



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 069**

51 Int. Cl.:
C12N 1/06 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05739527 .9**
96 Fecha de presentación : **19.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1737945**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **Método para purificar ADN plásmido.**

30 Prioridad: **19.04.2004 US 563008 P**
17.09.2004 PCT/EP2004/011437

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2011

73 Titular/es: **AVENTIS PHARMA S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

72 Inventor/es: **Blanche, Francis;**
Couder, Michel;
Maestrali, Nicolas;
Guillemin, Thierry y
Gaillac, David

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 359 069 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

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos para purificar ácidos nucleicos. La invención se refiere en particular a métodos para preparar ADN plasmídico (ADNp) altamente purificado, en particular a la producción y aislamiento de ADN plasmídico de grado farmacéutico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los avances en la biología molecular sugieren claramente que la terapia basada en plásmidos, en particular en los campos de vacunas y terapia génica humana, pueden ser la base de medios eficaces para tratar enfermedades. Sin embargo, un obstáculo significativo de esta tecnología es la preparación de ADN plasmídico en la suficiente cantidad y con la suficiente calidad como para utilizarse en clínica. Un método prometedor para administrar de manera segura y eficaz un gen normal a células humanas es mediante ADN plasmídico. El ADN plasmídico es una forma cerrada, circular de ADN bacteriano en el que puede insertarse una secuencia de ADN de interés. Los ejemplos de secuencias de ADN de interés que pueden introducirse en células de mamífero incluyen un gen exógeno funcional o un gen mutante, secuencias antisentido, secuencias de ARNi o ARNids, ribozimas, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones virales, cáncer o enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Una vez administrado a la célula humana, el ADNp empieza a replicarse y a producir copias de la secuencia de ADN insertada. Así, los científicos consideran el ADN plasmídico como un vehículo prometedor para administrar secuencias de ADN de interés a células humanas con el fin de tratar una variedad de estados patológicos.

Se necesitan grandes cantidades de ADN plasmídico para el desarrollo de las investigaciones para aplicar la tecnología basada en plásmidos en un contexto terapéutico. Debido a que el ADN plasmídico utilizado en terapia génica y en otras aplicaciones clínicas es habitualmente producido por bacterias tales como *Escherichia coli* (*E. coli*), se necesitan métodos para separar de manera eficaz el ADN plasmídico del ADN genómico (ADNg) de la célula bacteriana, así como de endotoxinas y proteínas de la célula bacteriana. Por lo tanto, existe una necesidad creciente de procedimientos de purificación sencillos, robustos y escalables que puedan utilizarse para aislar grandes cantidades de ADN plasmídico a partir de células bacterianas.

Una etapa importante en cualquier procedimiento de purificación de plásmidos implica la lisis de las células bacterianas con el fin de liberar el contenido celular a partir del cual puede entonces aislarse el ADNp. De hecho, en primer lugar es necesario conseguir tres etapas de suspensión celular, lisis celular y neutralización y precipitación de los contaminantes del anfitrión. La resuspensión celular utiliza normalmente agitación manual o agitación magnética y un homogeneizador o mezclador impelente para resuspender las células en el tampón de resuspensión. La lisis celular puede realizarse mediante agitación manual o agitación magnética con el fin de mezclar las células resuspendidas con la disolución de lisis (que consiste en álcali diluido (base) y detergentes); después mantener la mezcla a temperatura ambiente (20-25 grados Celsius) o en hielo durante un periodo de tiempo, tal como 5 minutos, para completar la lisis. Como se ha indicado anteriormente, ni la agitación manual ni la agitación magnética son escalables. La tercera etapa es la neutralización y precipitación de los contaminantes del anfitrión. El lisado de la segunda etapa se mezcla normalmente con una disolución de neutralización fría mediante agitación suave o agitación magnética para acidificar el lisado antes de ponerlo en hielo durante 10-30 minutos para facilitar la desnaturalización y precipitación del ADN cromosómico de alto peso molecular, proteínas del anfitrión y otras moléculas del anfitrión. Ni la agitación manual ni la agitación magnética son escalables.

Generalmente, la pared celular se digiere mediante tratamiento con lisozima durante poco tiempo o mediante tratamiento con acetato alcalino o de potasio (KOAc). Generalmente, también se añade ARNasa para degradar los ARN de la suspensión bacteriana. Estas etapas químicas pueden resultar eficaces para lisar las células a pequeña escala. Sin embargo, el incremento de la viscosidad hace muy difícil el procesamiento a gran escala.

Un método alternativo sencillo y rápido para preparar plásmidos comprende tratar las bacterias con lisozima, hervirlas a aproximadamente 100°C en un tampón apropiado durante 20 a 40 segundos formando un grumo insoluble de ADN genómico, proteína y restos celulares permaneciendo el plásmido en disolución con ARN como contaminante principal. Después, se añade una disolución mezclada de NaOH y dodecilsulfato sódico (SDS) con el fin de disolver la membrana citoplásmica. NaOH desnaturaliza parcialmente los ADN y degrada parcialmente los ARN y SDS actúa para disolver la membrana y desnaturalizar las proteínas. Sucesivamente, el complejo SDS-proteína y los restos celulares se precipitan mediante la adición de acetato de potasio 5N (pH 4,8). En este momento, el pH es importante tanto para neutralizar el NaOH utilizado en dicha manipulación como para renaturalizar el plásmido. Posteriormente, se aplica una centrifugación para eliminar los precipitados, obteniéndose así los plásmidos deseados en el sobrenadante. Sin embargo, esta técnica no es apropiada para aumentar la escala hasta fermentaciones bacterianas de gran volumen y se pretende que sea para fermentaciones de menos de cinco litros. Esta serie de manipulaciones también requiere una mezcla lenta y firme, con el fin de evitar que el ADN cromosómico bacteriano se rompa en fragmentos pequeños y agregue, produciendo la contaminación del plásmido y dificultando la realización del procesamiento a gran escala.

Un método alternativo habitual para lisar las células, conocido como lisis alcalina, consiste en mezclar una suspensión de células bacterianas (disolución 1) con una disolución de lisis alcalina (disolución 2). La disolución 2 consiste en un detergente, por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS) para lisar las células bacterianas y liberar el material intracelular y un álcali, por ejemplo, hidróxido sódico para desnaturalizar las proteínas y ácidos nucleicos de las células (particularmente ADNg y ARN). Al lisarse las células y desnaturalizarse el ADN, la viscosidad de la disolución aumenta en gran medida. Después de la desnaturalización, se añade una disolución ácida, por ejemplo, acetato de potasio (disolución 3), para neutralizar el hidróxido sódico induciendo la renaturalización de los ácidos nucleicos. Los fragmentos largos de ADNg se vuelven a asociar al azar y forman redes que precipitan como flóculos, atrapando proteínas, lípidos y otros ácidos nucleicos. La sal de potasio del dodecilsulfato también precipita eliminando las proteínas a las que está asociada. Las dos hebras de ADNp (ADN plasmídico), se entrelazan entre sí, se reasocian normalmente para volver a formar el plásmido inicial que permanece en disolución.

La técnica de lisis se realiza en modo discontinuo, es decir, en el que se mezclan diferentes disoluciones mediante la adición secuencial de las disoluciones a recipientes o tanques. Debido a que el lisado alcalino es un fluido viscoelástico que es muy difícil de manipular, una dificultad con este método se produce durante el mezclado de las diferentes disoluciones. Debido a que el esfuerzo de cizalla produce la fragmentación del ADNg, lo que hace que sea muy difícil de separar del ADNp, se necesitan métodos para evitar la aplicación de esfuerzos de cizalla al fluido. Además, el ADNp largo (es decir, mayor de aproximadamente 10 pares de kilo bases) también es susceptible al daño por cizalla durante el proceso de mezclado. Después de que la disolución que contiene la suspensión celular se ha mezclado con la disolución de lisis, se mezcla el lisado alcalino viscoelástico con la disolución de neutralización. De nuevo, este proceso de mezclado resulta problemático debido a las propiedades viscoelásticas de la disolución.

Además, otra dificultad para aumentar la escala del proceso de lisis discontinuo implica la eficacia del mezclado de los diferentes fluidos cuando se intentan limitar los esfuerzos de cizalla para evitar la fragmentación del ADNg. Como se ha indicado previamente, el comportamiento cromatográfico del ADN genómico fragmentado es muy similar al del ADNp, de manera que se vuelve prácticamente imposible deshacerse del ADNg mediante los procedimientos de purificación estándar. Por lo tanto, resultan claras varias limitaciones relacionadas con la utilización de este procedimiento discontinuo para lisar células bacterianas, tales como aumento de escala, baja calidad del ADNp recuperado debido a la contaminación con ADNg fragmentado y la cantidad relativamente baja del ADNp obtenido.

A diferencia del método discontinuo, se han propuesto varios métodos para mezclar de manera continua varias disoluciones de lisis celular utilizando una serie de mezcladores estáticos. Según estos métodos, una disolución de una suspensión celular y una disolución de lisis celular se añaden simultáneamente a un mezclador estático. La disolución de células lisadas que sale del primer mezclador estático y una disolución de precipitación se añaden simultáneamente a un segundo mezclador estático. La disolución que sale de este segundo mezclador contiene el lisado precipitado y plásmidos. Otros modos continuos de lisar células incluyen la utilización de un intercambiador de calor de flujo directo en el que las células suspendidas se calientan hasta 70-100°C. Después de la lisis celular en el intercambiador de calor, la corriente de salida se somete a centrifugación de flujo continuo o discontinuo durante la cual precipitan los restos celulares y el ADN genómico, dejando el ADN plasmídico en el sobrenadante.

El aislamiento y purificación de ADN plasmídico a gran escala a partir de fermentaciones microbianas de gran volumen requieren, por lo tanto, el desarrollo de un procedimiento mejorado de preparación de plásmidos.

A pesar de los numerosos métodos utilizados actualmente para lisar células bacterianas, ninguno de ellos se plantea los problemas causados por las propiedades viscoelásticas de los fluidos y las fuerzas de cizalla implicadas en las etapas de mezclado. La presente invención se refiere, por lo tanto, a un método nuevo para la lisis alcalina continua de la suspensión de células bacterianas a gran escala y proporciona una ventaja importante limitando las fuerzas de cizalla.

Otra etapa importante para cualquier aplicación en la que el ácido nucleico se introduce en un ser humano o en un animal en un contexto terapéutico es la necesidad de producir un ácido nucleico altamente purificado, de grado farmacéutico. Dicho ácido nucleico purificado debe cumplir con los estándares de calidad de fármacos de seguridad, potencia y eficacia. Además, es deseable tener un procedimiento escalable que pueda utilizarse para producir cantidad de varios gramos de ADN. Por lo tanto, es deseable tener un procedimiento para producir ácido nucleico muy puro que no requiera compuestos químicos tóxicos, mutágenos, disolventes orgánicos u otros reactivos que comprometerían la seguridad o eficacia del ácido nucleico resultante, o que hagan que el aumento de escala sea difícil o poco práctico. También es deseable preparar ácidos nucleicos sin endotoxinas contaminantes, que si se administran a un paciente pueden inducir una respuesta tóxica. La eliminación de las endotoxinas contaminantes es particularmente importante cuando el ADN plasmídico se purifica a partir de fuentes bacterianas gram-negativas que tienen unos niveles altos de endotoxinas como componente integral de la membrana celular exterior.

Las técnicas clásicas para aislar y purificar ADN plasmídico a partir de fermentaciones bacterianas son adecuadas para preparaciones de plásmidos a pequeña escala o a escala de laboratorio. Después de romper las células bacterianas anfitrionas que contienen el plásmido, seguido de neutralización con acetato que produce la precipitación del ADN genómico y proteínas de la célula anfitriona, que se eliminan generalmente mediante, por ejemplo, centrifugación. La fase líquida contiene el ADN plasmídico que se precipita con alcohol y se somete a centrifugación isopícnica utilizando CsCl en presencia de bromuro de etidio para separar las diferentes formas de ADN plasmídico, es decir, superenrollado,

círculo mellado, y linearizado. Se requiere una extracción adicional con butanol para eliminar el bromuro de etidio residual seguido de la precipitación del ADN utilizando alcohol. Se utilizan etapas adicionales de purificación para eliminar las proteínas de la célula anfitriona.

5 Estos métodos habituales para aislar ADN plasmídico tienen varias limitaciones. Por ejemplo, los métodos de purificación que implican la utilización de grandes cantidades de disolventes orgánicos inflamables (por ejemplo, etanol e isopropanol) y compuestos químicos tóxicos, por ejemplo, bromuro de etidio, fenol y cloroformo, no son deseables generalmente para el aislamiento y purificación de ADN plasmídico a gran escala. Pueden utilizarse métodos alternativos a la centrifugación con cloruro de cesio para la purificación de ADN plasmídico, tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en hidroxiapatito y varios métodos cromatográficos basados en fase reversa o
10 intercambio aniónico. Estas alternativas pueden ser adecuadas para producir cantidades pequeñas del material de investigación a escala de laboratorio pero generalmente no son fácilmente escalables y no son capaces de producir las cantidades de ADN plasmídico.

Además, con el método químico de separación, el proceso de separación y purificación es complicado y debe utilizarse una gran cantidad de disolvente orgánico, por lo que plantea muchos problemas respecto al tratamiento de los disolventes desechados y otros.
15

Además del método químico de separación y purificación, existe un método para separar plásmidos mediante electroforesis. El método electroforético incluye electroforesis en papel y electroforesis en gel, y la electroforesis en gel es habitual actualmente. Sin embargo, el método electroforético tiene muchos problemas de tiempo de separación largo, recogida difícil, carga pequeña de muestra, etc.

20 Los métodos disponibles actualmente para separar las dos formas de ADN plasmídico utilizan cromatografía de intercambio iónico (Duarte et al., Journal of Chromatography A, 606 (1998), 31-45) o cromatografía de exclusión por tamaño (Prazeres, D.M., Biotechnology Techniques Vol. 1, No. 6, Junio 1997, p 417-420), acopladas a la utilización de aditivos tales como polietilenglicol (PEG), detergentes, y otros componentes tales como cobalto de hexamina, espermidina, y polivinilpirrolidona (PVP). Tales métodos también están descritos por Ferreira et al (Trends in
25 biotechnology, 380-388, 2000) o por Stadles et al (J. of Gene Medicine, S54-S66, 2004). Sin embargo, los métodos que se conocen actualmente son incapaces de proporcionar una separación eficaz y económica de ADN superenrollado y mellado (o relajado). Además, muchos de los métodos conocidos presentan la desventaja de utilizar PEG u otros aditivos, que pueden no ser deseables en la fabricación de ADN plasmídico, ya que requieren métodos de separación, eliminación y control de calidad adicionales que pueden ser difíciles, más largos y más caros. Las formas alternativas de los métodos conocidos para separar las formas superenrolladas y relajadas de ADN plasmídico utilizan resinas muy
30 caras, que también utilizan disolventes tales como acetonitrilo, etanol y otros componentes, como trietilamina y fosfato de tetrabutilamonio durante el procesamiento. Los métodos adicionales para separar ADN superenrollado y relajado se basan en cromatografía de exclusión por tamaño, que implica la separación de las dos formas de ADN plasmídico tomando como base la pequeña diferencia de tamaño. Estas columnas tienden a ser relativamente largas, lo que plantea problemas significativos en el aumento de escala, haciendo que no sea factible su aplicación para una
35 producción a gran escala. Además, los métodos de exclusión por tamaño necesitan disoluciones de muestra concentradas que no se pueden obtener con disoluciones de ADN plasmídico, debido a la naturaleza altamente viscosa del ADN.

Además, las preparaciones de ADN plasmídico, que se producen a partir de preparaciones bacterianas y que habitualmente contienen una mezcla de ADN plasmídico relajado y superenrollado, requieren frecuentemente la eliminación de endotoxinas, como requiere la FDA, ya que se sabe que las endotoxinas producidas por muchos anfitriones bacterianos producen reacciones inflamatorias, tales como fiebre y sepsis, en el anfitrión que recibe el ADN plasmídico. Estas endotoxinas son generalmente lipopolisacáridos, o fragmentos de éstos, que son componentes de la
40 membrana exterior de bacterias Gram- negativas y que están presentes en la preparación de ADN de las células anfitrionas y en las membranas o macromoléculas de las células anfitrionas. Por lo tanto, la eliminación de endotoxinas es una etapa crucial y necesaria en la purificación de ADN plasmídico para una utilización terapéutica o profiláctica. La eliminación de endotoxinas de las disoluciones de ADN plasmídico utilizaba principalmente la estructura cargada negativamente de las endotoxinas. Sin embargo, el ADN plasmídico también está cargado negativamente y por lo tanto la separación se consigue habitualmente con resinas de intercambio aniónico que unen ambas moléculas y, en determinadas condiciones, eluyen preferentemente ADN plasmídico mientras unen endotoxinas. Dicha separación resulta sólo en una eliminación parcial ya que cantidades significativas de endotoxinas eluyen con el ADN plasmídico
45 y/o se consigue una baja recuperación del ADN plasmídico.

El aislamiento y purificación de ADN plasmídico a gran escala a partir de fermentaciones microbianas de gran volumen requieren, por lo tanto, el desarrollo de un procedimiento mejorado de preparación de plásmidos. También se requiere un procedimiento para separar y purificar una gran cantidad de ADN plasmídicos de una manera más sencilla y en
55 menos tiempo. También es deseable para la investigación y terapia basadas en plásmidos, que los ácidos nucleicos puedan separarse y purificarse manteniendo la misma estructura de una manera reproducible, y con el fin de evitar efectos adversos de impurezas en el cuerpo del mamífero, se requiere que los ácidos nucleicos hayan sido separados y purificados hasta una pureza alta.

Con dicho método convencional, sin embargo, existe el problema de que los ácidos nucleicos, en particular, los ADN plasmídicos no puedan obtenerse con una pureza lo suficientemente alta y en suficiente cantidad. Por lo tanto, la presente invención pretende proporcionar un método de separación que utiliza al menos dos etapas cromatográficas, que permite separar una gran cantidad de ADN plasmídicos en menos tiempo y con un grado de pureza inesperadamente alto.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se basa en el descubrimiento de un método para producir y aislar ADN plasmídico altamente purificado. El ADN plasmídico producido y aislado mediante el método de la invención contiene unos niveles muy bajos de ADN cromosómico, ARN, proteína y endotoxinas contaminantes. El ADN plasmídico producido según la invención tiene la suficiente pureza para terapia basada en plásmidos.

La presente invención se refiere a un método para preparar una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico que comprende proporcionar un extracto celular que contiene ADN plasmídico, en el que las células se han lisado mediante lisis alcalina y las membranas celulares y el ADN genómico han sido eliminados mediante una extracción o filtración inicial; y después realizar al menos dos etapas cromatográficas que comprenden, en el siguiente orden: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de triple hélice y cromatografía de interacción hidrofóbica, en donde la composición preparada tenía menos de aproximadamente 0,0001 % contaminación por ADN de la célula anfitriona.

Los objetos y ventajas adicionales de la invención se mostrarán en parte en la descripción que sigue y en parte serán obvias a partir de la descripción o pueden apreciarse mediante la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se llevarán a cabo y se conseguirán mediante los elementos y combinaciones indicadas particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son sólo a modo de ejemplo y explicación y que no son restrictivas de la invención, como se reivindica.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias realizaciones de la invención y junto a la descripción sirven para explicar los principios de la invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un esquema del aparato que puede utilizarse para el modo continuo de lisis celular de la invención.

La Figura 2 es un esquema del mezclador M1 en el aparato continuo de lisis celular.

La Figura 3 es una tabla que compara los rendimientos de la purificación en términos de ADN_g, ARN, proteínas, endotoxinas contaminantes utilizando una única etapa de cromatografía de intercambio aniónico (AEC), o un método de dos etapas con una etapa de cromatografía de intercambio aniónico en combinación con cromatografía de afinidad de triple hélice (THAC), y un método de tres etapas que comprende una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, una etapa de cromatografía de afinidad de triple hélice y una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en combinación ND significa no detectado: métodos analíticos de baja sensibilidad.

La Figura 4 es una tabla que compara varios métodos de separación y purificación de ADN plasmídico, tales como cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía en hidroxipatito (HAC), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía en fase reversa (RPC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de afinidad de triple hélice (THAC) solas o en combinación y el método según la presente invención. En la presente memoria se proporcionan los resultados en términos de calidad del ADN plasmídico purificado. ND, no detectado (métodos analíticos de baja sensibilidad).

Las Figuras 5A y 5B son gráficos que muestran las velocidades de despurinación y mella (formación de la forma de plásmido circular abierta) del ADN plasmídico almacenado a +25°C y +5°C hasta 90 días.

Definiciones

Ácido significa que se refiere a o que contiene un ácido; que tiene un pH de menos de 7.

Alcalino significa que se refiere a o que contiene un álcali o base; que tiene un pH mayor de 7. Continuo significa no interrumpido, que no se interrumpe.

ADN genómico significa un ADN que se obtiene de o que existe en un cromosoma.

Flujo laminar significa el tipo de flujo en una corriente de disolución acuosa en la que cada partícula se mueve en una dirección paralela a todas las partículas.

Lisado significa el material producido mediante el proceso de lisis celular. El término lisar se refiere a la acción de romper la pared celular y/o la membrana celular de una célula que está en una disolución tamponada (es decir,

suspensión celular) mediante tratamiento químico utilizando una disolución que contiene un agente lisante. Los agentes lisantes incluyen, por ejemplo, álcali, detergentes, disolventes orgánicos y enzimas. En una realización preferida, la lisis de las células se realiza para liberar plásmidos intactos de las células anfitrionas.

5 Se neutraliza para hacer (una disolución) neutra o para producir (un ácido o base/álcali) la neutralización. Mediante este término queremos decir que algo que neutraliza una disolución lleva el pH de la disolución a un pH entre 5 y 7, y preferiblemente aproximadamente 7 o más preferiblemente más cerca de 7 de lo que estaba anteriormente.

Fluido Newtoniano es un fluido en el que el esfuerzo de cizalla es proporcional al gradiente de velocidad y perpendicular al plano de cizalla. La constante de proporcionalidad se conoce como la viscosidad. Los ejemplos de fluidos Newtonianos incluyen líquidos y gases.

