiente y se irrigan 5 l de
65 tampón de diafiltración a través de la línea de permeado. Se comprueba el pH del permeado.

ES 2 287 189 T3

Formación de la capa de gel

Se vacía el sistema. Se llena el recipiente con aproximadamente 1,8 l de lisado clarificado y se conecta el extremo que contiene lisado al sistema. Se recircula a una presión inicial de 68,95 kPa, volviendo la línea de permeado al
5 recipiente de lisado, durante 30 minutos (para acumular la capa de gel). Se vigila la presión del material retenido ya que puede aumentar rápidamente. No debe superar los 137,9 kPa. Se ajusta de nuevo a 137,9 kPa si esto se produce.

Concentración

10 Se concentra el lisado hasta 500 ml. Se recoge el permeado de concentración.

Diafiltración

Se somete a diafiltración a 137,9 kPa usando aproximadamente 50 volúmenes de tampón de diafiltración (25 l).
15 Se usa el modo de diafiltración continua cuando se sustituye el filtrado por tampón nuevo a la misma velocidad. Se recoge el permeado de diafiltración en botellas de 5 x 5 l. Se registra el volumen, pH y conductividad.

Recogida

20 Al final de la diafiltración, se recircula el contenido del recipiente y los cartuchos durante 30 minutos con la válvula de material retenido abierta y la línea de permeado cerrada. Se drena el dispositivo de UF a una botella de 500 ml (permeado UF1-D).

25 Se añaden 500 ml de tampón de diafiltración nuevo al recipiente y se recircula durante 30 minutos. Se drena el dispositivo a una botella de 500 ml (lavado 1 de permeado UF1-D).

Se repite lo anterior (lavado 2 de permeado UF1-D).

30 Se combinan el permeado UF1-D, el lavado 1 de permeado y el lavado 2 de permeado.

Se filtra la combinación de material retenido a través de un filtro 1 x Gelman Science de 0,45 μm (y si requiere 1 x N66 Ultipor de 0,2 μm).

35 Se expone el efecto de variación de una o más de las condiciones operativas de este protocolo con referencia a los ejemplos 1 a 10 a continuación, mientras que los ejemplos 11 a 15 muestran otras variaciones:

Ejemplo 1

40 *Efecto de la fuerza iónica, parte 1*

Se produjo un hallazgo muy significativo cuando se sustituyó un tampón de diafiltración de Tris 10 mM + NaCl 0,45 M, pH 8,5 (conductividad de 41,3 mS) por un tampón de diafiltración de Tris 0,1 M, pH 8,5 (conductividad de 6,89 mS).

45 Cuando se usó este tampón de fuerza iónica baja, se observó la eliminación de una cantidad significativa de ARN. Esto se demostró mediante una HPLC de intercambio iónico en la que una muestra de permeado de diafiltración mostró la presencia de ARN pero no de plásmido (figura 2b) mientras que el lisado mostró la presencia tanto de ARN como de plásmido (figura 2a). La combinación de material retenido también mostró eliminación de ARN en comparación
50 con el lisado. (Figura 2c).

Se confirmaron los resultados anteriores y se cuantificaron realizando un ensayo de ARN mediante HPLC en fase inversa. Los resultados indicaron que:

55 el 32% del ARN que se encuentra en el lisado estaba presente en el permeado de diafiltración;

el 43,7% del ARN que se encuentra en el lisado estaba presente en la combinación de material retenido; y

60 el 0,9% del ARN se encontraba en el permeado de concentración.

Aunque el solicitante no quiere limitarse a una teoría, los resultados sugieren que el ARN de bajo peso molecular participa originalmente en la capa de gel pero luego se deja que se resolubilice por el tampón de diafiltración y puede pasar a través de la membrana de ultrafiltración.

65

Ejemplo 2

Efecto de la fuerza iónica, parte 2

- 5 Se llevó a cabo otro experimento para determinar la significación de la fuerza iónica sobre la eliminación de ARN. Se compararon tres tampones Tris de diferentes fuerzas iónicas. Los tampones Tris tenían todos un pH de 7,5, pero eran de concentraciones variables tal como se expone a continuación:

500 mM (conductividad de 25,3)

10

100 mM (conductividad de 6,89)

10 mM (conductividad de 0,33)

- 15 Una comparación de los perfiles de HPLC (lisado frente a combinación de material retenido) demostró que cuanto menor es la fuerza iónica, mayor es la eliminación de ARN (figuras 3a a 3f).

Ejemplo 3

20

Efecto del pH

- 25 Habiendo deducido que la fuerza iónica afectaba a la eliminación de ARN, se investigó el efecto del pH sobre la eliminación de ARN. Se realizó la investigación frente a un tampón Tris 10 mM a un pH de 6, 7,5 y 9. De nuevo comparando los perfiles de HPLC (lisado frente a combinación de material retenido) se determinó que un pH entre 7,5 y 9 proporcionó una mejor eliminación de ARN que un pH de 6 aunque los resultados a pH 9 no fueron mejores que a pH 7,5 (figuras 4a a 4d y figuras 3e y 3f.)

30 Ejemplo 4

Efecto de la fuerza iónica sobre el flujo de permeado y la presión transmembrana

- 35 Además de afectar a la eliminación de ARN, se observó que el flujo de permeado y la presión transmembrana (PTM) se veían afectados por la concentración iónica del tampón de diafiltración. Por tanto, aunque el flujo de permeado era generalmente del orden de 40 l/m²/h al comienzo de la diafiltración, se alteró con intercambios de volumen crecientes. En el caso del tampón 500 mM, el flujo de permeado disminuyó hasta aproximadamente 30 l/m²/h mientras que para el tampón 100 mM, aumentó hasta aproximadamente 70 l/m²/h y para el tampón 10 mM, aumentó hasta aproximadamente 140 l/m²/h. Estos hallazgos son significativos porque demuestran que puede llevarse a cabo el procesamiento a velocidades más rápidas para los tampones de menor fuerza iónica; en tanto como un factor de 5. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 5.

- 45 También disminuyó la PTM desde una presión inicial de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 17 en el caso del tampón 100 mM y hasta aproximadamente 10 en el caso del tampón 10 mM. Esto es en contraposición al tampón 500 mM para el que la PTM permaneció constante. Los resultados se ilustran en la figura 6.

Ejemplo 5

50 *Efecto de los intercambios de volumen*

- Sorprendentemente, se encontró que en el caso del tampón 10 mM, todavía estaban pasando cantidades significativas de ARN a través de la membrana tras 32 intercambios de volumen. En consecuencia, se llevó a cabo otro experimento para determinar cuando el ARN dejaba de eluirse.

55

- Se retiraron 500 ml de lisado clarificado del almacenamiento a -20°C, se descongelaron y filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. Se pusieron 150 ml del lisado filtrado en el recipiente de un dispositivo de TFF y se bombearon alrededor del sistema a un caudal transversal de 5,920 l/min/m². Se fijó la PTM a 60 kPa cerrando parcialmente la válvula de material retenido del dispositivo de TFF. Se recirculó el lisado durante 20 minutos para polarizar la membrana. Se concentró el contenido del recipiente hasta aproximadamente 25 ml y luego se sometió a diafiltración frente a 1600 ml de tampón de diafiltración.

- 65 Al final de la diafiltración, se cerró la línea de permeado y se abrió la válvula de material retenido para eliminar la PTM. Entonces, se recirculó el material retenido durante 10 minutos para lavar la membrana y luego se recogió en una botella de Nalgene limpia. Se bombearon otros 30 ml de tampón de diafiltración alrededor del sistema durante 10 minutos para lavar la membrana y luego se recogieron. Se realizó un total de dos lavados. Se midieron la PTM y el flujo de permeado en todo el procedimiento, y se tomaron muestras para HPLC de intercambio iónico como una indicación de la eliminación de ARN.

Se encontró que con una diafiltración prolongada, podía eliminarse todo excepto el 2% del ARN presente en el lisado (figuras 7a y 7b). Además, será evidente a partir de la figura 7b que el pico del ARN que queda está inmediatamente bajo el pico del plásmido indicando que el ARN que queda es todo ARN de alto peso molecular. Estos datos sugieren que podría usarse el procedimiento conjuntamente con un procedimiento que es eficaz en la eliminación de ARN de alto peso molecular, tal como, por ejemplo, precipitación con CaCl_2 para garantizar la eliminación de todo el ARN de una muestra.

Ejemplo 6

Efecto de la carga de plásmido

El solicitante determinó inesperadamente que reduciendo la cantidad de plásmido cargado en una membrana, podía aumentarse adicionalmente la separación de ARN del ADN de plásmido. De hecho, al reducir las cargas de plásmido desde 0,239 g de plásmido/m² hasta 0,119 g/m² en una membrana de 300 KDa, pudo obtenerse ADN de plásmido con niveles significativamente inferiores de ARN presente.

Los resultados se muestran en las figuras 8a a 8i.

Para explicarlo, se sometió a diafiltración un plásmido de 7,6 Kpb frente a 50 equivalentes en volumen de Tris 20 mM pH 7,5 en una membrana de 300 K según el protocolo general. Los cromatogramas de HPLC-IE para la muestra cargada a 0,119 g de plásmido por m² de membrana se muestran en las figuras 8a a 8h.

La figura 8a es el lisado;

La figura 8b es el permeado de concentración;

La figura 8c es el permeado de diafiltración combinado, volúmenes 1-10;

La figura 8d es el permeado de diafiltración combinado, volúmenes 11-20;

La figura 8e es el permeado de diafiltración combinado, volúmenes 21-30;

La figura 8f es el permeado de diafiltración combinado, volúmenes 31-40;

La figura 8g es el permeado de diafiltración combinado, volúmenes 41-50; y

La figura 8h es la combinación de material retenido.

Por comparación, la figura 8i es la combinación de material retenido de los 0,239 g de plásmido por m² de muestra de membrana. Lo que demuestran los resultados es que a las cargas menores, el plásmido está libre de ARN. (Compárese la figura 8h con la figura 8i.)

Los cromatogramas de HPLC-IE también demuestran cómo se elimina el ARN con el aumento de los equivalentes en volumen de diafiltración. (Compárese 8c con 8 g y también 8a y 8b) Por tanto, en el lisado (figura 8a) puede observarse un primer pico a la izquierda (proteína) seguido por un pico ancho de ARN con los picos de plásmido a 8,057 y 8,356 también marcados. Los dos picos de plásmido son los picos de ADN abierto y superenrollado, respectivamente. En el permeado de concentración (figura 8b) puede observarse el pico de proteína, pero muy poco ARN lo que sugiere que el ARN participa inicialmente en la capa de gel. A medida que se añaden volúmenes crecientes del tampón de diafiltración, hay un cambio marcado en la cantidad de ARN que está eluyendo. Tras 10 volúmenes (figura 8c), sólo se eliminan niveles bajos de ARN a través de la membrana; tras 20 volúmenes, cuando el tampón de diafiltración está realmente teniendo efecto, tal como se evidencia por una disminución en el pH y la conductividad, se elimina un pico de ARN a través de la membrana (figura 8d). Desde 30 hasta 50 volúmenes, puede observarse que los niveles de ARN disminuyen hasta que en el momento en que han pasado 50 volúmenes a través de la membrana los niveles no son significativos y puede detenerse la filtración. La combinación de material retenido (figura 8h) muestra plásmido puro y nada de ARN.

El solicitante ha determinado inesperadamente que cuando se usan membranas con un tamaño de poro mayor, las cargas de plásmido pueden ser superiores. Por ejemplo, con una membrana de 500 KDa, pueden usarse cargas de plásmido de hasta 1,615 g de plásmido/m². De hecho, el área total de la membrana puede ser significativa por sí misma dado que las indicaciones iniciales sugieren que cuanto mayor es el área de la membrana, son superiores las cargas de plásmido que pueden usarse.

Ejemplo 7

Otra etapa de refinamiento

Aunque el uso de un tampón de fuerza iónica baja en combinación con intercambios de volumen suficientes del tampón pudieron eliminar el 98,6% del ARN presente inmediatamente después de lisis (Tris 10 mM, pH 7,5

y 60 intercambios de volumen) el solicitante buscaba determinar si una segunda técnica diferente podría eliminar cualquier ARN que quede, particularmente ARN de alto peso molecular, hasta niveles en los que el ARN demostró ser indetectable.

5 Emprendieron un procedimiento basado en cromatografía tras la etapa de ultrafiltración. La etapa de cromatografía sometida a prueba fue una etapa con hidroxiapatita. Por tanto, se cargó la combinación de material retenido en una columna de hidroxiapatita (Bio-Rad MacroPrep Ceramic tipo II, tamaño de perla de 20 μ m) en condiciones que evitan la unión de ARN (Na_2HPO_4 0,3 M, pH 7,8) de modo que el ARN se elimina en la fracción no retenida mientras que se maximiza la unión de plásmido. Entonces se eluyó el plásmido con una recuperación del 93,4%. No se detectó ARN
10 mediante HPLC de intercambio iónico.

De manera interesante, el solicitante también determinó que el pH ha demostrado ser crítico para el uso eficaz de hidroxiapatita para separar ARN del ADN de plásmido. Los resultados que demuestran el efecto del pH sobre la separación de ARN del ADN de plásmido se muestran en el ejemplo 10 que también muestra los beneficios de usar
15 un sistema de doble tampón en el procedimiento de separación.

Ejemplo 8

Efecto del canal

20 Se acepta generalmente que un canal abierto permite más fácilmente la formación de una capa de gel que evita que el ADN de plásmido pase a través de la membrana y hacia el permeado. De hecho, incluso se ha sugerido que el uso de un cartucho de canales abiertos puede ser crítico para el funcionamiento satisfactorio del procedimiento.

25 Dado que el solicitante experimentó dificultades recuperando el plásmido de la membrana al final de la etapa de ultrafiltración, pero encontró que las membranas muy sucias podían restaurarse por medio de un digesto de ácido nucleico, se conjeturó que el ácido nucleico asociado con la capa de gel estaba de hecho uniéndose irreversiblemente a la membrana. En un esfuerzo para determinar si se podría alterar esta unión, se usó una pantalla diseñada para producir turbulencia en el canal de material retenido. El protocolo fue, por lo demás, tal como se describe a continuación y se
30 usó una membrana con canales con pantalla en T "Omega".

Se pusieron 180 ml de lisado clarificado (tratado con ARNasa) en el recipiente de un sistema Minim. Se encendió la bomba para facilitar un caudal transversal de 100 ml/min. Se cerró ligeramente la válvula de material retenido hasta facilitar una PTM de 80 kPa (presión de entrada de 150 kPa, presión de salida de 10 kPa.). Se hizo funcionar el sistema
35 en el modo de recirculación total durante 20 minutos para dejar que se formara una capa de gel. Se tomaron muestras del permeado y el recipiente para análisis mediante HPLC. Se puso la línea de permeado en una botella limpia, y se concentró el lisado hasta un volumen final de 30 ml. Entonces se sometió el concentrado a diafiltración frente a 20 volúmenes (600 ml) de Tris 10 mM / NaCl 0,45 M pH 8,5. Se recogieron cuatro muestras de permeado de 150 ml durante la diafiltración y una durante la concentración y se analizaron mediante HPLC. Se abrió la válvula de material
40 retenido y se fijó la línea de permeado para eliminar la PTM. Se dejó el sistema durante 10 minutos para disolver la capa de gel y recoger el plásmido. Tras 10 minutos, se recogió el material retenido del recipiente y se sustituyó por 30 ml de tampón de diafiltración. Esto se recirculó durante 10 minutos como antes, se recogió en un recipiente separado, y se marcó como "lavado 1". Se repitió la etapa de lavado. Se midieron los volúmenes de material recogido del material retenido, lavado 1 y lavado 2 y se tomaron las muestras para el análisis mediante HPLC. También se midió
45 la absorbancia a 260 nm y 280 nm y se calcularon las proporciones 260/280.

Se usaron dos criterios para medir el efecto de usar un canal con pantalla. Éstos fueron la recuperación de plásmido del procedimiento y la eliminación de contaminantes mediante inspección visual de los cromatogramas de HPLC.

50 A partir de los cromatogramas, se sacaron varias conclusiones. Tras una recirculación de 20 minutos, prácticamente no pasó plásmido a través de la membrana (figura 9a). La cantidad total de plásmido en el recipiente fue de 12,78 mg en comparación con 16,33 mg en el material de partida (figuras 9b y 9c). Por lo tanto, puede deducirse que están participando 3,55 mg de plásmido en la capa de gel.

55 La inspección visual de las muestras de permeado (figuras 9d a 9h) mostró que los contaminantes pasan a través de la membrana, pero no el plásmido. Los cromatogramas del material recogido del material retenido y los lavados (figuras 9i a 9k) mostraron una buena eliminación de contaminantes.

60 Se recuperó el 82% del plásmido total en el material recogido del material retenido, y se recuperó el 13,7% en el lavado. Esto fue significativamente superior a las recuperaciones observadas con un cartucho de canales abiertos (normalmente del 70-80%) para el material recogido del material retenido y el lavado combinados.

65 Cuando se aplicó el procedimiento a un procedimiento sin ARNasa tal como se describió anteriormente en el protocolo general, también se obtuvieron rendimientos de plásmido mejorados.

Claramente, el uso de canales con pantalla para mejorar los rendimientos de plásmido tiene aplicación general a cualquier procedimiento de ultrafiltración y es un aspecto independiente de esta solicitud.

Ejemplo 9

Efecto de otras etapas de cromatografía

Dado que el procedimiento sin ARNasa descrito es particularmente eficaz en la eliminación de ARN de bajo peso molecular, el solicitante deseaba determinar si podrían usarse otros procedimientos de eliminación de ARN, particularmente los que se sabe que eliminan ARN de alto peso molecular, en combinación con su procedimiento sin ARNasa como una etapa de ultrafiltración o bien previa o bien posterior (véase la figura 1b). Por tanto, se emprendió el siguiente experimento para determinar el efecto de una etapa de precipitación con cloruro de calcio posterior a la ultrafiltración.

Se preparó el material de carga siguiendo el protocolo general descrito previamente (se usó tampón Tris 100 mM, pH 7,5) para eliminar el ARN de bajo peso molecular durante la ultrafiltración. Esto estuvo seguido por una etapa de precipitación con cloruro de calcio. (1,4 M, pH 7,5)

A un volumen de combinación de material retenido se añadió un volumen de cloruro de calcio 2,8 M en Tris 100 mM, pH 7,5. Se agitó la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se eliminó el material precipitado mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μ m.

Se sabe que las sales de cloruro de calcio interfieren tanto en la filtración de flujo transversal como en la cromatografía de intercambio iónico. Por lo tanto, si fuera a demostrarse que un procedimiento combinado es satisfactorio, sería necesario efectuar la eliminación del cloruro de calcio. El solicitante determinó que podía usarse la cromatografía en fase inversa no sólo para separar el ADN de plásmido de las sales de cloruro de calcio, sino que seleccionando un agente de formación de par iónico podían eliminarse tanto el ARN como las sales de cloruro de calcio.

La investigación de diversos factores que afectan a la cromatografía identificó el agente de formación de par iónico y la matriz como claves para la separación del ADN de plásmido del ARN.

Si se busca eliminar sólo las sales de cloruro de calcio, podría usarse sin embargo un sistema más simple.

Dos medios de fase inversa demostraron ser adecuados en combinación con cloruro de tetrabutilamonio. Fueron:

Polyflow suministrado por Puresyn, tamaño de partícula de 55 μ m, que es no poroso y es un polímero patentado; y

Poros 50 R1 suministrado por Poros, tamaño de partícula de 50 μ m, que es poroso y es un polímero de poliestireno-divinilbenceno.

La concentración preferida del cloruro de tetrabutilamonio (TBAC) era de 2 mM.

Variaron las condiciones de elución preferidas para las dos matrices:

Para Polyflow, la eliminación del ARN fue con etanol al 10% y TBAC 2 mM y la elución del plásmido fue con etanol al 30%;

Para Poros 50 R1, la eliminación del ARN fue con etanol al 25% y TBAC 2 mM, y la elución del plásmido fue con etanol al 40%.

En ambos casos, la recuperación de plásmido fue elevada (aproximadamente del 80%) y sólo pudieron detectarse niveles muy bajos de ARN.

Los mejores resultados se obtuvieron con cargas bajas.

La aplicación de la cromatografía en fase inversa muestra claramente por sí misma que tiene potencial en asociación con la precipitación con cloruro de calcio tanto como técnica de separación de ARN, independientemente de si se usa en combinación con el procedimiento de ultrafiltración de flujo tangencial de la invención, como medio para mejorar los rendimientos de plásmido.

Ejemplo 10

Uso de cromatografía con hidroxiapatita

Se investigaron varios medios de hidroxiapatita para determinar su capacidad para separar ARN de ADN extracromosómico. Se investigaron todos del efecto del pH, tipo de tampón, protocolo de elución, capacidad de la columna y caudal. La metodología fue sencilla y comprendió equilibrar una columna de hidroxiapatita con tampón a un caudal dado, cargar una combinación de material retenido (diluido en tampón) en la columna, lavar con tampón, hacer pasar un gradiente lineal y regenerar la columna.

ES 2 287 189 T3

Los hallazgos significativos de estos experimentos fueron los siguientes:

Se encontró que el pH era crítico en la separación satisfactoria de ADN extracromosómico y ARN. Para hidroxipatita Macro Prep ceramic tipo II, 40 μm (Bio Rad) el pH óptimo era de 7,8 (véase la figura 10c) y una diferencia de tan sólo 0,2 unidades de pH tuvo un efecto significativo sobre la separación. Por tanto, a pH 6,8 (figura 10a) y 8,8 (figura 10d) no hubo separación mientras que a 7,6 (figura 10b) se redujo significativamente la resolución.

