



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 340**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02252249 .4**

96 Fecha de presentación : **27.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1245674**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

54 Título: **Purificación de ácido nucleico.**

30 Prioridad: **27.03.2001 GB 0107634**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Fermentas AB.**
Graiciuno 8
2028 Vilnius, LT

72 Inventor/es: **Kvederas, Rimantas;**
Siksniute, Asta y
Markauskas, Algimantas

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 315 340 T3

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).

ES 2 315 340 T3

DESCRIPCIÓN

Purificación de ácido nucleico.

5 La presente invención se refiere a un proceso para purificación de ADN plasmídico, más particularmente a un proceso para purificación de ADN plasmídico de uso farmacéutico.

Antecedentes de la invención

10 El uso de información genética en el tratamiento de enfermedades es uno de las vías más prometedoras en la investigación médica. Existen diferentes enfoques para suministrar información genética a un paciente; más destacadamente entre ellos están vectores virales de diferentes orígenes y vectores de ADN “desnudo” propagados en bacterias. El uso de vectores virales se ha rebatido últimamente por consideraciones de seguridad.

15 El uso de plásmidos que proceden de bacterias en la clínica aumenta la importancia de medios eficaces y económicos y métodos de fabricación y purificación de grandes cantidades de ADN plasmídico hasta niveles muy altos de pureza. Para satisfacer los criterios de fabricación farmacéutica adoptados por la mayoría de autoridades, un método para la purificación también necesita producir resultados reproducibles y validados.

20 Se han presentado varios métodos para la purificación de ADN plasmídico de uso farmacéutico. Muchos de ellos siguen un esquema similar, que comportan una primera etapa de lisis, en la que las bacterias se rompen, una etapa de desnaturalización posterior que destruye interacciones de ácidos nucleicos con proteínas, y finalmente un procedimiento por el cual el contenido de ácido nucleico diana se deriva en una secuencia de etapas de precipitación y al menos una etapa cromatográfica.

25 La calidad que se obtiene por estos métodos de purificación es variable. Una característica, sin embargo, es que ciertas sustancias presentes en la biomasa bacteriana, entre ellas polisacáridos que proceden de la pared celular bacteriana, lipopolisacáridos y ARN, son difíciles de eliminar sin varias etapas cromatográficas y tienden a contaminar las preparaciones de ADN convencionales. Algunas de estos contaminantes que proceden de bacterias son efectores extremadamente potentes de diversos sistemas de defensa de eucariotas superiores, posiblemente debido a su función intrínseca como una señal de infección bacteriana. La eliminación de estos contaminantes es un problema muy importante en la fabricación y purificación de ADN plasmídico.

30 Se conoce la ultrafiltración de productos biológicos. Se muestra un método para obtener una proteína a partir de fluido tisular mediante diafiltración en el documento WO 98/54195. También se conocen y se muestran en diferentes patentes y solicitudes de patente muchos métodos para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el documento WO98/05673 describe un proceso para producir ADN altamente purificado que implica una combinación de etapas de diafiltración y cromatografía. Se usa diafiltración antes y después de la cromatografía de intercambio iónico esencialmente para asegurar que la muestra que contiene ácido nucleico está en el tampón correcto. Una característica clave de esta propuesta es que la diafiltración usa una unidad de ultrafiltración de canal abierto o de fibra hueca para prevenir turbulencias en la membrana de ultrafiltración a fin de obtener una capa de gel.

35 El documento EP0517515 describe un método para purificar ADN plasmídico y/o ADN cosmídico que se puede llevar a cabo fácilmente sin centrifugación que requiera mucho tiempo y sin usar un reactivo tóxico.

El documento WO99/29832 describe un método para purificar ADN plasmídico a partir de una mezcla que contiene ADN plasmídico y ADN genómico.

40 El documento WO02/42317 forma parte del estado de la técnica en los Artículos 54 (3) y (4) EPC. Describe un método de separación de ADN extra-cromosómico de otros componentes celulares.

El documento EP0964057 describe un método para separar ácidos nucleicos mediante cromatografía de interacción hidrófoba.

55 El documento AU 723817 (que procede del documento WO98/30685) también se refiere a un método para producir un ADN plasmídico altamente purificado. En este método, se usan dos etapas de cromatografía en columna; una etapa de cromatografía en Q-Sepharose® seguida por una etapa de cromatografía de hidroxilapatita. El eluido de la etapa de cromatografía de hidroxilapatita se somete a una filtración de flujo cruzado que se indica en la descripción que es esencial. Esta etapa se usa para eliminar sal y otros contaminantes del eluido de la columna.

60 El documento WO00/05358 se refiere esencialmente al uso de un mezclador estático para obtener una solución de células lisadas en un método para purificar ADN plasmídico. Éste también depende de una etapa de cromatografía de intercambio iónico para purificar ADN plasmídico y se emplea diafiltración mediante flujo tangencial usando una unidad de ultrafiltración de canal abierto para asegurar que el ADN plasmídico está en el tampón correcto.

ES 2 315 340 T3

El documento US 4.623.723 se refiere a la separación de soluciones de ácido nucleico bruto usando membranas de ultrafiltración de fibra hueca. Se propone separar ARN de ADN usando diafiltración contra agua desionizada. No se dan datos en cuanto a la eficacia del método.

5 Para conseguir un ADN plasmídico de uso farmacéutico altamente purificado, cada uno de los métodos anteriores depende esencialmente de una etapa cromatográfica para eliminar contaminantes. Esto puede aumentar el tiempo para la purificación, especialmente cuando se requieren etapas cromatográficas múltiples, y también aumentará el coste que implica.

10 Sumario de la invención

La presente invención tiene como objetivo superar los inconvenientes de la técnica anterior.

15 La presente invención proporciona un proceso para purificación de ADN plasmídico a partir de una muestra que contiene ácido nucleico que comprende ADN plasmídico y contaminantes incluyendo ARN, comprendiendo el proceso una etapa de eliminación de contaminantes, que comprende:

(a) tratamiento de la muestra para formar una solución de ácido nucleico que tiene una concentración de cationes monovalentes;

20 (b) contacto de la solución de ácido nucleico con una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de exclusión por peso molecular de al menos 30 kDa en condiciones en las que se evita la formación de una capa de gel y en las que la concentración de cationes monovalentes es de al menos aproximadamente 0,35 M durante un tiempo suficiente para eliminar sustancialmente todo el ARN y formar un material retenido que contiene ADN plasmídico; y

25 (c) recogida del material retenido.

30 Se ha descubierto sorprendentemente que una combinación de un tipo particular de unidad de membrana de ultrafiltración y suficiente exposición a cationes monovalentes pueden eliminar contaminantes de una solución que contiene ADN plasmídico, con tal de que no se formen sustancialmente capas de gel sobre o adyacentes a la membrana de ultrafiltración. De esta manera se encuentra que la eliminación de contaminantes, especialmente la eliminación de contaminantes de ARN, es particularmente eficaz. Esto evita la necesidad de etapas de cromatografía en columna múltiples, manteniendo de este modo al mínimo el grado en el que se usa cromatografía para purificar el ADN plasmídico. 35 En la presente invención, una sola etapa de cromatografía es suficiente para conseguir la pureza de ADN necesaria. Otros contaminantes eliminados mediante la etapa de contacto de la solución de ácido nucleico con la membrana de ultrafiltración pueden incluir endotoxinas y proteínas celulares. Esto permite una preparación relativamente rápida y eficaz de ADN plasmídico capaz de producir un producto que es adecuado para la aplicación farmacéutica.

40 La concentración de catión monovalente usada en el presente proceso y el tiempo durante el que la solución de ácido nucleico se pone en contacto con la membrana de ultrafiltración en presencia de los cationes monovalentes se pueden determinar empíricamente. Están disponibles métodos convencionales para determinar la cantidad de ARN u otro contaminante restante en una muestra de ensayo aplicada en la membrana de ultrafiltración. De acuerdo con la invención, la concentración de catión monovalente es de al menos aproximadamente 0,35 M, aunque se pueden usar 45 concentraciones más bajas con pérdida de algo de eficacia. Generalmente, la concentración de catión monovalente no excede de aproximadamente 2 M. Los cationes monovalentes típicamente son metales alcalinos y preferiblemente comprenden sodio o potasio. El cloruro es un contraión adecuado para los cationes. Sin embargo, no se observa que el cloruro de litio sea eficaz en la invención y, por tanto, el litio no es un catión monovalente preferido.

50 Típicamente, el límite de exclusión por peso molecular de la membrana de ultrafiltración no excede de 100 kDa y es preferiblemente de al menos aproximadamente 50kDa. Actualmente no se entiende completamente por qué la combinación de una concentración de catión monovalente elevada y la selección de límite de peso molecular de la membrana permite dicha purificación eficaz de ADN de contaminantes tales como ARN. En el caso de separación de ADN de ARN, sin desear quedar ligado a una teoría, se puede especular que la conformación molecular o las 55 características fisicoquímicas del ARN se alteran en las condiciones de proceso de tal modo que puede permear la membrana de ultrafiltración mientras que el ADN plasmídico, especialmente de un tamaño de 2 Kb o superior, no puede permear la membrana en estas condiciones.

60 Se puede usar convenientemente una etapa (b) para reducir el volumen de la solución de ácido nucleico y es fácilmente alcanzable una reducción de volumen en el intervalo de 4 a 10 veces o más. Ventajosamente, al menos la etapa (b) comprende una etapa de diafiltración. Convenientemente, la concentración de cationes monovalentes también se puede introducir en la solución de ácido nucleico mediante diafiltración. Las condiciones de diafiltración deben ser, sin embargo, tales que sustancialmente no se produzca formación de capa de gel. La formación de capa de gel en este contexto se considera generalmente que es formación de una capa gelatinosa delgada de biomoléculas sobre o 65 en la membrana de ultrafiltración. Un aspecto importante de la presente invención es darse cuenta de que una capa de gel de este tipo puede bloquear los poros de la membrana de ultrafiltración, reduciendo de este modo la eficacia y velocidad de filtración y causando un aumento en la concentración de impurezas restantes en el material retenido. En la práctica, una buena manera de evitar dicha formación de capa de gel es asegurar que hay un grado de turbulencias en

ES 2 315 340 T3

la región de la membrana de ultrafiltración. Esto se puede conseguir mediante el uso de la membrana de ultrafiltración en una unidad de ultrafiltración de canal de tamizado. Típicamente, las unidades de ultrafiltración de canal de flujo se configuran para que el flujo de muestra esté en una dirección normal a la dirección de flujo a través de la membrana. Una unidad de ultrafiltración de canal de tamizado incluye un separador colocado entre un par de membranas para que se generen turbulencias en el material retenido, a diferencia de estructuras más abiertas tales como unidades de ultrafiltración de canal abierto o fibra hueca, que no son adecuadas para la presente invención debido a la formación de capa de gel.

Aunque la etapa (b) de contacto del ácido nucleico con la membrana de ultrafiltración puede realizarse a la temperatura ambiente o de la habitación, se prefiere usar una temperatura elevada porque esto permite una aceleración del proceso de filtración. Se prefiere una temperatura en el intervalo de 30°C a 60°C, más preferiblemente de aproximadamente 50°C. También se piensa que temperaturas de ultrafiltración elevadas ayudan a disminuir o evitar la formación de una capa de gel en la superficie de la membrana.

Se puede realizar la ultrafiltración a temperaturas más altas que 60°C, con tal de que no se afecte desfavorablemente el rendimiento de la membrana de ultrafiltración a dicha temperatura alta. 60°C es la temperatura más alta que se recomienda generalmente por los fabricantes de ultrafiltración. La temperatura no debe ser tan alta que comience la fusión o desnaturalización del ADN plasmídico. A temperaturas tan altas como 60°C, no se observa que la ultrafiltración de ADN plasmídico influya en su calidad, ni en su uso posterior en procedimientos biológicos moleculares o de transferencia de genes. También se observa que una temperatura elevada es beneficiosa en la eliminación de contaminación por lipopolisacárido. Se piensa que una combinación de temperatura alta, cationes monovalentes y otros componentes tales como iones de calcio y detergente pueden alterar los lipopolisacáridos en soluciones acuosas.

La etapa de contacto con la membrana de ultrafiltración se puede llevar a cabo una o varias veces para conseguir la eliminación de contaminantes. Habitualmente, un gradiente de presión en el intervalo de 0,10 a 0,21 MPa (15 a 30 psi) es adecuado para el proceso, preferiblemente aproximadamente 0,14 MPa (20 psi).

Se pueden incorporar varias otras etapas en el proceso para la purificación de ADN plasmídico de acuerdo con la presente invención además de la etapa de eliminación de contaminantes. Por ejemplo, el material retenido se puede someter a una etapa (d) de purificación adicional. Esto se puede conseguir convenientemente mediante una etapa de cromatografía típicamente para purificar adicionalmente el ADN plasmídico de contaminantes minoritarios o traza. Normalmente, sólo es necesaria una etapa de este tipo aunque etapas adicionales pueden mejorar la pureza del ADN producto. Se prefiere cromatografía de intercambio iónico, más preferiblemente cromatografía de intercambio aniónico. También es posible usar cromatografía hidrófoba. Un procedimiento típico comprende:

- (i) contacto del material retenido con una resina de intercambio aniónico en condiciones para unir ADN plasmídico;
- (ii) Opcionalmente, lavado de la resina para eliminar impurezas del ADN plasmídico; y
- (iii) elución del ADN plasmídico.

En una organización preferida también se emplea una etapa de cromatografía hidrófoba, especialmente antes de la etapa de cromatografía de intercambio iónico, para eliminar la contaminación por endotoxina y proteína celular del material retenido que contiene ADN plasmídico.

La muestra que contiene ácido nucleico usada en el proceso de la presente invención se puede preparar a partir de una solución de ácido nucleico bruto que contiene ADN plasmídico y ARN. Esta solución de ácido nucleico bruto se trata preferiblemente para proporcionar una concentración de ión calcio suficiente para precipitar una mayoría del ARN de peso molecular elevado; y se separa del mismo una fase de solución (M. Mukhopadhyay y N. C. Mandal - Anal. Biochem. 1983, 133, 265-270). La fase de solución comprende la muestra que contiene ácido nucleico usada en la etapa de eliminación de contaminante. Una concentración útil de ión de calcio está en el intervalo de 0,1 M a 0,3 M, preferiblemente de aproximadamente 0,2 M. De esta manera, se puede eliminar sustancialmente el ARN hospedador de la solución de ácido nucleico bruto para dejar del orden del 40-60% de ARN en la cantidad total de ácido nucleico. Aunque esto es una cantidad significativa para la preparación de ADN plasmídico de uso farmacéutico, en combinación con la etapa de eliminación fina de ARN se puede obtener un plásmido que esté sustancialmente libre de ARN. En términos prácticos, se puede obtener de otra manera en el mercado ADN plasmídico purificado que esté libre de ARN usando ARNasa. Sin embargo, para el uso como agente terapéutico, es esencial que se elimine la ARNasa del proceso de purificación de ADN plasmídico porque la ARNasa es una enzima procedente de animal cuyo uso en el procedimiento de purificación introduce una posibilidad de contaminación con agentes infecciosos. También se piensa que la presencia de iones calcio en la muestra que contiene ácido nucleico sometida a eliminación de contaminantes puede ayudar a la eliminación de contaminación por lipopolisacáridos y proteína de célula hospedadora.

La solución de ácido nucleico bruto usada en la etapa de precipitación con ión calcio se prepara típicamente mediante suministro de un extracto sin células que comprende ADN plasmídico y ARN; y concentración del extracto, por ejemplo, mediante ultrafiltración. El extracto se puede concentrar mediante el paso a través de una unidad de membrana de ultrafiltración que tiene un límite de exclusión por peso molecular adecuado, típicamente de al menos 30 kDa, para formar la solución de ácido nucleico bruto como un material retenido. El límite de exclusión por peso

ES 2 315 340 T3

molecular de esta membrana de ultrafiltración es preferiblemente no es mayor de aproximadamente 100 kDa y, más preferiblemente, al menos 50 kDa. Ventajosamente, se realiza el paso a través de la unidad de membrana de ultrafiltración a una temperatura en el intervalo de 30°C a 60°C, preferiblemente a aproximadamente 40°C. Dicha temperatura elevada tiene las ventajas analizadas anteriormente en relación a la etapa de eliminación de contaminante. El extracto se puede pasar a través de la unidad de membrana de ultrafiltración una o varias veces para conseguir la concentración deseada. Esto se puede llevar a cabo a un gradiente de presión en el intervalo de 0,10 MPa a 0,21 MPa (15 psi a 30 psi), preferiblemente a aproximadamente 0,14 MPa (20 psi). Puede alcanzarse una reducción en volumen en el intervalo de 3 a 15 veces. Es ventajoso en esta etapa incluir la etapa de diafiltración contra cualquier solución adecuada para el uso en la etapa posterior de precipitación con calcio del ARN.

