



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 008**

51 Int. Cl.:  
**C07H 21/00** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00936329 .2**  
96 Fecha de presentación : **26.05.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1187840**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

54 Título: **Procedimientos de purificación de ADN.**

30 Prioridad: **28.05.1999 US 136772 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.11.2009**

73 Titular/es: **Lonza Biologics Inc.**  
**101 International Drive**  
**Portsmouth, New Hampshire 03801, US**

72 Inventor/es: **Ramasubramanyan, Natarajan**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 328 008 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

## Procedimientos de purificación de ADN.

5 La presente invención proporciona procedimientos para la purificación de ADN plásmido que incluye la extracción de impurezas de la célula huésped, tales como endotoxinas, ARN, proteínas y ADN de la célula huésped, a partir de una solución acuosa que contiene ADN plásmido y procedimientos para la separación y purificación de ADN plasmídico superenrollado de una solución acuosa que contiene una mezcla de ADN plásmido superenrollado y nicked o relajado utilizando medio de interacción hidrofóbica. También se proporcionan procedimientos mejorados para pequeña escala, tales como laboratorio o escala de unidad de banco, purificación de ADN y equipamiento utilizado en tales procedimientos. La presente invención proporciona ADN purificado y/o separado, tal como plásmido, preferentemente superenrollado, ADN.

15 La terapia génica ofrece un paradigma de nuevo tratamiento para curar enfermedades humanas. El uso de ADN para el tratamiento de enfermedades genéticamente causadas, incluyendo fibrosis quística, varios tipos de cáncer, etc., e inmunización contra enfermedades, es un prometedor modo de terapia que en la actualidad es ampliamente perseguido. Más que alterar el fenotipo de la enfermedad mediante el uso de agentes que interactúan con productos génicos, o son en sí mismos productos génicos, la terapia génica puede teóricamente modificar genes específicos resultando en la cura o tratamiento de la enfermedad. La terapia génica también puede utilizarse como un sistema de suministro de fármacos. Para lograr esto, un gen que produce un producto útil (ARN, péptido, proteína, etc.) o es en sí mismo un producto útil (tales como en el uso de ADN antisentido) sería insertado en el ADN o célula de una célula homóloga, heteróloga o autóloga de un individuo o célula huésped para ser administrada luego a un individuo, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, durante la cirugía de vasos sanguíneos, un gen que produce un factor anti coagulación sería insertado en el ADN de células que revisten los vasos sanguíneos para ayudar a prevenir la formación de coágulos de sangre peligrosos. Muchas otras condiciones también pueden conducir al tratamiento utilizando esta aproximación general.

30 La terapia génica espera que sea una herramienta poderosa para tratar muchos de los más de 4.000 desórdenes genéticos conocidos, incluyendo fibrosis quística, enfermedad coronaria, cáncer, artritis, y otras enfermedades. La terapia génica generalmente requiere la transferencia de material genético (ADN) en un individuo. La entrega genética o la entrega de material genético can puede lograrse tanto mediante administración directa del 100 que contiene el virus o ADN plásmido a la sangre tejidos, indirectamente a través de la introducción de células manipuladas en el laboratorio para albergar ADN extraño o a través de diferentes técnicas de encapsulado o de portador conocidas en la técnica. Informes recientes sugieren que la entrega directa de ADN también puede ser posible. Varios sistemas distintos están en uso o bajo consideración para la transferencia somática de genes. Estas incluyen, por ejemplo, ADN (tanto desnudo o acompañado), virus ARN (retrovirus), y virus ADN (adenovirus, virus adenoasociado [AAV], virus del herpes, y virus de la viruela).

40 Las ventajas claves del modo de terapia génica no viral, tales como el uso de ADN plásmido, es la facilidad de preparación en grandes cantidades, un alto grado de seguridad, una falta general de integración del ADN heterólogo en el ADN del astro la huésped, y la posibilidad de utilizar gen(es) o fragmentos de gen (es) virtualmente de tamaño y número ilimitado. Además, el uso de ADN plásmido en la terapia génica generalmente no implican el uso de gen(es) o proteínas extraños que pueden inducir una respuesta inmune no deseada en el receptor. Además, las alternativas al uso del ADN plásmido, tales como vectores virales, son relativamente más caras de producir.

45 Los procedimientos actualmente utilizados para producir ADN plásmido generalmente proporcionan una mezcla de ADN plásmido superenrollado y un artefacto ADN nicked (o relajado), que generalmente no es útil en la aplicación final del ADN plásmido. Los procedimientos de la presente invención proporcionan una separación no destructiva de ADN plásmido superenrollado y nicked de forma tal que mientras los presentes procedimientos se ejemplifican mediante la recuperación y uso del ADN plásmido superenrollado, una persona de habilidad ordinaria apreciará que cualquier forma separada del ADN plásmido puede ser considerada un producto útil de los procedimientos aquí divulgados. Además, mientras la presente divulgación enfatiza la necesidad de una mayor pureza del ADN plásmido superenrollado en el contexto de la terapia génica, una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que el ADN plásmido es ampliamente utilizado en biología recombinante molecular más allá del uso en preparaciones de terapia génica y la invención aquí divulgada encuentra una amplia aplicabilidad como un procedimiento preparatorio para ADN plásmido superenrollado aislado y purificado.

60 Los procedimientos actualmente disponibles para la separación de las dos formas de ADN plásmido utilizan cromatografía de intercambio de iones (A novel, rapid process for purification of plasmids for gene therapy (Bhikhabhai R. Ollivier M. and Blanche F., Amersham Pharmacia Biotech R & D, 75184 Uppsala, Sweeden and RPR Gencell, Rhone-Poulenc Roer, Center de Recherche de Vitry-Alfortville, 13 quai Jules Guesde, 94400 Vitry sur Siene, France. Publication number: 18-1129-51; Preparative purification of supercoiled plasmid DNA utilizando anion exchange chromatography, Duarte Miguel Prazeres, Thomas Schleup, Charles Cooney, Journal of Chromatography A, 606 (1998), 31-45) o cromatografía de exclusión (Prazeres, D.M., A comparison of Gel Filtration Chromatographic Supports for Plasmid Purification, Biotechnology Techniques Vol. 11, No. 6, June 1997, p 417-420), acopladas con el uso de aditivos tales como polietilén glicol (PEG), detergentes, y otros componentes tales como cobalto hexamina, espermidina, y polivinilpirolidona (PVP). Recientemente se concedió una patente (Horn, *et al* (Patente U.S. No. 5.707.812)) para la purificación de ADN plásmido superenrollado usando PEG como un aditivo. Sin embargo, procedimientos actual-

mente conocidos son incapaces de proporcionar una separación eficiente y de coste efectivo de ADN superenrollado y nicked (o relajado). Además, muchos de los procedimientos conocidos sufren de la desventaja de utilizar PEG u otros aditivos, que pueden no ser deseados en la fabricación de ADN plásmido, al requerir procedimientos de separación, eliminación y control de calidad adicionales, que pueden ser difíciles, consumir más tiempo y más caros.

5 Formas alternativas de procedimientos conocidos para la separación de formas superenrolladas y relajadas de ADN plásmido utilizan resinas muy caras, propietarias, que también utilizan solventes, tales como acetonitrilo, etanol y otros componentes, como trietilamina y tetrabutyl fosfato de amonio, durante el proceso. Estos procedimientos generalmente no son adecuados para producción en gran escala debido al uso de solventes. Además, no pueden aplicarse a materiales  
10 iniciales que tienen cantidad significativas de ADN plásmido relajado ya que la cantidad abundante de ADN plásmido relajado contaminante en los materiales iniciales tiende a reducir las capacidades de resolución de estas resinas. (Green, A. P. *et al.* Bio. Pharm. Vol. 10, No. 5, páginas 52-62, Mayo 1997).

15 Procedimientos adicionales de separación de ADN superenrollado y relajado se basan en la cromatografía de exclusión, que implica la separación de las dos formas de ADN plásmido basada en la pequeña diferencia de tamaño. Estas columnas tienden a ser relativamente largas, presentando significativos problemas de escala, haciendo no factible implementar en la producción en gran escala. Además los procedimientos de exclusión necesitan muestras concentradas de soluciones, que no es factible obtener con soluciones de ADN plásmido, debido a la naturaleza altamente viscosa del ADN. *Ver*, A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification G.N.M. Ferreira, J.M.S. Cabral and D.M.F. Prazeres, Biotechnology Techniques, Volume 11, No. 6, June 1997, pp 417-420.

20 Las preparaciones de ADN plásmido, que son producidas a partir de preparaciones bacterianas y con frecuencia contienen una mezcla de ADN plásmido relajado y superenrollado, con frecuencia requieren la extracción de endotoxina, tal como requiere la FDA, ya que las endotoxinas producidas en muchos huéspedes bacterianos son conocidos por causar reacciones inflamatorias, tales como fiebre o sepsis en el huésped que recibe el ADN plásmido. Estas endotoxinas son generalmente lipopolisacáridos, o fragmentos de los mismos, que son componentes de la membrana  
25 exterior de una bacteria Gram-negativa, y están presentes en la preparación de ADN como artefactos de las células huésped o como una parte de artefactos mayores, tales como membranas de células huésped o macromoléculas, utilizadas en la expresión y fabricación del ADN plásmido para la terapia génica, por ejemplo. Por lo tanto la extracción de endotoxinas es una etapa crucial y necesaria en la purificación del ADN plásmido para uso terapéutico o profiláctico.

30 La extracción de endotoxina a partir de soluciones de ADN plásmido primariamente ha utilizado la estructura negativamente cargada de las endotoxinas; sin embargo el ADN plásmido también está cargado negativamente y por lo tanto la separación usualmente se logra con resinas de intercambio de iones que unen ambas de estas moléculas y, bajo ciertas condiciones, preferencialmente eluyen el ADN plásmido mientras enlazan las endotoxinas. Dicha separación resulta en sólo la extracción parcial como cantidades significativas de endotoxinas eluidas con el ADN plásmido y/o se logra una recuperación muy pobre de ADN plásmido. Otros procedimientos patentados usan detergentes, que pueden presentar problemas. (Process for the depletion or removal of endotoxins. Coplan, Metin, Moritz, Peter, Schorr, Joachim, U.S. Patent Number: 5,747,663). Además, la capacidad de enlace de estas resinas está sólo en el orden de  
35  $10^3$  a  $10^4$  EU (unidades endotoxina)/ml de resina ya que la resina está ocupada tanto por endotoxina y ADN plásmido, por ejemplo, requiriendo típicamente de 3 a 80 litros de resina, basado en capacidades informadas de 50.000 EU/ml a 2000 EU/ml (Green, A. P. *et al.* Bio. Pharm. Vol. 10, No. 5, pages 52-62, May 1997. Sterogene technical profile DNA Etox, Sterogene, 5922 Farnsworth Cr., Carlsbad, CA 92008).

40 Prazeres *et al.*, Trends in Biotech. 17(4):169-174 (1999) discute los problemas asociados con la producción a gran escala de ADN plásmido de grado farmacéutico para terapia génica y observa que la baja capacidad de absorbentes cromatográficos de intercambio de aniones es un problema pertinente en la purificación del plásmido.

45 McLaughlin *et al.*, J. Chromatog. 418:51-72 (1987) describe procedimientos para la resolución de ARN utilizando HPLC. En particular cromatografía de intercambio de aniones y de fase reversa.

50 El documento WO 99/29832 describe un procedimiento cromatográfico HPLC para purificar ADN plásmido a partir de una mezcla que contiene tanto ADN plásmido como genómico. Se utiliza etanol como un solvente para eluir ADN plásmido.

55 Colote *et al.*, Analytical Biochem. 154:15-20 (1986) describe un procedimiento para el análisis y purificación de ADN plásmido mediante la cromatografía líquida de fase reversa de alto rendimiento. El proceso descrito se lleva a cabo en presencia de solventes orgánicos tales como acetonitrilo y DMSO.

60 La presente invención proporciona procedimientos de separación, aislamiento y/o purificación de ADN plásmido que pueden ser utilizados en combinación o independientemente. Específicamente, la presente invención proporciona procedimientos de separación, purificación y/o aislamiento de ADN plásmido superenrollado y relajado así como un procedimiento de separación, purificación y/o aislamiento de plásmido.

65 Impurezas del ADN de la célula huésped, tales como componentes o fragmentos que contienen endotoxina. Composiciones de ADN plásmido purificado, separado y/o aislado, específicamente ADN plásmido superenrollado, también son provistas por la presente invención. La presente invención también proporciona procedimientos y aparatos para separación, aislamiento y/o purificación de ADN plásmido a escala de laboratorio o de banco.

La presente invención proporciona procedimientos para aislar tipos deseados de polinucleótidos a partir de otros componentes presentes en mezclas que contienen estos polinucleótidos, produciendo composiciones enriquecidas en el tipo deseado de polinucleótidos. Los procedimientos incluyen la separación de los polinucleótidos de los componentes no deseados contactando mezclas que contienen los polinucleótidos con medio interactivo hidrofóbico. La separación de los polinucleótidos de otros componentes, así como la separación de tipos de polinucleótidos resulta de las diferentes afinidades de los polinucleótidos y otros componentes no deseados por el medio interactivo hidrofóbico bajo diferentes condiciones iónicas. Así, en los procedimientos de la invención se utiliza un medio interactivo hidrofóbico que tiene un enlace altamente preferencial para los lipopolisacáridos y lipoproteínas relativas a polinucleótidos; este enlace preferencial se produce en el rango de condiciones iónicas utilizado en el proceso de separación. También en la invención hay incluidos procedimientos que separan ADN superenrollado y ADN relajado. Los procedimientos utilizan condiciones iónicas donde el ADN superenrollado se enlaza preferencialmente al medio interactivo hidrofóbico relativo al ADN relajado.