10 Fluido no Newtoniano es un fluido en el que el esfuerzo de cizalla no es proporcional sólo al gradiente de velocidad y perpendicular al plano de cizalla. Los fluidos no Newtonianos pueden no tener una viscosidad bien definida. Los fluidos no Newtonianos incluyen sólidos plásticos, fluidos según la ley de la potencia, fluidos viscoelásticos (que tienen tanto propiedades viscosas como elásticas), y fluidos con viscosidad dependiente del tiempo.

15 ADN plasmídico significa una inclusión celular pequeña que consiste en un anillo de ADN que no es un cromosoma, que puede tener la capacidad de tener insertado un fragmento de ADN no endógeno. Tal y como se utiliza en la presente memoria, ADN plasmídico también puede ser cualquier forma de ADN plasmídico, tal como una forma de ADN no cromosómico cortado, procesado u otra forma manipulada que incluye, por ejemplo, cualquiera de, o cualquier combinación de, ADN plasmídico circular mellado, ADN plasmídico circular relajado, ADN plasmídico superenrollado, ADN plasmídico cortado, ADN plasmídico linearizado o lineal y ADN plasmídico de una única hebra. Los procedimientos para la construcción de plásmidos incluyen los descritos en Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Un protocolo para una mini-prep de ADN plasmídico muy conocido en la técnica (Birnboim y Doly, Nucleic Acids Research 7:1513 (1979)), puede utilizarse para aislar inicialmente ADN plasmídico para un procesamiento posterior mediante algunos aspectos de la invención y puede contrastarse con las muestras altamente purificadas producidas a partir de los métodos de la invención. Preferiblemente, la forma del ADN plasmídico es, o al menos es después de la preparación mediante el método de purificación de la invención, sustancialmente una forma circular cerrada de ADN plasmídico o aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, o más de aproximadamente 99% forma circular cerrada de ADN plasmídico. Alternativamente, puede preferirse una forma superenrollada cerrada covalentemente de ADNp (ccc) en algunos métodos terapéuticos, en los que puede ser más eficaz que las formas circulares abiertas, lineales o multiméricas. Por lo tanto, el ADN plasmídico de grado farmacéutico puede aislarse de o separarse de una o más formas de plásmido y comprende sustancialmente una o más formas deseadas.

25 Para los fines de la presente invención, el término fluir se refiere a la acción de hacer pasar un líquido a una velocidad de flujo particular (por ejemplo, litros por minuto) a través del mezclador, habitualmente mediante la acción de una bomba. Debe indicarse que se cree que la velocidad de flujo a través del mezclador afecta la eficacia de la lisis, precipitación y mezclado.

35 Los términos ADN "mellado" y "relajado" significan ADN que no está superenrollado. ADN "superenrollado" es un término conocido en la técnica para describir una forma particular, aislada de ADN plasmídico. También se conocen en la técnica otras formas de ADN plasmídico.

40 Una "impureza contaminante" es cualquier sustancia de la que se desea separar o aislar el ADN. Las impurezas contaminantes incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de la célula anfitriona, endotoxina, ADN de la célula anfitriona, tal como ADN cromosómico o ADN genómico y/o ARN de la célula anfitriona. Se entiende que lo que es o puede considerarse una impureza contaminante puede depender del contexto en el que se practican los métodos de la invención. Una "impureza contaminante" puede proceder o no de la célula anfitriona, es decir, puede ser o no una impureza de la célula anfitriona.

45 "Aislar" o "purificar" un primer componente (tal como ADN) significa enriquecer el primer componente respecto a otros componentes con los que se encuentra inicialmente el primer componente. En la presente memoria se proporcionan los grados de purificación deseados y/o que se pueden obtener.

Los términos esencialmente sin y altamente purificado se definen como aproximadamente 95% y preferiblemente más de 98,99% puro o sin contaminantes o que posee menos de 5%, y preferiblemente menos de 1-2% de contaminantes.

50 ADN de grado farmacéutico se define en la presente memoria como una preparación de ADN que contiene no más de aproximadamente 5%, y preferiblemente no más de aproximadamente 1-2% de componentes celulares, tales como membranas celulares.

55 La invención engloba además un método para producir y aislar ADN plasmídico altamente purificado que esencialmente no contiene contaminantes y, por lo tanto, es ADN de grado farmacéutico. El ADN plasmídico producido y aislado mediante el método de la invención contiene unos niveles muy bajos, es decir, partes por millón (ppm) de ADN cromosómico, ARN, proteína y endotoxinas contaminantes y contiene mayoritariamente la forma circular cerrada de

ADN plasmídico. El ADN plasmídico producido según la invención tiene una pureza suficiente como para utilizarse en investigación y en terapia basada en plásmidos y opcionalmente como material para ensayos clínicos en seres humanos y experimentos de terapia génica en seres humanos y en ensayos clínicos.

5 Una "composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico" de la invención es una que está producida mediante un método de la invención y/o es una composición que tiene al menos uno de los niveles de pureza definidos más adelante como un "ADN plasmídico de grado farmacéutico". Preferiblemente, una "composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico" de la invención tiene un nivel de pureza definido por al menos dos de los definidos más adelante como un "ADN plasmídico de grado farmacéutico" por ejemplo, menos de aproximadamente 0,00008% de ADN cromosómico o genómico y menos de aproximadamente 0,00005% de proteínas contaminantes o por ejemplo menos de 10 aproximadamente 0,00008% de ADN cromosómico o genómico y menos de aproximadamente 0,1 EU/mg de endotoxinas. Otras combinaciones de niveles de pureza están incluidas en la definición. Por supuesto, la composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico puede comprender o contener además componentes añadidos deseados para cualquier utilización particular, incluyendo la utilización en tratamientos, composiciones y terapias combinadas. Los niveles de ADN cromosómico o genómico, ARN, endotoxinas o proteínas se refiere a contaminantes de la producción 15 basada en células del plásmido o a otro u otros contaminantes procedentes del proceso de purificación.

Como se ha indicado, "ADN plasmídico de grado farmacéutico" se define en la presente memoria como una preparación de ADN que contiene en el nivel de una parte por millón o ppm ($< 0,0001\%$, es decir $< 0,0001$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) o menos de ADN genómico, ARN y/o proteínas contaminantes.

20 También, o más precisamente, "ADN plasmídico de grado farmacéutico" en la presente memoria puede significar una preparación de ADN que contiene menos de aproximadamente 0,01%, o menos de 0,001%, y preferiblemente menos de 0,0001%, o preferiblemente menos de 0,00008% ($< 0,00008\%$, es decir $< 0,00008$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ADN cromosómico o ADN genómico.

"ADN plasmídico de grado farmacéutico" también puede significar una preparación de ADN que contiene menos de aproximadamente 0,01%, o menos de 0,001%, y preferiblemente menos de 0,0001%, o preferiblemente menos de 25 0,00002% ($< 0,00002\%$, es decir $< 0,00002$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ARN contaminantes.

"ADN plasmídico de grado farmacéutico" también puede significar una preparación de ADN que contiene menos de aproximadamente 0,0001%, y lo más preferiblemente menos de 0,00005% ($< 0,00005\%$, es decir $< 0,00005$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) de proteínas contaminantes.

30 "ADN plasmídico de grado farmacéutico" también puede significar una preparación de ADN que contiene menos de 0,1 EU/mg de endotoxinas.

El ADN plasmídico de grado farmacéutico significa en la presente memoria una preparación de ADN que está preferiblemente y de manera predominante en forma circular y más precisamente ADN que contiene más del 80%, 85%, 90%, 95%, o más del 99% de forma circular cerrada de ADN plasmídico.

35 Tubo T se refiere a una configuración de tubo con forma de T, en la que una forma T se forma mediante una única pieza de tubo creada en esa configuración o más de una pieza de tubo combinadas para crear esa configuración. El tubo T tiene tres brazos y un área central en la que se unen los brazos. Un tubo T puede utilizarse para mezclar ingredientes ya que dos fluidos pueden fluir en cada uno de los brazos de la T, unirse en el área central y salir por el tercer brazo. El mezclado se produce al combinarse los fluidos.

40 Flujo turbulento significa movimiento irregular al azar de partículas de fluido en direcciones transversales a la dirección del flujo principal, en el que la velocidad en un punto determinado varía de manera errática en magnitud y dirección.

Viscoelástico se refiere a fluidos que tienen propiedades tanto viscosas como elásticas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La invención se basa en el descubrimiento de un método escalable para producir una alta producción de ADN plasmídico de grado farmacéutico. En particular, la invención se basa en el descubrimiento de un método para producir y aislar ADN plasmídico altamente purificado utilizando una lisis alcalina continua de las células anfitrionas.

50 Como primera etapa las células anfitrionas se inoculan, es decir, se transforman con un ADN plasmídico en la fase exponencial de crecimiento y se siembran en placas que contienen medio LB que contiene un antibiótico tal como tetraciclina. Se inoculan colonias independientes de la placa cada una en 20 ml de medio LB suplementado con el antibiótico apropiado tetraciclina en matraces Erlenmeyer de plástico estériles independientes y se crecen durante 12-16 horas a 37 °C en un incubador con agitación. Uno de estos cultivos se utilizó para inocular 200 ml de medio LB estéril suplementado en un matraz Erlenmeyer de 2 L. Éste se creció a 37°C y 200 rpm en un incubador con agitación y se utilizó para inocular dos matraces Erlenmeyer de 5 L y se crecieron a 30 °C y 200 rpm en un incubador con agitación y se utilizaron para inocular el recipiente de fermentación cuando estaban en mitad de la fase exponencial, después de 5 horas y a una DO600 nm de 2 unidades.

Los cultivos de las células anfitrionas y la inoculación son muy conocidos en la técnica. Generalmente, las células anfitrionas se crecen hasta que alcanzan una gran biomasa y las células están en crecimiento exponencial con el fin de tener una gran cantidad de ADN plasmídico. Pueden utilizarse dos métodos distintos, es decir, fermentación discontinua y de alimentación discontinua.

5 La fermentación discontinua permite controlar la velocidad de crecimiento mediante la manipulación de la temperatura de crecimiento y de la fuente de carbono utilizada. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "fermentación discontinua" es un proceso de cultivo celular mediante el que todos los nutrientes requeridos para el crecimiento celular y para la producción del plásmido contenido en las células cultivadas están en el recipiente en exceso (por ejemplo, un exceso de 10 veces de las concentraciones de nutrientes respecto a la técnica anterior) en el momento de la inoculación, evitando así la necesidad de realizar adiciones al recipiente estéril después de las adiciones posteriores a la esterilización y la necesidad de modelos y estrategias de alimentación complejos.

10 Otro tipo de fermentación útil según la invención es la fermentación de alimentación discontinua, en la que se controla la velocidad de crecimiento celular mediante la adición de nutrientes al cultivo durante el crecimiento celular. Tal y como se utiliza en la presente memoria, "fermentación de alimentación discontinua" se refiere a un proceso de cultivo celular en el que la velocidad de crecimiento se controla mediante adiciones evaluadas cuidadosamente de metabolitos al cultivo durante la fermentación. La fermentación de alimentación discontinua según la invención permite que el cultivo celular alcance una biomasa mayor que la fermentación discontinua.

15 Los ejemplos de procesos de fermentación y velocidades ejemplares de adición de la alimentación están descritos más adelante para una preparación de 50 L. Sin embargo, también pueden procesarse otros volúmenes, por ejemplo, 10 L, 50 L, o más de 500 L, utilizando las velocidades de alimentación ejemplares descritas más adelante, dependiendo de la escala del equipo.

20 Las fermentaciones con medio discontinuo altamente enriquecido y con medio de alimentación discontinua son apropiadas para la producción de cultivos con alta densidad celular para maximizar la producción específica del plásmido y permitir la recogida con una gran biomasa todavía en crecimiento exponencial.

25 La fermentación de alimentación discontinua utiliza glucosa o glicerol como una fuente de carbono. La fermentación se realiza en modo discontinuo hasta que se agota el sustrato carbonado inicial (glucosa). Este punto se nota por un incremento rápido de DO y se confirma mediante un análisis de glucosa en una muestra tomada inmediatamente después de este evento. Entonces se pone en marcha la bomba del medio de alimentación previamente cebada. El caudal de la bomba es determinado mediante un modelo derivado de Curless et al. (Bioeng. 38:1082-1090, 1991). El modelo se diseña para facilitar el control de la fase de alimentación de un proceso de alimentación discontinua. En el proceso discontinuo inicial, una concentración no inhibitoria de sustrato es consumida por las células que crecen a su velocidad de crecimiento específica máxima, dando lugar a un incremento rápido de los niveles de biomasa después de la inoculación. El cultivo no puede crecer a esta velocidad indefinidamente debido a la acumulación de metabolitos tóxicos (Fieschio et al., "Fermentation Technology Using Recombinant Microorganisms." En Biotechnology, eds. H. J. Rhem y G. Reed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH 7b: 117-140, 1989). Con el fin de permitir un crecimiento logarítmico continuado, el modelo calcula la velocidad de alimentación basada en el tiempo del sustrato carbonado limitante del crecimiento, sin la necesidad de un retrocontrol, para dar lugar a una fase de crecimiento de alimentación discontinua ajustada por el operador. Esto se elige a un nivel que no produce la acumulación de catabolitos inhibidores y es suficiente para rendir una gran biomasa.

30 Generalmente, la fermentación discontinua utiliza unos niveles altos (por ejemplo, 4 veces mayores que las concentraciones de la técnica anterior) de precursores presentes en el medio discontinuo enriquecido. En particular, las cantidades de extracto de levadura en el medio discontinuo enriquecido son 5 g/l (como en el medio LB) hasta 20 g/litro proporcionando así grandes cantidades de factores de crecimiento y de precursores de ácidos nucleicos. El medio también está suplementado con sulfato de amonio (5 g/l) que actúa como una fuente de nitrógeno orgánico. Las adiciones de precursores (nitrógeno orgánico en la forma de sulfato de amonio) durante el proceso de alimentación en la fermentación de alimentación discontinua se diseñan para prevenir efectos perjudiciales en la calidad del plásmido.

35 Un aspecto importante del método según la presente invención es la lisis celular. Por lo tanto, la presente invención engloba un procedimiento para producir y aislar ADN plasmídico altamente purificado que incluye la etapa de lisis celular en la que hay (a) un medio para flujo turbulento para mezclar rápidamente una suspensión celular (disolución 1 en la Figura 1) con una disolución que lisa las células (disolución 2 en la Figura 1); y (b) un medio para flujo laminar para permitir la incubación de una mezcla formada en (a) sin agitación sustancial, en la que la mezcla formada en (a) fluye desde el medio para flujo turbulento hasta el medio para flujo laminar.

40 Según una realización de la invención, el mecanismo puede comprender además un medio para añadir una segunda disolución que neutralice la disolución de lisis (disolución 3 en la Figura 1), en el que la mezcla incubada en (b) fluye desde el medio para flujo laminar hasta el medio para la adición de una segunda disolución.

En otra realización más, el mecanismo puede utilizarse en un método para aislar ADN plasmídico a partir de células que comprende: (a) mezclar las células con una disolución de lisis alcalina en el medio para flujo turbulento; y (b) neutralizar la disolución de lisis alcalina mediante la adición de una disolución ácida.

A pesar de los numerosos métodos utilizados actualmente para lisar células bacterianas, ninguno de ellos se plantea los problemas causados por las propiedades viscoelásticas de los fluidos y las fuerzas de cizalla implicadas en las etapas de mezclado. Un objeto de la presente invención es un método para utilizar tubos T para mezclar la suspensión celular (disolución 1) y la disolución alcalina (disolución 2) uniformemente y muy rápidamente antes de que aparezca el fluido viscoelástico. Por lo tanto, la lisis continua según la presente invención proporciona una ventaja importante limitando las fuerzas de cizalla. Los tubos T tienen generalmente un diámetro de tubo pequeño, habitualmente un diámetro inferior a 1 cm, preferiblemente de aproximadamente 2 y 8 mm, y más preferiblemente de aproximadamente 6mm, con el fin de incrementar el tiempo de contacto de los fluidos mezclados, pero este método no utiliza la inducción del mezclado mediante el paso a través del tubo. La Tabla 1 que aparece a continuación en la presente memoria muestra la variación de los parámetros B1a, B1b, B2 del medio para flujo turbulento, flujo laminar, y flujo turbulento, respectivamente, y sus velocidades de flujo correspondientes S1, S2, y S3 como se muestra en la Figura 1.

Tabla 1

B1a (60L/h)		B1b (60L/h)		B2 (90L/h)		Velocidades de flujo	
diámetro	longitud	diámetro	longitud	diámetro	longitud	S1, S2 y S3	Intervalo
5 a 7 mm	2-6 m	12,5 a 19 mm	13 a 23 m	5 a 8 mm	2 a 4 m	60/60/90 L/h	± 20%

Otro objeto de la presente invención es un mezclador o inyector con tubos en lugar de una T, que permite la dispersión de las células en la disolución de lisis. De acuerdo con esto, el estrés mecánico en los fluidos que pasan a través de los tubos se reduce en gran medida si se compara con el de los fluidos que se agitan, por ejemplo, mediante palas en tanques. La eficacia inicial del mezclado resulta en una eficacia aún mayor en los segundos siguientes, ya que este fluido todavía no tiene las propiedades viscoelásticas y el mezclado realizado por el tubo de pequeño diámetro es muy eficaz. Por el contrario, cuando un tubo T se utiliza para el mezclado, el mezclado inicial es sólo moderado mientras el fluido se vuelve rápidamente viscoelástico, lo que resulta en problemas considerables mientras fluye en el tubo. Este mezclado parcial resulta en la lisis de sólo una parte de las células y, por lo tanto, sólo puede liberar una parte de los plásmidos antes de la neutralización.

Según la presente invención, hemos identificado dos fases durante la lisis, denominadas Fase I y Fase II. Estas dos fases corresponden a I) lisis de las células y II) desnaturalización de los ácidos nucleicos, lo que produce un cambio importante en el comportamiento reológico que resulta en un fluido viscoelástico. El ajuste de los diámetros de los tubos hace posible conseguir la finalidad de estas dos fases. En un tubo con un diámetro pequeño (B1a), el mezclado se incrementa. Esta es la configuración utilizada para la Fase I. En un tubo con un diámetro grande (B1b), el mezclado (y por lo tanto el esfuerzo de cizalla) se reduce. Esta es la configuración utilizada para la Fase II.

De acuerdo con esto, utilizamos un mezclador denominado M1 que se muestra en la Figura 2. También puede utilizarse cualquier dispositivo con forma de T para proporcionar la dispersión de la suspensión celular según la presente invención. Con este mezclador, la disolución 1 se inyecta en contracorriente en la disolución de lisis alcalina a través de uno o más orificios con diámetro pequeño con el fin de obtener una dispersión eficaz. Los diámetros de estos orificios son de aproximadamente 0,5 mm a 2 mm, y preferiblemente aproximadamente 1 mm en la configuración mostrada.

La mezcla sale del mezclador M1 para pasar a través de un tubo con un diámetro pequeño (Figura 1) durante un corto periodo de tiempo (de aproximadamente 2,5 s). La combinación del diámetro y del tiempo de flujo puede calcularse fácilmente para mantener un flujo turbulento. Los ejemplos de variaciones de estos parámetros se proporcionan en la Tabla 1. Todas las referencias al diámetro del tubo proporcionan el diámetro interno del tubo, no el diámetro externo, que incluye el espesor de las paredes del tubo. Este tiempo breve de residencia en el tubo permite una homogeneización muy rápida de las disoluciones 1 y 2. Asumiendo que la disolución 1 y la disolución 2 todavía son fluidos Newtonianos durante la Fase I, el modo de flujo es turbulento durante la fase de homogeneización. A la salida de este tubo, las disoluciones 1 y 2 se homogeneizan y comienza la lisis de las células en suspensión.

La mezcla homogeneizada pasa entonces a través de un segundo tubo (B1b) con un diámetro mucho mayor (Figura 1), en el que se produce la lisis de las células y la formación del fluido viscoelástico. Durante esta fase, el mezclado puede minimizarse y puede dejarse a la disolución en "reposo" para limitar la turbulencia lo máximo posible con el fin de minimizar cualquier esfuerzo de cizalla que fragmentaría el ADNg. En una realización de la presente invención, un tiempo de contacto de aproximadamente 1 a 3 min, aproximadamente 2 min, y preferiblemente de 1 min 20 s es suficiente para completar la lisis celular y para desnaturalizar los ácidos nucleicos. Durante la fase de desnaturalización, el modo del flujo es laminar, lo que promueve la difusión lenta de SDS y de hidróxido sódico hacia los componentes celulares.

5 El lisado obtenido de esta manera y la disolución de neutralización 3 se mezclan entonces con un mezclador Y denominado M2. En una realización de la presente invención, el diámetro interno del mezclador Y es de aproximadamente 4 a 15 mm, o de aproximadamente 6 a 10 mm, y puede ser de aproximadamente 6mm o de aproximadamente 10 mm. El tubo con un diámetro pequeño (por ejemplo, un tubo de aproximadamente 6 mm) se pone en la salida del mezclador Y para permitir el mezclado rápido (< 1 s) y eficaz del lisado con la disolución 3. La disolución neutralizada se recoge en un tanque de recogida. Durante la neutralización, la disminución rápida del pH induce la floculación (es decir, la formación de grumos o masas). Por otra parte, el plásmido parcialmente desnaturalizado se renaturaliza muy rápidamente y permanece en disolución. Los flóculos sedimentan gradualmente en el tanque de recogida, arrastrando a la mayor parte de los contaminantes.

10 El dibujo esquemático de la Figura 1 muestra una realización del sistema continuo de lisis (CL). La lisis continua puede utilizarse sola o con procesos adicionales.

15 El método de la presente invención puede utilizarse para lisar cualquier tipo de célula (es decir, procariota o eucariota) para cualquier propósito relacionado con la lisis, tal como la liberación de ADN plasmídico deseado de las células diana para ser posteriormente purificado. En una realización preferida, el método de la presente invención se utiliza para lisar células anfitrionas que contienen plásmidos para liberar los plásmidos.

20 El proceso de lisis alcalina continua según la presente invención puede realizarse en células recogidas de una fermentación que se ha crecido hasta una biomasa de células que no ha alcanzado la fase estacionaria y que por lo tanto están en la fase de crecimiento exponencial (2-10 g peso seco/litro). La etapa de lisis alcalina continua también puede realizarse en células recogidas de una fermentación que se ha crecido hasta una gran biomasa de células y que no están en crecimiento exponencial sino que han alcanzado la fase estacionaria, con una concentración celular de aproximadamente 10-200 g de peso seco por litro, y preferiblemente 12-60 g de peso seco por litro.