En una realización preferida, esta etapa de ultrafiltración se lleva a cabo en presencia de un detergente, preferiblemente un detergente iónico, más preferiblemente en presencia de un detergente aniónico tal como un dodecilsulfato de metal alcalino, tal como dodecilsulfato de sodio. El mantenimiento de una concentración adecuada del detergente, típicamente aproximadamente al 0,1%, durante esta etapa mejora la eliminación de polisacáridos celulares y otros contaminantes.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá ahora en más detalle, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes Ejemplos y figuras adjuntas, en las que:

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo para la purificación de plásmido de acuerdo con la invención;

La Figura 2 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de a la ultrafiltración a alta temperatura en la etapa 7 del proceso;

La Figura 3 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de a la ultrafiltración a temperatura ambiente en la etapa 7 del proceso;

La Figura 4 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración a 50°C;

La Figura 5 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración a temperatura ambiente;

La Figura 6 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración a 50°C;

La Figura 7 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración a temperatura ambiente;

La Figura 8 muestra los resultados de electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico purificado de acuerdo con la invención;

La Figura 9 muestra los resultados de electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de plata para evaluar la eliminación de proteína (A) después de la ultrafiltración a alta temperatura, y (B) después de la ultrafiltración a temperatura ambiente;

La Figura 10 muestra los resultados del análisis de electroforesis en gel de agarosa de diafiltrado y filtrado después de la eliminación fina de ARN en presencia de cloruro sódico 0,70 M;

La Figura 11 muestra los resultados del análisis de electroforesis en gel de agarosa de diafiltrado y filtrado después de la eliminación fina de ARN en la ausencia de cloruro sódico 0,70 M;

La Figura 12 muestra los resultados del análisis de electroforesis en gel de agarosa de diafiltrado y filtrado después de la eliminación fina de ARN usando una unidad de ultrafiltración de canal de tamizado;

La Figura 13 muestra un diagrama de flujo para la purificación de plásmido de acuerdo con una realización adicional de la invención;

La Figura 14 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la ultrafiltración a alta temperatura con SDS en la etapa 7 del proceso;

La Figura 15 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la ultrafiltración a alta temperatura sin SDS en la etapa 7 del proceso;

La Figura 16 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración a 50°C;

ES 2 315 340 T3

La Figura 17 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración sin SDS;

5 La Figura 18 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración con SDS;

La Figura 19 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN usando diafiltración sin SDS;

10 La Figura 20 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN y de la concentración, con SDS; y

La Figura 21 muestra un perfil cromatográfico y el análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN y de la concentración, sin SDS.

15

Descripción detallada de la invención

El método de purificación de ADN plasmídico que se presenta a continuación es capaz de proporcionar varias ventajas, incluyendo la eliminación extremadamente eficaz de proteína y ARN de célula hospedadora antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y la posibilidad de evitar el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y proteínas procedentes de animales exógenas en el proceso de purificación de plásmido. El método puede adaptarse a la producción para la producción de ADN plasmídico a gran escala, cuya pureza satisfaga los usos terapéuticos. La velocidad del proceso es significativamente más alta en comparación con la de otras tecnologías de purificación de plásmido de uso farmacéutico que se usan industrialmente.

25

Ejemplo 1

1. Fermentación

30

Se transformó la cepa JM109 de *Escherichia coli* (ATCC 53323) con el siguiente genotipo: *F' traD36 proA⁺B⁺ lac^R Δ(lacZ)M15/e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) endA1 gyrA96 (NaI^r) thi-1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) glnV44 relA1 recA1* u otra cepa adecuada con el plásmido modelo de control de tamaño de 4276 pb (origen de replicación pMB1, Km^R) que se va a producir, de acuerdo con técnicas de laboratorio rutinarias. La cepa resultante se caracterizó por la resistencia adquirida a kanamicina además de otras características fenotípicas descritas para una cepa hospedadora. La presencia del plásmido de control transformado en la cepa transformada se ensayó mediante una extracción alcalina y electroforesis en gel. Se usó un clon transformante de la cepa que lleva el plásmido, que se ha seleccionado en base a la producción máxima de ADN plasmídico de control con un mapa de restricción correcto, para preparar un banco de células maestro (MCB) y un banco de células de trabajo (WCB).

40

El proceso de fermentación se realizó como una fermentación de un lote de 100 l en medio modificado M9 que contiene antibiótico kanamicina 15 µg/ml en un fermentador a escala piloto BIOSTAT™ U-100 (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania). Una alícuota de 1 ml de un tubo de WCB congelado se descongeló a temperatura ambiente y se transfirió rápidamente al matraz de 2 l que contenía 1 l de medio modificado M9: Na₂HPO₄ 20 g/l, KH₂PO₄ 4 g/l, NH₄Cl 1 g/l, NaCl 0,5 g/l, extracto de levadura 10 g/l, glicerol 2 ml/l, casaminoácidos 1,5 g/l, MgSO₄ 1 mM, kanamicina 15 µg/ml, pH 7,3, para inocular la preparación. El matraz se agitó a 37°C y 200 rpm durante 18 horas. Se transfirió el litro del inóculo preparado con densidad óptica de 4,0 AU a un fermentador Braun de 100 l que contenía 80 l de medio modificado M9: Na₂HPO₄ 20 g/l, KH₂PO₄ 4 g/l, NH₄Cl 1 g/l, NaCl 0,5 g/l, extracto de levadura 10 g/l, glicerol 2 ml/l, casaminoácidos 1,5 g/l, MgSO₄ 1 mM, kanamicina 15 µg/ml, pH 7,3. La fermentación se procesó bajo un control automático de parámetros de proceso tales como: temperatura - 37°C, pO₂ - 30% de saturación, pH 7,3, y velocidad de agitación - 100 rpm. Después de 5-7 horas de fermentación se añadieron al fermentador 20 l de medio precalentado a 96°C y la temperatura del medio se aumentó mediante calentamiento por vapor a 45°C para ejecución de choque térmico. La velocidad de agitación se aumentó hasta 500 rpm y se continuó la fermentación hasta que se alcanzó la fase estacionaria de proliferación celular. La densidad óptica del medio era de 10 AU. El caldo de fermentación se enfrió y las células se recogieron mediante centrifugación. La biomasa celular centrifugada se pesó y se lavó una vez con tampón de suspensión: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM. Se almacenó durante una noche en hielo 900 g de concentrado celular lavado y se sometió a purificación de ADN plasmídico o se congeló a -20°C inmediatamente después del lavado del concentrado celular.

60 2. Purificación de ADN plasmídico

Se presenta un diagrama de flujo etapa por etapa y un protocolo detallado para la purificación de plásmido de control de células de *E. coli* en la Figura 1. Este ejemplo de proceso de purificación de ADN plasmídico se detalla a continuación.

65

ES 2 315 340 T3

Etapa 1

Preparación de suspensión de biomasa

- 5 Se resuspendieron 250 g de concentrado celular de *E. coli* en tampón de suspensión (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) a una proporción de 1 gramo de biomasa celular húmeda/5 ml de tampón y se mezcló para dar una suspensión homogénea de células.

Etapa 2

10

Lisis alcalina de células de E. coli

- 15 Se añadieron 1500 ml de la suspensión resultante de la etapa 1 a 3125 ml de tampón de lisis (NaOH 0,2 M, SDS al 1%, glucosa 0,1 M) en un recipiente de vidrio y se agitó suavemente con mezclador durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 3

20

Precipitación mediante neutralización con acetato de sodio

Se añadieron 2375 ml de solución de CH₃COONa 1,5 M, pH 4,8 a los 4625 ml de suspensión de células lisadas y se mezcló durante 20 minutos para formar una suspensión uniforme con residuos celulares precipitados. La suspensión de residuos celulares precipitados se dejó durante 20 minutos más para formar sedimentación de residuos.

25

Etapa 4

Eliminación de residuos celulares

- 30 Se sometió el residuo celular de células a centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se recogieron 6520 ml de sobrenadante en un frasco de plástico de volumen apropiado. Se neutralizó la solución de ácidos nucleicos obtenida a pH 7,7 +/- 0,5 mediante la adición de 650 ml de solución de Tris base 2,5 M. El volumen de la solución final fue de 7170 ml. La solución de ácidos nucleicos se dividió en dos porciones y se llevó a procesos de ultrafiltración caliente y fría en paralelo.

35

Etapa 5

Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN) (en alta temperatura)

- 40 Se concentraron 4000 ml de solución a pH 7,7 +/- 0,5 que contiene ácido nucleico (AN) neutralizada usando tres Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de MWCO (límite de peso molecular) de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en un dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). El área total de filtración era de 0,21 m². Se pueden usar casetes de canal de tamizado de MWCO de 30 kDa o 50 kDa, o 70 kDa o 100 kDa con membranas de ultrafiltración para concentración de AN. Se prefiere el uso de membranas de MWCO de hasta 70 kDa para plásmidos de menos de 45 4000 pb de tamaño para evitar la pérdida de plásmido en el filtrado. Es preferible la neutralización de la solución de AN antes de la concentración con solución de Tris base hasta pH 8,0. La temperatura de la solución de AN filtrada en el experimento fue de +40 +/- 2°C, la velocidad de suministro de la solución fue de 1100 +/- 50 ml/min y la presión en la unidad de ultrafiltración fue de 0,14 +/- 0,01 MPa (20 +/- 2 psi). La velocidad media de flujo de filtrado fue de 120 +/- 5 ml/min.

50

- El volumen inicial de solución de AN neutralizada se redujo más de diez veces mediante ultrafiltración hasta 400 ml y se añadieron posteriormente 800 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM (tampón TE) para diluir la solución de AN concentrada tres veces. Los ciclos de diafiltración/concentración de AN se repitieron dos veces más. El diafiltrado final se decantó, el sistema se lavó abundantemente con tampón TE para recoger un AN residual y se 55 combinó la solución lavada con el diafiltrado decantado. Se llevaron los 600 ml resultantes del volumen de combinado a la precipitación inicial de ARN con CaCl₂.

Etapa 5

60

Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN) (a temperatura ambiente)

- Se concentraron 3170 ml de solución a pH 7,7 +/- 0,5 que contiene ácido nucleico (AN) neutralizada usando la misma tecnología que en la ultrafiltración a temperatura elevada, excepto porque la ultrafiltración se realizó a temperatura ambiente. Es preferible la neutralización de la solución de AN antes de la concentración con solución de 65 Tris base hasta pH 8,0. Se realizó ultrafiltración de solución de AN a temperatura ambiente, puesto que a temperaturas más bajas que 15-17°C comienza a separarse por precipitación el complejo SDS/proteína de la solución, bloqueando de esta forma la membrana de ultrafiltración y disminuyendo significativamente la velocidad de proceso. Como en el ejemplo anterior (alta temperatura) la velocidad de suministro de la solución fue de 1100 +/- 50 ml/min y la presión en

ES 2 315 340 T3

la unidad de ultrafiltración fue de 0,14 +/- 0,01 MPa (20 +/- 2 psi). Sin embargo, la velocidad media de flujo de filtrado fue sólo de 58 +/- 5 ml/min. El volumen inicial de solución de AN neutralizada se redujo más de diez veces mediante ultrafiltración hasta 315 ml y se añadieron 630 ml de tampón TE para diluir volumen de solución de AN concentrada hasta tres veces. El volumen de la solución de AN se redujo cuatro veces mediante la próxima etapa de diafiltración. Los ciclos de diafiltración/concentración se repitieron dos veces. El diafiltrado final se decantó y el sistema se lavó abundantemente con tampón TE para recoger un AN residual que se combinó con el diafiltrado decantado. Se llevaron 520 ml del volumen combinado a la precipitación inicial de ARN con CaCl₂.

Etapa 6

Precipitación inicial de ARN con CaCl₂

600 ml de la solución de AN resultante del procedimiento de ultrafiltración a alta temperatura y 520 ml obtenidos en la ultrafiltración a temperatura ambiente se ajustaron hasta una concentración de CaCl₂ 0,2 M mediante la adición de 150 ml y 130 ml, respectivamente, de solución de CaCl₂ 1 M a temperatura ambiente. Se mantuvo la suspensión obtenida sin agitación durante aproximadamente 60 minutos antes de la centrifugación posterior.

Etapa 7

Recuperación de solución de ADN plasmídico bruto

El sobrenadante que contiene ADN plasmídico después de la centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente se recogió en los cilindros de medición. Ambas muestras de ADN plasmídico se analizaron en paralelo mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose HP. Los perfiles cromatográficos y los resultados del análisis se presentan en las figuras 2 y 3.

La Figura 2 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del sobrenadante que contiene ADN plasmídico después de la Etapa 7 usando ultrafiltración a alta temperatura: "minipreparación" de cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 6 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 80 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Ret ml	Área/Área de Pico (volumen)%	Altura mAU
1	ARN/polisacáridos	8,03	42,08	29,210
2	formas relajadas de ADN plasmídico	39,17	3,09	5,190
3	forma superenrollada de ADN plasmídico	42,62	54,83	35,420

Área total = 182,2107 mAU*ml

Área en picos evaluados = 163,2895 mAU*ml

Proporción área de pico/área total = 0,896158

Anchura de pico total = 18,57 ml

Calculado de: pmokmil4 05:1_UV2_260nm

Basal: pmokmil4 05:1_UV2_260nm@02,BASE

Rechazo de pico en:

Máximo número de picos: 5

Ajustes de filtro de picos actual:

Máximo número de picos: 20

ES 2 315 340 T3

La Figura 3 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del sobrenadante que contiene ADN plasmídico después de la Etapa 7 usando ultrafiltración a temperatura ambiente: “minipreparación” de cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 6 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 80 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Ret ml	Área/Área de Pico (volumen)%	Altura mAU
1	ARN/polisacáridos	8,06	38,83	23,660
2	formas relajadas de ADN plasmídico	37,95	2,89	3,830
3	forma superenrollada de ADN plasmídico	41,63	58,28	32,980

Área total = 148,9238 mAU*ml

Área en picos evaluados = 141,9435 mAU*ml

Proporción área de pico/área total = 0,953129

Anchura de pico total = 19,55 ml

Calculado de: pmokmil4 06:1_UV2_260nm

Basal: pmokmil4 06:1_UV2_260nm@02,BASE

Rechazo de pico en:

Máximo número de picos: 5

Ajustes de filtro de picos actual:

Máximo número de picos: 20

Etapa 8

Eliminación fina de ARN (en alta temperatura)

Antes de la eliminación de ARN, se diluyeron 725 ml de la solución de ADN plasmídico dos veces hasta 1450 ml con Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 65$ mS/cm (solución de tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP) y se calentó hasta 50 +/- 2°C. Se diafiltró la solución que contiene ADN plasmídico mediante el uso de tres Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de MWCO de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en un dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). El área total de filtración fue de 0,21 m². Se usó tampón de carga para la cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP que contenía alta concentración de NaCl y alta temperatura para la eliminación adicional de ARN mediante diafiltración de solución de ADN plasmídico. La diafiltración en la solución de tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónica en Q Sepharose HP facilita la transición de proceso a la siguiente etapa de cromatografía de intercambio aniónico, ya que la composición de la solución tampón de ADN plasmídico después de la diafiltración coincide con la que se usa para el equilibrado del sorbente, y de esta manera cualquier efecto de concentración iónica indeseable se puede evitar durante la cromatografía.

El volumen inicial de la solución de ADN se redujo seis veces hasta 250 ml mediante ultrafiltración y se añadió tampón de carga para restaurar el volumen inicial de 1450 ml. Se realizaron cinco ciclos de diafiltración a +50 +/- 2°C. El diafiltrado se decantó y el sistema se lavó abundantemente con tampón para recoger un ADN plasmídico residual que se combinó con el diafiltrado decantado. Se llevaron 550 ml de volumen combinado a cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP.

