

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 488**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/18** (2006.01)

**B01D 15/34** (2006.01)

**C07K 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2018 PCT/EP2018/054478**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2019 WO19001778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2018 E 18711827 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023 EP 3645139**

54 Título: **Separación de plásmidos por cromatografía en contracorriente periódica**

30 Prioridad:

**26.06.2017 GB 201710130**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.11.2023**

73 Titular/es:

**CYTIVA BIOPROCESS R&D AB (100.0%)  
Björkgatan 30  
751 84 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**BLOM, HANS;  
AKERBLOM, ANNA;  
SKOGLAR, HELENA y  
SENDABO, SARA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 953 488 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).

## DESCRIPCIÓN

Separación de plásmidos por cromatografía en contracorriente periódica

### Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a procesos de separación en la fabricación de productos biofarmacéuticos, y más particularmente a un proceso de separación útil para la separación de especies grandes tales como plásmidos, partículas de virus, etc.

### Antecedentes de la invención

10 En la fabricación de productos biofarmacéuticos como vacunas, anticuerpos, proteínas recombinantes, vectores de terapia génica, etc., normalmente se necesitan varios pasos de separación cromatográfica para eliminar diversos contaminantes e impurezas del producto. Estos pasos de separación añaden costes y tiempo de proceso significativos y, por lo tanto, existe un interés significativo en intensificarlos.

15 Hay disponibles procesos de cromatografía continua multicolumna, donde la alimentación se aplica a una primera columna y luego se desvía a una o más columnas posteriores a medida que las primeras columnas se acercan a la saturación y la primera columna se eluye y se regenera para volver a cargarse durante la elución y regeneración de la columna(s) subsiguiente(s). Dichos procesos pueden denominarse cromatografía en contracorriente periódica (PCC, por sus siglas en inglés) o lecho móvil simulado (SMB, por sus siglas en inglés) y son de considerable interés para la separación de productos biofarmacéuticos, véanse, por ejemplo, los documentos US7901581, US20130248451, US20130280788 y US7220356.

20 Los procesos PCC/SMB pueden aumentar significativamente la productividad, pero los aumentos logrados pueden depender en gran medida del diseño del proceso.

25 Los plásmidos son de interés en el área biofarmacéutica principalmente como vectores para terapias génicas y ciertas terapias celulares (p. ej., para preparar células CAR-T), pero también en tecnología de vacunas. Los plásmidos son grandes moléculas de ADN en forma de anillo de origen bacteriano, que presentan problemas particulares en los procesos cromatográficos, ya que su tamaño les impide entrar en los poros de la mayoría de los medios de cromatografía. Un primer paso común en la purificación de plásmidos es la llamada separación de grupos, donde la preparación de plásmido se aplica a una resina de filtración en gel y el plásmido se recupera en la fracción vacía o en una fracción ligeramente retenida, mientras que el ARN, un contaminante importante, entra en los poros de la resina y se retiene significativamente. Como ocurre con otros procesos de filtración en gel, este es un proceso lento con una capacidad de carga limitada y sería muy interesante acelerarlo aplicando un proceso continuo.

30 En consecuencia, existe la necesidad de nuevos procesos de separación de grupos para plásmidos y otras especies grandes, como p. ej., partículas de virus, lo que permite una mayor eficacia de los procesos.

### Sumario de la invención

35 Un aspecto de la invención es proporcionar un método eficaz para separar continuamente un plásmido o, p. ej., una partícula de virus u otra especie grande. Esto se logra con un método de aplicación de una alimentación de proceso que contiene una partícula de plásmido/virus u otra especie grande a un aparato con al menos tres columnas cromatográficas empaquetadas con partículas de matriz de separación, en donde mientras una columna cromatográfica se carga con la alimentación de proceso, otra columna cromatográfica se eluye con un eluyente para recuperar el plásmido separado, y se eluye otra columna más de cromatografía con otro eluyente para eliminar los contaminantes.

40 Otras realizaciones adecuadas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

### Dibujos

La figura 1 muestra un ejemplo de un sistema cromatográfico que se puede usar con el método de la invención.

La figura 2 muestra otro ejemplo de un sistema cromatográfico que se puede usar con el método de la invención.

La figura 3 muestra un ejemplo del método de la invención usando tres columnas.

45 La figura 4 muestra un ejemplo del método de la invención usando cuatro columnas.

La figura 5 muestra los resultados de la ejecución 1 de una sola columna del Ejemplo 1.

La figura 6 muestra los resultados de la ejecución 2 de una sola columna del Ejemplo 1.

La figura 7 muestra los resultados de la ejecución 1 de la PCC de cuatro columnas del Ejemplo 2.

La figura 8 muestra los resultados de la ejecución 2 de la PCC de cuatro columnas del Ejemplo 2.

La figura 9 muestra los resultados (ampliación) de la ejecución 2 de la PCC de cuatro columnas del Ejemplo 2.

La figura 10 muestra un gel de electroforesis con marcadores de 1 Mp, 2 la muestra y 3 la fracción de plásmido.

### Descripción detallada de las realizaciones

5 En un aspecto, la presente invención describe un método de separación continua de un plásmido de una alimentación de proceso que comprende un plásmido en un aparato con al menos tres columnas cromatográficas. El método también se puede usar para otras separaciones de especies grandes, p. ej., virus, partículas similares a virus, conjugados de antígenos, etc., de contaminantes de bajo peso molecular. Las columnas se empaquetan con partículas de matriz de separación y, mientras una columna cromatográfica se carga con la alimentación del proceso, otra columna cromatográfica se eluye con un eluyente para recuperar el plásmido separado, y otra columna más de cromatografía se eluye con un eluyente adicional (que puede ser el mismo eluyente que se usó para eluir el plásmido) para eliminar contaminantes como el ARN. Puede ser ventajoso si los caudales en los diferentes pasos coinciden, de modo que no se requiera parada en ningún paso para esperar a que termine otro paso.

El método puede comprender en algunas realizaciones, como se ilustra en la Fig. 3, los pasos siguientes:

15 a) transportar una alimentación de proceso que comprende un plásmido a través de una primera columna cromatográfica que comprende un lecho empaquetado de partículas de matriz de separación;

b) transportar un eluyente a través de la primera columna cromatográfica, recuperando el eluyente con el plásmido después del pase por la primera columna cromatográfica; y transportar la alimentación del proceso a través de una segunda columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera columna cromatográfica; y

20 c) transportar un eluyente adicional (que puede ser el mismo eluyente que en el paso b) a través de la primera columna cromatográfica; transportar un eluyente a través de la segunda columna cromatográfica, recuperar el eluyente con el plásmido después del pase por la segunda columna cromatográfica; y transportar la alimentación del proceso a través de una tercera columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera y la segunda columnas cromatográficas.

25 Después del paso c), los pasos a) a c) pueden repetirse durante el proceso continuo, p. ej., hasta que se haya procesado toda la alimentación del proceso. En estas repeticiones, el paso a) puede comprender además transportar un eluyente adicional a través de la segunda columna cromatográfica mientras se transporta un eluyente a través de la tercera columna cromatográfica y se recupera el eluyente con el plásmido después del pase por la tercera columna cromatográfica; y el paso b) puede comprender además transportar un eluyente adicional a través de la tercera columna cromatográfica. Adecuadamente, se transporta una alimentación de proceso o eluyente a través de las tres columnas a lo largo de todos los pasos a) a c), es decir, no se detiene ningún flujo para esperar a que finalice otra columna/paso.

