

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 675**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)
C12N 1/08 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
B01F 5/00 (2006.01)
B01F 5/04 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
B01F 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2005 E 05849465 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1817423**

54 Título: **Dispositivos de mezclado para la lisis química de células**

30 Prioridad:

30.11.2004 US 631782 P

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

24.02.2015

73 Titular/es:

**MERIAL LTD. (100.0%)
3239 SATELLITE BLVD.
DULUTH, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**DETRAZ, NOËL, JOSEPH, FRANÇOIS y
RIGAUT, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 529 675 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

Dispositivos de mezclado para la lisis química de células

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

10 [0001] La presente descripción se refiere a dispositivos de flujo para el mezclado de fluidos, en especial soluciones de lisis y fluidos que contienen células que se desea lisar. La presente invención proporciona procedimientos de flujo para mezclar y para lisar células con la finalidad de liberar compuestos biológicos de interés. Específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos de flujo para mezclar y procedimientos químicos para lisar células y liberar plásmidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] En el campo de la tecnología de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) recombinantes, los plásmidos son muy utilizados para codificar y expresar proteínas heterólogas de interés.

20 [0003] Recientemente, se ha demostrado que el ADN plasmídico puede ser útil para aplicaciones clínicas, como terapia génica e inmunización genética (Wolf y col., Science, 1990, 247, 1465-1468; WO-A-90/11092).

25 [0004] Los plásmidos son demasiado grandes y complejos como para producirse en cantidades grandes a través de medios sintéticos. En cambio, los plásmidos se pueden producir en células y, posteriormente, se pueden extraer, recoger y purificar. En general, los plásmidos se pueden producir a través de la fermentación bacteriana y recuperarse mediante rotura de la célula. Los expertos en la materia conocen las técnicas de fermentación. Se han publicado muchas de estas técnicas y se utilizan de forma rutinaria (p. ej., Sambrook y col., sección 1.21, «Extracción y purificación de ADN plasmídico», Molecular Cloning: a laboratory manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Estos procedimientos suponen el crecimiento del cultivo bacteriano y la replicación del plásmido, recogida y lisis de las bacterias, y el aislamiento y purificación del ADN plasmídico.

30 [0005] En consecuencia, existe la necesidad de procesos a gran escala para la extracción y recuperación del ADN plasmídico superenrollado.

35 [0006] Se dispone de una gran variedad de técnicas de rotura celular entre las que se incluyen procedimientos mecánicos o físicos (p. ej., altas presiones, sonicación, tratamientos de calor), químicos (p. ej., detergentes no iónicos, detergentes iónicos, solventes orgánicos, bases) o enzimáticos (p. ej., lisozima).

40 [0007] Para usos farmacéuticos y de inmunización, en las composiciones de ADN plasmídico se deben evitar la presencia de impurezas, como ADN genómico, endotoxinas y ARNt (ácidos ribonucleicos de transferencia) o ARNr (ácidos ribonucleicos ribosómicos), así como la reducción del rendimiento debido a una degradación del plásmido y a la baja eficacia del procedimiento de extracción.

45 [0008] Puesto que el ADN plasmídico superenrollado normalmente se separa tanto del ADN genómico más grande de la célula huésped como de los ADN y ARN celulares más pequeños en función de su tamaño, es importante evitar el corte por cizallamiento del ADN plasmídico o del ADN genómico. Las fuerzas de cizallamiento pueden dañar los ADN genómicos y producir ADN genómicos con el mismo tamaño que los ADN plasmídicos. Las fuerzas de cizallamiento también pueden cortar los ADN plasmídicos y producir ADN plasmídicos linealizados. Los ADN plasmídicos linealizados y los fragmentos de ADN genómico similares en cuanto a tamaño a los ADN plasmídicos superenrollados pueden ser especialmente difíciles de separar de los ADN plasmídicos superenrollados.

50 [0009] Para usos farmacéuticos y de inmunización, es preferible utilizar ADN plasmídicos superenrollados, que son más pequeños y compactos que los ADN plasmídicos circulares cerrados relajados y menos vulnerables a la degradación enzimática. Las técnicas de rotura celular pueden dañar los ADN plasmídicos superenrollados y producir ADN plasmídicos fragmentados, linealizados o circulares cerrados, lo que aumenta el nivel de impurezas y reduce el rendimiento de ADN plasmídicos superenrollados.

55 [0010] Se utilizan habitualmente varias técnicas de rotura celular para liberar un producto intracelular, especialmente proteínas intracelulares.

[0011] Las técnicas de rotura celular se clasifican en dos categorías principales: la primera implica solo fuerzas

físicas para romper las células y la segunda implica el contacto de las células con agentes químicos o enzimáticos y la destrucción de la membrana, cápsula o pared celular.

[0012] Las fuerzas físicas implicadas en la primera categoría pueden ser:

- altas presiones o altas temperaturas (p. ej., gracias a técnicas de microfluidificación, nebulización o tratamiento de calor),
- cavitación (p. e., gracias a técnicas de sonicación),
- impactos contra sólidos (p. ej., gracias a técnicas de molido con microesferas) (véase p. ej., la patente de EE. UU. N.º 6.455.287; Agerkvist I. y col., *Biotechnol. Bioeng.*, 1990, 36, 1083-1089; el documento. US-A-6.071.480).

[0013] La rotura de la célula depende de las condiciones del tiempo de residencia, presión, temperatura, velocidad de agitación, fuerzas de cizallamiento, fuerzas de impacto. etc. Estas condiciones son difíciles de controlar y monitorizar. Fuerzas físicas demasiado débiles pueden no romper todas las células y tener como consecuencia un rendimiento subóptimo de ADN plasmídicos. Fuerzas físicas demasiado fuertes pueden dañar los ADN libres y dar lugar a la fragmentación del ADN, la creación de un nivel inaceptable de impurezas y la reducción en la producción de ADN plasmídicos superenrollados.

[0014] En la segunda categoría de las técnicas de rotura celular, la lisis enzimática o química de las células implica el mezclado de la suspensión celular y la solución de lisis. Esto constituye el campo técnico de la presente invención. El mezclado de la suspensión celular y la solución de lisis es un paso crucial. Los mezclados incompletos, en particular debido a tiempos demasiado cortos de mezclado, pueden tener como consecuencia la lisis incompleta de las células y la pérdida parcial del compuesto biológico de interés, dando lugar a una producción subóptima. Por el contrario, un tiempo de mezclado demasiado largo puede tener como consecuencia un contacto demasiado largo entre las células y la solución de lisis, dar lugar a la degradación del compuesto biológico de interés y de los ADN genómicos y producir fragmentos de ADN genómico con el mismo tamaño que los ADN plasmídicos. Ambas situaciones incrementarán los costes del compuesto biológico final de interés. Se reconoce en la técnica previa que para permitir una recuperación completa de ADN plasmídicos superenrollados, las condiciones de procesamiento deben ser muy suaves, especialmente en lo que se refiere a las fuerzas de cizallamiento durante la etapa de mezclado.

[0015] En el documento US-A-6.197.553 se describe la lisis enzimática con lisozima y el tratamiento con calor mediante un intercambiador de calor. Esta técnica tiene la desventaja de que usa dos tipos de enzimas (lisozima y ARNasa) y que las enzimas son de origen animal, lo que podría conducir a posibles problemas de seguridad debido a contaminación, entre otros, por priones. Otra desventaja de esta técnica es que las enzimas se deben desechar posteriormente. Esto supone varias etapas de purificación, en particular, cromatografía de intercambio iónico en gradiente y cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa en gradiente.

[0016] Para automatizar los procedimientos para la purificación de ADN plasmídicos a partir de células, se ha propuesto previamente pasar de forma continua la suspensión celular que se desea lisar con una solución de lisis a través de un mezclador estático (documento WO-A-00/05358). Normalmente, los mezcladores estáticos contienen una estructura helicoidal interna que permite que la suspensión celular y la solución de lisis se pongan en contacto en un flujo giratorio opuesto que les fuerza a mezclarse en un flujo turbulento o laminar. Dichos mezcladores se describen, por ejemplo, en los documentos WO-A-00/05358 y US-A-5.837.529. La técnica que usa el mezclador estático es difícil de llevar a mayor escala debido a las limitaciones del tamaño del diámetro interno y a los caudales.

[0017] Otros autores proponen el paso continuo de la suspensión celular que se desea lisar y una solución de lisis a través de un tubo común (véase el documento US-A-6.664.049). Una de las principales desventajas de esta técnica es la gran dificultad para llevar a mayor escala debido al pequeño tamaño del diámetro interno del tubo. La solución descrita en esta patente no es para llevar a mayor escala el proceso, sino para multiplicar los tubos para aumentar la producción. Esta solución requiere una instalación compleja con múltiples tubos y una o varias bombas. Esta instalación es difícil de controlar y monitorizar, especialmente para ajustar los caudales en cada tubo para obtener y mantener un mezclado eficiente.

[0018] Existe la necesidad de nuevos procedimientos escalable para preparar compuestos biológicos purificados de interés, en particular, ADN plasmídicos purificados, y más en particular, ADN plasmídicos superenrollados purificados.

[0019] Estos procedimientos pueden tener un alto rendimiento y producir compuestos biológicos de interés con un buen nivel de pureza. También es deseable tener procedimientos escalables que se puedan usar para producir cantidades grandes de ADN plasmídicos. Estos procedimientos también pueden ser rápidos, fáciles de usar y fáciles de mantener.

5 **[0020]** Además, es deseable contar con procedimientos de flujo para aumentar la solidez, reproducibilidad y facilidad para llevar a mayor escala. Es deseable contar con procedimientos en dos etapas, la etapa de mezclado y la etapa de contacto, con el fin de un control y monitorización independiente de ambas. Es deseable contar con procedimientos que puedan producir ADN plasmídicos a bajo coste. También es deseable preparar ADN plasmídicos purificados, sin compuestos químicos tóxicos, impurezas, endotoxinas ni otros componentes que pudieran ser perjudiciales para su seguridad, eficacia o pureza.

10 **[0021]** Uno de los objetivos de la descripción es proporcionar un procedimiento de flujo y escalable de mezclado de al menos dos fluidos para permitir la lisis química de las células suspendidas en uno de estos fluidos.

15 **[0022]** Un segundo objetivo de la descripción es proponer un dispositivo de mezclado para dicho procedimiento.

20 **[0023]** Un tercer objetivo de la descripción es proporcionar un procedimiento de flujo y escalable para la preparación de compuestos biológicos de interés, en particular, ADN plasmídicos superenrollados, utilizando dicho dispositivo de mezclado.

