



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 135**

51 Int. Cl.:
B01D 61/24 (2006.01)
B01D 61/22 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
B01D 61/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04257246 .1**
96 Fecha de presentación : **23.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1533020**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Procedimiento de purificación y concentración de moléculas biológicas sintéticas.**

30 Prioridad: **24.11.2003 US 524682 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.09.2011

73 Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821-2405, US

72 Inventor/es: **Pearce, Richard James**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 135 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

Procedimiento de purificación y concentración de moléculas biológicas sintéticas

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a la purificación y concentración de moléculas biológicas fabricadas sintéticamente. Más particularmente, la misma se refiere a la purificación y concentración de moléculas biológicas fabricadas sintéticamente, tales como oligonucleótidos, ADN sintético y ARN sintético, mediante ultrafiltración.

10 Las moléculas biológicas sintéticas, tales como oligonucleótidos, ADN sintético y ARN sintético se están investigando como agentes terapéuticos. Estas moléculas se usarían en lugar de moléculas naturales o recombinantes. Existen varias razones para hacer esto. Algunas moléculas simplemente no existen en la naturaleza o por alguna razón no se pueden replicar aún usando tecnologías recombinantes. La síntesis sintética puede superar esta limitación. Con frecuencia, existen variantes de la misma molécula. Los sintéticos permiten preparar de forma personalizada la molécula hasta su forma deseada. Por último, los sintéticos y su fabricación con frecuencia son menos costosos de fabricar y con frecuencia evitan los problemas de riesgos biológicos de manipulación.

15 Estas moléculas típicamente están formadas por precursores químicos sintéticos y se ensamblan en diversos sustratos sólidos dentro de sintetizadores.

Después de la formación, los mismos se deben purificar y en muchos casos concentrar, bien sea para procesamiento adicional o formulación.

Las moléculas generalmente se separan de su soporte sólido y después se someten a una etapa de purificación tal como ultrafiltración o captura cromatográfica para eliminar las impurezas.

20 Las moléculas deseadas son relativamente pequeñas, y tienen típicamente un peso molecular desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 kilo Dalton (kD).

25 Como tal, las mismas son difíciles de purificar y concentrar mediante ultrafiltración ya que con frecuencia las mismas son de aproximadamente el mismo tamaño que el poro de la membrana usada para retenerlas. Esto da como resultado la obtención de rendimientos relativamente bajos de producto. Adicionalmente, las membranas, que tienen tales tamaños de poro pequeños, sufren de flujos bajos y los tiempos de procesamiento se pueden medir en horas. Esto aumenta el coste del procedimiento así como coloca una carga indebida sobre las membranas y los componentes del sistema.

Debido a esta limitación, la ultrafiltración no se acepta ampliamente para esta aplicación y se usan cromatografía, precipitación o técnicas de destilación para purificar y concentrar estas moléculas.

30 Estos procedimientos tienen sus propias desventajas. Los mismos están basados en biotecnología y la mayoría de las veces, especialmente los procedimientos de cromatografía a escala, son más caros que la ultrafiltración. La precipitación con frecuencia introduce un agente químico adicional que necesita eliminarse. La destilación puede influir negativamente sobre las moléculas especialmente cualquiera que sea sensible al calor.

35 El documento WO-98/15581 divulga un procedimiento para purificar oligonucleótidos mediante ultrafiltración con membranas cargadas. La carga de la membrana se ajusta para potenciar la selectividad de la membrana. El punto de corte de la membrana está por debajo del tamaño molecular de las moléculas diana.

El documento US-2003/0178368 enseña cómo potenciar la separación mediante el uso de membranas que tienen la misma carga neta incluso si el punto de corte de la membrana supera el tamaño de la molécula. Sin embargo el estudio se conduce para proteínas.

40 Van Reis y col ("High-performance tangential flow filtration using charged membranes", J Mem Sci, vol. 159, N° 1-2, 1999, págs. 133-142) divulgan el uso de membranas de la misma carga neta para la separación de biomoléculas.

Li S-L, y col ("Separation of l-glutamine from fermentation broth by nanofiltration" J Mem Sci, vol. 222, N° 1-2, 2003, págs. 191-201) divulgan la separación de aminoácidos con nanofiltración.