30 En ciertas realizaciones, como se ilustra en la Fig. 4, el método comprende los pasos siguientes:

35 a) transportar una alimentación de proceso que comprende un plásmido a través de una primera columna cromatográfica que comprende un lecho empaquetado de partículas de matriz de separación, y transportar un flujo de salida de la primera columna cromatográfica a través de una segunda columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera columna;

40 b) transportar un eluyente a través de la primera columna cromatográfica, recuperando el eluyente con el plásmido después del pase por la primera columna cromatográfica; y transportar la alimentación del proceso a través de la segunda columna cromatográfica y además a través de una tercera columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera y la segunda columnas;

45 c) transportar otro eluyente a través de la primera columna cromatográfica; transportar un eluyente a través de la segunda columna cromatográfica, recuperar el eluyente con el plásmido después del pase por la segunda columna cromatográfica; y transportar la alimentación de proceso a través de la tercera columna cromatográfica y además a través de una cuarta columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera, la segunda y la tercera columnas; y

50 d) transportar una alimentación de proceso que comprende un plásmido a través de la cuarta columna cromatográfica y transportar un flujo de salida de la cuarta columna cromatográfica a través de la primera columna cromatográfica; transportar otro eluyente a través de la segunda columna cromatográfica; y transportar un eluyente a través de la tercera columna cromatográfica, recuperando el eluyente con el plásmido después del pase por la tercera columna cromatográfica.

Después del paso d), los pasos a) a d) pueden repetirse durante el proceso continuo, p. ej., hasta que se haya procesado toda la alimentación de proceso. En estas repeticiones, el paso a) puede comprender además transportar un eluyente adicional a través de la tercera columna cromatográfica y transportar un eluyente a través de la cuarta columna cromatográfica mientras se recupera el eluyente con el plásmido después del pase por la cuarta columna cromatográfica; y el paso b) puede comprender además transportar un eluyente adicional a través de la cuarta columna cromatográfica. Adecuadamente, se transporta una alimentación de proceso o eluyente a través de las tres columnas a lo largo de todos los pasos a) a d), es decir, no se detiene ningún flujo para esperar a que finalice otra columna/paso.

El método puede, por ejemplo, llevarse a cabo en un sistema 10 cromatográfico como se ilustra en la Fig. 1. Tal sistema comprende una pluralidad de columnas 11, 12, 13 cromatográficas (se muestran tres columnas en la Fig. 1, pero cuatro o más columnas son igualmente posibles). El sistema puede disponerse adecuadamente para realizar una cromatografía continua. Las columnas pueden empaquetarse con la misma matriz de separación y conectarse con una o más líneas 14, 15, 16 de conexión de modo que el líquido pueda fluir desde una columna 11, 12 a una 12, 13 posterior y de una última columna 13 a una primera columna 11 y cada línea de conexión entre dos columnas puede comprender al menos una válvula 17, 18, 19 de apertura/cierre, que pueden ser válvulas de tres o cuatro vías. Estas válvulas junto con válvulas / bloques de válvulas 23, 25, 29 también permite operaciones paralelas de las columnas, p. ej., elución de una o más columnas simultáneamente con la carga de otra u otras columnas más. El sistema puede comprender además una bomba 20 de alimentación, p. ej., conectado a través de un primer detector 21 a un primer bloque 22 de válvulas y una o más bombas 34, 35, tampón, p. ej., conectado al bloque 22 de válvulas. El primer bloque 22 de válvulas se puede conectar además a la entrada de una primera columna 11 a través de una primera válvula 23. Un extremo de salida de la primera columna 11 se puede conectar a una segunda válvula 17 a través de un segundo detector 24. El primer bloque 22 de válvulas se puede conectar además a la entrada de una segunda columna 12 a través de una segunda válvula o bloque 25 de válvulas. Un extremo de salida de la segunda columna 12 se puede conectar a la válvula 18 a través de un tercer detector 26. Asimismo, una válvula 27 se puede conectar entre la válvula 17 y la válvula 18. La válvula 27 también se puede conectar a una válvula 28 que también está conectada a la válvula 23 y el segundo bloque 25 de válvulas. De este modo, el efluente de la primera columna 11 se puede dirigir a la entrada de la segunda columna 12 a través de la línea 14 de conexión, las válvulas 17, 27, 28 y 25. Asimismo, el primer bloque 22 de válvulas se puede conectar a la entrada de una tercera columna 13 a través de la válvula 29. Un extremo de salida de la tercera columna 13 puede estar conectado a la válvula 19 a través de un cuarto detector 30. Asimismo, la válvula 31 se puede conectar entre la válvula 18 y la válvula 19. La válvula 31 también se puede conectar a la válvula 32 que también puede conectarse al segundo bloque 25 de válvulas y la válvula 29. De este modo, el efluente de la segunda columna 12 se puede dirigir a la entrada de la tercera columna 13 a través de la línea 15 de conexión. El efluente de la tercera columna 13 se puede dirigir a la entrada de la primera columna 11 a través de la línea 16 de conexión a través de las válvulas 19 y 23 (alternativamente, se puede dirigir a una cuarta columna posterior). Asimismo, los detectores 21, 24, 26, 30, primero, segundo, tercero y cuarto, pueden estar todos conectados a una unidad 37 determinante. La unidad determinante se puede adaptar para usar las señales detectadas de los detectores para determinar los puntos de ruptura y de saturación para las tres diferentes columnas. La unidad 37 determinante y todos los bloques de válvulas, las válvulas y las bombas pueden conectarse además a una unidad 33 de control (todas las conexiones no se muestran en la Fig. 1) que está adaptada para controlar el sistema cromatográfico en términos de cuándo eliminar o añadir columnas desde/hacia la zona de carga, cambiar caudales, comenzar nuevos pasos de elución, etc. Los detectores 21, 24, 26, 30 pueden ser, por ej., detectores de UV. La unidad 33 de control puede configurarse para controlar el sistema según los datos de avance obtenidos de la unidad 37 determinante. Alternativamente, la unidad 33 de control puede usar tiempos de paso predeterminados fijos para las operaciones de conmutación.

La Fig. 2 ilustra un sistema 110 cromatográfico alternativo para llevar a cabo el método de la invención. El sistema comprende una pluralidad de columnas cromatográficas (por ejemplo, tres o cuatro columnas) 111, 112, 113, 114, que se pueden empaquetar con la misma matriz de separación. Las columnas se pueden conectar de forma independiente a una bomba 120 de alimentación, bombas 134, 135 tampón y/o líneas 115, 116, 117, 118, 119 de conexión a través de un primer bloque 122 de válvulas multifuncional. También se pueden conectar de forma independiente a las líneas de conexión y a los detectores 121, 124, 126 a través del segundo bloque 125 de válvulas multifunción. Los bloques 122 y 125 de válvulas permiten el acoplamiento paralelo de varias trayectorias de flujo diferentes dentro de los bloques (ver los documentos WO2015094095 o WO2015094096 para diseños útiles de válvulas / bloques de válvulas).

También se pueden usar para conectar una o más de las bombas con una o más de las líneas de conexión para desviar o retrolavar una o más de las columnas. Otra válvula u otro bloque 129 de válvulas permite la dirección de un flujo desde el detector 126 a uno o más recipientes de recogida, residuos o a la línea 119 de conexión, p. ej., aplicación en otra columna. Las válvulas / los bloques 122, 125, 129 de válvulas, los detectores 121, 124, 126 y las bombas 120, 134, 135 están conectados eléctrica o electromagnéticamente a una unidad de determinación y una unidad 133 de control combinadas para la detección y para el control de los flujos. El sistema 110 es similar al ÄKTA™ disponible comercialmente sistema pcc 75 (GE Healthcare Life Sciences), con algunas modificaciones menores, p. ej., siendo las tres bombas conectables directamente a tres columnas diferentes. Ambos sistemas 10 y 110 por supuesto, pueden modificarse aún más, p. ej., añadiendo más columnas, bombas, válvulas y/o detectores.