25 Otro aspecto importante de la invención es composiciones de ADN plasmídico altamente purificado y composiciones de ADN plasmídico de grado farmacéutico producidas mediante una combinación de etapas cromatográficas, que pueden combinarse o no con el aspecto de lisis celular mencionado anteriormente. Por lo tanto, la invención engloba además, o comprende además, un método para producir y aislar ADN plasmídico altamente purificado que esencialmente no contiene contaminantes y, por lo tanto, es ADN de grado farmacéutico. El ADN plasmídico producido y aislado mediante el método de la invención contiene unos niveles muy bajos, es decir, partes por millón (ppm) de ADN cromosómico, ARN, proteína y endotoxinas contaminantes y contiene mayoritariamente la forma circular cerrada de ADN plasmídico. El ADN plasmídico producido según la invención tiene la suficiente pureza como para utilizarse en investigación y en terapia basada en plásmidos. Como se ha indicado anteriormente, una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico de la invención puede definirse, en un aspecto, por un nivel de pureza respecto a uno o más contaminantes típicos, tales como los contaminantes de la célula anfitriona. De acuerdo con esto, una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico de la invención puede ser una composición que contiene en el nivel de una parte por millón o ppm ($< 0,0001\%$, es decir $< 0,0001$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) o menos de ADN genómico, ARN y/o proteínas contaminantes. Más precisamente, la composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico puede comprender una preparación de ADN plasmídico que contiene menos de aproximadamente 0,01%, o menos de 0,001%, y preferiblemente menos de 0,0001%, o preferiblemente menos de 0,00008% ($< 0,00008\%$, es decir $< 0,00008$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ADN cromosómico o ADN genómico de la célula anfitriona. Una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico también puede comprender una preparación de ADN plasmídico que contiene menos de aproximadamente 0,01%, o menos de 0,001%, y preferiblemente menos de 0,0001%, o preferiblemente menos de 0,00002% ($< 0,00002\%$, es decir $< 0,00002$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ARN contaminantes de la célula anfitriona. Una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico puede comprender una preparación de ADN plasmídico que contiene menos de aproximadamente 0,0001%, y lo más preferiblemente menos de 0,00005% ($< 0,00005\%$, es decir, $< 0,00005$ mg por 100 mg de ADN plasmídico) de proteínas contaminantes de la célula anfitriona. Una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico también puede comprender una preparación de ADN plasmídico que contiene menos de 0,1 EU/mg de endotoxinas. En particular, en la invención también está incluida cualquier combinación de al menos dos, o al menos tres, o cuatro de estos niveles de pureza. Por lo tanto, una composición que tiene un nivel detectable de ADN genómico de la célula anfitriona de menos de aproximadamente 0,01% y menos de aproximadamente 0,001% de ARN de la célula anfitriona puede incluirse en la invención. Lo más preferiblemente, la composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico puede tener menos de aproximadamente 0,00008% de ADN genómico de la célula anfitriona y menos de aproximadamente 0,00002% de ARN de la célula anfitriona y menos de aproximadamente 0,00005% de proteínas de la célula anfitriona. De hecho, puede utilizarse cualquier combinación de los niveles de pureza indicados anteriormente para cualquier composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico particular de la invención. Las composiciones también pueden comprender otros componentes aceptables desde un punto de vista farmacéutico, tampones, estabilizantes, o compuestos para mejorar la transferencia génica y particularmente la transferencia de ADN plasmídico a una célula u organismo.

60 En otro aspecto, los métodos de la invención comprenden la utilización de cromatografía de afinidad de triple hélice, que está precedida de o seguida de al menos una técnica cromatográfica adicional, opcionalmente o típicamente como las etapas de purificación finales o al menos al final o cerca del final del esquema de purificación del plásmido. En combinación con la cromatografía de afinidad de triple hélice está preferiblemente una o más de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hifrofóbica y cromatografía de permeación en gel o de exclusión por

5 tamaño. Otras técnicas incluyen cromatografía en hidroxapatito (tipo I y II), de fase reversa y cromatografía de afinidad. Puede adaptarse para ser utilizado cualquier protocolo disponible de cromatografía de afinidad que implica la separación de ácidos nucleicos. La cromatografía de intercambio aniónico o una cualquiera de las demás etapas o técnicas cromatográficas utilizadas puede utilizar fases estacionarias, métodos cromatográficos de desplazamiento, tecnología de lecho móvil simulado y/o columnas o sistemas de lechos continuos. Además, una cualquiera o más de las etapas o técnicas pueden utilizar técnicas o sistemas de cromatografía de alto rendimiento.

10 Por lo tanto, el método de la invención comprende etapas de purificación que incluyen cromatografía de afinidad de triple hélice con una etapa adicional de cromatografía de intercambio iónico y puede incluir además cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de permeación en gel. La etapa de cromatografía de intercambio iónico puede ser cromatografía de intercambio iónico en lechos fluidizados y cromatografía de intercambio aniónico axial y/o radial de alta resolución.

15 El método incluye, por lo tanto, la etapa de lisis alcalina descrita en la presente memoria en combinación con unas etapas posteriores de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad de triple hélice y cromatografía de interacción hidrofóbica, en ese orden. La primera etapa cromatográfica puede estar precedida de la filtración del lisado u otra eliminación del flóculo. Los métodos de la invención descritos en la presente memoria para purificar ADN plasmídico son escalables y por lo tanto se puede aumentar su escala hasta la fabricación a gran escala.

20 En algunas realizaciones de la invención, la lisis continua puede combinarse con etapas de purificación adicionales para proporcionar un producto con gran pureza que contiene ADNp. Puede combinarse, por ejemplo, con al menos una de eliminación del flóculo (tal como filtración del lisado, sedimentación o centrifugación), cromatografía de intercambio iónico (tal como intercambio catiónico o aniónico), cromatografía de afinidad de tríplex y cromatografía de interacción hidrofóbica. En una realización, la lisis continua está seguida de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad de tríplex y cromatografía de interacción hidrofóbica, en ese orden. En otra realización, la lisis continua está seguida de filtración del lisado, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad de tríplex y cromatografía de interacción hidrofóbica, en ese orden. Estas etapas permiten un proceso de fabricación de plásmidos verdaderamente escalable que puede producir grandes cantidades de ADNp con una pureza sin precedentes. El ADN y ARN así como las proteínas del anfitrión están en el intervalo de sub-ppm.

30 El método de la presente invención también puede utilizar etapas adicionales de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía en fase reversa, cromatografía en hidroxapatito y/o otras técnicas, métodos o sistemas cromatográficos disponibles, en combinación con las etapas descritas en la presente memoria según la presente solicitud.

35 Puede utilizarse una eliminación del flóculo para proporcionar una mayor pureza al producto ADNp resultante. Esta etapa puede utilizarse para eliminar la mayor parte del material precipitado (flóculo). Un mecanismo para realizar la eliminación del flóculo es mediante una etapa de filtración del lisado, tal como a través de un filtro con una rejilla de 1 a 5 mm, y preferiblemente 3,5 mm, seguido de una filtración de profundidad como una etapa de filtración fina. Otros métodos para conseguir la eliminación del flóculo son mediante centrifugación o sedimentación.

Puede utilizarse la cromatografía de intercambio iónico para proporcionar una mayor pureza al producto ADNp resultante. El intercambio aniónico puede seleccionarse dependiendo de las propiedades de los contaminantes y del pH de la disolución.

40 Puede utilizarse la cromatografía de intercambio aniónico para proporcionar una mayor pureza al producto ADNp resultante. La cromatografía de intercambio aniónico funciona uniendo moléculas cargadas negativamente (o ácidas) a un soporte que está cargado positivamente. La utilización de la cromatografía de intercambio iónico permite separar moléculas en base a su carga. Mediante esta técnica pueden separarse fácilmente familias de moléculas (ácidas, básicas y neutras). Pueden utilizarse esquemas de elución por etapas, eluyendo muchos contaminantes en las primeras fracciones y eluyendo el ADNp en las últimas fracciones. El intercambio aniónico es muy eficaz para eliminar proteínas y endotoxinas de la preparación de ADNp.

45 En el caso de la cromatografía de intercambio iónico, son muy conocidos en la técnica el material de empaquetamiento y el método para preparar dicho material así como el proceso para preparar, polimerizar y funcionalizar la cromatografía de intercambio aniónico y para eluir y separar el ADN plasmídico presente en ésta.

50 El compuesto que se va a utilizar para la síntesis de los materiales base que se utilizan para el material de empaquetamiento de la cromatografía de intercambio aniónico puede ser cualquier compuesto, si pueden introducirse varios grupos funcionales que presentan hidrofobicidad o varios grupos de intercambio iónico mediante una reacción posterior a la síntesis de los materiales base. Los ejemplos de monómeros monofuncionales incluyen estireno, o-halometilostireno, m-halometilostireno, p-halometilostireno, o-haloalquilestireno, m-haloalquilestireno, p-haloalquilestireno, α-metilostireno, α-metil-o-halometilostireno, α-metil-m-halometilostireno, α-metil-p-halometilostireno, α-metil-o-haloalquilestireno, α-metil-m-haloalquilestireno, α-metil-p-haloalquilestireno, o-hidroximetilostireno, m-hidroximetilostireno, p-hidroximetilostireno, o-hidroxialquilestireno, m-hidroxialquilestireno, p-hidroxialquilestireno, α-metil-o-hidroximetilostireno, α-metil-m-hidroximetilostireno, α-metil-p-hidroximetilostireno, α-metil-o-hidroxialquilestireno,

- 5 α -metil-m-hidroxiálquilestireno, α -metil-p-hidroxiálquilestireno, metacrilato de glicidilo, acrilato de glicidilo, acrilato de hidroxietilo, hidroximetacrilato, y acetato de vinilo. Los compuestos más preferidos son grupos haloálquilo sustituidos en el anillo aromático, halógenos tales como Cl, Br, I y F e hidrocarburos saturados de cadena lineal y/o ramificada con 2 a 15 átomos de carbono. Los ejemplos de monómeros polifuncionales incluyen divinilbenceno, trivinilbenceno, diviniltolueno, triviniltolueno, divinilnaftaleno, trivinilnaftaleno, dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de dietilenglicol, diacrilato de dietilenglicol, metilénbismetacrilamida, y metilénbisacrilamida.
- 10 Puede introducirse varios grupos de intercambio iónico mediante la reacción posterior. La preparación del material base incluye una primera etapa en la que se pesan el monómero monofuncional y el monómero polifuncional en una proporción apropiada y se añaden el diluyente o disolvente pesados de manera precisa que se utilizan para el fin de ajustar los poros de las partículas formadas y el iniciador de la polimerización pesado similarmente de manera precisa, seguido de una buena agitación. La mezcla se somete entonces a una suspensión de polimerización de tipo aceite-en-agua en la que se añade la mezcla en una disolución acuosa de suspensión disuelta del estabilizador pesada de manera precisa con anterioridad y se forman gotitas de aceite del tamaño deseado mezclando con agitación y la polimerización se realiza calentando gradualmente la disolución de la mezcla. La proporción del monómero monofuncional respecto al monómero polifuncional es generalmente aproximadamente 1 mol de monómero monofuncional y aproximadamente 0,01 a 0,2 moles del monómero polifuncional para obtener partículas blandas del material base. Un iniciador de la polimerización no está restringido particularmente y se utilizan de tipo azobis y/o de tipo peróxido utilizados comúnmente.
- 15 También pueden utilizarse estabilizadores de la suspensión tales como tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos y polímeros con propiedades anfipáticas o mezclas de éstos para prevenir la agregación de las gotitas de aceite entre sí.
- 20 El material de empaquetamiento que se va a utilizar para la cromatografía de intercambio iónico para purificar ADN plasmídicos tiene preferiblemente un diámetro de poro relativamente grande, particularmente en el intervalo de 1.500 a 4.000 angstrom. La modificación de la superficie para introducir grupos de intercambio iónico a los materiales base es muy conocida en la técnica.
- 25 Pueden utilizarse dos tipos de eluyentes para la cromatografía de intercambio iónico. Puede utilizarse un primer eluyente que contiene una baja concentración de sal y un segundo eluyente que contiene una alta concentración de sal. El método de elución consiste en cambiar por etapas del primer eluyente al segundo eluyente y en cambiar continuamente la composición del gradiente de elución del primer eluyente al segundo eluyente. Pueden utilizarse los tampones y sales que se utilizan generalmente en estos eluyentes para la cromatografía de intercambio iónico. Para el primer eluyente que contiene una baja concentración de sal es particularmente preferible una disolución acuosa con una concentración de tampón de 10 a 50 mM y un valor de pH de 6 a 9. Para el segundo eluyente que contiene una alta concentración de sal, es particularmente preferible una disolución acuosa con 0,1 a 2M de sal de sodio añadida al eluyente C. Para las sales de sodio pueden utilizarse cloruro de sodio y sulfato de sodio.
- 30 Además, puede utilizarse un agente quelante de iones metálicos bivalentes tal como, por ejemplo, ácido etilendiamino-tetraacético, para inhibir la degradación de los plásmidos debida a las enzimas que degradan ADN en el lisado de *Escherichia coli*. La concentración del agente quelante para iones metálicos bivalentes es preferiblemente 0,1 a 100 mM.
- 35 Una amplia variedad de matrices de intercambio aniónico disponibles comercialmente son adecuadas para utilizarse en la presente invención, incluyendo, pero sin limitarse a, las disponibles a partir de POROS Anion Exchange Resins, Qiagen, Toso Haas, Sterogene, Spherodex, Nucleopac, y Pharmacia. Por ejemplo, la columna (Poros II PI/M, 4,5 mm x 100) se equilibra inicialmente con 20 mM Bis/TRIS Propano a pH 7,5 y 0,7 M NaCl. La muestra se carga y se lava con el mismo tampón inicial. Se aplica un gradiente de elución de 0,5 M a 0,85 M NaCl en aproximadamente 25 volúmenes de columna y se recogen las fracciones. La cromatografía de intercambio aniónico preferida incluye Fractogel TMAE HiCap.
- 40 Según una realización preferida del procedimiento para separar y purificar ADN plasmídico, la presente invención se refiere a un método para separar y purificar ácidos nucleicos y/o ADN plasmídico mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de triple hélice en combinación para obtener eficazmente ácidos nucleicos con una gran pureza y en grandes cantidades.
- 45 La cromatografía de afinidad de triple hélice se describe entre otros en las patentes de EEUU 6.319.672, 6.287.762 así como en la solicitud de patente internacional publicada en WO02/77274 del Solicitante.
- 50 La cromatografía de afinidad de triple hélice se basa en la hibridación específica de oligonucleótidos y una secuencia diana en el ADN de doble hebra. Estos oligonucleótidos pueden contener las bases siguientes:
- timidina (T), que puede formar tripletes con dobles A.T de ADN bicatenario (Rajagopal et al., Biochem 28 (1989) 7859);
 - adenina (A), que puede formar tripletes con dobles A.T de ADN bicatenario;

- guanina (G), que puede formar tripletes con dobles G.C de ADN bicatenario;
- citosina protonada (C+), que puede formar tripletes con dobles G.C de ADN bicatenario (Rajagopal et al., loc. cit.);
- uracilo (U), que puede formar tripletes con pares de bases A.U o A.T.

5 Preferiblemente, el oligonucleótido utilizado comprende una secuencia de homopirimidina rica en citosinas y la secuencia específica presente en el ADN es una secuencia homopurina-homopirimidina. La presencia de citosinas permite tener una triple hélice que es estable a pH ácido en el que las citosinas están protonadas y se desestabiliza a pH alcalino en el que las citosinas se neutralizan.

10 El oligonucleótido y la secuencia específica presente en el ADN son preferiblemente complementarias para permitir la formación de una triple hélice. Los mejores rendimientos y la mejor selectividad pueden obtenerse utilizando un oligonucleótido y una secuencia específica que son totalmente complementarios. Por ejemplo, un oligonucleótido poli(CTT) y una secuencia específica poli(GAA). Los oligonucleótidos preferidos tienen una secuencia 5'-GAGGCTTCTTCTTCTT CTTCTTCTT-3' (GAGG(CTT)₇ (SEQ ID NO: 1), en la que las bases GAGG no forman una triple hélice pero permiten al oligonucleótido estar separado del brazo de acoplamiento; la secuencia (CTT)₇. Estos
15 oligonucleótidos son capaces de formar una triple hélice con una secuencia específica que contiene unidades complementarias (GAA). La secuencia en cuestión puede ser, en particular, una región que contiene 7, 14 ó 17 unidades GAA, como se describe en los ejemplos.

Otra secuencia de interés específico es la secuencia 5'-AAGGGAGGGAGGA GAGGAA-3' (SEQ ID NO: 2). Esta secuencia forma una triple hélice con los oligonucleótidos 5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3' (SEQ ID NO: 3) ó
20 5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGTT-3' (SEQ ID NO: 4). En este caso, el oligonucleótido se une en una orientación antiparalela a la cadena de polipurina. Estas triples hélices son estables sólo en presencia de Mg²⁺ (Vasquez et al., Biochemistry, 1995, 34, 7243-7251; Beal y Dervan, Science, 1991, 251, 1360--1363).

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia específica puede ser una secuencia presente naturalmente en el ADN de doble hebra o una secuencia sintética introducida artificialmente en este último. Es especialmente ventajoso utilizar
25 un oligonucleótido capaz de formar una triple hélice con una secuencia que está presente naturalmente en el ADN bicatenario, por ejemplo, en el origen de replicación de un plásmido o en un gen marcador. A este respecto, se sabe mediante análisis de secuencia que algunas regiones de estos ADN, en particular en el origen de replicación, podrían tener regiones homopurina-homopirimidina. La síntesis de oligonucleótidos capaces de formar triples hélices con estas regiones naturales homopurina-homopirimidina permite ventajosamente aplicar el método de la invención a plásmidos
30 sin modificar, en particular, a plásmidos comerciales del tipo pUC, pBR322, pSV, y semejantes. Entre las secuencias homopurina-homopirimidina presentes de manera natural en un ADN bicatenario, puede mencionarse una secuencia que comprende toda o parte de la secuencia 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3' (SEQ ID NO: 5) presente en el origen de replicación del plásmido de *E. coli* ColE1. En este caso, el oligonucleótido que forma la triple hélice tiene la secuencia: 5'-GAAGGGCTTCCCTTTCC-3' (SEQ ID NO: 6), y se une alternativamente a las dos hebras de la doble
35 hélice, como describen Beal y Dervan (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4976-4982) y Jayasena y Johnston (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 5279-5288). También puede mencionarse la secuencia 5'-GAAAAAGGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 7) del gen de la β-lactamasa del plásmido pBR322 (Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 504-508).

Las secuencias diana apropiadas que pueden formar estructuras tríplex con oligonucleótidos particulares se han
40 identificado en orígenes de replicación de plásmidos ColE1 así como los plásmidos pCOR. Los plásmidos pCOR son plásmidos con un origen de replicación condicional y se describen entre otros en EEUU 2004/142452 y EEUU 2003/161844. Los plásmidos derivados de ColE1 contienen una secuencia de homopurina de 12-mer (5'-AGAAAAAAGGA-3') (SEQ ID NO: 8) mapeada en posición 5' respecto al transcrito de ARN-II implicado en la replicación del plásmido (Lacatena et al., 1981, Nature, 294, 623). Esta secuencia forma una estructura tríplex estable con el oligonucleótido complementario de 12-mer 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 9). La parte central de pCOR
45 contiene una cadena de homopurina de 14 bases no repetidas (5'-AAGAAAAAAGAA-3') (SEQ ID NO: 10) localizada en el segmento rico en A+T del origen de replicación y de pCOR (Levchenko et al., 1996, Nucleic Acids Res., 24, 1936). Esta secuencia forma una estructura tríplex estable con el oligonucleótido complementario de 14-mer 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 11). Los oligonucleótidos correspondientes 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 11) localizan de manera eficaz y específica sus secuencias complementarias
50 respectivas localizadas en el origen de replicación bien de ColE1 ori o pCOR (oriγ). De hecho, una tríada única no-canónica (T*GC o C*AT) puede resultar en la completa desestabilización de la estructura tríplex.

La utilización de un oligonucleótido capaz de formar una triple hélice con una secuencia presente en un origen de replicación o en un gen marcador es especialmente ventajosa, ya que hace posible, con el mismo oligonucleótido, la
55 purificación de cualquier ADN que contiene dicho origen de replicación o dicho gen marcador. Por lo tanto, no es necesario modificar el plásmido o el ADN de doble hebra con el fin de incorporar en éste una secuencia artificial.

Aunque se prefieren secuencias totalmente complementarias, se entiende, sin embargo, que pueden tolerarse algunos emparejamientos erróneos entre la secuencia del oligonucleótido y la secuencia presente en el ADN, siempre que no

den lugar a una gran pérdida de afinidad. Puede mencionarse la secuencia 5'-AAAAAAGGGAATAAGGG-3' (SEQ ID NO: 12) presente en el gen de β -lactamasa de E. coli. En este caso, la timina que interrumpe la secuencia de polipurina puede reconocerse mediante una guanina de la tercera cadena, formando así un triplete G*TA que es estable cuando está flanqueado por dos tripletes T*AT (Kießling et al., *Biochemistry*, 1992, 31, 2829-2834).

5 Según una realización particular, los oligonucleótidos de la invención comprenden la secuencia (CCT)_n, la secuencia (CT)_n o la secuencia (CTT)_n, en las que n es un número entero entre 1 y 15 inclusive. Es especialmente ventajosa la utilización de secuencias del tipo (CT)_n o (CTT)_n. El Solicitante ha mostrado, en efecto, que la cantidad de C en el oligonucleótido influye en el rendimiento de la purificación. En particular, como se muestra en el Ejemplo 7, el rendimiento de la purificación aumenta cuando el oligonucleótido contiene menos citosinas. Se entiende que los
10 oligonucleótidos de la invención también pueden combinar unidades (CCT), (CT) o (CTT).