La presente invención proporciona los medios para posibilitar la ultrafiltración en esta aplicación.

45 Sumario de la invención

Características básicas y opcionales de la presente invención se exponen en las reivindicaciones principales y secundarias respectivamente.

50 La presente invención hace uso de una membrana de ultrafiltración (UF) que tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de desde aproximadamente 1 kD hasta aproximadamente 10 kD, en la que las superficies de la membrana tienen una carga que es positiva o negativa, para purificar y concentrar moléculas

biológicas sintéticas mediante el uso de superficies cargadas para repeler las biomoléculas sintéticas reteniéndolas en el material retenido.

La presente invención permite la eliminación de impurezas de peso molecular pequeño, reduciendo de ese modo la necesidad de cromatografía u otras etapas para conseguir niveles de purificación similares. También permite el uso de membranas con poros más grandes, aumentando de esa manera el flujo y mejorando la velocidad del procedimiento y la economía y creando rendimientos de producto mayores.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un corte transversal de una membrana en uso.

La Figura 2 muestra un sistema para el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 muestra un segundo sistema para el procedimiento de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de una o más membranas cargadas, positivas o negativas, para purificar o concentrar biomoléculas sintéticas tales como oligonucleótidos, ADN sintético y ARN sintético.

Como se ha mencionado anteriormente, el problema con la ultrafiltración en el procesamiento de biomoléculas es doble. En primer lugar, las propias moléculas son pequeñas, de 0,5 a 5 kD de tamaño. Esto requiere el uso de membranas de UF muy estrechas. Incluso así, con frecuencia estas moléculas son del mismo tamaño que las aberturas en las membranas. Como resultado, con frecuencia la molécula diana pasará a través de la membrana, dando como resultado rendimientos más bajos de esa molécula. En segundo lugar, tales membranas estrechas tienen características de flujo muy bajo, lo que significa que muy poco material pasa a través de las mismas en un tiempo determinado. Esto aumenta la cantidad de tiempo necesario para procesar una cantidad dada de fluido en comparación con una membrana de poro más grande. Adicionalmente, el flujo bajo puede crear contra presiones y presiones transmembrana más elevadas sobre la membrana y el sistema, lo cual también es perjudicial.

La presente invención usa una o más membranas de UF que contienen una carga positiva o negativa.

La membrana contiene la misma carga que la molécula diana. Debido a que las cargas iguales se repelen entre sí, la membrana repele la molécula diana lejos de su superficie. Este fenómeno se puede usar como una ventaja. El mismo permite el uso de una membrana con un NMWCO más elevado que la molécula diana para conseguir flujo mayor y mayor rendimiento a la vez que se aumentan los rendimientos de la molécula diana.

Las moléculas diana cargadas de forma similar se comportan como si las mismas fueran más grandes que de lo que realmente son debido a la carga que ellas y la membrana tienen. Por tanto, aunque físicamente las moléculas diana podrían pasar a través de la membrana, su carga similar evita que esto suceda.

Adicionalmente, las impurezas más pequeñas todavía pasan a través de la membrana aunque las mismas tienen carga similar debido a su tamaño más pequeño y la fuerza de filtración que es más grande que la fuerza de la repulsión de la carga.

La Figura 1 muestra una representación diagramática de una membrana y molécula de acuerdo con la presente invención. En esta realización, la molécula diana 2 se asume que es negativa y la superficie de la membrana 4 se prepara para que tenga una carga negativa también. Las impurezas 6A y B pueden ser negativas o positivas. Como se muestra, a medida que el fluido que contiene la molécula diana pasa a través de la membrana 4 las moléculas 2 se repelen a partir de la membrana 4 debido a sus cargas similares y se retienen en el material retenido. Las impurezas debido a su tamaño y a la fuerza de filtración, bien sean de carga similar o diferente, pasan a través de la membrana hacia el lado filtrado.