En las realizaciones mencionadas anteriormente, las partículas de la matriz de separación pueden ser adecuadamente partículas de filtración en gel que tienen un límite de exclusión para dextranos menor que 5000 kDa, como de 500 kDa a 5000 kDa o 500 kDa a 3000 kDa. Estas partículas permiten la separación de un plásmido, que a menudo puede tener un intervalo de tamaño de 2 kb a 20 kb (2 kb a 7 kb para plásmidos de tipo vacuna y hasta 20 kb para plásmidos que se usarán en terapia génica), a partir de contaminantes de peso molecular más bajo tales como el ARN más o menos degradado presente en los lisados celulares, típicamente con un tamaño <1 kb. Las partículas de la matriz de separación pueden comprender un polisacárido reticulado, tal como agarosa reticulada o, alternativamente, agar reticulado, celulosa o dextrano. Un ejemplo de partículas de agarosa reticuladas puede ser, p. ej., perlas de flujo rápido Sepharose™ 6 (GE Healthcare Life Sciences) con un límite de exclusión de dextrano de 2000 kDa, diámetro de partícula medio de 90 µm y un intervalo de diámetro de partícula de 45 µm a 165 µm. Como alternativa, se pueden usar perlas de agarosa reticuladas Sepharose CL-6B (GE Healthcare Life Sciences) con un límite de exclusión de dextrano de aprox. 1000 kDa, aunque las Sepharose 6 Fast Flow permitirán caudales más altos debido a su mayor rigidez. Para permitir caudales aún más altos, se pueden usar perlas de agarosa reticulada altamente rígidas, p. ej., las perlas como se describe en el documento US6602990.

En algunas realizaciones, el eluyente (y opcionalmente un eluyente adicional) comprende al menos 1.5 M de una sal, como 1.5 M a 2.5 M o 1.8 M a 2.3 M de sal. Expresado de forma alternativa, la concentración total de sal del eluyente (y opcionalmente del eluyente adicional) puede ser de al menos 1.5 M, tal como 1.5 M a 2.5 M o 1.8 M a 2.3 M. La sal puede ser, p. ej., sulfato de amonio y el eluyente/eluyente adicional puede comprender, p. ej., al menos sulfato de amonio 1.5 M, tal como sulfato de amonio 1.5 M a 2.5 M o 1.8 M a 2.3 M. La presencia de la sal / sulfato de amonio mejora la separación entre el plásmido y los contaminantes de ARN.

La alimentación del proceso puede comprender un lisado celular clarificado, tal como un lisado de células gramnegativas, p. ej., *E. coli*. En algunas realizaciones, el método comprende, antes de la separación, un paso 0) de preparación de un lisado celular clarificado como alimentación de proceso. El paso 0) puede comprender células de contacto, tales como células *E. coli*, con álcali y un tensioactivo, como SDS, para inducir la lisis y neutralizar, p. ej., con acetato de potasio. Este es un método bien conocido, que implica la adición de NaOH y SDS a concentraciones finales de, p. ej., 0.1 M y el 0.05 % (ver, p. ej., L A Ciccolini et al: *Biotech Bioeng* 87, 293-302 (2004)). El paso 0) también puede llevarse a cabo en un modo continuo, p. ej., añadiendo los reactivos de lisis en un mezclador estático o similar (ver el documento US2007/0213289).

La clarificación se puede realizar mediante filtración tradicional, pero para evitar una obstrucción excesiva de los filtros, puede ser ventajoso eliminar la mayor parte de los materiales en forma de partículas mediante floculación/flotación antes de una filtración final. Esto se puede lograr añadiendo un hidrogenocarbonato, p. ej., hidrogenocarbonato de amonio, al lisado bruto neutralizado a un pH de alrededor de 5, tal como a un pH de 4 a 6 o 4.5 a 5.5. Si el pH está fuera de este intervalo, se puede ajustar después de la adición de hidrogenocarbonato para que se encuentre dentro del intervalo. Las burbujas de dióxido de carbono generadas en estas condiciones provocarán la flotación de los materiales en forma de partículas floculados hacia la superficie, dejando un lisado casi totalmente clarificado como el líquido a granel. Tal proceso de flotación también se puede realizar de forma continua, p. ej., haciendo fluir el lisado a través de un recipiente de flotación donde el material flotado en la superficie se raspa o se desvía, mientras que el lisado clarificado pasa a través de un filtro sin ningún problema de obstrucción.

Además de los pasos mencionados anteriormente, el método puede comprender además, después de la separación, un paso e) de purificación del plásmido recuperado. Esto se puede hacer, p. ej., mediante cromatografía de unión-elución y puede implicar adecuadamente la separación del plásmido superenrollado (se) deseado del círculo abierto (co) y otras conformaciones del plásmido. Los métodos de cromatografía de interacción tanto tíofila como hidrófoba pueden usarse para este propósito. Para cromatografía tíofila, se pueden usar resinas como PlasmidSelect™ o PlasmidSelect Xtra (GE Healthcare Life Sciences), mientras que se han sugerido varias resinas cromatográficas con p. ej., grupos fenilo, butilo o hexilo para la cromatografía de interacción hidrófoba de plásmidos (véase, el documento US2007/0213289). El paso e) también se puede realizar en un modo continuo, p. ej., usando técnicas de cromatografía continua PCC o SMB. Esto se puede lograr mediante la aplicación directa del eluato de los pasos anteriores a un segundo sistema cromatográfico multicolumna. Alternativamente, en un sistema con varias columnas cromatográficas, algunas columnas pueden usarse para la separación inicial y algunas columnas pueden usarse para la purificación adicional. En este caso, el sistema puede comprender tanto columnas empaquetadas con resina de filtración de gel como columnas empaquetadas, p. ej., con resina de interacción tíofila o hidrófoba.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Cromatografía por lotes en una sola columna

Muestra: Lisado clarificado de *E. coli*, que contiene el plásmido pJV4 (6 kb), Tris 17 mM, EDTA 3.3 mM, acetato de potasio 1 M.

Columna: 20 ml de resina de filtración en gel Sepharose 6 Fast Flow (Sepharose 6FF) (GE Healthcare Life Sciences) empaquetada en una columna 16/10 HiPrep™ (GE Healthcare Life Sciences), con lecho de 16 mm de diámetro y altura de lecho de 100 mm.

Sistema cromatográfico: sistema ÄKTA pcc 75 (GE Healthcare Life Sciences)

Tampón de equilibrio: sulfato de amonio 2.1 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7.5.

Tampón de elución: sulfato de amonio 2.1 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 7.5.

Ejecución 1

5

Tabla 1. Condiciones para la ejecución 1

Paso	Tampón	Volúmenes de columna	Caudal (ml/min)	Velocidad de flujo (cm/h)	Tiempo de residencia (min)
Equilibrio	Tampón de equilibrio	5	1.67	50	12
Carga	Muestra	0.3	1.67	50	12
Elución	Tampón 1 de elución	3	1.67	50	12

Esta fue la ejecución inicial, para verificar el patrón de separación e iniciar la optimización. Los resultados se muestran en la Fig. 5 e indican una clara separación entre el plásmido (el primer pico) y el ARN contaminante (el segundo pico).

Ejecución 2

10

Tabla 2. Condiciones para la ejecución 2

Paso	Tampón	Volúmenes de columna	Caudal (ml/min)	Velocidad de flujo (cm/h)	Tiempo de residencia (min)
Equilibrio	Tampón de equilibrio	2	3.0	90	6.7
Carga	Muestra	0.3	3.0	90	6.7
Elución	Tampón 1 de elución	3	3.0	90	6.7

Los caudales aumentaron en comparación con la ejecución 1. Como se muestra en la Fig. 6, la forma del pico del plásmido sigue siendo similar a la de la ejecución 1. El pico del plásmido tiene un volumen de 7.7 ml, que corresponde a 0.39 volúmenes de columna, lo que indica un cierto grado de dilución.