[0024] La presente descripción cubre estas necesidades y alcanza estos objetivos.

25 **[0025]** La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que este documento está disponible como técnica previa a la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

30 **[0026]** La presente invención proporciona un proceso de lisis que comprende las etapas de:

proporcionar un flujo de solución de lisis en una primera dirección;
proporcionar un flujo de uno o más fluidos adicionales en una dirección diferente a la del flujo de la solución de lisis;
35 donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas que producen y contienen compuestos biológicos de interés como proteínas, ARN, ADN, virus y fagos;
donde el flujo combinado de la solución de lisis y al menos uno de los fluidos adicionales induce fuerzas de cizallamiento y turbulencias;
donde la solución de lisis y las células se someten a un cizallamiento intenso durante un breve periodo de tiempo de menos de 10 segundos para mezclar la solución de lisis y las células y lisar las células sin una
40 desnaturalización permanente de los compuestos biológicos de interés; donde los compuestos biológicos de interés incluyen proteínas, ARN, ADN, virus y fagos;
donde la intensidad del cizallamiento es suficiente para causar un mezclado completo sustancial de la solución y dichos fluidos y donde la relación de las velocidades lineales de uno o más fluidos adicionales con la velocidad lineal de la solución de lisis es de 100 a 15 000; y
45 hacer pasar un fluido combinado resultante de la solución de lisis que se mezcla con el uno o más fluidos adicionales que comprenden las células biológicas a través de un reductor de vórtices para reducir o eliminar cualquier velocidad rotacional o cualquier componente tórico del flujo y obtener un flujo laminar.

50 **[0027]** Un primer objeto de la presente descripción es un dispositivo de flujo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis, comprendiendo dicho dispositivo:

- un conducto a través del cual circula la solución de lisis con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s;
- 55 - una o más tuberías a través de las cuales se inyectan uno o más fluidos adicionales dentro del conducto con una velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, donde la relación entre la velocidad lineal del fluido adicional y la velocidad lineal de la solución de lisis medida en la salida de la tubería es de aproximadamente 100 a aproximadamente 15 000 y causa el mezclado sustancial de la solución de lisis con uno o más fluidos adicionales; y

- una salida a través de la cual un fluido saliente sale del conducto, donde el fluido saliente está compuesto por la solución de lisis y uno o más fluidos adicionales después de haber sido mezclados sustancialmente.

5 **[0028]** Un segundo objeto de la presente descripción es un dispositivo de flujo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis, que comprende:

- un conducto a través del cual circula la solución de lisis con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s;
- 10 - una o más tuberías a través de las cuales se inyecta uno o más fluidos adicionales dentro del conducto con una velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, donde la relación de las velocidades lineales medidas en la salida de la tubería entre la velocidad lineal del fluido adicional y la velocidad lineal de la solución de lisis es de aproximadamente 100 a aproximadamente 15 000 y causa el mezclado sustancial de la solución de lisis con uno o más fluidos adicionales;
- 15 - una salida a través de la cual un fluido saliente sale del conducto, donde el fluido saliente está compuesto por la solución de lisis y uno o más fluidos adicionales después de haber sido mezclados sustancialmente; y
- un reductor de vórtices localizado cerca o en la salida del conducto, que reduce o elimina cualquier velocidad giratoria o cualquier componente tóxico del fluido saliente para obtener un flujo laminar saliente.

20 **[0029]** Aún otro objeto es un procedimiento de flujo para la preparación de un lisado biológico que contenga un compuesto biológico de interés, que comprende:

- el flujo de una suspensión celular y una solución de lisis a través de un dispositivo de mezclado según la descripción que permite sustancialmente un mezclado completo y una lisis celular sin una desnaturalización permanente de los compuestos biológicos de interés;
- 25 - el flujo de los fluidos mezclados a través de una tubería de contacto opcional que permita la degradación de impurezas;
- neutralizar la solución de lisis mediante la adición de una solución neutralizante.

30 **[0030]** Un objeto adicional de la descripción es un proceso de lisis alcalina de flujo y escalable para la extracción de ADN plasmídico a gran escala que comprende:

- el flujo de una suspensión celular y una solución de lisis alcalina a través de un dispositivo de mezclado según la descripción que permite sustancialmente un mezclado completo y una lisis celular sin una desnaturalización permanente de los ADN plasmídicos;
- 35 - el flujo de los fluidos mezclados a través de una tubería de contacto opcional que permita la degradación de impurezas;
- neutralizar la solución de lisis mediante la adición de una solución neutralizante;
- precipitar las impurezas mediante la adición de una solución de precipitación;
- 40 - aclarar el lisado mediante decantación y/o centrifugación y/o filtración.

[0031] Aún otros objetos de la descripción son los compuestos biológicos de interés, especialmente los ADN plasmídicos obtenidos mediante el proceso de la invención.

45 **[0032]** Es de destacar que en esta memoria descriptiva y, especialmente, en las reivindicaciones, términos como «comprende», «comprendido», «que comprende» y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley estadounidense sobre patentes; por ejemplo, pueden significar «incluye», «incluido», «que incluye» y similares; y que términos como «consta esencialmente de» tiene el significado que se les atribuye en la ley estadounidense sobre patentes, por ejemplo, permiten elementos no enumerados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica previa o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

[0033] Estas y otras realizaciones se describen o son obvias a partir de la siguiente descripción detallada, donde están incluidas.

55 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0034] La siguiente descripción detallada, que se da a modo de ejemplo, y no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con las figuras acompañantes, incorporadas a este documento por referencia, en donde:

La figura 1 ilustra una vista de una sección longitudinal de un dispositivo de mezclado con una salida de tubería contracorriente y un reductor de vórtices, donde A indica la solución de lisis, B el fluido adicional y C los fluidos mezclados.

5 La figura 2 ilustra una vista de una sección longitudinal de un dispositivo de mezclado con una boquilla pulverizadora a favor de la corriente, donde A indica la solución de lisis, B el fluido adicional y C los fluidos mezclados.

10 La figura 3 ilustra una vista de una sección longitudinal de un dispositivo de mezclado con una boquilla pulverizadora con placa de impacto a favor de la corriente, donde A indica la solución de lisis, B el fluido adicional y C los fluidos mezclados.

La figura 4 ilustra una vista frontal de un reductor de vórtices.

La figura 5 ilustra una boquilla pulverizadora con la placa de impacto adherida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 **[0035]** La presente descripción se refiere a un dispositivo de flujo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis.

20 **[0036]** Se proporciona el dispositivo para inyectar uno o más fluidos adicionales a través de una o más tuberías [1] dentro de un flujo en movimiento direccional de la solución de lisis a través de un conducto [2].

25 **[0037]** Por definición, el conducto [2] tiene una sección transversal más grande que la tubería [1] con el fin de colocar la tubería [1] dentro del conducto [2]. Preferiblemente, el conducto [2] y la tubería de contacto tienen una sección transversal capaz de inducir el flujo laminar en los fluidos que circulan a su través.

[0038] Una sección transversal de una tubería, conducto o reductor de vórtices es por definición el corte perpendicular a la dirección del flujo que circula a través de la tubería, conducto o reductor de vórtices. En virtud de esto, se usa el término sección para sección transversal.

30 **[0039]** No existen limitaciones a una forma en particular del conducto [2] o de la tubería [1]. En especial en las formas de sus secciones como por ejemplo, pero sin limitaciones, de forma cilíndrica o forma cuadrada.

35 **[0040]** La solución de lisis circula por el conducto con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s, preferiblemente igual o inferior a aproximadamente 0,2 m/s y más preferiblemente igual o inferior a aproximadamente 0,04 m/s, medido en la salida de la tubería [3]. La solución de lisis preferiblemente fluye con una velocidad lineal capaz de inducir un flujo laminar. Un flujo laminar se caracteriza por un valor del número de Reynolds inferior a 2000. Un experto en la materia es capaz de calcular el número de Reynolds de un fluido en circulación.

40 **[0041]** La velocidad lineal de un fluido según la presente descripción se calcula dividiendo el caudal volumétrico entre el área superficial de la sección transversal del canal, en especial de la tubería [1] o el conducto [2], y se expresa en metros por segundo (m/s).

45 **[0042]** Como se muestra en la figura 1, la tubería (o tuberías) se localiza dentro de un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4].

50 **[0043]** La solución de lisis se introduce en el dispositivo de mezclado según la invención a través de la entrada anterior [6] del conducto [2]. Los fluidos adicionales se introducen en el dispositivo de mezclado según la descripción a través de la tubería (o tuberías) [1]. Los fluidos mezclados salen del dispositivo de mezclado según la descripción a través de la salida posterior [4] del conducto [2].

[0044] La tubería acaba en una salida [3] alienada preferiblemente con el eje longitudinal del conducto [2]. La salida de la tubería [3] también puede estar alineada en otra dirección dentro del conducto [2], por ejemplo dirigido a la pared del conducto [8].

55 **[0045]** El conducto [2] se proporciona con eje longitudinal, así como con una sección. A este conducto [2] se conectan una o más tuberías [1]. La salida [3] de estas tuberías permite la inyección de uno o más fluidos adicionales en dirección opuesta a la del flujo de la solución de lisis (inyección contracorriente). Alternativamente, la salida [3] de estas tuberías permite la inyección de uno o más fluidos adicionales en la misma dirección a la del flujo

de la solución de lisis (inyección a favor de corriente).

5 **[0046]** El fluido adicional se inyecta a través de la salida [3] de la tubería con un velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, preferiblemente de aproximadamente 5 m/s a aproximadamente 50 m/s y, más preferiblemente, de aproximadamente 10 m/s a aproximadamente 20 m/s, medido en la salida de la tubería. El fluido adicional preferiblemente circula con una velocidad lineal capaz de inducir un flujo turbulento del fluido adicional. Un flujo turbulento se caracteriza por un valor del número de Reynolds superior a 3000.

10 **[0047]** La alimentación del fluido adicional a la salida [3] de la tubería se realiza a través de un conducto de alimentación [7] que emana radialmente desde la pared lateral [8] del conducto [2]. A través del conducto de alimentación radial [7] se proporciona el fluido adicional, generalmente una suspensión celular, en comunicación con una pared interior [9] localizada a lo largo del eje longitudinal del conducto [2] para descargar un flujo de suspensión celular dentro de la solución de lisis en movimiento.