La Figura 2 muestra un sistema de acuerdo con la presente invención para purificar y/o concentrar biomoléculas sintéticas. Una fuente 20 de biomoléculas está en comunicación fluida con un soporte de filtro 22. En esta realización, el sistema se desarrolla en modo de flujo tangencial (TFF). Una bomba 24 se localiza aguas abajo de la fuente 20. Su salida 26 está conectada a la entrada 28 del soporte 22. Aguas abajo está una o más membranas (únicamente una 30 de las cuales se muestra en aras de la claridad) que separan el soporte 22 en un compartimento aguas arriba 32 y un compartimento aguas abajo 34. El fluido y cualquier sólido o disolvente que llega al compartimento aguas abajo 34 tiene que pasar en primer lugar a través de una o más membranas 30. El compartimento aguas arriba 32 también tiene una salida de material retenido 36. Opcionalmente, como se muestra, la salida de material retenido 36 también tiene un bucle de retorno 38 en comunicación fluida aguas arriba de la entrada 28 para devolver el material retenido de nuevo hacia el sistema si se desea. También se muestra una bomba de material retenido opcional 40. Como se muestra, el bucle de retorno 38 está entre la bomba 24 y la entrada 28 del soporte. Como alternativa, puede regresar a la fuente 20 o cualquier punto entre la fuente 20 y la entrada 28. También se muestra la salida del filtrado 42 localizada en la cámara aguas abajo.

Durante el funcionamiento, el fluido desde la fuente entra en la entrada 28 del soporte 22 y fluye a través de una o

más membranas 30. El fluido y las impurezas o la molécula diana pasan a través de las mismas hacia el compartimento aguas abajo 34. Se prefiere que la molécula diana y la membrana o las membranas tengan carga similar.

5 La Figura 3 muestra un sistema de flujo normal de la invención. La fuente 100 está en comunicación fluida con la entrada 102 del dispositivo de filtro 103. El fluido entra en la entrada 102 a un compartimento aguas arriba 104 que está separado de un compartimento aguas abajo 106 mediante una membrana ultrafiltradora 108. Cualquier fluido, sólido o soluto, que llega al compartimento aguas abajo 106 tiene que haber pasado a través de la membrana 108. Después el filtrado sale del dispositivo a través de la salida 110.

10 Como alternativa, la realización de la Figura 2 puede funcionar de una manera de flujo normal eliminando el bucle de retorno opcional 18 y la bomba 20.

Es importante mencionar con respecto a esto dos características de la membrana o del filtro seleccionado, tamizado y permeabilidad.

15 El tamizado es la proporción de concentración de molécula deseada aguas abajo del filtro en comparación con la concentración de la molécula aguas arriba del filtro después de la filtración. A mayor valor, mayor es la cantidad de la molécula deseada que pasa a través del filtro. Por tanto un valor elevado es indicativo de que la molécula pasa fácilmente a través del filtro. Por el contrario un valor bajo es indicativo de que la mayor parte de la molécula se está reteniendo aguas arriba del filtro. Cuando se desea mantener la molécula aguas arriba (lado del material retenido) del filtro y la molécula de interés y la membrana tienen la misma carga es deseable un valor de tamizado bajo. Por el contrario cuando se desea tener la molécula en el filtrado (que pasa a través de la membrana o del filtro) es deseable un valor elevado.

20 La permeabilidad es el índice de filtración de la membrana o filtro. Se determina principalmente mediante el tamaño de poro, la porosidad porcentual y el espesor de la membrana y la viscosidad y concentración de la solución que se está filtrando. Para una membrana no cargada la permeabilidad desciende a medida que desciende el tamizado. Para una membrana cargada de acuerdo con la presente invención, el tamizado mejora en comparación con el de la membrana no cargada (el valor de tamizado se reduce si la molécula está en el material retenido o se aumenta si la molécula está en el material filtrado) mientras que la permeabilidad permanece igual o se reduce únicamente ligeramente de forma que la combinación de tamizado y permeabilidad se mejora globalmente en comparación con un sistema no cargado. Por ejemplo, cuando la molécula es de la misma carga que la membrana y por tanto se mantiene en el material retenido, la mejora se observa como un valor de tamizado más bajo acompañado por una pequeña reducción o ninguna reducción en la permeabilidad. De acuerdo con la presente invención, la mejora en el tamizado debería ser de al menos 1,5 veces, como alternativa, al menos 2 veces, como alternativa al menos 5 veces, preferentemente a 10 veces, más preferentemente a 50 veces mejor que el valor de tamizado conseguido con una membrana o filtro no cargado.