También, el tipo de tampón demostró ser significativo, funcionando mejor con tampón fosfato de disodio que con el de fosfato de dipotasio más soluble. De hecho, se obtuvieron los mejores resultados usando una etapa de doble elución combinando las propiedades de separación del fosfato de disodio con la alta solubilidad del fosfato de dipotasio. Se equilibró la columna de hidroxipatita y se lavó con fosfato de disodio 10 mM a pH 7,8, se eluyó entonces el ARN con fosfato de disodio 0,35 M a pH 7,8. Se eluyó el ADN de plásmido con fosfato de dipotasio 0,2 M a pH 7,8 con a una recuperación del 78,6% (tabla 1 a continuación).

TABLA 1

Tampón (elución 1)	Tampón (elución 2)	Pico	Volumen	Recuperación de plásmido (%)
0,35 M Na_2HPO_4 pH 7,8	0,6 M Na_2HPO_4 pH 7,8	1 2	2,5 1,5	6,6 65,7
0,35 M Na_2HPO_4 pH 7,8	0,2 M K_2HPO_4 pH 7,8	1 2	2,0 1,0	2,5 78,6
0,3 M Na_2HPO_4 pH 7,8	0,2 M K_2HPO_4 pH 7,8	1 2	3,0 1,0	9,9 76,2

La sustitución del tampón de elución del ARN por fosfato de disodio 0,3 M a pH 7,8 proporcionó recuperaciones de plásmido similares (76,2%) pero la eliminación de ARN no fue tan eficaz. La sustitución del tampón de elución del ARN por fosfato de dipotasio 0,6 mM a pH 7,8 dio como resultado una recuperación de plásmido inferior (65,7%).

La carga de la columna con más de 0,5 mg de ácido nucleico total por ml de columna usando las condiciones de elución de la etapa indicadas en la tabla 1 dio como resultado pérdidas de plásmido en el pico de elución de ARN del 56-58%.

A una capacidad de carga de ácido nucleico total de 0,5 mg/ml, un caudal de 2 ml/min también condujo a una fuerte pérdida de plásmido del 7,7% en la fracción de elución de ARN.

Las condiciones óptimas fueron las siguientes:

1. Se equilibra y se lava la columna con Na_2HPO_4 10 M, pH 7,8
2. Se eluye el ARN con Na_2HPO_4 0,35 M, pH 7,8
3. Se eluye el ADN de plásmido con K_2HPO_4 0,2 M, pH 7,8
4. Caudal de 0,5 ml/min.
5. Capacidad de la columna de 0,5 mg de ácido nucleico total por ml de columna o 25,4 mg de plásmido por ml de columna.

Estas condiciones dieron lugar a una recuperación de plásmido del 78,6% y el producto pareció estar libre de ARN (usando cromatografía de intercambio iónico).

Se obtuvieron resultados similares usando hidroxapatita de Merck con la excepción de que el pH óptimo era de 7,5 y el tampón Na_2HPO_4 es mejor a 0,25 M. El objetivo es maximizar la unión del plásmido para aumentar la capacidad de la columna. Puesto que el ARN se une a la columna y está presente en grandes cantidades, se lleva una gran parte de la capacidad de unión de la hidroxapatita. Sin embargo, puesto que el ARN tiene una afinidad menor por la columna que el plásmido, se usan condiciones de alto contenido en fosfato para evitar que el ARN se una a la columna y como resultado se maximiza la unión del plásmido. Estas condiciones son Na_2HPO_4 0,35 M, pH 7,8 para BioRad y Na_2HPO_4 0,25 M, pH 7,5 para Merck. En estas condiciones, pueden lograrse capacidades de 300-500 $\mu\text{g/ml}$. Las rutas alternativas ilustradas con referencia a la figura 1b dieron lugar a ADN de plásmido de diferentes grados de pureza y diferentes rendimientos. Así, por ejemplo, el procedimiento ilustrado como ruta B dio lugar a la eliminación de hasta el 96% de las endotoxinas y hasta el 99,89% de ADN genómico, mientras que el procedimiento ilustrado como ruta C dio lugar a la eliminación de hasta el 99,97% de ADN genómico.

Por lo tanto, la selección de cualquier procedimiento particular dependerá de varios factores. Aunque en los ejemplos anteriores, se llevó a cabo la etapa de ultrafiltración según el protocolo de purificación de plásmidos sin ARNasa (a escala de 300 g expuesto previamente) y suponía formar una capa de gel mediante la recirculación durante 30 minutos, el solicitante ha determinado que la recirculación no es necesaria. Esto se demuestra en el ejemplo 11 a continuación.

Ejemplo 11

UF, sin recirculación

a) Control (con ARNasa)

Se añadió ARNasa durante la lisis alcalina y se cargó el lisado clarificado en una membrana de ultrafiltración membrana sin recirculación.

Constructo	=	plásmido de 7,8 kb
Membrana	=	300 K
Carga de plásmido	=	1,970 g/m^2
PTM	=	68,95 kPa
Tampón de diafiltración	=	50 vol de Tris 10 mM pH 8

Resultados
Recuperación de plásmido = 52%
Pérdidas de plásmido durante la concentración/diafiltración = 38%

b) comparación (procedimiento sin ARNasa)

El constructo, membrana y tampón de diafiltración fueron tal como se establece para el control. Varió la carga de plásmido (tal como se muestra) y se obtuvieron resultados a una PTM tanto de 34,47 como de 68,95 kPa. Véase la tabla 2 a continuación.

TABLA 2

	Carga de plásmido	Recuperación de plásmido	Pérdidas de plásmido	HPLC-SEC
PTM = 34,47 kPa	1,249 g/m^2	52%	3%	NA
PTM = 68,95 kPa	1,550 g/m^2	90%	0	83% de ARN

La diferencia significativa en las pérdidas de plásmido entre a) control y b) la comparación para un procedimiento sin ARNasa indican que la recirculación no es necesaria en un procedimiento sin ARNasa.

Sin querer restringirse a una teoría, es posible que la presencia de altos niveles de ARN en el procedimiento sin ARNasa dé como resultado la formación de una capa de gel "instantánea" posiblemente debido a los altos niveles de ARN. A este respecto, debe observarse que el lisado en el procedimiento sin ARNasa contiene el ~98% en peso de ARN con respecto al ~2% en peso de ADN extracromosómico. De hecho, la hipótesis está respaldada por los resultados obtenidos en el ejemplo 12 a continuación, en el que se estudió el efecto de la concentración de la carga de plásmido.

Ejemplo 12

Efecto de la concentración de la carga

5 En este ejemplo, se estudió el efecto de reducir la carga de plásmido. Los resultados se indican en la tabla 3 a continuación.

TABLA 3

	Carga de plásmido	Recuperación de plásmido	Pérdidas de plásmido	HPLC-SEC
15 Dilución 2 x	0,926 g/m ²	72%	0,7%	78% de ARN
Dilución 4 x	0,433 g/m ²	86%	1,3%	65% de ARN
Dilución 8 x	0,196 g/m ²	82%	7%	46% de ARN
20 Dilución 16 x	0,0646 g/m ²	141%	5%	34% de ARN

Lo que es evidente a partir de los resultados es que diluyendo tanto el plásmido como el ARN en la carga de lisado, aumentan las pérdidas de plásmido aunque la recuperación de plásmido sigue siendo alta.

En vista de los resultados obtenidos en los ejemplos 11 y 12, el solicitante decidió investigar si era necesaria la recirculación en una ultrafiltración de segunda fase (UF2) es decir una en la que se había eliminado previamente la mayor parte del ARN. El protocolo y los resultados se facilitan en el ejemplo 13 a continuación.

Ejemplo 13

Recirculación para UF de 2ª etapa

En este experimento se estudió el efecto de:

i) La concentración de plásmido en el material de partida

ii) La PTM y

iii) El tamaño del plásmido

para determinar cómo afectan a la recuperación de plásmido.

Se empleó la UF2 para reducir el volumen de una combinación tras TMAE, es decir una que se ha sometido a una etapa de purificación usando cromatografía.

Los materiales fueron los que se enumeran a continuación:

Materiales

Combinación tras TMAE que contiene plásmido (7,7 Kpb) en Tris 50 mM/ NaCl 0,74 M pH 8,5, almacenado a 2-8°C.

Combinación tras TMAE que contiene plásmido (5,5 Kpb) en Tris 50 mM/ NaCl 0,74 M pH 8,5, almacenado a 2-8°C.

El tampón usado como diluyente fue Tris 50 mM/ NaCl 0,74 M pH 8,5

Se limpió el cartucho de ultrafiltración usando NaOH 0,5 M y se almacenó en NaOH 0,1 M según las instrucciones del fabricante.

Parte experimental

Se diluyó el eluato de TMAE con Tris 50 mM/ NaCl 0,74 M pH 8,5 hasta la concentración requerida. Se tomaron muestras para análisis mediante HPLC (Dionex) y medición de A260. Se pusieron 500 ml en el recipiente, situándose el resto en una botella conectada al recipiente de 500 ml. Se encendió la bomba para facilitar un caudal transversal (QR) de 900 ml/min. Se cerró ligeramente la válvula de material retenido para dar la presión transmembrana (PTM)

ES 2 287 189 T3

requerida. Se puso la línea de permeado en una botella limpia, y se concentró el lisado hasta un volumen final de 250 ml. En total, se recogieron cuatro fracciones de permeado (volúmenes dependientes de la concentración de plásmido del material de partida). Se tomaron muestras para análisis mediante HPLC (Dionex) y medición de A260.

- 5 Se abrió la válvula de material retenido y se fijó la línea de permeado para eliminar la PTM. Se dejó recircular el sistema durante 10 minutos para disolver cualquier plásmido asociado con la membrana y recoger el plásmido. Tras 10 minutos, se recogió el material retenido de UF2 del recipiente y se repuso con 100 ml de Tris 50 mM/ NaCl 0,74 M pH 8,5. Esto se recirculó durante 10 minutos como antes, se recogió en un recipiente separado y se marcó como “lavado 1”. Se repitió dos veces la etapa de lavado y los materiales recogidos se marcaron como “lavado 2” y “lavado 3”. Se midieron los volúmenes de material retenido de UF2, lavado 1, lavado 2 y lavado 3 y se tomaron muestras para análisis mediante HPLC (Dionex) y medición de A260.

Los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones indicadas en la tabla 4 a continuación.

TABLA 4

Nº de experimento	Conc. de plásmido (µg/ml)	PTM (kPa)	Tamaño de plásmido
064	200	68,95	7,7 kpb
065	400	68,95	7,7 kpb
066	600	68,95	7,7 kpb
068	100	68,95	7,7 kpb
069	400	103,4	7,7 kpb
070	300	68,95	5,5 kpb
071	250	103,4	5,5 kpb
072	200	137,9	5,5 kpb

Los resultados se facilitan en la tabla 5 a continuación:

Nº de experimento	Recuperado (%)	Perdido (%)	No tenido en cuenta (%)
064	86,25	2,95	10,79
065	90,94	3,70	5,36
066	93,05	3,08	3,87
068	91,73	5,58	2,70
069	85,83	5,33	8,84
070	95,54	3,53	0,93
071	86,30	5,85	7,85
072	86,10	6,50	7,40

Los resultados sugieren que no es necesaria la polarización de la membrana de ultrafiltración.

- 65 Puesto que, en un procedimiento de purificación de ADN extracromosómico sin ARNasa, los niveles de ARN que queda tras la lisis alcalina son particularmente altos (aproximadamente 20 veces la cantidad de ADN de plásmido en peso) el solicitante consideró la manera de reducir los niveles de ARN antes de la ultrafiltración.

Haciendo referencia a las figuras 1b “c”, será evidente que el solicitante había propuesto usar CaCl_2 antes de la etapa de ultrafiltración. Esta etapa eliminaba cantidades significativas de ARN y, en consecuencia, se realizaron otras investigaciones con vista a optimizar la etapa de ultrafiltración en presencia de cloruro de calcio. Estas investigaciones se exponen en el ejemplo 14.

5

Ejemplo 14

CaCl_2 y tamaño de poro

10 Puesto que los experimentos previos con CaCl_2 sugieren que se pierden cantidades significativas de plásmido a través de una membrana de 300 K, el solicitante planteó la hipótesis de que el CaCl_2 podría estar “condensando” el plásmido. Por lo tanto, se probó a usar una membrana con un tamaño de poro inferior (100 K). Sin embargo, esto sólo dio una recuperación de plásmido inferior a la esperada. Esto se rectificó usando una PTM inferior (34,47 kPa frente a 68,95 kPa). Se realizó la separación de los restos celulares:

15

a) usando centrifugación y

b) usando un tamiz

20

A continuación se muestran experimentos comparativos con y sin recirculación:

a) Lisado de carga de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio con recirculación

Se produjo lisado clarificado mediante lisis alcalina en una preparación de 50 g. Se añadió un volumen de disolución madre de CaCl_2 2 M a 1 volumen de lisado clarificado con agitación. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó el precipitado a 5000 rpm durante 10 minutos. Se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro Sartobran 300 de 0,45/0,2 μm . Se vació un sistema de ultrafiltración constituido por un dispositivo Pall Filtron Centramate dotado con una membrana de canales abiertos Omega Centramate de 0,0929 m^2 y 100 K de la disolución de almacenamiento y se lavó con Tris 10 mM pH 8,5. Se llenó el recipiente con aproximadamente 400 ml de lisado clarificado de una preparación de 50 g y se conectó a una botella que contenía el resto del lisado. Se llevó a cabo la recirculación conectando la línea de permeado al recipiente. Se fijó la bomba Watson-Marlow a 158 rpm (caudal transversal de 10,76 l/min/ m^2), y se ajustó la válvula de material retenido para obtener una PTM de 34,47 kPa. La recirculación duró 20 minutos, tiempo durante el cual no se dejó que la PTM se elevara por encima de 68,95 kPa. Se concentró el lisado clarificado hasta 75 ml conectando la línea de permeado a una botella de 2 l (permeado de concentración). Se inició la diafiltración conectando el recipiente a una botella de disolución de Tris 10 mM, pH 8,5 de modo que se sustituyó el filtrado perdido por tampón nuevo a la misma velocidad. Se recogió el permeado de diafiltración en 5 botellas de 1 l. A 30 volúmenes (3 l) de Tris 10 mM pH 8,5 siguieron 20 volúmenes (2 l) de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M pH 8,5. Al final de la diafiltración, se abrió la válvula de material retenido (sin contrapresión), se cerró la línea de permeado y se recirculó el contenido del sistema de UF durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (material recogido del material retenido). Se llenó el recipiente con 100 ml de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M pH 8,5 y se recirculó durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (lavado 1 de material retenido). Esto se repitió una vez más (lavado 2 de material retenido). Se combinaron el material recogido del material retenido de UF1 y 2 lavados y se hicieron pasar a través de un filtro Sartobran 300 de 0,45/0,2 μm . Entonces se desinfectó el sistema de UF1 recirculando 300 ml de NaOH 0,5 M durante 30 minutos. Se almacenó el sistema de UF1 en NaOH 0,1 M. Se repitió el experimento pero se combinó el lisado clarificado de 2 preparaciones de 50 g, se precipitó con cloruro de calcio y se procesó a través de UF1 de modo que se dobló la carga de UF1.

50

b) Lisado de carga de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio sin recirculación

i) Usando centrifugación para eliminar los restos celulares

Se produjo lisado clarificado mediante lisis alcalina en una preparación de 100 g. Se añadió un volumen de disolución madre de CaCl_2 2 M a 1 volumen de lisado clarificado con agitación. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugó el precipitado a 4600 rpm durante 20 minutos. Se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro Sartopure PP2 de 5 μm seguido por uno Sartobran P de 0,45/0,2 μm . Se vació un sistema de ultrafiltración constituido por un dispositivo Pall Filtron Centramate dotado con una membrana de canales abiertos Omega Centramate de 0,0929 m^2 y 100 K de la disolución de almacenamiento y se lavó con Tris 10 mM pH 8,5. Se llenó el recipiente con aproximadamente 400 ml de lisado clarificado de una preparación de 100 g y se conectó a una botella que contenía el resto del lisado. Se fijó la bomba Watson-Marlow a 158 rpm (caudal transversal de 10,76 l/min/ m^2) y se ajustó la válvula de material retenido para obtener una PTM de 34,47 kPa. Se concentró el lisado clarificado hasta 75 ml y se recogió el permeado de concentración en una botella de 2 l. No se dejó que la PTM se elevara por encima de 68,95 kPa. Se inició la diafiltración conectando el recipiente a una botella de tampón Tris 10 mM pH 8,0 de modo que se sustituyó el filtrado perdido por tampón nuevo a la misma velocidad. Se recogió el permeado de diafiltración en 5 botellas de 1 l. 30 volúmenes (3 l) de Tris 10 mM pH 8,0 estuvo seguido por 20 volúmenes (2 l) de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M pH 8,5. Al final de la diafiltración, se abrió la válvula de material retenido (sin contrapresión), se cerró la línea de permeado y se recirculó el contenido del sistema de UF durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (material recogido del material retenido). Se

llenó el recipiente con 75 ml de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M pH 8,5 y se recirculó durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (lavado 1 de material retenido). Esto se repitió una vez más (lavado 2 de material retenido). Se combinaron el material recogido del material retenido de UF1 y 2 lavados y se hicieron pasar a través de un filtro Sartobran 300 de 0,45/0,2 μ m. Entonces se desinfectó el sistema de UF1 recirculando 300 ml de NaOH 0,5 M durante 30 minutos. Se almacenó el sistema de UF1 en NaOH 0,1 M.

ii) Usando filtración para eliminar los restos celulares

Constructo de plásmido: líneas células huésped de *E. coli* de 5,9 kpb. Se dividieron 100 g de pasta celular bacteriana almacenada a -70°C en pequeños trozos con un mazo. Se añadieron 500 ml de tampón de resuspensión a un recipiente de resuspensión de Bellico a temperatura ambiente. Se añadió la pasta celular dividida al recipiente y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente con un ajuste del agitador magnético de 8. Inmediatamente antes de la lisis, se añadieron 834 ml de NaOH al 0,96% frío a 166 ml de SDS al 6% en la sala fría. Se transfirió la suspensión celular a un vaso de precipitados de 4 l con un agitador superior Heidolph y en la sala fría. Se añadió la mezcla de lisis a la resuspensión celular y se agitó durante 30 min. a 40 rpm. Se añadieron 500 ml de acetato de potasio 3 M al lisado y se agitó durante 30 min. a 60 rpm a 4°C. Se tomó una muestra de 20 ml de lisado y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. en una centrífuga MSE Mistral 2000. El sobrenadante era el lisado clarificado. A 1 volumen de lisado, se añadieron 0,66 volúmenes de disolución madre de CaCl_2 3 M con agitación. Se dejó la mezcla en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de nuevo y se vertió sobre un soporte Plastok dotado con un filtro de malla de tamaño de poro de 200 μ m, diámetro de 350 mm. Se recuperó el filtrado en un vaso de precipitados de 5 l con gravedad. Se bombeó el filtrado tras la malla a través de un cartucho de filtro de profundidad Millipore CE 15 y se recogió el filtrado en un vaso de precipitados de 5 l. Se bombeó el filtrado tras el filtro de profundidad a través de un filtro Sartobran P de 0,45/0,2 μ m. Este material se denominó el lisado tras precipitación con cloruro de calcio. Se procesó el lisado tras la precipitación con cloruro de calcio a través de UF1 como anteriormente excepto porque la diafiltración fue frente a 35 volúmenes de Tris 10 mM pH 8,0 seguido por 15 volúmenes de Tris 10 mM + NaCl 0,45 M pH 8,5. Se repitió el experimento pero se diluyó el lisado 2x con permeado de concentración de UF1 antes de la adición de la disolución de cloruro de calcio.

Desalación

Se desalaron todas las muestras que contenían sal de cloruro de calcio (incluyendo el lisado tras la precipitación con cloruro de calcio, permeado de concentración de UF1 y permeado de diafiltración de UF1) antes del análisis mediante HPLC.

Se inyectaron 2 ml de muestra en columnas de desalación HiTrap de 2x5 ml en serie equilibradas con Tris 50 mM, pH 8,5 a un caudal de 5 ml/min y se recogió un pico de desalación de 4,5 ml de absorbancia a 254 nm.

Análisis mediante HPLC

Se determinó la concentración de plásmido mediante HPLC-intercambio iónico en una columna Dionex DNAPac.

Se determinó el área de pico del ARN mediante HPLC-exclusión por tamaños en una columna G-ADN-PW de gel TSK de TosoHaas en serie con una columna G3000SWXL. Tampón de ejecución: Tris 0,1 M + NaCl 0,3 M + EDTA 1 mM, pH 7,5. Caudal = 0,3 ml/min. El contenido en ARN es la cantidad de ARN como un porcentaje de los ácidos nucleicos.

Resultados

a) lisado de carga de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio con recirculación

Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación que muestra: el efecto del aumento de la carga de ácido nucleico sobre el rendimiento de la UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio.