15 **[0048]** El dispositivo de mezclado según la presente descripción está colocado entre la entrada anterior [6] del conducto [2] próxima al conducto de alimentación [7] o a la salida [3] de la tubería y la salida posterior [4] (inmediatamente después de un reductor de vórtices, si lo hay, o inmediatamente antes de una tubería de contacto, si la hay, o inmediatamente antes de un conector para la adición de una solución neutralizante).

20 **[0049]** La velocidad lineal de la solución de lisis y de los fluidos adicionales se selecciona para que proporcione una relación entre la velocidad lineal del fluido adicional y la velocidad lineal de la solución de lisis de aproximadamente 100 a aproximadamente 15 000, en particular de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000, más especialmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 y, más preferiblemente, de aproximadamente 400 a aproximadamente 700. Esta relación se calcula dividiendo el valor de la velocidad lineal del fluido adicional entre el valor de la velocidad lineal de la solución de lisis.

25 **[0050]** La relación de caudales entre el fluido adicional y la solución de lisis es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 y, más preferiblemente, igual a 1.

30 **[0051]** Las velocidades lineales de la solución de lisis y del fluido adicional son tales que el flujo del fluido adicional a través de la salida de la tubería [3] induce fuerzas de cizallamiento y turbulencias que causan un mezclado sustancialmente completo de los fluidos. El mezclado se completa sustancialmente en aproximadamente 10 segundos o menos, preferiblemente en aproximadamente 5 segundos o menos, más preferiblemente en aproximadamente 2 segundos o menos.

35 **[0052]** La presente invención permite en un modo de flujo continuo someter los fluidos adicionales que contienen una suspensión celular a un cizallamiento intenso durante un tiempo muy corto para mezclar las células y la solución de lisis y lisar las células.

40 **[0053]** De hecho, las fuerzas de cizallamiento se aplican sobre las células solo durante la inyección de la suspensión celular a través de la salida de la tubería [3].

45 **[0054]** El modo de flujo continuo de la presente invención comparado con un modo en lote tiene la ventaja de evitar espacios muertos dentro del sistema de turbulencia (p. ej., todas las células pasan a través de la zona de mezclado y se someten a fuerzas de cizallamiento para una mezcla eficaz). También se limite a las células a un único paso dentro de la zona de mezclado (p. ej., no ha posibilidad de que las células pasen dos veces a través de la salida de la tubería del dispositivo de mezclado). La ausencia de piezas mecánicas dentro del dispositivo de mezcla también es una ventaja para la presente descripción.

50 **[0055]** En una realización preferida, el dispositivo de mezclado de la descripción está compuesto por un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4], una tubería [1] con una entrada [5] y una salida [3] alineadas con el eje longitudinal del conducto [2] y dirigidas a favor de corriente o en dirección contracorriente.

55 **[0056]** En otra realización preferida de la invención la salida de la tubería [3] termina en una boquilla pulverizadora [10]. Por definición, una boquilla pulverizadora permite la dispersión de un fluido dentro de un gas y el aumento del área superficial del líquido por la formación de pequeñas gotitas. En el mercado hay disponibles muchas boquillas

pulverizadoras (p. ej., de Delavan® Spray Technologies; Spraying Systems Co.®; Bete® Fog Nozzle Inc.; PNR America LLC; Steinen Wm. Mfg. Co.; Nozzle Network Company Ltd.). Un experto en la materia es capaz de seleccionar una boquilla pulverizadora y utilizarla de acuerdo con la descripción en un entorno líquido, por ejemplo, para la inyección de un fluido dentro de un segundo fluido. Según esta realización preferida, el dispositivo de

5

[0057] Cuando se usa una boquilla pulverizadora, la relación entre las velocidades lineales es de aproximadamente 100 a aproximadamente 6000, en particular de aproximadamente 100 a aproximadamente 3000, más especialmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 y, más preferiblemente, de aproximadamente 400 a aproximadamente 700.

10

[0058] Tras el paso de mezclado por el dispositivo de la descripción los fluidos mezclados pasan a través de un reductor de vórtices para reducir o suprimir cualquier velocidad giratoria o cualquier componente tórico del flujo y obtener un flujo laminar. El reductor de vórtices puede estar compuesto por cualquier dispositivo estático que reduzca o suprima cualquier velocidad giratoria y cualquier componente tórico de un caudal tan solo pasando a través de este y proporcionando un flujo laminar del fluido mezclado saliente. El reductor de vórtices [11] podría estar localizado en o próximo a la salida posterior [4] del conducto [2]. Preferiblemente, el reductor de vórtices [11] tiene una sección adaptada a la sección del conducto [2] sin pieza móvil y cuenta con varios agujeros rectilíneos [12] paralelos al eje longitudinal del conducto [2] (figuras 1 y 4). Preferiblemente, todos los agujeros tiene forma cilíndrica y, más preferiblemente, tienen el mismo diámetro. El flujo del fluido a través del reductor de vórtices [11] se completa a lo largo de una distancia corta. El número y diámetro de los agujeros se ajusta para obtener de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50% de obstrucción del flujo del fluido, preferiblemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 40%, más preferiblemente de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 35% y, más en particular, aproximadamente el 30%.

15

20

25

[0059] La obstrucción del flujo del fluido, expresado en porcentaje, se calcula mediante la siguiente fórmula:
 $(X-Y)/X$

30

donde X es la superficie de la sección del reductor de vórtices, Y es el total de las superficies de los agujeros del reductor de vórtices.

[0060] La longitud de los agujeros del reductor de vórtices es preferiblemente al menos igual al doble del diámetro de un agujero. El tiempo de residencia dentro del reductor de vórtices depende de la longitud de dicho reductor de vórtices y del caudal del fluido. La distancia entre la salida de la tubería (o de la boquilla, si se utiliza) y el reductor de vórtices en un dispositivo de mezclado según la descripción puede ser tan corta como sea técnicamente posible para evitar un cizallamiento demasiado largo de una suspensión de células ya lisadas.

35

[0061] Tan pronto como la suspensión celular y la solución de lisis se mezclen, se iniciará la lisis. La duración del paso de mezclado es de aproximadamente 10 segundos o menos, preferiblemente de aproximadamente 5 segundos o menos, más preferiblemente de aproximadamente 2 segundos o menos. Los expertos en la materia saben cómo determinar la distancia entre la salida de la tubería (o de la boquilla, si se utiliza) y el reductor de vórtices para adaptar la duración del paso de mezclado.

40

[0062] La posibilidad de utilizar un reductor de vórtices es especialmente ventajosa para obtener un flujo laminar del fluido saliente, evitando el cizallamiento de componentes intracelulares sensibles presentes en el lisado celular. Una ventaja adicional del reductor de vórtices es dividir el proceso en dos zonas diferentes, la zona de mezclado y la zona de contacto. Antes del reductor de vórtices, las turbulencias creadas por la inyección de fluidos adicionales con alta velocidad lineal en el fluido en circulación dentro del conducto proporciona suficiente energía para mezclar estos fluidos, creando una zona de mezclado eficaz. La zona de mezclado se encuentra entre la salida de la tubería [3] y el reductor de vórtices [11] si se utiliza o entre la salida de la tubería [3] y la salida posterior [4] del dispositivo de mezclado. La lisis de las células se produce sustancialmente entre la salida de la tubería [3] y la salida posterior [4] del conducto. Después del reductor de vórtices, no hay más fuerza de cizallamiento que afecte a la estabilidad del compuesto biológico intracelular de interés liberado de las células lisadas, lo que limita la producción de impurezas y permite la degradación de dichas impurezas, principalmente a través de una tubería de contacto, hasta la adición de una solución neutralizante. La degradación de las impurezas se produce sustancialmente en la zona de contacto colocada entre la salida posterior [4] del conducto y la adición de la solución neutralizante a través del conector de la solución neutralizante.

45

50

55

5 **[0063]** Según una realización preferida, el dispositivo de mezclado de la descripción está compuesto por un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4], una tubería [1] con una entrada [5] y una salida [3] alineadas con el eje longitudinal del conducto [2] y dirigidas a favor de corriente o en dirección contracorriente (figura 1) y por un reductor de vórtices [11] localizado en, o próximo, a la salida posterior [4] del conducto [2].

10 **[0064]** Según otra realización preferida, el dispositivo de mezclado de la descripción está compuesto por un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4], una tubería [1] con una entrada [5] y tiene una abertura de salida con una boquilla pulverizadora [10] alineada con el eje longitudinal del conducto [2] y dirigida a favor de corriente o en dirección contracorriente, y por un reductor de vórtices [11] localizado en, o próximo, a la salida posterior [4] del conducto [2].

15 **[0065]** Opcionalmente, el dispositivo de mezclado de la presente descripción puede además comprender un objetivo de impacto [13], localizado a muy corta distancia de la salida [3] de la tubería [1]. Este objetivo de impacto proporciona fuerzas de impacto para uno o más fluidos adicionales que pasan a través de la tubería [1] e impactan sobre el objetivo.

20 **[0066]** La relación de velocidades lineales puede ser ventajosa para romper los agregados celulares presentes en las suspensiones celulares. La rotura de los agregados antes del contacto con la solución de lisis, permite una acción más rápida de dicha solución de lisis y un mejor contacto con todas las superficies de las células, debido al hecho de que pueden esconderse dentro de los agregados un menor número de células.

25 **[0067]** Sin ceñirse a la teoría, el impacto también puede ser útil para romper los agregados celulares y puede debilitar las membranas celulares, las cápsulas o los muros y facilitar la acción de la solución de lisis.

30 **[0068]** El objetivo de impacto [13] puede ser una placa localizada dentro del conducto y justo frente a la salida del conducto [3]. «Justo» significa que el objetivo de impacto está en un campo de acción suficientemente próximo a la salida del conducto o de la boquilla como para que sea golpeado por el chorro de fluido adicional y este chorro se disperse. Alternativamente, el objetivo de impacto [13] puede ser parte del dispositivo de mezclado, en especial de la pared lateral [8] del conducto [2]. En este caso, la salida del conducto [3] puede no estar alineada con el eje longitudinal del conducto [2] sino localizada en su proximidad y orientada hacia esta parte del dispositivo de mezclado, en especial, hacia la pared lateral [8] del conducto [2].