Se entiende que, cuando se describe una concentración de sal utilizada en los procedimientos de esta invención, puede utilizarse una fuerza iónica equivalente de una sal diferente. También se entiende que, especialmente respecto a procedimientos que agotan y/o eliminan la endotoxina, estos procedimientos se aplican al plásmido así como al ADN no plásmido.

Es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos de separación, aislamiento y/o purificación ADN plásmido de impurezas contaminantes de la célula huésped.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar procedimientos de separación, purificación y/o aislamiento de ADN plásmido y componentes o fragmentos que contienen endotoxina.

Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar procedimientos de separación, purificación y/o aislamiento de ADN plásmido superenrollado y relajado.

ADN plásmido purificado, separado y/o aislado, específicamente composiciones ADN plásmido superenrollado, también son proporcionadas por la presente invención.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento de separación de endotoxina y otras impurezas de la célula huésped (por ejemplo, ARN, ADN cromosómico, proteína) del ADN plásmido implicando contactar un lisado celular con un medio de interacción hidrofóbica bajo condiciones donde la endotoxina y otras sustancias contaminantes se unen al medio de interacción hidrofóbica para formar un complejo y separar el ADN plásmido y el complejo. La endotoxina separada en el procedimiento de esta realización incluye endotoxina de microorganismos Gram-negativos así como fragmentos y componentes celulares y subcelulares unidos a las endotoxinas y fragmentos de endotoxina. El medio de interacción hidrofóbica enlaza ARN, incluyendo t-ARN, r-ARN y m-ARN, proteínas de la célula huésped y ADN cromosómico. El medio de interacción hidrofóbica útil en la presente invención puede estar en forma de resinas, membranas u otro medio de soporte.

Una forma preferida de esta realización incluye cargar la mezcla de ADN plásmido, con otros componentes opcionales contaminantes de la célula huésped, incluyendo endotoxinas, estando presentes, en una matriz de columna o lecho que contiene el medio de interacción hidrofóbica, en una forma donde la endotoxina y las impurezas de la célula huésped preferencialmente se unen o son retenidas por el medio de interacción hidrofóbica, y el ADN plásmido se recoge como un efluente (flujo continuo) desde el proceso de carga o en lavado(s) opcionales subsiguientes del medio de Interacción Hidrofóbica que no disturben o interrumpan la retención de las impurezas y endotoxinas de la célula huésped sobre y/o en el medio de interacción hidrofóbica. Después de la recolección del ADN plásmido, la columna o matriz de lecho puede ser regenerada mediante la elución de las impurezas de la célula huésped y endotoxinas unidas o retenidas mediante la alteración, cambio o modificación de las condiciones hidrofóbicas de interacción de la columna o lecho mediante, por ejemplo, la alteración de la concentración de sal que rodea la matriz de columna o lecho.

Realizaciones alternativas de la presente invención proporcionan procedimientos de separación en ausencia de una o ambas cromatografía de intercambio de iones o cromatografía de exclusión.

En una forma preferida de esta realización, el volumen de la columna o lecho es inicialmente equilibrado con una solución de reacción de sulfato de amonio a una concentración que permite la unión selectiva de las impurezas contaminantes a la columna de interacción hidrofóbica, preferentemente, una concentración de aproximadamente 2M. Las sales que pueden ser utilizadas en el procedimiento de la presente invención incluyen mezclas de aniones y cationes seleccionadas del grupo consistente en, pero no limitado a, acetato, fosfato, carbonato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ . Pueden emplearse mezclas de sales. Además, la mezcla de ADN plásmido y otras impurezas contaminantes, tales como endotoxinas, son preferentemente dializadas con un tampón de diálisis antes de contactar con la matriz de columna o lecho para extraer las sales y otros contaminantes que pueden alterar la hidrofobicidad de la endotoxina y del ADN plásmido y otras impurezas contaminantes, tales como endotoxina, en la solución de reacción de sulfato de amonio. La solución de reacción es preferentemente tamponada con, por ejemplo, Tris-HCl a un pH en el rango de, pero no limitado a, 6,8 a 8,5, preferentemente 7,4. Pueden utilizarse otros tampones, que son conocidos para aquellos entendidos en la técnica, tales como, pero no limitados a, Tris, TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano-sulfónico), Tricina (N-tris(hidroximetil) metilglicina), fosfato, PIPES (Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etano

## ES 2 328 008 T3

sulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanesulfónico), MEPES (ácido 3-N-(N-Morfolino)etilpiperazina-N'-2-etanesulfónico), y Bicina (N,N-bis(2-hiroxietyl) glicina).

5 Los procedimientos de la presente invención proporcionan ADN plásmido aislado y/o purificado, y una composición que contiene el ADN plásmido, que tiene un contenido de endotoxina sustancialmente reducido, o está libre de endotoxina, de forma tal que la carga de endotoxina del ADN plásmido se ha reducido en tanto como más del 95%, preferentemente, más del 98%, más preferentemente más del 99%, alternativamente más del 99,9% y más preferentemente más del 99,99% al 99,999%. El procedimiento de la presente invención puede utilizarse para separar grandes cargas iniciales de endotoxina, tales como al menos 200.000 a 400.000 unidades endotoxina (EU)/mililitro de solución, proporcionando una capacidad de al menos 600.000 a 3 millones EU/ml matriz hidrofóbica. Además, el proceso de la presente invención proporciona un producto de composición ADN plásmido que contiene un rango de menos de 10 a menos de 2500 EU o un rango de menos de 1 a menos de 300 EU/mg ADN. Alternativamente, el proceso de la presente invención proporciona un producto de composición ADN plásmido que contiene un rango de menos de 50 a menos de 1000 unidades endotoxina (EU) o un rango de menos de 10 a menos de 50 EU/mg ADN. El procedimiento de la presente invención también reduce el contenido de proteína a menos de 0,1% (w/w) ARN a menos de 1% (w/w) y de ADN cromosómico de menos de 1% (w/w).

20 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento de separación de ADN plásmido superenrollado de ADN plásmido relajado que incluye las etapas de contactar una mezcla de ADN plásmido superenrollado y ADN plásmido relajado con un medio de Interacción Hidrofóbica bajo una primera condición donde tanto el ADN plásmido superenrollado como el ADN plásmido relajado se unen al medio de interacción hidrofóbica para formar una primera mezcla de unión, alterando las primeras condiciones que rodean la primera mezcla de unión a una segunda condición para extraer el ADN plásmido relajado de la primera mezcla de unión para formar componentes separados que contienen una segunda mezcla de unión y el ADN plásmido relajado, y modificar las segundas condiciones que rodean la segunda mezcla de unión a una tercera condición para extraer el ADN plásmido superenrollado de la segunda mezcla de unión para formar componentes separados que contienen el medio de Interacción Hidrofóbica y el ADN plásmido superenrollado.

30 En otra forma de esta realización, la alteración y modificación pueden realizarse mediante el cambio de las condiciones de pH del tampón de elución o solución, en una forma tal que las formas relajada y superenrollada pueden ser eluidas a diferentes condiciones de pH, con o sin cambios en las condiciones de la sal.

35 En otra forma de esta realización, la alteración y modificación pueden realizarse a través de elución isocrática, donde una solución de la misma composición, preferentemente a una concentración de sal que pueda eluir ambas formas del ADN plásmido, cuando pasan a través de la columna que contiene el plásmido ligado, eluirían secuencialmente las dos formas distintamente, en fracciones separadas.

40 En otra realización, las condiciones de la sal y/u otras condiciones pueden ser modificadas en una forma tal que la forma relajada del plásmido puede ser recogida como la fracción no unida, mientras que la forma superenrollada se une a la resina. La forma superenrollada puede ser subsiguientemente eluída utilizando condiciones indicadas anteriormente.

45 En otra forma de esta realización, la alteración y modificación pueden realizarse mediante el uso de moléculas o una mezcla de moléculas que se unen a los ligandos competitivamente ("desplazadores") y extraer las formas ligadas de ADN plásmido de la matriz como componentes separados.

50 En otra forma de esta realización, moléculas o mezcla de moléculas que pueden unirse a través de interacción hidrofóbica o por el contrario, pueden mezclarse con soluciones de ADN plásmido, que, al cargarse en la columna pueden ser secuencialmente desplazadas, resultando en la separación de las diferentes formas de ADN.

En las dos formas alternativas anteriores de la realización, comúnmente referidas como modos de cromatografía de "desplazamiento" y "frontal", la molécula añadida puede co-eluir con el producto que, en la mayoría de los casos puede ser efectivamente separado utilizando procedimientos conocidos para aquellos en la técnica.

55 La cromatografía de desplazamiento es un modo de cromatografía en el cual dos o más moléculas unidas a una resina son desplazadas utilizando una molécula desplazadora que tiene una afinidad más alta por la resina resultando en un desplazamiento secuencial y por lo tanto elución de las dos o más moléculas unidas. Recientemente, se han identificado desplazadores para resinas hidrofóbicas de interacción, que consisten en copolímeros tribloque incluyendo polimetil metacrilato, ácido acrílico, y polidimetilaminoetil metacrilato (ver Ruaan *et al* "Hydrophobic displacement chromatography of proteins using triblock copolymers as displacers", 1998 AIChE meeting). Otros desplazadores han sido exitosamente desarrollados para la cromatografía de desplazamiento con resinas hidrofóbicas de interacción (ver Shukla *et. al.* Hydrophobic displacement chromatography of proteins in 1998 Annual AIChE meeting). Desplazadores tales como 2-(2-butoxi) etanol se han utilizado como desplazadores en cromatografía de fase reversa, que podrían ser útiles.

65 Después de unir las dos formas del plásmido, puede utilizarse un desplazador, tales como los listados anteriormente para desplazar ADN superenrollado y relajado secuencialmente de las resinas HIC (columna de interacción hidrofóbica) aquí descritas.

## ES 2 328 008 T3

En cromatografía de modo “frontal”, la columna se carga con una mezcla binaria, que difiere en su afinidad por la resina, y al sobrecargar continuamente la columna, un componente desplaza al otro y resulta en elución secuencial de los dos componentes. En la aplicación de este procedimiento de la presente invención, las dos formas de ADN, por ejemplo, pueden cargarse sobre una columna HIC y la sobrecarga de la muestra puede resultar en un efecto de desplazamiento que lleve al desplazamiento de la forma relajada, que puede ser recogida separadamente de la forma superenrollada.

En una forma de esta realización, la alteración y modificación son combinadas en un proceso continuo de un gradiente de elución del ADN plásmido relajado y ADN plásmido superenrollado mezclando primera mezcla de unión son una solución de sal, tales como solución de sulfato de amonio, con una concentración continuamente variable de sal, tales como sulfato de amonio, la concentración preferentemente variando de 3M a 1M de sal, tales como sulfato de amonio. El ADN plásmido relajado se recoge en esta forma de esta realización de la invención en un primer volumen eluido y el ADN plásmido superenrollado se recoge en un segundo volumen eluido.

En otra forma preferida de esta realización, las formas superenrollada y relajada del ADN plásmido son separadas uniendo primero las dos formas del ADN a un medio de interacción hidrofóbica en un lecho o columna a altas concentraciones de sal, o fuerzas iónicas equivalentes, tales como 2,5 M a 4 M, preferentemente 3 M, sulfato de amonio, y luego eluyendo, tanto en forma de gradiente por etapas o gradiente continuo, las dos formas separadas del ADN plásmido de la columna, cambiando la concentración de sal, o fuerzas iónicas equivalentes, a un primer rango de 2,45M a 2,35M sulfato de amonio y luego a un segundo rango de 0M (posiblemente 1M) a 2,3M sulfato de amonio (en la etapa de realización de la elución) o cambiando continuamente la concentración de sulfato de amonio del rango de 2,5 M a 4M a un segundo rango de 0M (posiblemente 1M) a 2,3M sobre un volumen de 1 a 30 volúmenes de columna o lecho, preferentemente al menos 6 volúmenes columna o lecho (en la realización de gradiente continuo). En cada una de estas formas, el ADN plásmido relajado eluye desde el medio de la columna o lecho a la concentración de sal (sulfato de amonio) en el rango de 2,35M a 2,45M mientras que el ADN plásmido superenrollado eluye desde el medio de la columna o lecho a la concentración de sal (sulfato de amonio) en el rango de 0M a 2,3M.

En otra realización, la invención proporciona procedimientos de aislamiento de ADN plásmido superenrollado que incluyen:

aplicar una muestra que contiene plásmido superenrollado a un medio de interacción hidrofóbica bajo condiciones iónicas donde el plásmido superenrollado preferencialmente se une al medio respecto al no-plásmido superenrollado; y

ajustar las condiciones iónicas de forma tal que el plásmido superenrollado unido se extrae del medio.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para enriquecer la cantidad de ADN superenrollado relativa al ADN relajado en una mezcla de los mismos, incluyendo el procedimiento (1) interactuar la mezcla que contiene ADN superenrollado y ADN relajado con un medio interactivo hidrofóbico que contiene una mitad alquil bajo condiciones iónicas donde el ADN superenrollado preferencialmente se une al medio interactivo hidrofóbico; (2) tratar el medio interactivo hidrofóbico que contiene el ADN relajado y superenrollado bajo condiciones iónicas que permitan la extracción preferencial del ADN relajado; y (3) eluir el ADN superenrollado del medio interactivo hidrofóbico.

En una realización preferida adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para extraer lipopolisacárido (LPS) de una composición que contiene ADN, incluyendo el procedimiento las etapas de (1) interactuar la mezcla que contiene el ADN y LPS con un medio interactivo hidrofóbico que contiene una mitad alquil, donde la interacción es bajo condiciones iónicas donde el LPS preferencialmente se une al medio interactivo hidrofóbico relativo al ADN; y (2) tratar el medio interactivo hidrofóbico que contiene el ADN y LPS con condiciones iónicas que permiten la extracción selectiva del ADN.