Se analizó el ADN plasmídico obtenido en el proceso de diafiltración a alta temperatura mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP. El perfil cromatográfico y los resultados del análisis se presentan en la figura 4.

ES 2 315 340 T3

La Figura 4 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a temperatura de +50°C: “minipreparación” de cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 16 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 64$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 120 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Ret ml	Área/Área de Pico (volumen)%	Altura mAU
1	polisacáridos	8,44	0,84	17,720
2	ARN	19,70	2,11	19,690
3	formas relajadas de ADN plasmídico	84,17	4,16	56,220
4	forma superenrollada de ADN plasmídico	92,61	92,89	569,890

Número total de picos detectados = 32

Área total = 4725,6799 mAU*ml

Área en picos evaluados = 4704,8508 mAU*ml

Proporción área de pico/área total = 0,995592

Anchura de pico total = 100,47 ml

Calculado de: pMOKmIL4 04:1_UV2_260nm

Basal: pMOKmIL4 04:1_UV2_260nm@02, BASE3

Rechazo de pico en:

Máximo número de picos: 20

Ajustes de filtro de picos actual:

Máximo número de picos: 20

Etapa 8

Eliminación fina de ARN (a temperatura ambiente)

Antes de la eliminación de ARN, se diluyeron 618 ml de la solución de ADN plasmídico dos veces hasta 1240 ml con Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 65$ mS/cm (solución de tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP) a temperatura ambiente. Se diafiltró una solución que contenía ADN plasmídico usando Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de MWCO de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en un dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). Se usó tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP que contenía alta concentración de NaCl para la eliminación adicional de ARN y diafiltración de la solución de ADN plasmídico a temperatura ambiente. El volumen inicial de la solución de ADN se redujo seis veces hasta 200 ml mediante ultrafiltración y se añadió tampón de carga para restaurar el volumen inicial de 1200 ml. Se realizaron cinco ciclos de diafiltración a temperatura ambiente. El diafiltrado se decantó y el sistema se lavó abundantemente con tampón para recoger un ADN plasmídico residual que se combinó con diafiltrado decantado. Se llevaron 410 ml de volumen combinado a una cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP. Se analizó el ADN plasmídico obtenido en el proceso de diafiltración a temperatura ambiente mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP. El perfil de cromatografía y los resultados del análisis se presentan en la figura 5.

ES 2 315 340 T3

La figura 5 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a temperatura ambiente: “minipreparación” de cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 16 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 64$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 120 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Ret ml	Área/Área de Pico (volumen)%	Altura mAU
1	polisacáridos	8,47	1,05	21,780
2	ARN	19,19	5,26	47,310
3	formas relajadas de ADN plasmídico	84,52	2,56	44,780
4	forma superenrollada de ADN plasmídico	92,70	91,13	573,800

Área total = 4825,3857 mAU*ml
 Área en picos evaluados = 4777,7240 mAU*ml
 Proporción área de pico/área total = 0,990123
 Anchura de pico total = 104,03 ml
 Calculado de: pMOKmIL4 03:1_UV2_260nm
 Basal: pMOKmIL4 03:1_UV2_260nm@02,BASE
 Rechazo de pico en:
 Máximo número de picos: 20
 Ajustes de filtro de picos actual:
 Máximo número de picos: 20

Etapa 9

Cromatografía de intercambio aniónico

430 cm³ de Q Sepharose HP (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) en columna cromatográfica XK-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) conectada a un sistema cromatográfico AktaExplorer 100Air (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) se equilibraron con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 65$ mS/cm a un caudal de 46 cm/h hasta que apareció una curva de conductividad eléctrica estable en un monitor o registrador. Se controló el proceso cromatográfico mediante el software para Windows NT Unicorn 3.00. Se realizó la purificación cromatográfica de ambas preparaciones de muestra de plásmido usando la misma columna a los mismos parámetros de proceso, mediante regeneración del sorbente antes de cada cromatografía. Ambas soluciones de ADN plasmídico obtenidas en ultrafiltración a alta temperatura o a temperatura ambiente se aplicaron en un intercambiador aniónico a un caudal de 46 cm/h. Se llevó a cabo la elución del ADN plasmídico adsorbido con una extensión de volumen de 8 columnas de un gradiente creciente lineal desde 0,70 M hasta 0,90 M de NaCl en tampón TE, pH 8,0 a un caudal de 43 cm/h. Se aumentó la conductividad eléctrica de una solución de tampón de 65 mS/cm a 84 mS/cm. Se recogieron fracciones de 45 ml. Se analizaron fracciones cromatográficas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se combinaron las fracciones que contenían ADN plasmídico superenrollado y se obtuvieron los siguientes volúmenes finales de ADN plasmídico: 495 ml de ADN plasmídico a partir del proceso de ultrafiltración a alta temperatura y 450 ml de ADN plasmídico a partir del proceso de ultrafiltración a temperatura ambiente. Los perfiles cromatográficos de ambas soluciones de ADN plasmídico se presentan en figuras 6 y 7.

La Figura 6 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a una temperatura de +50°C. Cromatografía de intercambio aniónico semipreparativa en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 430 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH

ES 2 315 340 T3

8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal de gradiente - 43 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

5	Nº	Nombre del pico	Ret ml	Área/Área de Pico (volumen)%	Altura mAU
10	1	ARN/polisacáridos	699,15	1,51	49,930
	2	formas relajadas de ADN plasmídico	3491,40	6,44	396,430
15	3	forma superenrollada de ADN plasmídico	4095,21	92,05	4774,220
	Área total = 1504886,5008 mAU*ml				
	Área en picos evaluados = 1501728,1830 mAU*ml				
20	Proporción área de pico/área total = 0,997901				
	Anchura de pico total = 2085,54 ml				
	Calculado de: pMOKmIL4 01:1_UV2_260nm				
25	Basal: pMOKmIL4 01:1_UV2_260nm@02,BASE1				
	Rechazo de pico en:				
	Máximo número de picos: 25				
30	Ajustes de filtro de picos actual:				
	Máximo número de picos: 20				

35 La Figura 7 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del ADN plasmídico recibido después de la eliminación fina de ARN (etapa 8) usando diafiltración a temperatura ambiente. Cromatografía de intercambio aniónico semipreparativa en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 430 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal de gradiente - 43 cm/h. El análisis del cromatograma es como sigue:

40	Nº	Nombre del pico	Ret ml	Área/Área de Pico (volumen)%	Altura mAU
45	1	ARN/polisacáridos	833,15	3,02	110,160
	2	formas relajadas de ADN plasmídico	3390,77	6,38	294,960
50	3	forma superenrollada de ADN plasmídico	4029,57	90,60	3890,120
	Área total = 1083119,1953 mAU*ml				
	Área en picos evaluados = 1083112,7265 mAU*ml				
55	Proporción área de pico/área total = 0,999994				
	Anchura de pico total = 1874,38 ml				
	Calculado de: pmokmil4 02:1_UV2_260nm				
60	Basal: pmokmil4 02:1_UV2_260nm@02,BASE				
	Rechazo de pico en:				
	Máximo número de picos: 25				
65	Ajustes de filtro de picos actual:				
	Máximo número de picos: 20				

ES 2 315 340 T3

Etapa 10

Diafiltración de ADN plasmídico combinado y concentración de ADN

5 Las soluciones de ADN plasmídico combinado de ambas preparaciones de plásmido se diafiltraron en paralelo usando Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de MWCO de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). Se usó tampón TE filtrado a $0,22 \mu\text{m}$ para la diafiltración de las soluciones de ADN plasmídico. El volumen inicial de la solución de ADN se redujo seis veces mediante ultrafiltración y se añadió
10 tampón TE para restaurar el volumen inicial. Se realizaron tres ciclos de diafiltración. Se redujo volumen de diafiltrado de ADN plasmídico en el último ciclo de diafiltración para obtener una concentración de ADN en el intervalo de 4-5 mg/ml. Se decantó el diafiltrado y el sistema de ultrafiltración se lavó abundantemente con un volumen de tampón TE para recoger el ADN plasmídico residual y diluir el ADN hasta una concentración de 1,8-2,2 mg/ml.

15 Etapa 11

Preparación de ADN plasmídico a granel

La solución de ADN plasmídico a una concentración final se preparó y se sometió a la filtración estéril en recipientes apirógenos. Se tomaron muestras para control de calidad. Se etiquetaron los recipientes con una descripción del n° del lote producto, volumen, concentración, fecha de producción y se almacenaron congelados.

Se presentan rendimientos de ADN plasmídico de ensayo después del proceso de purificación descrito anteriormente en la Tabla 1 para ultrafiltración a alta temperatura y en la Tabla 2 para ultrafiltración a temperatura ambiente, se presenta el curso de la eliminación de ARN controlado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en la Figura 8, y se muestra el curso de la eliminación de proteína hospedadora controlado mediante SDS-PAGE al 10% con tinción de plata, en la Figura 9.

La Figura 8 muestra un curso de la purificación de ADN plasmídico controlado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%: carril 1 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331, Fermentas AB, Lituania). Tamaño de fragmentos (pb): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

Los carriles 2-8 de la Figura representan un método de ultrafiltración a alta temperatura: carril 2 - solución de ácido nucleico (AN) después de la etapa de centrifugación de residuos celulares, carril 3 - solución de ácido nucleico después de la etapa de concentración y diafiltración de AN, carril 4 - filtrado después de la concentración y diafiltración de AN, carril 5 - solución de AN después de la precipitación inicial de ARN con CaCl_2 , carril 6 - concentrado de solución de AN después de la etapa de eliminación fina de ARN, carril 7 - filtrado después de la etapa de eliminación fina de ARN, carril 8 - fracciones de ADN plasmídico combinadas después de la cromatografía de intercambio aniónico. Los carriles 9-15 representan un método de ultrafiltración a temperatura ambiente: carril 9 - solución de ácido nucleico (AN) después de la etapa de centrifugación de residuos celulares, carril 10 - solución de AN después de la etapa de concentración y diafiltración de AN, carril 11 - filtrado después de concentración y diafiltración de AN, carril 12 - solución de AN después de precipitación inicial de ARN con CaCl_2 , carril 13 - concentrado de solución de AN después de la etapa de eliminación fina de ARN, carril 14 - filtrado después de la etapa de eliminación fina de ARN, carril 15 - fracciones de ADN plasmídico combinadas después de la cromatografía de intercambio aniónico.

La Figura 9 muestra un curso de la eliminación de proteína durante las etapas de purificación de ADN plasmídico por ultrafiltración a temperatura alta y ambiente mediante electroforesis en PAGE al 10% con tinción de plata.

De acuerdo con la Figura, el panel A muestra la proteína restante en ultrafiltración a alta temperatura; el panel B muestra la proteína restante en ultrafiltración a temperatura ambiente:

carril 1 - solución de ácido nucleico después de la etapa de centrifugación de residuos celulares, carril 2 - concentrado de solución de ácido nucleico después de la etapa de concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN), carril 3 - filtrado después de la etapa de concentración y diafiltración de ácido nucleico, carril 4 - solución de AN después de la etapa de precipitación inicial de ARN con CaCl_2 , carril 5 - filtrado después del primer ciclo de diafiltración durante la etapa de eliminación fina de ARN, carril 6 - filtrado después del segundo ciclo de diafiltración, carril 7 - filtrado después del tercer ciclo de diafiltración, carril 8 - filtrado después del quinto ciclo de diafiltración, carril 9 - filtrado final combinado después de la etapa de eliminación fina de ARN, carril 10 - concentrado de solución de AN final después de la etapa de eliminación fina de ARN, carril 11 - ADN plasmídico después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, carril 12 - Marcador de pesos moleculares de proteínas (#SM0431, Fermentas AB, Lituania), kDa: 116,0, 66,2, 45,0, 35,0, 25,0, 18,4, 14,4.

Es evidente a partir de los datos presentados que la elevación de temperatura desde la temperatura ambiente (20°C) hasta 40°C durante la concentración de la solución de AN (Etapa 5) permitió aumentar la velocidad de ultrafiltración (velocidad media de flujo de filtrado) aproximadamente dos veces, es decir desde 58 hasta 120 ml/min en el experimento descrito, mientras se mantienen los mismos parámetros de proceso de ultrafiltración, concretamente, la

ES 2 315 340 T3

velocidad de suministro de la solución de AN (1100 ml/min) y la presión en la unidad de ultrafiltración (0,14 MPa (20 psi)), y posteriormente se redujo la duración de la etapa de concentración al menos dos veces.

La diafiltración y la concentración de la solución de AN en tampón TE en la etapa 5 cuando se sigue de un tratamiento posterior con CaCl_2 permite la eliminación de la mayoría de ARN, ADN genómico, proteínas celulares y grandes cantidades de lipopolisacáridos de *E. coli*. El análisis electroforético de ADN (carriles 3 y 5 en la Figura 8) y el análisis de SDS PAGE (carriles 2 y 4 en la Figura 9), así como el análisis cromatográfico de ADN plasmídico (Figuras 2 y 3) indican que la concentración y diafiltración de la solución de AN aumentaron la eficacia del tratamiento posterior con CaCl_2 y redujeron eficazmente la cantidad de contaminantes. De acuerdo con nuestros datos, el tratamiento con CaCl_2 realizado inmediatamente después de la etapa de neutralización con acetato (Etapa 3, 4) no es tan eficaz y se retienen en la solución cantidades significativamente más altas de contaminantes originarios de *E. coli*, tales como diferentes ARN y sus productos de degradación.

La diafiltración de ARN a temperatura de 50°C y alta concentración de NaCl (0,70 M) en la etapa 8 permitió reducir la cantidad de contaminantes de ARN/polisacárido/proteína hasta el 1,51% de acuerdo con la absorción a 260 nm, mientras que la misma etapa realizada a temperatura ambiente redujo la cantidad total de sustancias contaminantes hasta el 3,01% de acuerdo con los datos de la cromatografía de intercambio aniónico semipreparativa (Figuras 6, 7). Teniendo en cuenta que habitualmente los polisacáridos constituyen aproximadamente el 30% de los picos de ARN/polisacáridos (datos de las Figuras 4, 5), la cantidad final de ARN en la solución de ADN plasmídico después de la etapa de eliminación fina de ARN a temperatura de 50°C constituyó sólo aproximadamente el 1% de la absorción total a 260 nm. La etapa de eliminación fina de ARN que se llevó a cabo a temperatura ambiente también fue bastante eficaz, sin embargo, la cantidad final de ARN constituyó el 2%. De acuerdo con los resultados del análisis de SDS PAGE (Figura 9), las proteínas celulares restantes después de la etapa de precipitación inicial de ARN con CaCl_2 se eliminaban eficazmente durante la diafiltración en la etapa 8 (carriles 4 y 10). Además, los datos experimentales indican que la diafiltración a 50°C da como resultado la cantidad de proteínas contaminantes más baja que en el mismo procedimiento realizado a la temperatura ambiente (Figura 9, carril 10). La Figura 10 muestra la eficacia del procedimiento de eliminación fina de ARN, en presencia de NaCl 0,70 M. Los resultados mostrados son del análisis electroforético de diafiltrado y filtrado, obtenidos mediante filtración de la solución de AN a través de canal de tamizado de MWCO 100 kDa: carril 1 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331, Fermentas AB, Lituania), carril 2 - patrón de ADN plasmídico, carril 3 - solución inicial ARN/ADN (solución de AN), carriles 4 y 5 - concentrado de solución de AN (material retenido) y filtrado (material permeado) después del ciclo I de diafiltración, respectivamente, carriles 6 y 7 - después del ciclo II, carriles 8 y 9 - después del ciclo III, carriles 10 y 11 - después del ciclo IV, carriles 12 y 13 - después del ciclo V, carriles 14 y 15 - solución de AN final combinado, (material retenido) y filtrado (material permeado). Los resultados indican que se prefiere usar varios ciclos de diafiltración en presencia de alta concentración de sal para obtener la eliminación fina de ARN completa.