El oligonucleótido utilizado puede ser natural (compuesto por bases naturales sin modificar) o puede estar modificado químicamente. En particular, el oligonucleótido puede tener ventajosamente determinadas modificaciones químicas que permiten incrementar su resistencia a o su protección frente a nucleasas o su afinidad por la secuencia específica. También se entiende que oligonucleótido significa cualquier sucesión de nucleósidos unidos que han sufrido una
15 modificación del esqueleto con el fin de hacerlo más resistente a nucleasas. Entre las modificaciones posibles, pueden mencionarse los fosforotioatos de oligonucleótido, que son capaces de formar triples hélices con ADN (Xodo et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 3322-3330), así como los oligonucleótidos que tienen esqueletos de formacetal o metilfosfonato (Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 7767-7768). También es posible utilizar oligonucleótidos sintetizados con anómeros α de nucleótidos, que también forman triples hélices con ADN (Le Doan et al., *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15, 7749-7760). Otra modificación del esqueleto es la unión fosforamidato. Por ejemplo, puede mencionarse la unión internucleotídica fosforamidato N³-p⁵ descrita por Gryaznov y Chen, que da oligonucleótidos que forman triples
20 hélices con ADN especialmente estables (*J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 3143-3144). Entre otras modificaciones del esqueleto, también puede mencionarse la utilización de ribonucleótidos, de 2'-O-metilribosa, fosfodiéster, etc. (Sun y Hélène, *Opinion Struct. Biol.*, 1993, 116, 3143-3144). Por último, el esqueleto basado en fósforo puede reemplazarse por un esqueleto de poliamida como en PNA (ácidos nucleicos peptídicos), que también pueden formar triples hélices (Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500; Kim et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 6477-6481), o por un esqueleto basado en guanidina, como en DNG (guanidina desoxiribonucleica, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 6097-6101), o por análogos policatiónicos del ADN, que también forman triples hélices.

La timina de la tercera cadena también puede reemplazarse por un 5-bromouracilo, que aumenta la afinidad del oligonucleótido por el ADN (Povsic y Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 3059-3061). La tercera cadena también puede contener bases no naturales, entre las cuales pueden mencionarse 7-deaza-2'-desoxixantocina (Milligan et al., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 327-333), 1-(2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-3-metil-5-amino-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona (Koh y Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 1470-1478), 8-oxoadenina, 2-aminopurina, 2'-O-metilseudocitidina, o cualquier otra modificación conocida por el experto en la técnica (para una revisión véase Sun y Hélène, *Opinion Struct. Biol.*, 1993, 3, 345-356).
35

Otro tipo de modificación del oligonucleótido tiene la finalidad, más especialmente, de mejorar la interacción y/o afinidad entre el oligonucleótido y la secuencia específica. En particular, una modificación más ventajosa según la invención consiste en metilar las citosinas del oligonucleótido. El oligonucleótido así metilado presenta la propiedad destacada de formar una triple hélice estable con la secuencia específica en intervalos de pH cercanos a la neutralidad (≥ 5). Por lo tanto, esto hace posible trabajar a valores de pH mayores que los oligonucleótidos de las técnicas anteriores, es decir, a valores de pH en los que son mucho menores los riesgos de degradación del ADN plasmídico.
40

La longitud del oligonucleótido utilizado en el método de la invención es entre 5 y 30. Se utiliza ventajosamente un oligonucleótido con una longitud mayor de 10 bases. La longitud puede adaptarse por un experto en la técnica para cada caso individual para obtener la selectividad y estabilidad deseadas de la interacción.

45 Los oligonucleótidos según la invención pueden sintetizarse mediante cualquier técnica conocida. En particular, pueden prepararse mediante sintetizadores de ácidos nucleicos. Obviamente puede utilizarse cualquier otro método conocido por el experto en la técnica.

Con el fin de permitir su acoplamiento covalente al soporte, generalmente el oligonucleótido se funcionaliza. Así, puede modificarse mediante un tiol, amina o grupo carboxilo terminal en la posición 5' ó 3'. En particular, la adición de un tiol, amina o grupo carboxilo permite, por ejemplo, acoplar el oligonucleótido a un soporte que tiene funciones disulfuro, maleimida, amina, carboxilo, éster, epóxido, bromuro de cianógeno o aldehído. Estos acoplamientos se forman mediante la formación de uniones disulfuro, tioéter, éster, amida o amina entre el oligonucleótido y el soporte. Puede utilizarse cualquier otro método conocido por el experto en la técnica, tal como reactivos de acoplamiento bifuncionales, por ejemplo.
50

55 Más aún, para mejorar la hibridación con el oligonucleótido acoplado, puede ser ventajoso que el oligonucleótido contenga una secuencia de bases "brazo" y "espaciador". La utilización de un brazo permite, de hecho, unir el oligonucleótido a una distancia elegida del soporte, permitiendo mejorar sus condiciones de interacción con el ADN. El brazo consiste ventajosamente en una cadena carbonada lineal que comprende 1 a 18 y preferiblemente 6 ó 12 grupos

(CH₂), y una amina que permite la unión a la columna. El brazo está unido a un fosfato del oligonucleótido o de un "espaciador" compuesto por bases que no interfieren con la hibridación. Así, el "espaciador" puede comprender bases de purina. Como ejemplo, el "espaciador" puede comprender la secuencia GAGG. El brazo está compuesto ventajosamente por una cadena carbonada lineal que comprende 6 ó 12 átomos de carbono.

5 La cromatografía de afinidad de tríplex es muy eficaz para eliminar ARN y ADN genómico. Estos pueden ser soportes cromatográficos funcionalizados, en gran cantidad o preempaquetados en una columna, superficies plásticas funcionalizadas o lechos de látex, magnéticos funcionalizados u otros. Preferiblemente se utilizan soportes cromatográficos. Como ejemplo, los soportes cromatográficos que pueden utilizarse son agarosa, acrilamida o dextrano así como sus derivados (tales como Sefadex, Sefarosa, Superosa, etc.), polímeros tales como poli
10 (estireno/divinilbenceno), o sílice injertada o no injertada, por ejemplo. Las columnas de cromatografía pueden operar en el modo de difusión o perfusión.

15 Para obtener mejores rendimientos en la purificación, es especialmente ventajoso utilizar, en el plásmido, una secuencia que contiene varias posiciones de hibridación con el oligonucleótido. La presencia de varias posiciones de hibridación promueve, en efecto, las interacciones entre dicha secuencia y el oligonucleótido, que dan lugar a una mejora en los rendimientos de la purificación. Por lo tanto, para un oligonucleótido que contiene n repeticiones de restos (CCT), (CT) o (CTT), es preferible utilizar una secuencia de ADN que contiene al menos n restos complementarios y preferiblemente n+ 1 restos complementarios. Una secuencia que tiene n+ 1 restos complementarios proporciona dos posiciones de hibridación con el oligonucleótido. Ventajosamente, la secuencia de ADN contiene hasta 11 posiciones de hibridación, es decir, n+10 motivos complementarios.

20 El método según la presente invención puede utilizarse para purificar cualquier tipo de ADN de doble hebra. Un ejemplo de este último es ADN circular, tal como un plásmido, que generalmente tiene uno o más genes con importancia terapéutica. Este plásmido también puede llevar un origen de replicación, un gen marcador y semejantes. El método de la invención puede aplicarse directamente a un lisado celular. En esta realización, el plásmido, amplificado por transformación seguida de cultivo celular, se purifica directamente después de la lisis de las células. El método de la
25 invención también puede aplicarse a un lisado aclarado, es decir al sobrenadante obtenido después de la neutralización y centrifugación del lisado celular. Obviamente también puede aplicarse a una disolución prepurificada mediante métodos conocidos. Este método también permite purificar ADN lineal o circular que tiene una secuencia importante a partir de una mezcla que comprende ADN de diferentes secuencias. El método según la invención también puede utilizarse para purificar ADN de doble hebra.

30 El lisado celular puede ser un lisado de células procariotas o eucariotas.

Respecto a las células procariotas, pueden mencionarse como ejemplos las bacterias E. coli, B. subtilis, S. typhimurium o Streptomyces. Respecto a las células eucariotas pueden mencionarse las células animales, de levaduras, fúngicas y semejantes y más específicamente las levaduras Kluyveromyces o Saccharomyces o las células COS, CHO, C127, NIH3T3, y semejantes.

35 El método de la presente invención que incluye al menos una etapa de cromatografía de afinidad de tríplex puede utilizarse para proporcionar una mayor pureza al producto ADN_p resultante. En la cromatografía de afinidad de tríplex, se une un oligonucleótido a un soporte, tal como una resina de cromatografía u otra matriz. La muestra que se está purificando se mezcla con el oligonucleótido unido, por ejemplo aplicando la muestra a una columna de cromatografía que contiene el oligonucleótido unido a una resina de cromatografía. El plásmido deseado en la muestra se unirá al oligonucleótido formando un tríplex. Los enlaces entre el oligonucleótido y el plásmido pueden ser enlaces Hoogsteen. Esta etapa puede producirse a un pH ≤5, a una concentración alta de sal durante un tiempo de contacto de 20 minutos o más. Puede utilizarse una etapa de lavado. Finalmente, la desprotonación de citosina se produce en un tampón neutro, eluyendo el plásmido de la resina a la que está unida el oligonucleótido.

45 Según la realización más preferida, el procedimiento de separación y purificación de los ácidos nucleicos y/o de los ADN plasmídicos comprende las etapas de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad de triple hélice y cromatografía de interacción hidrofóbica en combinación.

50 La cromatografía de interacción hidrofóbica utiliza restos hidrofóbicos en un sustrato para atraer regiones hidrofóbicas de las moléculas en la muestra para purificación. Debe indicarse que estos soportes de HIC funcionan mediante un efecto de "agrupamiento"; se forman o se comparten enlaces no covalentes o iónicos cuando estas moléculas se asocian. La cromatografía de interacción hidrofóbica es beneficiosa ya que elimina muy eficazmente formas circulares abiertas de plásmidos y otros contaminantes, tales como ADN_g, ARN y endotoxinas.

La síntesis de los materiales base para la cromatografía de interacción hidrofóbica, así como los procesos para preparar, polimerizar y funcionalizar la cromatografía de interacción hidrofóbica y eluir y separar ADN plasmídico mediante ésta son muy conocidos en la técnica y se describen entre otros en la patente de EEUU No: 6.441.160 .

55 El compuesto que se va a utilizar para la síntesis de los materiales base que se utilizan para el material de empaquetamiento de la cromatografía de interacción hidrofóbica puede ser cualquier compuesto, si pueden introducirse varios grupos funcionales que presentan hidrofobicidad o varios grupos de intercambio iónico mediante una reacción

posterior a la síntesis de los materiales base. Los ejemplos de monómeros monofuncionales incluyen estireno, o-halometilestireno, m-halometilestireno, p-halometilestireno, o-haloalquilestireno, m-haloalquilestireno, p-haloalquilestireno, α-metilestireno, α-metil-o-halometilestireno, α-metil-m-halometilestireno, α-metil-p-halometilestireno, α-metil-o-haloalquilestireno, α-metil-m-haloalquilestireno, α-metil-p-haloalquilestireno, o-hidroximetilestireno, m-hidroximetilestireno, p-hidroximetilestireno, o-hidroxialquilestireno, m-hidroxialquilestireno, p-hidroxialquilestireno, α-metil-o-hidroximetilestireno, α-metil-m-hidroximetilestireno, α-metil-p-hidroximetilestireno, α-metil-o-hidroxialquilestireno, α-metil-m-hidroxialquilestireno, α-metil-p-hidroxialquilestireno, metacrilato de glicidilo, acrilato de glicidilo, acrilato de hidroxietilo, hidroximetacrilato, y acetato de vinilo. Los compuestos más preferidos son grupos haloalquilo sustituidos en el anillo aromático, halógenos tales como Cl, Br, I y F e hidrocarburos saturados de cadena lineal y/o ramificada con 2 a 15 átomos de carbono.

Los ejemplos de monómeros polifuncionales incluyen divinilbenceno, trivinilbenceno, diviniltolueno, triviniltolueno, divinilnaftaleno, trivinilnaftaleno, dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de dietilenglicol, diacrilato de dietilenglicol, metilenbismetacrilamida, y metilenbisacrilamida.

Pueden introducirse varios grupos hidrofóbicos funcionales o varios grupos de intercambio iónico mediante la reacción posterior. Con el fin de minimizar la influencia en los productos deseados que se desea separar debida a la hidrofobicidad que presenta el material base en sí mismo, o al aumento o disminución del volumen del material base por sí mismo debido al cambio en la concentración de sal y al cambio del valor del pH, el material base se prepara preferiblemente utilizando monómeros relativamente hidrofílicos, tales como metacrilato de glicidilo, acrilato de glicidilo, acrilato de hidroxietilo, hidroximetacrilato y acetato de vinilo. La preparación del material base incluye una primera etapa en la que se pesan el monómero monofuncional y el monómero polifuncional en una proporción apropiada y se añaden el diluyente o disolvente pesados de manera precisa que se utilizan para el fin de ajustar los poros de las partículas formadas y el iniciador de la polimerización pesado similarmente de manera precisa, seguido de una buena agitación. La mezcla se somete entonces a una suspensión de polimerización de tipo aceite-en-agua en la que se añade la mezcla en una disolución acuosa de suspensión disuelta del estabilizador pesada de manera precisa con anterioridad y se forman gotitas de aceite del tamaño deseado mezclando con agitación y la polimerización se realiza calentando gradualmente la disolución de la mezcla.

La proporción del monómero monofuncional respecto al monómero polifuncional es generalmente aproximadamente 1 mol de monómero monofuncional y aproximadamente 0,01 a 0,2 moles del monómero polifuncional para obtener partículas blandas del material base. La proporción del monómero polifuncional puede incrementarse hasta aproximadamente 0,2 a 0,5 moles para obtener partículas duras de materiales base. El monómero polifuncional puede utilizarse solo para obtener partículas todavía más duras.

Un iniciador de la polimerización no está restringido particularmente y se utilizan de tipo azobis y/o de tipo peróxido utilizados comúnmente.

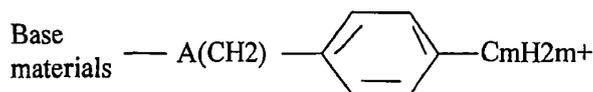
También pueden utilizarse estabilizadores de la suspensión tales como tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos y polímeros con propiedades anfipáticas o mezclas de éstos para prevenir la agregación de las gotitas de aceite entre sí.

El diámetro de las partículas formadas es generalmente de aproximadamente 2 a 500 μm. El diámetro preferido de las partículas está comprendido entre 2 y 30 μm, y más preferiblemente aproximadamente 2 a 10 μm. Cuando se pretende la purificación a gran escala de ácidos nucleicos con gran pureza, es aproximadamente 10 a 100 μm y cuando se separa el producto deseado de la disolución madre cruda puede ser 100 a 500 μm, más preferiblemente aproximadamente 200 a 400 μm. Para ajustar el diámetro de las partículas, puede ajustarse la velocidad rotacional del agitador durante la polimerización. Cuando se necesitan partículas con un diámetro pequeño, puede incrementarse el número de revoluciones y, cuando se desean partículas grandes, puede disminuirse el número de revoluciones. Por lo tanto, como el diluyente que se va a utilizar se utiliza para ajustar los poros de las partículas formadas, la selección del diluyente es particularmente importante. Como concepto fundamental, para el disolvente que se va a utilizar para la polimerización, el ajuste se realiza combinando de manera variada un disolvente que es un mal disolvente para el monómero con un disolvente que es un buen disolvente para el monómero. El tamaño del diámetro del poro puede seleccionarse apropiadamente dependiendo del tamaño molecular de los ácidos nucleicos que se van a separar, aunque se prefiere que esté en un intervalo de 500 a 4.000 ángstrom para el material de empaquetamiento para la cromatografía de interacción hidrofóbica y en un intervalo de 1.500 a 4.000 ángstrom para el material de empaquetamiento para la cromatografía de intercambio iónico.

En la cromatografía de interacción hidrofóbica, para separar ácidos nucleicos con diferente hidrofobicidad preferible utilizando materiales de empaquetamiento con diferente hidrofobicidad, respectivamente, es importante la modificación de la superficie del material base.

Los grupos hidrofóbicos pueden seleccionarse entre los de cadena larga o ramificada incluyendo grupos hidrocarbonados saturados o grupos hidrocarbonados insaturados con 2 a 20 átomos de carbono. El anillo aromático también puede estar contenido en el grupo hidrocarbonado.

Los grupos hidrofóbicos también pueden seleccionarse entre compuestos que tienen la fórmula siguiente:



en la que $n=0$ a aproximadamente 20 y el grupo metileno puede tener cadena lineal o ramificada, $m=0$ a aproximadamente 3 y el grupo hidrocarbonado puede tener cadena lineal o ramificada, y A es un grupo C=O o un grupo éter, aunque el grupo metileno puede estar unido directamente al material base sin A.

- 5 Los grupos hidrofóbicos pueden incluir además un grupo éter de alquilenglicol con 2 a 20 átomos de carbono que consiste en unidades repetidas de 0 a 10, en el que el extremo opuesto del grupo funcional que reacciona con el material base puede ser un grupo OH tal cual o puede estar cubierto con un grupo alquilo con 1 a 4 átomos de carbono.

Los grupos hidrofóbicos descritos anteriormente pueden utilizarse solos o en mezcla para modificar la superficie.

- 10 Se prefieren las cadenas de los grupos alquilo con 6 a 20 átomos de carbono para una baja hidrofobicidad como los plásmidos. Cadenas largas de grupos alquilo que tienen 2 a 15 átomos de carbono para separar compuestos con una alta hidrofobicidad tales como ARN procedente de *Escherichia coli* y ARN en las células de seres humanos y animales. Grupos alquilo de 4 a 18 átomos de carbono para separar compuestos con una hidrofobicidad relativamente baja tales como ADN procedentes de *Escherichia coli* y ADN en las células de seres humanos y animales.

- 15 Después de separar estos compuestos, los compuestos pueden seleccionarse apropiadamente para modificar la superficie sin estar confinados a dicha ejemplificación. En efecto, el grado de hidrofobicidad del material de empaquetamiento varía dependiendo de la concentración de sal en el medio o de la concentración de sal en el eluyente para la adsorción. Además, el grado de hidrofobicidad del material de empaquetamiento difiere dependiendo de la cantidad del grupo introducida en el material base.

- 20 El diámetro del poro del material base para la cromatografía de interacción hidrofóbica es particularmente preferible que sea de 500 a 4.000 ángstrom, pero puede seleccionarse apropiadamente de dicho intervalo dependiendo del tamaño molecular de los ácidos nucleicos que se desea separar. En general, debido a que la retención de los ácidos nucleicos en el material de empaquetamiento y la capacidad de adsorción (definido por la muestra) difieren dependiendo del diámetro del poro, es preferible utilizar un material base con un diámetro de poro grande para ácidos nucleicos con un tamaño molecular grande y un material base con un diámetro de poro pequeño para ácidos nucleicos con un tamaño molecular pequeño.

- 30 Por ejemplo, puede hacerse reaccionar material base de estireno con grupo hidrofóbico que comprende grupos alquilo de cadena larga, utilizando un compuesto que contiene halógenos y/o haluro de carbonilo y un catalizador tal como FeCl_3 , SnCl_2 o AlCl_3 , y utilizando una reacción de Friedel-Craft, es posible añadirlo directamente al anillo aromático en el material base como un compuesto deshalogenado y/o compuesto acilado. En el caso de que el material base sean partículas que contienen un grupo halógeno, por ejemplo, utilizando compuestos con OH contenido en el grupo funcional que se va a añadir, como butanol, y utilizando la reacción de Williamson con un catalizador alcalino tal como NaOH o KOH, es posible introducir el grupo funcional mediante un enlace éter. En el caso de que el grupo funcional deseado que se va a añadir sea un compuesto que contiene un grupo amino, como hexilamina, es posible la adición utilizando un catalizador alcalino tal como NaOH o KOH y utilizando una reacción ácida deshalogénica. En el caso de que el material base contenga un grupo OH, por el contrario, si se introduce un grupo epoxi, grupo halógeno o grupo haluro de carbonilo previamente en el grupo funcional que se desea añadir, es posible introducir el grupo funcional mediante un enlace éter o éster. En el caso en el que el material base contenga un grupo epoxi, si reacciona con un compuesto con un grupo OH o grupo amino contenido en el grupo funcional que se desea añadir, es posible introducir el grupo funcional mediante un enlace éter o amino. Más aún, en el caso en el que el grupo funcional que se desea añadir contenga un grupo halógeno, es posible añadir el grupo funcional mediante un enlace éter utilizando un catalizador ácido. Debido a que la proporción del grupo funcional que se va a introducir en el material base está influida por la hidrofobicidad del producto que se quiere separar, no puede restringirse, pero, en general, es adecuado el material de empaquetamiento con aproximadamente 0,05 a 4,0 mmoles de grupo funcional añadido por 1 g de material base seco.

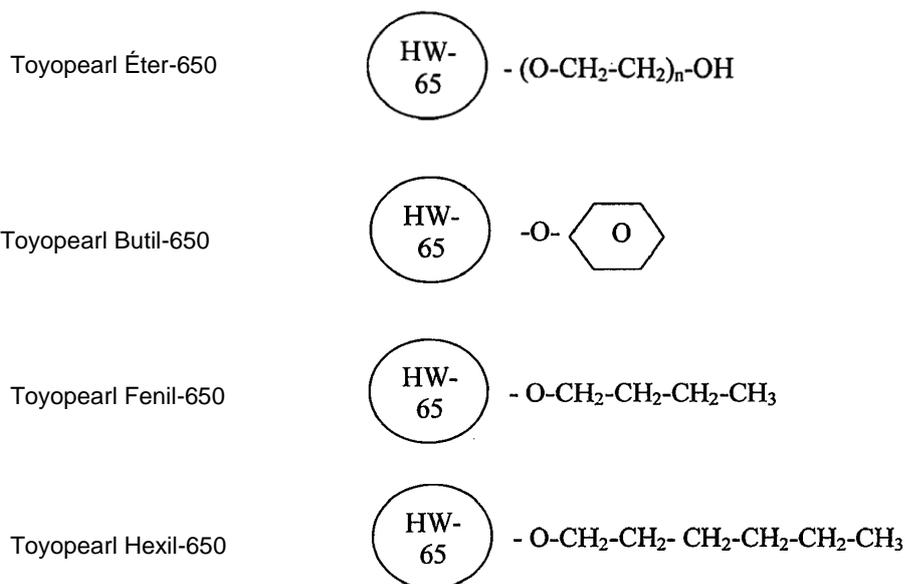
- 45 Respecto a la modificación de la superficie, un método para añadir el grupo funcional mediante una reacción posterior a la formación del material base o las partículas es como se describe. La modificación de la superficie se realiza según el mismo método, en el que el material base se forma después de la polimerización utilizando monómeros añadiéndose dichos grupos funcionales antes de la polimerización.