TABLA 6

Carga de UF1 (g de plásmido/m ²)	Recuperación de plásmido (HPLC-IE)	Contenido en ARN (HPLC-SEC)
0,646	109,9%	2,61%
1,163	121,5%	4,51%

Experimentos previos con un sistema TFF a escala de laboratorio de Millipore dotado con una membrana Omega de 0,00929 m² y 300 K Centramate de bajo volumen sugirieron que, en presencia de sal de cloruro de calcio, se perdían cantidades significativas de plásmido a través de la membrana. Por lo tanto, se usó en su lugar una membrana de 100 K membrana sin pérdidas significativas de plásmido. Sin embargo, la recuperación de plásmido fue inferior a la esperada pero esto se rectificó usando una PTM inicial inferior de 34,47 kPa en lugar de 68,95 kPa. Se maximizó la eliminación de ARN, como en la UF1 sin cloruro de calcio, usando un tampón de diafiltración con una fuerza iónica baja.

Se usó un sistema Centramate de 0,0929 m² para confirmar los resultados a escala de laboratorio, cargando 0,646 g de plásmido por metro cuadrado de membrana en presencia de sal de cloruro de calcio 1 M. La recuperación de plásmido fue alta, de más del 100% y la eliminación de ARN fue muy eficaz con un contenido en ARN de sólo el 2,61% en el material retenido de UF1 (tabla 6). A diferencia de la UF1 sin cloruro de calcio, se eliminó ARN durante la concentración y los primeros 10 volúmenes de diafiltración.

Entonces se aumentó la carga de la membrana hasta 1,163 g plásmido/m² con resultados similares en la recuperación de plásmido (> 100%) y eliminación de ARN (contenido del 4,51% en el material retenido de UF1).

Se llevó a cabo la diafiltración en dos etapas: en primer lugar, se usaron 30 volúmenes de Tris 10 mM, pH 8,5 para maximizar la eliminación de ARN. Esto estuvo seguido por 20 volúmenes de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M, pH 8,5 para intercambiar con tampón el plásmido y prepararlo para la carga directa en la columna de Fractogel TMAE.

b) Lisado de carga de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio sin recirculación

Se llevó a cabo UF1, sin recirculación, para acumular una capa de gel, con lisado tratado con cloruro de calcio. Sólo se detectaron cantidades muy pequeñas de plásmido en el permeado (0,2%) y la recuperación de plásmido fue muy alta (de más del 100%). El contenido en ARN en el material retenido de UF1 fue del 4,64% (tabla 7). Tabla 7: ilustra el efecto de la concentración de ácido nucleico en la carga sobre el rendimiento de la UF1 sin recirculación en presencia de cloruro de calcio.

TABLA 7

Carga de UF1 (g de plásmido/m ²)	Conc. de plásmido (µg/mt)	Recuperación de plásmido			Contenido en ARN (HPLC-SEC)
		Permeado de conc.	Permeado de diaf.	Material retenido de UF1	
1,362*	69,9	0,2%	0	108,8%	4,64%
1,177	60,7	1,3%	0	90,5%	0
1,395	36,0	5,9%	72%	82,7%	1,93%
Construido de plásmido: *7,7 Kpb, **5,9 Kpb					

Se combinaron la etapa de eliminación de restos celulares tras la neutralización y la etapa de eliminación de precipitado con cloruro de calcio. Se usó una disolución madre de cloruro de calcio 3 M para minimizar los volúmenes del procedimiento. Se añadieron directamente 0,66 volúmenes de la disolución madre a 1 volumen de lisado tras la neutralización. Se hizo pasar la mezcla a través de un filtro de malla para eliminar los restos celulares, luego a través de un filtro de profundidad para eliminar partículas más finas. Este proceso fue más rápido que la centrifugación y también se contiene más fácilmente. También se cambió el segundo tampón de diafiltración del que contenía NaCl 0,54 M a NaCl 0,45 M. Se cambió el constructo de plásmido a un tamaño menor desde (7,7 Kpb) hasta (5,9 Kpb).

Las pérdidas de plásmido en el permeado de concentración fueron superiores al 1,3%, lo que puede deberse al menor tamaño del plásmido. La recuperación de plásmido fue del 90,5% y no se detectó ARN en el material retenido de UF1 (tabla 7).

Entonces se diluyó el lisado 2 veces con permeado de concentración de una ejecución previa, antes de la adición de cloruro de calcio, de modo que la concentración de plásmido en la carga de UF1 load se redujo desde 60,7 hasta 36 µg/ml. Las pérdidas de plásmido en el permeado de concentración aumentaron significativamente hasta el 5,9% y la recuperación de plásmido fue inferior al 82,7%. Esto podría indicar que los plásmidos más pequeños de una cepa huésped de baja producción pueden dar recuperaciones menores en la fase de UF1.

Pueden sacarse varias conclusiones a partir de los resultados de los experimentos expuestos en el ejemplo 14.

1. El ARN parece contribuir a la capa de gel durante la recirculación de modo que sólo se eliminan niveles bajos a través de la membrana durante la concentración.

2. La fuerza iónica del tampón de diafiltración fue el factor más importante en la eliminación del ARN: una conductividad baja aumentó significativamente el paso de ARN a través de la membrana durante la diafiltración, aunque no se entiende el mecanismo exacto.

3. Se recomiendan 50 volúmenes de diafiltración para proporcionar la eliminación completa del ARN.

4. Se recomienda un tamaño de poro de la membrana de 300 K para tamaños de plásmido de 5 Kpb o superior.

5. El otro factor importante en la eliminación de ARN fue la carga de ácido nucleico: una carga menor dio como resultado una eliminación superior.

6. La adición de cloruro de calcio al lisado para precipitar el ARN requirió la modificación de las condiciones usadas para la etapa UF1.

i) Fue necesaria una membrana menor, por ejemplo de 100 K para evitar las pérdidas de plásmido.

ii) También era deseable una PTM menor (34,47 kPa) para mejorar la recuperación de plásmido.

Tras la precipitación con cloruro de calcio, sólo quedaba el ARN de bajo peso molecular y éste se eliminó eficazmente mediante la etapa de ultrafiltración.

7. Se encontró que no era necesaria la recirculación para polarizar la membrana en un procedimiento sin ARNasa en presencia o ausencia de cloruro de calcio. Esto puede deberse a la presencia de grandes cantidades de ARN que rápidamente se polarizan al principio de la concentración. Sin embargo, la reducción de la carga de ácido nucleico no produjo las pérdidas de plásmido observadas cuando se añadió ARNasa durante la lisis y no se llevó a cabo la recirculación. En presencia de cloruro de calcio, se procesó un constructo de plásmido más pequeño a través de la UF1 a la mitad de la concentración normal con sólo pérdidas mínimas de plásmido a través de la membrana. Esto muestra la robustez de la etapa de UF1 en presencia de cloruro de calcio sin recirculación.

En vista de los hallazgos anteriores, el solicitante continuó para determinar si podría optimizarse adicionalmente un procedimiento usando, como un ejemplo de una sal anticaotrópica, CaCl_2 . Se estudiaron 3 regímenes alternativos y se facilitan los resultados de estas investigaciones en el ejemplo 15 a continuación:

Ejemplo 15

Los tres regímenes estudiados fueron:

Opclón 2

Lisado clarificado

UF1

Precip. con CaCl_2

Fractogel TMAE

Opclón 3

Lisado clarificado

UF1

Precip. con CaCl_2

UF2

Fractogel TMAE

Opclón 4

Lisado

Precip. con CaCl_2

Clarificación

UF1

Fractogel TMAE

Procedimientos

Lisis

Se dividieron 100 g de pasta celular bacteriana almacenada a -70°C en pequeños trozos con un mazo. Se añadieron 500 ml de tampón de resuspensión a un recipiente de resuspensión de Belco a temperatura ambiente. Se añadió la pasta celular dividida al recipiente y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente con un ajuste del agitador magnético de 8. Inmediatamente antes de la lisis, se añadieron 834 ml de NaOH al 0,96% frío a 166 ml de SDS al 6% en la sala

ES 2 287 189 T3

fría. Se transfirió la suspensión celular a un vaso de precipitados de 3 l con un agitador superior Heidolph y en la sala fría. Se añadió la mezcla de lisis a la resuspensión celular y se agitó durante 30 min. a 40 rpm. Se añadieron 500 ml de acetato de potasio 3 M al lisado y se agitó durante 30 min. a 80 rpm a 4°C.

- 5 Se centrifugó el lisado a 8000 g durante 10 min. en una centrífuga Sorvall RC5C Plus. Se filtró el sobrenadante a través de una doble capa de Miracloth, luego se hizo pasar a través de un filtro Sartopure PP2 de 5 µm seguido por uno Sartobran P de 0,45/0,2 µm. Este material se denominó el lisado clarificado.

UF1

- 10 Se vació un sistema de ultrafiltración constituido por un dispositivo Pall Filtron Centramate dotado con una membrana de canales abiertos Omega Centramate de 0,0929 m² y 300 K de la disolución de almacenamiento y se lavó con tampón de diafiltración (Tris 10 mM, pH 8,0).

- 15 Se llenó el recipiente con aproximadamente 500 ml de lisado clarificado y se conectó a una botella que contenía el resto del lisado. Se llevó a cabo la recirculación conectando la línea de permeado al recipiente. Se fijó la bomba Watson-Marlow a 155 rpm (caudal transversal de 10,76 l/min/m²), y se fijó la PTM a 34,47 kPa. La recirculación duró 20 minutos, tiempo durante el cual no se dejó que la PTM se elevara por encima de 68,95 kPa.

- 20 Se concentró el lisado clarificado hasta 75 ml conectando la línea de permeado a una botella de 2 l (permeado de concentración).

- Se inició la diafiltración conectando el recipiente a la botella de tampón de diafiltración de modo que se sustituyó el filtrado perdido por tampón nuevo a la misma velocidad. Se recogió el permeado de diafiltración en 5 botellas de 1 l. Se usaron 50 volúmenes (5 l) de tampón de diafiltración.

- 30 Al final de la diafiltración, se abrió la válvula de material retenido (sin contrapresión), se cerró la línea de permeado y se recirculó el contenido del sistema de UF durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (material recogido del material retenido).

- Se llenó el recipiente con 75 ml de tampón nuevo de diafiltración y se recirculó durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (lavado 1 de material retenido). Esto se repitió una vez más (lavado 2 de material retenido).

- 35 Se combinaron el material recogido del material retenido de UF1 y 2 lavados y se hicieron pasar a través de un filtro de 0,45 µm Gelman Science.

- Entonces se desinfectó el sistema de UF1 recirculando 500 ml de NaOH 0,5 M durante 1 hora. Se almacenó el sistema de UF1 en NaOH 0,1 M.

40 *Precipitación con cloruro de calcio*

- A 1 volumen de material retenido de UF1, se añadieron 0,12 volúmenes de CaCl₂ 2,8 M en Tris 0,1 M, pH 8,0 de modo que la concentración final de cloruro de calcio fue de 0,3 M. Se incubó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Entonces se diluyó la mezcla 2x con Tris 0,1 M, pH 8,5 para hacer la concentración final de cloruro de calcio de 0,15 M. Entonces se eliminó por filtración el precipitado haciéndolo pasar a través de 3 filtros 25CE seguido por 4 filtros 40CE y finalmente dos filtros Sartobran P de 0,45/0,2 µm.

- 50 Este material se denominó UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio.

Cromatografía de intercambio aniónico con Fractogel TMAE

- 55 Se equilibró una columna Fractogel TMAE de 20 ml (1,6 x 10 cm) con 10 volúmenes de columna de Tris 50 mM, pH 8,5 a un caudal de 5,1 ml/min (152 cm/h).

- Se cargó la columna con aproximadamente 2,5 mg de plásmido por ml de columna con UF1 diluido tras la precipitación con cloruro de calcio. Se lavó la columna con 2 volúmenes de columna de Tris 50 mM, pH 8,5 seguido por 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M pH 8,5.

Se eluyó el plásmido con un gradiente de 10 volúmenes de columna de NaCl 0,54 a 3 M en Tris 50 mM, pH 8,5.

Se regeneró la columna con 4 volúmenes de columna de Tris 50 mM + NaCl 3 M, pH 8,5.

- 65 Se volvió a equilibrar la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM, pH 8,5.

ES 2 287 189 T3

UF2

Se vació un sistema de ultrafiltración constituido por un sistema a escala de laboratorio de Millipore dotado con una membrana de canales abiertos Omega Centramate de 0,0929 m² y 100 K de disolución de almacenamiento y se lavó con tampón de diafiltración (Tris 10 mM, pH 8,0).

Se llenó el recipiente con material de UF1 no diluido tras cloruro de calcio. Se llevó a cabo la recirculación conectando la línea de permeado al recipiente. Se fijó la bomba en 4 (caudal transversal de 10,76 l/min/m²), y se fijó la PTM a 34,47 kPa. La recirculación duró 20 minutos, tiempo durante el cual no se dejó que la PTM se elevara por encima de 68,95 kPa.

La UF1 tras cloruro de calcio se concentró hasta 35 ml conectando la línea de permeado a una botella de 500 ml (permeado de concentración).

Se inició la diafiltración conectando el recipiente a una botella de tampón Tris 10 mM, pH 8,0 de modo que se sustituyó el filtrado perdido por tampón nuevo a la misma velocidad. La diafiltración fue frente a 40 volúmenes de Tris 10 mM pH 8,0 seguido por 10 volúmenes de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M, pH 8,5. Se recogió el permeado de diafiltración en 4 botellas de 500 ml.

Al final de la diafiltración, se abrió la válvula de material retenido (sin contrapresión), se cerró la línea de permeado y se recirculó el contenido del sistema de UF durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF2 abriendo la línea de material retenido (material recogido del material retenido).

Se llenó el recipiente con 50 ml de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M pH 8,5 y se recirculó durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (lavado 1 de material retenido). Esto se repitió una vez más (lavado 2 de material retenido).

Se combinaron el material recogido del material retenido de UF1 y 2 lavados y se hicieron pasar a través de un filtro Sterivex GV.

Entonces se desinfectó el sistema de UF1 recirculando 100 ml de NaOH 0,5 M durante 1 hora. Se almacenó el sistema de UF1 en NaOH 0,1 M.

Opción 2 de procedimiento

Se llevó a cabo la lisis alcalina como anteriormente, seguido por UF1 como anteriormente, la precipitación con cloruro de calcio como anteriormente. Se cargaron 237 ml de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio en la columna de Fractogel TMAE. Se recogieron 240 ml de ruptura y lavado (pico 1) así como 75 ml de eluato (pico 2).

Se produjeron 280 ml de material retenido de UF1 pero sólo se recuperaron 210 ml tras la filtración. Parte del material se perdió sobre los filtros y parte se perdió debido a fugas.

Se produjeron 482 ml de material retenido diluido de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio. Sólo se recuperaron 400 ml tras la filtración.

Opción 3 de procedimiento

Esta opción es similar a la 2 en que se llevó a cabo la lisis alcalina seguido por UF1 y precipitación con cloruro de calcio excepto porque el material retenido de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio no se diluyó.

Se introdujo una etapa de ultrafiltración (UF2) para eliminar las sales de cloruro de calcio que de otra forma interferirían con la columna de cromatografía.

Se cargaron 90 ml de material retenido de UF2 en una columna Fractogel TMAE de 20 ml como anteriormente excepto porque el gradiente de 10 volúmenes de columna era de NaCl 0,54-1 M en Tris 50 mM, pH 8,5.

Se produjeron 315 ml de material retenido de UF1 pero sólo se recuperaron 295 ml tras la filtración.

Se produjeron 330 ml de UF1 tras la precipitación con cloruro de calcio pero sólo se recuperaron 320 ml tras la filtración.

Opción 4 de procedimiento

Lisis

La etapa de lisis era como se describió anteriormente excepto porque no se centrifugó tal como se describió previamente. En su lugar, el lisado se sometió a la precipitación con cloruro de calcio y eliminación de restos celulares tal como se expone a continuación:

ES 2 287 189 T3

Precipitación con cloruro de calcio y eliminación de restos celulares

Se centrifugó una muestra de 20 ml de lisado en una centrífuga MSE Mistral 2000 a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se denominó el lisado clarificado.

A 2100 ml de lisado, se añadieron 1960 ml de disolución de CaCl_2 2 M con agitación y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se vertió la mezcla sobre un soporte Plastok dotado con un filtro de malla de tamaño de poro de 200 μm , 350 mm para eliminar los restos celulares y se recogió el filtrado en un vaso precipitados de 5 l con gravedad. Se hizo pasar entonces el filtrado a través de un cartucho de filtro de profundidad Millipore CE 15 seguido por un filtro Sartobran P de 0,45/0,2 μm . El filtrado se denominó el lisado tras la precipitación con cloruro de calcio. (vol = 3350 ml).

UF1

Se vació un sistema de ultrafiltración constituido por un dispositivo Pall Filtron Centramate dotado con una membrana de canales abiertos Omega Centramate de 0,0929 m^2 y 100 K de la disolución de almacenamiento y se lavó con tampón de diafiltración Tris 10 mM, pH 8,0.

Se llenó el recipiente con aproximadamente 500 ml de lisado tras cloruro de calcio y se conectó a una botella que contenía el resto del lisado. Se llevó a cabo la recirculación conectando la línea de permeado al recipiente. Se fijó la bomba Watson-Marlow a 155 rpm (caudal transversal de 10,76 l/min/ m^2), y se fijó la PTM a 34,47 kPa. La recirculación duró 20 minutos, tiempo durante el cual no se dejó que la PTM se elevara por encima de 68,95 kPa.

Se concentró el lisado clarificado hasta 75 ml conectando la línea de permeado a una botella de 2 l (permeado de concentración).

Se inició la diafiltración conectando el recipiente a una botella de tampón Tris 10 mM, pH 8,0 de modo que se sustituyó el filtrado perdido por tampón nuevo a la misma velocidad. Se llevó a cabo la diafiltración con 35 volúmenes de Tris 10 mM pH 8,0 seguido por 15 volúmenes de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M, pH 8,5. Se recogieron 5 muestras de 1 l de permeado de diafiltración.

Al final de la diafiltración, se abrió la válvula de material retenido (sin contrapresión), se cerró la línea de permeado y se recirculó el contenido del sistema de UF durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (material recogido del material retenido).

Se llenó el recipiente con 100 ml de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M, pH 8,5 y se recirculó durante 30 minutos. Se recuperó el concentrado sometido a diafiltración de UF1 abriendo la línea de material retenido (lavado 1 de material retenido). Esto se repitió una vez más (lavado 2 de material retenido).

Se combinaron el material recogido del material retenido de UF1 y 2 lavados (vol = 290 ml) y se hicieron pasar a través de un filtro de 0,45 μm Gelman Science (vol final = 270 ml).

Cromatografía de intercambio aniónico con Fractogel TMAE

Ésta fue tal como se describió previamente excepto porque el gradiente de 10 volúmenes de columna fue de NaCl 0,54-1 M en Tris 50 mM, pH 8,5. Se cargaron 125 ml de material retenido de UF1 en la columna. Se recogieron 135 ml de ruptura y lavado (pico 1) así como 135 ml de eluato (pico 2). Se sometieron las muestras a análisis tal como se expone a continuación:

Análisis de muestras

HPLC-intercambio iónico

Se determinó la concentración de plásmido mediante HPLC-intercambio aniónico en una columna Dionex DNA-Pac PA-100 de 4 x 250 mm siguiendo el protocolo habitual. Se digirieron muestras con ARNasa para eliminar cualquier interferencia de ARN: se añadieron 2 μl de ARNasa de páncreas bovino a 100 μl de muestra.

Se determinó la topología del plásmido mediante HPLC-intercambio aniónico en una columna TSK DNA-NPR de 4,6 mm x 7,5 cm, 2,5 μm siguiendo el protocolo habitual.

Ensayo de ARN

Se determinó la concentración de ARN mediante BAD usando un ensayo basado en HPLC en fase inversa.

Se determinó la proporción de plásmido/ARN mediante HPLC-exclusión por tamaños en una columna TSK G-DNA-PW de 7,8 mm x 30 cm, 10 μm acoplada a una columna TSK G3000 SWXL de 7,8 mm x 30 cm, 5 μm . La fase

ES 2 287 189 T3

móvil era Tris 0,1 M + NaCl 0,3 M + EDTA 1 mM, pH 7,5. El caudal era de 0,3 ml/min. La inyección de la muestra fue de 100 μ l.

Ensayo de proteínas

- 5 Se determinó la concentración de proteínas usando el kit de reactivo de ensayo de proteínas Micro BCA de Pierce. Se representó gráficamente una curva patrón usando disolución de BSA en el intervalo de 0,625-20 μ g/ml. Se diluyeron de manera adecuada las muestras con PBS para que estuvieran dentro del intervalo de los patrones de BSA.

10 *Ensayo de endotoxinas*

Se determinó la concentración de endotoxinas mediante microbiología farmacéutica usando un ensayo LAL habitual.

15 *Ensayo de ADN genómico*

Se determinó la concentración de ADN genómico mediante BAD usando un ensayo de PCR cuantitativo.

Desalación

- 20 Se desalaron las muestras que contenían altos niveles de sal de cloruro de calcio (lisado tras la precipitación con cloruro de calcio, permeado de concentración de UF1, permeado de diafiltración de UF1) antes del análisis. No se desalaron las muestras de los procedimientos 2 y 3 que contenían sal de cloruro de calcio porque la baja concentración no estaba interfiriendo en los ensayos.

- 25 Se inyectaron 2 ml de muestra en una columna de desalación HiTrap de 2 x 5 ml en serie equilibrada con Tris 50 mM, pH 8,5 a un caudal de 5 ml/min y se recogió un pico de desalación de 4,5 ml de absorbancia a 254 nm.