Por el contrario, la Figura 11 muestra que el procedimiento de eliminación fina de ARN sin NaCl 0,70 M es ineficaz. Los resultados mostrados son del análisis electroforético de diafiltrado y filtrado obtenidos mediante filtración de la solución de AN a través del canal de tamizado de MWCO de 100 kDa: carril 1 - solución de ARN/ADN inicial (solución de AN), carriles 2 y 3 - concentrado de solución de AN (material retenido) y filtrado después del ciclo I de diafiltración, respectivamente, carriles 4 y 5 - después del ciclo II, carriles 6 y 7 - después del ciclo III, carriles 8 y 9 - después del ciclo IV, carriles 10 y 11 - después del ciclo V, carriles 12 y 13 - después del ciclo VI, carriles 14 y 15 - solución de AN final combinado (material retenido) y filtrado (material permeado), carril 16 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331, Fermentas AB, Lituania). Sin sal no hay eliminación de ARN de bajo peso molecular durante el proceso.

La Figura 12 proporciona pruebas de que el procedimiento de eliminación fina de ARN en presencia de NaCl 0,70 M transcurre sin formación de capas de gel cuando se usa una unidad de ultrafiltración de canal de tamizado. Los resultados mostrados son del análisis electroforético de diafiltrado y filtrado, obtenidos mediante filtración de solución de AN a través de canal de tamizado de MWCO de 300 kDa: carril 1 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331, Fermentas AB, Lituania), carril 2 - solución inicial de ARN/ADN (solución de AN), carriles 3 y 4 - concentrado de solución de AN (material retenido) y filtrado (material permeado) después del ciclo I de diafiltración, respectivamente, carriles 5 y 6 - después del ciclo II, carriles 7 y 8 - después del ciclo III, carriles 9 y 10 - después del ciclo IV, carriles 11 y 12 - después del ciclo V, carriles 13 y 14 - después del ciclo VI, carriles 15 y 16 - solución de AN final combinado, (material retenido) y filtrado (material permeado). Cuando se usan membranas de canal de tamizado de MWCO de 300 kDa en lugar de membranas de canal abierto como en el documento WO98/05673, se observa pérdida de ADN plasmídico de gran tamaño en el material permeado, debido a la formación minimizada de la capa de gel en la superficie de la membrana. La Etapa 9 de la cromatografía de intercambio aniónico constituye la etapa final del proceso de purificación de ADN plasmídico, después de lo cual las características del ADN plasmídico obtenido se ajustan a los requisitos para ADN de uso terapéutico (la concentración de endotoxina ya es más baja que 0,1 EU/ μg de ADN, tablas 1 y 2). La etapa de diafiltración que se usa después permite obtener la preparación final de ADN plasmídico purificado disuelto en la solución que tiene la composición deseada.

65

ES 2 315 340 T3

TABLA 1

Resultados de purificación de ADN plasmídico usando un método de ultrafiltración a alta temperatura

Fase de purificación	Volumen, ml	Contenido de endotoxina, EU/ml	Cantidad total de ácido nucleico, mg	Contenido ARN/ADN		Rendimiento de ADN, %	
				Cantidad de ARN, mg	Cantidad de ADN, mg		
Eliminación de residuo celular, sobrenadante	4000	<1000000		-	-		
Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN), concentrado de AN	600	>100000		-	-		
Precipitación inicial de ARN con CaCl ₂ , sobrenadante	725	<1250	592	214	378	100	
Eliminación fina de ARN	Concentrado	550	>800	377	6	371	98
	Diafiltrado	7200	<1250	208	208	-	-
Cromatografía de intercambio aniónico, combinación de fracciones adecuadas	495	<50	317	0	317	84	

TABLA 2

Resultados de purificación de ADN plasmídico usando un método de ultrafiltración a temperatura ambiente

Fase de purificación	Volumen, ml	Contenido de endotoxina, EU/ml	Cantidad total de ácido nucleico, mg	Contenido ARN/ADN		Rendimiento de ADN, %
				Cantidad de ARN, mg	Cantidad de ADN, mg	
Eliminación de residuo celular, sobrenadante	3170	<1000000		-	-	
Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN), concentrado de AN	520	>100000		-	-	

ES 2 315 340 T3

Fase de purificación	Volumen, ml	Contenido de endotoxina, EU/ml	Cantidad total de ácido nucleico, mg	Contenido ARN/ADN		Rendimiento de ADN, %	
				Cantidad de ARN, mg	Cantidad de ADN, mg		
Precipitación inicial de ARN con CaCl ₂ , sobrenadante	618	<1250	449	151	298	100,0	
Eliminación fina de ARN	Concentrado	410	<2500	287	7	280	94
	Diafiltrado	6040	<1250	105	144	-	-
Cromatografía de intercambio aniónico, combinación de fracciones adecuadas	450	<50	252	0	252	84	

Ejemplo 2

1. Fermentación

Se realizó fermentación como se describe en el Ejemplo 1.

2. Purificación de ADN plasmídico

Se presentan en la Figura 13 un diagrama de flujo etapa por etapa y un protocolo detallado para purificación de plásmido de control de células de *E. coli*. Este ejemplo de proceso de purificación de ADN plasmídico se detalla más adelante.

Etapa 1

Preparación de suspensión de biomasa

Se resuspendieron 200 g de concentrado celular de *E. coli* en tampón de suspensión (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) a una proporción de 1 gramo de biomasa celular húmeda/5 ml de tampón y se mezcló dar una suspensión homogénea de células.

Etapa 2

Lisis alcalina de células de E. coli

Se añadieron 1200 ml de la suspensión resultante de la etapa 1 a 2500 ml de tampón de lisis (NaOH 0,2 M, SDS al 1%, glucosa 0,1 M) en un recipiente de vidrio y se agitó suavemente con mezclador durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 3

Precipitación mediante neutralización con acetato de sodio

Se añadieron 1900 ml de solución de CH₃COONa 3 M, pH 4,8 a los 3700 ml de suspensión de células lisadas y se mezcló durante 10 minutos para formar una suspensión uniforme con residuo celular precipitado.

ES 2 315 340 T3

Etapa 4

Eliminación de residuos celulares

5 Se sometió el residuo celular de células a centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 18°C y se recogieron 4880 ml de sobrenadante en un frasco de plástico de volumen apropiado. Se neutralizó la solución de ácidos nucleicos obtenida a pH 7,5 +/- 0,5 mediante la adición de 488 ml de solución de Tris base 2,5 M y 240 ml de NaOH 5 M. El volumen de la solución final fue de 5608 ml. La solución de AN se dividió en dos porciones iguales y se llevó a proceso de ultrafiltración con SDS al 0,1% y sin SDS al 0,1% en paralelo.

10

Etapa 5

Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN) (con SDS al 0,1%)

15

Se concentraron 2804 ml de solución a pH 7,5 +/- 0,5 que contiene ácido nucleico (AN) neutralizada usando dos Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de NMWL (límite de peso molecular nominal) de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en un dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). El área total de filtración fue de 0,14 m². Se pueden usar cassetes de canal de tamizado de NMWL de 30 kDa o 50 kDa, o 70 kDa o 100 kDa con membranas de ultrafiltración para concentración de AN. Se prefiere el uso de membranas de NMWL de hasta 70 kDa para plásmidos de menos de 4000 pb de tamaño para evitar la pérdida de plásmido en el filtrado. Es preferible la neutralización de la solución de AN antes de la concentración con soluciones de Tris base y NaOH hasta pH 8,0 +/- 0,5. La temperatura de la solución de AN filtrada en el experimento fue de +40 +/- 2°C, la presión en la unidad de ultrafiltración fue de 0,14 +/- 0,01 MPa (20 +/- 2 psi). La velocidad media de flujo de filtrado fue de 100 +/- 5 ml/min.

25

El volumen inicial de solución de AN neutralizada se redujo más de diez veces mediante ultrafiltración hasta 280 ml y se añadieron posteriormente 560 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, SDS al 0,1% para diluir la solución concentrada de AN tres veces. Los ciclos de diafiltración/concentración de AN se repitieron cinco veces, mientras que los ciclos de diafiltración/concentración de AN se repitieron tres veces usando solución de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM sin SDS al 0,1% (tampón TE). El diafiltrado final se decantó, el sistema se lavó abundantemente con tampón TE para recoger un AN residual y se combinó la solución lavada con el diafiltrado decantado. Se llevaron los 360 ml resultantes de volumen combinado a la precipitación inicial de ARN con CaCl₂.

35

Etapa 5

Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN) (sin SDS al 0,1%)

40

Se concentraron 2804 ml de solución a pH 7,5 +/- 0,5 que contiene ácido nucleico (AN) neutralizada usando la misma tecnología que en la Etapa 5 (con SDS al 0,1%), excepto porque se realizó ultrafiltración sin SDS al 0,1%. Es preferible la neutralización de la solución de AN antes de la concentración con soluciones de Tris base y NaOH hasta pH 8,0. Se realizó la ultrafiltración de solución de AN a una temperatura de 40 +/- 2°C. Como en el ejemplo anterior (con SDS al 0,1%) la presión en la unidad de ultrafiltración fue de 0,14 +/- 0,01 MPa (20 +/- 2 psi). La velocidad media de flujo de filtrado fue de 80 ml/min. El volumen inicial de solución de AN neutralizada se redujo más de diez veces mediante la ultrafiltración hasta 280 ml y se añadieron 560 ml de tampón (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) TE para diluir el volumen de la solución de AN concentrada hasta tres veces. El volumen de la solución de AN se redujo cuatro veces mediante la próxima etapa de diafiltración. Los ciclos de diafiltración/concentración se repitieron 6 veces. El diafiltrado final se decantó y el sistema se lavó abundantemente con tampón TE para recoger un AN residual que se combinó con el diafiltrado decantado. Se llevaron 360 ml de volumen combinado a la precipitación inicial de ARN con CaCl₂.

50

Etapa 6

Precipitación inicial de ARN con CaCl₂

360 ml de la solución de AN resultante del procedimiento de ultrafiltración con SDS al 0,1% y 360 ml obtenidos en el procedimiento de ultrafiltración sin SDS al 0,1% se ajustaron hasta una concentración de CaCl₂ 0,2 M mediante la adición de 90 ml de solución de CaCl₂ 1 M. Se mantuvo la suspensión obtenida sin agitación durante aproximadamente 30 minutos antes de la centrifugación posterior.

65

ES 2 315 340 T3

Etapa 7

Recuperación de solución de ADN plasmídico bruto

5 El sobrenadante que contiene ADN plasmídico después de la centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente se recogió en los cilindros de medición. Ambas muestras de ADN plasmídico se analizaron en paralelo mediante cromatografía de intercambio iónico en Q Sepharose HP. Los perfiles cromatográficos y los resultados del análisis se presentan en las figuras 14 y 15.

10 La Figura 14 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del sobrenadante que contiene ADN plasmídico después de la Etapa 7 usando ultrafiltración a alta temperatura con SDS al 0,1%: "minipreparación" de cromatografía de intercambio aniónico en columna de Q Sepharose HP HiTrap Q HP; volumen de columna - 5 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 64$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,95 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 60 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
1	ARN/polisacáridos	7,34	1305,3977	52,74	446,670
2	ADN genómico	56,10	6,7491	0,27	2,300
3	Forma relajada de ADN plasmídico	60,83	35,8755	1,45	21,310
4	Forma superenrollada de ADN plasmídico	65,88	1127,0944	45,54	263,830
Área total (mAU*ml)		2488,4278			
Área en picos evaluados (mAU*ml)		2475,1166			
Proporción área de pico/área total		0,994651			
Anchura de pico total (ml)		40,44			
Calculado de Basal Rechazo de pico en Máximo		rpomc po cac12 su sds01:1_UV2_260nm rpomc po cac12 su sds01:1_UV2_260nm@02,BASEC 20			
número de picos ()					
Ajustes de filtro de picos actual					

ES 2 315 340 T3

La Figura 15 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del sobrenadante que contiene ADN plasmídico después de la Etapa 7 usando ultrafiltración a alta temperatura sin: SDS al 0,1%: “minipreparación” de cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP, en columna HiTrap Q HP; volumen de columna - 5 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 64$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,95 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 60 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
1	ARN/polisacáridos	7,39	1547,9908	55,41	551,230
2	ADN genómico	56,54	17,5617	0,63	4,440
3	Forma relajada de ADN plasmídico	61,20	44,1249	1,58	24,450
4	Forma superenrollada de ADN plasmídico	66,32	1184,1590	42,38	250,810
Área total (mAU*ml)		2825,9080			
Área en picos evaluados (mAU*ml)		2793,8365			
Proporción área de pico/área total		0,988651			
Anchura de pico total (ml)		55,99			
Calculado de Basal Rechazo de pico en Máximo		rpmc po Cacl2 be sds01:1_UV2_260nm			
número de picos ()		rpmc po Cacl2 be sds01:1_UV2_260nm@02,BASEC1			
Ajustes de filtro de picos actual		20			

Etapa 8

Eliminación fina de ARN (de muestras siguientes al tratamiento en la etapa 5 con SDS al 0,1%)

Antes de la eliminación de ARN, se diluyeron 435 ml de la solución de ADN plasmídico dos veces hasta 870 ml con Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 65$ mS/cm (solución de tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónica en Q Sepharose HP) y se calentó hasta 50 +/- 2°C. Se diafiltró la solución que contiene ADN plasmídico mediante el uso de dos Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de NMWL de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, USA). El área total de filtración fue de 0,14 m². Se usó tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP que contenía alta concentración de NaCl y alta temperatura para la eliminación adicional de ARN mediante diafiltración de la solución de ADN plasmídico. La diafiltración en la solución de tampón de carga por cromatografía de intercambio aniónica en Q Sepharose HP facilita la transición de proceso a la siguiente etapa de cromatografía de intercambio aniónico, ya que la composición de la solución tampón de ADN plasmídico después de la diafiltración coincide con la que se usa para el equilibrado del sorbente, y de esta manera cualquier efecto de concentración iónica indeseable se puede evitar durante la cromatografía.

ES 2 315 340 T3

El volumen inicial de la solución de ADN se redujo cinco veces hasta 85 ml mediante ultrafiltración y se añadió tampón de carga para restaurar el volumen de 500 ml. Se realizaron cinco ciclos de diafiltración a +50 +/- 2°C. El diafiltrado se decantó y el sistema se lavó abundantemente con tampón para recoger un ADN plasmídico residual que se combinó con el diafiltrado decantado. Se llevaron 205 ml de volumen combinado a una cromatografía hidrófoba en Phenyl Sepharose 6FF. Se analizó el ADN plasmídico obtenido en el proceso de diafiltración con SDS al 0,1% mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP. El perfil cromatográfico y los resultados del análisis se presentan en la Figura 16.

La Figura 16 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a una temperatura de +50°C después de la etapa de concentración/diafiltración con SDS al 0,1%: "minipreparación" de cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP, columna HiTrap Q HP; volumen de columna - 5 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, λ = 66 mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,9 M, λ = 84 mS/cm, caudal - 60 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
1	Polisacáridos	4,01	1,0646	0,04	1,460
2	ARN	6,63	19,0362	0,79	8,510
3	Forma relajada de ADN plasmídico	39,66	86,3014	3,59	31,060
4	Forma superenrollada de ADN plasmídico	46,96	2300,2018	95,58	356,620
Área total (mAU*ml)		2413,7948			
Área en picos evaluados (mAU*ml)		2406,6040			
Proporción área de pico/área total		0,997021			
Anchura de pico total (ml)		56,85			
Calculado de Basal Rechazo de pico en Máximo		mini prepas su sds02:1_UV2_260nm mini prepas su sds02:1_UV2_260nm@02,BASEC1 20			
número de picos ()					
Ajustes de filtro de picos actual					

ES 2 315 340 T3

Etapa 8

Eliminación fina de ARN (de muestras después del tratamiento en la etapa 5 sin SDS al 0,1%)

5 Antes de la eliminación de ARN, se diluyeron 425 ml de la solución de ADN plasmídico dos veces hasta 850 ml con Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 65$ mS/cm (solución de tampón de carga para cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP) y se calentó hasta 50 +/- 2°C. Se diafiltró la solución que contiene ADN plasmídico usando Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de NMWL de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en un dispositivo de ultrafiltración
10 Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). El área total de filtración fue de 0,14 m². Se usó tampón de carga para la cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP que contenía alta concentración de NaCl y alta temperatura para la eliminación adicional de ARN y diafiltración de solución de ADN plasmídico. El volumen inicial de solución de ADN se redujo cinco veces hasta 85 ml mediante ultrafiltración y se añadió tampón de carga hasta un volumen de 500 ml. Se realizaron cinco ciclos de diafiltración a alta temperatura. El diafiltrado se
15 decantó y el sistema se lavó abundantemente con tampón para recoger un ADN plasmídico residual que se combinó con el diafiltrado decantado. Se llevaron 205 ml de volumen combinado a una cromatografía hidrófoba en Phenyl Sepharose 6FF. Se analizó el ADN plasmídico obtenido en el proceso de diafiltración mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP. El perfil cromatográfico y los resultados del análisis se presentan en la Figura 17.