15 Ejemplo 2. Experimentos de PCC de 4 columnas

Un sistema cromatográfico en contracorriente periódica (PCC) con cuatro columnas del mismo tipo que se usó en el Ejemplo 1 se dispuso en el sistema cromatográfico ÄKTA pcc 75. La muestra y los tampones fueron los mismos que en el Ejemplo 1, aunque el paso de equilibración solo se realizó una vez para todas las columnas antes de iniciar los ciclos de la PCC. En la Figura 4 se muestra una descripción general de las diferentes columnas durante el proceso. Para el paso de carga, se usaron dos columnas acopladas en serie para que el flujo de salida de la primera columna de carga (carga 1) se dirigiera a una segunda columna de carga (Carga 2). El efecto del paso Carga 2 fue principalmente lavar la segunda columna con el tampón que sale de la primera columna. En la ejecución 1 de la PCC, la duración del paso Elución 2 fue mayor que la de los otros pasos, lo que requirió cierto tiempo de espera en los otros pasos.

25

Ejecución 1 de la PCC

Tabla 3. Condiciones para la ejecución 1 de la PCC

Paso	Tampón	de	Volúmenes columna	Caudal (ml/min)	Velocidad de flujo (cm/h)	Tiempo de residencia (min)
Equilibrio	Tampón equilibrio	de	4	5.0	150	4
Carga	Muestra		0.2	1.8	54	11
Elución 1	Tampón elución	de	0.36	1.8	54	11
Elución 2	Tampón elución	de	1	5.0	150	4

5 Los resultados, como se muestra en la Fig. 7, indican un rendimiento razonablemente bueno, aunque ya con alguna ruptura UV durante la carga, lo que indica que parte del plásmido se eluye directamente en el flujo continuo.

Ejecución 2 de la PCC

En este experimento, la cantidad cargada se redujo ligeramente para evitar la elución en el flujo continuo. Además, los tiempos de los pasos se ajustaron para que todos los pasos pudieran ejecutarse continuamente sin ningún tiempo de espera. Como anteriormente, el paso de equilibrio solo se ejecutó una vez, antes de los ciclos reales de la PCC.

10

Tabla 4. Condiciones para la ejecución 2 de la PCC

Paso	Tampón	de	Volúmenes columna	Caudal (ml/min)	Velocidad de flujo (cm/h)	Tiempo de residencia (min)
Equilibrio	Tampón equilibrio	de	4	5.0	150	4
Carga	Muestra		0.18	0.9	27	22
Elución 1	Tampón elución	de	0.36	1.8	54	11
Elución 2	Tampón elución	de	1	5.0	150	4

15 Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9, lo que demuestra una separación completamente continua. El gel de electroforesis en la Fig. 10 muestra una eliminación esencialmente completa de la banda de ARN de bajo Mp del plásmido de alto Mp. Una forma sencilla de expresar la productividad es calcular el número de volúmenes de columna (VC) cargados por hora. Para los experimentos por lotes de una sola columna, a 1.67 ml/min (Ejecución 1), es posible cargar cada 25 min, lo que lleva a una productividad de 0.7 VC/h. A 3.0 ml/min, la columna se puede cargar cada 12 min, es decir, la productividad es de 1.5 VC/h. En el ejemplo de PCC optimizado (ejecución 2 de la PCC), se pueden cargar 0.18 VC cada 4.2 min, lo que corresponde a una productividad de 2.6 VC/h, es decir, una mejora del 170 % con respecto a la Ejecución 2 y del 370 % con respecto a la Ejecución 1. Se puede esperar que la configuración de tres columnas continua proporcione productividades aún mayores.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de separación continua de un plásmido de una alimentación de proceso que comprende un plásmido en un aparato con al menos tres columnas cromatográficas empaquetadas con partículas de la misma matriz de separación, en donde mientras una columna cromatográfica se carga con la alimentación de proceso, se eluye otra columna cromatográfica con un eluyente para recuperar el plásmido separado, y se eluye otra columna cromatográfica más con otro eluyente para eliminar los contaminantes.
 

5
2. El método de la reivindicación 1, que comprende los pasos sucesivos siguientes:
  - a) transportar una alimentación de proceso que comprende un plásmido a través de una primera columna cromatográfica que comprende un lecho empaquetado de partículas de matriz de separación;
 

10
  - b) transportar un eluyente a través de dicha primera columna cromatográfica, recuperando el eluyente con el plásmido después del pase por la primera columna cromatográfica; y transportar dicha alimentación de proceso a través de una segunda columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera columna cromatográfica; y
 

15
  - c) transportar otro eluyente a través de dicha primera columna cromatográfica; transportar un eluyente a través de dicha segunda columna cromatográfica, recuperar el eluyente con el plásmido después del pase por la segunda columna cromatográfica; y transportar dicha alimentación de proceso a través de una tercera columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera y la segunda columnas cromatográficas.
 

20
3. El método de la reivindicación 2, en donde después del paso c), los pasos a) a c) se repiten durante la duración del proceso continuo, y en donde opcionalmente en las repeticiones:
 

25

  - el paso a) comprende además transportar un eluyente adicional a través de dicha segunda columna cromatográfica mientras se transporta un eluyente a través de dicha tercera columna cromatográfica y se recupera el eluyente con el plásmido después del pase por la tercera columna cromatográfica; y
  - el paso b) comprende además transportar un eluyente adicional a través de dicha tercera columna cromatográfica.
 

30
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en donde se transporta una alimentación de proceso o eluyente a través de las tres columnas a lo largo de todos los pasos a) a c).
5. El método de la reivindicación 1, que comprende los pasos sucesivos siguientes:
  - a) transportar una alimentación de proceso que comprende un plásmido a través de una primera columna cromatográfica que comprende un lecho empaquetado de partículas de matriz de separación, y transportar un flujo de salida de dicha primera columna cromatográfica a través de una segunda columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera columna;
 

35
  - b) transportar un eluyente a través de dicha primera columna cromatográfica, recuperando el eluyente con el plásmido después del pase por la primera columna cromatográfica; y transportar dicha alimentación de proceso a través de dicha segunda columna cromatográfica y además a través de una tercera columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera y la segunda columnas;
 

40
  - c) transportar otro eluyente a través de dicha primera columna cromatográfica; transportar un eluyente a través de dicha segunda columna cromatográfica, recuperar el eluyente con el plásmido después del pase por la segunda columna cromatográfica; y transportar dicha alimentación de proceso a través de dicha tercera columna cromatográfica y además a través de una cuarta columna cromatográfica empaquetada con la misma matriz de separación que la primera, la segunda y la tercera columnas; y
 

45
  - d) transportar una alimentación de proceso que comprende un plásmido a través de dicha cuarta columna cromatográfica y transportar un flujo de salida de dicha cuarta columna cromatográfica a través de dicha primera columna cromatográfica; transportar otro eluyente a través de dicha segunda columna cromatográfica; y transportar un eluyente a través de dicha tercera columna cromatográfica, recuperando el eluyente con el plásmido después del pase por la tercera columna cromatográfica.
 

50
6. El método de la reivindicación 5, en donde después del paso d), los pasos a) a d) se repiten durante la duración del proceso continuo, y en donde opcionalmente en las repeticiones:
  - el paso a) comprende además transportar un eluyente adicional a través de dicha tercera columna cromatográfica y transportar un eluyente a través de dicha cuarta columna cromatográfica mientras se recupera el eluyente con el plásmido después del pase por la cuarta columna cromatográfica; y
  - el paso b) comprende además transportar un eluyente adicional a través de dicha cuarta columna cromatográfica.