Resultados y discusión

- 30 Los volúmenes usados para todos los cálculos se corrigieron para las pérdidas que se produjeron durante la filtración. Esto permitió una mejor comparación entre cada opción.

Selección de la opción de procedimiento: opción 2

- 35 Se sometió el lisado clarificado a través de una etapa de UF1 modificada para maximizar la eliminación de ARN. Esto incluyó la diafiltración con 50 volúmenes de un tampón de fuerza iónica baja y el uso de una PTM inicial de 34,47 kPa. La carga de plásmido sobre la membrana de PES de 300 K, de 0,0929 m², fue de 1,468 g de plásmido por m². Entonces se precipitó el ARN que quedaba con cloruro de calcio 0,3 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se diluyó la mezcla 1 en 1 hasta una concentración de sal de cloruro de calcio de 0,15 M y se eliminó el precipitado mediante filtración. Entonces se cargó el filtrado directamente en una columna de intercambio aniónico Fractogel TMAE. Fue necesaria la dilución para evitar que la sal de cloruro de calcio interfiriera en la unión del plásmido a la columna. Se cargó la columna a 2,47 mg de plásmido por ml de columna, se lavó con Tris 50 mM para evitar la elución temprana del plásmido seguido por Tris 50 mM + NaCl 0,54 M para eluir el ARN que quedaba. Se eluyó el plásmido con un gradiente salino.

La recuperación de plásmido global fue alta del 89,2% (véase la tabla 8 a continuación).

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

TABLA 8

	Vol (ml)	Concentración de plásmido (µg/ml)	Recuperación por etapas	Recuperación global
Lisado	1800	75,8	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1700	0	0	0
Permeado de diafiltración de UF1	5000	0	0	0
Material retenido de UF1	280	381,8	78,3%	78,3%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	480	208,7	124,9%	97,9%
Pico 1 de TMAE	240	0	0	0
Pico 2 de TMAE	75	601,1	91,1%	89,2%

La etapa UF1 dio una recuperación del 78,3% mientras que la recuperación de la etapa de precipitación con cloruro de calcio fue superior al 100%. La recuperación a través de la etapa de cromatografía fue del 91,1%.

La eliminación de ARN global fue del 99,84% (véase la tabla 9 a continuación).

TABLA 9

	Vol (ml)	Concentración de ARN (µg/ml)	Recuperación por etapas	Recuperación global
Lisado	1800	1579,1	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1700	123,2	7,4%	NA

Permeado de diafiltración de UF1	5000	354,8	62,0%	NA
Material retenido de UF1	280	2552,4	74,9%	74,9%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	480	6,25	99,44%	99,86%
Pico 1 de TMAE	240	18,21	> 100%	NA
Pico 2 de TMAE	75	21,95	0%	99,84%

La etapa UF1 mejorada dio como resultado una eliminación de ARN del 74,9%. El hecho de que la mayor parte del ARN se eliminó durante la diafiltración y que el ARN que quedaba era esencialmente de alto peso molecular sugiere que el ARN participó inicialmente en la capa de gel pero se “resolubilizó” entonces por el tampón de diafiltración de fuerza iónica baja y se dejó que pasara a través de la membrana debido a su pequeño tamaño. Entonces se precipitó el 99,44% del ARN recuperado en el material retenido de UF1 mediante tratamiento con cloruro de calcio. Se conoce bien que el cloruro de calcio es un agente precipitante particularmente potente de ARN de alto peso molecular. Sin embargo, la columna de intercambio aniónico no proporcionó más eliminación de ARN aunque se detectó ARN en la ruptura de la columna: esto parece ser una contradicción en el resultado del ensayo de ARN.

El análisis mediante HPLC-exclusión por tamaños muestra el efecto del tratamiento con cloruro de calcio: la proporción de plásmido/ARN aumentó desde el 16,11% en el material retenido de UF1 hasta el 89,76% tras la precipitación con cloruro de calcio (véase la tabla 10 a continuación).

TABLA 10

	%de plásmido	% de ARN
Material retenido de UF1	16,11 %	83,89%
UF1 tras la precipitación con CaCl ₂	89,76%	10,24%
Pico 1 de TMAE	0%	100,0%
Pico 2 de TMAE	98,95%	1,05%

Al final del procedimiento, el contenido en ARN fue sólo del 1,05%.

El análisis de la topología de plásmido mediante HPLC-intercambio iónico muestra que el procedimiento no afectó a los niveles de isoformas del plásmido: durante todo el procedimiento estaban superenrollados aproximadamente el 96% de los plásmidos siendo multiméricos aproximadamente el 3,4% (véase la tabla 11 a continuación).

TABLA 11

	% de círculo abierto	% de superenrollado	% de multímeros
Material retenido de UF1	0,77%	95,76%	3,47%
UF1 tras la precipitación con CaCl ₂	0%	96,69%	3,31 %
Pico 2 de TMAE	0%	96,57%	3,43%

La etapa UF1 eliminó el 99,87% de proteínas (véase la tabla 12 a continuación)

TABLA 12

	Vol (ml)	Concentración de proteína (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	5768,6	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1700	5565,5	91,1%	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	277,8	13,3%	NA
Material retenido de UF1	280	52,6	99,87%	99,87%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	480	NA*	NA	NA
Pico 1 de TMAE	240	NA	NA	NA
Pico 2 de TMAE	75	0	100,0%	100,0%
* se formó un precipitado turbio debido a la presencia de sal de cloruro de calcio				

Las proteínas son lo suficientemente pequeñas para eliminarse de manera eficaz a través de una membrana de 300 K. Al final del procedimiento, no pudieron detectarse proteínas en el material de eluato de Fractogel TMAE.

La eliminación global de endotoxinas fue alta de más del 99,94% (véase la tabla 13 a continuación).

TABLA 13

	Vol (ml)	Concentración de endotoxina (EU/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	102,0	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1700	< 5,0	< 4,6%	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	44,0	119,8%	NA
Material retenido de UF1	280	540,5	17,6%	17,6%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	480	< 25,0	> 89,4%	> 91,3%
Pico 1 de TMAE	240	0,65	NA	NA
Pico 2 de TMAE	75	< 0,50	NA	> 99,94%

La etapa de cloruro de calcio dio una eliminación de endotoxina alta: más del 89,4%. La etapa de intercambio aniónico también proporcionó una eliminación de endotoxina aunque no pudo calcularse la cifra exacta. La etapa UF1 no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de endotoxinas: sólo se eliminó en esta etapa el 17,6%.

Se redujeron los niveles de ADN genómico mediante una combinación de etapas: una reducción del 55% para la etapa UF1, un 77,6% para la etapa con cloruro de calcio y un 66,1% para la etapa de intercambio aniónico (véase la tabla 14 a continuación que muestra el efecto de la concentración de ácido nucleico en la carga sobre el rendimiento de UF1 sin recirculación en presencia de cloruro de calcio).

TABLA 14

Carga de UF1 (g de plásmido/m²)	Concentración de plásmido (µg/ml)	Recuperación de plásmido			Contenido en ARN (HPLC- SEC)
		Permeado de concentración	Permeado de diafiltración	Material retenido de UF1	
1,362*	69,9	0,2%	0	108,8%	4,64%
1,177**	60,7	1,3%	0	90,5%	0
1,395**	36,0	5,9%	7,2%	82,7%	1,93%
Construido de plásmido: *7,7 kpb, **5,9 kpb					

La eliminación global fue del 96,6%. La etapa con cloruro de calcio no tuvo el impacto esperado probablemente debido a la baja concentración de 0,3 M usada.

ES 2 287 189 T3

Selección de la opción de procedimiento: opción 3

La opción 3 fue muy similar a la 2 excepto que se introdujo una segunda etapa de UF para eliminar las sales de cloruro de calcio antes de la carga en la columna de intercambio aniónico. La membrana usada para la etapa UF2 tenía un corte de peso molecular inferior de 100 K para evitar pérdidas de plásmido en presencia de sal de cloruro de calcio. Se usó un tampón de fuerza iónica baja al comienzo de la diafiltración para promover la eliminación de ARN seguido por Tris 50 mM + NaCl 0,54 M para intercambiar el tampón antes de la carga en la columna de cromatografía. Se seleccionó una PTM inicialmente baja de 34,47 kPa para mejorar la recuperación de plásmido. La carga de membrana fue de 9,785 g de plásmido por m² de membrana.

Se eliminó la mayor parte del ARN que quedaba durante la concentración y la diafiltración temprana. La etapa de intercambio aniónico se llevó a cabo tal como para la opción 2.

La recuperación de plásmido a través de la etapa UF1 fue del 74,5%, después superior al 100% a través de la etapa de precipitación con cloruro de calcio y del 71,1% para la etapa UF2 (véase la tabla 15 a continuación).

TABLA 15

	Vol (ml)	Concentración de plásmido (µg/ml)	Recuperación por etapas	Recuperación global
Lisado	1800	71,2	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1730	0	0	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	0	0	NA
Material retenido de UF1	315	303,0	74,5%	74,5%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	330	284,3	105,0%	78,2%
Permeado de concentración de UF2	260	2,0	0,6%	NA
Permeado de diafiltración de UF2	1000	0,77	0,8%	NA
Material retenido de UF2	105	635,2	71,1%	57,3%
Pico 1 de TMAE	105	201,6	37,0%	21,2%
Pico 2 de TMAE	90	305,8	41,3%	27,6%

Se detectó un pico de absorbancia en la ruptura de la columna Fractogel TMAE: se perdió el 37% del plásmido en la ruptura con el 41,3% recuperado en el eluato. La recuperación global de las fracciones combinadas fue del 48,8%. Aunque la carga de la columna fue de 2,86 mg de plásmido por ml de columna, que es ligeramente superior que en la opción 2, no es seguro que esto pueda explicar las fuertes pérdidas de plásmido observadas. El tampón de carga también fue diferente: se cargó la columna en cloruro de calcio 0,15 M y Tris 0,1 M en la opción 2 comparado con Tris 50 mM + NaCl 0,54 M para la opción 3, de modo que la fuerza iónica del tampón de carga pudo haber sido demasiado alta.

La eliminación global de ARN fue muy alta, del 99,985% (véase la tabla 16 a continuación).

TABLA 16

	Vol (ml)	Concentración de ARN ($\mu\text{g/ml}$)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	1749,5	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1730	117,2	6,4%	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	357,0	56,7%	NA
Material retenido de UF1	315	2281,9	77,2%	77,2%
UF1 tras la precipitación con CaCl_2	330	25,0	98,8%	99,72%
Permeado de concentración de UF2	260	185,4	> 100,0%	NA
Permeado de diafiltración de UF2	1000	10,74	> 100,0%	NA
Material retenido de UF2	105	19,12	74,9%	99,93%
Pico 1 de TMAE	105	5,84	35,6%	NA
Pico 2 de TMAE	90	4,20	78,0%	99,985%

La eliminación de ARN fue del 77,2% para la etapa UF1, del 98,8% para la etapa de precipitación con cloruro de calcio, del 74,9% para la etapa UF2 y del 78% para la columna de cromatografía. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en el procedimiento, 2 excepto para la eliminación añadida proporcionada por la etapa UF2.

El análisis mediante HPLC-exclusión por tamaños muestra un aumento en la proporción de plásmido/ARN de desde el 17,02% en el material retenido de UF1 hasta el 92,25% tras la precipitación con cloruro de calcio, del 95,24% en el material retenido de UF2 y el 98,91% tras la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (véase la tabla 17).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 17

	% de plásmido	%de ARN
Material retenido de UF1	17,02%	82,98%
UF1 tras la precipitación con CaCl_2	92,25%	7,75%
Permeado de concentración de UF2	22,67%	77,33%
Permeado de diafiltración de UF2	4,93%	95,07%
Material retenido de UF2	95,24%	4,76%
Pico 1 de TMAE	92,01%	7,99%
Pico 2 de TMAE	98,91%	1,09%

El análisis de la topología de plásmidos mediante HPLC-intercambio iónico muestra que están superenrollados aproximadamente el 96% de plásmidos y el 3,5% son multiméricos en la fase de material retenido de UF1 y tras la precipitación con cloruro de calcio (véase la tabla 18 a continuación).

TABLA 18

	% de círculo abierto	% de superenrollado	% de multímeros
Material retenido de UF1	0%	96,21%	3,79%
UF1 tras la precipitación con CaCl_2	0%	96,49%	3,51%
Material retenido de UF2	22,73%	75,70%	1,57%
Pico 2 de TMAE	20,93%	78,54%	0,53%

Tras la etapa UF2, el 22,73% de plásmidos son circulares abiertos estando superenrollados sólo el 75,5%. Es posible que la bomba en el sistema UF a escala de laboratorio usado para la etapa UF2 fuera inadecuado y cortara el plásmido dando como resultado altos niveles de círculo abierto. A partir de experiencias previas en esta fase, no se cree que la etapa UF2 sea inadecuada por sí misma. Este hallazgo, sin embargo, parece explicar los altos niveles de plásmido en la ruptura de la etapa de cromatografía: es bastante probable que el tampón de lavado de Tris 50 mM + NaCl 0,54 M se diseñara para eluir plásmidos circulares abiertos. En este tampón, el plásmido circular abierto cargado en la columna evitaría entonces la unión.

ES 2 287 189 T3

La eliminación de proteínas en la etapa UF1 fue del 99,86% dando como resultado una eliminación global del 99,997% (véase la tabla 19 a continuación).

TABLA 19

	Vol (ml)	Concentración de proteína (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	5881,5	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1730	5373,6	87,8%	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	277,8	13,1%	NA
Material retenido de UF1	315	45,9	99,86%	99,86%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	330	ND*	ND	ND
Material retenido de UF2	105	3,7	ND	99,996%
Pico 2 de TMAE	90	2,94	20,5%	99,997%
*se formó un precipitado turbio debido a la presencia de sal de cloruro de sodio				

La eliminación de endotoxinas fue sólo del 27,9% en la etapa UF1 pero fue del 90% a través de la etapa de precipitación con cloruro de calcio (véase la tabla 20 a continuación).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 20

	Vol (ml)	Concentración de endotoxina (UE/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	95,40	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1730	< 5,0	< 5,0%	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	17,53	51,0%	NA
Material retenido de UF1	315	392,9	27,9%	27,9%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	330	35,07	90,0%	92,8%
Permeado de concentración de UF2	260	< 5,0	< 11,2%	NA
Permeado de diafiltración de UF2	1000	0,15	1,3%	NA
Material retenido de UF2	105	69,62	36,8%	95,3%
Pico 1 de TMAE	105	1,96	3,3%	NA
Pico 2 de TMAE	90	< 0,5	> 99,3%	> 99,967%

La etapa UF2 también dio una baja eliminación del 36,8% confirmando que la ultrafiltración no es una etapa de eliminación de endotoxinas significativa. Sin embargo, la etapa de cromatografía en Fractogel TMAE eliminó más del 99,3% de la endotoxina que queda llevando la eliminación global a más del 99,97%.

La eliminación del ADN genómico fue esencialmente el resultado de la etapa de precipitación con cloruro de calcio: se observó una eliminación del 94% (véase la tabla 21).

TABLA 21

	Vol (ml)	Concentración de ADNg (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	1,74	NA	NA
Permeado de concentración de UF1	1730	0,01	0,6%	NA
Permeado de diafiltración de UF1	5000	0,14	22,3%	NA
Material retenido de UF1	315	12,64	0%	0%
UF1 tras la precipitación con CaCl₂	330	0,68	94,0%	92,4%
Permeado de concentración de UF2	260	0,01	1,2%	NA
Permeado de diafiltración de UF2	1000	0,004	1,8%	NA
Material retenido de UF2	105	0,57	72,5%	97,9%
Pico 1 de TMAE	105	0,38	77,8%	NA
Pico 2 de TMAE	90	0,23	59,6%	99,2%

Las otras cifras de eliminación por etapas fueron: del 0% para la etapa UF1, del 72,5% para la etapa UF2 y del 59,6% para la etapa de cromatografía. La eliminación del ADN genómico global fue del 99,2%.

Selección de la opción de procedimiento: opción 4

La etapa de eliminación de los restos celulares tras la lisis alcalina se combinó con la etapa de eliminación de precipitado con cloruro de calcio. Se añadió la disolución madre de cloruro de calcio a 2 M al lisado tras la neutralización con acetato de potasio, de modo que la concentración de cloruro de calcio final fue de 1 M. Entonces se eliminaron los restos celulares mediante un filtro con tamiz con poros de 200 µm, después se separaron por filtración las partículas más pequeñas con un filtro de profundidad. Se llevó a cabo la etapa UF1 sobre una membrana de PES 0,0929 m², de 100 K para evitar pérdidas de plásmido en presencia de sal de cloruro de calcio. Se usó un tampón de fuerza iónica baja al inicio de la diafiltración para maximizar la eliminación de ARN seguido por Tris 50 mM + NaCl 0,54 M para intercambiar el tampón antes de la carga en la columna de intercambio aniónico. Se redujo la PTM inicial hasta 34,47 kPa para mejorar la recuperación de plásmido. La carga de la membrana fue de 2,583 g de plásmido por m² de membrana. Se realizó la cromatografía de intercambio aniónico en Fractogel TMAE como anteriormente, cargando a 2,83 mg de plásmido por ml de columna.

La recuperación del plásmido a través de la etapa con cloruro de calcio fue superior al 100%, después del 50,8% a través de la etapa UF1 (véase la tabla 22).

TABLA 22

	Vol (ml)	Concentración de plásmido (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	97,5	NA	NA
Lisado tras la precipitación con CaCl₂*	3350	71,8	137,0%	137,0%
Permeado de concentración de UF1*	3350	0	0	NA
Permeado de diafiltración de UF1*	5000	0,16	0,3%	NA
Material retenido de UF1	290	452,4	50,8%	74,8%
Pico 1 de TMAE	135	66,8	15,9%	11,9%
Pico 2 de TMAE	135	341,4	81,5%	60,9%
* muestra desalada				

Se perdió el 15,9% del plásmido cargado en la ruptura mientras que se eluyó el 81,5%: la columna pudo haberse sobrecargado a 2,83 mg/ml. La recuperación de plásmido global de las 2 fracciones combinadas fue del 72,8%.

La eliminación global de ARN fue del 99,9% (véase la tabla 23).

TABLA 23

	Vol (ml)	Concentración de ARN (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	1968,5	NA	NA
Lisado tras precipitación con CaCl₂ *	3350	162,6	84,6%	84,6%
Permeado de concentración de UF1*	3350	126,7	77,9%	NA
Permeado de diafiltración de UF1*	5000	84,5	77,6%	NA
Material retenido de UF1	290	42,7	97,7%	99,65%
Pico 1 de TMAE	135	8,60	21,8%	NA
Pico 2 de TMAE	135	10,98	72,2%	99,90%
* muestras desaladas				

ES 2 287 189 T3

La etapa de precipitación con cloruro de calcio representó el 84,6% del ARN eliminado, esencialmente ARN de alto peso molecular. Entonces se eliminó fácilmente el ARN de bajo peso molecular mediante la etapa UF1 (eliminación del 97,7%). La eliminación del ARN a través de la columna de cromatografía fue del 72,2%.

- 5 El análisis mediante HPLC-exclusión por tamaños mostró un nivel de plásmido del 97,7% en el material retenido de UF1, aumentando hasta el 98,62% en el eluato de Fractogel TMAE (véase la tabla 24)

TABLA 24

	% de plásmido	% de ARN
Material retenido de UF1	97,70%	2,30%
Pico 1 de TMAE	97,07%	2,93%
Pico 2 de TMAE	98,62%	1,38%

- 25 El análisis de la topología del plásmido mediante HPLC-intercambio iónico mostró que el lisado tras la precipitación con cloruro de calcio estaba constituido por el 84,44% de plásmido superenrollado y por el 14% de circular abierto (véase la tabla 25).

TABLA 25

	% de circulo abierto	% de superenrollado	% de multímeros
Lisado tras la precipitación con CaCl ₂	14,0%	84,44%	1,56%
Material retenido de UF1	3,62%	93,34%	3,04%
Pico 2 de TMAE	2,16%	94,76%	3,08%

La proporción de superenrollado aumentó hasta el 94,76% en el eluato de Fractogel TMAE con el 2,16% de círculo abierto y el 3,08% de multímeros.

- 55 No pudieron detectarse proteínas en el eluato de Fractogel TMAE. La etapa de precipitación con cloruro de calcio eliminó el 95,8% de las proteínas mientras que la etapa UF1 eliminó el 99,7% del resto (véase la tabla 26 a continuación).

TABLA 26

	Vol (ml)	Concentración de proteína (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	6107,2	NA	NA
Lisado tras la precipitación con CaCl₂*	3350	138,6	95,8%	95,8%
Permeado de concentración de UF1*	3350	117,4	84,7%	NA
Permeado de diafiltración de UF1*	5000	0,52	0,6%	NA
Material retenido de UF1	290	5,2	99,7%	99,99%
Pico 2 de TMAE	135	0	100,0%	100,0%
* muestras desaladas				

La eliminación global de endotoxinas fue superior al 99,5% (véase la tabla 27).

TABLA 27

	Vol (ml)	Concentración de endotoxina (EU/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	18,84	NA	NA
Lisado tras la precipitación con CaCl₂*	3350	< 11,05	> 0%	> 0%
Permeado de concentración de UF1*	3350	< 11,05	< 100,0%	NA
Permeado de diafiltración de UF1*	5000	< 1,1	< 14,9%	NA
Material retenido de UF1	290	< 50,0	> 60,8%	> 57,2%
Pico 1 de TMAE	135	2,43	< 5,2%	NA
Pico 2 de TMAE	135	< 0,5	> 98,9%	> 99,5%
* muestra desalada				

ES 2 287 189 T3

No fue posible determinar qué etapa contribuyó a la eliminación a partir de los resultados del ensayo aunque la eliminación en la columna Fractogel TMAE fue superior al 98,9%.

