

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 429**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2010 PCT/EP2010/057276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO10136503**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010 E 10725639 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2435569**

54 Título: **Método y dispositivo para la producción y/o purificación de polinucleótidos y productos obtenibles de los mismos**

30 Prioridad:

26.05.2009 EP 09161169

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

31.05.2017

73 Titular/es:

**EUROGENTEC SA (100.0%)
Liege Science Park Rue Bois Saint-Jean 5
4102 Seraing, BE**

72 Inventor/es:

LEDENT, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 614 429 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

Método y dispositivo para la producción y/o purificación de polinucleótidos y productos obtenibles de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y a un dispositivo para la obtención (producción y/o purificación) de secuencias de polinucleótidos, de tipo ADN plasmídico (de calidad farmacéutica).

10 Estado de la técnica

La purificación de polinucleótidos se obtiene generalmente de células hospedadoras que pueden producir grandes cantidades de estos polinucleótidos, posiblemente después de modificación por ingeniería genética.

15 Birnboim *et al.*, (Nucleic acids research, 1979, 7, 1513-1523) describen la adición de una solución alcalina sobre un cultivo celular para disgregar estas células y probablemente desnaturalizar ADN genómico pero no ADN plasmídico. Esta lisis alcalina se complementa con neutralización utilizando una cantidad suficiente de acetato/ácido acético, con una o más etapas de filtración y con una etapa de retención sobre una columna cromatográfica.

20 Se sabe que una biomasa de bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli*, puede lisarse y que sus secuencias de nucleótidos de interés pueden separarse del resto de ácidos nucleicos y proteínas mediante etapas sucesivas, entre las que se incluyen, una sedimentación, una filtración, una precipitación selectiva y una retención específica sobre columnas.

25 Dependiendo del protocolo que se siga, estas secuencias de nucleótidos de interés están mezcladas con contaminantes (o impurezas), tales como endotoxinas, fenoles, cloruros de cesio, bromuros de etidio, Triton®, proteínas unidas u otros ácidos nucleicos.

30 Como para usos específicos en laboratorios o con fines clínicos se requieren secuencias de nucleótidos altamente purificadas, se propusieron diversos intentos para reducir la cantidad de contaminantes.

El documento EP 0 880 536 B1 describe un método para la obtención de plásmidos de ADN puros de endotoxina basándose en una separación usando una cromatografía de hidroxipatita.

35 El documento US 6 410 274 B1 (W09916869A1) describe un método en lotes para una purificación de ADN plasmídico mediante la adición de CaCl_2 0,1- 0,4 M a contaminantes precipitados, tales como moléculas de ARN y de ADN genómico.

40 El proceso debe garantizar la integridad de las secuencias de nucleótidos (preferentemente de ADN plasmídico). Obstáculos de mayor índole impiden la fácil recuperación de estas secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, el uso de una solución alcalina o de una etapa de calentamiento y/o de un procedimiento largo degradan estas secuencias de nucleótidos.

45 Además, las moléculas de ADN, incluyendo plásmidos, son sensibles al estrés mecánico. Adicionalmente, una solución altamente viscosa puede causar bien heterogeneidades locales o requerir una agitación extensiva, teniendo ambas el potencial de degradar estas secuencias de nucleótidos. Esto es especialmente el caso cuando se usan soluciones concentradas de cloruros de metales divalentes (tales como CaCl_2).

Para impedir la degradación, algunos procesos del estado de la técnica requieren la manipulación de una solución a 4 °C, lo que produce mayores limitaciones operativas y costes.

También se sabe que los métodos por lotes presentan un riesgo de contaminación añadido.

50 La solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0026177 describe un dispositivo y un método continuo para la obtención de ADN plasmídico de calidad farmacéutica, incluyendo una lisis alcalina, una neutralización y una sedimentación del precipitado en una capa de retención por encima de una salida, en el que el lisado limpio abandona el reactor de retención.

55 Objetivos de la invención

60 La presente invención se refiere a un método y a un aparato que no presentan los inconvenientes de los métodos y aparatos del estado de la técnica, especialmente, se refiere a un método asequible y sencillo y a un aparato que no requiere una etapa cromatográfica o un dispositivo cromatográfico y que puede realizarse o usarse preferentemente a temperatura ambiente para la obtención de una producción y/o purificación rápida y eficaz de una o más secuencias de polinucleótidos de interés, tales como una secuencia de un virus o de un plásmido de ADN (posiblemente de calidad (clínica) farmacéutica) de interés.