7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en donde se transporta una alimentación de proceso o eluyente a través de las tres columnas a lo largo de todos los pasos a) a d).
- 5 8. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dichas partículas de la matriz de separación son partículas de filtración en gel que tienen un límite de exclusión para dextranos menor que 5000 kDa, tal como de 500 kDa a 5000 kDa o 500 kDa a 3000 kDa.
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dichas partículas de la matriz de separación comprenden un polisacárido reticulado, tal como agarosa reticulada.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde:
- a) dicho eluyente comprende al menos 1.5 M de una sal, tal como 1.5 M a 2.5 M o 1.8 M a 2.3 M de sal;
  - 10 b) la concentración total de sal de dicho eluyente es de al menos 1.5 M, tal como 1.5 M a 2.5 M o 1.8 M a 2.3 M; y/o
  - c) dicho eluyente comprende al menos sulfato de amonio 1.5 M, tal como sulfato de amonio de 1.5 M a 2.5 M o 1.8 M a 2.3 M.
- 15 11. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicha alimentación de proceso comprende un lisado celular clarificado.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende, antes de la separación, un paso 0) de preparación de un lisado celular clarificado como alimentación de proceso, en donde el paso 0) comprende opcionalmente poner en contacto células, tales como células *E. coli*, con álcali y un tensioactivo, tal como SDS y, además, opcionalmente se lleva a cabo en un modo continuo.
- 20 13. El método de la reivindicación 12, en donde el paso 0) comprende además la adición de una sal de hidrogenocarbonato, tal como hidrogenocarbonato de amonio, seguido opcionalmente por el ajuste de pH a de 4 a 6.
14. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende además, después de la separación, un paso e) de purificación del plásmido recuperado, que opcionalmente comprende cromatografía de unión-elución, tal como cromatografía de interacción tíofila o hidrofóbica.
- 25 15. El método de la reivindicación 14, en donde el paso e) se opera en un modo continuo.

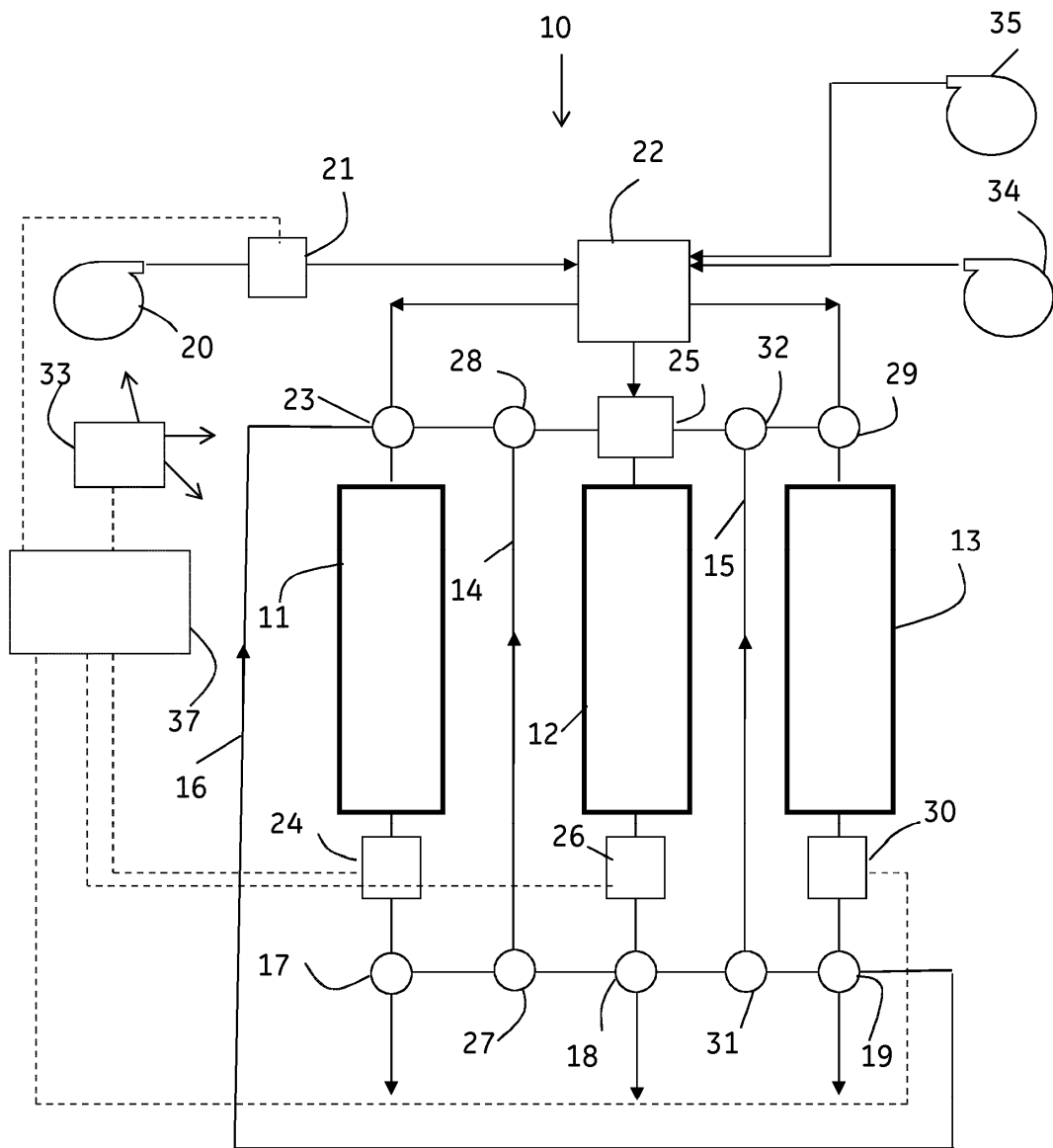


Fig. 1.