Los procedimientos de la presente invención proporciona ADN plásmido superenrollado aislado y/o purificado, y una composición que contiene el ADN plásmido superenrollado, que preferentemente está libre de endotoxina free, de forma tal que la cantidad de ADN plásmido superenrollado presente en la composición producida mediante los procedimientos aquí descritos es al menos 50% en peso de la cantidad total de plásmido a al menos 99% en peso, preferentemente al menos 60% en peso a al menos 95% en peso, más preferentemente al menos 70% en peso a al menos 90% en peso, más preferentemente al menos 75% en peso a al menos 85% en peso, ADN plásmido superenrollado.

El porcentaje en peso puede medirse, como aquí se ejemplifica, mediante resolución HPLC sobre una columna ADN-NPR HPLC, a través de un gradiente, resultando en picos con áreas correspondientes a la cantidad de cada componente. El porcentaje de forma superenrollada se calculó como la fracción del área del pico correspondiente al ADN superenrollado al área total de los picos de ADN plásmido superenrollado y relajado.

El medio de interacción hidrofóbica preferido que puede ser utilizado en los procedimientos de la presente invención incluye resinas de cromatografía hidrofóbicas de interacción que, por ejemplo, contienen polímero metacrilato o esqueleto copolímero, tales como copolímeros metacrilato/etilen glicol y/o metacrilato/propilen glicol (TosoHaas, Montgomeryville, PA), y/o una agarosa o sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), tales como re-

5 ticulada o no-reticulada, agarosa, sefarosa, dextrano, sílica que contiene polímero, polímeros orgánicos (naturales o sintéticos), una cerámica que contenga, o una matriz de gel, esqueleto, o una combinación de cualquiera de éstos, con C<sub>3</sub> a C<sub>10</sub> alquil, ramificado o recto, ligandos pendientes de cadenas laterales. Los grupos pendientes hidrofóbicos preferidos incluyen ligandos propil, butil, hexil y/o octil. Estos ligandos proporcionan la interacción preferencial de enlace que se aprovecha en los procedimientos de separación, purificación y/o aislamiento de la presente invención. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que las resinas hidrofóbicas de interacción pueden incluir ligandos además a o en lugar de esos ligandos alquil, que también serán útiles en el procedimiento de la presente invención. Ejemplos de tales ligandos incluyen, pero no están limitados a, fenil, octil, butil, propil, neopentil, hidroxipropil, benzil, octadecil, difenil, y metil así como derivados sustituidos y no sustituidos del mismo, y combinaciones de los mismos. Resina o materiales de medio adecuados útiles en la presente invención incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente EP No. 964057, Solicitud EP No. 99109441, JP 2000035423, JP 99127700 y JP 98127665 (Kitamura *et al.*).

15 El medio de interacción hidrofóbica puede estar en forma de granos, que pueden ser empaquetados o cargados en una columna o lecho reactor, o un medio reticulado poroso. El tamaño de grano del medio puede oscilar de 2,5 µm a más o igual a 100 µm. El tamaño de grano del medio está preferentemente en el rango de 30 a 110 µm de diámetro, tales como 35 a 100 µm de diámetro, o, alternativamente en el rango de 35 a 90 µm de diámetro. El medio de interacción hidrofóbica puede estar presente en forma de membranas, tales como esqueletos de celulosa o de derivados de celulosa, poliéter sulfonas, polisulfonas, y derivados de la misma y/u otros materiales conocidos en las técnicas de filtración y separación, incluyendo plásticos, tales como e incluyendo placas de microtítulo y de Petri o placas y contenedores de cultivo de células.

20 Los granos utilizados en columnas "Streamline" (Amersham Pharmacia biotech) típicamente son de mayor tamaño con diferentes densidades, y son hechos por varios fabricantes, incluyendo (Amersham Pharmacia Biotech, Biosepra Inc, pero no limitado a éstos, donde el lisado clarificado puede fluir a través de estas columnas de "lecho expandido", resultando en la extracción de contaminantes a través de la unión a los granos que contienen los ligandos interactivos hidrofóbicos.

30 Tamaños de granos menores, son típicamente utilizados en separaciones de alto rendimiento, incluyendo HPLC, donde esta invención puede utilizarse para proporcionar un procedimiento analítico cuantitativo para ADN plásmido y/o diferentes formas de ADN.

35 Los granos para los propósitos de uso en esta invención, particularmente la separación de dos formas de ADN plásmido no necesitan ser porosos ya que el ADN plásmido es generalmente demasiado grande para ser capaz de ocupar los poros, y por lo tanto proporcionar cualquier capacidad adicional. Sin embargo, para los propósitos de enlace de contaminantes, los poros pueden incrementar efectivamente la capacidad ya que las moléculas contaminantes tales como ARN, proteínas, endotoxinas y fragmentos de ADN son entonces comparables o menores que el tamaño de los poros. En este caso la porosidad jugará un papel y por lo tanto las resinas porosas pueden ser útiles.

40 En los siguientes procedimientos de la presente invención:

- (i) purificar ADN plásmido a partir de una mezcla del mismo que contiene al menos una impureza de célula huésped;
- 45 (ii) separar ADN plásmido superenrollado de ADN plásmido relajado; y
- (iii) enriquecer la cantidad de ADN superenrollado relativa al ADN relajado en una mezcla de los mismos;

50 el procedimiento se realiza en ausencia de solventes orgánicos, detergentes, glicoles, cobalto hexamina, espermidina y polivinilpirrolidona. Otros procedimientos de la invención preferentemente no requieren solventes orgánicos o aditivos o detergentes, tales como glicoles, polietilenglicol, cobalto hexamina, espermidina o polivinil pirrolidona, que más tarde requerirán separación del producto ADN plásmido superenrollado antes de utilizarlo en, por ejemplo, terapia génica.

### 55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama de flujo de las distintas etapas implicadas en realizar el procedimiento ejemplificado de separar ADN plásmido superenrollado y relajado.

60 La figura 2 muestra una representación conceptual de los distintos soportes hidrofóbicos de interacción con las químicas del ligando unidas a las mismas que fueron utilizados en el procedimiento ejemplificado.

La figura 3 muestra un diagrama de flujo de las distintas etapas implicadas en la realización del procedimiento ejemplificado de separar la endotoxina del ADN plásmido.

65 La figura 4 (inserción) muestra una imagen escaneada de un gel de agarosa del Ejemplo 5 (butil HIC) teñido con SYBR GOLD donde el carril 1 contiene un ADN superenrollado Ladder; los carriles 2 y 3, contienen muestras del pico 1 (relajado) y los carriles 3-5 contienen muestras del pico 2 (superenrollado). (Estando los carriles numerados de

## ES 2 328 008 T3

izquierda a derecha). El cromatograma del Ejemplo 5 de absorbancia *versus* volumen muestra la separación del ADN relajado (pico 1) y superenrollado (pico 2).

5 La figura 5 (inserción) muestra una imagen escaneada de un gel de agarosa del Ejemplo 6 (butil HIC) teñida con SYBR GOLD donde el carril 1 contiene un marcador; los carriles 2 y 3 contienen muestras del pico 1 (relajado) y los carriles 4-6 contienen fracciones del pico 2 (forma superenrollada). (Estando los carriles numerados de izquierda a derecha). El cromatograma del Ejemplo 6 muestra la separación de formas de ADN relajado (pico 1) y superenrollado (pico 2).

10 La figura 6 (inserción) muestra una imagen escaneada de un gel de agarosa del Ejemplo 7 donde el carril 1 contiene un marcador, los carriles 2 y 3 contienen material cargado sobre la columna; el carril 4 contiene material del pico del artefacto; el carril 5 contiene material de la Elución 2,4M AS; y el carril 6 contiene material de la Elución 1M AS. (Estando los carriles numerados de izquierda a derecha). El cromatograma muestra la separación de formas de ADN plásmido relajado y superenrollado donde el pico del artefacto es un pico iniciador ancho (izquierda), seguido hacia la derecha por picos relajado y superenrollado, respectivamente.

15 La figura 7 (inserción) muestra una imagen escaneada de un gel de agarosa del Ejemplo 8 (hexyl HIC) donde el carril 1 contiene un marcador; los carriles 2-4 contienen material del pico 1 (forma relajada); y los carriles 5 y 6 contienen fracciones del pico 2 (forma superenrollada). (Carriles y picos numerados de izquierda a derecha). El cromatograma demuestra la separación de las formas relajada de la superenrollada.

20 La figura 8 muestra una imagen escaneada de una electroforesis de un gel de agarosa de muestras teñidas SYBR GOLD, del Ejemplo 9, donde el carril 1 es un marcador; el carril 2 contiene el material cargado sobre la columna; los carriles 3, 4 y 5 contienen los lavados 1, 2 y 3, respectivamente; el carril 6 contiene la elución 1M; y el carril 7 contiene la elución de agua.

25 Los procedimientos de la presente invención aprovechan las diferencias en las hidrofobicidades del ADN plásmido superenrollado, ADN plásmido relajado y contaminantes celulares, tales como endotoxina.

30 Los procedimientos aquí descritos son útiles para purificar y aislar ADN plásmido superenrollado, cósmidos, y vectores fagomideos. Estos vectores y el ADN plásmido pueden ser purificados a partir de cualquier fuente. Además, el ADN plásmido y cósmidos presentes en levadura y células de mamífero también pueden ser purificados, ya que mezclas similares de contaminantes, incluyendo endotoxinas, ARN, proteínas y ADN cromosómico, pueden estar presentes en estas preparaciones. También existe la necesidad de obtener la forma superenrollada del ADN plásmido y cósmido a partir de estas fuentes y por lo tanto, los procedimientos aquí descritos pueden ser utilizados para purificar ADN en muchas de estas aplicaciones.

35 “Medio de interacción hidrofóbica” es un material que comprende (a) una mitad soporte y (b) una mitad hidrofóbica unida ya sea directa o indirectamente a la mitad soporte, ejemplos de los cuales son aquí descritos y son conocidos en la técnica. La mitad hidrofóbica proporciona las bases para la unión preferencial utilizada en los procedimientos de separación aquí descritos. Varios ejemplos de “medio de interacción hidrofóbica” son conocidos en la técnica y están aquí descritos. Otros términos aquí utilizados también indican un medio de interacción hidrofóbica y ejemplos del mismo, tales como “resina”, “matriz”, “columna”, “medio”, “granos” y “ligando de interacción hidrofóbica”.

40 “ADN” significa cualquier forma de ácido desoxiribonucleico, incluido, pero no limitado a, plásmido (tanto superenrollado y/o relajado o nicked), cósmido, o cromosoma artificial.

45 ADN “nicked” o “relajado” significa ADN que no está superenrollado. ADN “superenrollado” es un término bien entendido en la técnica.

50 Una “impureza contaminante” es cualquier sustancia de la cual se desea separar, o aislar, ADN. Las impurezas contaminantes incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de la célula huésped, endotoxina, ADN y/o ARN de la célula huésped. Se entiende que, lo que es considerado una impureza contaminante puede depender del contexto en el cual se practican los procedimientos de la invención. Una “impureza contaminante” puede ser o no una célula huésped derivada, por ejemplo, puede ser o no una impureza de la célula huésped.

55 “Aislar” o “purificar” un primer componente (tales como ADN) significa el enriquecimiento del primer componente a partir de otros componentes con los cuales el primer componente se halla inicialmente. Se proporcionan aquí grados de purificación deseable y/o obtenible. Preferentemente, los procedimientos de la invención resultan en un enriquecimiento aproximado de cinco veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de diez veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de 20 veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de 50 veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de 100 veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de 200 veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de 500 veces, preferentemente en un enriquecimiento aproximado de 1000 veces. Alternativamente, el grado de purificación puede expresarse como un porcentaje del primer componente respecto a otro componente, o respecto a la preparación resultante. Ejemplos de dichos porcentajes se proporcionan aquí.



## ES 2 328 008 T3

Unión o extracción “preferencial” o “selectiva” de un componente significa que, para una condición dada, el primer componente se une o se extrae en un mayor grado respecto a otro componente.

5 Como será entendido por aquellos entendidos en la técnica, “extracción” o “unión” no necesariamente, o aún de forma deseada, significa completa, o 100%, extracción o unión.

Una solución “acuosa” generalmente indica una solución de base agua (por ejemplo, el solvente principal es agua), que puede o no ser 100% de agua como solvente.

10 El aislamiento del ADN plásmido producido en células bacterianas recombinantes implica la lisis de las células y la extracción de restos celulares, que puede lograrse a través de varios procedimientos. La solución final contiene ADN plásmido, que contiene típicamente cantidades extremadamente altas de endotoxinas entre otros contaminantes. Los procedimientos de la presente invención prevén la extracción de cantidades significativas de los contaminantes  
15 como una primera etapa, donde el ADN plásmido fluye sin unir. Un procedimiento de la presente invención implica, opcionalmente dializar la solución mezclada obtenida a partir de la lisis bacteriana en un tampón en el rango de pH de 6,8 a 8,5, preferentemente un pH de 6,8 a 7,4, que contiene, preferentemente, 2M sulfato de amonio, con o sin 10 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y fluir opcionalmente la solución dializada a través de una columna de cromatografía empaquetada que contiene un soporte cromatográfico con un ligando(s) de interacción  
20 hidrofóbica, tales como cualquiera de, o una mezcla de, un ligando propil, butil, octil o hexyl, que preferentemente había sido, previamente equilibrado con un tampón en el rango de pH de 6,8 a 8,5 (preferentemente 6,8 a 7,4), que también contiene 2M sulfato de amonio, con o sin 10 mM EDTA. La solución de flujo continuo está típicamente a una concentración de sales aproximadamente de 2M, tales como sulfato de amonio, y predominantemente contiene ADN plásmido (mezcla de superenrollado y relajado) con menos de 2% de contaminantes. Dependiendo de las variaciones  
25 en las etapas anteriores, el porcentaje de ADN superenrollado puede oscilar en cualquier parte entre 50 y 95% en peso, típicamente aproximadamente 75 a 85%, alternativamente, 80 a 85%, requiriendo purificación adicional, implicando la extracción de la forma relajada de ADN plásmido de la mezcla.