- 50 El material base también puede ser gel de sílice poroso. Un método para fabricar gel de sílice, comprende acoplamiento con silano utilizando un compuesto tal como alquiltrimetoxisilano directamente en las partículas fabricadas según el método descrito en "Latest High-Speed Liquid Chromatography", página 289 y siguientes. (escrito por Toshio Nambara y Nobuo Ikegawa, publicado por Tokyo Hirokawa Bookstore en 1988). Antes o después del acoplamiento del silano utilizando un agente de acoplamiento de silano que contiene un grupo epoxi, puede añadirse un grupo funcional según el método mencionado anteriormente. Es adecuada una proporción del grupo funcional que se introduce de aproximadamente 0,05 a 4,0 mmoles de grupo funcional añadido por 1 g de material base seco.

Se utilizan eluyentes en la etapa de separación o purificación de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Generalmente, se utilizan dos tipos de eluyentes. Un eluyente contiene una alta concentración de sal, mientras que el segundo eluyente contiene una baja concentración de sal. El método de elución comprende cambiar por etapas de un eluyente que tiene una alta concentración de sal a un eluyente que tiene una baja concentración de sal y puede utilizarse el método de gradiente de elución que cambia continuamente la composición de un eluyente al otro. Pueden utilizarse los tampones y sales generalmente utilizados en la cromatografía de interacción hidrofóbica. Para el eluyente que contiene una alta concentración de sal, es particularmente preferible una disolución acuosa con una concentración de sal de 1,0 a 4,5M y un valor de pH de 6 a 8. Para el eluyente que contiene una baja concentración de sal, es particularmente preferible una disolución acuosa con una concentración de sal de 0,01 a 0,5M y un valor de pH de 6 a 8. Generalmente, pueden utilizarse como sales el sulfato de amonio y el sulfato de sodio.

La etapa de purificación del ADN plasmídico con cromatografía de interacción hidrofóbica puede realizarse combinando un material de empaquetamiento en el que se ha introducido el grupo funcional con una baja hidrofobicidad con un material de empaquetamiento en el que se ha introducido el grupo funcional con alta hidrofobicidad. En efecto, el medio de Escherichia coli cultivada contiene en gran cantidad varios componentes diferentes en hidrofobicidad tales como polisacáridos, ADN genómico, ARN, plásmido y proteínas de Escherichia coli. También se sabe que existen diferencias en hidrofobicidad incluso entre los ácidos nucleicos. Las proteínas que son consideradas impurezas tienen una mayor hidrofobicidad que los plásmidos.

Muchas resinas de cromatografía de interacción hidrofóbica están disponibles comercialmente, tales como Fractogel propil, Toyopearl, Source isopropil, y cualquier otra resina que tiene grupos hidrofóbicos. Las resinas más preferidas son medio polimérico Toyopearl. Toyopearl es un polímero metacrílico que incorpora una alta estabilidad mecánica y química. Las resinas están disponibles como serie de resinas no funcionalizadas "HW" y pueden derivatizarse con químicas de superficie para cromatografía de intercambio iónico o interacciones hidrofóbicas. Pueden utilizarse cuatro tipos de resinas Toyopearl HIC que presentan diferente química de superficie y niveles de hidrofobicidad. La hidrofobicidad de las resinas Toyopearl HIC se incrementa en las series: Éter, Fenil, Butil y Hexil. Las estructuras de las resinas Toyopearl HIC preferidas, es decir, Toyopearl HW-65 con un diámetro de poro de 1.000 ángstrom se muestran a continuación:



Las resinas Toyopearl descritas anteriormente pueden tener varios grados de tamaño de partícula. Toyopearl 650C tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 50 a 150 µm, preferiblemente aproximadamente 100µm, mientras que Toyopearl 650M tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 40 a 90µm, preferiblemente aproximadamente 65µm y Toyopearl 650S tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 20 a 50 µm, preferiblemente aproximadamente 35µm. Es muy conocido que el tamaño de las partículas influye en la resolución, es decir, la resolución mejora con un grado de tamaño de partícula de C a M a S, y por lo tanto se incrementa con tamaños de partícula más pequeños. La resina Toyopearl mas preferida utilizada en la etapa de cromatografía HIC en el proceso de separación y purificación del ADN plasmídico según la presente invención es Toyopearl butil-650S que está comercializada por Tosoh Bioscience.

Según una realización preferida, se realiza una etapa adicional de diafiltración. Los materiales de diafiltración estándar disponibles comercialmente son adecuados para utilizarse en este proceso, según las técnicas estándar conocidas en la técnica. Un método de diafiltración preferido es diafiltración utilizando una membrana de ultrafiltración con un punto de

5 corte de peso molecular en el intervalo de 30.000 a 500.000, dependiendo del tamaño del plásmido. Esta etapa de diafiltración permite el intercambio de tampón y se realiza una concentración. El eluato se concentra 3 a 4 veces mediante filtración en flujo tangencial (punto de corte de la membrana, 30 kDa) hasta una concentración diana de aproximadamente 2,5 a 3,0 mg/mL y se intercambia el tampón del concentrado por diafiltración a un volumen constante con 10 volúmenes de disolución salina y se ajusta a la concentración de plásmido diana con disolución salina. La concentración del ADN plasmídico se calcula a partir de la absorbancia a 260 nm de muestras del concentrado. La disolución de ADN plasmídico se filtra a través de un filtro de cápsula de 0,2 µm y se divide en varias alícuotas, que se almacenan en recipientes en una habitación fría a 2-8°C hasta el procesamiento adicional. Esto rinde un concentrado purificado con una concentración de ADN plasmídico de plásmido superenrollado de aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, y preferiblemente 99%. La recuperación global de plásmido con este proceso es al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, y 80%, con una recuperación media del 60 %.

10 Según esta realización, la etapa de diafiltración se realiza según las condiciones siguientes: se utilizan tampón para la etapa a) y para la etapa b):

15 i) una primera diafiltración (etapa a) frente a 12,5 a 13,0 volúmenes de 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (denominado tampón I), y

20 ii) Realizar una segunda diafiltración del retenido de la etapa a) anterior (etapa b) frente a 3,0 a 3,5 volúmenes de excipiente salino (150 mM NaCl). Esta etapa de diafiltración preferida según la presente invención elimina de manera eficaz y extensa el sulfato de amonio y el EDTA. También, posteriormente a estas etapas de diafiltración, se obtiene una concentración fisiológica apropiada de NaCl (aproximadamente 150mM) y una concentración final de Tris por debajo de 1 mM (entre 200 µM y 1 mM).

25 La formulación de ADN plasmídico obtenida de esta manera utilizando esta etapa de diafiltración comprende NaCl como excipiente salino y una concentración apropiada de tampón Tris con el fin de mantener o controlar el valor de pH entre 7 y 7,5. Las formulaciones de ADN plasmídico según la presente solicitud son particularmente útiles ya que su ADN plasmídico puede almacenarse de manera sorprendente en una forma estable no degradable en estas condiciones durante un periodo de tiempo prolongado a 5°C y hasta 25°C, es decir, a temperatura ambiente.

Como se ha descrito, según el método inventivo de separación se puede obtener ADN plasmídico con gran pureza en gran cantidad mediante una manipulación más sencilla que la del método convencional.

30 El proceso para purificar plásmidos puede utilizarse posteriormente al método de lisis continua como se ha descrito anteriormente, o a cualquier método alternativo de lisis muy conocido en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse lisis por calor con flujo directo de las células microbianas que contienen el plásmido. Este proceso se describe entre otros en la publicación Internacional WO 96/02658. El intercambiador de calor particular consistió en un tubo de acero inoxidable de 305 cm x 0,64 cm O.D. con forma de serpentín. El serpentín está completamente sumergido en un baño de agua con una temperatura alta constante. El volumen de retención del serpentín es aproximadamente 50 mL. Se utilizaron termopares y un termómetro para determinar las temperaturas de entrada y de salida y la temperatura del baño de agua, respectivamente. La corriente del producto se bombea en el serpentín de calefacción utilizando una bomba peristáltica Masterflex con tubos de silicona. El lisado celular salió del serpentín y se centrifugó en una centrifuga discontinua Beckman J-21 para aclararlo. Después de la centrifugación, el ADN plasmídico puede purificarse utilizando el método de purificación según la presente invención.

40 Alternativamente, para la lisis celular se pueden utilizar mezcladores estáticos en serie. En efecto, como se describe en WO97/23601, puede utilizarse un primer mezclador estático para lisar las células a través de un primer mezclador estático y para precipitar el lisado celular un segundo mezclador estático como un método alternativo para lisar las células antes del método para purificar el ADN plasmídico según la presente invención. Se puede lisar en línea un gran volumen de células cuidadosamente y de manera continua utilizando el mezclador estático y los otros mezcladores estáticos se ponen en línea para conseguir otras funciones tales como dilución y precipitación. Los mezcladores estáticos adecuados útiles en el método de la presente invención incluyen cualquier dispositivo de flujo directo referido en la técnica como un mezclador estático o sin movimiento con una longitud suficiente como para permitir los procesos de la presente invención. Por ejemplo, para el fin de lisar las células, el mezclador estático tendrá que tener una longitud que proporcione un tiempo de contacto suficiente entre la disolución de lisis y las células para producir la lisis de las células en cuestión durante su paso a través del mezclador. En una realización preferida, los mezcladores estáticos adecuados contienen una estructura helicoidal interna que hace que los dos líquidos entren en contacto entre sí en un flujo rotacional opuesto haciendo que los líquidos se mezclen entre sí en un flujo turbulento.

55 El método para separar y purificar ADN plasmídico según la presente invención puede utilizarse para separar y purificar cualquier tipo de vector de cualquier tamaño. El intervalo del tamaño del ADN plasmídico que puede separarse mediante el método según la presente invención es de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 50 kb, preferiblemente 15 kb a 50 kb, ADN que incluye un núcleo de vector de aproximadamente 3 kb, un gen terapéutico y secuencias reguladoras asociadas. Por lo tanto, un núcleo de vector útil en la invención puede ser capaz de portar insertos de aproximadamente 10-50 kb o mayores. El inserto puede incluir ADN de cualquier organismo, pero preferiblemente será de origen mamífero y puede incluir, además de un gen que codifica una proteína terapéutica,

5 secuencias reguladoras tales como promotores, secuencias de poli adenilación, amplificadores, regiones de control de locus, etc. El gen que codifica una proteína terapéutica puede tener un origen genómico y por lo tanto contener exones e intrones como se refleja en su organización genómica o puede proceder de ADN complementario. Dichos vectores pueden incluir, por ejemplo, un núcleo de vector replicable con una replicación de alto número de copias, que tiene un policonector para la inserción de un gen terapéutico, un gen que codifica un marcador que se puede seleccionar, por ejemplo SupPhe ARNt, el gen de resistencia a la tetraciclina y es físicamente pequeño y estable. El núcleo de vector del plásmido permite ventajosamente insertos de fragmentos de ADN de mamíferos, otros eucariotas, procariota o viral y el plásmido resultante puede purificarse y utilizarse en terapia basada en plásmidos in vivo o ex vivo. Los vectores con un número de copias relativamente alto, es decir, en el intervalo de 20-40 copias/célula hasta 1.000-2.000 copias/célula pueden separarse y purificarse mediante el método según la presente invención. Por ejemplo, se prefiere un vector que incluye el origen de replicación de pUC según el método de la invención. El origen de replicación de pUC permite una replicación más eficaz del ADN plasmídico y resulta en un incremento de diez veces del número de copias de plásmido/célula respecto, por ejemplo, a un origen de pBR322. Preferiblemente, puede separarse ADN plasmídico con un origen de replicación condicional o pCOR como se describe en EEUU 2003/1618445, mediante el proceso según la presente invención. El número de copias alto resultante incrementa en gran medida la proporción de ADN plasmídico respecto a ADN cromosómico, ARN, proteínas celulares y co-factores, mejora la producción del plásmido y facilita la purificación aguas abajo. De acuerdo con esto, puede utilizarse cualquier vector (ADN plasmídico) según la invención. Los vectores representativos incluyen pero no están limitados a plásmido NV1FGF. NV1FGF es un plásmido que codifica un Factor de Crecimiento de Fibroblastos ácido o Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 1 (FGF-1), útil para tratar pacientes con enfermedad oclusiva arterial periférica terminal (PAOD) o con enfermedad arterial periférica (PAD). Camerota et al. (J Vasc. Surg., 2002, 35, 5:930-936) describen que a 51 pacientes con PAD terminal no reconstruible, con dolor en reposo o necrosis tisular, se les inyectó intramuscularmente dosis crecientes únicas o repetidas de NV1FGF en muslo y pantorrilla isquémicos. Se evaluaron posteriormente varios parámetros tales como presión de oxígeno transcutánea, índices braquiales en tobillos y dedos de los pies, evaluación del dolor y cicatrización de úlceras. Se observó un incremento significativo de los índices braquiales, reducción del dolor, resolución del tamaño de las úlceras y una perfusión mejorada después de la administración de NV1FGF.

30 Las células anfitrionas útiles según la invención pueden ser cualquier cepa bacteriana, es decir, tanto cepas Gram positivas como Gram negativas, tales como E. coli y Salmonella Typhimurium o Bacillus que es capaz de mantener un número de copias alto de los plásmidos descritos anteriormente; por ejemplo 20-200 copias. Pueden utilizarse cepas anfitrionas de E. coli según la invención e incluyen HB101, DH1, y DH5 α F, XAC-1 y XAC-1pir 116, TEX2, y TEX2pir42 (WO04/033664). Las cepas que contienen el plásmido F o derivados del plásmido F (por ejemplo, JM 109) no se prefieren generalmente debido a que el plásmido F puede co-purificarse con el producto plasmídico terapéutico.

35 Según otro aspecto, la presente invención también se refiere a una composición que comprende ADN plasmídico altamente purificado que esencialmente no contiene contaminantes o contaminantes en el intervalo de sub-ppm y que, por lo tanto, es ADN de grado farmacéutico. La composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico según la presente invención contiene, por lo tanto, sub-ppm (< 0,0001%, es decir < 0,0001 mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ADNg, ARN, y proteínas contaminantes

40 La composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico contiene, por lo tanto, menos de aproximadamente 0,01%, o menos de 0,001%, y preferiblemente menos de 0,0001%, o preferiblemente menos de 0,00008% (< 0,0008%, es decir, < 0,0008 mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ADN cromosómico o ADN genómico.

La composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico contiene, por lo tanto, menos de aproximadamente 0,01%, o menos de 0,001%, y preferiblemente menos de 0,0001%, o preferiblemente menos de 0,00002% (< 0,0002%, es decir, < 0,0002 mg por 100 mg de ADN plasmídico) de ARN contaminantes.

45 La composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico contiene, por lo tanto, menos de aproximadamente 0,0001%, y lo más preferiblemente menos de 0,00005% de proteínas contaminantes.

La composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico contiene, por lo tanto, menos de 0,1 EU/mg de endotoxinas.

La composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico contiene por lo tanto de forma predominante la forma circular y más precisamente contiene más de 80%, 85%, 90%, 95%, ó 99% de la forma circular cerrada del ADN plasmídico.

50 La presente invención también se refiere a formulaciones líquidas de ADN plasmídico que son estables y permanecen sin degradarse a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, y son, por lo tanto, útiles para el almacenamiento de ADN plasmídicos que son utilizados en investigación y en terapia humana relacionada.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a una formulación estable de ADN plasmídico que comprende ADN plasmídico, una disolución de tampón muy diluida, y un excipiente salino, en la que la disolución de tampón está presente a una concentración para mantener el pH de dicha formulación o composición entre 7 y 7,5.

55 Las disoluciones tampón que son capaces de mantener el pH de la composición entre 7 y 7,5 consisten en un sistema ácido/base que comprende Tris [tris(hidroximetil)-aminometano], o lisina y un ácido elegido entre un ácido fuerte (ácido clorhídrico, por ejemplo) y un ácido débil (ácido maleico, ácido málico o ácido acético, por ejemplo), o un sistema

ácido/base que comprende Hepes ácido [2-(4-(2-hidroxietilpiperacín)-1-il)etanosulfónico] y una base fuerte (hidróxido sódico, por ejemplo). La disolución tampón también puede comprender Tris/HCl, lisina/HCl, Tris/ácido maleico, Tris/ácido málico, Tris/ácido acético, o Hepes/hidróxido sódico.

Preferiblemente, el pH se mantiene entre 7 y 7,5 y aún más particularmente a aproximadamente 7,2.

5 El excipiente salino que puede utilizarse en la formulación de la presente invención es preferiblemente NaCl a una concentración entre 100 y 200 mM, y preferiblemente a una concentración de aproximadamente 150mM. Otro excipiente salino puede comprender aniones y cationes seleccionados del grupo que consiste en acetato, fosfato, carbonato, SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , NO_3^- , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , y NH_4^+ .

10 La concentración molar de la disolución tampón se determina para que ejerza el efecto tamponador dentro de un límite y en un volumen en el que el valor del pH se establezca entre 7 y 7,5. La composición de almacenamiento estable de ADN plasmídico según la presente invención comprende, por lo tanto, ADN plasmídico, un excipiente salino y una disolución tampón en la que la disolución tampón está presente en una concentración de hasta 1mM, y preferiblemente entre 250 μM y 1mM, o preferiblemente entre 400 μM y 1mM para mantener el pH de dicha formulación o composición entre 7 y 7,5. Entre los sistemas tampón según la invención, la disolución tampón Tris a una concentración de 400 μM proporciona unos resultados particularmente satisfactorios y es, por lo tanto, la preferida en la formulación de plásmido de la presente invención.

15 Como se muestra en los Ejemplos más adelante, las formulaciones de ADN plasmídico según la presente invención presentan una estabilidad excelente tanto a 4°C como a temperatura ambiente (RT), por ejemplo, 20 ó 25°C. Particularmente, la formulación de ADN plasmídico es útil durante un periodo de tiempo prolongado de 1 mes, 2 meses, 3 meses, a 6 meses y hasta 12 meses a 4°C y a 25°C, por ejemplo, TA.

20 La presente invención se refiere, por lo tanto, a una composición que comprende ADN plasmídico, una disolución tampón y un excipiente salino, en la que la disolución tampón está presente a una concentración suficiente para preservar el ADN plasmídico en una forma estable a 4°C a 25°C.

25 La presente invención también se refiere a una composición que comprende ADN plasmídico, una disolución tampón y un excipiente salino, en la que la disolución tampón está presente a una concentración suficiente para preservar el ADN plasmídico en una forma estable a 4°C a 25°C durante un periodo de tiempo prolongado de 1 mes, 2 meses, 3 meses, a 6 meses, y hasta 12 meses.

30 En efecto, los ADN plasmídicos que se almacenan a 5°C o a temperatura ambiente durante un periodo largo de tiempo presentan velocidades bajas de despurinación y de circularización abierta, inferiores a 20%, 15%, 10%, 5%, o $\leq 1\%$ por mes.

La composición según la presente invención puede comprender además un adyuvante, tal como por ejemplo un polímero seleccionado entre polietilén glicol, un plurónico o un azúcar polisorbato o alcohol.

35 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preservar ADN plasmídico en una composición que comprende a) preparar una muestra purificada de ADN plasmídico y b) combinar dicha muestra purificada de ADN plasmídico con un excipiente salino y una disolución tampón que mantiene el pH de la composición resultante entre 7 y 7,5.

40 La presente invención también se refiere a un método para preservar ADN plasmídico en una composición a una temperatura de hasta aproximadamente 20°C, que comprende a) preparar una muestra purificada de ADN plasmídico, b) combinar la muestra purificada de ADN plasmídico con un excipiente salino y una disolución tampón en la que la disolución tampón está presente a una concentración de menos de 1mM, o entre 250 μM y 1mM, y preferiblemente 400 μM ; y c) almacenar la composición de ADN plasmídico a una temperatura de aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 20°C.

Ejemplos

Técnicas generales de clonación y de biología molecular

45 Los métodos tradicionales de biología molecular, tales como digestión con enzimas de restricción, electroforesis en gel, transformación en *E. coli*, precipitación de ácidos nucleicos y similares, están descritos en la bibliografía (Maniatis et al., T., E.F. Fritsch, y J. Sambrook, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; Ausubel F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman y K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Willey and Sons, Nueva York.). Las secuencias de nucleótidos se determinaron mediante el método de terminación de la cadena según el protocolo publicado previamente (Ausubel et al., 1987).

Las enzimas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs, Beverly, MA (Biolabs).

Para llevar a cabo las ligaciones, los fragmentos de ADN se incuban en un tampón que comprende 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM ATP en presencia de la ADN ligasa del fago T4 (Biolabs).

5 Los oligonucleótidos se sintetizaron utilizando química de fosoramidita con las fosoramiditas protegidas en la posición β mediante un grupo cianoetilo (Sinha, N.D., J. Biernat, J. McManus y H. Köster, 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis, XVIII: Use of β-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of ADN fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. Nucl. Acids Res., 12, 4539-4557: Giles, J. W. 1985. Advances in automated ADN synthesis. Am. Biotechnol., Nov./Dic.) con un sintetizador automático de ADN Biosearch 8600 utilizando las recomendaciones del fabricante.

10 Los ADN ligados o los ADN que se van a ensayar para determinar su eficacia de transformación se utilizan para transformar la cepa siguiente que se ha hecho competente:

E. coli DH5α[F/endlA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, Φ80dlac (lacZΔM15)] (para cualquier plásmido Col E1); o

E. coli XAC-pir (para cualquier plásmido derivado de pCor).

Las minipreparaciones de ADN plasmídico se realizan según el protocolo de Klein et al., 1980.

15 El medio de cultivo LB se utiliza para crecer las cepas de *E. coli* (Maniatis et al., 1982). Las cepas se incuban a 37°C. Las bacterias se plaquean en placas de medio LB suplementado con antibióticos adecuados.

Ejemplo 1

20 El ajuste de los diámetros a las velocidades de flujo utilizadas se hace según el cálculo de los números de Reynolds en serpentines del sistema de lisis continuo. Debido a que el análisis siguiente asume que el comportamiento de los fluidos es Newtoniano, las figuras mostradas más adelante son sólo completamente válidas en B1a y en parte en B2.

El valor del número de Reynolds permite al experto en la técnica especificar el tipo de comportamiento que se produce. Aquí, sólo nos ocuparemos del flujo de fluido en un tubo (ingeniería hidráulica).