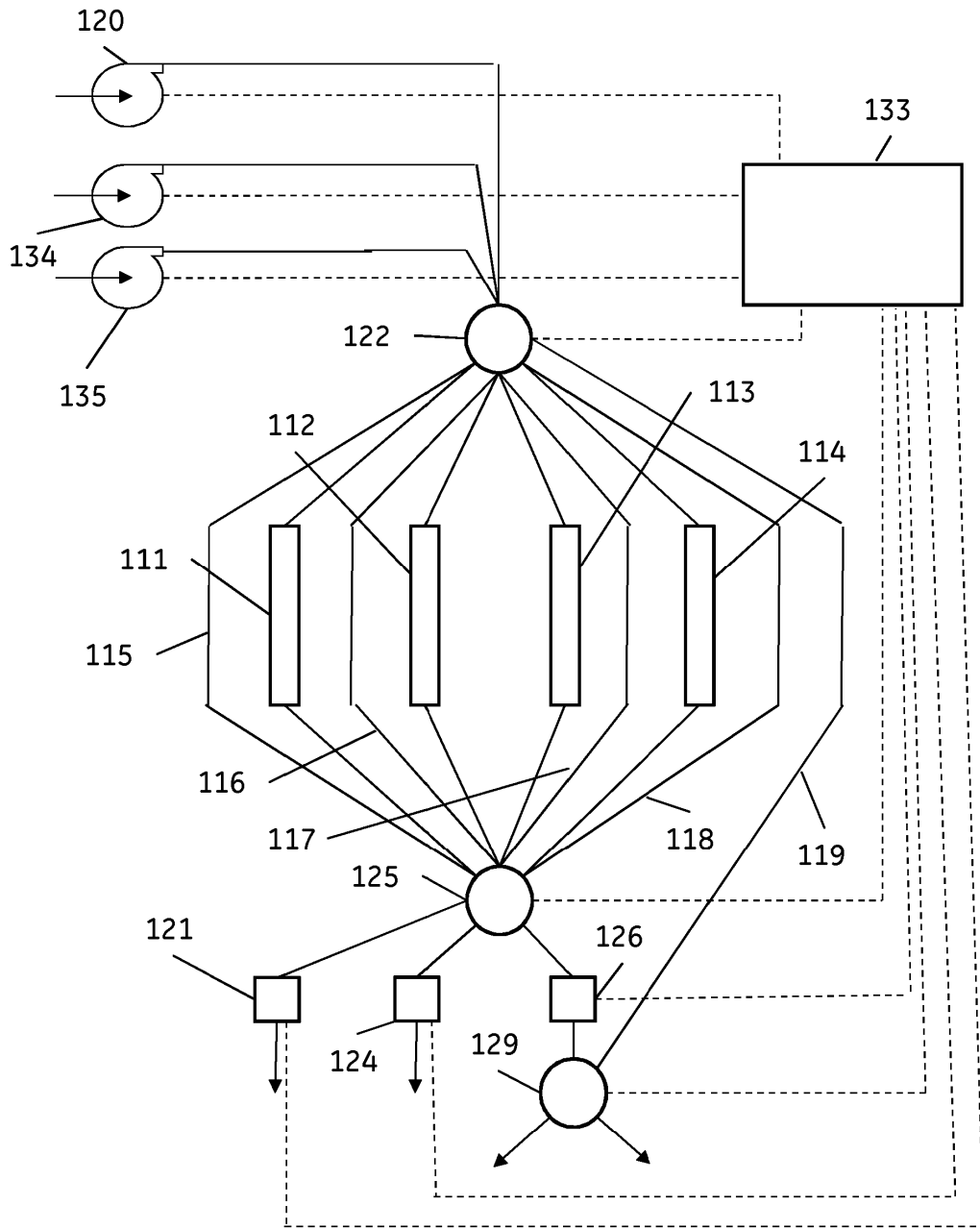


Fig. 2.

↑  
110

	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Columna 1	Carga	Elución 1	Elución 2
Columna 2	Elución 2	Carga	Elución 1
Columna 3	Elución 1	Elución 2	Carga

Fig. 3.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Columna 1	Carga	Elución 1	Elución 2	Carga 2
Columna 2	Carga 2	Carga	Elución 1	Elución 2
Columna 3	Elución 2	Carga 2	Carga	Elución 1
Columna 4	Elución 1	Elución 2	Carga 2	Carga

Fig. 4.

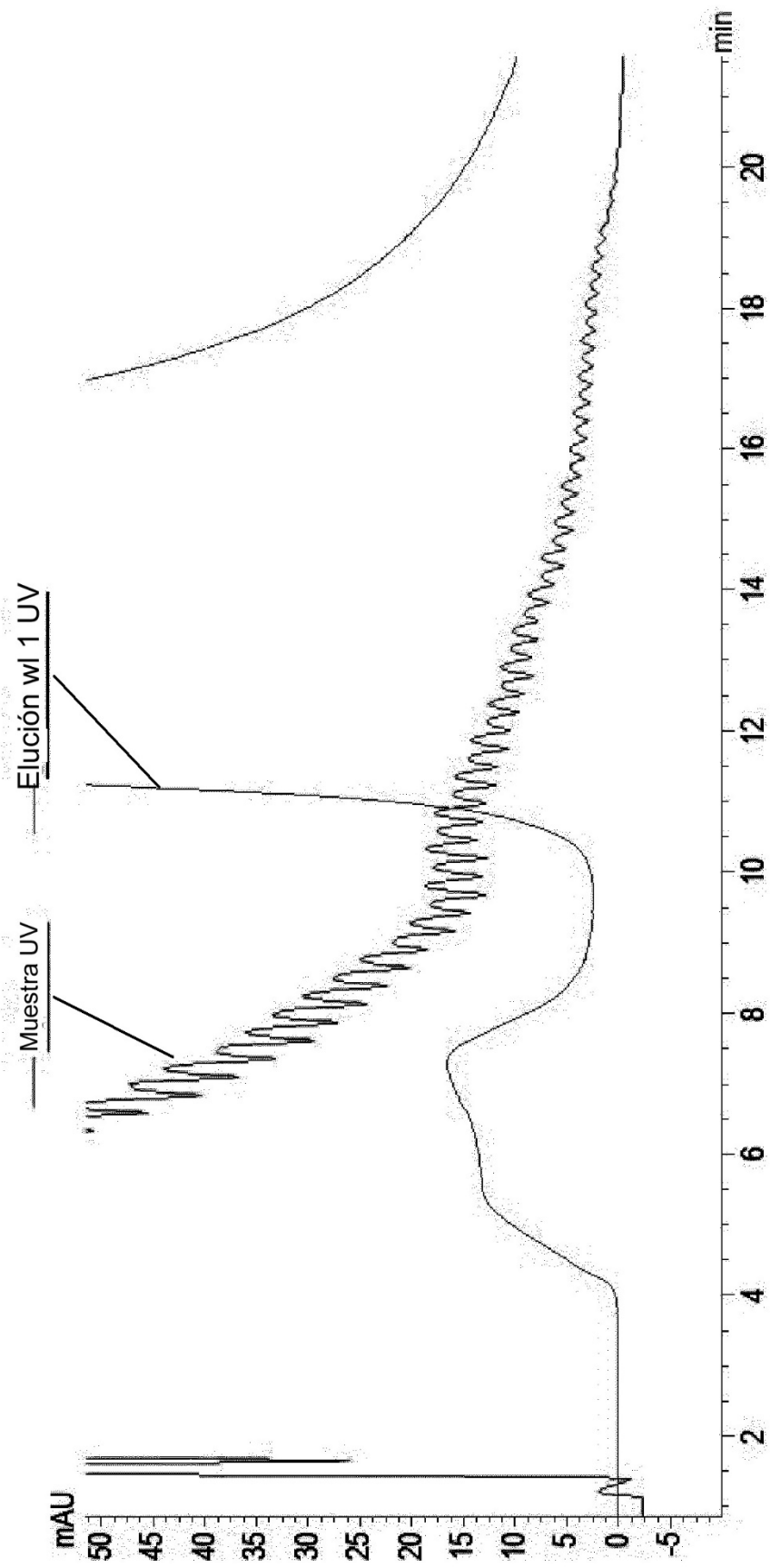


Fig. 5.