30 Procedimientos de la presente invención también hacen posible producir ADN plásmido purificado que tiene niveles de endotoxina por debajo de niveles especificados, por ejemplo, típicamente <10 EU/mg ADN plásmido. Los procedimientos de extracción de endotoxina de la presente invención son adaptables tanto a producción a gran escala como a pequeña escala, permitiendo la producción económica de material de grado terapéutico y de laboratorio. Estos procedimientos aprovechan la unión selectiva de la endotoxina a las resinas hidrofóbicas aquí descrito que, para producción a gran escala, puede contener capacidades que excedan un millón de unidades por mililitro de resina  
35 utilizada.

Los procedimientos convencionalmente disponibles de extracción de endotoxina tienen bajas capacidades (1.000 a 50.000 EU/mililitro de resina) y/o resultan en bajas recuperaciones de ADN plásmido y/o implican el uso de componentes químicos y/o procedimientos que no pueden ser fácilmente utilizados en la preparación de material de grado terapéutico. (Patente U.S. No. 5.747.663). El procedimiento de extracción de endotoxina de la presente invención implica suspender la solución que contiene endotoxina y ADN plásmido en una sal, tales como sulfato de amonio o cloruro de sodio a una concentración de 2M que hace a la endotoxina significativamente más hidrofóbica que el ADN plásmido y asegura la unión o interacción preferencial y separación de la endotoxina sobre la resina que contiene ligandos hidrofóbicos de interacción, tales como grupos butil, octil, y/o hexil, en comparación con el ADN plásmido. La concentración de sal utilizada puede preferentemente ser optimizada para unir  
45 ARN, proteína y endotoxina. Una baja concentración de sal puede ser suficiente para proporcionar la unión de la endotoxina sola ya que la endotoxina tiene una mayor afinidad para los ligandos hidrofóbicos de interacción aquí descritos.

50 Una característica atractiva de este procedimiento de extracción de endotoxina es la inmensa capacidad de la resina por la endotoxina, de aproximadamente 1.000.000 EU/ml de resina, además de la simplicidad y >95% de recuperación de ADN plásmido. Por ejemplo, una solución de ADN plásmido que contiene 500 mg de plásmido y 10 millones EU de endotoxina puede ser purificada utilizando 10 ml de resina, mientras que, se requerirían al menos 1.000 a 4.000 ml de una resina de intercambio de aniones para unir el ADN plásmido y la endotoxina, con la desventaja añadida de recuperaciones pobres de resina de intercambio de aniones. El procedimiento de la presente invención por lo tanto resulta en ahorros de 100 a 400 veces en el coste de la resina, y ahorros adicionales de coste de columna y recuperación incrementada de producto. La resina comercialmente disponible ADN Etox es actualmente al menos 8 veces más cara que las resinas utilizadas en el procedimiento de la presente invención. Otra resina comercial (PolyFlo - PureSyn Inc., 87 Great Valley Pkwy Malvern, PA 19355) con propiedad química que es útil en la extracción de endotoxina es 5 a 10 veces más cara y requiere el uso de solventes y químicos de apareamiento de iones.  
60

Los procedimientos de la presente invención proporciona ADN plásmido de alta calidad que comprenden más de 90% de ADN plásmido superenrollado a partir del material inicial de menor calidad (por ejemplo, un material inicial compuesto de una mezcla de ADN relajado y superenrollado). Adicionalmente, los procedimientos de la presente invención son aplicables para procesos a gran escala típicamente usados para la producción de ADN plásmido para terapia génica. Los procedimientos de la presente invención permiten una producción confiable de ADN plásmido de alta calidad, independiente de variaciones que típicamente conducen a la reducción en calidad

por ejemplo generación de forma de ADN plásmido relajado/nicked. Estas variaciones pueden producirse durante el crecimiento de las bacterias que producen el ADN plásmido y las subsiguientes etapas de aislamiento y purificación.

5 Los procedimientos de separación de ADN plásmido superenrollado y relajado, y procedimientos de separación de ADN plásmido y endotoxina, de la presente invención se basan en un descubrimiento de que las formas de ADN plásmido y endotoxina exhiben diferentes especificidades de unión sobre resinas de cromatografía hidrofóbicas de interacción que, por ejemplo, contienen C<sub>4</sub> a C<sub>10</sub> alquil, ramificados o rectos, ligados, y preferentemente contienen tanto un ligando butil o un hexil. Estos ligandos proporcionan la interacción preferencial de unión que es aprovechada en los procedimientos de separación, purificación y/o aislamiento de la presente invención. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que las resinas hidrofóbicas pueden incluir ligandos además de o en lugar de estos ligandos alquil, que también serán útiles en el procedimiento de la presente invención. Ejemplos de dichos ligandos también se describen con anterioridad. Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran los procedimientos de la presente invención descrita. Los siguientes procedimientos generales fueron o pueden ser utilizados.

Se extrajeron plásmidos para aplicaciones de terapia génica a partir de una bacteria huésped adecuada, por ejemplo *Escherchia coli*, a continuación de una fermentación. En la siguiente ejemplificación de la invención descrita, se utilizó *E. coli* STBL-2, que contiene plásmido pEIA-K2. El plásmido pEI-A-K2 es un derivado plásmido pUC que contiene un gen supresor de adenovirus Tipo 5, y contiene un gen kanamicina como un marcador seleccionable. La fermentación se llevó a cabo anaeróticamente en un medio adecuado de extracto de levadura/glucosa que contiene sales inorgánicas, tales como fosfato de potasio mono básico, fosfato de sodio dibásico, sulfato de amonio y sulfato de magnesio a un pH de entre 6,5 a 7,8, preferentemente 7,0, y a una temperatura de 37°C. La aireación se ajustó a un volumen de aire por volumen de medio y la agitación se ajustó a 800 rpm. Las células se cultivaron en esta forma hasta que se agotó la glucosa del medio, luego se controló la DO del caldo de fermentación mediante la alimentación de glucosa y agitación. La alimentación contenía una solución concentrada de glucosa (160 g/L) y extracto de levadura (80 g/L) y sales (1,5 g/L sulfato de amonio, MgSO<sub>4</sub>, 1,5 g/L en tampón fosfato). Después de completar la fermentación, las células fueron recogidas mediante centrifugación o mediante filtración a través de membranas de ultra o microfiltración, y lavadas con TE tampón (ver a continuación), pH 7,4. Las células fueron lisadas contactando la suspensión con un volumen igual de una solución de 0,15N a 0,2N NaOH y 1% sulfato de sodio dodecil (pH 11,5 a 13) con mezclado suave. La solución alcalina fue neutralizada con una solución de acetato de potasio. El material fue luego clarificado tanto mediante centrifugación como mediante el pasaje de la suspensión a través de una serie de filtros intensos. Las soluciones de plásmido son concentradas mediante membranas de ultrafiltración y diafiltración contra TE tampón, pH 7. El concentrado diafilter puede aplicarse directamente al medio aquí descrito.

El contenido de ADN plásmido del lisado es generalmente menos del 2% del ácido nucleico total siendo la mayor parte de los contenidos ARN o ADN cromosómico. Además, el lisado está contaminado con endotoxina y proteínas celulares.

La presente invención también proporciona procedimientos de producción a escala pequeña, de laboratorio o de banco de ADN aislado o purificado, y equipos de columnas y separadores útiles aquí. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que la producción a pequeña escala de ADN plásmido introduce desafíos diferentes, en comparación con la producción gran escala. Específicamente, la separación a pequeña escala comporta la separación de una mayor proporción de ARN contaminante en el material inicial, de forma tal que mientras la relación de plásmido respecto al ARN en un material inicial a gran escala puede ser aproximadamente 2% (wt/wt), como se indicó anteriormente, la relación de pequeña escala es aproximadamente 0,1% (wt/wt). Además, el volumen de cultivo de las muestras a pequeña escala es generalmente de aproximadamente 2 mL hasta aproximadamente 2 L, en oposición a los de aproximadamente 5 L hasta aproximadamente 1000L en la separación a gran escala. Las separaciones a pequeña escala de la presente invención implican aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 1mg de plásmido con un volumen reactor o columna lecho de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 ml; usualmente en el rango de aproximadamente 10 ml hasta aproximadamente 15 ml. La presente invención proporciona por lo tanto, producción eficiente a pequeña escala de ADN aislado y/o purificado, preferentemente ADN superenrollado, a partir de impurezas, tales como endotoxina, ARN y ADN relajado.

Mientras que distintos procedimientos son utilizados en la presente ejemplificación, una persona de habilidad ordinaria apreciará que otros procedimientos preparatorios y materiales iniciales pueden ser utilizados en la invención aquí descrita.

#### Ejemplo 1

##### *Extracción de endotoxina utilizando Cromatografía Butil De Interacción Hidrofóbica (Pequeña escala)*

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de filtración. Todos los tampones utilizados fueron filtrados a través de un filtro de 0.2 µm, y se almacenaron muestras para endotoxina en tubos de muestra de poliestireno.

## ES 2 328 008 T3

Un concentrado de diafiltración (~ 400 ml) se dializó en TE pH 7,4 (50 ml Tris, 10 mM EDTA ajustado a pH 7,4 con HCl) se utilizó para el experimento. Se añadió sulfato de amonio (AS) según se requirió para llevar la muestra 2M a 100 ml de TE más 2M AS, tampón pH 7,4 y parcialmente disuelta. Esta solución se añadió a la muestra dializada para hacer un volumen final de 575 ml, del cual 475 ml se utilizaron para el experimento.

Una columna Butil 650S (resina Butil 650S de TosoHaas Inc., 156 Keystone Drive, Montgomeryville, PA 18936) de 2,6 cm de diámetro y 15 cm de altura de lecho, de aproximadamente 75 ml volumen de lecho se empaquetó y se equilibró con TE tampón, pH 7,4, que contiene 2M AS. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 5 ml/min. El flujo continuo se recolectó, y se tomaron muestras para análisis (concentración ADN, gel de agarosa, y ensayo de endotoxina. El ensayo de endotoxina se realizó con jeringuillas y las muestras fueron diluidas apropiadamente para obtener recuperaciones PPC (Positive Product Control) en el rango considerado aceptable. Las concentraciones de endotoxina se determinaron utilizando el ensayo BioWhittaker Kinetic-QCL Chromogenic LAL como se describió en la BW publicación No. P50-650U-5, Kinetic-QCL Test Kit Manual. A continuación de la carga de la muestra, se hizo fluir TE que contiene 2M sulfato de amonio a través de la columna, y se recogió y se muestreó. La columna fue subsiguientemente lavada con TE tampón - pH 7,4, USP agua purificada, y limpiada con 0,5N hidróxido de sodio, y enjuagada con >15 volúmenes de USP agua purificada. La endotoxina estuvo presente en cada uno de estos lavados como se muestra a continuación en la Tabla 1. Además para esta excepcional eficiencia de extracción de endotoxina, se extrajeron cantidades significativas de ARN, proteína, y fragmentos de ADN, dejando la muestra significativamente purificada.

TABLA 1

Muestra	ADN conc. (mg/ml)	Endotoxina EU/ml	Total unidades EU	% Endotoxina	EU por Mg de ADN
Carga	0,70	472,200	22.400.000	100	674.571
Flujo continuo	0,38	1,64	771	0,003	4,31
Lavado	0,56	7,48	1.196	0,005	13,42
capacidad de endotoxina por ml de resina:				3 millones	
EU/ml					
Reducción de endotoxina en muestra:				99,992%	

### Ejemplo 2

#### *Extracción de endotoxina utilizando Cromatografía Butil De Interacción Hidrofóbica (gran escala)*

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de filtración.

La diafiltración del concentrado (- 650 ml) se dializó en TE pH 7,4 (50 mM Tris, 10 mM EDTA ajustado a pH 7,4 con HCl) y el sulfato de amonio requerido para volver la muestra 2M se añadió a 1200 ml de TE que contiene 2M AS, pH 7,4 tampón y se disolvió. El volumen de esta solución se llevó hasta 1300 ml. Esta solución se añadió a la muestra dializada para hacer un volumen final de 1950 ml, y el pH se ajustó a 7,4 utilizando HCl.

Una columna Butil 650S de 5 cm diámetro y 15 cm de altura de lecho, de aproximadamente 275 ml de volumen de lecho se empaquetó y equilibró con TE tampón, pH 7,4, que contiene 2M AS. La muestra se cargó a una tasa de

## ES 2 328 008 T3

flujo de 20 ml/min. El flujo continuo se recogió, y se tomaron muestras para análisis (concentración ADN, gel de agarosa, y ensayo de endotoxina, como se describió anteriormente). A continuación de la carga de la muestra, TE que contenía 2M sulfato de amonio se hizo fluir a través de la columna, y se recogió y se muestreó. La columna fue subsiguientemente lavada con TE tampón - pH 7,4, USP agua purificada, y limpiada con 0,5N hidróxido de sodio, y enjuagada con >15 volúmenes de USP agua purificada. La endotoxina estaba presente en cada uno de estos lavados como se muestra a continuación en la Tabla 2. Además de esta extremadamente excepcional eficiencia de extracción de endotoxina, se extrajeron cantidades significativas de ARN, proteína, y fragmentos de ADN, dejando la muestra significativamente purificada.