35 Cualquier membrana de ultrafiltración que sea capaz de portar una carga deseada al menos en condiciones de funcionamiento es útil en la presente invención. Tales membranas se conocen bien en la técnica.

40 Por ejemplo, el documento US 2003/0178368 A1 enseña cómo preparar una membrana de filtración celulósica cargada modificando covalentemente la superficie de la membrana con un compuesto cargado o un compuesto capaz de modificarse químicamente para que posea una carga. Por ejemplo, una membrana celulósica (celulosa, di- o tri-acetato de celulosa, nitrato de celulosa o combinaciones de los mismos) tiene restos hidroxilo que se derivatizan para formar las superficies cargadas. Se puede usar una amplia diversidad de compuestos. La mayoría posee un resto haluro capaz de reaccionar con la superficie de la membrana (incluyendo el interior de sus poros) así como un resto hidroxilo capaz de reaccionar con un segundo ligando que imparte la carga, positiva o negativa.

45 El documento US 4.824.568 enseña el vaciado de un revestimiento polimérico sobre una superficie de membrana y después la reticulación en su lugar con luz UV, haz de electrones u otra fuente de energía para aportar una carga a la membrana tal como PVDF, polietersulfona, polisulfona, resina PTFE y similares.

Otras tecnologías tales como polimerización y reticulación de revestimientos cargados o el injerto de materiales cargados en la superficie de la membrana también se pueden usar.

50 Las membranas adecuadas incluyen pero sin limitación membranas de polietersulfona tales como membranas BIOMAX®, membranas de celulosa regenerada compuesta tales como membranas Ultracel® o membranas de celulosa regenerada, tales como membranas PL; todas disponibles en Millipore Corporation of Billerica, Massachusetts.

55 El NMWCO para estas membranas es de 1 kD a 10 kD. El tamaño seleccionado depende de la molécula que se tiene que purificar y/o concentrar, su carga, el nivel de carga que es capaz de aplicarse a las superficies de la membrana, si el sistema se desarrolla como TFF, normal o similares y la presión bajo la cual se desarrolla el sistema.

En algunos casos, el efecto de repulsión se puede potenciar modificando el pH de la solución que se está filtrando

5 de forma de provocar que la biomolécula sintética o la membrana tengan la misma carga que la membrana o biomolécula sintética. Por ejemplo, a pH neutro (pH=7), la molécula puede tener una carga opuesta o una carga neutra. Sin embargo, dependiendo de su punto isoeléctrico, elevar o reducir el pH provocará que la molécula adopte la misma carga que la membrana. De forma similar una membrana puede tener una carga opuesta o una carga neutra. Sin embargo, dependiendo de su punto isoeléctrico, elevar o reducir el pH provocará que la membrana adopte la misma carga que la molécula que se tiene que separar.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para separar y concentrar una molécula diana (2), seleccionada entre oligonucleótidos sintéticos, ADN sintético y ARN sintético, que tiene un peso molecular que varía desde 0,5 hasta 5 kD a partir de una fuente de la misma que contiene adicionalmente impurezas (6a, 6b) incluyendo otras biomoléculas sintéticas que tienen un peso molecular menor que la molécula diana, que comprende las etapas de:
- 10 formar una solución que contiene una mezcla de dicha molécula diana, dichas impurezas y un fluido portador; y poner en contacto la mezcla con una membrana de ultrafiltración cargada que tiene un NMWCO de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 kD, en el que la molécula diana y la membrana tienen cargas netas similares, para de ese modo separar la molécula diana de la mezcla reteniendo la molécula diana aguas arriba de la membrana mientras que las impurezas y el fluido portador pasan a través de la membrana, **caracterizado porque** el NMWCO de la membrana es más grande que el peso molecular de la molécula diana.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el pH de la mezcla se ajusta de forma que la molécula diana tenga una carga neta que sea la misma que la carga neta de la membrana.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la membrana tiene una carga negativa.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, comprendiendo además la etapa de poner la carga negativa en la membrana mediante:
- 20 a) el ajuste del pH de dicha solución; o
b) el ajuste del pH de la fuente de la molécula diana.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la membrana tiene un NMWCO de desde aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5 kD y la carga es una carga positiva.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, comprendiendo además la etapa de poner la carga positiva en la membrana mediante:
- 25 a) el ajuste del pH de dicha solución; o
b) el ajuste del pH de la fuente de la molécula diana.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que el valor de tamizado tiene al menos una mejora de 1,5 veces en comparación con el de una membrana no cargada del mismo tipo.
- 30 8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente comprendiendo además hacer circular un material retenido a partir de dicha membrana a través de un bucle de recirculación de material retenido y mezclar el material retenido con la fuente de dicha molécula diana.
9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha mezcla se pone en contacto con una pluralidad de dichas membranas de ultrafiltración cargadas.