35 **[0069]** Como se observa en la figura 5, en una realización en particular de esta opción, la salida de la tubería [3] está compuesta por una boquilla pulverizadora [14] que incluye en sí misma el objetivo de impacto [13]. Estas boquillas pulverizadoras de impacto están disponibles en el mercado (p. ej., de Delavan® Spray Technologies; de Spraying Systems Co.®; Bete® Fog Nozzle Inc.; Nozzle Network Company Ltd.). Un experto en la materia es capaz de seleccionar una boquilla pulverizadora de impacto y utilizarla de acuerdo con la descripción en un entorno líquido, por ejemplo, para la inyección de un líquido dentro de un segundo fluido. Cuando se usa una boquilla pulverizadora de impacto, la relación entre las velocidades lineales es de aproximadamente 100 a aproximadamente 6000, en particular de aproximadamente 100 a aproximadamente 3000, más especialmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, preferiblemente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 y, más preferiblemente, de aproximadamente 400 a aproximadamente 700.

45 **[0070]** En una realización preferida, el dispositivo de mezclado de la descripción está compuesto por un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4], una tubería [1] con una entrada [5] y una salida que termina en una boquilla pulverizadora de impacto [14] alineada con el eje longitudinal del conducto [2] y dirigida a favor de corriente (figura 3) o en dirección contracorriente.

50 **[0071]** Según otra realización preferida, el dispositivo de mezclado de la descripción está compuesto por un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4], una tubería [1] con una entrada [5] y una abertura de salida con una boquilla pulverizadora de impacto [14] alineada con el eje longitudinal del conducto [2] y dirigida a favor de corriente o en dirección contracorriente, y por un reductor de vórtices [11] localizado en o próximo a la salida posterior [4] del conducto [2].

55 **[0072]** En una realización más preferida, el dispositivo de mezclado de la descripción está compuesto por un conducto [2] que tiene una entrada anterior [6] y una salida posterior [4], una tubería [1] con una entrada [5] y una abertura de salida con una boquilla pulverizadora de impacto [14] alineada con el eje longitudinal del conducto [2] y dirigida a favor de corriente o en dirección contracorriente, y por un reductor de vórtices [11] localizada en, o

próximo, a la salida posterior [4] del conducto [2] y con una duración del paso de mezclado de aproximadamente 2 segundos.

5 **[0073]** En la presente descripción se recogen procedimientos de flujo para la preparación de un lisado celular que contenga un compuesto biológico de interés. Estos procedimientos comprenden el cultivo de células que contiene los compuestos de interés, la recogida de estas células, un paso de mezclado y lisis según la presente descripción y pasos adicionales de extracción, purificación y aislamiento de los compuestos celulares de interés a partir de los lisados celulares.

10 **[0074]** El término «célula» abarca a cualquier célula capaz de producir y contener cualquier compuesto biológico de interés. La célula puede seleccionarse a partir del grupo compuesto por células procariotas, en especial, bacterias y, particularmente, *Escherichia coli* (*E. coli*), y a partir del grupo compuesto por células eucariotas, en especial levaduras, células de insecto y células de mamífero. Los compuestos biológicos de interés son proteínas, ARN, ADN, virus o fagos y, preferiblemente, ADN de plásmidos, más preferiblemente, ADN plasmídicos superenrollados. Las células se obtienen y recogen mediante técnicas bien conocidas. Preferiblemente, las células se obtienen mediante fermentación. En una realización preferida, las células son *E. coli* con un alto número de copias de ADN plasmídico producido a alta densidad mediante cultivo en lote (O'Kennedy R. D. y col., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, 37 (1): 83-90) o fermentación en lotes alimentados (Jones R. C. y Anthony R. M., *European J. Appl. Microbiol.*, 1977, 4: 87-92).

20 **[0075]** Las células se recogen mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia, en especial, mediante filtración o centrifugación. Preferiblemente, las células se recogen, concentran mediante centrifugación a flujo continuo, en especial, centrifugación de disco a flujo continuo (documento WO-A-00/05358). A continuación, el sedimento celular se resuspende en un tampón, (p. ej., tampón Tris-EDTA/glucosa, véase Birnboim y Doly, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7, 1513-1523). Después las células pueden conservarse en forma refrigerada o congelada.

25 **[0076]** La suspensión celular y la solución de lisis se mezclan a flujo continuo haciéndolas pasar a través del dispositivo de mezclado según la invención. En realizaciones alternativas, la salida de la tubería termina en una boquilla pulverizadora o en una boquilla pulverizadora de impacto.

30 **[0077]** Los fluidos adicionales son preferiblemente suspensiones, en especial, diferentes suspensiones celulares en caso de varios fluidos adicionales. Cada suspensión celular comprende células que contienen compuestos biológicos de interés, en especial, plásmidos, cuyos compuestos o plásmidos son diferentes de una suspensión celular a otra. Esto permite el mezclado de diferentes suspensiones celulares, y la recogida de una mezcla que contiene diferentes compuestos biológicos de interés, en especial, diferentes plásmidos. El tipo de células puede ser diferente de una suspensión celular a otra (p. ej., células procariotas, en especial, bacterias y, en particular, *Escherichia coli* (*E. coli*), células eucariotas, en especial, levaduras, células de insecto y células de mamífero).

40 **[0078]** En una primera realización, la solución de lisis comprende al menos un agente caotrópico con o sin al menos un tensioactivo. Un agente caotrópico es una sustancia química que puede alterar la estructura de puentes de hidrógeno del agua. En soluciones concentradas las proteínas pueden desnaturalizar debido a que reducen el efecto hidrófobo. Entre los agentes caotrópicos se incluyen, por ejemplo, urea y clorhidrato de guanidina. Un tensioactivo es una molécula con una cabeza hidrófila y un extremo hidrófobo. El tensioactivo es capaz de reducir la tensión superficial de un líquido en el que se disuelve. Entre los tensioactivos se incluye, por ejemplo, Tween®, Brij® y Triton®.

45 **[0079]** En una segunda realización, la solución de lisis comprende al menos un solvente orgánico. Los solventes orgánicos son compuestos químicos capaces de disolver la materia orgánica. Entre los solventes orgánicos se incluyen, en particular, fenol y cloroformo.

50 **[0080]** En una realización preferida, la solución de lisis comprende al menos un agente alcalino y al menos un compuesto detergente. El agente alcalino se refiere a cualquier sustancia que proporciona un pH mayor de aproximadamente 8 cuando se añade una cantidad suficiente de la sustancia al agua. Entre los agentes alcalinos se incluyen, por ejemplo, hidróxido sódico (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de litio (LiOH). El compuesto detergente se refiere a cualquier agente anfipático, ya sea neutro, aniónico, catiónico o bipolar. Entre los compuestos detergentes se incluyen dodecil sulfato sódico (SDS), copolímeros en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno (p. ej. Pluronic®), éter de polioxietileno (p. ej., Brij®), sorbitán de polietilenglicol (p. ej., Tween®). Preferiblemente, la solución de lisis contiene hidróxido sódico y SDS (véase Birnboim y Doly, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7, 1513-1523). La concentración de NaOH es preferiblemente de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente

0,3 N y, más preferiblemente, de aproximadamente 0,2 N. La concentración de SDS es preferiblemente de aproximadamente del 0,1% a aproximadamente el 5% y, más preferiblemente, aproximadamente del 1%.

5 **[0081]** De forma ventajosa, la solución de lisis según la presente descripción no contiene ninguna enzima, en especial, no contiene lisozima ni ARNasa.

[0082] Normalmente para un volumen de suspensión celular, se añade preferiblemente un volumen de la solución de lisis.

10 **[0083]** Se añade una solución neutralizante con flujo continuo al lisado celular para neutralizar los agentes de lisis. La solución neutralizante contiene un agente ácido como ácido acético, y una sal, como acetato de potasio y acetato amónico. Preferiblemente, la solución neutralizante contiene acetato de potasio y ácido acético. Más preferiblemente, la solución neutralizante contiene aproximadamente acetato de potasio 3 M y ácido acético 2 M.

15 **[0084]** La solución neutralizante se inyecta a través de cualquier conector, en especial, un conector de entrada, en T o en Y, localizado inmediatamente después del dispositivo de mezclado según la invención.

20 **[0085]** Un experto en la materia puede controlar la cantidad de solución neutralizante adaptando la sección del conector y/o ajustando el caudal de la solución neutralizante. Preferiblemente, se añaden cuatro volúmenes de lisado celular y tres volúmenes de la solución neutralizante.

25 **[0086]** Esta neutralización previene una acción prolongada de los agentes de lisis, que pueden ser responsable de la desnaturalización del compuesto biológico de interés y la formación de impurezas. La neutralización permite la precipitación de las impurezas, en particular la precipitación de los ADN genómicos.

30 **[0087]** Preferiblemente, el dispositivo de la presente descripción puede además comprende una tubería, localizada después de la salida del conducto (o después del reductor de vórtices cuando se utiliza) y antes del conector a través del cual se añade la solución neutralizante. Esta tubería se denomina tubería de contacto. La tubería de contacto se usa para degradar las impurezas presentes en el lisado celular, en particular, endotoxinas y ARN. La longitud de esta tubería de contacto determina el tiempo de residencia de los fluidos mezclados que pasan a su través y, por tanto, la duración del contacto entre la solución de lisis y el lisado celular y, finalmente, la degradación de las impurezas. La tubería de contacto constituye la zona de contacto y es el elemento principal del paso de contacto. Los expertos en la materia pueden sin necesidad de experimentación adaptar la longitud de la tubería de contacto a la duración del contacto según la naturaleza y concentración de las impurezas presentes en cada lisado celular. Preferiblemente, la longitud de la tubería de contacto es suficiente para un paso de contacto de aproximadamente de 1 segundo a aproximadamente 10 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 5 minutos y, más especialmente, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2 minutos. En este caso, la solución neutralizante se inyecta a través de cualquier conector, en especial, un conector de entrada, en T o en Y, localizado inmediatamente después de la tubería de contacto.

40 **[0088]** Tras la lisis y la neutralización de la solución de lisis, las impurezas deben ser eliminadas del compuesto biológico de interés por los expertos en la materia mediante cualquier sistema.

45 **[0089]** En el caso de recuperación de ADN plasmídicos como compuesto biológico de interés, la adición de una composición precipitante proporciona la precipitación de impurezas sólidas, en especial, los detritos celulares y algunos componentes celulares como ARN. La composición precipitante contiene preferiblemente cloruro de calcio (CaCl_2). Preferiblemente, la composición precipitante de CaCl_2 se añade al lisado neutralizado con flujo continuo a través de un conector. El conector de la composición precipitante puede ser cualquier conector, en especial, un conector de entrada, en T o en Y, o un segundo dispositivo de mezclado según la invención. La concentración final de CaCl_2 en el lisado tras la adición puede ser de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,6 M. Las impurezas precipitadas y el lisado clarificado pueden separarse mediante decantación y/o filtración. Preferiblemente, las impurezas precipitadas y el lisado clarificado pueden prepararse mediante decantación, seguido de una centrifugación de flujo continuo, una filtración profunda, preferiblemente sobre tierra de diatomeas, con un punto de corte entre 2-0,1 μm , preferiblemente con un punto de corte entre 1-0,2 μm . El lisado clarificado contiene los ADN plasmídicos. En esta fase, el producto está listo para la purificación.