TABLA 2

Muestra	ADN conc. (mg/ml)	Endotoxina EU/ml	Total EU	% Endotoxina	EU por mg de ADN
Carga	1,59	271500	176.475.000	100	170.754
Flujo continuo + Lavado	0,34	<0,5	1325	0,007	1,45
Capacidad de endotoxina por ml de resina:				0,64	
millón EU/ml					
Reducción de endotoxina en muestra:				99,993%	

### Ejemplo 3

#### 50 Extracción de endotoxina utilizando Cromatografía Hexil De Interacción Hidrofóbica (Pequeña escala)

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de centrifugación. El sobrenadante se dializó en un tampón 20 mM fosfato de potasio (solución 20 mM fosfato de potasio monobásico combinada con 20 mM fosfato de potasio dibásico en una proporción para obtener un pH de 6,8), pH 6,8 y el sulfato de amonio requerido para hacer la muestra 2M se añadió a 20 ml de KPB (20 mM fosfato de potasio tampón) que contiene 2M AS, pH 6,8 tampón y se disolvió. Esta solución se añadió a 5 ml de muestra dializada para hacer un volumen final de 25 ml y el pH se ajustó a 6,8.

Una columna Hexyl 650C (TosoHaas) de 1,6 cm diámetro y 4 cm de altura de lecho, de aproximadamente 8 ml de volumen de lecho se empaquetó y equilibró con KPB, pH 6,8, que contiene 2M AS. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 2 ml/min. El flujo continuo se recogió, y se tomaron muestras para análisis (concentración ADN, gel de agarosa, y ensayo endotoxina, ver anterior). A continuación de la carga de la muestra, se permitió el flujo continuo de KPB que contiene 2M sulfato de amonio en la columna, se recogió y se muestreó. La columna fue subsiguientemente lavada con KPB pH 6,8, USP agua purificada, y limpiada con 0,5N hidróxido de sodio, y enjuagada con >15 volúmenes de USP agua purificada. La endotoxina estaba presente en cada uno de estos lavados como se muestra a

## ES 2 328 008 T3

continuación en la Tabla 3. Además de esta eficiencia extremadamente excepcional de extracción de endotoxina, se extrajeron cantidades significativas de ARN, proteína, y fragmentos de ADN, dejando la muestra significativamente purificada.

5

TABLA 3

Muestra	ADN conc. (mg/ml)	Endotoxina EU/ml	Total unidades EU	% Endotoxina	EU por Mg de ADN
Carga	2,43	593500	29.675.000	100	244.238
Flujo continuo + Lavado	0,037	0,5	35	0,0001	14
Capacidad de endotoxina por ml de resina:				3,7 millones	
EU/ml					
Reducción de endotoxina en muestra:				99,999%	

45

### Ejemplo 4

#### 50 *Extracción de Endotoxina utilizando Cromatografía Octil De Interacción Hidrofóbica (Pequeña escala)*

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y lisado utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de centrifugación como se describió anteriormente. El sobrenadante se utilizó para el experimento. Se añadió sulfato de amonio requerido para hacer la muestra 2M a 20 ml de TE más 2M AS, pH 7,4 tampón y se disolvió. Esta solución se añadió a 10 ml de muestra dializada para hacer un volumen final de 25 ml y el pH se ajustó a 7,4.

Una columna Octil Sefarosa 4 de Flujo Rápido (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) de 1,0 cm diámetro y 10 cm de altura de lecho, de aproximadamente 8 ml de volumen de lecho se empaquetó y equilibró con TE, pH 7,4, que contiene 2M AS. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 2 ml/min. El flujo continuo se recogió, y se tomaron muestras para análisis (concentración de ADN, gel de agarosa, y ensayo de endotoxina). A continuación de la carga de la muestra, TE que contiene 2M sulfato de amonio se hizo fluir a través de la columna, se recogió y se muestreó. La columna fue subsiguientemente lavada con TE pH 7,4, USP agua purificada, y limpiada con 0,5N hidróxido de sodio, y enjuagada con >15 volúmenes de USP agua purificada. La endotoxina estaba presente en cada uno de estos lavados como se muestra a continuación en la Tabla 4.

65

# ES 2 328 008 T3

TABLA 4

5	Muestra	ADN conc. (mg/ml)	Endotoxina EU/ml	Total unidades EU	% Endotoxina	EU por mg de ADN
10	Carga	2,43	593500	59.350.000	100	244.238
15	Flujo continuo + Lavado	0,037	32	2240	0,004	280
20	Capacidad de endotoxina por ml de resina:				7,41	
25	millón EU/ml					
30	Reducción de endotoxina en muestra:				99,996%	

## Ejemplo 5

### 35 *Separación de formas superenrollada y relajada del ADN plásmido utilizando Cromatografía Butil De Interacción Hidrofóbica - Gradiente de Elución*

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de filtración, como se describió anteriormente. La purificación gruesa del ADN plásmido para eliminar los contaminantes principales tales como endotoxina, ARN, proteína, ADN cromosómico, etc. se realizó utilizando cromatografía butil de interacción hidrofóbica, donde, a una concentración de 2M Sulfato de amonio, el ADN plásmido fluye a través de la columna mientras los contaminantes se unen a la columna (ver anterior).

45 El flujo continuo que contiene el ADN plásmido se dializó y procesó sobre una columna de intercambio de iones (Bio Septra) que no proporcionaba ninguna purificación adicional. El procesado a través de la columna Q de intercambio de iones y diafiltraciones no son necesarias para lograr la separación sobre la columna butil. La elución de la columna Q de intercambio de iones fue diafiltrada utilizando una membrana 30 kD regenerada de celulosa (0,1 m<sup>2</sup>, Millipore Corporation). El material dializado se ajustó a 3M sulfato de amonio utilizando sulfato de amonio sólido.

55 Una columna Butil (Toyopearl Butil 650S - TosoHaas) de 2,6 cm diámetro y aproximadamente 15 cm de altura se empaquetó a una tasa de flujo de 15-20 mUmin. La columna fue equilibrada con 3M sulfato de amonio en Tris - EDTA tampón pH 7,4. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 5 ml/min. El plásmido se unió a la columna a 3M sulfato de amonio. La columna fue entonces lavada con 2-3 volúmenes de columna de una solución 3M de sulfato de amonio en tampón. La columna se eluyó entonces con un gradiente de sulfato de amonio de concentración desde 3M a 1M sobre 6 volúmenes de lecho. Durante el gradiente de elución, resultaron dos picos, el primer pico que contiene la forma relajada del ADN plásmido, y el segundo pico que contiene la forma superenrollada de ADN plásmido como se evidencia en fracciones del gel de agarosa (la figura 4A). El cromatograma se muestra en la figura 4B. Los resultados fueron confirmados adicionalmente mediante un ensayo HPLC utilizado para determinar el porcentaje de las dos formas (Tabla 5).

65 Dentro de los límites de sensibilidad del ensayo, se confirmó que el segundo pico contenía un 85% de forma superenrollada, mientras que el material inicial sólo contenía un 50-60% de forma superenrollada. Al menos un 90% del ADN plásmido superenrollado inicial fue recuperado. La resolución de los picos fue adecuada para realizar la separación, aún con una altura de columna de 15 cm. Esto demuestra la separación efectiva de formas superenrollada y relajada del plásmido utilizando cromatografía Butil de interacción hidrofóbica. Además de esta excelente separación,

## ES 2 328 008 T3

la cantidad residual de ARN, proteína, y endotoxina pueden ser extraídas resultando en un producto que reúne las especificaciones para la terapia génica.

TABLA 5

5

10

15

Muestra	% Superenrollado
Material inicial	63
Fracción Pico 1	8
Fracción Pico 2	83

### Ejemplo 6

20 *Separación de formas superenrollada y relajada del ADN plásmido utilizando Cromatografía Butil De Interacción Hidrofóbica -Gradiente Elución Long columna*

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de filtración, como descrito anteriormente. Se realizó una purificación gruesa del ADN plásmido para eliminar los principales contaminantes tales como endotoxina, ARN, proteína, ADN cromosómico, etc. utilizando cromatografía butil de interacción hidrofóbica, donde, a una concentración de 2M Sulfato de amonio, el ADN plásmido fluye a través de la columna mientras los contaminantes se unen a la columna (ver anterior). El flujo continuo que contiene el ADN plásmido se dializó y procesó sobre una columna de intercambio de iones que no proporciona ninguna purificación adicional. La elución de la columna Q fue diafiltrada utilizando una membrana de celulosa 30 kD regenerada. El material dializado se ajustó a 3M sulfato de amonio utilizando sulfato de amonio solido, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5.

Una columna Butil (Toyopearl Butil 650S - TosoHaas) de 2,6 cm diámetro y aproximadamente 30 cm de altura se empaquetó a una tasa de flujo de 15-20 ml/min. La columna fue equilibrada con 3M sulfato de amonio en Tris - EDTA tampón pH 7,4. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 5 ml/min. El plásmido se unió a la columna a 3M sulfato de amonio. La columna se lavó entonces lavada con 2-3 volúmenes de lecho con una solución tampón 3M sulfato de amonio. La columna se eluyó con un gradiente de concentración de sulfato de amonio de 3M a 1M sobre 6 volúmenes de lecho. Durante el gradiente de elución, resultan dos picos, el primer pico que contiene la forma relajada del ADN plásmido, y el segundo pico que contiene la forma superenrollada de ADN plásmido como se evidenció en el gel de agarosa de fracciones (la figura 5A). El cromatograma se muestra en La figura 5B. Los resultados fueron adicionalmente confirmados mediante un ensayo HPLC utilizado para determinar el porcentaje de las dos formas (Tabla 6).

Dentro de los límites de sensibilidad del ensayo, se confirmó que el segundo pico contenía un 90% de forma superenrollada, mientras que el material inicial sólo contenía 50% de forma superenrollada. La resolución de punto de partida de los picos se obtuvo con la columna más larga. Este ejemplo demuestra claramente la separación efectiva de las formas superenrollada y relajada del plásmido utilizando cromatografía butil de interacción hidrofóbica. Además de esta excelente separación, cantidades residuales de ARN, proteína, y endotoxina pueden extraerse resultando en un producto que reúne las especificaciones para terapia génica.

50

TABLA 6

55

60

65

Muestra	% Superenrollado
Material inicial	53
Pico 1 Fracción 36	15
Pico 2 Fracción 47	83
Pico 2 Fracción 49	95
Pico 2 Fracción 52	91

## Ejemplo 7

*Separación de formas superenrollada y relajada del ADN plásmido utilizando Cromatografía Butil Interacción de Hidrofóbica - columna larga de elución por etapas*

5 Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2, y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de filtración, como se ha descrito anteriormente. Se realizó una purificación gruesa del ADN plásmido para eliminar los principales contaminantes tales como endotoxina, ARN, proteína, ADN cromosómico, etc. utilizando cromatografía butil de interacción hidrofóbica, donde, a una concentración de 2M Sulfato de amonio, el ADN plásmido fluye a través de la columna mientras que los contaminantes se unen a la columna (ver 10 Ejemplo 1 anterior). El flujo continuo y el lavado se reunieron y concentraron utilizando una membrana 30 kD de ultrafiltración utilizando filtración de flujo tangencial. El ADN plásmido concentrado se ajustó a 3M sulfato de amonio utilizando sulfato de amonio sólido.

15 Una columna Butil (Toyopearl Butil 650S - TosoHaas) de 1 cm diámetro y aproximadamente 30 cm de altura se empaquetó a una tasa de flujo de 6 ml/min. La columna fue equilibrada con 3M de sulfato de amonio en Tris - EDTA tampón pH 7,4. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 2 ml/min. El plásmido se unió a la columna a 3M sulfato de amonio. La columna se lavó entonces con 2-3 volúmenes de lecho con una solución tampón 3M de sulfato de amonio. La columna se eluyó entonces con varias concentraciones de sulfato de amonio - 2,8M, 2,7M, 2,6M, 2,55M, 2,5M, 20 2,4M, 1M - utilizando 2-3 volúmenes de columna. Se observaron picos en las eluciones 2,4M y 1M. La electroforesis de gel de agarosa de los picos se muestra en la figura 6A. El gel indica separación clara de las formas superenrollada y relajada. La elución 2,4M contiene la forma relajada, mientras que la elución 1M contiene el ADN superenrollado. El cromatograma se muestra en la figura 6B. Los resultados fueron adicionalmente confirmados mediante un ensayo HPLC usado para determinar el porcentaje de las dos formas (Tabla 7).

25 Dentro de los límites de sensibilidad del ensayo, se confirmó que el segundo pico contenía un 93% de forma superenrollada, mientras que el material inicial sólo contenía 62% de forma superenrollada. Estos resultados fueron confirmados mediante subsiguientes experimentos donde las eluciones 2,3M y 2,2M no proporcionan la resolución, y la elución 2,4M repetidamente proporcionó una significativa extracción de la forma relajada, enriqueciendo así la 30 forma superenrollada en la elución 1M. La separación lograda utilizando la elución por etapas es significativa en separaciones a gran escala, que son realizadas de forma más confiable utilizando eluciones en etapas. Este ejemplo demuestra claramente la efectiva separación de las formas superenrollada y relajada del plásmido utilizando elución por etapas de cromatografía butil de interacción hidrofóbica. Además de esta excelente separación, la cantidad residual de ARN, proteína, y endotoxina puede ser extraída resultando en un producto que reúne las especificaciones para 35 terapia génica.

TABLA 7

Muestra	% Superenrollado
Material inicial	62
2,4M Elución	8
1M Elución	93

## Ejemplo 8

*Separación de las formas superenrollada y relajada del ADN plásmido utilizando Cromatografía Hexyl de Interacción Hidrofóbica - Columna Larga de Gradiente de Elución*

55 Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2 y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de filtración, como se ha descrito anteriormente. Se realizó una purificación gruesa del ADN plásmido para eliminar los principales contaminantes tales como endotoxina, ARN, proteína, ADN cromosómico, etc. utilizando cromatografía butil de interacción hidrofóbica, donde, a una concentración de 2M Sulfato de amonio, el ADN plásmido fluye a través de la columna mientras que los contaminantes se unen a la columna (ver, por ejemplo, Ejemplo 1 anterior). El flujo continuo que contiene el ADN plásmido se dializó y procesó en una columna de intercambio de iones que no proporciona ninguna purificación adicional. La elución de la columna Q fue diafiltrada 60 utilizando una membrana de celulosa 30 kD regenerada. El material dializado se ajustó a 3M sulfato de amonio utilizando sulfato de amonio sólido (ver anterior).