65

Sumario de la invención

El presente método, para la obtención (mediante una producción y/o purificación) de un plásmido de ADN de interés, comprende (o consiste en) las etapas de:

- 5 b) introducir células que contengan un plásmido de ADN de interés en un conducto y disgregarlas ininterrumpidamente mezclando estas células con una solución de lisis alcalina para formar células lisadas y realizar una etapa de neutralización de las células lisadas con una solución de neutralización que es una composición de ácido acético/acetato para formar una primera mezcla en la que el pH de dicha solución de neutralización está dentro del intervalo comprendido entre aproximadamente 5,0 y 6,0;
- 10 c) realizar ininterrumpidamente en el conducto, una precipitación de contaminantes de plásmidos de ADN, añadiendo a la primera mezcla de la etapa b), una solución que contenga una o más sales, para formar una segunda mezcla usando medios que provoquen un efecto Venturi, en el que la sal, o las sales, se seleccionan del grupo que consiste en CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , SrCl_2 y BaCl_2 , LiCl , acetato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de sodio y sulfato de magnesio o una mezcla de los mismos y en el que esta una o más sales están en esta solución añadida que contiene una o más sales a una concentración comprendida entre 2 M y 6 M; preferentemente la sal añadida es CaCl_2 , a una concentración comprendida entre 2 M y 6 M.
- 15 d) recuperar la segunda mezcla y permitir que se separe un precipitado de la solución de la segunda mezcla; y
- 20 e) recuperar un material soluble, que comprenda el plásmido de ADN de interés, de la solución de la segunda mezcla, excluyendo al mismo tiempo la recuperación del precipitado de la segunda mezcla.

En el método de acuerdo con la invención, el tiempo de contacto de las células disgregadas y de la solución de lisis alcalina, está preferentemente comprendido en el intervalo entre 15 segundos y 15 minutos y, ventajosamente, el tiempo de contacto de las células lisadas y de la solución de neutralización está preferentemente comprendido en el intervalo entre 15 segundos y 5 minutos.

Preferentemente, el método de la invención comprende adicionalmente una etapa f) que consiste en realizar una etapa de filtración del material soluble recuperado sobre uno o más filtros que tienen un tamaño de poro comprendido en el intervalo entre 0,22 μm y 1,5 μm , posiblemente seguido de una ultrafiltración del material soluble sobre una membrana de 50 kDa a 500 kDa y recuperar un primer material retenido que comprende el plásmido de ADN de interés, que posiblemente comprende además una etapa g) que consiste en realizar una cromatografía de intercambio aniónico del primer material retenido y que posiblemente comprende además una etapa h) que consiste en realizar una ultrafiltración del primer material retenido sobre una membrana de 30 kDa, en recoger un segundo material retenido y en realizar una filtración de este segundo material retenido sobre una membrana de 0,22 μm para recoger el ADN de interés.

Preferentemente las etapas del método se realizan a temperatura ambiente, preferentemente a una temperatura comprendida entre 15 °C y 35 °C.

40 Ventajosamente las etapas b) y c) del método se realizan ininterrumpidamente usando bombas peristálticas y en el que estos flujos de bombeo se controlan pesando los viales de las soluciones de suministro.

De acuerdo con la invención, antes de la etapa b), el método comprende la etapa a) que consiste en cultivar células que comprendan uno o más plásmidos de ADN de interés y recoger dichas células.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un aparato para realizar el método, que está formado por tuberías circulares, comprendiendo este aparato:

- 50 - una bomba con un flujo de bombeo comprendido en el intervalo entre 0,1 l/min a 1 l/min y que está conectado a un vial, que contiene una mezcla de células, y a un elemento de tubería;
- un recinto de mezclado;
- una bomba, que tiene un flujo de bombeo comprendido en el intervalo entre 0,1 l/min y 1 l/min, estando dicha bomba unida a un tanque y a los otros elementos del dispositivo a través de dicho recinto de mezclado;
- 55 - un elemento de tubería que comienza desde dicho recinto de mezclado, que tiene un diámetro interno comprendido en el intervalo entre 0,5 cm y 5 cm y una longitud comprendida en el intervalo entre 5 m a 60 m;
- opcionalmente, una bomba, conectada a un tanque y conectada al extremo de los elementos de tubería, conectada a través de una conexión de tipo Y o de tipo T, para formar un elemento de tubería, y que tiene, preferentemente, un flujo de 0,2 a 3 l/min;
- 60 - una bomba unida a un tanque, estando dicha bomba unida al extremo de los elementos de tubería, teniendo dicha bomba un flujo de bombeo comprendido en el intervalo entre 0,1 l/min y 1 l/min y estando conectada, a través de una conexión de tipo Y o tipo T, a elementos de tubería;
- en el que los elementos de tubería tienen una longitud total comprendida en el intervalo entre 1 m y 50 m, y un diámetro interno comprendido en el intervalo entre 0,5 cm y 5 cm y que comprende preferentemente medios para provocar un efecto Venturi en los elementos de tubería.

65

En el aparato de la invención, las bombas son bombas peristálticas y además comprenden preferentemente medios para pesar las diferentes soluciones de suministro.

5 La célula hospedadora que se usa en el método de acuerdo con la invención es o una célula procariota, tal como una bacteria, o una célula eucariota, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en células de levadura, de planta, de hongo, de insecto o de mamífero, incluyendo células humanas, con la condición de que estas células de mamífero sean células embrionarias no humanas.

10 Las células eucariotas preferidas de la invención son células de levadura, tales como células de *Saccharomyces cerevisiae* o células de *Pichia pastoris* y/o células animales, tales como células de *Drosophilla* S2 o células de ovario de hámster chino (CHO, *Chinese Hamster Ovary*).

15 Preferentemente, la célula hospedadora es una célula procariota, de tipo bacteria Gram positiva o Gram negativa, tal como células de *Escherichia coli* o de *Bacillus subtilis*.

Por la expresión "secuencia de (poli)nucleótidos", se entiende cualquier secuencia de nucleótidos de más de 50 bases, preferentemente de más de 50 pares de bases. Más preferentemente, esta secuencia de (poli)nucleótidos es una molécula de ADN.

20 Preferentemente, la secuencia de (poli)nucleótidos de la invención está en forma de un plásmido (ADN), posiblemente un plásmido (ADN) de un tamaño inferior a 3.000 pares de bases.

Ventajosamente, en el método de la invención, las células (suspensión) se disgregan mediante la adición de una solución de lisis.

25 Ventajosamente, la solución (lisis) para disgregar las células (suspensión) es una solución alcalina, preferentemente presente a un pH comprendido entre aproximadamente 11 y aproximadamente 12,5, preferentemente a un pH comprendido entre aproximadamente 12 y aproximadamente 12,5.

30 Un método preferido para disgregar estas células incluye la etapa de mezclar (adición continua) las células (suspensión) con una solución alcalina (lisis) en el conducto y después de esto, obtener (ininterrumpidamente) en este conducto, una neutralización mediante una adición a las células lisadas de una solución de neutralización compuesta de una cantidad suficiente de una composición de ácido acético/acetato (solución), preferentemente a un pH comprendido en el intervalo entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0 para formar una primera mezcla.

35 Ventajosamente, el pH de esta composición (solución) de disgregación alcalina (lisis) está comprendida en el intervalo entre aproximadamente 12 y aproximadamente 12,5 y esta solución está complementada con una cantidad suficiente de uno o más detergentes.

40 Preferentemente, esta solución de lisis alcalina consta de una cantidad suficiente de NaOH, de Na₂CO₃ o de una mezcla de los mismos, y es preferentemente una cantidad suficiente de NaOH.

45 La solución de lisis para disgregar las células puede comprender adicionalmente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5 %, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 %, más preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 % (p:v) de uno o más detergentes, preferentemente un detergente seleccionado del grupo que consiste en dodecilsulfato sódico (SDS), desoxicolato sódico, Triton® X-100, Triton® X-114, Nonidet® P-40, octil-glucósido, Brij® 35, Brij® 56 Tween® 20 y CHAPS (3-[(3-cloramidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato), o una mezcla de los mismos.