20 La Figura 16 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a una temperatura de +50°C después de la etapa de concentración/diafiltración sin SDS al 0,1%: "minipreparación" de cromatografía de intercambio aniónico en Q Sepharose HP, columna HiTrap Q HP; volumen de columna - 5 cm³, tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,9 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal - 60 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)	
35	1	Polisacáridos	4,14	1,9249	0,08	1,840
	2	ARN	6,77	53,6578	2,16	25,220
40	3	Forma relajada de ADN plasmídico	40,02	75,9882	3,06	29,190
45	4	Forma superenrollada de ADN plasmídico	47,16	2353,6699	94,71	358,600
	Área total (mAU*ml)		2503,5982			
50	Área en picos evaluados (mAU*ml)		2485,2408			
	Proporción área de pico/área total		0,992668			
55	Anchura de pico total (ml)		50,93			

60

65

ES 2 315 340 T3

Calculado de Basal mini prepas be sds02:1_UV2_260nm
 Ajustes de filtro de picos actual mini prepas be sds02:1_UV2_260nm@02,BASEC2

5 Rechazo de pico en
 Máximo 20
 número de picos ()
 10 Ajustes de filtro de picos actual

Etapa 9

15 *Cromatografía hidrófoba*

85 cm³ de Phenyl Sepharose 6FF (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) en columna cromatográfica XK-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) conectada a un sistema cromatográfico AktaExplorer 100Air (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) se equilibraron con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm a un caudal de 56 cm/h hasta que apareció una curva de conductividad eléctrica estable en un monitor o registrador. Se controló el proceso cromatográfico mediante el software para Windows NT Unicorn 3.00. Se realizó la purificación cromatográfica de ambas preparaciones de muestra de plásmido usando la misma columna a los mismos parámetros de proceso, mediante regeneración del sorbente antes de cada cromatografía. Ambas soluciones de ADN plasmídico obtenidas en la ultrafiltración con SDS al 0,1% o ultrafiltración sin SDS al 0,1% se aplicaron sobre Phenyl Sepharose 6FF a un caudal de 56 cm/h. El ADN plasmídico se hizo fluir a través de ella y se recogió. Se obtuvieron volúmenes finales de ADN plasmídico: 203 ml de ADN plasmídico a partir del proceso de ultrafiltración con SDS al 0,1% y 203 ml de ADN plasmídico a partir del proceso de ultrafiltración sin SDS al 0,1%. Los perfiles cromatográficos de ambas soluciones de ADN plasmídico se presentan en las figuras 18 y 19.

30 La Figura 18 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a temperatura de +50°C, concentración/diafiltración de AN (Etapa 6) con SDS al 0,1%. Cromatografía hidrófoba en Phenyl Sepharose 6FF, columna XK-26; volumen de columna - 85 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, caudal - 56 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
1	ARN y ADN plasmídico	164,88	467276,1527	100,00	2550,710

45 Área total (mAU*ml) 471872,4674

Área en picos evaluados (mAU*ml) 467276,1527

50 Proporción área de pico/área total 0,990259

55 Anchura de pico total (ml) 202,79

Calculado de Basal Phenyl Sepharose 0101:1_UV2_260nm
 Ajustes de filtro de picos actual Phenyl Sepharose 0101:1_UV2_260nm@02,BASEC1

65 Rechazo de pico en
 Máximo 20
 número de picos ()

ES 2 315 340 T3

La Figura 19 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a una temperatura de +50°C, concentración/diafiltración de AN (Etapa 6) sin SDS al 0,1%. Cromatografía hidrófoba en Phenyl Sepharose 6FF, columna XK-26; volumen de columna - 85 cm³, tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, caudal - 56 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
1	ARN y ADN plasmídico	163,49	503668,7017	100,00	2788,110
	Área total (mAU*ml)	511791,8029			
	Área en picos evaluados (mAU*ml)	503668,7017			
	Proporción área de pico/área total	0,984128			
	Anchura de pico total (ml)	203,57			
	Calculado de Línea de base	Phenyl Sepharose 0201:1_UV2_260nm			
	Ajuste de filtro de pico actual	Phenyl Sepharose 0201:1_UV2_260nm@02,BASEC			
	Máximo número de picos ()	20			

Etapa 10

Cromatografía de intercambio aniónico

125 cm³ de Phenyl Sepharose 6FF (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) en columna cromatográfica XK-26 (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) conectada a un sistema cromatográfico AktaExplorer 100Air (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) se equilibraron con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm a un caudal de 45 cm/h hasta que apareció una curva de conductividad eléctrica estable en un monitor o registrador. Se controló el proceso cromatográfico mediante el software para Windows NT Unicorn 3.00. Se realizó una purificación cromatográfica de ambas preparaciones de muestra de plásmido usando la misma columna a los mismos parámetros de proceso, mediante regeneración del sorbente antes de cada cromatografía. Ambas soluciones de ADN plasmídico obtenidas en ultrafiltración con SDS al 0,1% o ultrafiltración sin SDS al 0,1% se aplicaron sobre un intercambiador aniónico a un caudal de 45 cm/h. Se llevó a cabo elución del ADN plasmídico adsorbido con extensión de volumen de 10 columnas de un gradiente creciente lineal de 0,70 M a 0,95 M de NaCl en tampón TE, pH 8,0 a un caudal de 45 cm/h. Se aumentó la conductividad eléctrica de una solución de tampón de 66 mS/cm hasta 84 mS/cm. Se recogieron fracciones de 20 ml. Se analizaron fracciones cromatográficas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se combinaron fracciones que contenían ADN plasmídico superenrollado y se obtuvieron los siguientes volúmenes finales de ADN plasmídico: 120 ml de ADN plasmídico a partir del proceso de ultrafiltración con SDS al 0,1% y 120 ml de ADN plasmídico a partir del proceso de ultrafiltración sin SDS al 0,1%. Los perfiles cromatográficos de ambas soluciones de ADN plasmídico se presentan en figuras 20 y 21.

La Figura 20 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis de ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a una temperatura de +50°C. Concentración/diafiltración de AN (etapa 6) con SDS al 0,1%. Cromatografía de intercambio aniónico semipreparativa en columna de Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 125 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, Tampón

ES 2 315 340 T3

B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal de gradiente - 45 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

5	Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
10	1	Forma relajada de ADN plasmídico	616,03	13638,3239	3,15	246,610
15	2	Forma superenrollada de ADN plasmídico	741,64	416982,8787	96,20	4861,060
20	Área total (mAU*ml)		43394,2683			
25	Área en picos evaluados (mAU*ml)		433471,1200			
30	Proporción área de pico/área total		0,998900			
35	Anchura de pico total (ml)		615,68			
40	Calculado de Basal		Q Sepharose HP 0102:1_UV2_260nm			
45	Ajustes de filtro de picos actual		Q Sepharose HP 0102:1_UV2_260nm@02,BASEC			
50	Máximo número de picos ()		20			

La Figura 21 muestra el perfil cromatográfico y los datos de análisis del ADN plasmídico después de la eliminación fina de ARN (Etapa 8) usando diafiltración a una temperatura de +50°C. Concentración/diafiltración de AN (Etapa 6) sin SDS al 0,1%. Cromatografía de intercambio aniónico semipreparativa de columna en Q Sepharose HP XK-16; volumen de columna - 125 cm³, Tampón A - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,70 M, $\lambda = 66$ mS/cm, Tampón B - Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,90 M, $\lambda = 84$ mS/cm, caudal de gradiente - 45 cm/h. El análisis del cromatograma es el siguiente:

55

60

65

ES 2 315 340 T3

Nº	Nombre del pico	Retención (ml)	Área (mAU*ml)	Área/Área de Pico ((volumen)%)	Altura (mAU)
1	ARN	217,29	10709,5104	2,29	58,920
2	Forma relajada de ADN plasmídico	667,67	15872,7195	3,39	297,470
3	Forma superenrollada de ADN plasmídico	795,17	441913,3352	94,33	4953,590
Área total (mAU*ml)		468832,3410			
Área en picos evaluados (mAU*ml)		468495,5651			
Proporción área de pico/área total		0,999282			
Anchura de pico total (ml)		679,16			
Calculado de Basal		Q Sepharose HP 0202:1_UV2_260nm			
Ajustes de filtro de picos actual		Q Sepharose HP 0202:1_UV2_260nm@02,BASEC			
Máximo número de picos ()		20			

Etapa 11

Diafiltración de ADN plasmídico combinado y concentración de ADN

Las soluciones de ADN plasmídico combinado de ambas preparaciones plasmídicas se diafiltraron en paralelo usando un Minisette Systems Cassettes de ultrafiltración de canal de tamizado de NMWL de 100 kDa con Omega Membrane (PALL FILTRON, Estados Unidos) instalados en un dispositivo de ultrafiltración Minisette Lab Tangential Flow (PALL FILTRON, Estados Unidos). Se usó tampón TE filtrado a 0,22 μm para diafiltración de las soluciones de ADN plasmídico. El volumen inicial de solución de ADN se redujo seis veces mediante ultrafiltración y se añadió tampón de carga para restaurar el volumen inicial. Se realizaron tres ciclos de diafiltración. Se redujo volumen de diafiltrado de ADN plasmídico en el último ciclo de diafiltración para obtener una concentración de ADN en el intervalo de 4-5 mg/ml. Se decantó el diafiltrado y el sistema de ultrafiltración se lavó abundantemente con un volumen de tampón TE para recoger el ADN plasmídico residual y diluir el ADN hasta una concentración de 1,8-2,2 mg/ml.

Etapa 12

Preparación de ADN plasmídico a granel

La solución de ADN plasmídico a una concentración final se preparó y sometió a la filtración estéril en recipientes apirógenos. Se tomaron muestras para control de calidad. Se etiquetaron recipientes con una descripción del nº de lote de producto, volumen, concentración, fecha de producción y se almacenaron congelados.

Se presentan rendimientos de ADN plasmídico de ensayo después de los procesos de purificación descritos anteriormente en la Tabla 1 para ultrafiltración con SDS al 0,1% y en la Tabla 2 para ultrafiltración sin SDS al 0,1%.

ES 2 315 340 T3

La cantidad de polisacáridos, incluyendo lipopolisacáridos, sintetizados en células de *E. coli* depende mucho de las condiciones de cultivo, tales como la proporción carbono/nitrógeno en el medio de cultivo, vida del inóculo, etc. La cantidad de polisacáridos sintetizados también depende mucho de una cepa particular de *E. coli* que se elige como productora de ADN plasmídico. Por regla general, si en el comienzo de la fermentación de *E. coli* se observa una fase de retraso de 2-3 horas, la biomasa obtenida en dicha fermentación se caracteriza por cantidades aumentadas de polisacáridos que complican significativamente la purificación adicional de ADN plasmídico y disminuyen los parámetros cualitativos del producto final. Para minimizar la influencia negativa del polisacárido en el proceso de purificación plasmídica y en la calidad, se ha modificado la composición del tampón TE usado en la Etapa 5: Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN) y se ha introducido una etapa adicional de cromatografía hidrófoba en el esquema de purificación. El mantenimiento de concentración de SDS al 0,1% durante la diafiltración permitió una eliminación más eficaz de polisacáridos celulares y otros contaminantes de producto original en comparación con el tampón TE convencional (Tris HCl 10 mM, pH 8,0 EDTA 1 mM) usado en el experimento previo. Se usa cromatografía hidrófoba como una etapa adicional que asegura que el nivel de endotoxina y contaminación proteica celular en la preparación final de ADN plasmídico se ajusta a los requisitos establecidos para compuestos farmacéuticos.

El Ejemplo N° 2 ilustra el proceso de purificación de ADN plasmídico de tipo pUC a partir de biomasa de producto de la cepa de *E. coli* JM109. Durante la fermentación de esta biomasa se registró una fase de retraso de casi 3 horas, que dio como resultado una cantidad aumentada de polisacáridos y endotoxinas. Los resultados resumidos del proceso de purificación realizado en el Ejemplo N° 2 se presentan en la Tabla 3 y en la Tabla 4. La diafiltración en la Etapa 5 contra tampón TE complementado con SDS al 0,1% permitió la preparación de solución de ADN plasmídico (concentrado después de la Etapa 8. Eliminación fina de ARN), que se caracterizó por un contenido mil veces menor de lipopolisacáridos en comparación con lo que puede obtenerse cuando se usa tampón TE convencional: 6800 EU/ml en lugar de 7000000 EU/ml respectivamente. El uso de SDS al 0,1% también mejoró la eliminación de ARN de baja masa molecular restante en la Etapa 8: eliminación fina de ARN: ARN al 0,8%, cuando se usa tampón TE con SDS al 0,1% en lugar de al 2,3%, cuando se usa tampón TE convencional. La eliminación de proteínas celulares de *E. coli* fue mucho más eficaz cuando se usó SDS al 0,1%: 45 ng/ml en lugar de 126 ng/ml. La cromatografía hidrófoba fue más eficaz cuando se usó en combinación con ultrafiltración en presencia de SDS al 0,1% y permitió una reducción adicional del nivel de contaminantes celulares de al menos diez veces, que después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico, a su vez, dio como resultado ADN plasmídico con un conjunto de parámetros de mayor calidad hasta el momento para ADN plasmídico terapéutico.

Es evidente a partir de los datos presentados que la elevación de temperatura desde la temperatura ambiente (20°C) hasta 40°C durante la concentración de solución de AN (Etapa 5) permitió aumentar de la velocidad de ultrafiltración (velocidad media de flujo de filtrado) aproximadamente dos veces, es decir, de 58 a 120 ml/min en el experimento descrito, mientras se mantuvieron los mismos parámetros de proceso de ultrafiltración, concretamente, la velocidad de suministro de la solución de AN (1100 ml/min) y la presión en la unidad de ultrafiltración (0,14 MPa (20 psi)), y se redujo posteriormente la duración de la etapa de concentración al menos dos veces.

La diafiltración y concentración de solución de AN en tampón TE en la etapa 5 cuando se sigue de tratamiento posterior con CaCl₂ en la etapa permite la eliminación de la mayoría del ARN, ADN genómico, proteínas celulares y grandes cantidades de lipopolisacáridos de *E. coli*. El análisis electroforético de ADN (carriles 3 y 5 en la Figura 20) y el análisis en SDS PAGE (carriles 2 y 4 en la Figura 21), así como el análisis cromatográfico de ADN plasmídico (Figuras 14 y 15) indican que la concentración y la diafiltración de la solución de AN aumentó la eficacia del tratamiento posterior con CaCl₂ y redujo eficazmente la cantidad de contaminantes. De acuerdo con nuestros datos, el tratamiento con CaCl₂ realizado inmediatamente después de la etapa de neutralización con acetato (Etapa 3, 4) no es tan eficaz y se retienen cantidades significativamente más altas de contaminantes originarios de *E. coli*, tales como diferentes ARN y sus productos de degradación, en la solución.

La diafiltración de ARN a una temperatura de 50°C y alta concentración de NaCl (0,70 M) en la etapa 8 permitió reducir la cantidad de contaminantes de ARN/polisacárido/proteína hasta el 1,51% de acuerdo con la absorción a 260 nm, mientras que la misma etapa realizada a temperatura ambiente redujo la cantidad total de sustancias contaminantes hasta el 3,01% de acuerdo con los datos de cromatografía de intercambio aniónico semipreparativa (Figuras 18, 19). Teniendo en cuenta que habitualmente los polisacáridos constituyen aproximadamente el 30% del pico de ARN/polisacáridos (datos de las Figuras 16, 17) la cantidad de ARN final en la solución de ADN plasmídico después de la etapa de eliminación fina de ARN a temperatura de 50°C constituye sólo aproximadamente el 1% de la absorción total a 260 nm. La etapa de eliminación fina de ARN llevada a cabo a temperatura ambiente fue bastante eficaz también, sin embargo, la cantidad final de ARN constituyó el 2%. De acuerdo con los resultados del análisis de SDS PAGE (Figura 21), las proteínas celulares restantes después de la etapa de precipitación inicial de ARN con CaCl₂ se eliminan eficazmente durante la diafiltración en la etapa 8 (carriles 4 y 10). Además, los datos experimentales indican que la diafiltración a 50°C da como resultado la cantidad de proteínas contaminantes más baja que el mismo procedimiento realizado a temperatura ambiente (Figura 21, carril 10). La etapa 9 de cromatografía de intercambio aniónico constituye la etapa final del proceso de purificación de ADN plasmídico después de lo cual las características del ADN plasmídico obtenido se ajustan a los requisitos para ADN de uso terapéutico (la concentración de endotoxina ya es más baja que 0,10 EU/μg de ADN, Tablas 3 y 4). La etapa de diafiltración usada después permite obtener la preparación final de ADN plasmídico purificado disuelto en la solución que tiene la composición deseada.