1) Fluido No Newtoniano

25 Los dos tipos de fluidos no Newtonianos que aparecen más comúnmente en la industria son Bingham y Ostwald de Waele.

En este caso, el número de Reynolds (Re) se calcula como sigue:

Re_N es el número de Reynolds generalizado

$$Re_N = (1 / (2^{-n})) \times (n / 3n + 1)^n \times ((\rho \times D^n \times w^{2-n}) / m) \quad (1)$$

D: diámetro interno de la sección transversal (m)

30 P: masa volumétrica del fluido (kg/m³)

w: velocidad espacial del fluido (m/s)

n: índice del comportamiento del fluido (sin dimensión)

m: coeficiente de la consistencia del fluido (dyn . sⁿ / cm²)

Y n y m se determinan empíricamente (estudio del comportamiento reológico).

35 2) Fluido Newtoniano

Como en la primera sección, en la Ecuación (1) tenemos:

Re = f(diámetro interno, μ, ρ, y u) porque n y m son funciones de μ.

$$Re = (u \times D \times \rho) / \mu \quad (2)$$

P: Masa volumétrica del fluido (kg/m³)

40 μ: Viscosidad del fluido (Pa.s, y 1 mPa.s = 1 cP)

D: diámetro interno de la sección transversal (m)

u: velocidad espacial media del fluido (m/s)

La Ecuación (1), para n=1, se reduce a la Ecuación (2).

Con Q = velocidad de flujo (m³/h) y S = área superficial de la sección transversal (m²) y si μ se da en cP, entonces:

$$Re = (4 \times (Q/3600) \times \rho) / ((\mu/1000) \times \Pi \times D) \quad (3)$$

- 5 En un conducto circular, el flujo es laminar para un número de Reynolds por debajo de 2.500, y es flujo turbulento suave hidráulicamente para un número de Reynolds entre 2.000 y 500.000. El límite es deliberadamente vago entre 2.000 y 2.500, cuando se utilizan ambos tipos de comportamiento para determinar qué puede ocurrir y la elección se realiza a posteriori.

3) Cálculos

- 10 Como n y m generalmente no se conocen, se han utilizado las aproximaciones siguientes para estimar las tendencias:

Fluido Newtoniano (en todas las secciones transversales)

ρ = 1.000 kg/m³ (para todos los fluidos)

μ = 5 cP en B1a y 40 cP en B1b (nuestros datos)

2,5 cP en B2 (nuestros datos)

- 15 Los cálculos siguientes se realizaron utilizando la Ecuación (3) para dos configuraciones de tubos estándar ensayadas denominadas configuración 1 y configuración 2 (sin tubo B1b):

Tabla 2

Serpentín	Configuración 1		Configuración 2	
	B1a	B2	B1a	B2
Viscosidad * (cP)	5	2,5	5	2,5
Diámetro (mm)	12,7	9,5	6	6
Velocidad de flujo (L/h)	60	105	12	21
Número de Reynolds	334	1564	141	495
Proceso	laminar	laminar	laminar	laminar

- 20 En estas dos configuraciones, los flujos son laminares en todas las etapas y las disoluciones no se mezclan adecuadamente entre sí.

Para otras configuraciones de tubos (sin tubo B1b), tenemos:

Tabla 3

Serpentín	Alta velocidad/diámetro std		Alta velocidad/16 mm ID		Velocidad elevada/ 6 mm ID	
	B1a	B2	B1a	B2	B1a	B2
Viscosidad * (cP)	5	2,5	5	2,5	5	2,5
Diámetro (mm)	12	10	16	16	6	6
Velocidad de flujo (L/h)	120	210	120	210	120	210
Número de Reynolds	707	2971	531	1857	1415	4951
Proceso	laminar	turbulento	laminar	laminar	laminar	turbulento

Se realizaron cálculos similares utilizando la Ecuación (3) para varias configuraciones de tubos estando presentes los tubos B1a y B1b:

Tabla 4

Serpentín	Alta velocidad			Alta velocidad/agitación máx		
	B1a	B1b	B2	B1a	B1a	B1a
Viscosidad * (cP)	5	5	2,5	5	5	5
Diámetro (mm)	6	16	6	3	2	3
Velocidad de flujo (L/h)	120	120	210	120	120	160
Número de Reynolds	1415	531	4951	2829	4244	3773
Proceso	laminar	laminar	turbulento	turbulento	turbulento	turbulento

5 Claramente, se pueden obtener valores de Reynolds predefinidos ajustando los diámetros de los tubos y las velocidades de flujo.

Un experto en la técnica puede prever muchas combinaciones de diámetros y longitudes para B2 o para las dos secciones de B1 (B1a y B1b). Por ejemplo, la primera sección de B1 puede reducirse de 6 mm a 3 mm con el fin de reducir la longitud y de incrementar la agitación. Adicionalmente, n y m pueden determinarse a partir del estudio del comportamiento reológico de los fluidos y utilizarse para determinar las características correctas de los tubos.

Además de la eficacia de la agitación, también se puede considerar la duración de la agitación, que en algunas realizaciones de la presente invención se obtiene ajustando la longitud de los serpentines.

15 El diámetro de los tubos o la velocidad del fluido no parecen dominar en la Ecuación (1) para un fluido no Newtoniano (datos no mostrados). En otras palabras, no parece ser más eficaz alterar el diámetro que alterar la velocidad de flujo si se utiliza la ecuación (1) para los cálculos en B1b y en B2. Cuando se desean velocidades de flujo altas, el diámetro puede variarse junto con la velocidad de flujo.

Estos principios pueden utilizarse como base para limitar la agitación tanto como sea posible en B1b y B2 con el fin de evitar la fragmentación del ADNg.

20 Durante la lisis, la agitación puede ser bastante vigorosa siempre que el ADNg no se desnaturalice. La reducción del diámetro al comienzo de B1 hace posible el incremento de la agitación (Re incrementado) con el fin de mezclar suficientemente la disolución 2 con las células. Por otra parte, cuando las células se lisan, pueden reducirse la agitación y las fuerzas de fricción contra la pared para evitar la fragmentación de los ácidos nucleicos. El incremento del diámetro hace posible la reducción de la agitación (Re disminuido) y de la fricción (velocidad menor).

M1: mezclado de los fluidos.

25 B1a: sintonización precisa del mezclado al comienzo de la lisis: fenómeno de convección (macromezclado).

B1b: dejar que se produzca la desnaturalización más fenómeno de difusión (micromezclado).

Se asume que el número de Reynolds generalizado tiene el mismo significado para un fluido no Newtoniano que el número de Reynolds clásico tiene para un fluido Newtoniano. En particular, se asume que el límite para el régimen laminar en un conducto con sección transversal circular es $Re_N < 2.300$.

30 La neutralización se realiza en B2. Las velocidades altas de flujo tienden a incrementar la fragmentación del ADN genómico mediante la producción de una agitación demasiado vigorosa y mediante fuerzas de fricción en la pared (estrés mecánicos). La utilización de un tubo con un diámetro grande hace posible reducir la agitación (Re) y las fuerzas de fricción (velocidad). Pusimos aquí un tubo con un diámetro pequeño (6 mm) para evitar una agitación insuficiente. Nuestras observaciones muestran que es mejor tener sólo un tubo con diámetro pequeño para B2, con el fin de agitar "violentamente y rápidamente" el lisado neutralizado.

Ejemplo 2

Se puede dividir el sistema CL en 5 etapas. En una realización particular, la configuración es como sigue:

1) Mezclado: células (en la disolución 1) + disolución 2 (M1 + 3 m de tubo de 6 mm). Comienzo de la lisis de las células con SDS, no existe riesgo de fragmentación del ADN siempre que no se desnaturalice.

2) Final de la lisis y desnaturalización del ADNg (13 m de tubo de 16 mm).

3) Mezclado: Lisado + disolución 3 (M2 + 3 m de tubo de 6 mm).

5 4) Recogida del lisado neutralizado a 4°C

5) Sedimentación de flóculos y grandes fragmentos de ADNg toda la noche a 4°C.

Las condiciones siguientes pueden utilizarse para llevar a cabo la lisis continua:

- Disolución 1 : EDTA 10 mM, glucosa (Glc) 9 g/l y Tris HCl 25 mM, pH 7,2.

- Disolución 2: SDS 1 % y NaOH 0,2 N.

10 • Disolución 3: Ácido acético 2 M y acetato de potasio 3M.

- Velocidad de flujo 60 l/h: Disolución 1 y disolución 2

- Velocidad de flujo 90 l/h: Disolución 3.

- Células ajustadas a 38,5 g/l con la disolución 1.

15 Las células en la disolución 1 pasan a través de 3 toberas que las dispersan en la disolución 2, que llega desde la dirección opuesta.

- El mezclador M1 tiene una geometría que hace posible optimizar el mezclado de los dos fluidos (véase la Figura 2, dibujo esquemático del mezclador).

- La primera sección del tubo después del mezclador M1 es B1a y la siguiente sección es B1b.

B1a: 3 m de longitud, 6 mm de diámetro, 2,5 s de tiempo de residencia

20 B1b: 13 m de longitud, 16 mm de diámetro, 77 s de tiempo de residencia

El proceso de la presente invención proporciona una ventaja en términos de eficacia, resumidos como: dispersión, mezclado breve violento, y mezclado suave por difusión.

Utilizando el proceso de la presente invención, se incrementa el número de células lisadas y por lo tanto se incrementa la cantidad de ADNp recuperada.

25 La idea de la difusión es especialmente importante por la dificultad de mezclar estos fluidos debido a sus propiedades, en particular la viscoelasticidad.

El proceso de la presente invención hace posible limitar el esfuerzo de cizalla y por lo tanto limitar la fragmentación del ADNg, lo que facilita su eliminación durante la purificación cromatográfica posterior.

30 El problema es el mezclado con la disolución 3, que puede enfriarse hasta 4°C. En una realización, el proceso de la invención utiliza:

- Mezclador M2, que es una Y con un diámetro interno de aproximadamente 10 mm

- La sección del tubo B2 situado después del mezclador M2.

B2: 2 m de tubo de 6 mm; tiempo de residencia: 1 s

35 La Tabla 5 siguiente proporciona los resultados obtenidos en ensayos comparativos para mostrar las ventajas de nuestro proceso de lisis continua comparado con la lisis discontinua.

Tabla 5

	Proporción ADNg/ADNp en el lisado	Cantidad de plásmido extraída por g de célula (mg/g)
Lisis discontinua	16,9	1,4
Lisis continua con sistema CL descrito en el ejemplo 1	1,6	1,9

Ejemplo 3

5 La columna utilizada es una columna HiTrap de 1 ml activada con NHS (N-hidroxisuccinimida, Pharmacia) conectada a una bomba peristáltica (salida < 1 ml/min. El oligonucleótido específico utilizado tiene un grupo NH₂ en el extremo 5' y su secuencia es como sigue:

5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 1)

Los tampones utilizados en este ejemplo son los siguientes:

Tampón de acoplamiento: 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3.

10 Tampón A: 0,5 M etanolamina, 0,5 M NaCl, pH 8,3.

Tampón B: 0,1 M acetato, 0,5 M NaCl, pH 4.

15 La columna se lava con 6 ml de 1 mM HCl, y el oligonucleótido diluido en el tampón de acoplamiento (50 nmoles en 1 ml) se aplica a la columna y se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente. La columna se lava tres veces sucesivamente con 6 ml de tampón A y después con 6 ml de tampón B. El oligonucleótido se une así covalentemente a la columna mediante una conexión CONH. La columna se almacena a 4°C en PBS, 0,1 % NaN₃, y puede utilizarse al menos cuatro veces.

Se sintetizaron los dos oligonucleótidos siguientes: oligonucleótido 4817:

5'-GATCCGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA

GAAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 13) y oligonucleótido 4818 5'-AATTCCTTCTT

20 CTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTG-3' (SEQ ID NO: 14)

Estos oligonucleótidos cuando se hibridan y clonan en un plásmido, introducen una secuencia homopurina-homopirimidina (GAA)₁₇ (SEQ ID NO: 15) en el plásmido correspondiente, como se ha descrito anteriormente.

25 La secuencia correspondiente a estos dos oligonucleótidos hibridados se clonó en el sitio de clonación múltiple del plásmido pBKS+ (Stratagene Cloning System, La Jolla CA), que porta un gen de resistencia a ampicilina. Para este fin, los oligonucleótidos se hibridan de la manera siguiente: un µg de estos dos oligonucleótidos se ponen juntos en 40 ml de un tampón final que comprende 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂. Esta mezcla se calienta a 95°C y se pone a temperatura ambiente de manera que la temperatura disminuye lentamente. Diez ng de la mezcla de oligonucleótidos hibridados se ligan con 200 ng de plásmido pBKS+ (Stratagene Cloning System, La Jolla CA) digerido con BamHI y EcoRI en 30 µl finales. Después de la ligación, se transforma una alícuota en DH5a. Las mezclas de transformación se plaquean en medio L suplementado con ampicilina (50 mg/l) y X-gal (20 mg/l). Los clones recombinantes deberían mostrar una ausencia de coloración azul en este medio, al contrario que el plásmido parental (pBKS+) que permite la complementación α del fragmento ω de B-galactosidasa de E. coli. Después de la minipreparación del ADN plasmídico a partir de 6 clones, todos mostraron la desaparición del sitio PstI localizado entre los sitios EcoRI y BamHI de pBKS+, y un incremento del peso molecular de la banda de PvuII de 448-pb que contiene el sitio de clonación múltiple. Se selecciona un clon y el plásmido correspondiente se denomina pXL2563. La secuencia clonada se verifica secuenciando utilizando el cebador -20 (5'-TGACCGGCAGCAAATG-3' (SEQ ID NO: 16)) (Viera J. y J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene, 19, 259-268) para el plásmido pBKS+ (Stratagene Cloning System, La Jolla CA). El plásmido pXL2563 se purifica según el kit Wizard Megaprep (Promega Corp. Madison, WI) según las recomendaciones del proveedor. Esta preparación de ADN plasmídico se utiliza en los ejemplos descritos más adelante.

El plásmido pXL2563 se purifica en la columna HiTrap acoplada al oligonucleótido, descrito en 1.1., a partir de una disolución que también contiene el plásmido pBKS+.

Los tampones utilizados en esta purificación son los siguientes:

Tampón F: 2 M NaCl, 0,2 M acetato, pH 4,5 a 5.

Tampón E: 1 M Tris-HCl, pH 9, 0,5 mM EDTA.

5 La columna se lava con 6 ml de tampón F, y los plásmidos (20 µg de pXL2563 y 20 µg de pBKS+ en 400 µl de tampón F) se aplican a la columna y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. La columna se lava con 10 ml de tampón F y la elución se realiza con el tampón E. Los plásmidos se detectan después de electroforesis en gel de agarosa al 1 % y tinción con bromuro de etidio. La proporción de los plásmidos en la disolución se estima midiendo su actividad transformante en E. coli.

10 Comenzando con una mezcla que contiene 30 % de pXL2563 y 70 % de pBKS+, se recupera una disolución que contiene 100 % de pXL2563 a la salida de la columna. La pureza, estimada por la proporción de DO a 260 y 280 nm se incrementa de 1,9 a 2,5, lo que indica que mediante este método se han eliminado las proteínas contaminantes.

Ejemplo 4

15 El acoplamiento del oligonucleótido (5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 1)) a la columna se realiza como se describe en el Ejemplo 3. Para el acoplamiento, el oligonucleótido se modifica en el extremo 5' con un grupo amino unido al fosfato del espaciador por un brazo que contiene 6 átomos de carbono (Modified oligonucleotide Eurogentec SA, Bélgica). El plásmido pXL2563 se purifica utilizando el kit Wizard Megaprep (Promega Corp. Madison, WI) según las recomendaciones del proveedor. Los tampones utilizados en este ejemplo son los siguientes:

Tampón F: 0-2 M NaCl, 0,2 M acetato, pH 4,5 a 5.

Tampón E: 1 M Tris-HCl pH 9, 0,5 mM EDTA.

20 La columna se lava con 6 ml del tampón F, y 100 µg del plásmido pXL2563 diluidos en 400 µl de tampón F se aplican a la columna y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. La columna se lava con 10 ml de tampón F y la elución se realiza con el tampón E. El plásmido se cuantifica determinando la densidad óptica a 260 nm.

25 En este ejemplo, la unión se realiza en un tampón cuya molaridad respecto a NaCl varía de 0 a 2 M (tampón F). El rendimiento de la purificación disminuye al disminuir la molaridad de NaCl. El pH del tampón de unión puede variar de 4,5 a 5, siendo el rendimiento de la purificación mayor a 4,5. También es posible utilizar otro tampón de elución de pH básico: la elución se realiza entonces con un tampón que comprende 50 mM borato, pH 9, 0,5 mM EDTA.

El acoplamiento del oligonucleótido (5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 1) a la columna se realiza como se describe en el Ejemplo 3. El plásmido pXL2563 se purifica utilizando el kit Wizard Megaprep (Promega Corp. Madison, WI) según las recomendaciones del proveedor. Los tampones utilizados en este ejemplo son los siguientes:

Tampón F: 0,1 M NaCl, 0,2 M acetato, pH 5.

30 Tampón E: 1 M Tris-HCl pH 9, 0,5 mM EDTA.

35 La columna se lava con 6 ml del tampón F, y 100 µg del plásmido pXL2563 diluidos en 400 µl de tampón F se aplican a la columna y se incuba durante una hora a temperatura ambiente. La columna se lava con 10 ml de tampón F y la elución se realiza con el tampón E. Se determina el contenido de ADN genómico o cromosómico de E. coli presente en las muestras de plásmido antes y después de pasar a través de la columna con el oligonucleótido. Este ADN genómico se cuantifica mediante PCR utilizando cebadores en el gen galK de E. coli. Según el protocolo siguiente: La secuencia de estos cebadores la describen Debouck et al. (Nucleic Acids Res. 1985, 13, 1841-1853):

5'-CCG AAT TCT GGG GAC CAA AGC AGT TTC-3' (SEQ ID NO: 17)

y 5'-CCA AGC TTC ACT GTT CAC GAC GGG TGT-3' (SEQ ID NO: 18).

40 El medio de reacción comprende, en 25 µl de tampón de PCR (Promega France, Charbonnières): MgCl₂ 1,5 mM; dXTP 0,2 mM (Pharmacia, Orsay); cebador 0,5 µM; 20 U/ml de polimerasa Taq (Promega). La reacción se realiza según la secuencia:

- 5 min a 95°C

- 30 ciclos de 10 s a 95°C

30 s a 60°C

45 1 min a 78°C

- 10 min a 78°C.

El fragmento de ADN amplificado de 124 pares de bases de longitud se separa mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % en presencia de SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene, EEUU), y se cuantifica por referencia con una serie de ADN genómico Ultrapur de la cepa B de *E. coli* (Sigma, ref D4889).

Ejemplo 5

5 Este ejemplo describe la purificación de ADN plasmídico a partir de un lisado aclarado de un cultivo bacteriano, en la denominada escala "miniprep": se centrifugan 1,5 ml de un cultivo de toda la noche de cepas DH5 α que contienen el plásmido pXL2563 y el sedimento se resuspende en 100 μ l de 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA. Se añaden 200 μ l de NaOH 0,2 M, SDS al 1 %, se invierten los tubos para mezclar, a continuación se añaden 150 μ l de acetato de potasio 3 M pH 5 y los tubos se invierten para mezclar. Después de centrifugar, se recupera el sobrenadante y se carga en la columna del oligonucleótido obtenida como se describe en el Ejemplo 1. La unión, lavados y elución son idénticos a los descritos en el Ejemplo 3. Se recupera aproximadamente 1 μ g de plásmido a partir de 1,5 ml de cultivo. El plásmido obtenido, analizado mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, forma una única banda de ADN circular "superenrollado". No se detecta ninguna traza de ADN o ARN de alto peso molecular (cromosómico) en el plásmido purificado mediante este método.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe un experimento de purificación de ADN plasmídico realizado en las mismas condiciones que en el Ejemplo 5, comenzando a partir de 20 ml de cultivo bacteriano de cepas DH5 α que contienen el plásmido pXL2563. El sedimento celular se resuspende en 1,5 ml de 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA. La lisis se realiza con 2 ml de 0,2 M NaOH, 1 % SDS, y la neutralización con 1,5 ml de 3 M acetato de potasio, pH 5. El ADN se precipita con 3 ml de 2-propanol, y el sedimento se resuspende en 0,5 ml de 0,2 M de acetato de sodio, pH 5, 0,1 M NaCl y se carga en la columna de oligonucleótido obtenida como se describe en el Ejemplo anterior. La unión, lavado de la columna y elución se realizan como se describe en el Ejemplo anterior, excepto en el tampón de lavado, cuya molaridad respecto a NaCl es 0,1M. El plásmido obtenido, analizado mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, forma una única banda de ADN circular "superenrollado". No se detecta ninguna traza de ADN o ARN de alto peso molecular (cromosómico) en el plásmido purificado. La digestión del plásmido con una enzima de restricción proporciona una única banda en el peso molecular esperado de 3 kilobases. El plásmido contiene un casete que contiene el promotor de citomegalovirus, el gen que codifica la luciferasa y la secuencia homopurina-homopirimidina (GAA)₁₇ (SEQ ID NO: 15) que se origina a partir del plásmido pXL2563. La cepa DH1 (Maniatis et al., 1989) que contiene este plásmido se cultiva en un fermentador de 7 litros. Se prepara un lisado aclarado a partir de 200 gramos de células: el sedimento celular se resuspende en 2 litros de 25 mM Tris, pH 6,8, 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, a los que se añaden 2 litros de 0,2 M NaOH, 1 % SDS. El lisado se neutraliza mediante la adición de un litro de 3M acetato de potasio. Después de la diafiltración, se aplican 4 ml de este lisado a una columna HiTrap-NHS de 5 ml acoplada al oligonucleótido de secuencia 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 1), según el método descrito en el Ejemplo 3. El lavado y la elución se realizan como se describe en el Ejemplo anterior.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la utilización de un oligonucleótido que presenta citosinas metiladas. La secuencia del oligonucleótido utilizado es como sigue:

5' -GAGG^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CTT^{Me}CCT^{Me}CTT^{Me}CTT-3' (SEQ ID NO: 19)

Este oligonucleótido tiene un grupo NH₂ en el extremo 5' terminal. ^{Me}C = 5-metilcitosina. Este oligonucleótido permite purificar el plásmido pXL2563 en las condiciones del Ejemplo 1 con un tampón de unión de pH 5 (de esta manera se disminuye el riesgo de degradación del plásmido).