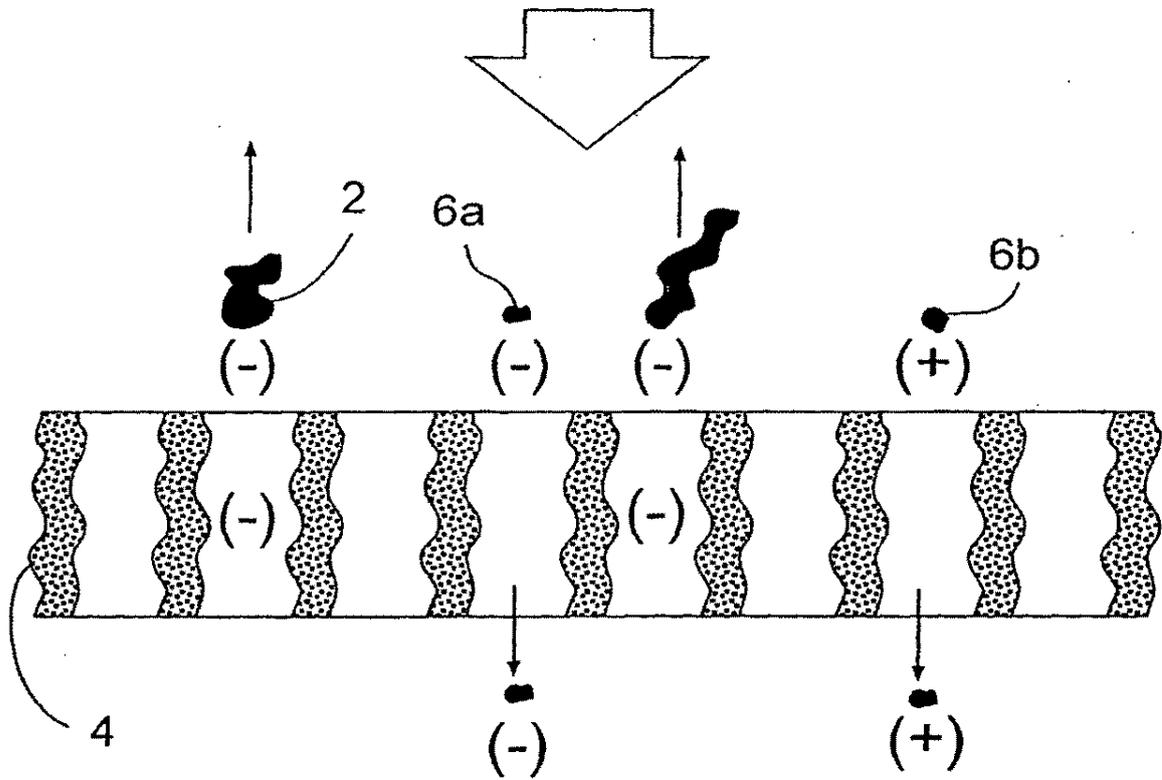


Figura 1

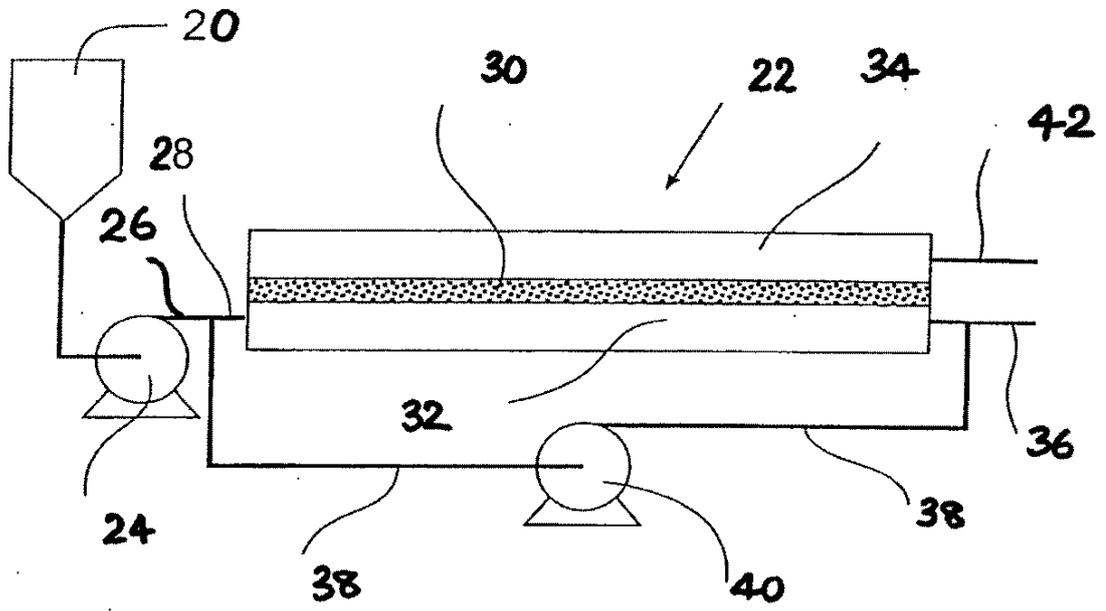