55 **[0090]** El lisado clarificado puede concentrarse, a continuación, mediante ultrafiltración (p. ej., con un punto de corte menor o igual a 300 kDa) y someterse a diafiltración para cambiar el solvente.

[0091] El lisado clarificado concentrado puede someterse a cromatografía de exclusión molecular (p. ej., Sephacryl™ S-400HR o Sephacryl™ S-1000C o Sepharose™ 4FF, o Sepharose™ 6FF de Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J., EE. UU.; Toyopearl™ HW65 o Toyopearl™ HW75 de Tosoh Biosciences, Superflow6™ de Sterogene) y/o cromatografía de intercambio iónico (p. ej., Fractogel® EMD DEAE o Fractogel® EMD TMAE de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania; Q Ceramic Hyper DF de Biosepra; Q Macrorep™ de Biorad; Q Sepharose™ de Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J., EE. UU.) y/o cromatografía de interacción hidrofóbica para purificar el ADN plasmídico (p. ej., Octil Sepharose™ de Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J., EE. UU.) y/o hidroxapatita (HA Macrorep™ de Biorad, véanse los documentos WO-A-97/35002; WO-A-02/095047). Preferiblemente, el lisado clarificado se purifica mediante cromatografía de exclusión molecular.

[0092] Adicionalmente, el ADN plasmídico purificado puede concentrarse mediante ultrafiltración y/o diafiltración. Finalmente, el ADN plasmídico se esteriliza mediante filtración estéril (p. ej., con un filtro que tenga un punto de corte de 0,22 µm).

[0093] De forma ventajosa, el dispositivo según la descripción puede usarse en un modo de flujo continuo que procese rápidamente grandes volúmenes de fluidos. Los caudales de los fluidos pueden adaptarse para aumentar la cantidad de fluidos procesados en un tiempo determinado sin cambiar el dispositivo. Para una escalada adicional, el dispositivo puede ajustarse fácilmente mediante una simple modificación del tamaño de la sección del conducto y/o de la sección de la salida de la tubería. El dispositivo de la descripción permite la flexibilidad y fácil escalado del proceso

[0094] El dispositivo de la presente invención también puede adaptarse a procesos conocidos para los compuestos biológicos aislados de interés (p. ej., ADN, ARN y proteínas). Por ejemplo, el dispositivo descrito en este documento podría ser aplicado a los procedimientos de las patentes de EE. UU. N.º 5.945.515; 5.346.994 y 4.843.155 por un experto en la materia.

[0095] La presente descripción abarca a los compuestos biológicos de interés obtenidos mediante el proceso de la invención, en particular los ADN plasmídicos obtenidos mediante el proceso de la invención.

[0096] La invención se describirá ahora más detalladamente a modo de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1:

[0097] *Bacterias de Escherichia coli* (cepa SCS1, N.º de catálogo 200231 de Stratagene®) con un alto número de copias de ADN plasmídico (un plásmido que codifica genes de la rabia) se cultivaron hasta alta densidad mediante fermentación. Tras el cultivo, las bacterias se recogieron.

[0098] Las bacterias de *E. coli* se concentraron mediante centrifugación de disco a flujo continuo usando una centrífuga CSC-6 (Westfalia) a 70 l/h.

[0099] Las bacterias se conservaron congeladas.

[0100] Cuando se habían obtenidos suficientes bacterias, se descongelaron las mezclas de bacterias congeladas, se mezclaron y se diluyeron mediante la adición de tampón S1 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH 7,2).

[0101] Se diseñó un dispositivo de mezclado con un conducto (100 mm de longitud y 22 mm de diámetro interno) con una boquilla pulverizadora de impacto PJ40 o una boquilla nebulizadora (Bete® de Fog Nozzle Inc.) orientada en dirección a favor de flujo del fluido que pasa a través del conducto y seguido por una tubería de contacto (de forma cilíndrica, 25 mm de diámetro interno, 6,5 m de longitud, para una duración del contacto de aproximadamente 140 segundos), de un conector en T y de una segunda tubería de contacto.

[0102] La suspensión de bacterias se inyectó a través de la boquilla pulverizadora de impacto PJ40 con un caudal de aproximadamente 40 l/h. Se inyectó una solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS al 1%) a través del conducto con un caudal de aproximadamente 40 l/h. Se inyectó una solución neutralizante (acetato de potasio 3 M y ácido acético 2 M) a través del conector en T con un caudal de aproximadamente 60 l/h para la neutralización de la solución de lisis y para la precipitación de las impurezas, en especial de los ADN genómicos.

[0103] La duración del mezclado con este dispositivo de mezclado era de menos de 5 segundos y la duración del contacto entre la suspensión celular y la solución de lisis era de 140 segundos.

5 [0104] La velocidad lineal de la solución de lisis a su paso a través del conducto de este dispositivo de mezclado era de aproximadamente 3 cm/s, la velocidad lineal de la suspensión de bacterias a su paso a través de la boquilla pulverizadora de impacto de este dispositivo de mezclado era de aproximadamente 14 m/s. La relación de las velocidades lineales era también de aproximadamente 500.

10 [0105] El lisado celular se trató a continuación con CaCl_2 (a una concentración final de 0,4 M en la mezcla) para precipitar las impurezas, en especial, ARN y endotoxinas. Tras la centrifugación y la filtración, el lisado clarificado contiene el ADN plasmídico.

15 [0106] A continuación, el lisado clarificado se concentró mediante ultrafiltración con una membrana con un valor de corte de 300 kDa. La solución concentrada se diafiltró para cambiar el solvente por un tampón de cromatografía.

[0107] El lisado clarificado se sometió a cromatografía de exclusión molecular.

[0108] Se obtuvieron 1,31 mg de ADN plasmídico por gramo de biomasa húmeda con el 83% de ADNp superenrollado.

20 **EJEMPLO 2:**

[0109] Tras su cultivo como se describe en el ejemplo 1, se recogieron bacterias de la misma cepa de *E. coli*, la SCS1.

25 [0110] Las bacterias de *E. coli* se concentraron mediante centrifugación de disco a flujo continuo usando una centrífuga CSC-6 (Westfalia) a 70 l/h. Después, el sedimento celular se resuspendió en tampón S1 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH 7.2).

[0111] Las bacterias se conservaron congeladas.

30 [0112] Cuando se habían obtenidos suficientes bacterias, se descongelaron las mezclas de bacterias congeladas, se mezclaron y se diluyeron mediante la adición de tampón S1.

35 [0113] Se diseñó un dispositivo de mezclado con un conducto (100 mm de longitud y 22 mm de diámetro interno) con una boquilla pulverizadora PJ40 (Bete® de Fog Nozzle Inc.) orientada en dirección a favor de flujo del fluido que pasa a través del conducto y seguido por una tubería de contacto (de forma cilíndrica, 25 mm de diámetro interno, 3,4 m de longitud, para una duración del contacto de aproximadamente 60 segundos), de un conector en T y de una segunda tubería de contacto.

40 [0114] Se diseñó un segundo dispositivo de mezclado con un conducto (100 mm de longitud y 22 mm de diámetro interno) con una boquilla pulverizadora PJ40 (Bete® de Fog Nozzle Inc.) orientada en dirección a favor de flujo del fluido que pasa a través del conducto y seguido de un conector en T y de una segunda tubería de contacto.

[0115] Se realizó un experimento comparativo con este dispositivo de mezclado con o sin la tubería de contacto.

45 [0116] Para cada dispositivo de mezclado, la suspensión de bacterias se inyectó a través de la boquilla pulverizadora PJ40 con un caudal de aproximadamente 50 l/h. Se inyectó una solución de lisis (NaOH 0,2N, SDS al 1%) a través del conducto con un caudal de aproximadamente 50 l/h. Se inyectó una solución neutralizante (acetato de potasio 3 M y ácido acético 2 M) a través del conector en T con un caudal de aproximadamente 75 l/h para la neutralización de la solución de lisis y para la precipitación de las impurezas, en especial de los ADN genómicos.

50 [0117] La duración del mezclado con este dispositivo de mezclado fue de menos de 5 segundos.

55 [0118] La velocidad lineal de la solución de lisis a su paso a través del conducto del dispositivo de mezclado era de aproximadamente 3,6 cm/s, la velocidad lineal de la suspensión de bacterias a su paso a través de la boquilla pulverizadora era de aproximadamente 17,7 m/s. La relación de velocidades lineales era también de aproximadamente 500.

[0119] Las muestras de lisados alcalinos neutralizados se centrifugaron mediante centrifugación basculante con las mismas condiciones entre muestras.

[0120] En los sobrenadantes se analizaron las cantidades de ADNp, el porcentaje de ADNp superenrollado y cantidad de endotoxinas (expresadas en unidades internacionales de endotoxina por mililitro de cultivo). Estos resultados se presentan en la tabla siguiente:

5

	Duración del contacto (segundos)	ADNp (mg/g de biomasa húmeda)	% de ADNp superenrollado	Endotoxinas (UI/ml de cultivo)
Con tubería de contacto	60	1,60	96	592
Sin tubería de contacto	Irrelevante	1,45	93	7630

[0121] Estos resultados muestran que la ausencia de tubería de contacto da lugar a rendimientos de ADN plasmídico similares, aunque no se reduce la cantidad de endotoxinas. Esto demuestra la alta eficacia del dispositivo de mezclado de la presente descripción.

10

EJEMPLO 3:

[0122] Bacterias de *Escherichia coli* (cepa SCS1, N.º de catálogo 200231 de Stratagene®) con un alto número de copias de ADN plasmídico (un plásmido que codifica genes de la rabia) se cultivaron hasta alta densidad mediante fermentación. Tras el cultivo, las bacterias se recogieron.

15

[0123] Las bacterias de *E. coli* se concentraron mediante centrifugación de disco a flujo continuo usando una centrífuga CSC-6 (Westfalia) a 70 l/h.

20

[0124] Las bacterias se conservaron congeladas.