ES 2 315 340 T3

TABLA 3

Resultados de purificación de ADN plasmídico usando un método de concentración y diafiltración con SDS al 0,1%

Fase de purificación	Volumen, ml	Contenido de endotoxina, EU/ml	Cantidad de proteína de célula hospedadora, ng/ml	Cantidad total de ácido nucleico, mg	Contenido ARN/ADN		Rendimiento de ADN, %	
					Cantidad de ARN, mg	Cantidad de ADN, mg		
Eliminación de residuo celular, sobrenadante	2440				-	-		
Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN), concentrado de AN	360				-	-		
Precipitación inicial de ARN con CaCl ₂ , sobrenadante	435			268	142	126	100	
Eliminación fina de ARN	Concentrado	205	6800	45	123	1	122	97
	Diafiltrado	4000			132	132		
Cromatografía hidrófoba	203	400	3	117	1	116	92	
Cromatografía de intercambio aniónico, combinación de fracciones adecuadas	120	3	0,3	104		104	83	

ES 2 315 340 T3

TABLA 4

Resultados de purificación de ADN plasmídico usando un método de concentración y diafiltración sin SDS al 0,1%

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Fase de purificación	Volumen, ml	Contenido de endotoxina, EU/ml	Cantidad de proteína de <i>E. coli</i> hospedadora, ng/ml	Cantidad total de ácido nucleico, mg	Contenido ARN/ADN		Rendimiento de ADN, %	
					Cantidad de ARN, mg	Cantidad de ADN, mg		
Eliminación de residuo celular, sobrenadante	2440				-	-		
Concentración y diafiltración de ácido nucleico (AN), concentrado de AN	360				-	-		
Precipitación inicial de ARN con CaCl ₂ , sobrenadante	425			295	164	131	100	
Eliminación fina de ARN	Concentrado	205	7,0x10 ⁶	126	128	3	125	95
	Diafiltrado	4000			142	142		
Cromatografía hidrófoba	203	>360000	112	125	2	123	94	
Cromatografía de intercambio aniónico, combinación de fracciones adecuadas	120	2200	28	110		110	84	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para purificación de ADN plasmídico a partir de una muestra que contiene ácido nucleico que comprende ADN plasmídico y contaminantes que incluyen ARN, concerniendo dicho proceso una etapa de eliminación de contaminantes, que comprende:
- (a) tratamiento de la muestra para formar una solución de ácido nucleico que tiene una concentración de cationes monovalentes;
- 10 (b) contacto de la solución de ácido nucleico con una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de exclusión por peso molecular de al menos 30 kDa en condiciones en las que se evita la formación de una capa de gel y en las que la concentración de cationes monovalentes es de al menos aproximadamente 0,35 M durante un tiempo suficiente para eliminar sustancialmente todo el ARN y formar un material retenido que contiene ADN plasmídico; y
- 15 (c) recogida del material retenido.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos la etapa (b) comprende una etapa de diafiltración.
- 20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de catión monovalente no excede de aproximadamente 2 M.
4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el catión monovalente comprende sodio o potasio.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el límite de exclusión por peso molecular de la membrana de ultrafiltración no excede de 100 kDa.
- 30 6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el límite de exclusión por peso molecular de la membrana de ultrafiltración es de al menos 50 kDa.
7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la membrana de ultrafiltración se suministra en una unidad que genera un flujo de muestra turbulento.
- 35 8. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la membrana de ultrafiltración se suministra en una unidad de ultrafiltración de canal de tamizado.
9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de eliminación de contaminante comprende eliminación fina de ARN.
- 40 10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos la etapa (b) se realiza a una temperatura en el intervalo de 30°C a 60°C.
- 45 11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa (d) de someter el material retenido a una purificación adicional.
12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa (d) comprende:
- 50 (i) contacto del material retenido con una resina de intercambio aniónico en condiciones para unir ADN plasmídico;
- (ii) opcionalmente, lavado de la resina para eliminar impurezas del ADN plasmídico; y
- (iii) elución del ADN plasmídico.
- 55 13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el material retenido se pone en contacto con una fase sólida hidrófoba en condiciones para separar contaminantes de ADN plasmídico.
14. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra que contiene ácido nucleico se prepara a partir de una solución de ácido nucleico bruto que contiene ADN plasmídico y ARN mediante
- 60 (i) tratamiento de la solución para proporcionar una concentración de ión calcio suficiente para precipitar una mayoría del ARN; y
- 65 (ii) separación de la misma de una fase de solución que comprende la muestra que contiene ácido nucleico.

ES 2 315 340 T3

15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la concentración de ión calcio está en el intervalo de 0,1 a 0,3 M.

5 16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que la solución de ácido nucleico bruto se prepara mediante

(i) suministro de un extracto sin células que comprende ADN plasmídico y ARN; y

(ii) concentración del extracto mediante ultrafiltración.

10

17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la etapa (ii) comprende el paso del extracto a través de una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de exclusión por peso molecular de al menos 30 kDa para formar la solución de ácido nucleico bruto como un material retenido.

15

18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que al menos la etapa (ii) se realiza a una temperatura en el intervalo de 30°C a 60°C.

20

19. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que comprende además una etapa de diafiltración contra una solución adecuada para tratamiento para precipitar ARN.

20

20. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que la ultrafiltración se lleva a cabo en presencia de un detergente.

25

21. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el detergente comprende dodecilsulfato de sodio.

25

22. Un proceso para preparación de ADN plasmídico de uso farmacéutico, que comprende un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