La eliminación de ADN genómico global fue del 99,8% (véase la tabla 28 a continuación).

TABLA 28

	Vol (ml)	Concentración de ADNg (µg/ml)	Eliminación por etapas	Eliminación global
Lisado	1800	2.11	NA	NA
Lisado tras la precipitación con CaCl₂*	3350	0,02	98,0%	98,0%
Permeado de concentración de UF1*	3350	0,002	0,2%	NA
Permeado de diafiltración de UF1*	5000	0,005	0,7%	NA
Material retenido de UF1	290	0,006	74,0%	99,5%
Pico 1 de TMAE	135	0,02	16,7%	NA
Pico 2 de TMAE	135	0,03	75,0%	99,8%
* muestra desalada				

Se eliminó el 98% del ADN genómico en la etapa de precipitación con cloruro de calcio, el 74% mediante la etapa UF1 y el 75% mediante la etapa de cromatografía.

Los beneficios de los procedimientos alternativos pueden compararse de la manera más simple en la tabla 29 a continuación.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 29

	Opción 2	Opción 3	Opción 4	Espec. de producto
Recuperación del plásmido	89,2%	48,8%*	72,8%*	
Eliminación de ARN (RP-HPLC)	99,84%	99,985%	99-90%	
Proporción p/p de ARN	3,65%	1,37%	3,13%	< 5%
% de plásmido (HPLC-SEC)	98,95%	98,91%	98,62%	
Topología de plásmido (% de superenrollado)	96,57%	78,54%	94,76%	
Eliminación de proteínas	100,0%	99,997%	100,0%	
Proporción p/p de proteínas	0%	0,96%	0%	< 1%
Eliminación de endotoxinas	> 99,94%	> 99,967%	> 99,54%	
Endotoxina UE/mg	< 0,83 UE/mg	< 1,63 UE/mg	< 1,54 UE/mg	< 100 UE/mg
Eliminación de ADNg	96,6%	99,2%	99,8%	
Proporción p/p de ADNg	0,45%	0,07%	0,02%	<5%
* pico 1 + pico 2				

La recuperación global de plásmido fue superior con las opciones 2 (89,2%) y 4 (72,8% para los picos combinados) que con la opción 3 (48,8% para los picos combinados). Ninguna etapa individual dio recuperaciones de plásmido bajas. La recuperación global de plásmido baja para la opción 3 es esencialmente debido a la otra etapa de UF introducida.

La eliminación de ARN fue alta con las tres opciones (99,84-99,985%). La opción 3 dio como resultado un contenido en ARN del 1,37% en peso por peso del plásmido. Sin embargo las opciones 2 y 4 dieron contenidos en ARN del 3,65 y del 3,13% respectivamente. Tanto las etapas de ultrafiltración como con cloruro de calcio se realizaron de manera eficaz, combinando bien, de hecho, con la etapa de ultrafiltración que elimina ARN de bajo peso molecular y con cloruro de calcio que precipita ARN de alto peso molecular. Las opciones 3 y 4 dieron niveles adecuados de plásmido superenrollado al 96,6 y al 94,8%, respectivamente. Sin embargo, la opción 3 generó altas proporciones de plásmido circular abierto dando como resultado sólo el 78,5% de plásmido superenrollado. Esto fue debido al sistema de ultrafiltración usado para UF2 y no debe eliminarse la opción.

La eliminación de proteína fue alta para las 3 opciones con niveles no detectables para las opciones 3 y 4. Una proporción de proteínas del 0,96% en peso por peso para la opción 3 puede deberse a la tendencia del ensayo BCA de generar falsos resultados debido a la contaminación más que la representación precisa de los niveles de proteínas. No existen razones para esperar niveles de proteínas superiores en la opción 3, en la que hay otra etapa de purificación

comparada con la opción 2. Tanto la etapa UF1 como la etapa con cloruro de calcio son muy eficaces en la eliminación de impurezas de proteínas.

5 La eliminación de endotoxinas fue muy alta con niveles por debajo del límite de detección del ensayo en el material final para todas las 3 opciones.

La etapa de precipitación con cloruro de calcio y la etapa de intercambio aniónico dieron ambas alta eliminación de endotoxinas.

10 Finalmente, los niveles de ADN genómico fueron muy bajos, especialmente para las opciones 3 y 4. La alta eliminación de ADN genómico parece estar relacionada con los altos niveles de cloruro de calcio.

Tras evaluar todos los datos cuidadosamente, parece que no hay razones para eliminar ninguna de las 3 opciones basándose en la eliminación de impurezas puesto que todas de las 3 opciones dieron buena eliminación de impurezas.
15 La opción 3 dio la recuperación del plásmido más baja pero también la mejor eliminación de ARN. Se prefirió la opción 4 porque contenía menos etapas de purificación y sería la opción más fácil para ampliar a escala.

Conclusión

20 Las tres opciones difirieron sólo en si se introdujo la etapa de precipitación con cloruro de calcio (después de la lisis o bien después de la etapa UF1) o si requirió una segunda etapa de ultrafiltración para eliminar la sal de cloruro de calcio antes de la cromatografía. Los resultados mostraron que todas de las 3 opciones fueron viables dando más del 50% de recuperación de plásmido y buena eliminación de impurezas.

25 Se mejoró la eliminación de ARN cargando la columna de cromatografía a un nivel reducido de 1,2 mg de plásmido/ml y usando una elución en gradiente. De hecho, con el gradiente de elución y corte de pico correctos, los niveles de ARN final fueron tan bajos que estaban por debajo del límite de detección del ensayo.

30 El cloruro de calcio tuvo un efecto muy significativo en la reducción de los niveles de ARN, proteínas, endotoxinas y ADN genómico. Como resultado, los niveles finales de endotoxinas y ADN genómico son inferiores a los del procedimiento que contiene ARNasa.

35 La solicitud de la que esta descripción y reivindicaciones forman parte puede usarse como base de prioridad con respecto a cualquier solicitud posterior. Las reivindicaciones de tal solicitud posterior pueden referirse a cualquier característica o combinación de características descritas en el presente documento. Pueden tomar la forma de reivindicaciones de producto, composición, procedimiento o uso y pueden incluir, a modo de ejemplo y sin limitación, una o más de las siguientes reivindicaciones.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de separación de ADN extracromosómico de ARN sin digerir en primer lugar el ARN, comprendiendo dicho procedimiento:
 - i) lisar células que comprenden ADN extracromosómico para formar un lisado; y
 - ii) separar una cantidad sustancial del ARN presente en el lisado del ADN extracromosómico usando una combinación de precipitación con cloruro de calcio, clarificación y ultrafiltración de flujo tangencial.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ADN obtenido comprende menos del 50% en peso del ARN presente en el lisado.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el ADN obtenido comprende menos del 10% en peso del ARN presente en el lisado.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el ADN obtenido comprende menos del 5% en peso del ARN presente en el lisado.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el ADN obtenido comprende menos del 2% en peso del ARN presente en el lisado.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el ADN obtenido comprende menos del 1% en peso del ARN presente en el lisado.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de precipitación con cloruro de calcio precede a la etapa de ultrafiltración.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de precipitación con cloruro de calcio sigue a la etapa de ultrafiltración.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se usan una o más otras etapas de purificación o refinamiento.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que las una o más otras etapas de purificación o refinamiento son para eliminar una o más de las siguientes entidades: endotoxinas; proteínas; ADN genómico y ARN.
11. El procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, en el que las una o más otras etapas de purificación o refinamiento siguen a la etapa de ultrafiltración.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 u 11, en el que las una o más otras etapas de purificación o refinamiento comprenden una etapa de cromatografía.
13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que la etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía de intercambio iónico o con hidroxipatita.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía de intercambio iónico.
15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que la etapa de cromatografía de intercambio iónico utiliza Fractogel TMAE.
16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se elimina un precipitado formado en la etapa de precipitado con cloruro de calcio mediante una malla o tamiz.
17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que se elimina un precipitado formado en la etapa de precipitado con cloruro de calcio junto con restos celulares mediante una malla o tamiz.
18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de precipitación con CaCl_2 elimina ARN de alto peso molecular y ADN genómico.
19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que la etapa de ultrafiltración utiliza una membrana con un punto de corte del peso molecular inferior a 500 KDa y el ADN extracromosómico es de desde 2 Kb hasta 200 Kb.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que la membrana tiene un punto de corte del peso molecular inferior a 300 KDa, más preferiblemente de aproximadamente 100 KDa.

ES 2 287 189 T3

21. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que la membrana se selecciona del grupo que está compuesto por: polietersulfona; acetato de celulosa; polisulfona; polivinilideno; polipropileno; poliamida; PES modificada; polivinilidenpirrolidina; poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF); nitrato de celulosa y triacetato de celulosa.

5 22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que la membrana es una membrana de polietersulfona.

23. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que utiliza un tampón de diafiltración que tiene un intervalo de pH de desde 6-10.

10 24. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que el tampón de diafiltración es un tampón Tris.

25. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que se usa el tampón de diafiltración con más de 10 intercambios de volumen.

15 26. El procedimiento según la reivindicación 25, en el que se usa el tampón de diafiltración con más de 20 intercambios de volumen.

20 27. El procedimiento según la reivindicación 26, en el que se usa el tampón de diafiltración con más de 30 intercambios de volumen.

28. El procedimiento según la reivindicación 27, en el que se usa el tampón de diafiltración con más de 40 intercambios de volumen.

25 29. El procedimiento según la reivindicación 28, en el que se usa el tampón de diafiltración en desde 50 hasta 100 intercambios de volumen.

30. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que se usa la membrana con un canal de pantalla.

30 31. El procedimiento según la reivindicación 30, en el que el canal de pantalla es una pantalla en T.

32. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se lleva a cabo el procedimiento a una presión transmembrana inferior a 68,95 kPa.

35 33. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que el ADN extracromosómico se carga sobre la membrana en una cantidad inferior a 0,323 g/m² en el caso de una membrana de 300 K.

34. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que la etapa de cromatografía es una etapa de cromatografía con hidroxiapatita.

40 35. El procedimiento según la reivindicación 34, en el que la etapa de cromatografía con hidroxiapatita se lleva a cabo a un pH de desde 7,3 hasta 8,3.

36. El procedimiento según la reivindicación 35, en el que la etapa de cromatografía con hidroxiapatita se lleva a cabo a un pH de entre 7,6 y 8,0.

45 37. El procedimiento según la reivindicación 34, 35 ó 36, en el que la hidroxiapatita es BioRad MacroPrep Ceramic.

38. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, en el que se usa un sistema de doble tampón para separar ADN extracromosómico de ARN.

50 39. El procedimiento según la reivindicación 38, en el que el sistema de doble tampón comprende Na₂HPO₄ para eluir el ARN y K₂HPO₄ para eluir el ADN extracromosómico.

55 40. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa de precipitación con CaCl₂ va seguida por otra etapa de ultrafiltración o una etapa de desalación o una etapa de cromatografía en fase inversa.

41. El procedimiento según la reivindicación 40, en el que la otra etapa de ultrafiltración o una etapa de desalación o una etapa de cromatografía en fase inversa va seguida por la etapa de cromatografía.

60 42. El procedimiento según la reivindicación 41, en el que la etapa de cromatografía es una de intercambio iónico.