Ejemplo 8

En los ejemplos anteriores, el oligonucleótido utilizado está modificado en el extremo 5' terminal con un grupo amino unido al fosfato mediante un brazo que contiene 6 átomos de carbono: NH₂-(CH₂)₆. En este ejemplo, el grupo amino está unido al fosfato del extremo 5' terminal mediante un brazo que contiene 12 átomos de carbono: NH₂-(CH₂)₁₂. El acoplamiento del oligonucleótido y el paso a través de la columna se realizan como se describe en el Ejemplo 3 con un tampón F: NaCl 2 M, acetato 0,2 M, pH 4,5. Este oligonucleótido permite obtener rendimientos de purificación mejores: se obtiene un rendimiento del 53 % mientras con el oligonucleótido que contiene 6 átomos de carbono, este rendimiento es del orden del 45 % en las mismas condiciones.

Ejemplo 9

Siguiendo la estrategia de clonación descrita en el Ejemplo 3, se construyen otros dos plásmidos que portan secuencias homopurina-homopirimidina: el plásmido pXL2725 que contiene la secuencia (GGA)₁₆, (SEQ ID NO: 20) y el plásmido pXL2726 que contiene la secuencia (GA)₂₅ (SEQ ID NO: 21).

Los plásmidos pXL2725 y pXL2726, análogos al plásmido pXL2563, se construyen según la estrategia de clonación descrita en el Ejemplo 3, utilizando los pares de oligonucleótidos siguientes:

5986:	5'-GATCC(GA) ₂₅ GGG-3' (SEQ ID NO: 22)
5987:	5'-AATTCCC(TC) ₂₅ G-3' (SEQ ID NO: 23)
5981:	5'-GATCC(GGA) ₁₇ GG-3' (SEQ ID NO: 24)
5982:	5'-AATT(CCT) ₁₇ CCG-3' (SEQ ID NO: 25)

5 La pareja de oligonucleótidos 5986 y 5987 se utiliza para construir el plásmido pXL2726 clonando los oligonucleótidos en los sitios BamHI y EcoRI de pBKS+ (Stratagene Cloning System, La Jolla CA), mientras que los oligonucleótidos 5981 y 5982 se utilizan para la construcción del plásmido pXL2725. Se utilizan las mismas condiciones experimentales que para la construcción del plásmido pXL2563, y sólo se cambian las parejas de oligonucleótidos. De manera similar, se verifican las secuencias clonadas mediante secuenciación en los plásmidos. Esto permite observar que el plásmido pXL2725 tiene una modificación respecto a la secuencia esperada: en lugar de la secuencia GGA repetida 17 veces, está GGAGA(GGA)₁₅ (SEQ ID NO: 26).

Ejemplo 10

15 Los oligonucleótidos que forman hélices triples con estas secuencias de homopurina se acoplan a las columnas HiTrap según la técnica descrita en el Ejemplo 1.1. El oligonucleótido de secuencia 5'-AATGCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT-3' (SEQ ID NO: 27) se utilizó para la purificación del plásmido pXL2725, y el oligonucleótido de secuencia 5'-AGTGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT-3' (SEQ ID NO: 28) se utiliza para la purificación del plásmido pXL2726.

Las dos columnas obtenidas de esta manera permiten purificar los plásmidos correspondientes según la técnica descrita en el Ejemplo 2, con los tampones siguientes:

Tampón F: NaCl 2 M, acetato 0,2 M, pH 4,5.

Tampón E: 1 M Tris-HCl, pH 9, 0,5 mM EDTA.

20 Los rendimientos obtenidos son 23 % y 31 % para pXL2725 y pXL2726, respectivamente.

Ejemplo 11

Este ejemplo ilustra la influencia de la longitud de la secuencia específica presente en el plásmido en los rendimientos de la purificación.

25 El gen informador utilizado en estos experimentos para demostrar la actividad de las composiciones de la invención es el gen que codifica la luciferasa (Luc).

El plásmido pXL2621 contiene una casete que contiene el promotor de 661-pb del citomegalovirus (CMV) clonado en posición 5' respecto al gen que codifica la luciferasa, en los sitios MluI y HindIII, en el vector pGL Vector básico (Promega Corp., Madison, WI). Este plásmido se construye utilizando técnicas estándar de biología molecular.

Los plásmidos pXL2727-1 y pXL2727-2 se construyen de la manera siguiente:

30 Dos microgramos del plásmido pXL2621 se linearizaron con BamHI; la enzima se inactivó mediante tratamiento durante 10 min a 65°C; simultáneamente, los oligonucleótidos 6006 y 6008 se hibridan como se describe para la construcción del plásmido pXL2563.

6006: 5'-GATCT(GAA)₁₇CTGCAGATCT-3' (SEQ ID NO: 29)

6008: 5'-GATCAGATCTGCAG(TTC)₁₇A-3' (SEQ ID NO: 30).

35 Esta mezcla de hibridación se clona en los extremos BamHI del plásmido pXL2621 y, después de transformación en DH5α, se identifican los clones recombinantes mediante análisis de restricción enzimática con PstI debido a que los oligonucleótidos introducen un sitio PstI. Se seleccionan dos clones y la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado se verifica utilizando el cebador (6282, 5'-ACAGTCATAAGTGC GCGACG-3' (SEQ ID NO: 31)) como cebador de la reacción de secuenciación (Viera J. y J. Messing, 1982). The pUC plasmids an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. (Gene 19:259-268).

40 El primer clon (pXL2727-1) contiene la secuencia GAA repetida 10 veces. El segundo (pXL2727-2) contiene la secuencia 5'-GAAGAAGAG(GAA)₇GGAAGAGAA-3' (SEQ ID NO: 32).

Se utiliza una columna tal como la descrita en el Ejemplo 3, y que está acoplada al oligonucleótido 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID NO: 1).

El plásmido pXL2727-1 tiene 14 repeticiones de la secuencia GAA. El oligonucleótido descrito anteriormente, que contiene sólo 7 repeticiones de la secuencia de hibridación correspondiente CTT, puede hibridar así con el plásmido en 8 posiciones diferentes. El plásmido pXL2727-2, por el contrario, tiene una secuencia de hibridación (GAA)₇ (SEQ ID NO: 36) de la misma longitud que la del oligonucleótido unido a la columna. Este oligonucleótido puede hibridar así sólo en una posición en pXL2727-2.

El experimento es idéntico al descrito en el Ejemplo 4, con los tampones siguientes:

Tampón F: NaCl 2 M, acetato 0,2 M, pH 4,5.

Tampón E: 1 M Tris-HCl, pH 9, 0,5 mM EDTA.

El rendimiento de la purificación es 29 % con el plásmido pXL2727-1 y 19 % con pXL2727-2.

Las células utilizadas son células NIH 3T3, inoculadas el día anterior al experimento en placas de cultivo de 24 pocillos con 50.000 células/pocillo. El plásmido se diluye en 150 mM NaCl y se mezcla con el lipofectante RPR115335. Se utiliza una proporción de cargas positivas de lipofectante/cargas negativas de ADN igual a 6. La mezcla se agita en un vortex, se deja durante 10 minutos a temperatura ambiente, se diluye en medio sin suero fetal de ternera y a continuación se añade a las células en la proporción de 1 µg de ADN por pocillo de cultivo. Después de dos horas a 37°C, se añade 10 % volumen/volumen de suero fetal de ternera y las células se incuban durante 48 horas a 37°C en presencia de 5 % de CO₂. Las células se lavan dos veces con PBS y se determina la actividad luciferasa según el protocolo descrito (kit de Promega, Promega Corp. Madison, WI) en un luminómetro Lumat LB9501 (EG y G Berthold, Evry). El plásmido pXL2727-1, purificado como se describe en el Ejemplo 8.2, proporciona unos rendimientos en la transfección dos veces mayores que los obtenidos con el mismo plásmido purificado utilizando el kit Wizard Megaprep (Promega Corp. Madison, WI).

Ejemplo 12

El ejemplo siguiente demuestra la purificación de plásmidos derivados de pCOR utilizando cromatografía de afinidad de triple hélice. Se ha mostrado que esta tecnología elimina ácidos nucleicos contaminantes (particularmente ADN genómico y ARN de la célula anfitriona) hasta niveles que no se han conseguido alcanzar con métodos cromatográficos convencionales.

Se sintetiza un gel de afinidad de tríplex con Sephacryl S-1000 SF (Amersham-Pharmacia Biotech) como matriz cromatográfica. Sephacryl S-1000 se activa en primer lugar con m-peryodato de sodio (3 mM, temperatura ambiente, 1 h) en 0,2 M acetato de sodio (pH 4,7). Después, el oligonucleótido se acopla mediante su resto 5'-NH₂ terminal a grupos aldehído de la matriz activada mediante aminación reductora en presencia de ácido ascórbico (5 mM) como se ha descrito previamente para el acoplamiento de proteínas (Hornsey et al., J. Immunol. Methods, 1986, 93, 83-88). El oligonucleótido homopirimidina utilizado en estos experimentos (de Eurogentec, purificado mediante HPLC) tenía una secuencia que es complementaria a una secuencia de homopurina corta de 14-mer (5'-AAGAAAAAAAAGAA-3') (SEQ ID NO: 10) presente en el origen de replicación (ori) del plásmido pCOR (Soubrier et al., Gene Therapy, 1999, 6, 1482-1488). Como se ha discutido anteriormente, la secuencia del oligonucleótido homopirimidina es 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 11).

Se cromatografían los plásmidos siguientes: pXL3296 (pCOR sin transgén, 2,0 kpb), pXL3179 (pCOR-FGF, 2,4 kpb), pXL3579 (pCOR- VEGFB, 2,5 kpb), pXL3678 (pCOR-AFP, 3,7 kpb), pXL3227 (pCOR-lacZ 5,4 kpb) y pXL3397 (pCOR-Bdeletad FVIII, 6,6 kpb). Todos estos plásmidos se purifican mediante dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico a partir de lisados aclarados obtenidos como se describe en el Ejemplo 4. También se estudia el plásmido pBKS+ (pBluescript II KS + de Stratagene), un plásmido derivado de ColE1, purificado mediante ultracentrifugación en CsCl. Todos los plásmidos utilizados están en su estado topológico o forma superenrollada (> 95 %).

En cada experimento de purificación de ADN plasmídico, se cargan 300 µg de ADN plasmídico en 6 ml de 2 M NaCl, 0,2 M acetato de potasio (pH 5,0) con una velocidad de flujo de 30 cm/h en una columna de afinidad que contiene el oligonucleótido mencionado anteriormente 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 11). Después de lavar la columna con 5 volúmenes del mismo tampón, el plásmido unido se eluye con 1 M Tris/HCl, 0,5 mM EDTA (pH 9,0) y se cuantifica mediante UV (260 nm) y cromatografía de intercambio iónico con una columna Millipore Gen-Pak (Marquet et al., BioPharm, 1995, 8, 26-37). Las recuperaciones de los plásmidos en la fracción recogida son 207 µg para pXL3296, 196 µg para pXL3179, 192 µg para pXL3579, 139 µg para pXL3678, 97 µg para pXL 3227, y 79 µg para pXL 3397.

No se detectó unión de plásmido (< 3 µg) cuando se cromatografía pBKS en esta columna. Esto indica que el oligonucleótido 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 11) forma estructuras tríplex estables con la secuencia complementaria de 14-mer 5'- AAGAAAAAAAAGAA-3' (SEQ ID NO: 10) presente en pCOR (ori), pero no con la secuencia muy relacionada 5'-AGAAAAAAAAGGA-3' (SEQ ID NO: 8) presente en pBKS. Esto indica que la introducción de una tríada no canónica única (T*GC en este caso) resulta en una desestabilización completa de la estructura tríplex.

Como control, no se observó unión de plásmido (< 1 µg) cuando se cromatografió pXL3179 en una columna blanco sintetizada en condiciones estrictamente similares pero sin oligonucleótido.

5 Realizando esta columna de purificación de afinidad en las condiciones indicadas en la presente memoria, el nivel de contaminación por el ADN genómico del anfitrión se redujo del 2,6 % hasta el 0,07 % para una preparación de pXL3296. De manera similar, el nivel de contaminación por el ADN del anfitrión se reduce del 0,5 % hasta el 0,008 % para una preparación de pXL3179 cuando la muestra se cromatografía mediante la misma columna de afinidad.

Ejemplo 13

10 El ejemplo siguiente demuestra la purificación de plásmidos derivados de ColE1 utilizando cromatografía de afinidad de triple hélice. Se ha mostrado que esta tecnología elimina ácidos nucleicos contaminantes (particularmente ADN genómico y ARN de la célula anfitriona) hasta niveles que no se han conseguido alcanzar con métodos cromatográficos convencionales.

Se sintetiza un gel de afinidad de tríplex acoplado un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) en Sephacryl S-1000 SF oxidado con peryodato como se describe en el Ejemplo anterior.

15 Los plásmidos pXL3296 (pCOR sin transgén) y pBKS, un plásmido derivado de ColE1, se cromatografían en una columna de 1 ml que contiene el oligonucleótido 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) en las condiciones descritas en el Ejemplo 9. Las recuperaciones de los plásmidos en la fracción recogida son 175 µg para pBKS y <1 µg para pXL3296. Esto indica que el oligonucleótido 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) forma estructuras tríplex estables con la secuencia complementaria de 12-mer (5'-AGAAAAAAGGA-3') (SEQ ID NO: 8) presente en pBKS, pero no con la secuencia muy relacionada de 12-mer (5'-AGAAAAAAGA-3') (SEQ ID NO: 34) presente en pCOR. Esto indica que la introducción de una tríada no canónica única (C*AT en este caso) puede resultar en una desestabilización completa de la estructura tríplex.

20

Ejemplo 14

25 Un cultivo de siembra se produce en un matraz Erlenmeyer sin deflectores mediante el método siguiente. El banco de trabajo de células se inocula en un matraz Erlenmeyer que contiene medio M9modG5, en una proporción de siembra de 0,2%v/v. La cepa se cultiva a 220 rpm en un agitador rotatorio a 37° ± 1°C durante aproximadamente 18 ± 2 horas hasta la desaparición de la glucosa. Esto resulta en un cultivo de siembra de 200 ml. Se espera que la densidad óptica del cultivo sea A₆₀₀ aproximadamente 2-3.

30 Se crea un pre-cultivo en un primer fermentador. El cultivo de siembra se transfiere asépticamente a un pre-fermentador que contiene medio M9modG5 para asegurar una proporción de siembra de 0,2% (v/v) y se cultiva con aireación y agitación. La pO₂ se mantiene por encima del 40% de saturación. El cultivo se recoge cuando la glucosa se consume después de 16 horas. Esto resulta en aproximadamente 30 litros de pre-cultivo. Se espera que la densidad óptica del cultivo sea A₆₀₀ aproximadamente 2-3.

35 Se crea un cultivo principal en un segundo fermentador. Se transfieren asépticamente 30 litros de precultivo a un fermentador con 270 litros de medio FmodG2 esterilizado para asegurar una proporción de siembra de aproximadamente el 10% (v/v). El cultivo se comienza en modo discontinuo para formar biomasa. La alimentación con glucosa se inicia una vez que se ha consumido el azúcar inicial después de aproximadamente 4 horas. La aireación, agitación, pO₂ (40%), pH (6,9 ± 0,1), temperatura (37±1°C) y la alimentación de glucosa se controlan con el fin de mantener una velocidad de crecimiento específica cercana a 0,09h⁻¹. El cultivo se termina después de aproximadamente 35 horas de alimentación. Esto resulta en aproximadamente 400 litros de cultivo. Se espera que la densidad óptica del cultivo sea A₆₀₀ aproximadamente 100.

40

Se realiza una primera etapa de separación, que se denomina recogida celular. La biomasa se recoge con una centrífuga de discos. El medio se concentra 3 a 4 veces para eliminar el medio de cultivo restante y se resuspende continuamente en 400 litros de tampón S1 estéril. Esto resulta en aproximadamente 500 litros de biomasa pre-condicionada. DCW = 25 ± 5 g/L.

45 Se realiza una segunda etapa de separación, que se denomina etapa de concentración. Después de la resuspensión/homogeneización en tampón S1, las células se procesan de nuevo con el separador para rendir una suspensión de sólidos concentrada. Esto resulta en aproximadamente 60-80 litros de suspensión de sólidos lavada y concentrada. DCW = 150 ± 30 g/L ; pADN = 300 ± 60 mg/L.

50 Después, se realiza una etapa de congelación. La suspensión de sólidos se distribuye asépticamente en bolsas Flexboy™ de 20 L (llenas hasta el 50% de su capacidad) y posteriormente se congelan a -20° ± 5°C antes del procesamiento adicional. Esto resulta en una biomasa congelada. ADNp = 300 ± 60 mg/L ; forma superenrollada > 95%.

Entonces se realiza una etapa de descongelación celular. Las bolsas congeladas se calientan hasta 20°C y la suspensión celular se diluye hasta 40 g/L, pH 8,0 con 100 mM Tris hidrocloreuro, 10 mM EDTA, 20 mM glucosa y la

suspensión se deja a 20 ± 2 °C durante 1 h con agitación antes de la lisis celular. Esto resulta en una suspensión de sólidos de biomasa descongelada. $\text{pH}=8,0 \pm 0,2$.

Pueden utilizarse temperaturas de aproximadamente 20°C durante esta etapa.

5 Después, se realiza una etapa de lisis alcalina. La etapa de lisis celular está comprendida del bombeo de la suspensión celular diluida a través de un mezclador en línea con una disolución 0,2 N de NaOH-35 mM SDS (disolución S2), seguido de una etapa de contacto continuo en un tubo en serpentín. La etapa de contacto continuo es para asegurar la lisis celular completa y la desnaturalización del ADN genómico y de las proteínas. La disolución de las células lisadas se mezcla en línea con la disolución 3 (S3) helada de 3 M acetato de potasio-2 N ácido acético, antes de recogerla en un recipiente helado agitado. La adición de la disolución S3 resulta en la precipitación de un ADN genómico, ARN, proteínas y KDS.

10 A continuación, se realiza una filtración del lisado. El lisado neutralizado se incuba a 5 ± 3 °C durante 2 a 24 horas sin agitación y se filtra a través de un filtro de rejilla de 3,5 mm para eliminar la mayor parte del material precipitado (fase de flóculo) seguido de una filtración de profundidad como etapa de filtración fina. Esto resulta en un lisado aclarado, con una concentración de plásmido superenrollado de más del 90%.

15 Después, se realiza cromatografía de intercambio aniónico. La disolución del lisado aclarado se diluye con agua purificada hasta un valor de conductividad diana de 50 mS/cm, se filtra a través de un filtro con doble capa ($3 \mu\text{m}$ – $0,8 \mu\text{m}$) y se carga en una columna de cromatografía de intercambio aniónico. Se utiliza una columna de 300 mm empaquetada con 11,0 L de resina Fractogel® TMAE HiCap (M) (Merck; #1.10316.5000). El lisado aclarado se carga en la columna y la elución se realiza utilizando una etapa de gradiente de NaCl. La mayor parte de los contaminantes unidos a la columna se eluyen con una disolución de NaCl a aproximadamente 61 mS/cm, y el ADN plasmídico se eluye con una disolución de NaCl a aproximadamente 72 mS/cm. Esto resulta en un eluato de cromatografía de intercambio iónico que tiene una alta concentración de ADN plasmídico.

20 Después, se realiza una cromatografía de afinidad de tríplex. El eluato de la columna de cromatografía de intercambio aniónico se diluye con aproximadamente 0,5 volúmenes de una disolución 500 mM de acetato de sodio (pH 4,2) que contiene 4,8 M de NaCl y se bombea a través de una columna de cromatografía de afinidad de tríplex equilibrada con 50 mM acetato de sodio (pH 4,5) que contiene 2 M NaCl. La columna tiene un diámetro de 300 mm y contiene 10,0 L de gel THAC Sephacryl™ S-1000 (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ). La columna se lava con una disolución 50 mM acetato de sodio (pH 4,5) que contiene 1 M NaCl y NV1FGF se eluye con 100 mM Tris (pH 9,0) que contiene 0,5 mM EDTA. Esto resulta en un eluato de cromatografía de afinidad de tríplex que tiene una alta concentración de plásmido.

30 A continuación, se realiza una etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica. El eluato de la columna de cromatografía de afinidad se diluye con 3,6 volúmenes de una disolución 3,8 M sulfato de amonio en Tris (pH 8,0). Después de filtrar a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$, el filtrado se carga a 60 cm/h en una columna de interacción hidrofóbica (diámetro 300 mm) empaquetada con 9,0 L de resina Toyopearl® Butil-650S (TosoH corp., Grove City, OH). La columna se lava con una disolución de sulfato de amonio a aproximadamente 240 mS/cm y NV1FGF se eluye con sulfato de amonio a 220 mS/cm. Esto resulta en un eluato de HIC sin formas relajadas.

35 Según una realización preferida, se realiza una etapa adicional de diafiltración. Los materiales de diafiltración estándar disponibles comercialmente son adecuados para utilizarse en este proceso, según las técnicas estándar conocidas en la técnica. Un método de diafiltración preferido es diafiltración utilizando una membrana de ultrafiltración con un punto de corte de peso molecular en el intervalo de 30.000 a 500.000, dependiendo del tamaño del plásmido. Esta etapa de diafiltración permite el intercambio de tampón y se realiza una concentración. El eluato de la etapa 12 se concentra 3 a 4 veces mediante filtración en flujo tangencial (punto de corte de la membrana, 30 kDa) hasta una concentración diana de aproximadamente 2,5 a 3,0 mg/mL y se intercambia el tampón del concentrado por diafiltración a un volumen constante con 10 volúmenes de disolución salina y se ajusta a la concentración de plásmido diana con disolución salina. La concentración de NV1FGF se calcula a partir de la absorbancia a 260 nm de muestras del concentrado. La disolución de NV1FGF se filtra a través de un filtro de cápsula de $0,2 \mu\text{m}$ y se almacena en recipientes en una habitación fría a $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta un procesamiento posterior. Esto rinde un concentrado purificado con una concentración de ADN plasmídico de plásmido superenrollado de aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, y preferiblemente 99%. La recuperación global de plásmido con este proceso es al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, y 80%, con una recuperación media del 60 %.