[0125] Cuando se habían obtenidos suficientes bacterias, se descongelaron las mezclas de bacterias congeladas, se mezclaron y se diluyeron mediante la adición de tampón S1 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH 7,2).

25

[0126] El proceso de lisis alcalina continua descrito en el ejemplo 1 se usó para producir lisados alcalinos neutralizados con o sin tubería de contacto, con un caudal de 50 l/h de solución de lisis, 50 l/h de suspensión de bacterias y 75 l/h de solución neutralizante.

30

[0127] Las muestras de lisados alcalinos neutralizados y tratados con CaCl₂ se centrifugaron mediante centrifugación basculante con las mismas condiciones entre muestras.

[0128] En los sobrenadantes se analizaron las cantidades de ADNp y el porcentaje de ADNp superenrollado. Estos resultados se presentan en la tabla siguiente:

	Duración del contacto (segundos)	ADNp (mg/g de biomasa húmeda)	% de ADNp superenrollado
Con tubería de contacto	60	1,45	93
Sin tubería de contacto	Irrelevante	1,35	95

35

[0129] Estos resultados después del tratamiento con CaCl₂ muestran que la ausencia de tubería de contacto produce el mismo rendimiento de ADN plasmídico. Esto demuestra la alta eficacia del dispositivo de mezclado de la presente descripción.

40

EJEMPLO 4:

[0130] Tras su cultivo como se describe en el ejemplo 1, se recogieron las bacterias de la cepa SCS1 de *E. coli*.

45

[0131] Las bacterias de *E. coli* se concentraron mediante centrifugación de disco a flujo continuo usando una centrífuga CSC-6 (Westfalia) a 70 l/h. Después, el sedimento celular se resuspendió en tampón S1 (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM, pH 7.2).

[0132] Las bacterias se conservaron congeladas.

[0133] Cuando se habían obtenidos suficientes bacterias, se descongelaron las mezclas de bacterias congeladas, se mezclaron y se diluyeron mediante la adición de tampón S1.

5 **[0134]** Se diseñó un dispositivo de mezclado con un conducto (100 mm de longitud y 35 mm de diámetro interno) con una boquilla pulverizadora de impacto P54 (Bete® de Fog Nozzle Inc.) orientada en dirección a favor de flujo del fluido que pasa a través del conducto, con un reductor de vórtices (50 mm de longitud y 36 mm de diámetro, localizado justo después del conducto y que tenía 26 agujeros de 17 mm de longitud y 5 mm de diámetro cada uno). El dispositivo de mezclado iba seguido de una tubería de contacto (de forma cilíndrica, 32 mm de diámetro interno, 10 3,3 m de longitud para una duración del contacto de 60 segundos), de un conector en T y de una segunda tubería de contacto.

15 **[0135]** La suspensión de bacterias se inyectó a través de la boquilla pulverizadora de impacto P54 con un caudal de aproximadamente 80 l/h. Se inyectó una solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS al 1%) a través del conducto con un caudal de aproximadamente 80 l/h. Se inyectó una solución neutralizante (acetato de potasio 3 M y ácido acético 2 M) a través del conector en T con un caudal de aproximadamente 120 l/h para la neutralización de la solución de lisis y para la precipitación de las impurezas, en especial de los ADN genómicos.

20 **[0136]** La duración del mezclado con este dispositivo de mezclado era de menos de 5 segundos y la duración del contacto entre la suspensión celular y la solución de lisis era de aproximadamente 60 segundos.

25 **[0137]** La velocidad lineal de la solución de lisis a su paso a través del conducto de este dispositivo de mezclado era de aproximadamente 2,3 cm/s, la velocidad lineal de la suspensión de bacterias a su paso a través de la boquilla pulverizadora de impacto de este dispositivo de mezclado era de aproximadamente 15 m/s. La relación de las velocidades lineales era también de aproximadamente 650.

30 **[0138]** El lisado celular se trató a continuación con CaCl₂ (a una concentración final de 0,2 M en la mezcla) para precipitar las impurezas, en especial, ARN y endotoxinas. La separación entre las impurezas precipitadas y el lisado clarificado se realizó mediante centrifugación basculante.

35 **[0139]** Se obtuvieron 1,22 mg de ADN plasmídico por gramo de biomasa húmeda con el 95% de ADNp superenrollado.

[0140] Ahora se describen con más detalle los aspectos de la descripción mediante los siguientes párrafos numerados:

1. Un dispositivo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis, que comprende:

- 40
- un conducto a través del cual circula la solución de lisis con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s;
 - una o más tuberías a través de las cuales se inyectan uno o más fluidos adicionales dentro del conducto con una velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, donde la relación de las velocidades lineales medidas en la salida de la tubería entre la velocidad lineal del fluido adicional y la 45 velocidad lineal de la solución de lisis es de aproximadamente 100 a aproximadamente 15 000 y causa el mezclado sustancial de la solución de lisis con uno o más fluidos adicionales; y
 - una salida a través de la cual un fluido saliente sale del conducto, donde el fluido saliente está compuesto por la solución de lisis y uno o más fluidos adicionales después de haber sido mezclados sustancialmente.

50 2. Un dispositivo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis, que comprende:

- 55
- un conducto a través del cual circula la solución de lisis con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s;
 - una o más tuberías a través de las cuales se inyectan uno o más fluidos adicionales dentro del conducto con una velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, donde la relación de las velocidades lineales medidas en la salida de la tubería entre la velocidad lineal del fluido adicional y la velocidad lineal de la solución de lisis es de aproximadamente 100 a aproximadamente 15 000 y causa el mezclado sustancial de la solución de lisis con uno o más fluidos adicionales;

- una salida a través de la cual un fluido saliente sale del conducto, donde el fluido saliente está compuesto por la solución de lisis y uno o más fluidos adicionales después de haber sido mezclados sustancialmente; y
 - un reductor de vórtices localizado cerca o en la salida del conducto, que reduce o elimina cualquier velocidad giratoria o cualquier componente tórico del fluido saliente para obtener un flujo laminar saliente.
- 5
3. Un dispositivo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis, que comprende:
- un conducto a través del cual circula la solución de lisis con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s;
 - una o más tuberías que terminan en una boquilla pulverizadora a través de la cual se inyectan uno o más fluidos adicionales dentro del conducto con una velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, donde la relación de las velocidades lineales medidas en la salida de la boquilla pulverizadora entre la velocidad lineal del fluido adicional y la velocidad lineal de la solución de lisis es de aproximadamente 100 a aproximadamente 6000 y causa el mezclado sustancial de la solución de lisis con uno o más fluidos adicionales; y
 - una salida a través de la cual un fluido saliente sale del conducto, donde el fluido saliente está compuesto por la solución de lisis y uno o más fluidos adicionales después de que se hayan mezclados sustancialmente.
- 10
- 15
- 20
4. Un dispositivo para mezclar una solución de lisis con uno o más fluidos adicionales, donde al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas para su lisis, que comprende:
- un conducto a través del cual circula la solución de lisis con una velocidad lineal igual o inferior a aproximadamente 2 m/s;
 - una o más tuberías que terminan en una boquilla pulverizadora a través de la cual se inyectan uno o más fluidos adicionales dentro del conducto con una velocidad lineal de aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 150 m/s, donde la relación de las velocidades lineales medidas en la salida de la boquilla pulverizadora entre la velocidad lineal del fluido adicional y la velocidad lineal de la solución de lisis es de aproximadamente 100 a aproximadamente 6000 y causa el mezclado sustancial de la solución de lisis con uno o más fluidos adicionales;
 - una salida a través de la cual un fluido saliente sale del conducto, donde el fluido saliente está compuesto por la solución de lisis y uno o más fluidos adicionales después de que se hayan mezclados sustancialmente; y
 - un reductor de vórtices localizado cerca o en la salida del conducto, que reduce o elimina cualquier velocidad giratoria o cualquier componente tórico del fluido saliente para obtener un flujo laminar saliente.
- 25
- 30
- 35
5. El dispositivo del párrafo 3 o 4, en el que la boquilla pulverizadora es una boquilla pulverizadora de impacto.
- 40
6. El dispositivo del párrafo 3 o 4, en el que la boquilla pulverizadora está orientada hacia una pieza del dispositivo de mezclado, cuya pieza constituye un objetivo de impacto.
7. Un procedimiento de flujo para la preparación de un lisado biológico que contiene un compuesto biológico de interés, que comprende:
- el flujo de una suspensión celular y una solución de lisis a través de un dispositivo de mezclado según cualquiera de los párrafos 1 a 6 para permitir sustancialmente un mezclado completo y una lisis celular sin una desnaturalización permanente de los compuestos biológicos de interés;
 - el flujo de los fluidos mezclados a través de una tubería de contacto opcional que permita la degradación de impurezas;
 - neutralizar la solución de lisis mediante la adición de una solución neutralizante.
- 45
- 50
8. Un proceso de lisado alcalino de flujo y escalable para la extracción de ADN plasmídico a gran escala que comprende:
- el flujo de una suspensión celular y una solución de lisis alcalina a través de un dispositivo de mezclado según el procedimiento del párrafo 7 para permitir sustancialmente un mezclado completo y una lisis celular sin una desnaturalización permanente de los ADN plasmídicos;
 - el flujo de los fluidos mezclados a través de una tubería de contacto opcional para permitir la degradación
- 55

de impurezas;

- neutralizar la solución de lisis mediante la adición de una solución neutralizante al lisado celular;
- precipitar las impurezas mediante la adición de una composición de precipitación;
- aclarar el lisado mediante decantación y/o centrifugación y/o filtración.