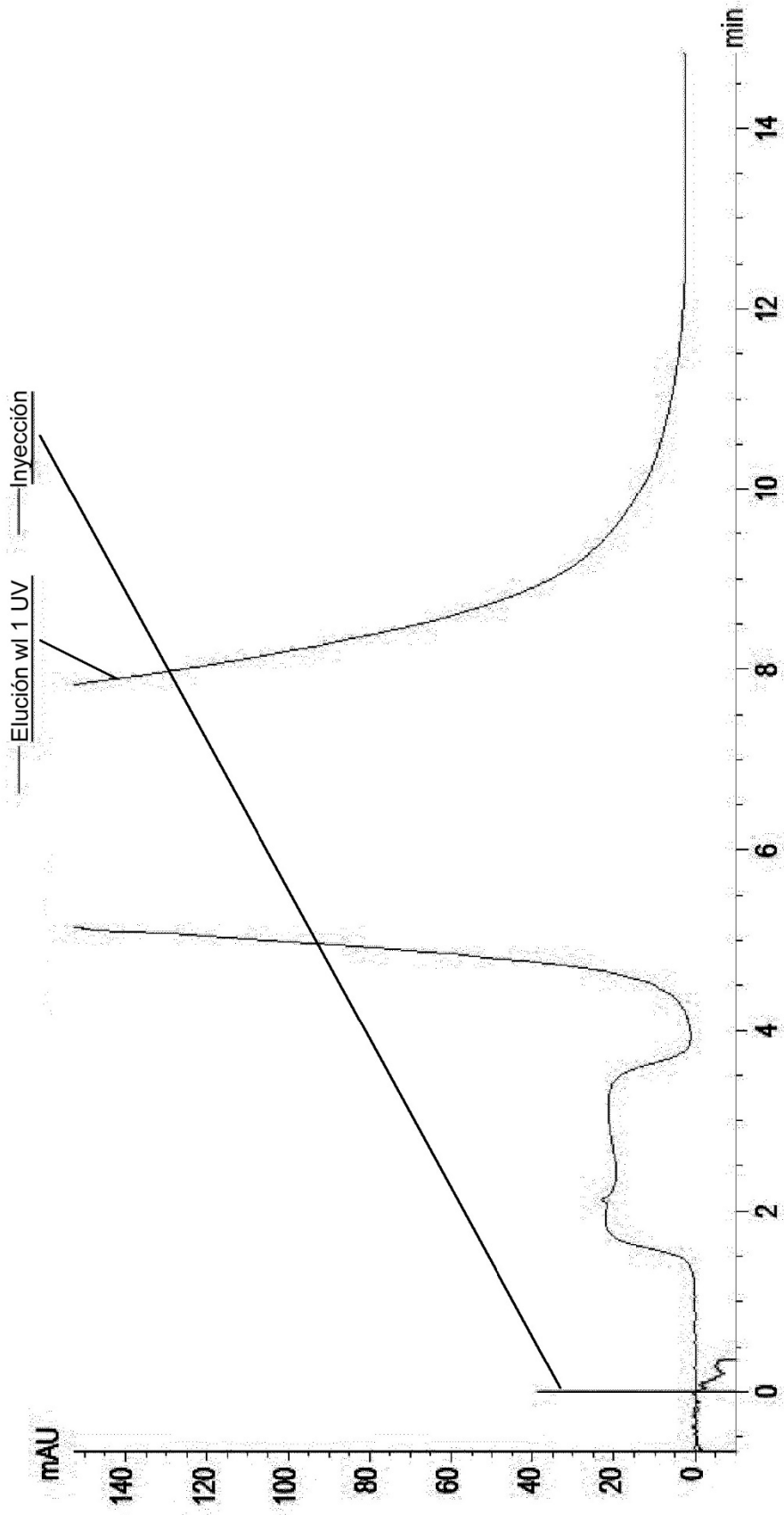


Fig. 6.

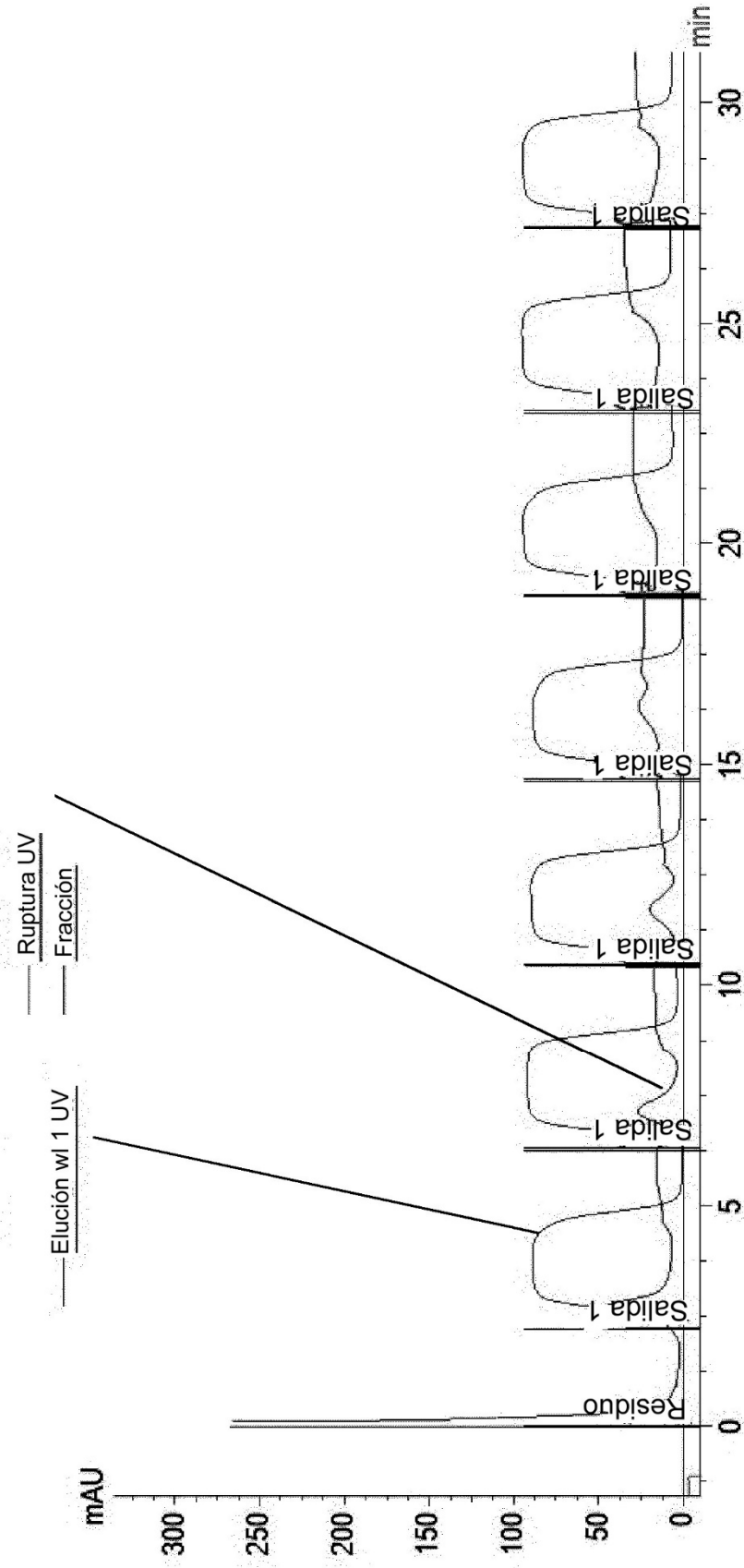


Fig. 7.