50 Ventajosamente, el tiempo de contacto óptimo entre las células (suspensión) que comprenden la molécula, o las moléculas, biológicas de interés y la solución de (lisis) que se usa para disgregar (ininterrumpidamente) estas células, está comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 15 segundos y aproximadamente 15 minutos, preferentemente entre aproximadamente 3 minutos y aproximadamente 10 minutos, más preferentemente de aproximadamente 5 minutos.

55 Como alternativa, el tiempo de contacto óptimo entre las células (suspensión) que comprenden la molécula, o moléculas, biológicas de interés y la solución de (lisis) que se usa para disgregar (ininterrumpidamente) estas células está preferentemente comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 3 minutos.

60 Preferentemente, la composición de ácido acético/acetato tiene un pH comprendido entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, preferentemente de aproximadamente 5,5.

65 Preferentemente, la composición de ácido acético/acetato tiene una concentración de 3 M (mol/l) de acetato y 15 % (v:v) de ácido acético.

Preferentemente, la composición de ácido acético/acetato se enfría a aproximadamente 4 °C.

5 Ventajosamente, el tiempo de contacto óptimo de estas células lisadas que comprenden la molécula, o moléculas, biológicas de interés y la solución de neutralización está comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 15 segundos y aproximadamente 5 minutos, preferentemente entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 2 minutos, más preferentemente de aproximadamente 1 minuto.

10 Ventajosamente, el tiempo de contacto óptimo de estas células lisadas y de esta solución de precipitación está comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 15 segundos y aproximadamente 5 minutos, preferentemente entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 2 minutos, más preferentemente de aproximadamente 1 minuto.

15 Ventajosamente, el tiempo óptimo de la etapa d) relacionado con la decantación, la sedimentación y/o la flotación, está comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 24 horas, preferentemente entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 24 horas, más preferentemente entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 24 horas.

20 Por aproximadamente, se entiende preferentemente un valor más o menos 20 o 10 % (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos significa cada uno de los valores de 4 minutos y 30 segundos a 5 minutos y 30 segundos).

25 El método de la invención puede comprender opcionalmente una etapa preliminar que consiste en la adición de una cantidad suficiente de RNasa a las células (enteras) (suspensión) que comprende el plásmido de interés y que puede difundirse a través de la membrana celular. Este tratamiento con RNasa es especialmente útil para una purificación de ADN plasmídico que tiene un tamaño inferior a 3.000 bases (pares de bases).

30 Preferentemente, la sal (hidratada) se selecciona del grupo que consiste en CaCl_2 (hidratado), MgCl_2 (hidratado), ZnCl_2 (hidratado), SrCl_2 (hidratado) y BaCl_2 (hidratado), o (menos preferentemente) de otra sal, o sales, (hidratada o hidratadas) tales como LiCl , acetato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de sodio o sulfato de magnesio (siendo las sales preferidas CaCl_2 (hidratado) y MgCl_2 (hidratado)) y se añade(n) (ininterrumpidamente) a estas células (disgregadas) en una solución a una concentración comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 6 M.

35 La sal hidratada preferida es $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y que se añade a una concentración comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 6 M, preferentemente a aproximadamente 5 M.

40 Ventajosamente, el tiempo de contacto óptimo entre estas células (disgregadas) y entre la sal, o las sales, añadidas, está comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 15 segundos y aproximadamente 5 minutos, preferentemente entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 2 minutos, más preferentemente es de aproximadamente 1 minuto, siendo este periodo adecuado para obtener la precipitación requerida sin inducir fuerzas de cizalla que puedan destruir la(s) molécula(s) biológica(s) de interés a purificar.

45 Ventajosamente, el proceso continuo de la invención se realiza sin que haya contacto entre la solución que contiene la secuencia de (poli)nucleótidos (preferentemente el plásmido) de la invención y un material no desechable (tales como bombas y medios para controlar el flujo del bombeo).

50 En el método de la invención, el proceso continuo (o las etapas de adición continua) se realiza a través de una abertura de entradas/salidas, bombas o válvulas y estos flujos bombeo están ventajosamente controlados pesando los viales o recipientes de las soluciones de suministro de la invención.

Preferentemente, las bombas que se usan en el proceso continuo y en el dispositivo de la invención son bombas peristálticas.