5

9. Un compuesto de interés obtenido mediante el proceso del párrafo 7.

10. ADN plasmídicos obtenidos mediante el proceso del párrafo 8.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de lisis que comprende las etapas de:
- 5 proporcionar un flujo de solución de lisis en una primera dirección;
proporcionar un flujo de uno o más fluidos adicionales en una dirección diferente a la dirección del flujo de la solución de lisis;
en el que al menos uno de los fluidos adicionales comprende células suspendidas que producen y contienen compuestos biológicos de interés como proteínas, ARN, ADN, virus y fagos;
- 10 en el que el flujo combinado de la solución de lisis y al menos uno de los fluidos adicionales induce fuerzas de cizallamiento y turbulencias;
en el que la solución de lisis y las células se someten a un cizallamiento intenso durante un breve periodo de tiempo de menos de 10 segundos para mezclar la solución de lisis con las células y lisar las células sin una desnaturalización permanente de los compuestos biológicos de interés; en el que los compuestos biológicos de interés incluyen proteínas, ARN, ADN, virus y fagos;
- 15 en el que la intensidad del cizallamiento es suficiente para causar un mezclado sustancialmente completo de la solución y dichos fluidos y en el que la relación de las velocidades lineales del uno o más fluidos adicionales con la velocidad lineal de la solución de lisis es de 100 a 15 000; y
hacer pasar un fluido combinado resultante de la solución de lisis que se mezcla con el uno o más fluidos adicionales que comprenden las células biológicas a través de un reductor de vórtices para reducir o eliminar cualquier velocidad rotacional o cualquier componente tórico del flujo y obtener un flujo laminar.
- 20
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que dicho mezclado crea vórtices que maximizan la exposición del material en que se va a realizar la lisis a la solución de lisis.
- 25
3. El proceso de la reivindicación 1, en el que la solución de lisis y el uno o más fluidos adicionales tienen caudales continuos.
4. El proceso de la reivindicación 1, en el que al menos una proporción de las células lisadas se lisan dentro de una zona de mezclado.
- 30
5. El proceso de la reivindicación 1, en el que la solución de lisis y el uno o más fluidos adicionales se mezclan durante menos de 5 segundos.
- 35
6. El proceso de la reivindicación 1, en el que la solución de lisis y el uno o más fluidos adicionales se mezclan durante menos de 2 segundos.
7. El proceso de la reivindicación 1, en el que el reductor de vórtices se localiza en un conducto y comprende una sección adaptada a la sección del conducto con varios agujeros rectilíneos paralelos al eje longitudinal del conducto.
- 40