## ES 2 328 008 T3

Una columna Hexyl (Toyopearl Hexyl 650C - TosoHaas) de 1 cm diámetro y aproximadamente 30 cm de altura se empaquetó a una tasa de flujo de 5 ml/min. La columna fue equilibrada con 3M sulfato de amonio en Tris-EDTA tampón pH 7,4. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 2 ml/min. El plásmido se unió a la columna a 3M sulfato de amonio. La columna se lavó entonces con 2-3 volúmenes de lecho con una solución 3M sulfato de amonio tampón. La columna se eluyó entonces con un gradiente de sulfato de amonio de concentración de 3M a 1M durante 6 volúmenes de lecho. Durante el gradiente de elución, resultaron dos picos, el primer pico que contiene predominantemente la forma relajada del ADN plásmido, y el segundo pico que contiene predominantemente la forma superenrollada de ADN plásmido como se evidencia en el gel de agarosas de fracciones (La figura 7A).

El cromatograma se muestra en la figura 7B. Cualitativamente, el segundo pico contenía significativamente una mayor proporción de plásmido superenrollado que el material inicial basado en la electroforesis de gel de agarosa. Se obtuvo una excelente resolución de los picos, considerando el hecho de que el tamaño de grano fue de 100 :m para el Hexyl, comparado con 35 :m para el Butil.

### Ejemplo 9

#### *Endotoxina extracción utilizando Cromatografía de Butil Interacción Hidrofóbica (utilizando cloruro de sodio)*

Se cultivaron células de *E. coli* que abrigan el plásmido pEIA-K2 y se lisaron utilizando procedimientos químicos, y se clarificaron a través de procedimientos de centrifugación. El sobrenadante se utilizó para el experimento. La muestra fue purificada a través de una columna de intercambio de iones (Q Hyper D - BIOSEPRA Inc.). Una elución 2M de cloruro de sodio de la columna se utilizó para este experimento. La muestra estuvo presente en 50 mM Tris 10 mM EDTA pH 7,4 tampón con 2M NaCl. Una columna Butil HIC (utilizando Butil 650S resina - TosoHaas) de 1 cm de diámetro y de altura 20 cm de aproximadamente 10 ml de volumen se empaquetó y equilibró con TE que contiene 2M cloruro de sodio. La muestra se cargó a una tasa de flujo de 2 ml/min. El flujo continuo se recogió, y se tomaron muestras para análisis (concentración de ADN, gel de agarosa, y ensayo de endotoxina). A continuación de la carga de la muestra, TE que contiene 2M sulfato de amonio se hizo fluir a través de la columna, se recogió y se muestreó. La columna fue subsiguientemente lavada con TE pH 7,4.

TABLA 8

Muestra	ADN conc. (mg/ml)	Endotoxina EU/ml	Total unidades EU	% Endotoxina	EU por mg de ADN
Carga	0,27	642	16.050	100	2377
Lavado	0,13	5	350	2	38
Capacidad de endotoxina por ml de resina:			1570 EU/ml		
Reducción de endotoxina en muestra:			98 %		

### Ejemplo 10

#### *Purificación de Plásmido a Pequeña escala con Cromatografía Butil de Interacción Hidrofóbica*

La purificación de ADN plásmido a pequeña escala se realiza utilizando equipos comercialmente disponibles, el más comúnmente conocidos de los cuales es el equipo Qiagen's Miniprep. Los procedimientos aquí descritos pueden utilizarse para la purificación de ADN plásmido proporcionan varias ventajas sobre los equipos comerciales. El siguiente ejemplo demuestra el uso de la cromatografía de interacción hidrofóbica en un procedimiento de la presente invención para purificación de ADN plásmido en una pequeña escala.

El material inicial para la purificación se obtuvo a través de procedimientos estándar. Específicamente, células de *E. coli* que abrigan plásmido de aproximadamente 4,65 Kb de tamaño se cultivaron en Caldo de Luria que contiene 100 µg/ml de ampicilina a 37°C. Las células se recogieron a un OD de 2,7. Las células se extrajeron del medio a través de centrifugación. Subsiguientemente, el gránulo de células se resuspendió en 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0.

## ES 2 328 008 T3

Se añadió un volumen igual de 200 mM NaOH, 1% SDS solución, se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Esta etapa resulta en la lisis de las células, liberando los contenidos de la célula, incluyendo el ADN plásmido. Se añadió solución de neutralización consistente en 3,1M de acetato de potasio (pH 5,5) en volumen igual (original) y se mezcló bien. El lisado neutralizado se filtró entonces a través de tela para queso y filtros para extraer el precipitado. El lisado clarificado se precipitó con 70% isopropanol (añadiendo 2,1 ml isopropanol por 3 ml de lisado clarificado). El precipitado se separó a través de centrifugación y el gránulo fue lavado con 70% etanol, secado y disuelto en 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA tampón, pH 8,0. Esta preparación se congeló a -20°C hasta su uso y fue el material inicial para los experimentos de purificación.

Una columna Butil 650S con un volumen de lecho de 20 ml y altura de lecho de 10 cm se empaquetó en una columna de 1,6 cm de diámetro (Pharmacia XK16/20) y se equilibró con 2,2M sulfato de amonio (AS) en 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (TE) tampón, pH 7,4. La muestra para cargar se preparó mediante el añadido de sulfato de amonio sólido a la concentración final de 2,2M. La muestra se diluyó con 2,2M AS en Tris - EDTA, pH 7,4 a 10 ml.

Las condiciones de purificación se diseñaron para permitir que el ADN plásmido sea recogido en el flujo continuo y que los contaminantes se unieran a la resina.

La muestra se cargó a 2 ml/min y se recogió el flujo continuo. La columna fue lavada con 35 ml de 2,2M AS en TE tampón y se recogió como fracciones Lavado 1(10 ml), Lavado 2 (14,5 ml), y Lavado 3 (10 ml). Un pico resultó durante el lavado. La columna se eluyó con 55 ml de 1M AS en TE tampón, pH 7,4 y se recogió como 1M Lavado 1 (10 ml) y 1M Lavado 2 (45 ml). Un pico resultó durante la elución 1M AS. La columna se eluyó con 50 ml de USP - Agua purificada. Resultó un pico. La tabla siguiente muestra el ácido nucleico total presente en cada una de las fracciones anteriores. Las concentraciones fueron calculadas en base a la absorbancia a 260 nm (Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $A_{260} * 50$ ).

TABLA 9

Fracciones de columna	Conc.	Masa
	( $\mu\text{g/ml}$ )	( $\mu\text{g}$ )
Carga	550,0	5503
Lavado 1	7,6	76
Lavado 2	40,4	607
Lavado 3	5,0	50
Lavado reunido (ADN plásmido)	20,9	733
1M elución	35,8	1611
Agua elución	30,5	1523

Se realizó la electroforesis de un gel de agarosa de las muestras. La figura 8 muestra una fotocopia del gel. La fotografía del gel muestra el ADN plásmido en las fracciones de Lavado (carriles 3, 4, 5). En comparación con la muestra de carga (carril 2) se ve ARN no visible en las fracciones de Lavado. Las fracciones de elución contienen ARN como se ve en los Carriles 6 y 7. La endotoxina en el Lavado reunido se midió utilizando un ensayo Kinetic QCL de endotoxina. No se detectó endotoxina en la muestra en el nivel de sensibilidad del ensayo, que fue de 0.005 EU/ml. El rendimiento de plásmido fue 733  $\mu\text{g}$  a partir de 100 ml de cultivo que es similar al obtenible con equipos comerciales.

Producción de ADN plásmido de grado farmacéutico, Magda Marquet, Nancy Horn, Jennifer Meek, Gregg Budahazi, Patente U.S. Número. 5.561.064.

Concentración y fraccionamiento por tamaño de ácidos nucleicos y virus en medio poroso, Cole, Kenneth D., Patente U.S. Número: 5.707.850.

Purificación de ADN plásmido durante cromatografía de columna, Nancy Horn, Greg Budahazi, Magda Marquet, Patente U.S. Número: 5.707.812.

**Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- FR 18112951 [0006]
- US 5707812 A, **Horn** [0006] [0104]
- US 5747663 A, **Coplan, Metin, Moritz, Peter, Schorr, Joachim** [0010] [0064]
- WO 9929832 A [0013]
- EP 964057 A [0045]
- EP 99109441 A [0045]
- JP 2000035423 B [0045]
- JP 99127700 B [0045]
- JP 98127665 B, **Kitamura** [0045]
- US 5561064 A [0102]
- US 5707850 A [0103]

**Documentos que no son patentes citados en la descripción**

- Duarte Miguel **Prazeres**; Thomas **Schleup**; Charles **Cooney**. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 606, 31-45 [0006]
- **Prazeres**, D. M. A comparison of Gel Filtration Chromatographic Supports for Plasmid Purification. *Biotechnology Techniques*, June 1997, vol. 11 (6), 417-420 [0006]
- **Green**, A. P. *et al. Bio. Pharm.*, May 1997, vol. 10 (5), 52-62 [0007] [0010]
- **Ferreira**, J. M. S. **Cabral**; D. M. F. **Prazeres**. A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification G. N. M. *Biotechnology Techniques*, June 1997, vol. 11 (6), 417-420 [0008]
- **Prazeres et al. Trends in Biotech., 1999, vol. 17 (4), 169-174 [0011]**
- **McLaughlin et al. J. Chromatog., 1987, vol. 418, 51-72 [0012]**
- **Colote et al. Analytical Biochem., 1986, vol. 154, 15-20 [0014]**

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para purificar ADN plásmido a partir de una mezcla del mismo que contiene al menos una impureza de la célula huésped que comprende las siguientes etapas:

- (a) formar una solución mediante la adición de suficiente sal a dicha mezcla en donde dicha solución tiene una concentración de sal en el rango de aproximadamente 2M a 4M para permitir la unión selectiva de dicha al menos una impureza de célula huésped a un medio de interacción hidrofóbica;
- 10 (b) contactar dicha solución que contiene ADN plásmido con dicho medio de interacción hidrofóbica bajo condiciones en que dicha al menos una impureza se une al medio de interacción hidrofóbica para formar un complejo; y
- 15 (c) recoger ADN plásmido no unido a partir de dicho complejo;

en donde dicho procedimiento se realiza en ausencia de solventes orgánicos, detergentes, glicoles, cobalto hexamina, espermidina, y polivinilpirrolidona.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1 en donde la al menos una impureza es seleccionada del grupo consistente en ARN, endotoxina, ADN cromosómico y proteína.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 en donde la al menos una impureza es una endotoxina.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 1 en donde la sal comprende un anión o catión seleccionado del grupo consistente en acetato, fosfato, carbonato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ .

5. Procedimiento según la reivindicación 4 en donde la sal es sulfato de amonio en un rango de concentración de 2M a 4M.

30 6. Procedimiento según la reivindicación 5 en donde el sulfato de amonio está presente en una concentración de 2M.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 1 en donde la solución comprende sales de sodio en un rango de concentración de 2M a 4M.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 en donde la sal de sodio es cloruro de sodio.

40 9. Procedimiento según la reivindicación 8 en donde la sal de sodio es cloruro de sodio en una concentración de 2M.

10. Procedimiento según la reivindicación 1 en donde la solución tiene un pH en el rango de 6,8 a 7,4.

11. Procedimiento según la reivindicación 1 en donde la solución tiene un pH de 7,4.

45 12. Procedimiento de separación de ADN plásmido superenrollado de una mezcla de ADN plásmido superenrollado y ADN plásmido relajado y, opcionalmente, al menos una impureza de célula huésped que comprende las siguientes etapas:

- 50 (a) formar a solución mediante el añadido de una sal a la mezcla de ADN plásmido superenrollado y ADN plásmido relajado y, cuando esté presente, dicha al menos una impureza de célula huésped;
- (b) contactar la solución con un medio de interacción hidrofóbica bajo una primera condición donde tanto el ADN plásmido superenrollado y el ADN plásmido relajado se unen al medio de interacción hidrofóbica para formar una primera mezcla de unión;
- 55 (c) alterar la primera condición que rodea la primera mezcla de unión a una segunda condición para extraer ADN plásmido relajado de la primera mezcla de unión para formar componentes separados que contienen una segunda mezcla de unión y ADN plásmido relajado; y
- 60 (d) modificar la segunda condición que rodea dicha segunda mezcla de unión a una tercera condición para extraer ADN superenrollado plásmido de dicha segunda mezcla de unión para formar componentes separados que contienen medio de interacción hidrofóbica y ADN plásmido superenrollado.

65 13. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde la al menos una impureza de célula huésped es seleccionada del grupo consistente en ARN, endotoxina, ADN cromosómico y proteína.

## ES 2 328 008 T3

14. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde la al menos una impureza de célula huésped es una endotoxina.

5 15. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde la sal comprende un anión o catión seleccionado del grupo consistente en acetato, fosfato, carbonato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ .

16. Procedimiento según la reivindicación 15 en donde la sal es sulfato de amonio en un rango de concentración de 2,5M a 4M.

10 17. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde la primera condición comprende equilibrar dicho medio con una solución de sal que contiene sulfato de amonio que está presente en un rango de concentración de 2,5M a 4M.

18. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde la segunda condición comprende lavar el medio con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en una concentración de 2,35M a 2,45M.

15 19. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde dicha tercera condición comprende lavar dicha segunda mezcla de unión con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en una concentración de 1 M a 2,3M.

20 20. Procedimiento de separación de endotoxina de ADN plásmido que comprende contactar una mezcla de endotoxina y ADN plásmido con un medio de interacción hidrofóbica bajo condiciones donde dicha endotoxina se une a dicho medio de interacción hidrofóbica para formar un complejo y separar dicho ADN plásmido y dicho complejo.