65

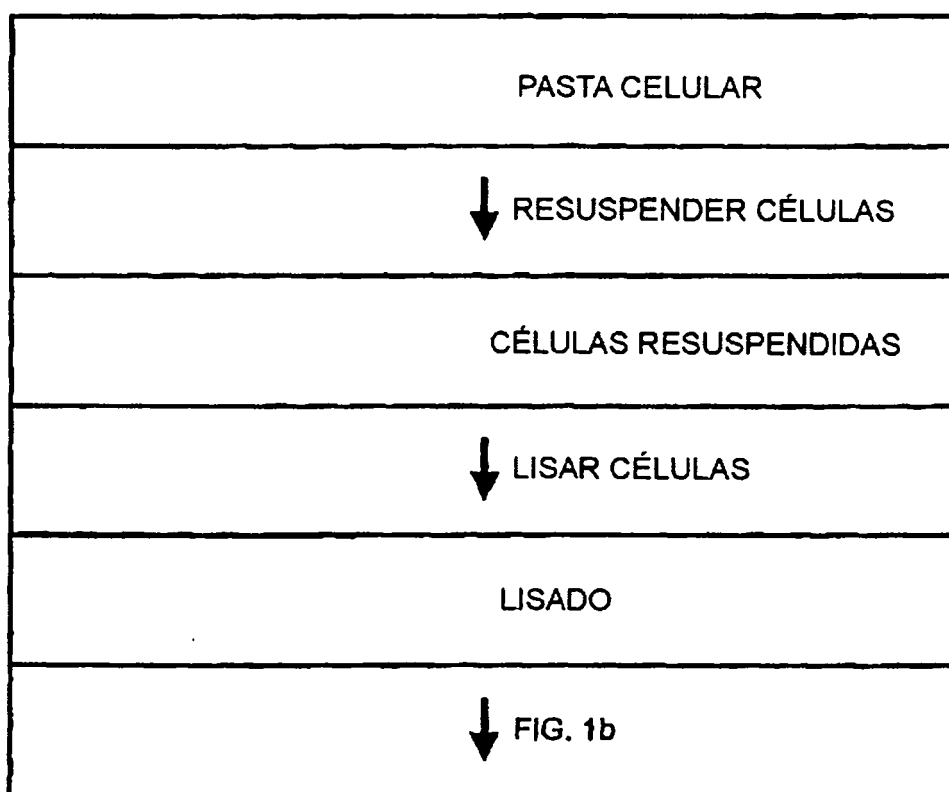


FIG. 1a



FIG. 1b

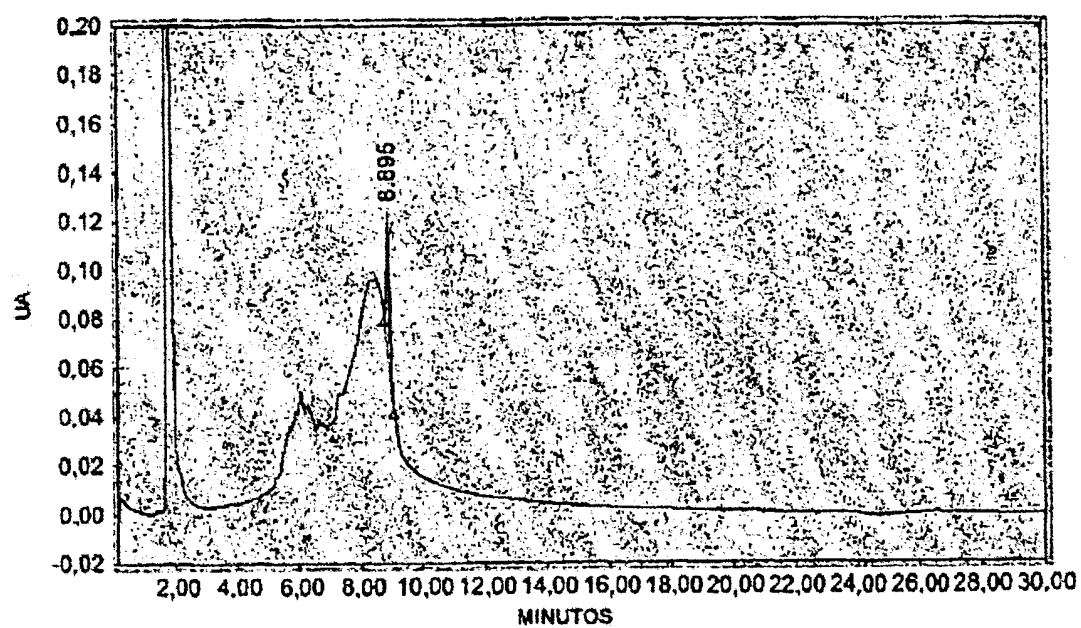


FIG. 2a

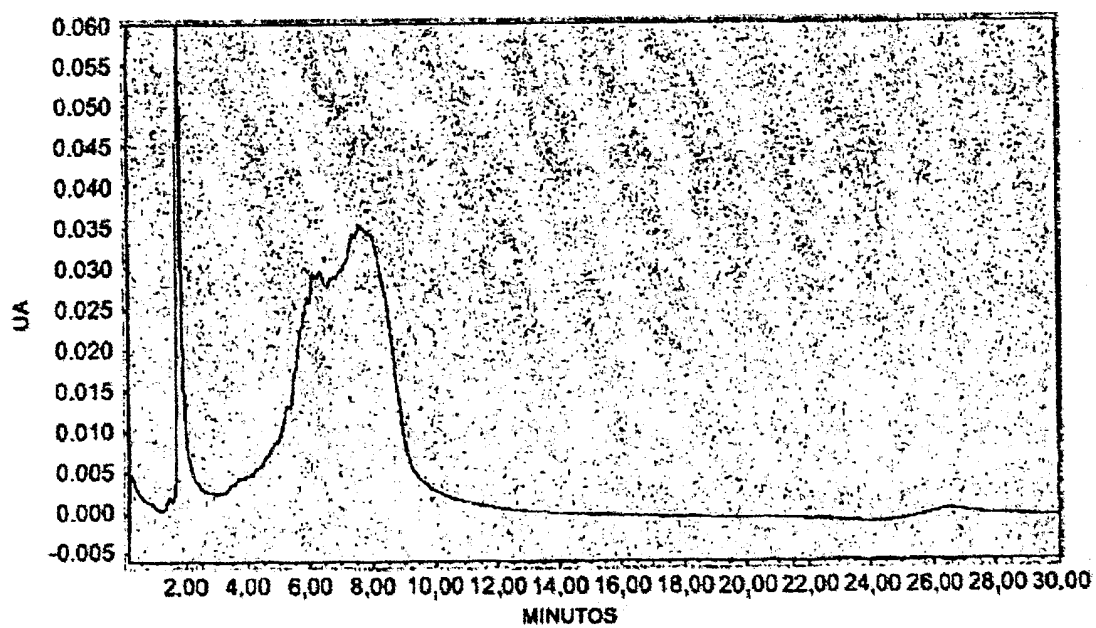


FIG. 2b

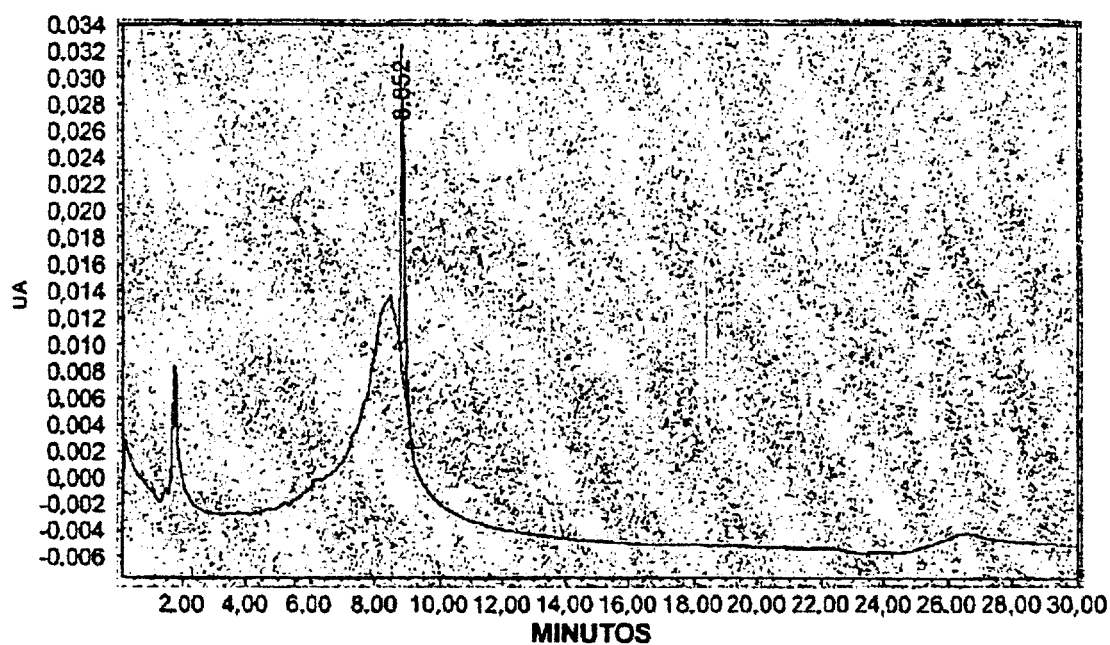


FIG. 2c

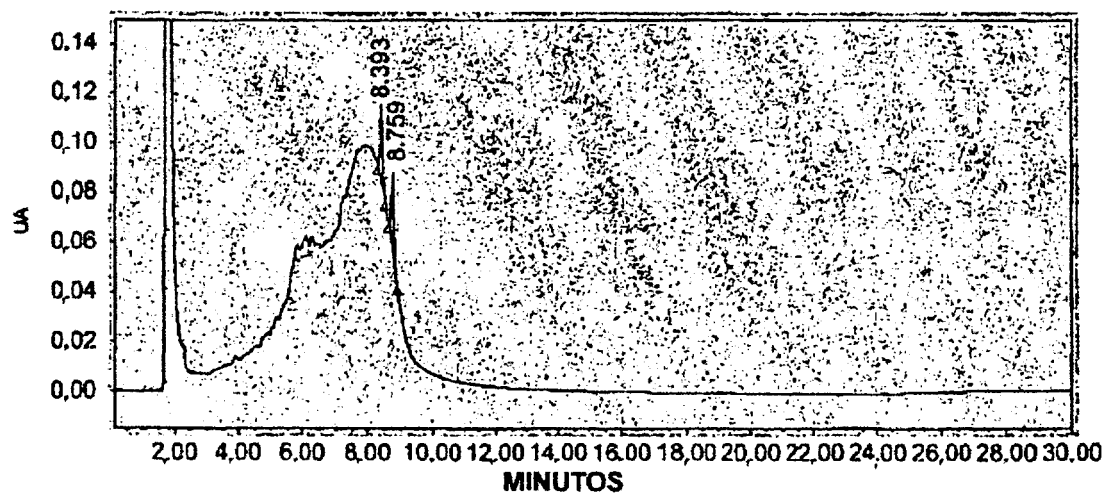


FIG. 3a

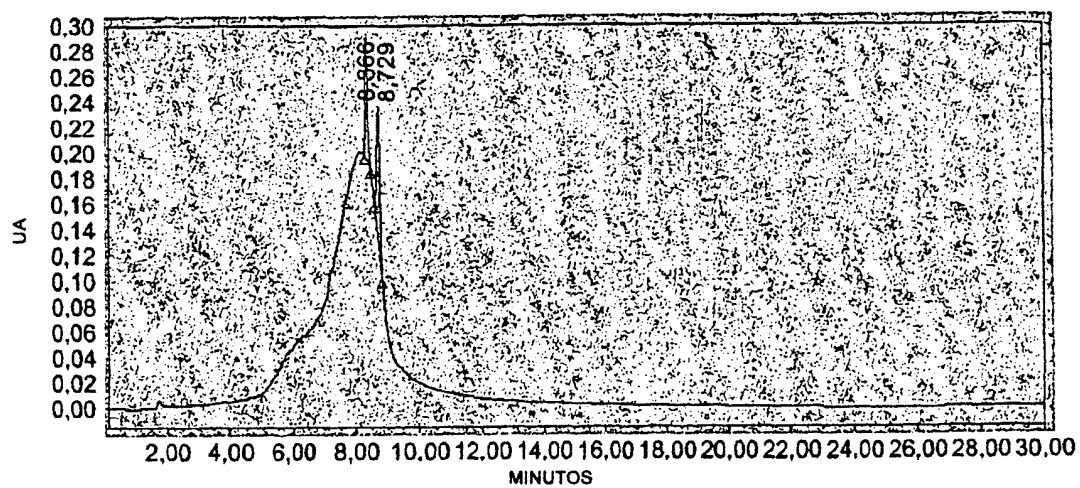


FIG. 3b

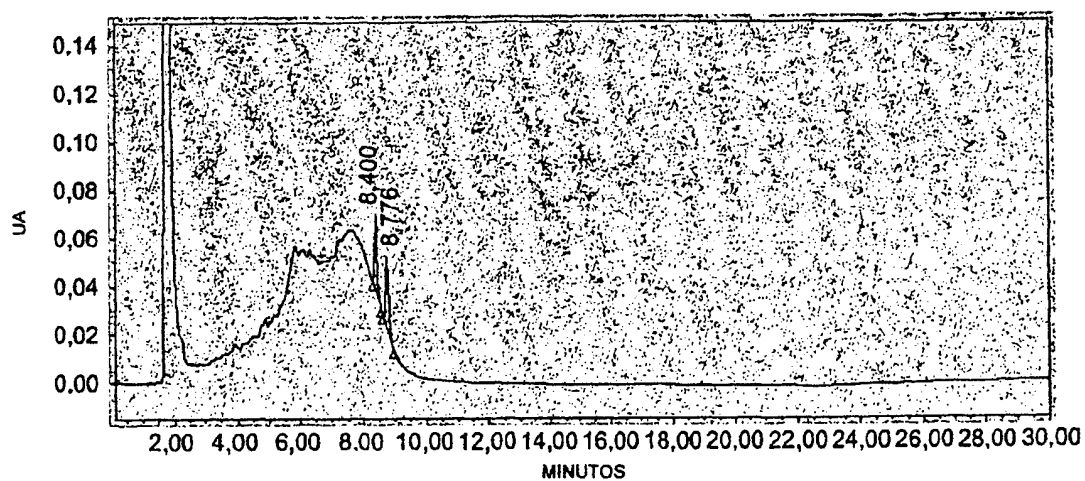


FIG. 3c

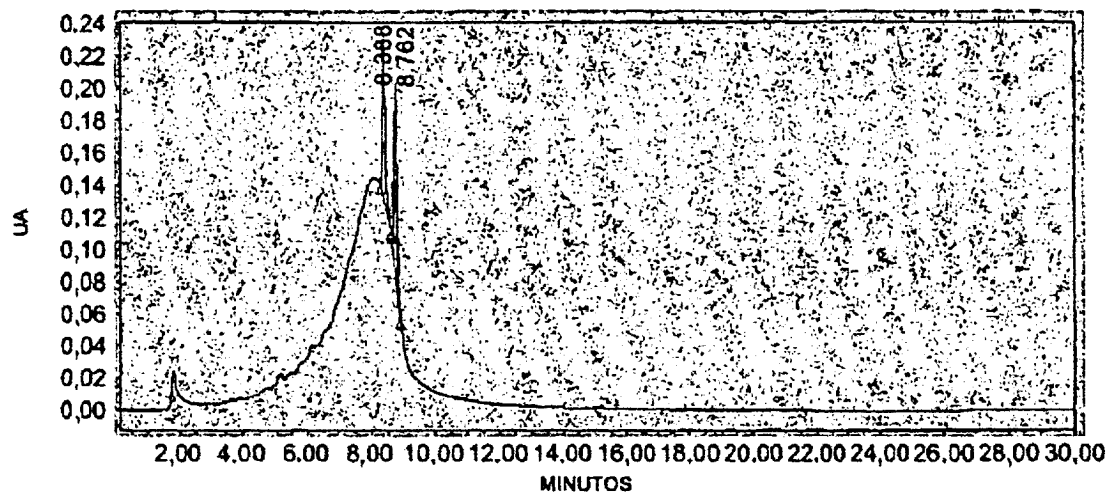


FIG. 3d

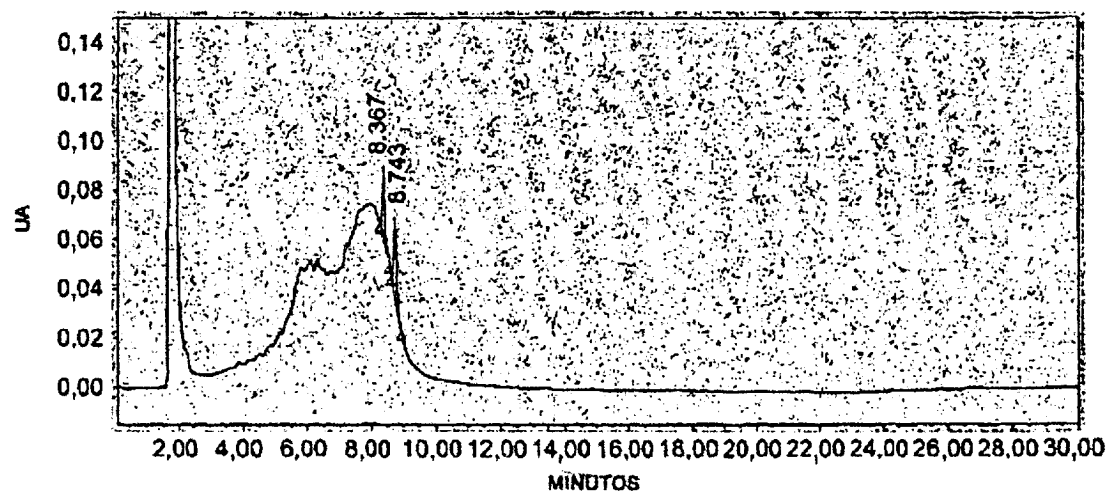


FIG. 3e

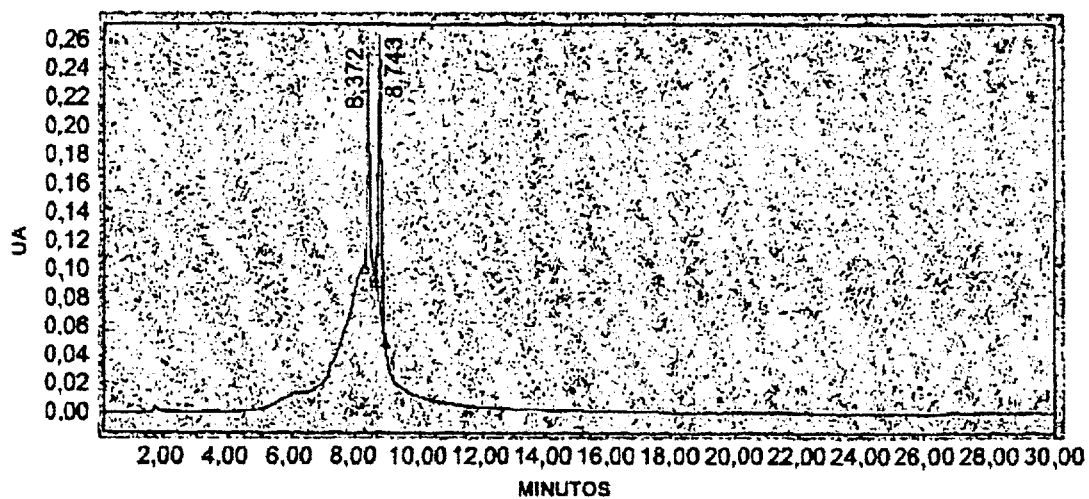


FIG. 3f

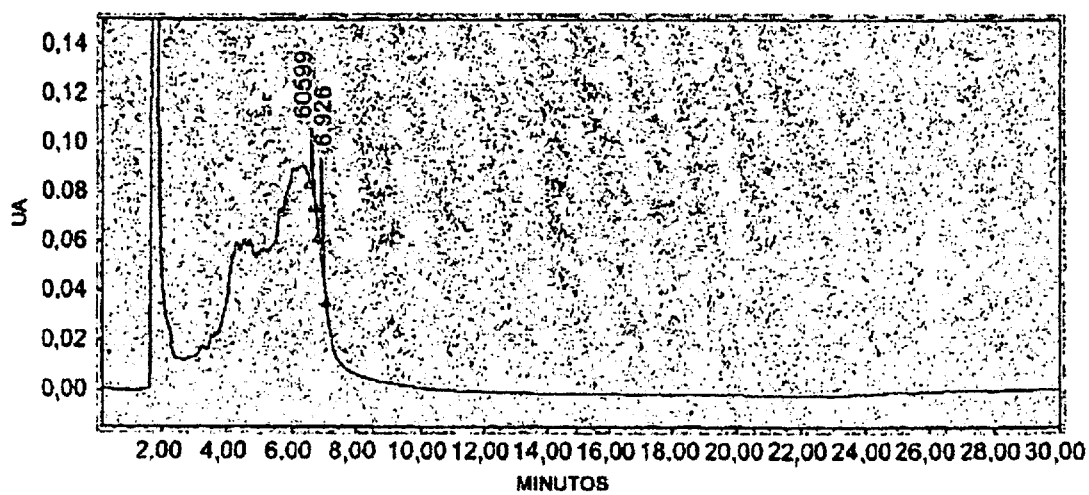


FIG. 4a

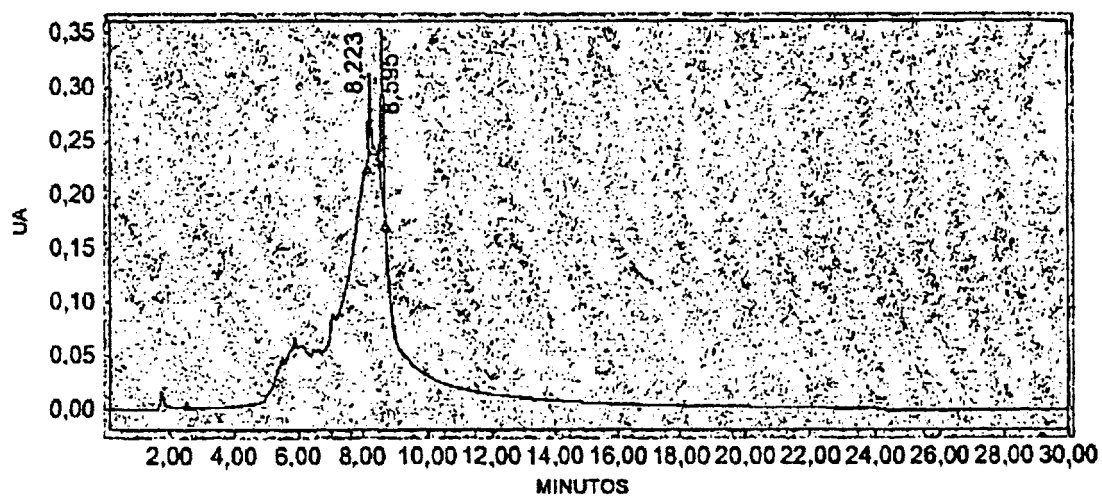


FIG. 4b

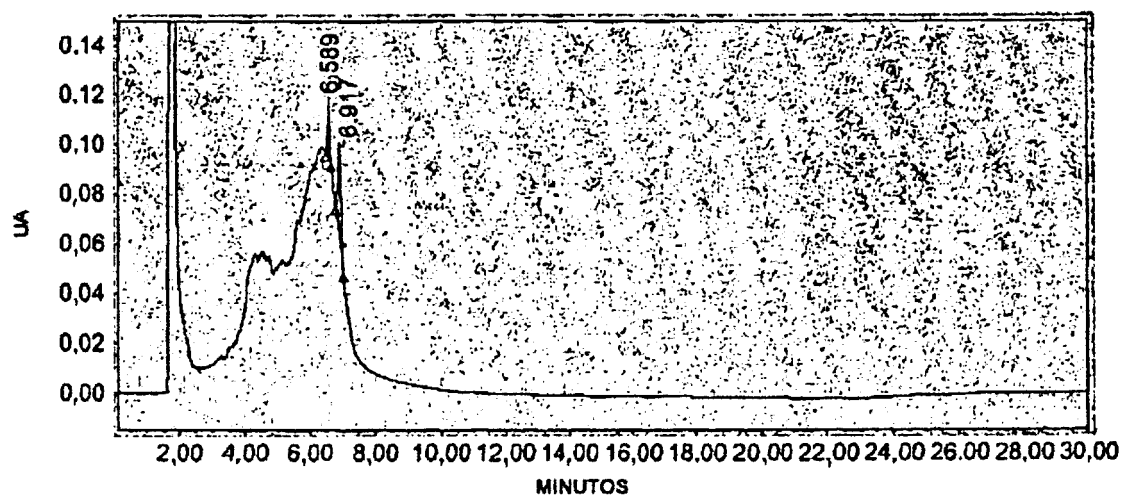


FIG. 4c

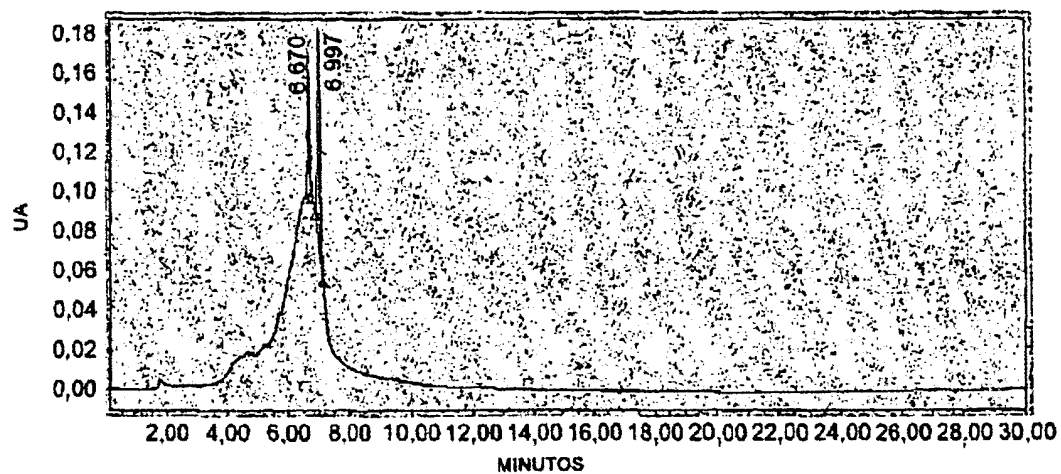