30

35

40

45

50

55

60

65

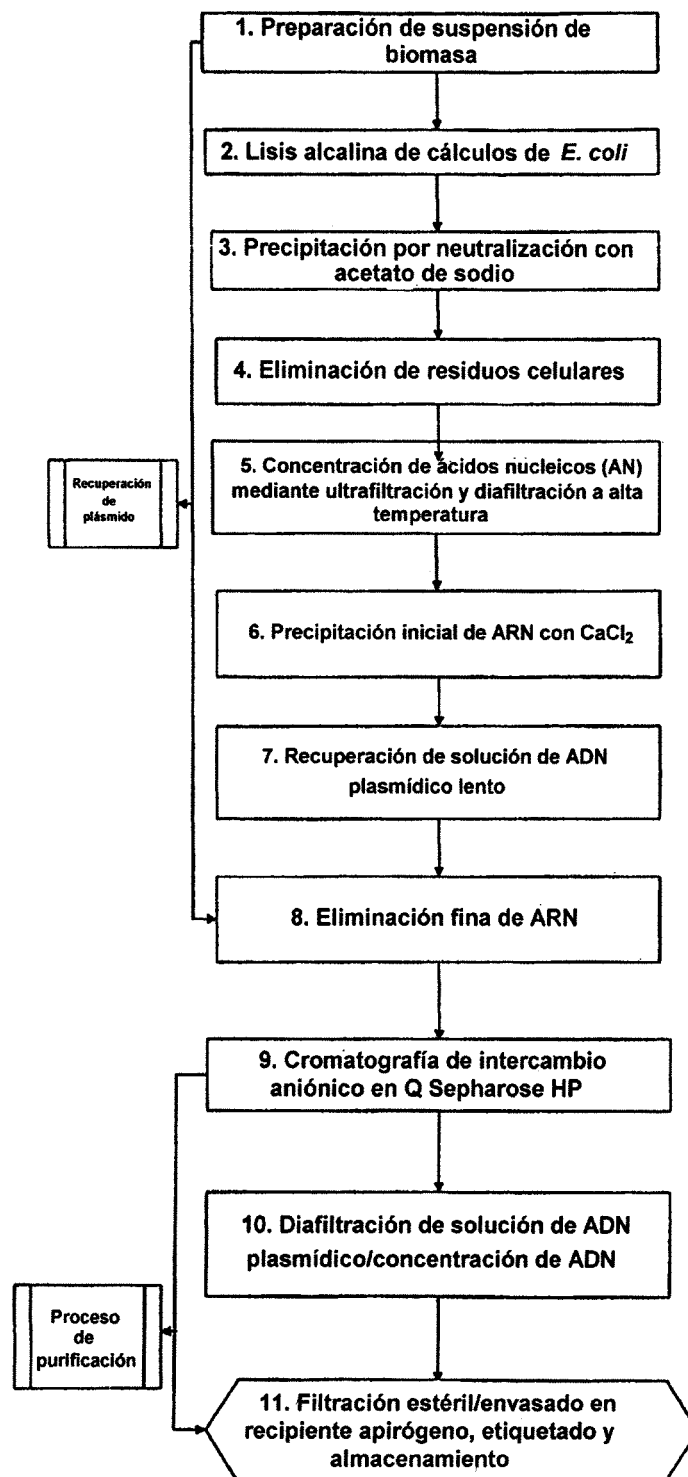


Figura 1

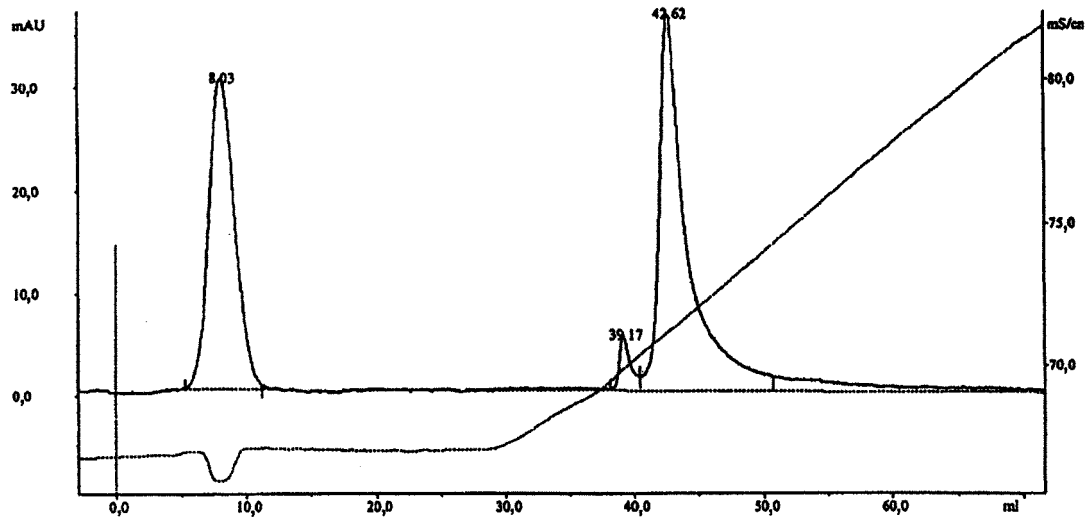


Figura 2

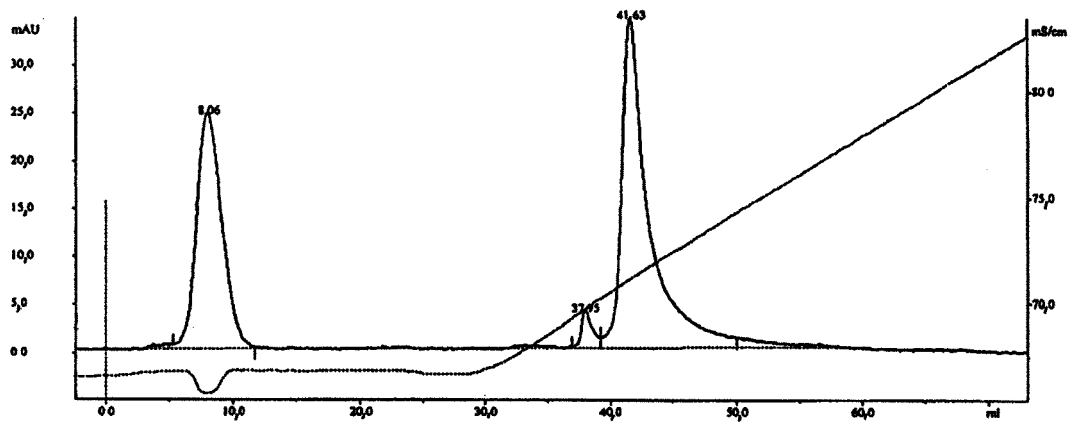


Figura 3

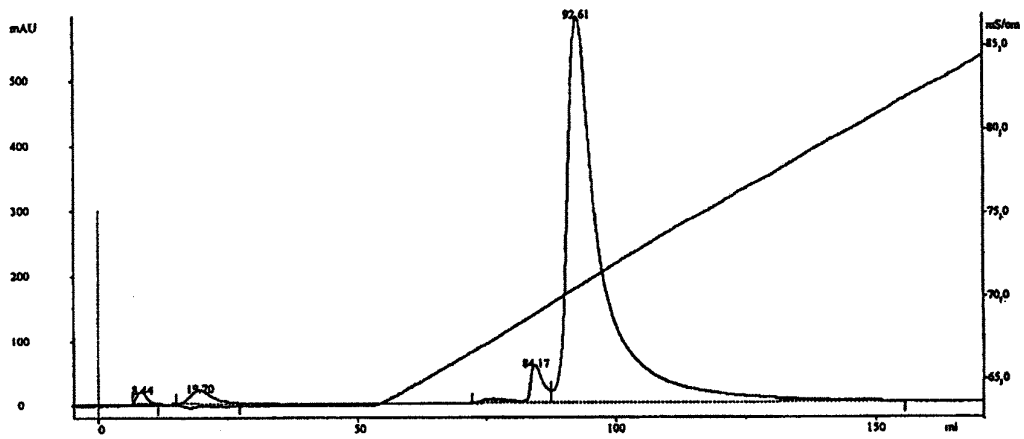


Figura 4

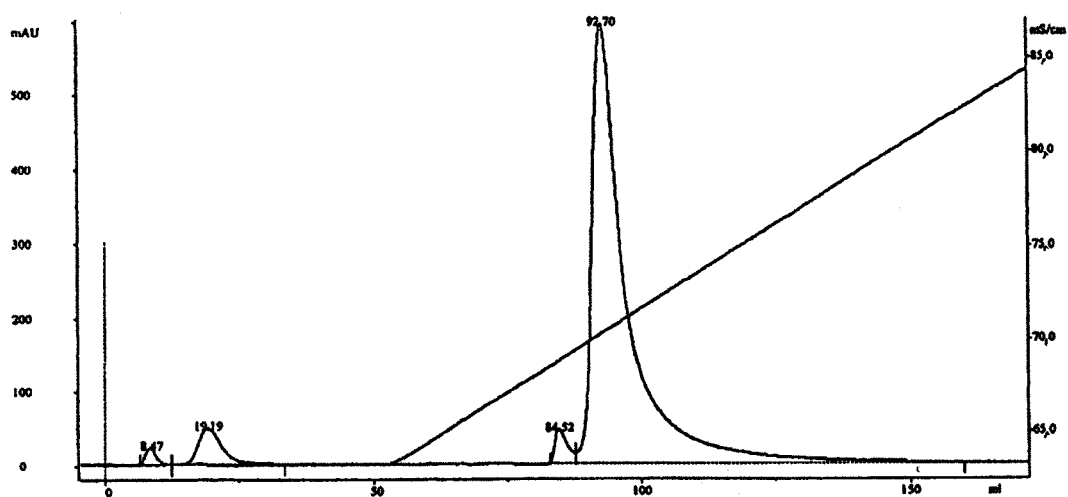


Figura 5

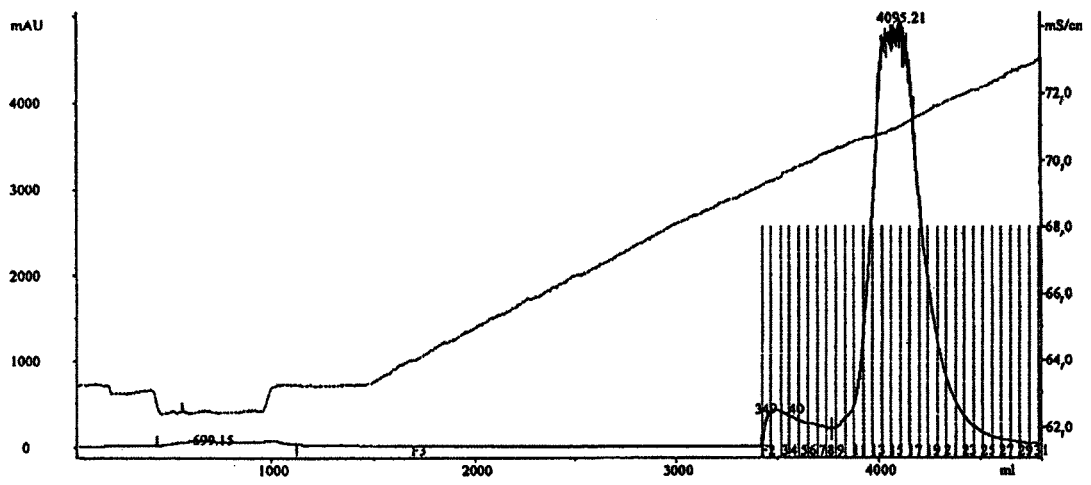


Figura 6

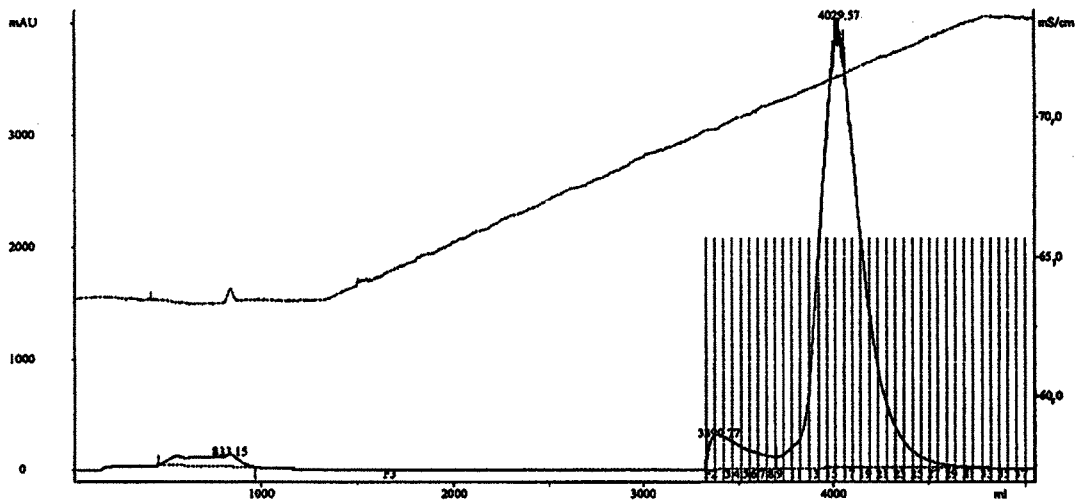
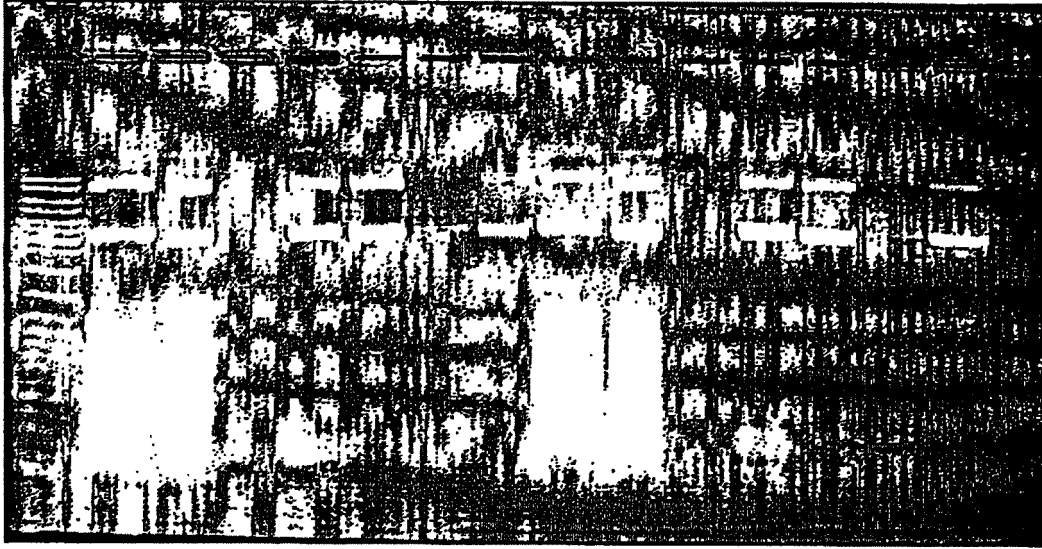


Figura 7



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figura 8

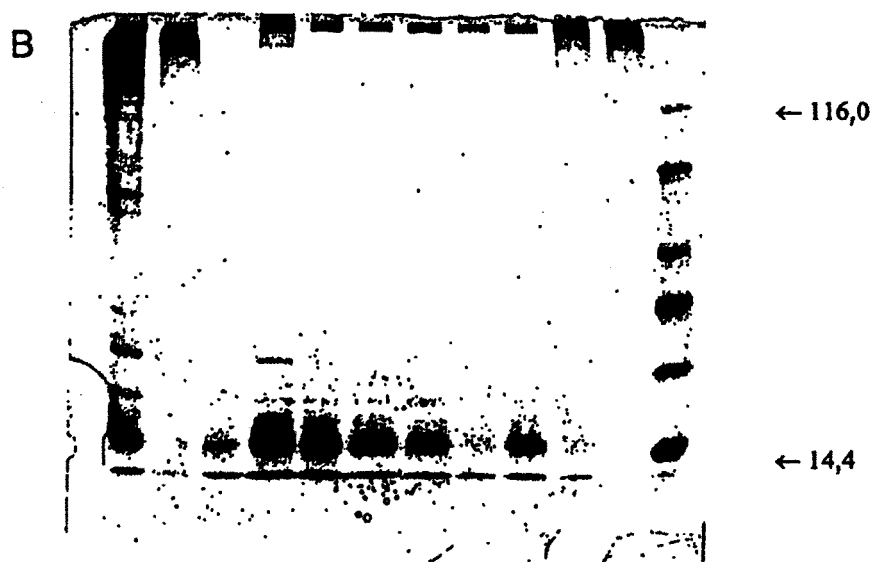
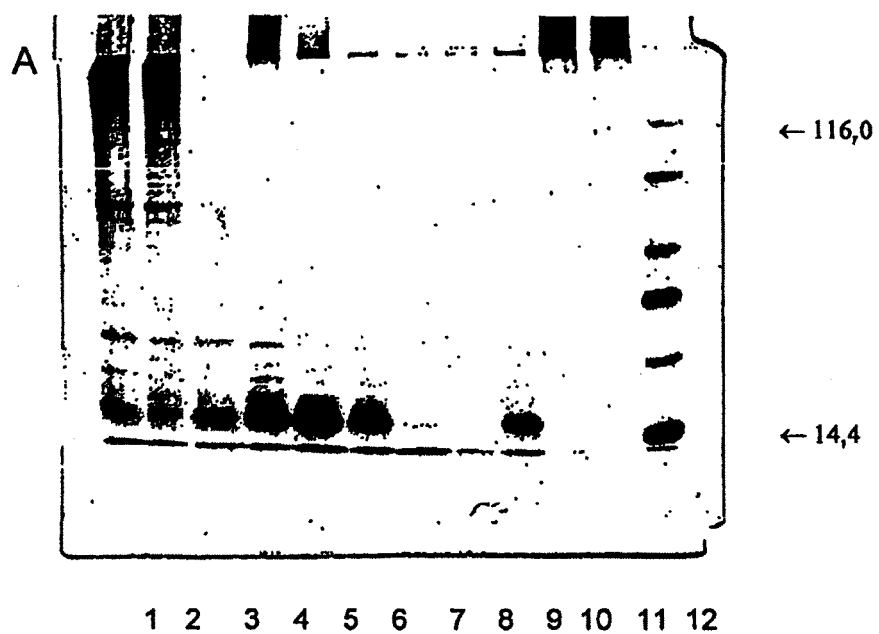
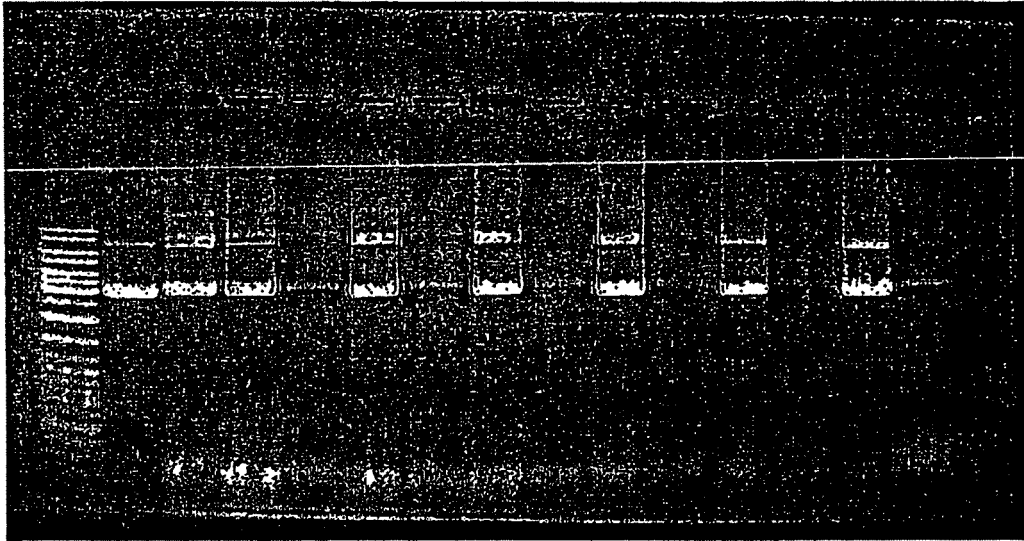
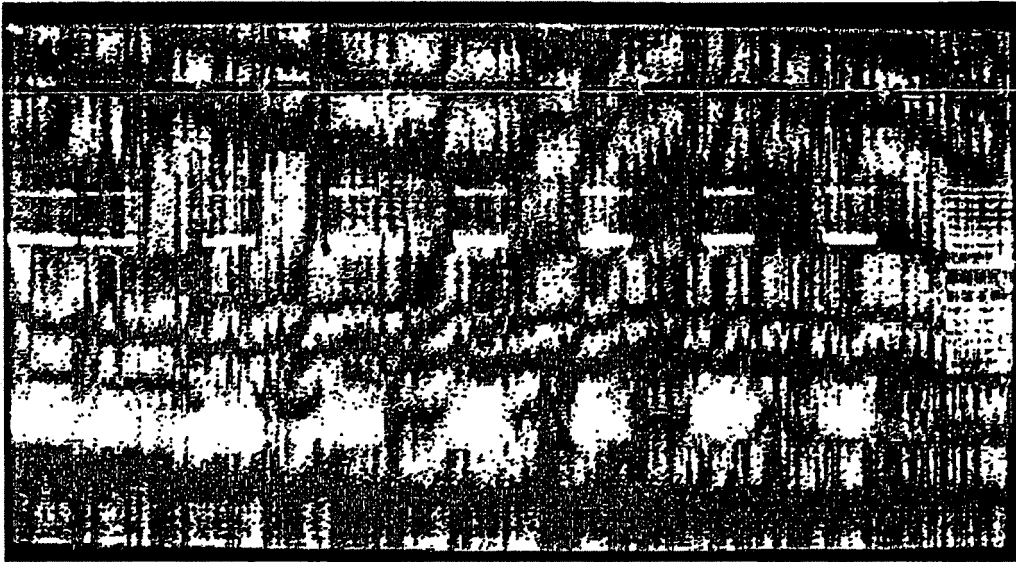


Figura 9



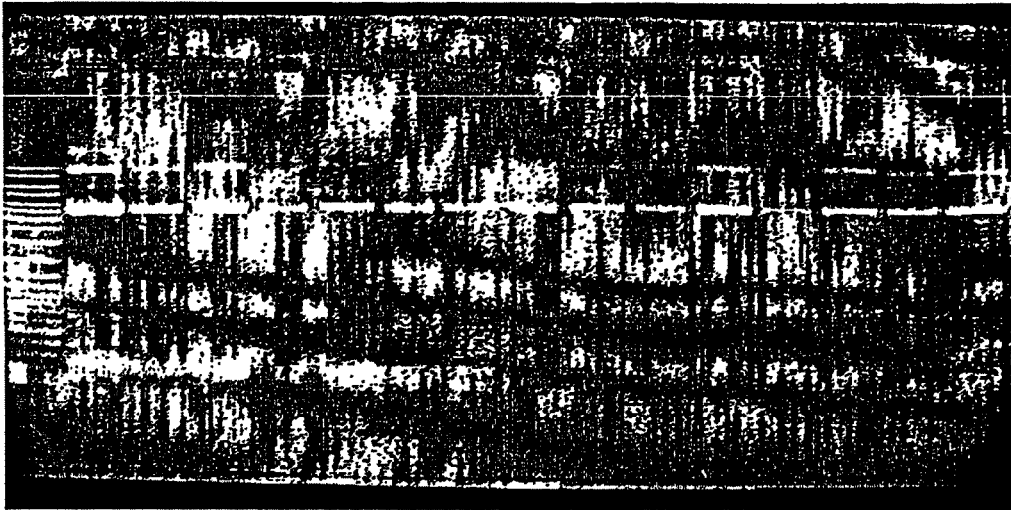
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figura 10