55 En una realización menos preferida, este proceso continuo se realiza mediante una abertura de entradas, salidas, bombas o válvulas y estos flujos de bombeo están controlados por una medición de los flujos de bombeo en los diferentes elementos de tubería.

60 En el método de la invención, la etapa de filtración se realiza en filtros de profundidad.

Como alternativa, en el método de la invención, la etapa de filtración se realiza en filtros de superficie.

65 Preferentemente, el método de la invención puede comprender además, una etapa g) de realizar una cromatografía de intercambio aniónico (etapa de pulido), con una subetapa de lavado, exactamente, de manera preferente, se realiza una etapa (de pulido) sobre cromatografía (de intercambio aniónico).

La cromatografía de intercambio aniónico (etapa g) comprende (o consiste en) etapas de purificación clásica bien conocidas por el experto en la técnica y que comprende las subetapas de:

- 5 - unir la secuencia de (poli)nucleótidos presente en el primer retenido
- lavar
- eluir la secuencia de (poli)nucleótidos de interés.

10 La subetapa de lavado se realiza preferentemente usando una solución tamponada a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, que comprende, de manera preferente, Tris (HCl) aproximadamente 50 mM y NaCl de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,6 M.

15 Opcionalmente, después de esta subetapa de lavado (y antes de la subetapa de elución), se realiza otra subetapa de lavado con la misma solución complementada con uno o más detergentes neutros, preferentemente detergentes seleccionados del grupo que consiste en Triton® X-100, Triton® X-114, Tween® 20, Nonidet® P-40, octilglucósido, Brij® 35, Brij® 56 o una mezcla de los mismos, preferentemente presentes en la solución a aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 1 %, y seguido de una tercera subetapa de lavado sin detergente(s) neutro(s).

20 La etapa de elución de la primera fracción retenida (para recoger el primer retenido y recuperar la secuencia de (poli)nucleótidos de interés) se realiza usando un gradiente salino, preferentemente con la adición de una solución tamponada a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 y que tiene una concentración salina que aumenta de aproximadamente 0,4 M a aproximadamente 2 M de NaCl, preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 M de NaCl.

25 Ventajosamente, estas (sub)etapas de lavado y de elución de la cromatografía de intercambio aniónico de acuerdo con el método de la invención, se realizan añadiendo al menos tres veces el volumen de la columna para cada solución, preferentemente añadiendo (al menos) cinco veces el volumen de la columna para cada solución.

30 Preferentemente, el método de la invención comprende además una etapa h) de realizar una ultrafiltración del primer retenido sobre una membrana de aproximadamente 30 kDa y recoger un segundo retenido (recién) obtenido (de aproximadamente 30 kDa) y posiblemente realizar una filtración (final) de este segundo retenido (recién) obtenido (de aproximadamente 30 kDa) sobre una membrana de aproximadamente 0,22 µm para recuperar en el filtrado, la secuencia de (poli)nucleótidos purificada (de estos contaminantes o impurezas), preferentemente el plásmido de la invención.

35 Ventajosamente, el método de la invención permite obtener una simplificación y una reducción de costes de los métodos del estado de la técnica, porque tiene la ventaja de que se realiza a temperatura ambiente: una temperatura comprendida entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 35 °C, preferentemente a una temperatura de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25 °C.

40 Como alternativa, todo el método de la invención se realiza a temperatura ambiente (a una temperatura comprendida entre aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C), excepto la etapa d) que se realiza a una temperatura de aproximadamente 4 °C, con medios adecuados que pueden usarse para obtener un enfriamiento de la solución que comprende la secuencia de (poli)nucleótidos de interés que mejora la mezcla y que impide que se produzcan daños en los ácidos nucleicos.

45 La invención también se refiere a un aparato (dispositivo, instalación o kit de partes) para realizar el método, preferentemente las etapas b) a c) o todas las etapas de este método.

50 Ventajosamente, este aparato de la presente invención, comprende (o consiste en) medios para obtener un flujo continuo y está fabricado de un elemento de tubería desechable (de un solo uso) (posiblemente presente en un kit de partes), formado con tubos circulares, posiblemente conectado a uno o más tanques o a uno o más recipientes con células adecuados y que tienen medios de entrada para la introducción de medios y células (o fracciones celulares) y medios de salida para la recogida de contaminantes y medios separados de la secuencia (o secuencias) de (poli)nucleótidos de interés obtenidos de estas células y purificados de estos contaminantes.