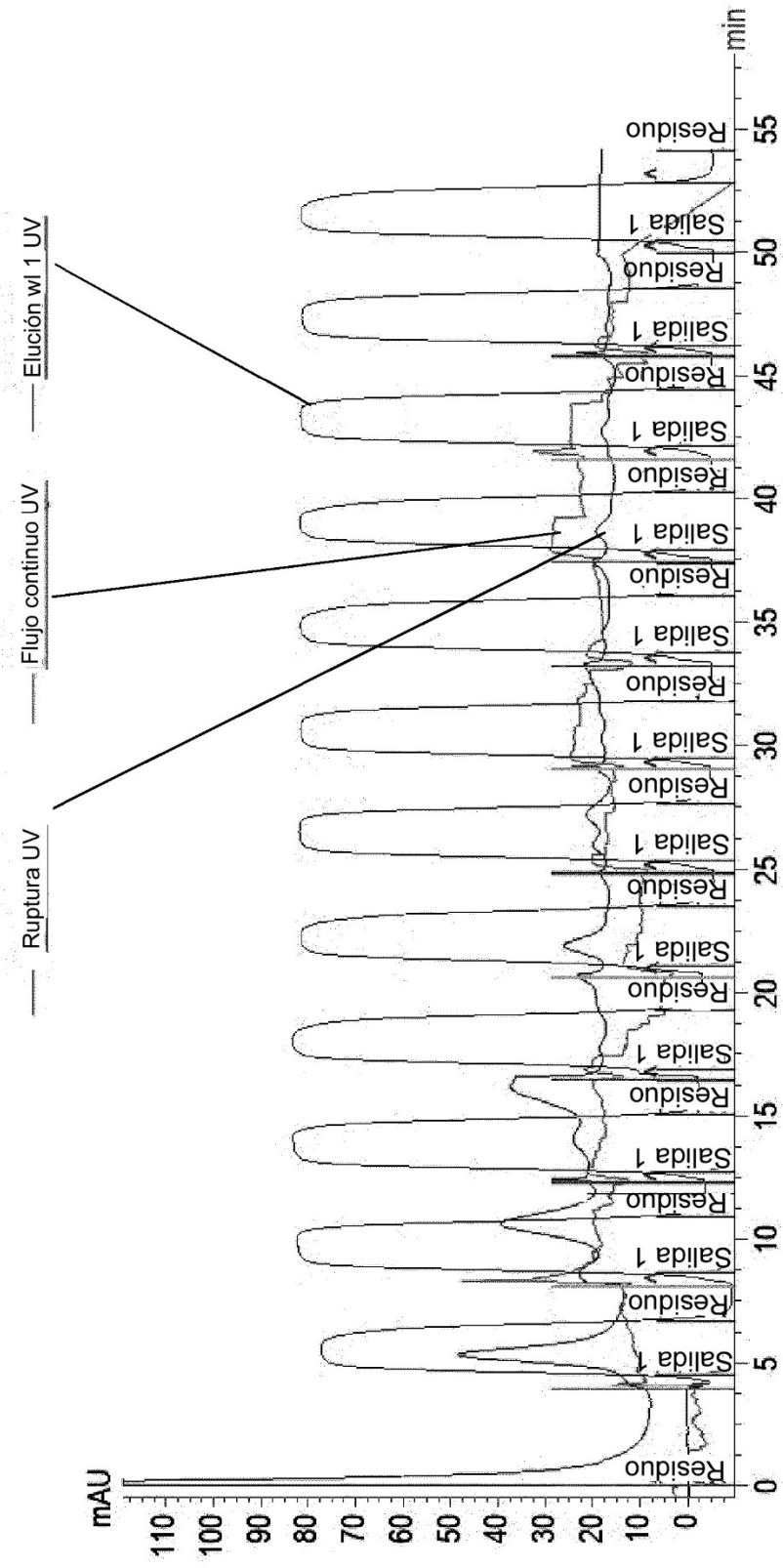


Fig. 8.

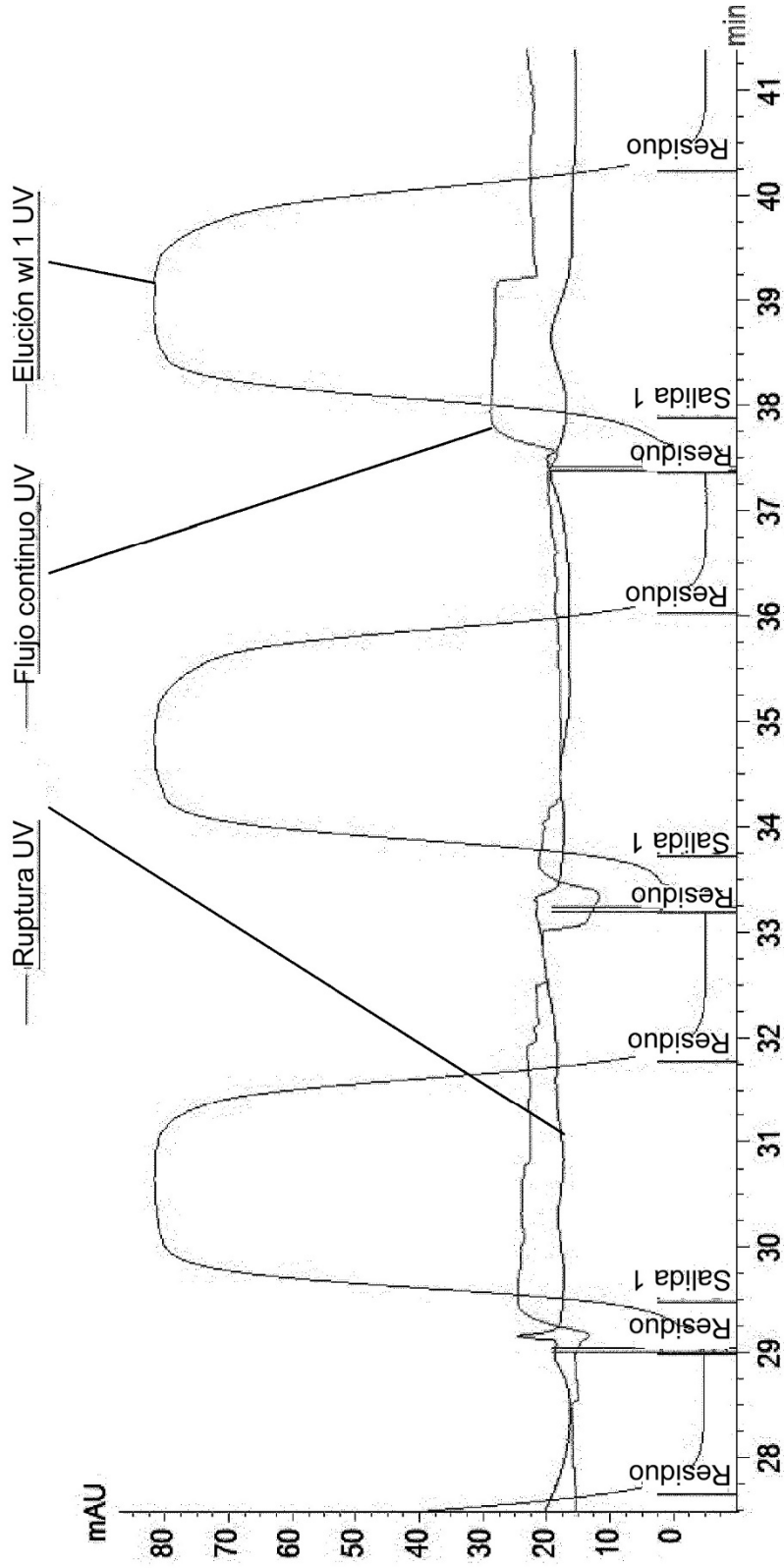


Fig. 9.

1 2 3

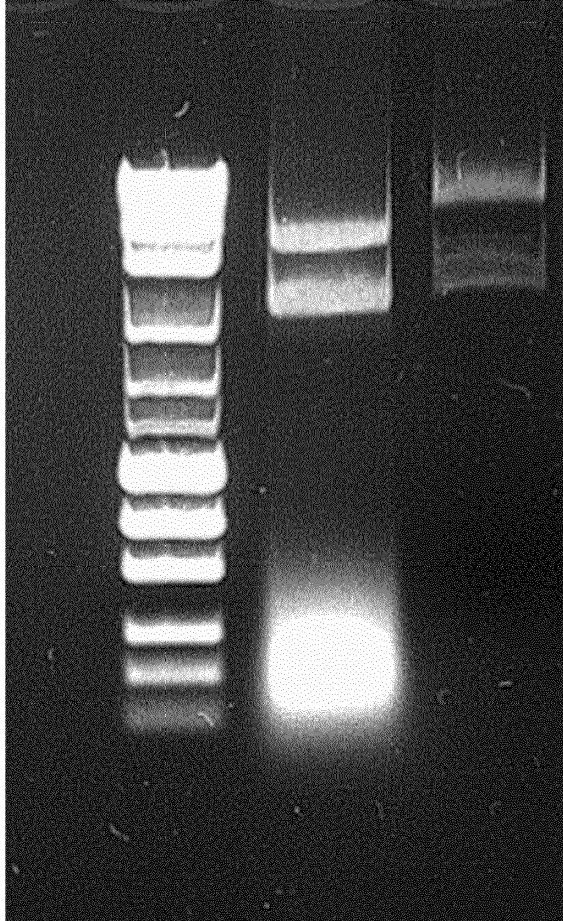


Fig. 10.