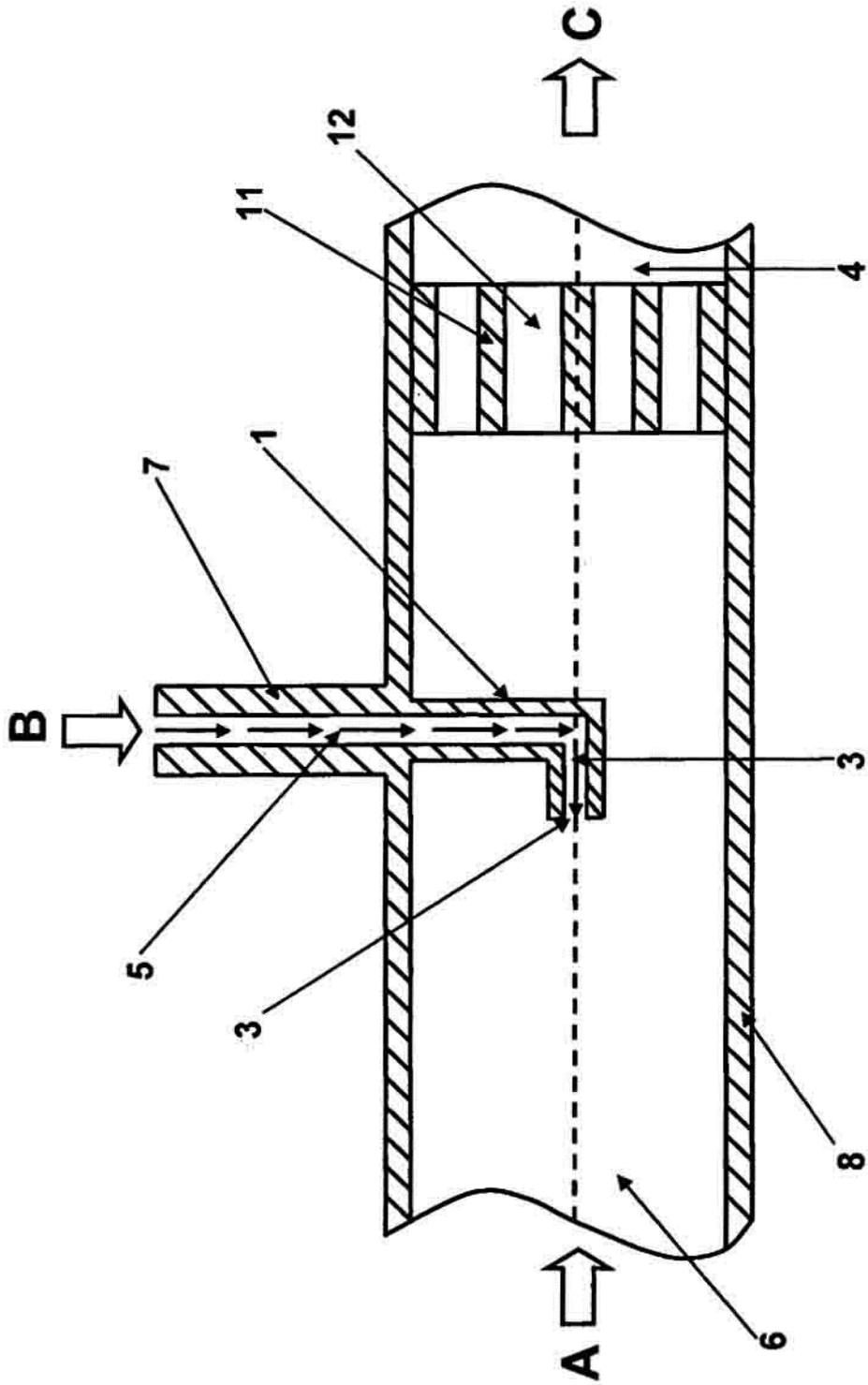


Fig. 1

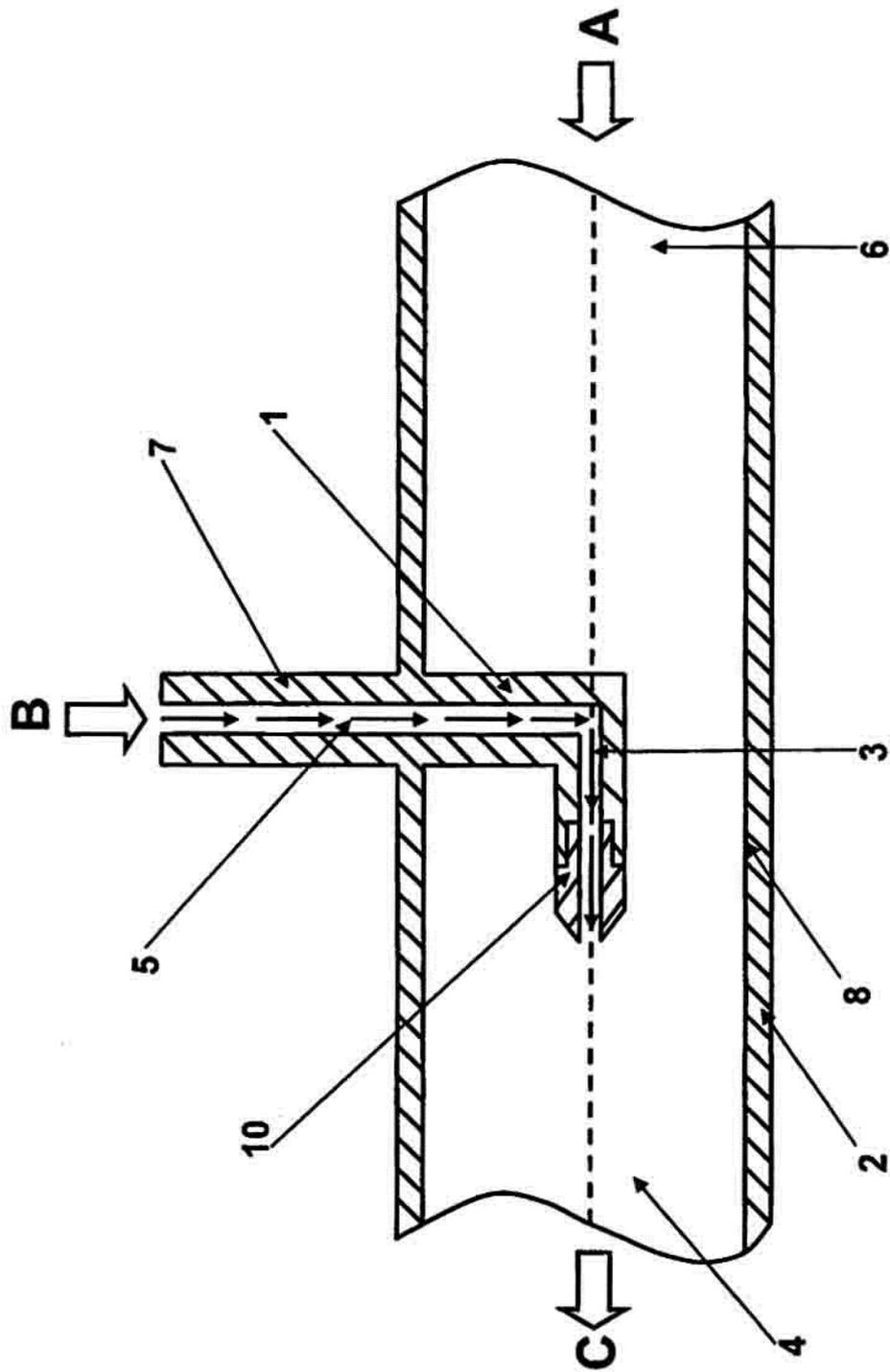
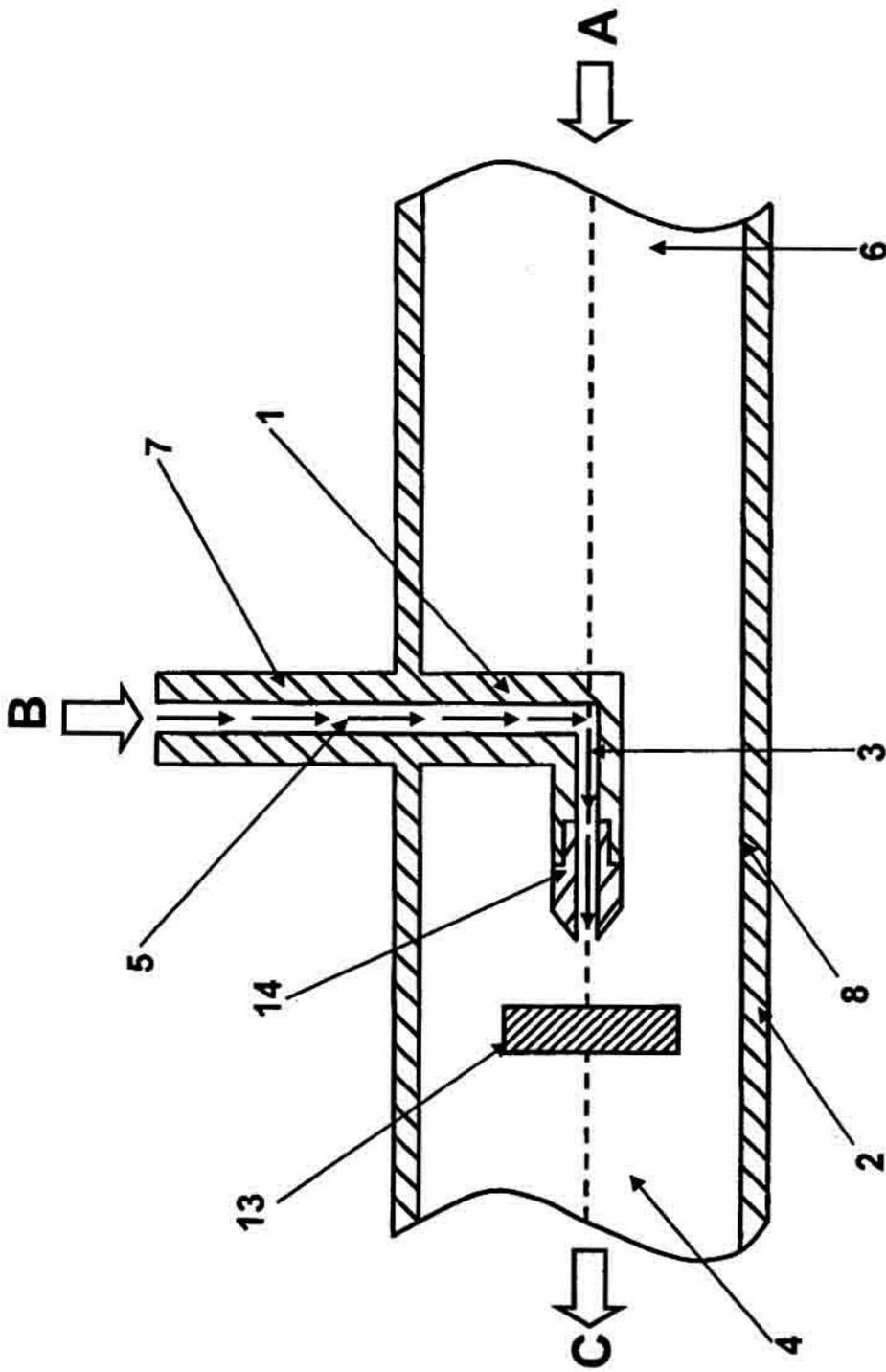
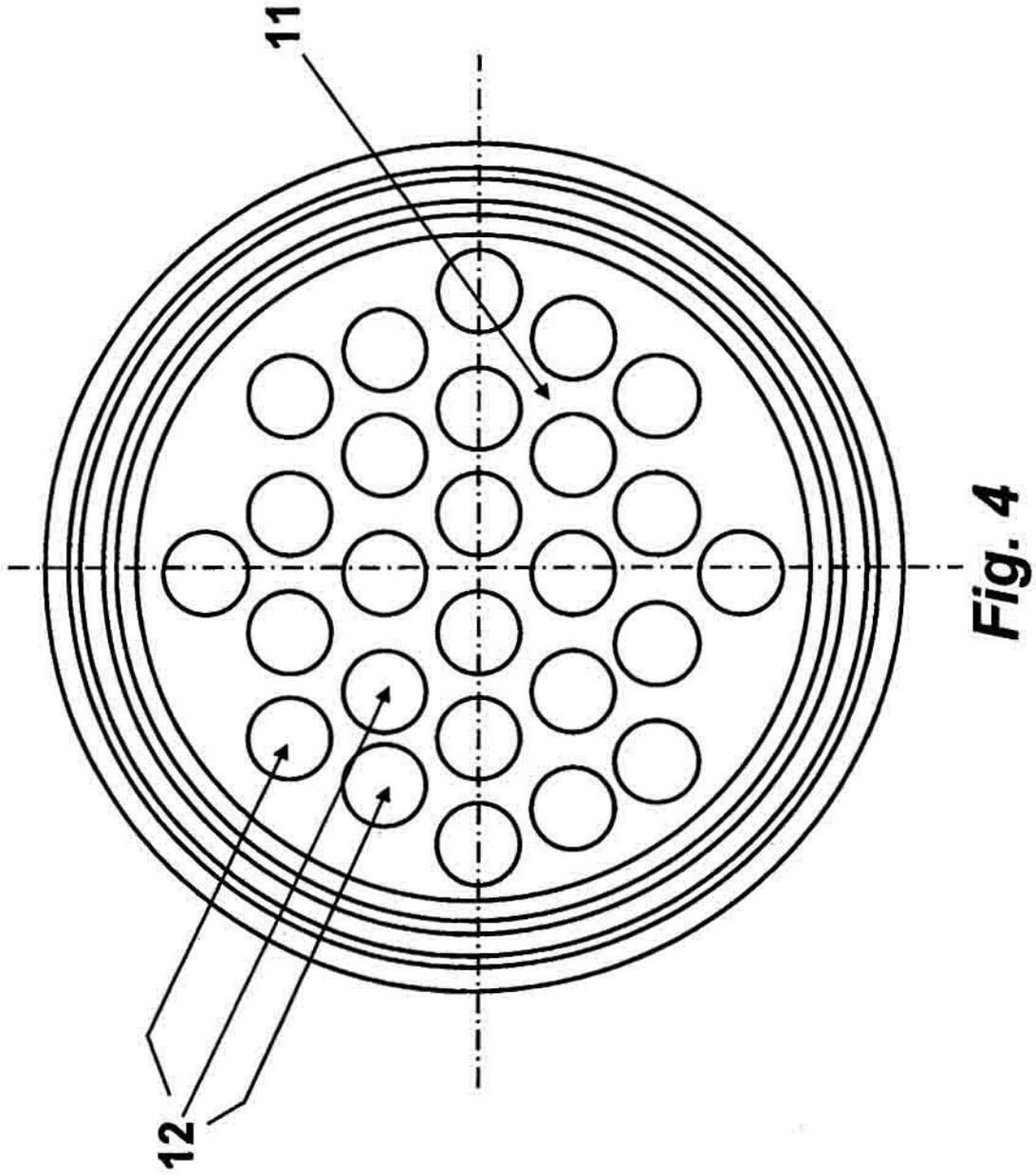


Fig. 2





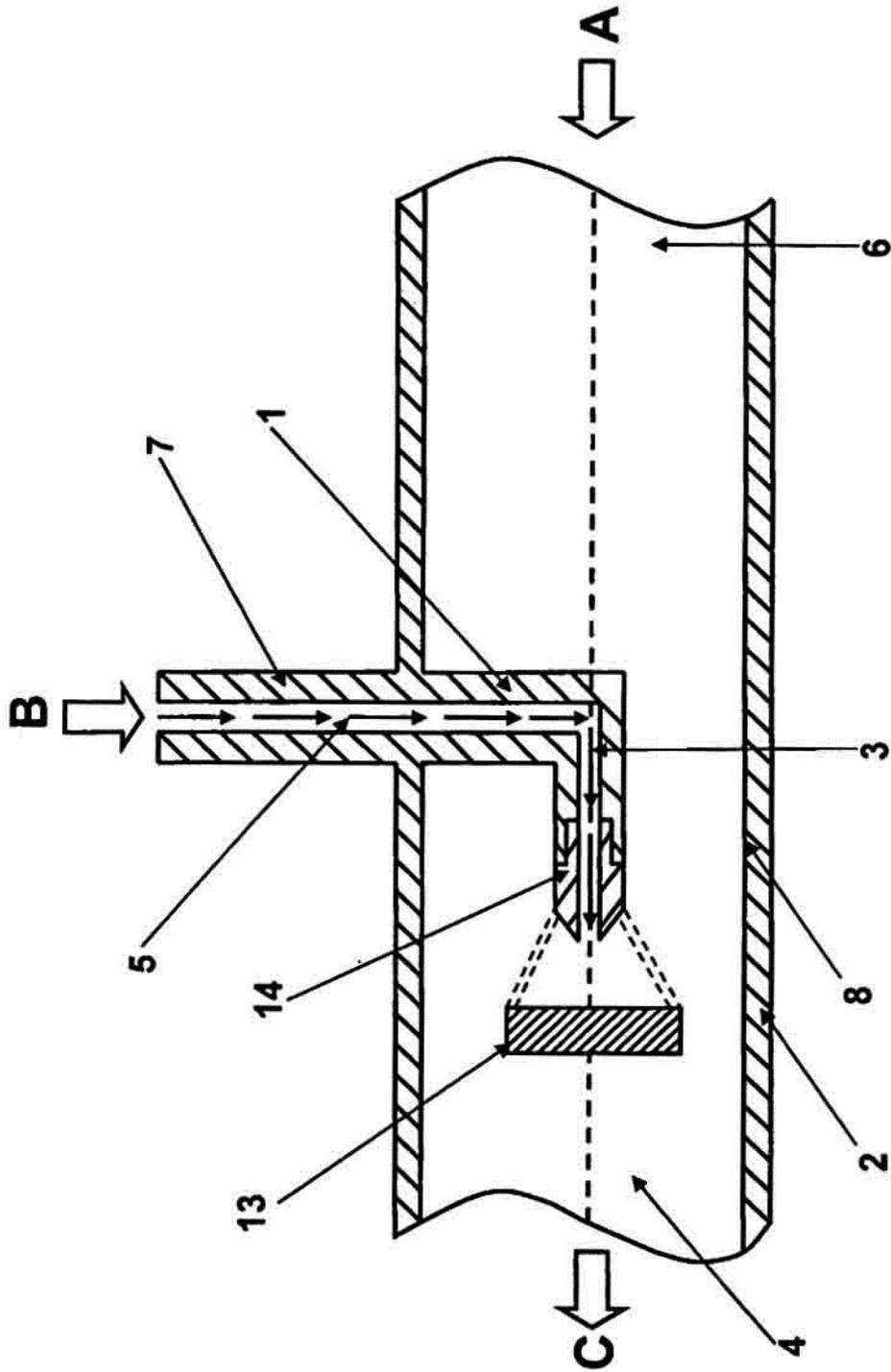


Fig. 5