55 Ventajosamente, los elementos de tubería de la invención cumplen los requisitos para su uso en medicina humana (son de calidad farmacéutica).

60 Ventajosamente, los elementos de tubería de la invención no son lixiviables.

El aparato de la presente invención comprende (o consiste en) una (primera) bomba 1 con un flujo de bombeo de aproximadamente 0,1 l/min a aproximadamente 1 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,30 l/min y está conectada a un elemento de tubería 2.

65 En el aparato de la presente invención, esta (primera) bomba 1 está conectada a un vial 3 (o un recipiente similar que comprende o presenta un volumen) que puede comprender una mezcla de células resuspendida,

ES 2 614 429 T3

preferentemente en una solución acuosa isotónica al 10 % (v:v) tamponada a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

5 El aparato de la presente invención comprende adicionalmente un recinto de mezclado 4 (un recipiente o una bolsa que tiene un volumen adecuado) que se coloca en el extremo del elemento de tubería 2.

Preferentemente, este elemento de tubería 2 tiene una longitud total de 0,5 m a aproximadamente 5 m, preferentemente de aproximadamente 1,5 m.

10 Este elemento de tubería 2 tiene un diámetro interno preferido de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 25 mm, preferentemente de aproximadamente 7 mm a aproximadamente 15 mm, más preferentemente de aproximadamente 9 mm a aproximadamente 11 mm.

15 El aparato de la presente invención puede comprender adicionalmente una (segunda) bomba 11 conectada mediante un elemento de tubería 14 a un tanque 13 o a un recipiente que contiene una solución de lisis, con un flujo de bombeo de aproximadamente 0,1 l/min a aproximadamente 1 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,30 l/min, y conectada a los elementos (de tubería) del dispositivo a través de este recinto de mezclado 4 o recipiente equivalente.

20 Ventajosamente, el recinto de mezclado 4 está provisto de un homogeneizador orbital desechable.

Preferentemente, el recinto de mezclado 4 es un vial cónico desechable de aproximadamente 1 l a aproximadamente 3 l.

25 Ventajosamente, el flujo de bombeo de la (segunda) bomba 11 es igual al flujo de bombeo de la primera bomba 1.

El aparato de la presente invención puede comprender adicionalmente elementos de tubería 12 que comienzan desde este recinto de mezclado 4 o recipiente equivalente, teniendo estos elementos de tubería 12 un diámetro interno de aproximadamente 0,5 cm a aproximadamente 5 cm, preferentemente de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm, más preferentemente de aproximadamente 1,27 cm.

30

Los elementos de tubería 12 tienen ventajosamente una longitud total de aproximadamente 5 m a aproximadamente 60 m, preferentemente de aproximadamente 10 m a aproximadamente 30 m, más preferentemente de aproximadamente 20 m a aproximadamente 25 m.

35

Preferentemente, en el inicio de los elementos de tubería 12, el aparato de la presente invención comprende adicionalmente una (tercera) bomba 21 que tiene un flujo de bombeo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1 l/min, más preferentemente de aproximadamente 0,6 l/min.

40

El flujo en el elemento de tubería 12 es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1 l/min, más preferentemente de aproximadamente 0,6 l/min.

45 Preferentemente, el flujo de bombeo de la (tercera) bomba 21 es igual al flujo de bombeo del elemento de tubería 12.

Opcionalmente, una (cuarta) bomba 31, está conectada en el extremo de los elementos de tubería 12.

50 Esta (cuarta) bomba 31 tiene un flujo de bombeo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1 l/min, más preferentemente de aproximadamente 0,6 l/min.

Preferentemente, el flujo de bombeo de la (cuarta) bomba 31 es igual al flujo de bombeo del elemento de tubería 12.

55 Dicha (cuarta) bomba 31 está conectada (en el extremo del elemento de tubería 12) con un tanque 32 (una bolsa o un recipiente equivalente que tiene un volumen adecuado) que posiblemente contiene la solución de neutralización, y está conectada a través de una conexión de tipo Y (o de tipo T) para formar un elemento de tubería 33.