50 **Ejemplo 15**

El método del Ejemplo anterior que comprende una etapa de cromatografía de intercambio iónico (AEC), una etapa de cromatografía de afinidad de triple hélice (THAC), y una etapa de cromatografía hidrofóbica (HIC) resulta en una preparación de ADN plasmídico más purificada comparada con los métodos conocidos previamente. Este nuevo método se ha comparado con métodos conocidos previamente y ha resultado en preparaciones de ADNp que tienen unas cantidades mucho menores de ADN genómico, ARN, proteínas y endotoxinas. Esto se refleja en la Figura 3. Estos experimentos muestran que AEC, THAC y HIC proporcionan un rendimiento de la purificación sorprendentemente alto comparado con algunas combinaciones de 2 etapas para la eliminación eficaz de todos los contaminantes. La

combinación de estas etapas proporciona una sinergia clara en términos de eficacia en la separación del ADN plasmídico de otros materiales biológicos y contaminantes, tales como proteínas y endotoxinas, ARN y ADN genómico, así como plásmido circular abierto. Además, la combinación sinérgica de las etapas, es decir, AEC/THAC/HIC según la presente invención permite no sólo la obtención de ADN plasmídico altamente purificado de grado farmacéutico sino también de composiciones de ADN plasmídico altamente puras y totalmente superenrolladas de más del 80%, 85%, 90%, 95% y más del 99%.

Ejemplo 16

El método del Ejemplo anterior que comprende una etapa de cromatografía de intercambio iónico, una etapa de cromatografía de afinidad de triple hélice, y una etapa de cromatografía hidrofóbica para la preparación de una preparación de ADN plasmídico altamente purificado se compara con los métodos conocidos previamente. Como se muestra en la Figura 4, el método según la presente invención resulta sorprendentemente en preparaciones de ADNp que tienen unas cantidades mucho menores de ADN genómico, ARN, proteínas y endotoxinas en el intervalo de sub-ppm. Además, como se muestra en la Figura 4, el proceso de la presente invención muestra una calidad del producto obtenido a hasta 10g.

Ejemplo 17

La etapa de diafiltración como se describe en el Ejemplo 14 se realiza según las condiciones siguientes: los tampones para la etapa a y para la etapa b se utilizaron para determinar las mejores condiciones para:

- iii) una primera diafiltración (etapa a) frente a 12,5 a 13,0 volúmenes de 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (denominado tampón I), y
- iv) Realizar una segunda diafiltración del retenido de la etapa a) anterior (etapa b) frente a 3,0 a 3,5 volúmenes de excipiente salino (150 mM NaCl).

Esta etapa de diafiltración alternativa según la presente invención elimina de manera eficaz y extensa el sulfato de amonio y el EDTA. También, posteriormente a estas etapas de diafiltración, se obtiene una concentración diana apropiada de NaCl de aproximadamente 150mM y una concentración final de Tris entre 400 µM y 1 mM. Los ejemplos de composiciones de formulaciones de ADN plasmídico se proporcionan en la Tabla 6 siguiente, y

Tabla 6

Especies	Concentración final		
	1 ^a diafiltración	2 ^a diafiltración	Ingrediente Farmacéutico Activo
Sulfato de amonio	10 µM	< 1 µM	< 1 µM
AEDT	4 µM	< 1 µM	< 1 µM
Tris	50 mM	1,48 mM	740 µM
NaCl	154 mM	154 mM	154 mM

Ejemplo 18

Se fabricó un lote técnico de ADN plasmídico NV1FGF API (ingredientes farmacéuticos activos) denominado LS06 según el Ejemplo 13 con la etapa del proceso de diafiltración descrito en el Ejemplo 17. El eluato se diafiltra en primer lugar a aproximadamente 2 mg de API /mL frente a aproximadamente 13 volúmenes de tampón I y el retenido resultante se diafiltró frente a aproximadamente 3 volúmenes de excipiente salino. El retenido final se filtró entonces a través de un filtro de 0,2 µm y se ajustó a 1 mg/mL. El API final (pH 7,24) se almacenó en una botella de vidrio Duran a +5°C hasta la fabricación de DP.

Se realizó un estudio de estabilidad en muestras de LS06 almacenadas en botellas de vidrio Duran (API) así como en viales de 8 mL utilizados para la fabricación del Producto Farmacéutico. Después de 90 días a +5°C el grado tanto de despurinación como de circularización abierta en todas las muestras fue difícilmente detectable (≤ 0,3 %). Después de 90 días a +25°C las velocidades de despurinación y de circularización abierta de las muestras de LS06 también fueron bastante bajas. Las velocidades de despurinación y de circularización abierta calculadas a partir de este estudio fueron ≤ 1 % por mes (Fig 8).

Este estudio demuestra que el perfil de estabilidad del ADN plasmídico NV1FGF es muy estable en la formulación de la presente invención en la que los valores de pH se mantienen a aproximadamente 7 a 7,5. Mientras que la velocidad de

despurinación y las velocidades de mella del plásmido generalmente se aceleran mucho a +25°C, el Solicitante ha mostrado que el ADN plasmídico permanece estable en una forma no degradada durante un periodo de tiempo largo incluso a RT.

5 A no ser que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, y así sucesivamente, utilizados en la especificación, incluyendo las reivindicaciones, deben entenderse en todos los casos que están modificados por el término "aproximadamente." De acuerdo con esto, a no ser que otra cosa indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas pretendidas que se quieren obtener por la presente invención. Por último, y sin intención de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz de las aproximaciones del número de dígitos significativos y de redondeo ordinario.

10 A no ser que se indique otra cosa, el término "al menos" que precede una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie.

REFERENCIAS

Patentes:

- 15 Solicitud WO 98/00815 (utilización de T [Tee], Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins [Sueros y Vacunas])
 Solicitud WO 96/02658, A.L. Lee et al., *A Method for Large Scale Plasmid Purification* (1996).
 Solicitud WO 97/23601, N.C. Wan et al., *Method for Lysing Cells* (1997).
 Solicitud WO 99/29832, D.S. McNeilly, *Method for purifying plasmid ADN and plasmid ADN substantially free of genomic ADN* (1999).
- 20 Patente de EEUU No. 6.214.568, D.S. McNeilly *Method for purifying plasmid ADN and plasmid ADN substantially free of genomic ADN* (2001).

Publicaciones:

1. H.C. Birnboim y J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN Nucleic Acid Research 7(6):1513-1523 (1979).
- 25 2. D. Stephenson, F. Norman y R.H. Cumming, Shear thickening of ADN in SDS lysates Bioseparation 3:285-289 (1993).
3. M.S. Levy, L.A.S. Ciccolini, S.S.S. Yim, J.T. Tsai, N. Titchener-Hooker, P. Ayazi Shamlou y P. Dunnill, The effects of material properties and fluid flow intensity on plasmid ADN recovery during cell lysis Chemical Engineering Science 54:3171-3178 (1999).

30 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> CENTELION

<120> Método para Purificar ADN Plásmido

<130> GC03001A

<150> PCT/EP2004/011437

35 <151> 17-09-2004

<150> US 60/563.008

<151> 19-04-2004

<160> 34

<170> Versión PatentIn 3.2

40 <210> 1

<211> 25

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 5 <400> 1
 gaggcttctt cttcttcttc ttctt 25
 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 2
 aaggaggagga ggagaggaa 19
 15 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 3
 aaggagagga gggaggaa 19
 <210> 4
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 4
 30 ttggtgtggt ggggtgggtt 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 5
 cttcccgaag ggagaaagg 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 6
 gaagggcttc cctctttcc 19
 10 <210> 7
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 15 <400> 7
 gaaaaaggaa gag 13
 <210> 8
 <211> 12
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 8
 agaaaaaaag ga 12
 25 <210> 9
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 9
 tcttttttc ct 12
 <210> 10
 <211> 14
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 10
 aagaaaaaaa agaa 14
 <210> 11
 <211> 14
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótido Sintético
 <400> 11
 10 ttcttttt tctt 14
 <210> 12
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 12
 aaaaaagga ataaggg 17
 <210> 13 <211> 58
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 13
 25 gatccgaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gaagaagg 58
 <210> 14
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 14
 aattcctct tcttctct ctctcttc ttcttctt tcttctct ctctctg 58
 <210> 15
 35 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 15
 gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga a 51
 5 <210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 16
 tgaccggcag caaaatg 17
 <210> 17
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 17
 20 ccgaattctg gggaccaaag cagtttc 27
 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 18
 ccaagcttca ctgttcacga cgggtgt 27
 <210> 19
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 5-metilcitosina
 35 <400> 19
 gaggcttctt ctcttcttc ttctt 25
 <210> 20
 <211> 48

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Sintético	
5	<400> 20	
	ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga ggaggaggag gaggagga	48
	<210> 21	
	<211> 50	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Sintético	
	<400> 21	
	gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga	50
15	<210> 22	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Sintético	
	<400> 22	
	gatccgagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggg	58
	<210> 23	
	<211> 58	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Sintético	
	<400> 23	
30	aattccctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctcg	58
	<210> 24	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido Sintético	
	<400> 24	
	gatccggagg aggaggagga ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga ggaggagg	58

<210> 25
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 25
 aattcctct cctcctctc ctctctctc tctctctct cctcctctc ctctctccg 58
 <210> 26
 10 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 26
 15 ggagaggagg aggaggagga ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga 50
 <210> 27
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 27
 aatgcctct cctcctctc ctct 25
 <210> 28
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 28
 agtgctctct ctctctctct ctctct 26
 <210> 29
 <211> 66
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

	gatctgaaga agaagaaga gaagaagaag aagaagaaga agaagaaga gaagaactgc	60	
	agatct	66	
	<400>		29
	<210> 30		
	<211> 66		
	<212> ADN		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido Sintético		
	<400> 30		
	gatcagatct gcagttcttc ttcttcttct tcttcttctt cttcttcttc ttcttcttct	60	
	tcttca	66	
10	<210> 31		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
15	<223> Oligonucleótido Sintético		
	<400> 31		
	acagtcataa gtgcggcgac g	21	
	<210> 32		
	<211> 39		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido Sintético		
	<400> 32		
25	gaagaagagg aagaagaaga agaagaaga ggaagagaa	39	
	<210> 33		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótido Sintético		
	<400> 33		
	gaagaagaag aagaagaaga a	21	
	<210> 34		
35	<211> 12		

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

5

<400> 34

agaaaaaaaa ga 12

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para preparar una composición de ADN plasmídico de grado farmacéutico que comprende proporcionar un extracto celular que contiene ADN plasmídico, en el que las células se han lisado mediante lisis alcalina y las membranas celulares y el ADN genómico han sido eliminados mediante una extracción o filtración inicial; y después realizar al menos tres etapas cromatográficas que comprenden, en el siguiente orden: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad de triple hélice y cromatografía de interacción hidrofóbica, en donde la composición preparada tenía menos de aproximadamente 0,0001 % contaminación por ADN de la célula anfitriona.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en el que la primera etapa cromatográfica realizada está precedida de una filtración del lisado.
- 10 **3.** El método de la reivindicación 1, en el que la primera etapa cromatográfica realizada está precedida de la eliminación del flóculo.
- 4.** El método de la reivindicación 1, en el que la composición tiene menos de aproximadamente 0,0001% de ARN contaminante de la célula anfitriona.
- 15 **5.** El método de la reivindicación 1, en el que la composición tiene menos de aproximadamente 0,0001% de proteínas contaminantes de la célula anfitriona.
- 6.** El método de la reivindicación 4, en el que la composición tiene menos de aproximadamente 0,0001% de proteínas contaminantes de la célula anfitriona.
- 7.** El método de la reivindicación 1, en el que la composición tiene menos de aproximadamente 0,1EU/mg de endotoxinas.
- 20 **8.** El método de la reivindicación 6, en el que la composición tiene menos de aproximadamente 0,1EU/mg de endotoxinas.
- 9.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,1 EU/mg de endotoxinas, menos de o aproximadamente 0,00008% de proteínas contaminantes de la célula anfitriona, menos de o aproximadamente 0,00008% de ARN contaminante de la célula anfitriona y menos de o aproximadamente 0,00008% de ADN genómico contaminante de la célula anfitriona.
- 25 **10.** El método de la reivindicación 1, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,00005% de ADN genómico contaminante de la célula anfitriona.
- 11.** El método de la reivindicación 1, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,00008% de ADN genómico contaminante de la célula anfitriona.
- 30 **12.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,1 EU/mg de endotoxinas y menos de o aproximadamente 0,00005% de proteínas contaminantes de la célula anfitriona.
- 13.** El método de la reivindicación 12, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,00002% de ARN contaminante de la célula anfitriona y menos de o aproximadamente 0,00008% de ADN genómico contaminante de la célula anfitriona.
- 35 **14.** El método de la reivindicación 1, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,1 EU/mg de endotoxinas y menos de o aproximadamente 0,00002% de ARN contaminante de la célula anfitriona.
- 15.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, en el que la composición tiene menos de o aproximadamente 0,1 EU/mg de endotoxinas y menos de o aproximadamente 0,00005% de proteínas contaminantes de la célula anfitriona.
- 40 **16.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó , en el que la composición no tiene más de 0,00002% de ARN contaminante de la célula anfitriona y no más de 0,00005% de proteínas contaminantes de la célula anfitriona.
- 17.** El método de una de las reivindicaciones 1-16, que es susceptible de aumentar de escala para la fabricación a gran escala.
- 18.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende además una etapa de esterilización por filtración, formulación y llenado de viales con el ADN plasmídico purificado.
- 45 **19.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el una o más de las etapas cromatográficas se realiza en un soporte sólido que comprende cualquier material orgánico, inorgánico o compuesto, soporte poroso,

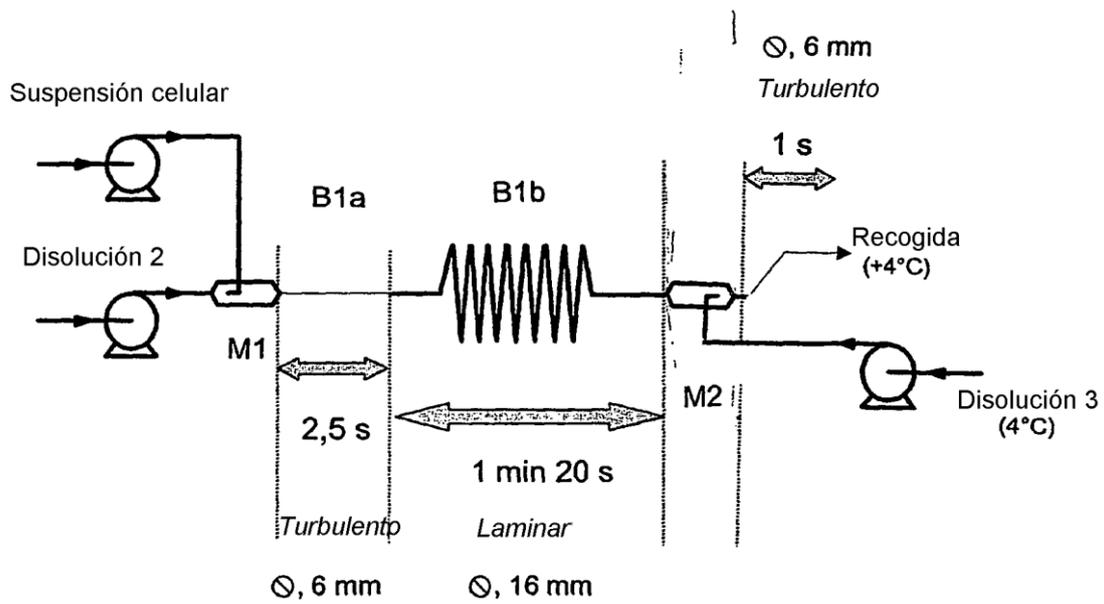
superporoso o no poroso, adecuado para separaciones cromatográficas, que está derivatizado con poli(alquenglicoles), alcanos, alquenos, alquinos, arenos u otras moléculas que confieren un carácter hidrofóbico al soporte.

5 **20.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que una o más de las etapas cromatográficas se realiza como cromatografía de desplazamiento, cromatografía de lecho móvil simulado, cromatografía en lecho continuo, cromatografía líquida de proteínas rápida o cromatografía líquida de alta resolución.

21. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la cromatografía de interacción hidrofóbica se realiza en un lecho fijo o en un lecho expandido.

FIGURA 1

Lisis Celular: modo continuo



> 10 veces menos *kADN* en continuo que en discontinuo

FIGURA 2

Vista general del mezclador M1

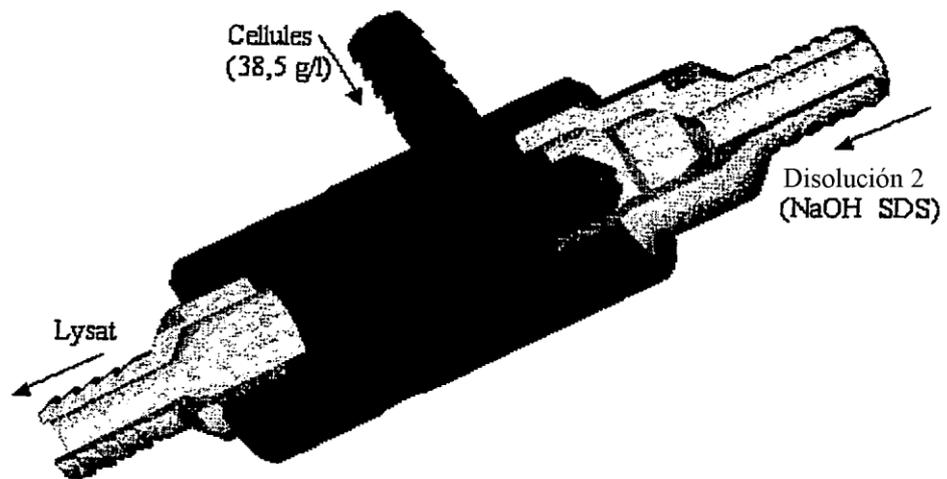


FIGURA 3

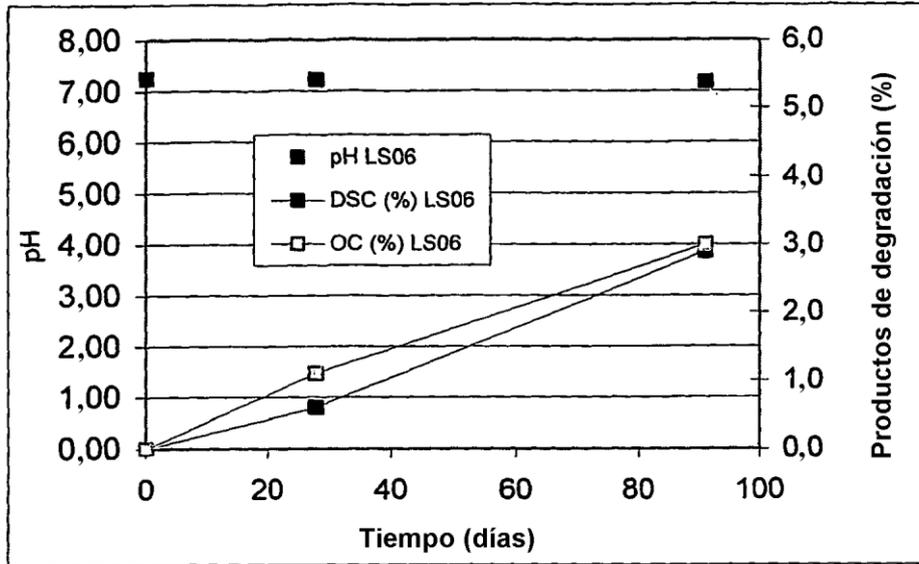
Secuencia	Contenido de ADN genómico (%)	ARN (%)	Proteína (%)	Endotox. (EU/mg de plásmido)	forma ccc (%)	Comentarios
Lisis	500	> 1000	> 2000	> 100 000	≈ 95	
Cromatografía de intercambio aniónico [FractogelTMAE (HiCap)]	10 a 50	5 a 20	0,0002	20 a > 200	≈ 95	Eliminación de proteína muy eficiente (>10 ⁶ -veces) Eliminación de endotoxina eficiente (1000-veces)
Cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad de Triple hélice (THAC-SepharcyI S1000)	0,3 a 1,0	0,002 a 0,01	< 0,0001	10 a 200	≈ 95	Eliminación de ARN muy eficiente (1000-veces) Eliminación de ADN genómico eficiente (100-veces) Eliminación de endotoxina deficiente (<10-veces) No eliminación de forma de plásmido circular abierta
Cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) [Toyopearl Butil (650s)]	0,2 a 0,6	< 0,01	ND	< 0,2	> 99	Eliminación de forma de plásmido oc muy eficiente (10-veces) Eliminación de ADN y ARN genómico eficiente (100-veces) Eliminación de endotoxina eficiente (1000-veces)
Cromatografía de intercambio aniónico, y cromatografía de afinidad de Triple hélice y cromatografía de interacción hidrofóbica en combinación (AEC/THAC/HIC)	< 0,00008	< 0,00002	< 0,00005	< 0,1	> 99	Eliminación muy eficiente de ADN genómico, ARN, proteína, endotoxina, y forma de plásmido oc

FIGURA 4

Métodos de separación y purificación de ADN plásmido	ADN genómico (%)	ARN (%)	Proteína (%)	Endotoxina (EU/mg)
CaCl ₂ / AEC / AEC	< 1	< 0,1	< 2,2	< 1,5
HIC / HIC	< 1	< 1	< 1	< 5
AEC/HAC			< 0,1	< 0,1
AEC / SEC	< 1	< 0,2	< 1	< 100
UF / AEC	< 1	< 1	< 1	< 1
RPC / AEC	< 0,2 a 1,0	ND	< 0,1 a 1	< 5
UF / AEC	< 1	< 2	< 0,1	< 100
Lisis por calor / AEC / RPC	3	< 1	< 1	2,8
Filtración / RNasa / AEC	< 2	< 0,1	< 0,1	< 20
Detergente / precipitación / SEC	< 1	< 1	< 0,5	< 5
PEG / AEC / SEC	< 1	ND	ND	< 100
Filtración (tierra de diatomeas) / SEC / precipitación				
THAC				
HAC / IEC o HAC / THAC	< 0,01			< 10
AEC / THAC / HIC	< 0,00008	< 0,00002	< 0,00005	< 0,1

FIGURA 5

A) Formación de formas abiertas circulares y depurinadas a +25°C
(experimentos con LS06)



B) Formación de formas abiertas circulares y depurinadas a +5°C
(experimentos con LS06)