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Figura 11



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Figura 12

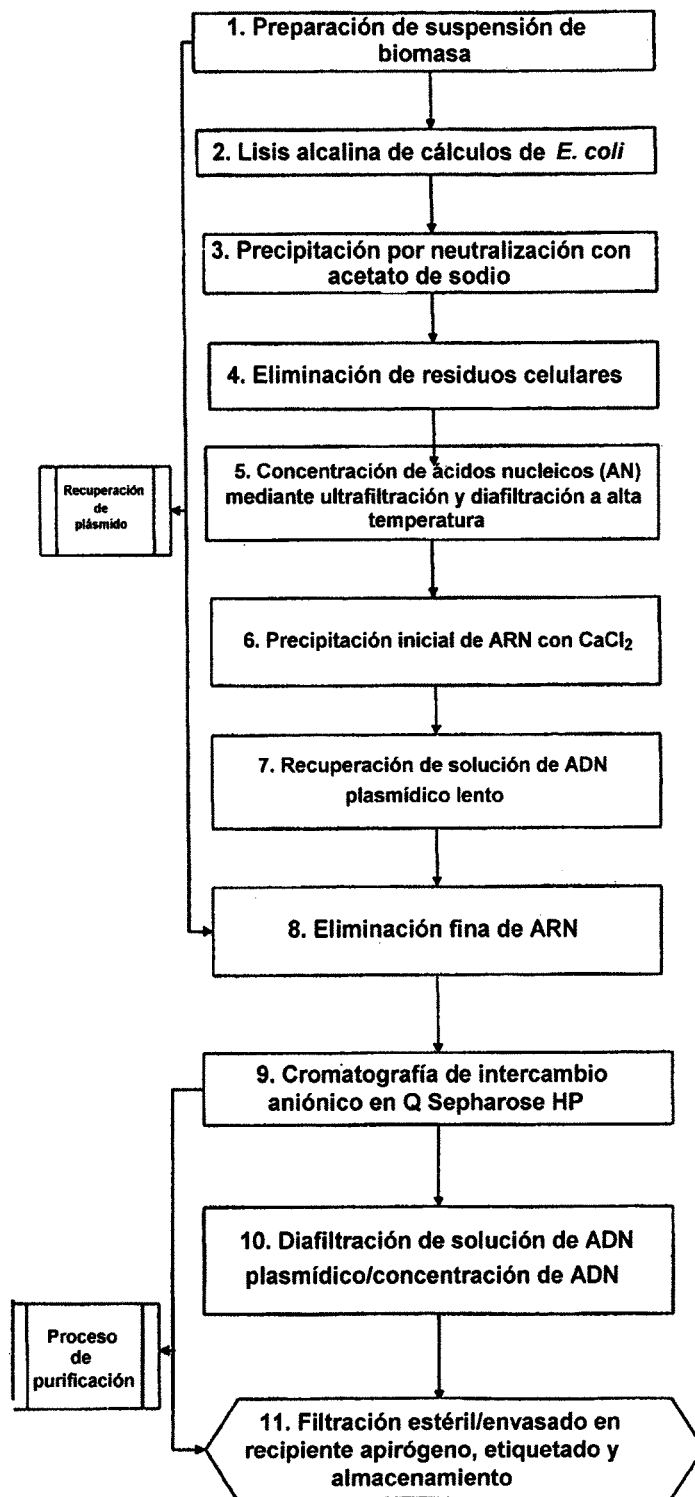


Figura 13

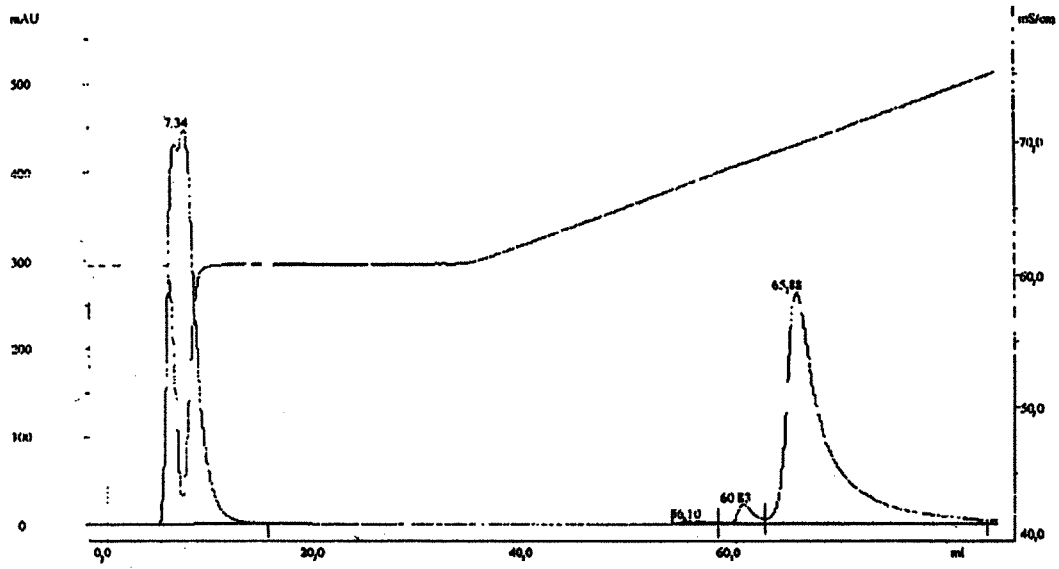


Figura 14

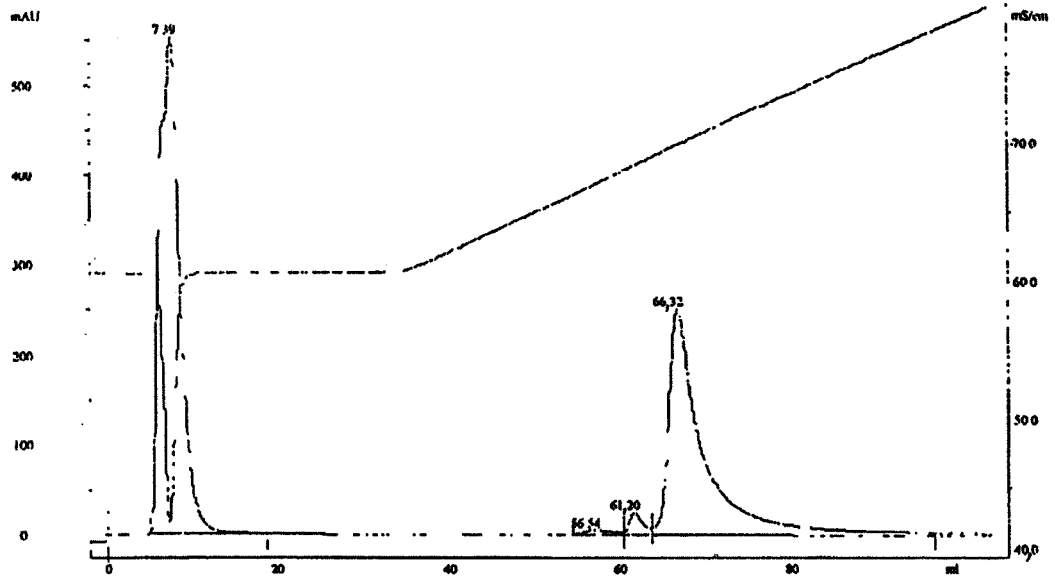


Figura 15

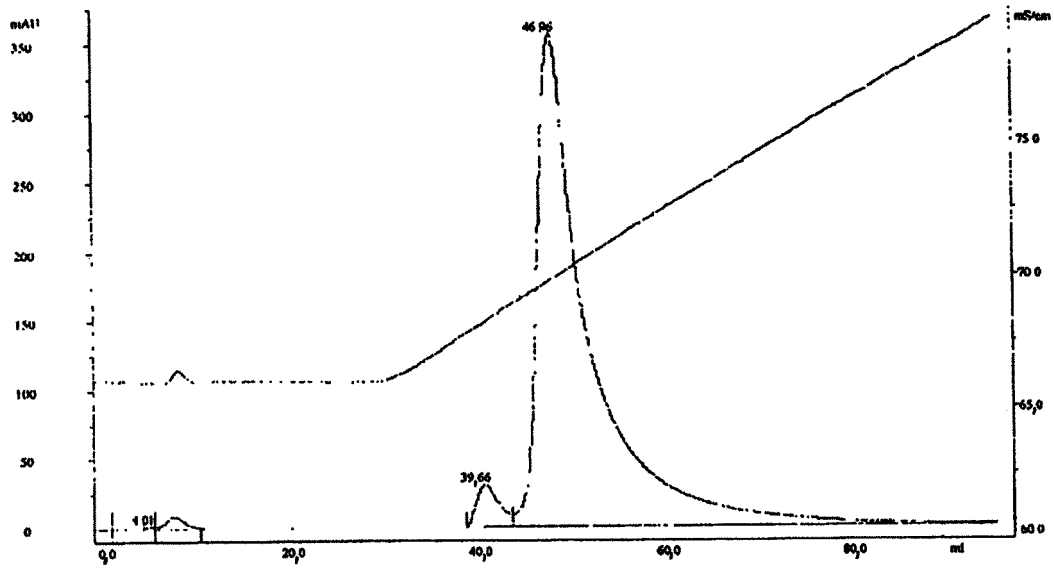


Figura 16

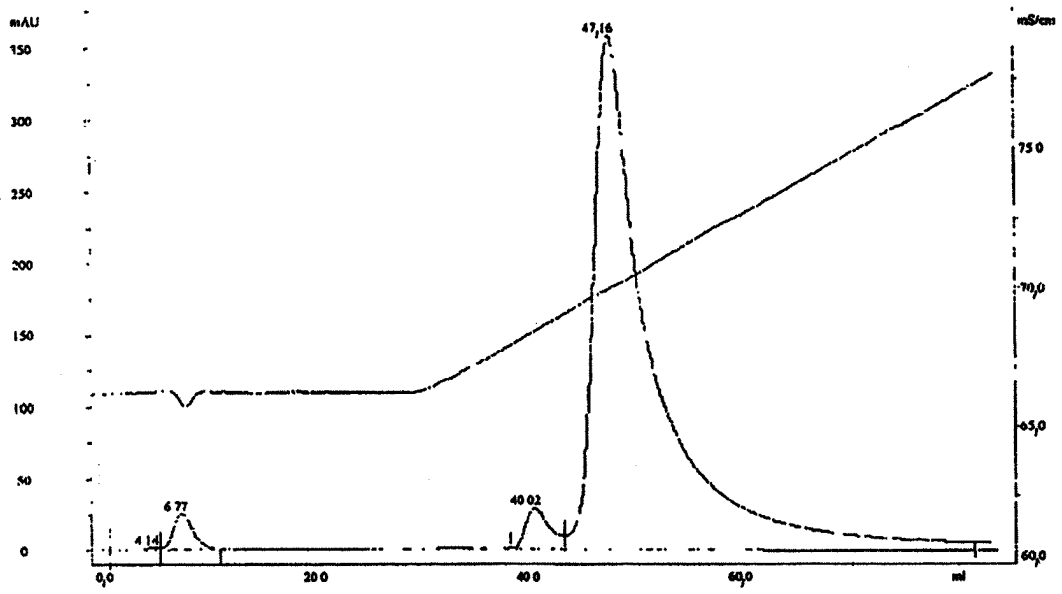


Figura 17

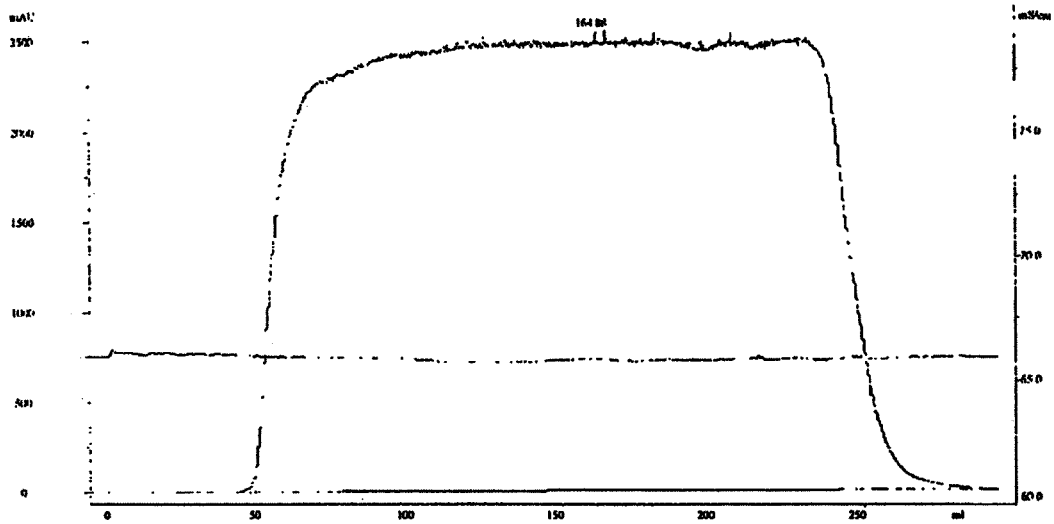


Figura 18

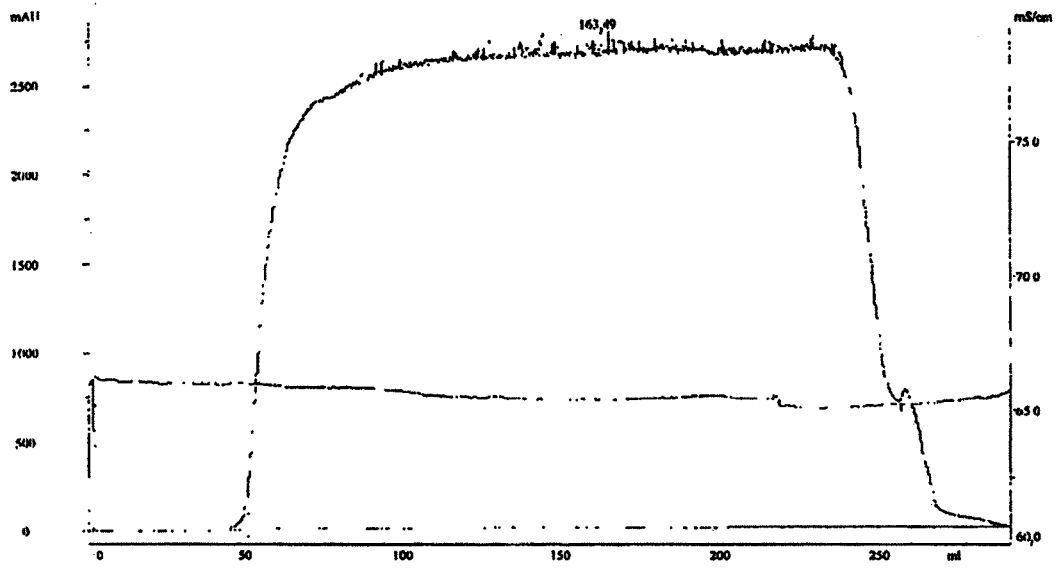


Figura 19

ES 2 315 340 T3

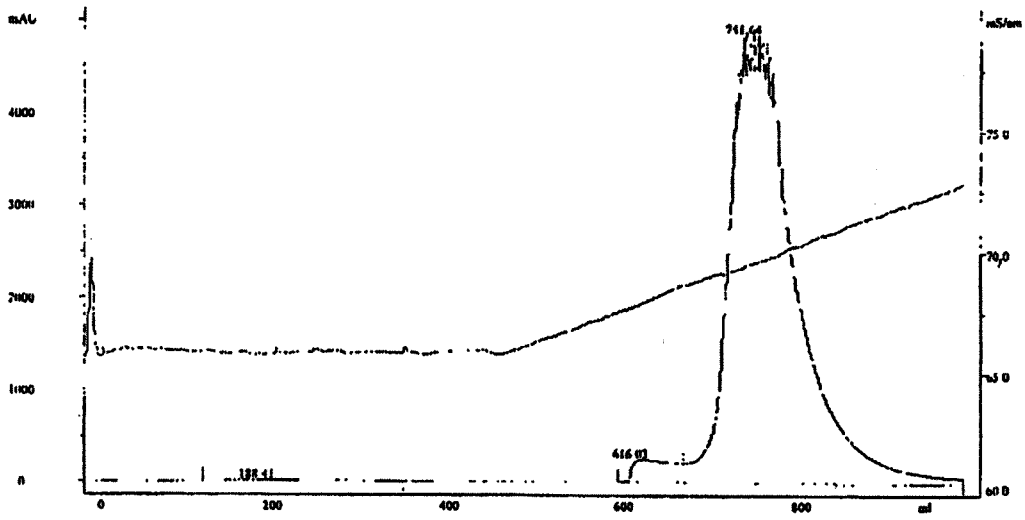


Figura 20

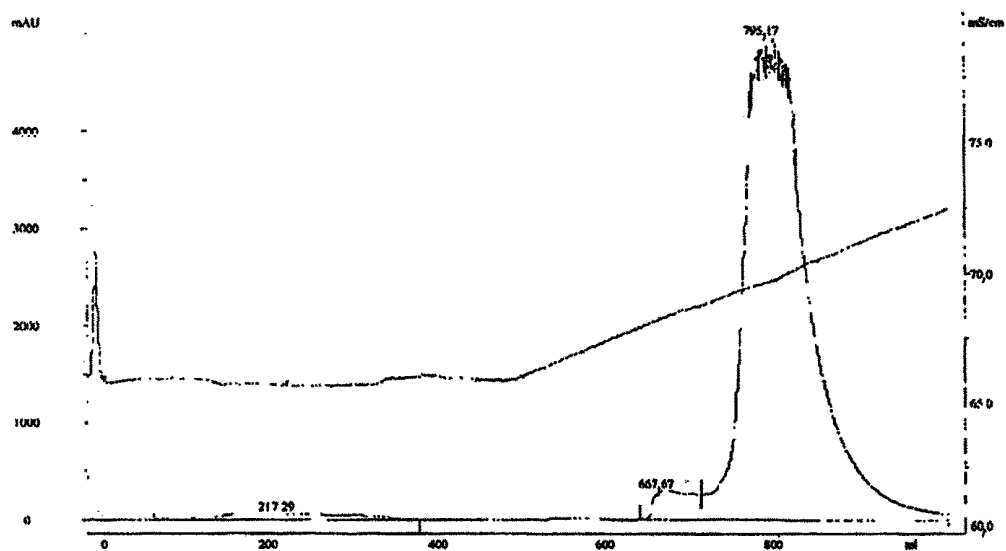


Figura 21