FIG. 4d

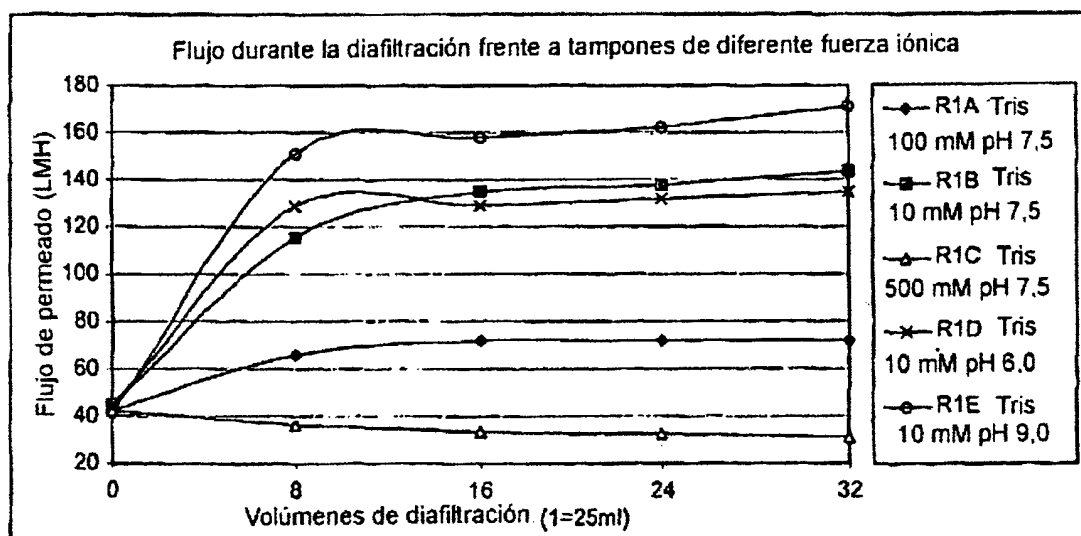


FIG. 5

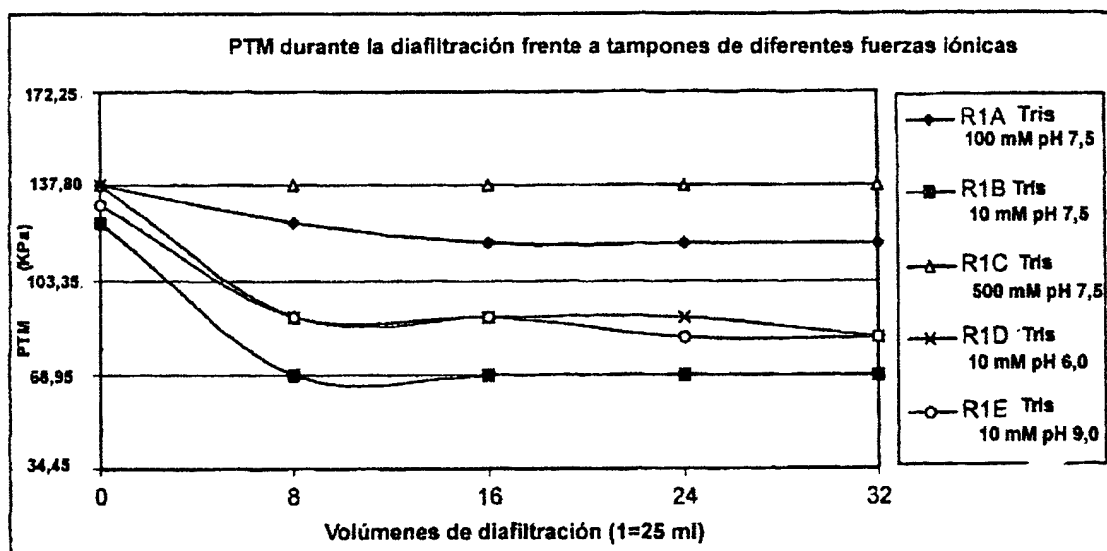


FIG. 6

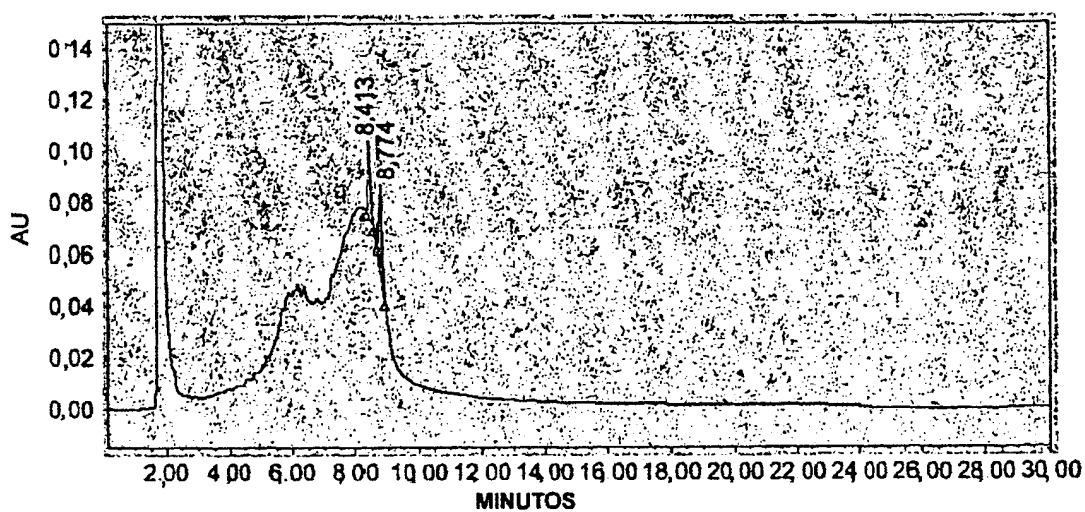


FIG. 7a

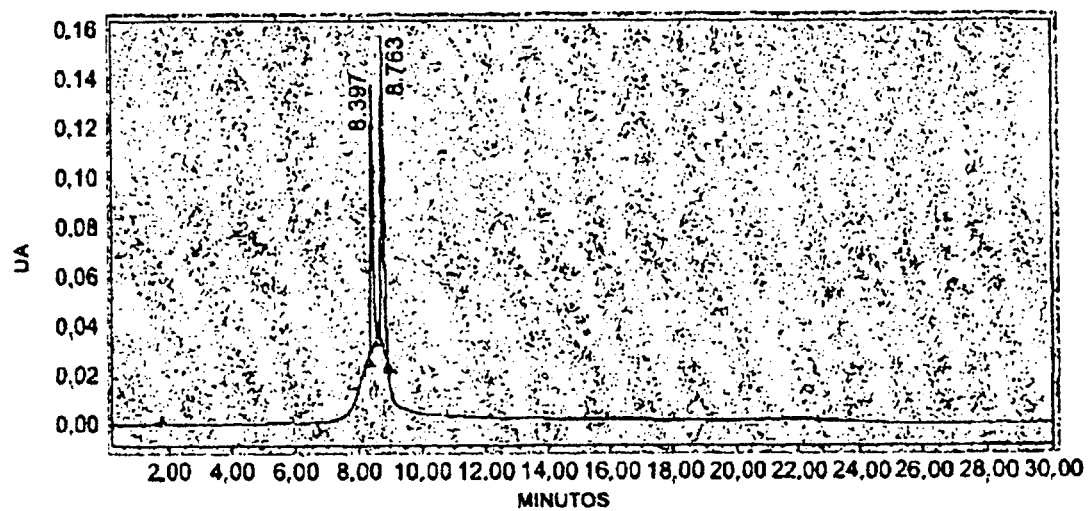


FIG. 7b

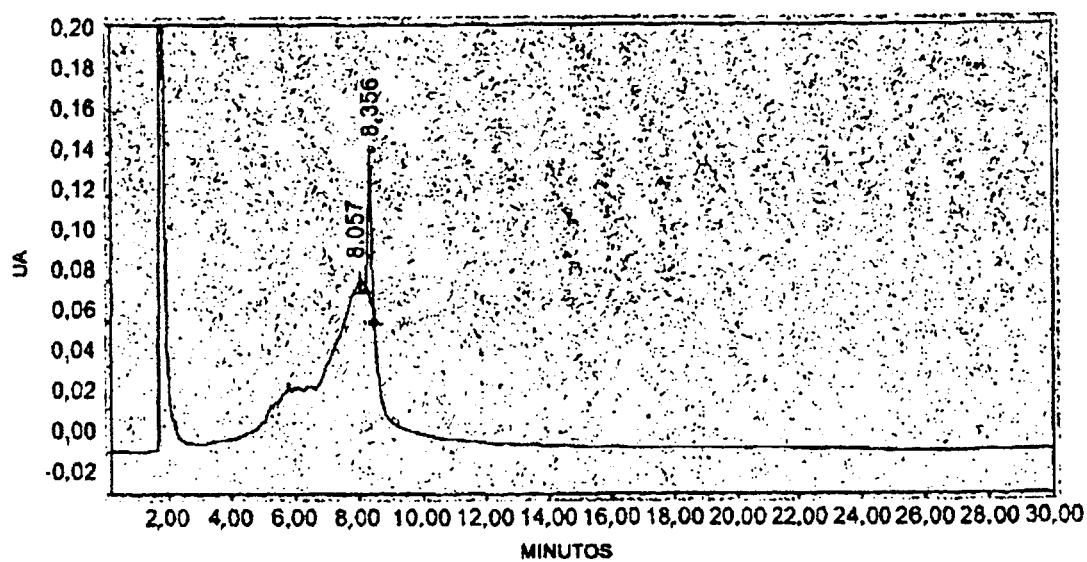


FIG. 8a

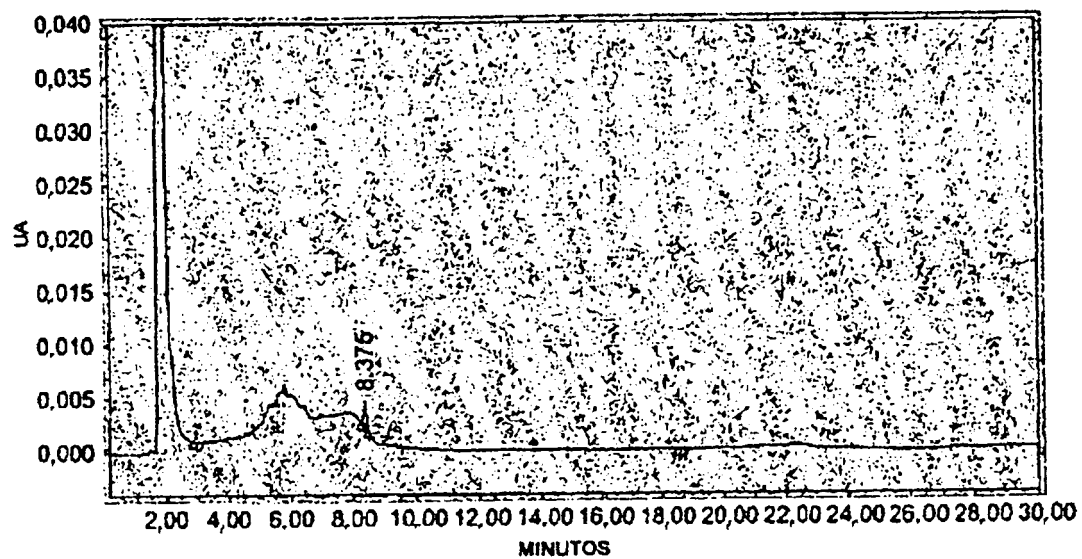


FIG. 8b

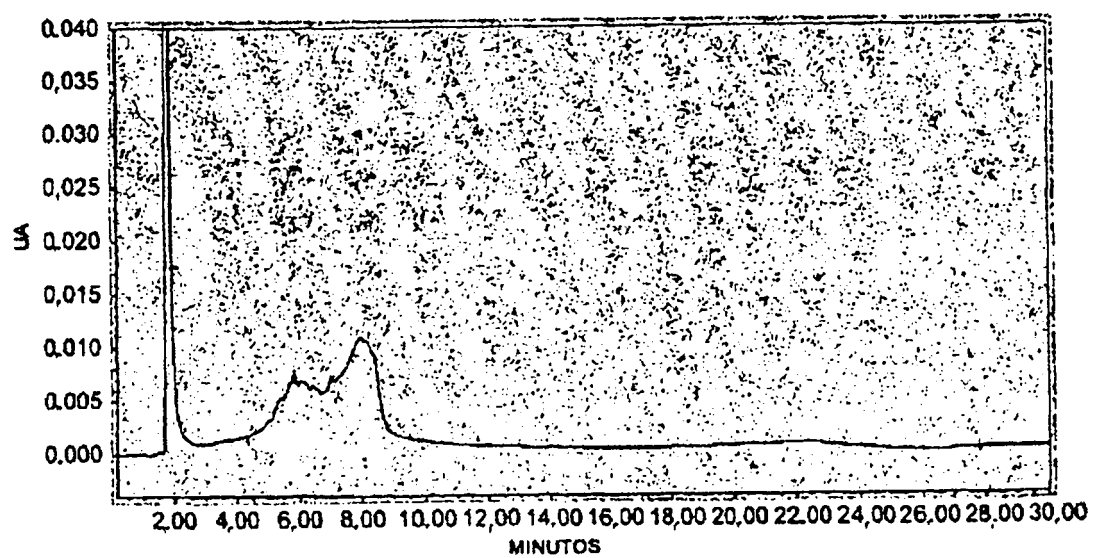


FIG. 8c

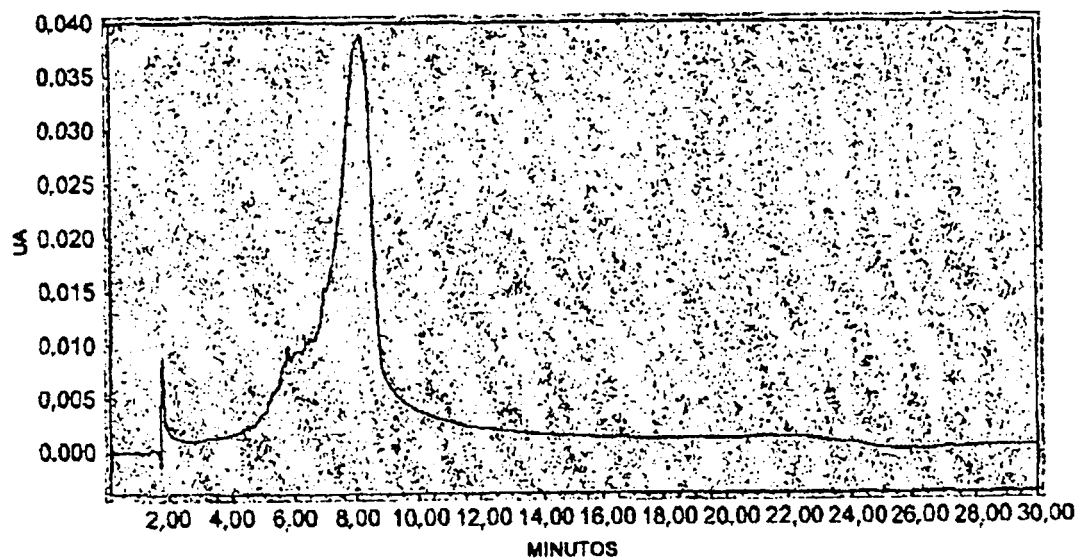


FIG. 8d

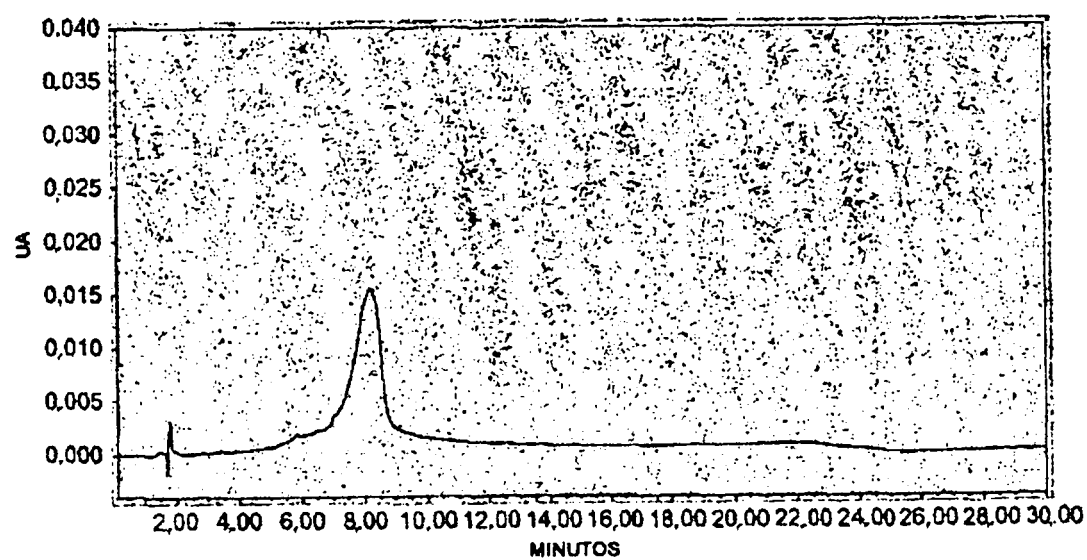


FIG. 8e

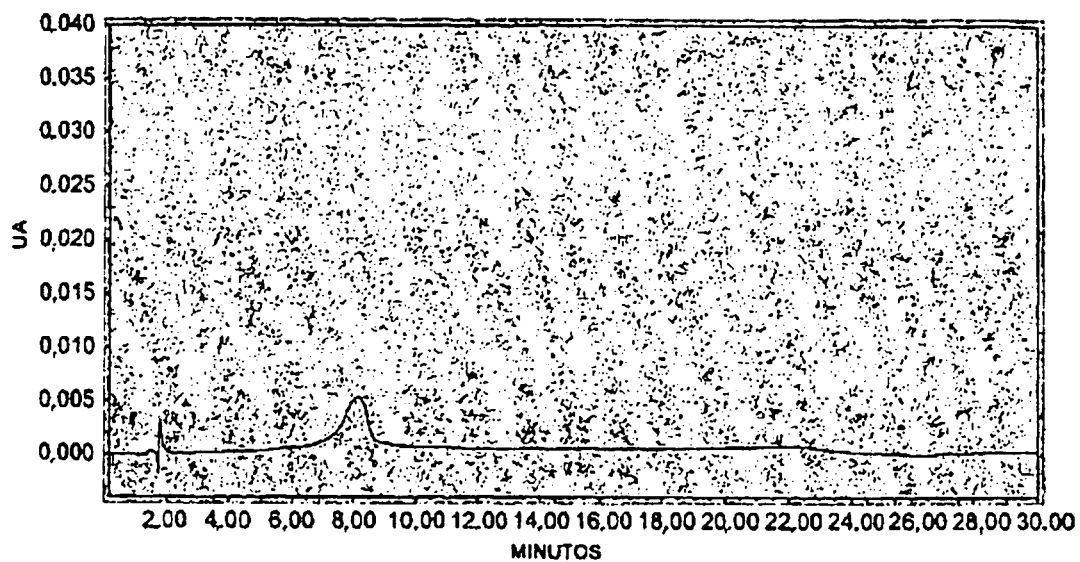


FIG. 8f

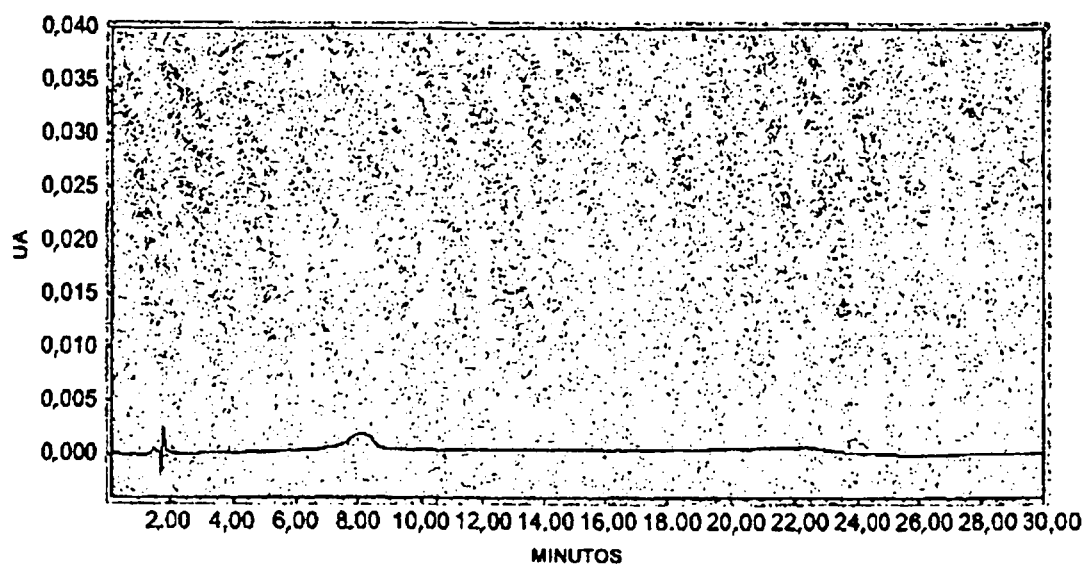


FIG. 8g

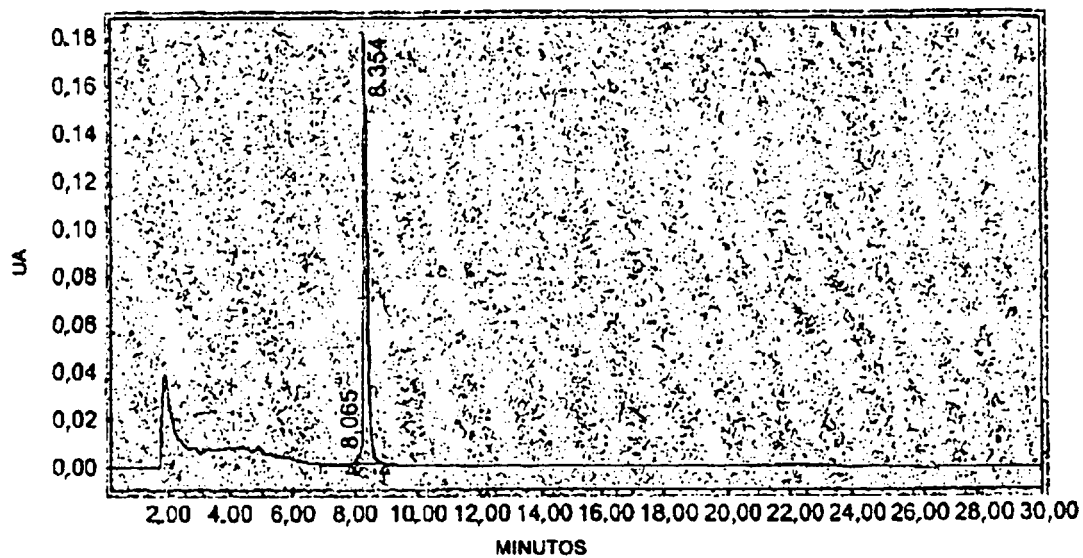


FIG. 8h

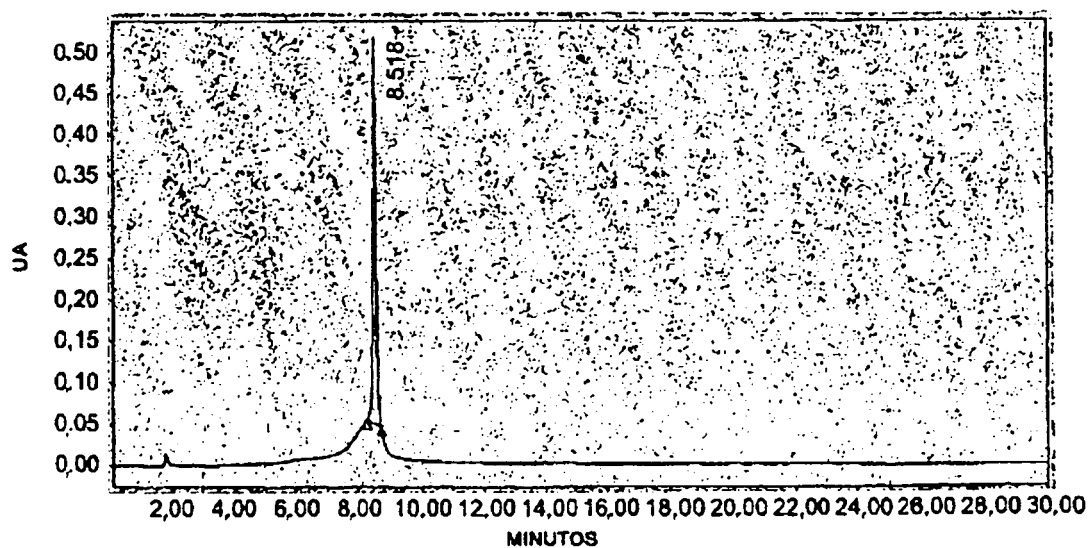


FIG. 8i

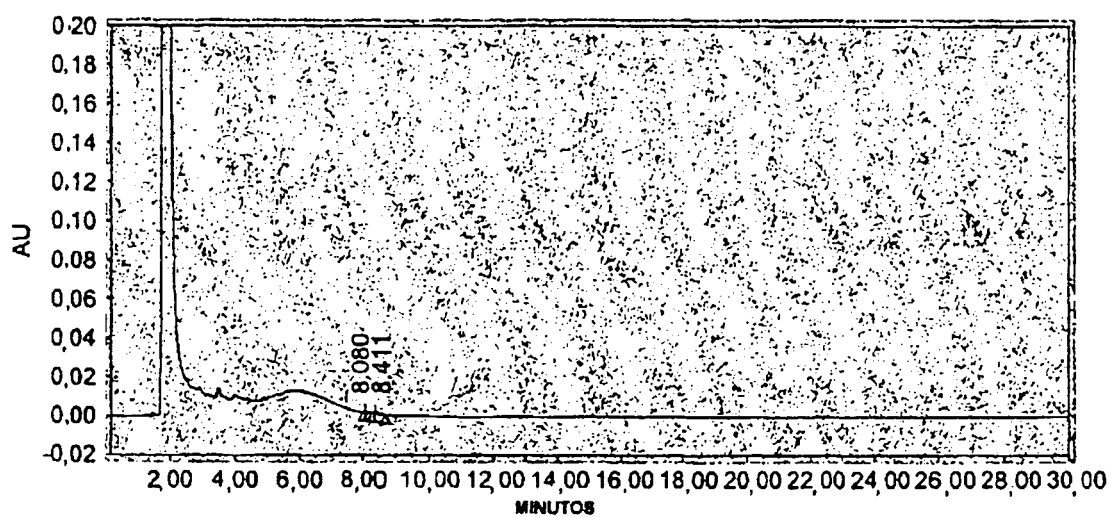


FIG. 9a