Figura 2

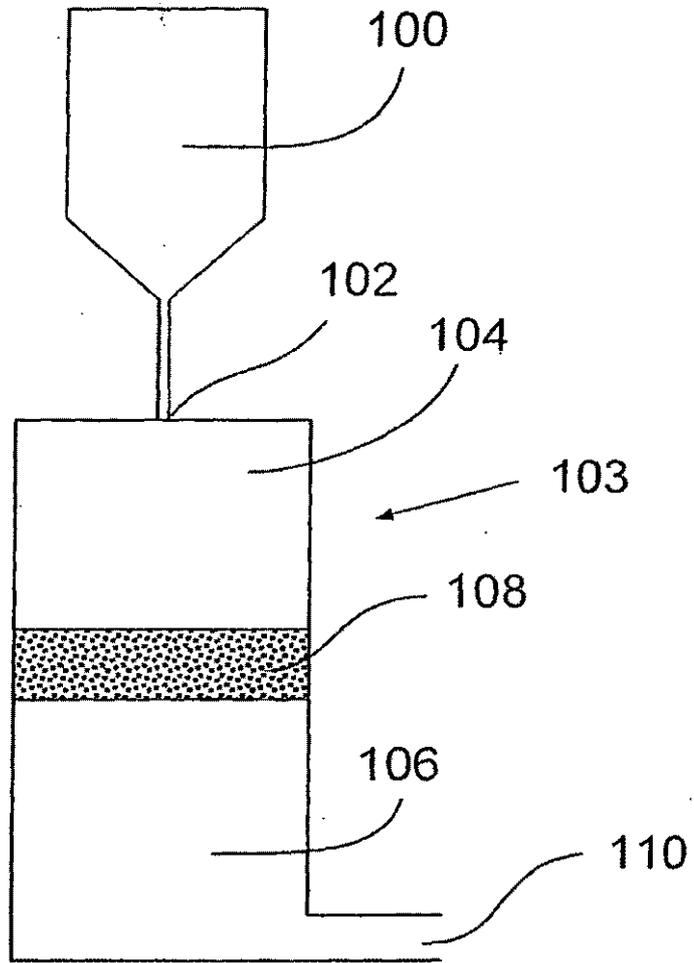


Figura 3