25 21. Procedimiento según la reivindicación 20 en donde la sal comprende un anión o catión seleccionado del grupo consistente en acetato, fosfato, carbonato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ .

22. Procedimiento según la reivindicación 20 en donde dicha mezcla comprende además una sal de amonio en un rango de concentración de 1,5 a 4M.

30 23. Procedimiento según la reivindicación 22 en donde dicha sal de amonio es sulfato de amonio que está presente en una concentración de 2M.

24. Procedimiento según la reivindicación 20 en donde dicha mezcla tiene un pH en el rango de 6,8 a 7,4.

35 25. Procedimiento según la reivindicación 24 en donde el pH es 7,4.

26. Procedimiento de separación de ADN superenrollado plásmido del ADN plásmido relajado que comprende contactar una mezcla de ADN plásmido superenrollado y ADN plásmido relajado con un medio de interacción hidrofóbica bajo una primera condición donde tanto el ADN plásmido superenrollado como el ADN plásmido relajado se unen a dicho medio de interacción hidrofóbica para formar una primera mezcla de unión, alterar dicha primera condición que rodea la primera mezcla de unión a una segunda condición para extraer dicho ADN plásmido relajado de dicha primera mezcla de unión para formar componentes separados que contienen una segunda mezcla de unión y dicho ADN plásmido relajado, y modificar la segunda condición que rodea dicha segunda mezcla de unión hasta una tercera condición para extraer dicho ADN superenrollado plásmido de dicha segunda mezcla de unión para formar componentes separados que contiene dicho medio de interacción hidrofóbica y dicho ADN superenrollado plásmido;

en donde dicho procedimiento se realiza en ausencia de solventes orgánicos, detergentes, glicoles, cobalto hexamina, espermidina, y polivinilpirolidona.

50 27. Procedimiento según la reivindicación 26 en donde dicha primera condición comprende equilibrar dicho medio con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en un rango de concentración de 2,5 M a 4 M.

28. Procedimiento según la reivindicación 27 en donde dicha segunda condición comprende lavar dicha primera mezcla de unión con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en una concentración de 2,35 M a 2,45 M.

55 29. Procedimiento según la reivindicación 28 en donde dicha tercera condición comprende lavar dicha segunda mezcla de unión con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en una concentración de 1 M a 2,3M.

60 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 26 en donde dicha alteración y dicha modificación son combinados en un proceso continuo que comprende un gradiente elución de dicho ADN plásmido relajado y ADN plásmido superenrollado mediante la mezcla de dicha primera mezcla de unión con una solución de sulfato de amonio que contiene sal con una concentración continuamente variable de sulfato de amonio, dicha concentración variando de 3M a 1 M de sulfato de amonio, y dicho ADN plásmido relajado se recoge en un primer volumen eluido y dicho ADN superenrollado plásmido se recoge en un segundo volumen eluido.

65 31. Procedimiento según la reivindicación 26 en donde dicho componente de ADN plásmido relajado separado y dicho ADN plásmido superenrollado separado se recogen y se aíslan.

## ES 2 328 008 T3

32. Procedimiento para el enriquecimiento de la cantidad de ADN superenrollado relativa al ADN relajado en una mezcla de los mismos, procedimiento que comprende:

- (1) interactuar la mezcla que contiene ADN superenrollado y ADN relajado con un medio interactivo hidrofóbico que comprende una mitad alquil bajo condiciones iónicas en donde el ADN superenrollado preferencialmente se une al medio interactivo hidrofóbico;
- (2) tratar el medio interactivo hidrofóbico que contiene el ADN relajado y superenrollado bajo condiciones iónicas que permiten la extracción preferencial del ADN relajado; y
- (3) eluir el ADN superenrollado del medio interactivo hidrofóbico;

en donde dicho procedimiento se realiza en ausencia de solventes orgánicos, detergentes, glicoles, cobalto hexamina, espermidina, y polivinilpirolidona.

33. Procedimiento para extraer lipopolisacárido (LPS) de una composición que contiene ADN, procedimiento que comprende:

- (1) interactuar la mezcla que comprende el ADN y LPS con un medio de interacción hidrofóbica que comprende una mitad alquil, en donde la interacción es bajo condiciones iónicas donde el LPS preferencialmente se une al medio interactivo hidrofóbico relativo al ADN; y
- (2) tratar el medio interactivo hidrofóbico que contiene el ADN y LPS con condiciones iónicas que permiten la extracción selectiva del ADN.

34. Procedimiento de enriquecimiento del ADN superenrollado relativo al ADN relajado en una mezcla de los mismos, el procedimiento que comprende:

- (a) formar una solución mediante la adición de una sal a la mezcla de ADN superenrollado y ADN relajado;
- (b) contactar la solución con un medio de interacción hidrofóbica bajo una primera condición donde tanto el ADN superenrollado y el ADN relajado se unen al medio de interacción hidrofóbica para formar una primera mezcla de unión;
- (c) alterar la primera condición que rodea la primera mezcla de unión a una segunda condición para extraer ADN relajado de la primera mezcla de unión para formar componentes separados que contiene una segunda mezcla de unión y ADN relajado; y
- (d) modificar la segunda condición que rodea dicha segunda mezcla de unión a una tercera condición para extraer ADN superenrollado de dicha segunda mezcla de unión para formar componentes separados que contiene medio de interacción hidrofóbica y ADN superenrollado.

35. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 12, 20, 26 ó 34 en donde el medio de interacción hidrofóbica comprende un soporte de cromatografía con grupos hidrofóbicos pendientes.

36. Procedimiento según la reivindicación 35 en donde dichos grupos pendientes son seleccionados del grupo consistente en C<sub>3</sub> a C<sub>10</sub> grupos alquil.

37. Procedimiento según la reivindicación 35 respecto a las reivindicaciones 12, 20 ó 34 en donde el medio de interacción hidrofóbica es seleccionado del grupo consistente en un polímero metacrilato o esqueleto copolímero unido a al menos uno de un propil, butil, hexil, octil, nonil o una mezcla de éstos como grupo hidrofóbico pendiente.

38. Procedimiento según la reivindicación 35 respecto de la reivindicación 1 en donde el medio de interacción hidrofóbica es seleccionado del grupo consistente en un polímero metacrilato o esqueleto copolímero unido a al menos uno de un grupo hidrofóbico propil, butil, hexil, octil, nonil o decil.

39. Procedimiento según la reivindicación 35 respecto de la reivindicación 26 en donde el medio de interacción hidrofóbica es un polímero metacrilato o esqueleto copolímero unido a al menos un ligando propil, butil, pentil, hexil, heptil, octil, nonil o decil.

40. Procedimiento según la reivindicación 35 en donde el medio es al menos uno de esqueleto copolímero metacrilato etilenglicol o una agarosa reticulada.

41. Procedimiento según la reivindicación 35 en donde el medio es una resina en la forma de granos en el rango de tamaño de 15 a 100  $\mu\text{m}$ .

## ES 2 328 008 T3

42. Procedimiento según la reivindicación 34 en donde la sal comprende un anión o catión seleccionado del grupo consistente en acetato, fosfato, carbonato,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ .

5 43. Procedimiento según la reivindicación 40 en donde la sal es sulfato de amonio en un rango de concentración de 2,5M a 4M.

44. Procedimiento según la reivindicación 34 en donde la primera condición comprende equilibrar dicho medio con una solución de sal que contiene sulfato de amonio que está presente en un rango de concentración de 2,5M a 4M.

10 45. Procedimiento según la reivindicación 34 en donde la segunda condición comprende lavar el medio con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en una concentración de 2,35M a 2,45M.

15 46. Procedimiento de la reivindicación 34 en donde la dicha tercera condición comprende lavar dicha segunda mezcla de unión con una solución de sal que contiene sulfato de amonio en una concentración de 1M a 2,3M.

20

25

30

35

40

45

50

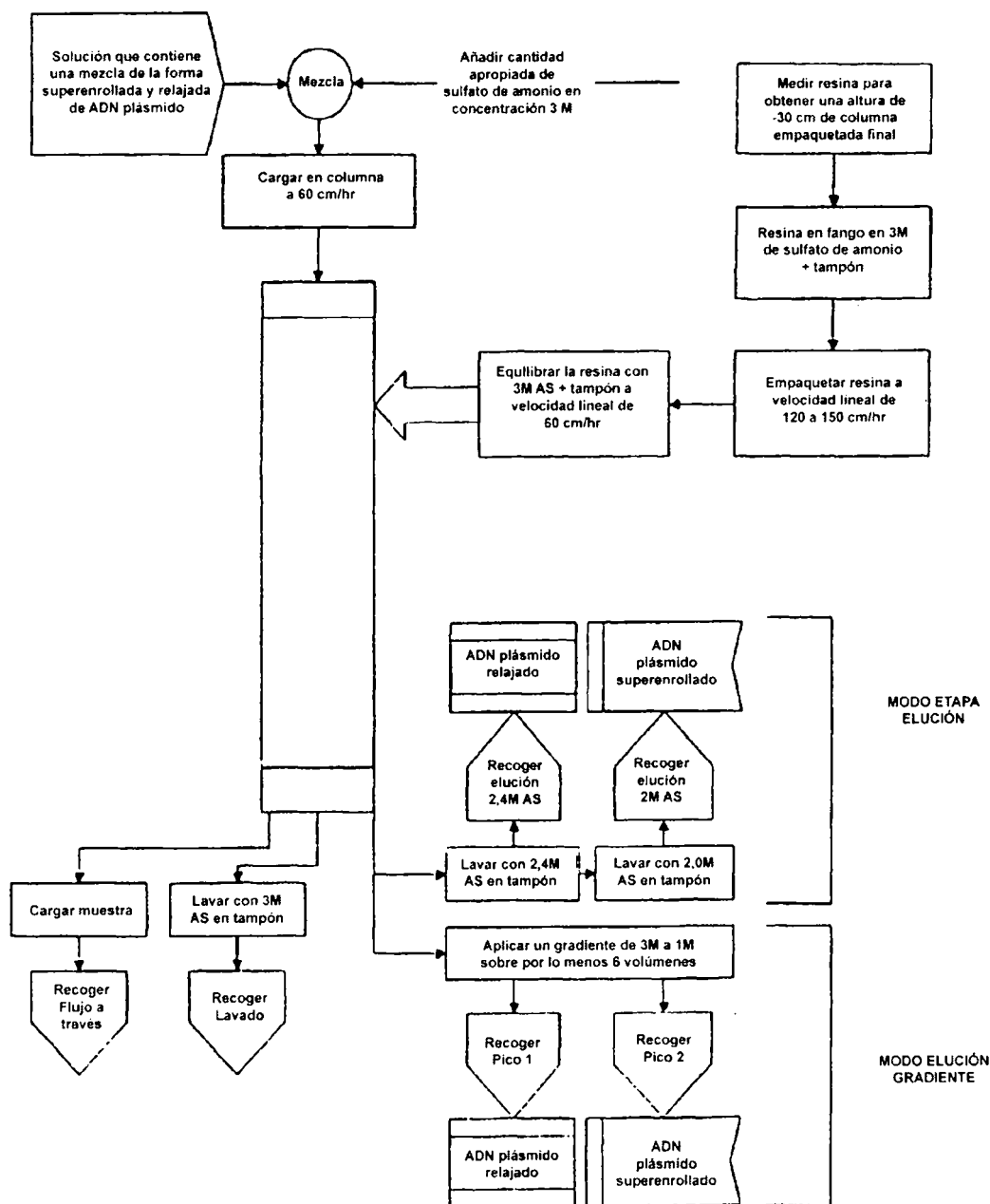
55

60

65

**Fig. 1**

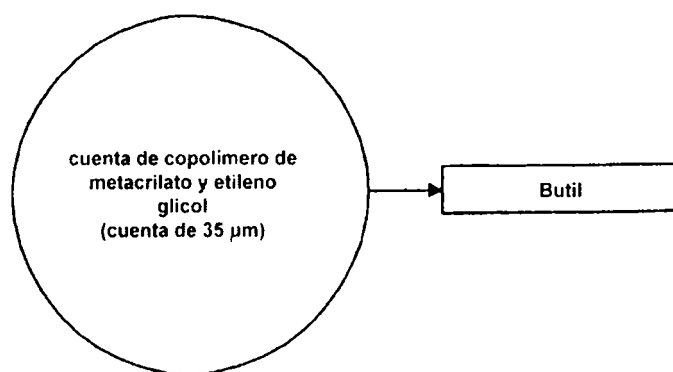
**PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN DE ADN PLÁSMIDO SUPERENROLLADO DE ADN PLÁSMIDO RELAJADO**