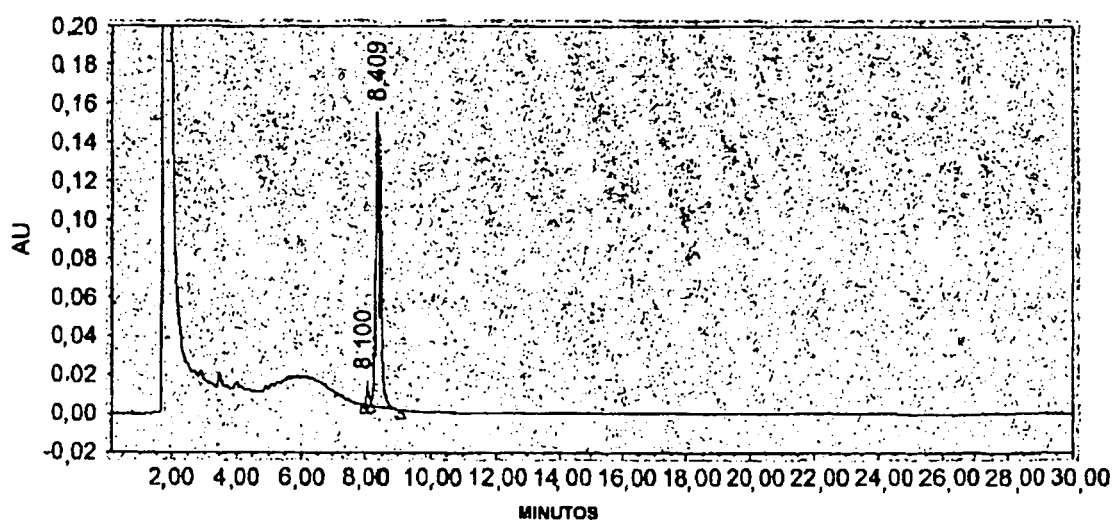


FIG. 9b

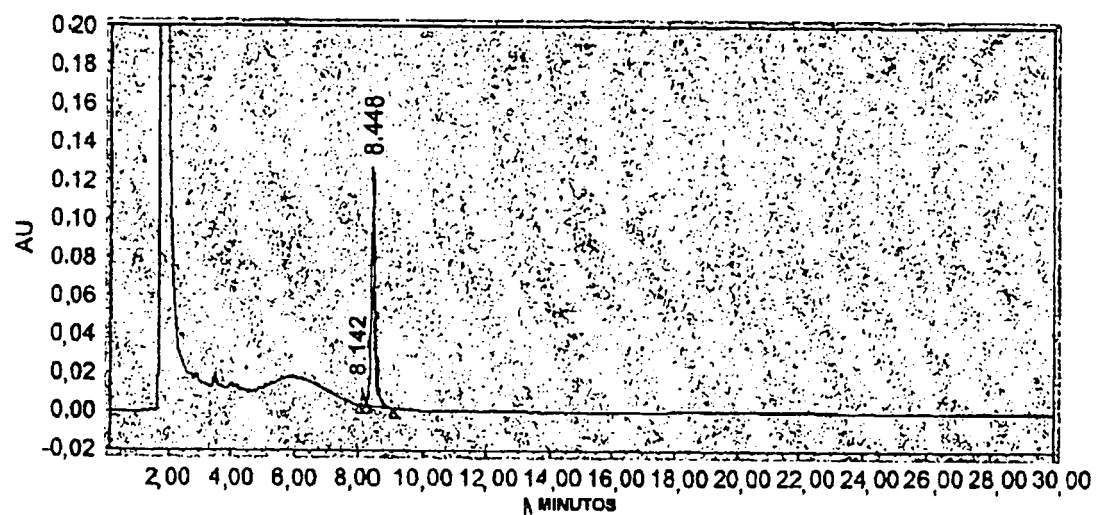


FIG. 9c

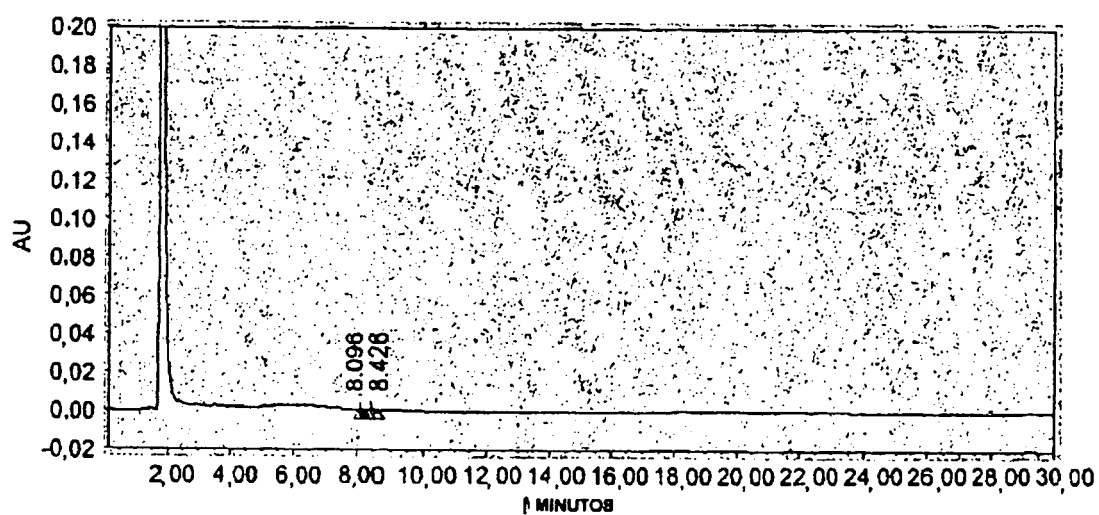


FIG. 9d

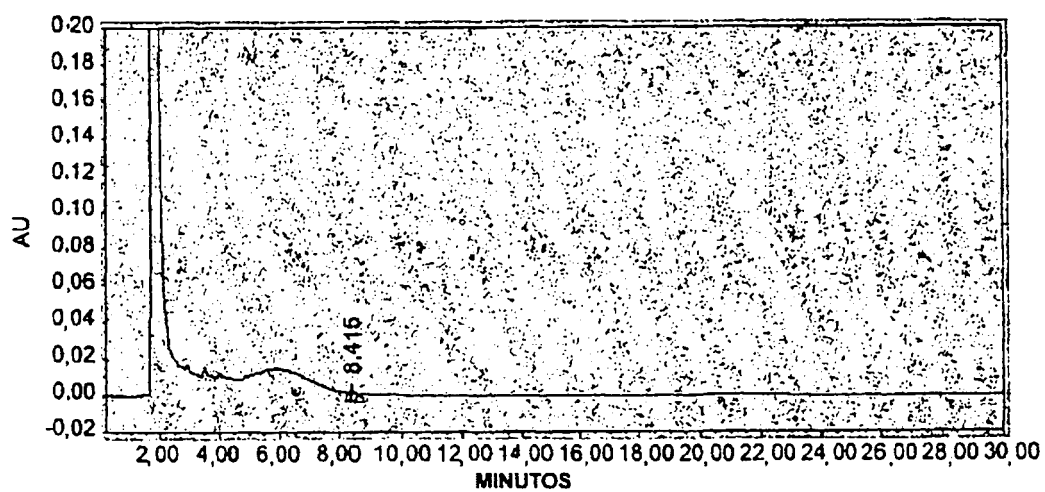


FIG. 9e

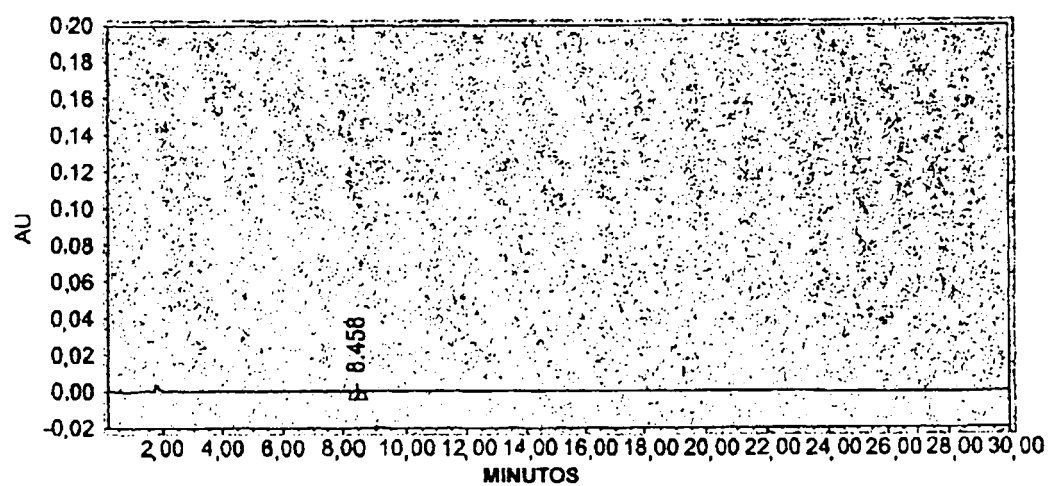


FIG. 9f

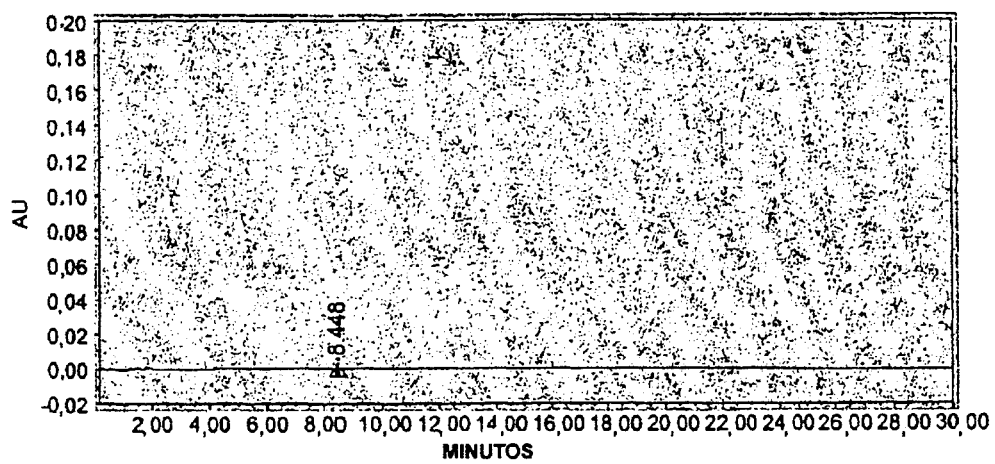


FIG. 9g

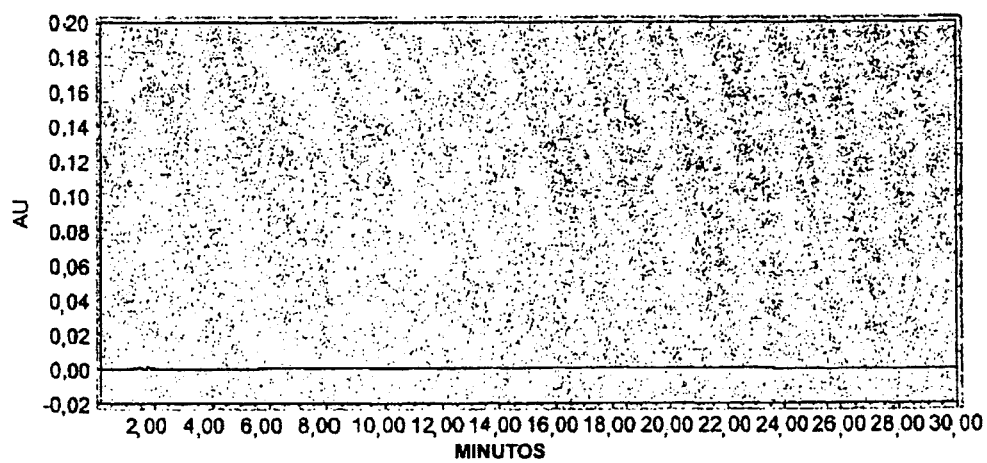


FIG. 9h

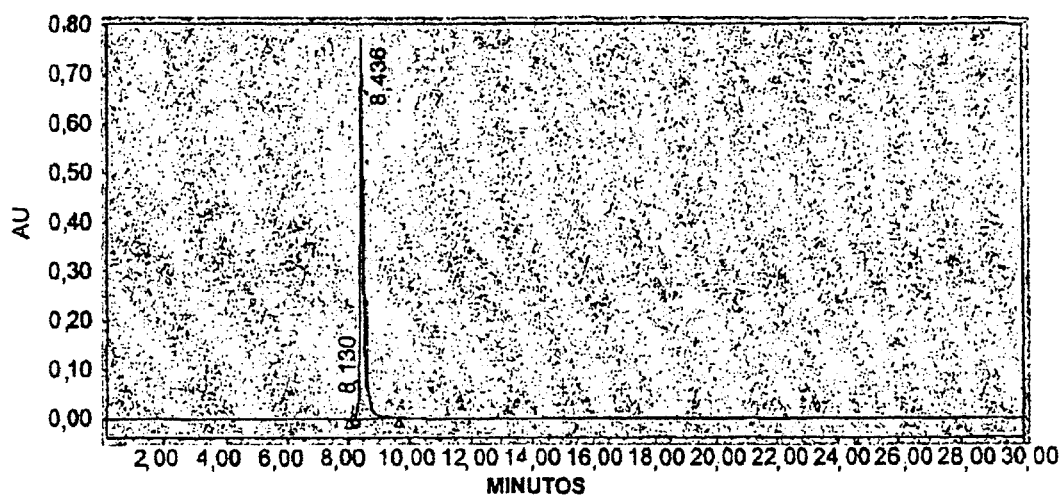


FIG. 9i

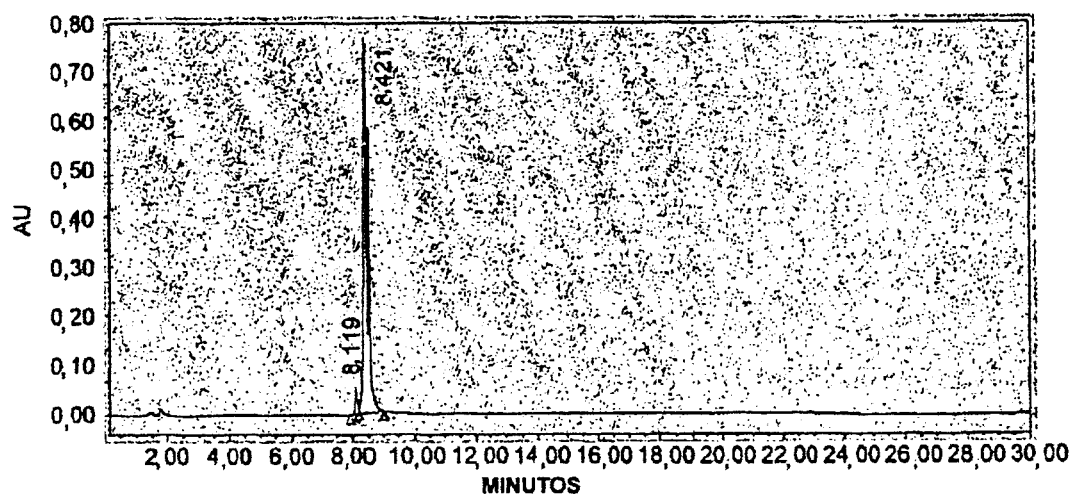


FIG. 9j

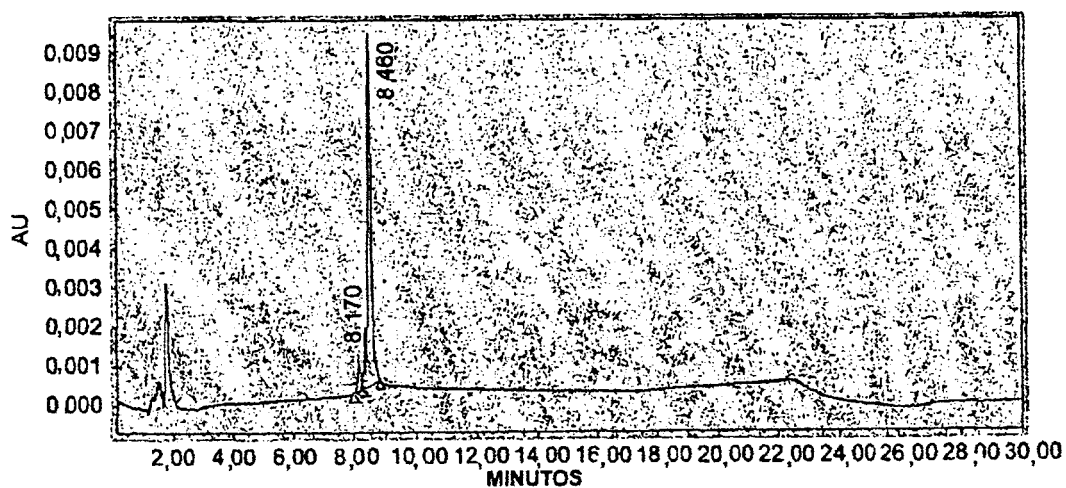


FIG. 9k

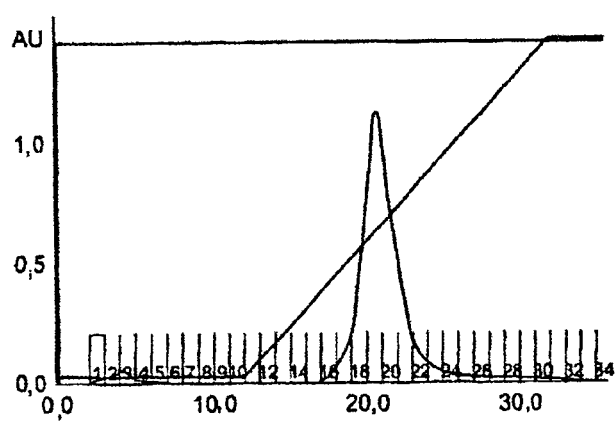


FIG. 10a

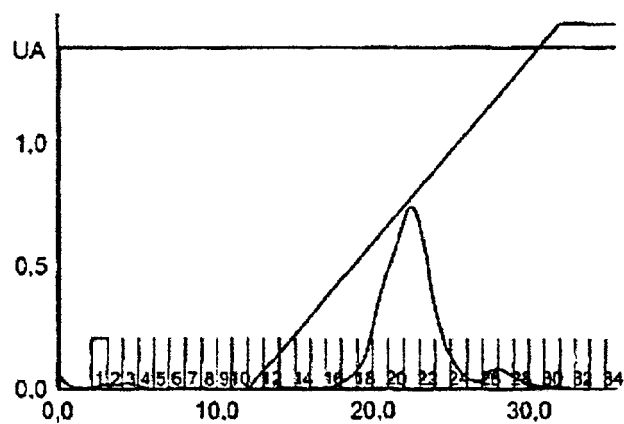


FIG. 10b

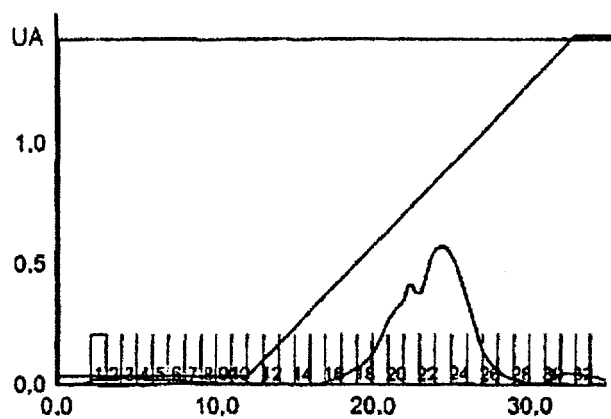


FIG. 10c

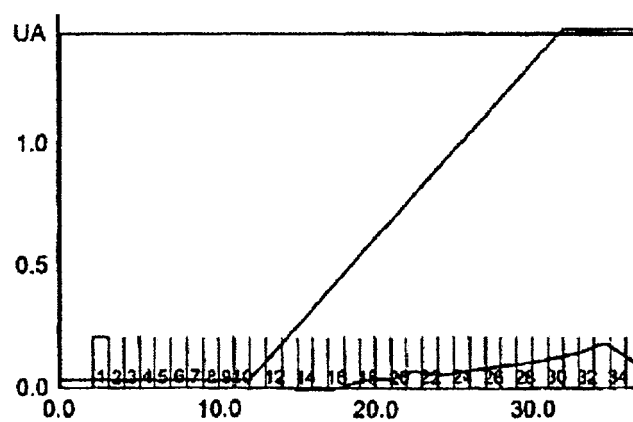


FIG. 10d