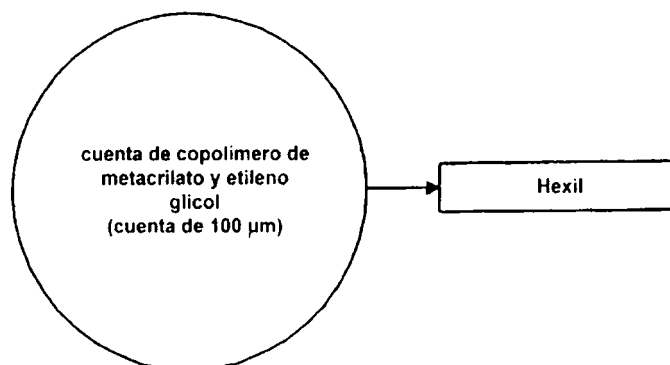


**Fig. 2**

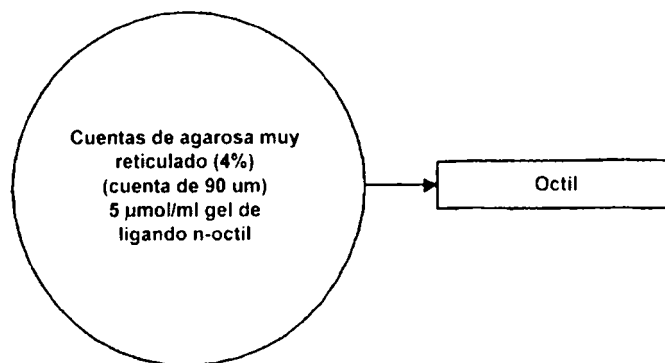
**Cuenta de resina HIC butil**



**Cuenta de resina HIC hexil**

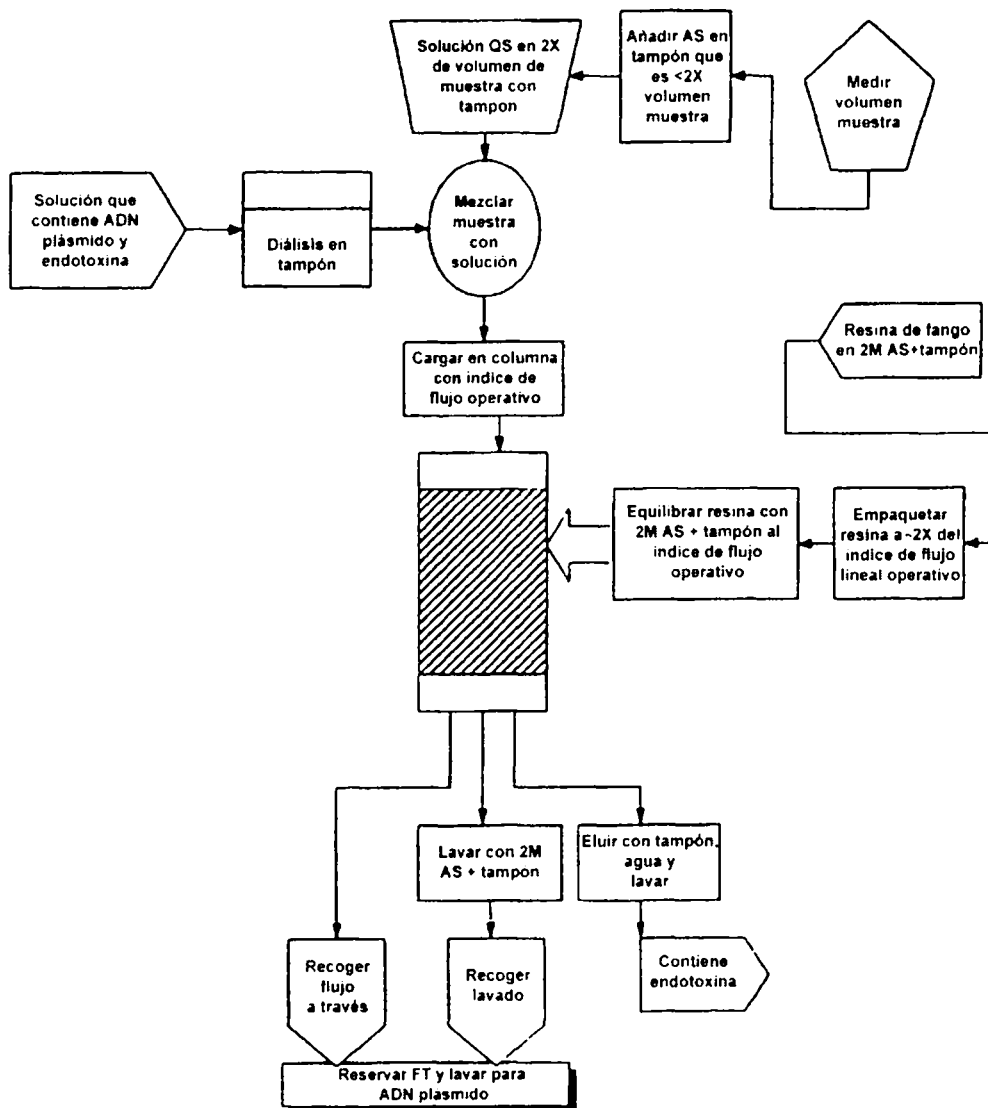


**Cuenta de resina HIC octil**

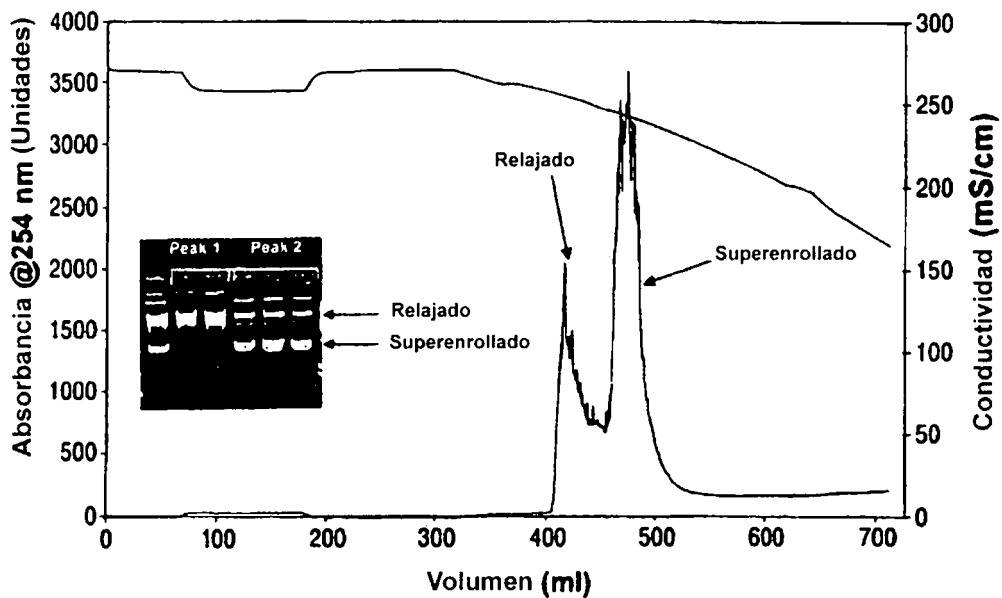


**Fig. 3**

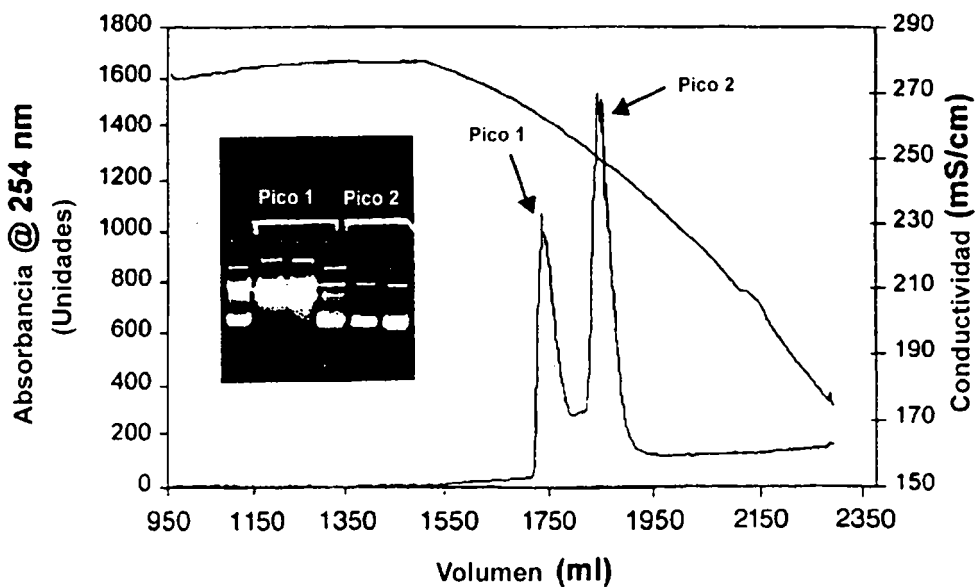
**Procedimiento para la retirada de endotoxina de soluciones de ADN plásmido**



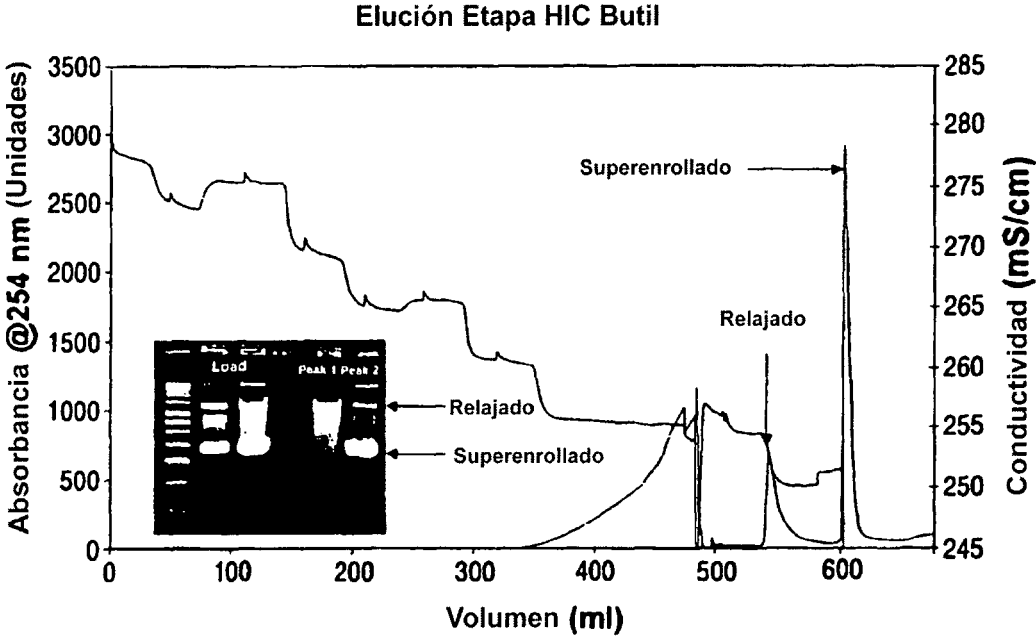
Elución Gradiente HIC Butil



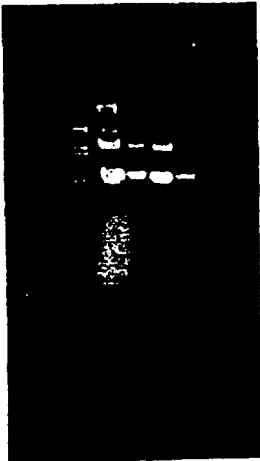
**Fig. 4**



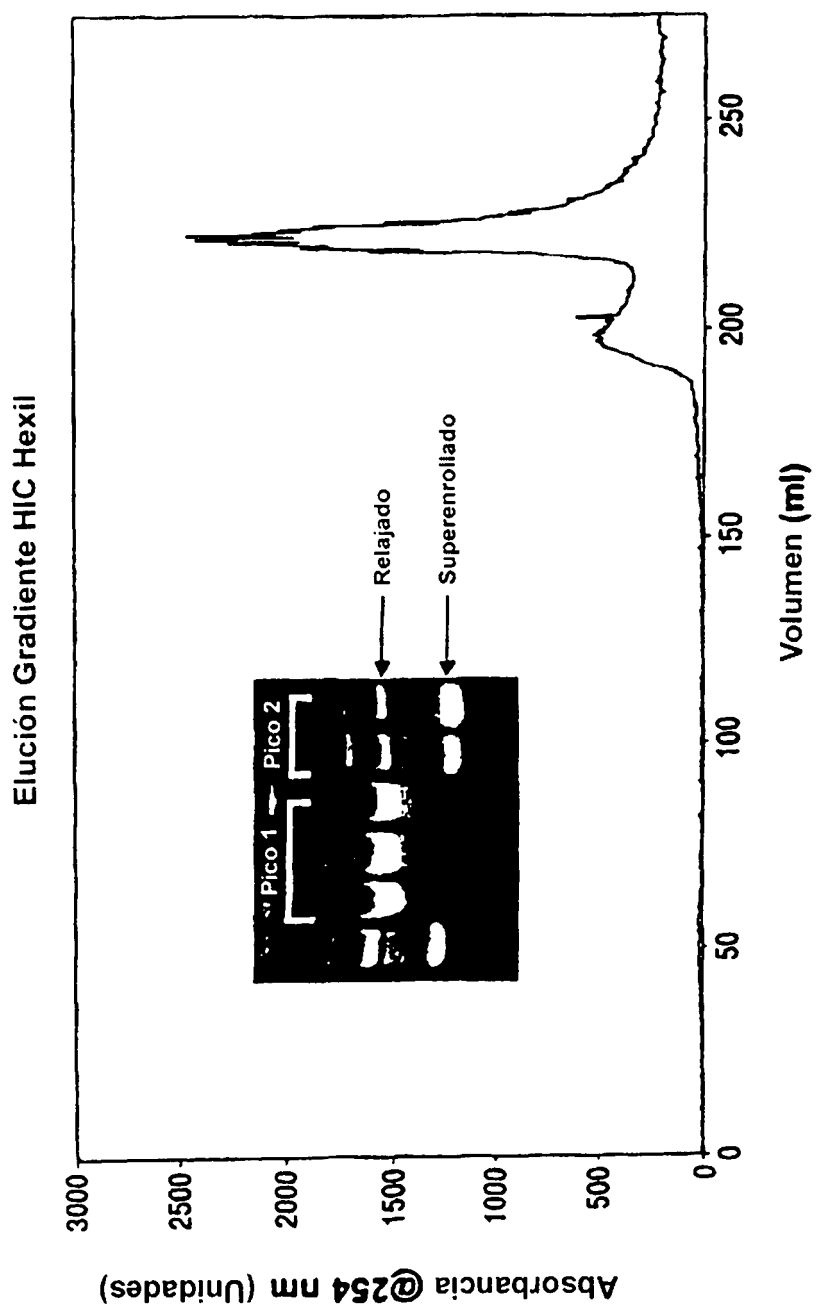
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 8**



**Fig. 7**