60 Preferentemente, estos elementos de tubería 33 presentan medios 34 para inducir (provocar) un efecto Venturi (de mezclado) en el elemento de tubería 33.

Preferentemente, el diámetro interno del elemento de tubería 33 está comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 cm, preferentemente de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm, más preferentemente de aproximadamente 1,27 cm, excluyendo los medios 34 (diámetro modificado de estos elementos de tubería) usados para inducir (provocar) el efecto Venturi (de mezclado) mencionado anteriormente.

65

La longitud de este elemento de tubería 33 es de aproximadamente 1 m a aproximadamente 20 m, preferentemente de aproximadamente 5 m a aproximadamente 15 m, más preferentemente de aproximadamente 8 m a aproximadamente 12 m.

5 Ventajosamente, este efecto Venturi (de mezclado) se induce (obtiene o provoca) mediante una reducción en el diámetro interno de aproximadamente 40 % (de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % del diámetro interno inicial) del elemento de tubería 33.

10 La posición de las bombas, como se representa en la Figura 1 adjunta, también mejora la eficiencia del tratamiento, debido a su posición respectiva como se representa, estas bombas pueden impulsar ventajosamente (el flujo de) los fluidos en los elementos de tubería en lugar de impulsar los fluidos presentes en estos elementos de tubería, pudiendo dicho movimiento de impulso inducir un efecto colapsante del (de los) elemento(s) de tubería, que modificará la calidad del producto a recuperar.

15 El aparato de la presente invención comprende adicionalmente una (quinta) bomba 41 conectada en el extremo de los elementos de tubería 12 o 33, y que presenta un flujo de bombeo de aproximadamente 0,1 l/min a aproximadamente 1 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,3 l/min (conectada a través de una conexión de tipo Y (o de tipo T) a un elemento de tubería 42.

20 La (quinta) bomba 41 está conectada con un tanque 43 (una bolsa o un recipiente de un volumen adecuado) que contiene la solución de precipitación y está conectada a través de una conexión de tipo Y (o de tipo T) al inicio de los elementos de tubería 42.

Ventajosamente, las bombas del aparato de la invención son bombas peristálticas.

25 Estos elementos de tubería 42 también pueden comprender medios 44 para inducir (provocar) un efecto de Venturi (de mezclado).

30 Ventajosamente, este efecto de Venturi (de mezclado) (en los elementos de tubería 42 está causado (obtenido o provocado) por una reducción en su diámetro interno de aproximadamente 40 % (de aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 % del diámetro interno inicial).

35 Por efecto Venturi (de mezclado), se entiende una turbulencia obtenida de (inducida por) un sistema, en el que se hace pasar un fluido en flujo laminar, por el interior de un tubo reducido, en una extensión tal, que el fluido tiene una velocidad aumentada y justo después del diámetro reducido se produce una depresión.

40 Preferentemente, el medio para producir el efecto de Venturi (de mezcla) se coloca después de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 cm, preferentemente después de 5 a aproximadamente 20 cm, más preferentemente después de 9 a aproximadamente 30 cm del inicio de los elementos de tubería 33 y/o 42, preferentemente después de que el flujo en los elementos de tubería 33 y/o 42 sea laminar.

Ventajosamente, el (los) efecto(s) Venturi (de mezclado) de acuerdo con la invención, permite(n) una mezcla de fluidos viscosos (no newtonianos) que puede dar como resultado un líquido homogéneo adecuado.

45 Los elementos de tubería 42 tienen una longitud total de aproximadamente 1 m a aproximadamente 45 m, preferentemente de aproximadamente 5 m a aproximadamente 15 m, más preferentemente de aproximadamente 10 m a aproximadamente 14 m.

50 Los elementos de tubería 42 tienen un diámetro interno de aproximadamente 0,5 cm a aproximadamente 5 cm, preferentemente de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 2 cm, más preferentemente de aproximadamente 1,27 cm, excluyendo dicho medio para producir este efecto Venturi (de mezclado).

55 Preferentemente, el aparato de la invención comprende adicionalmente medios para pesar las (diferentes) soluciones de suministro presentes en los diferentes tanques (bolsas o recipientes).

La presente invención también se refiere a una nueva composición aislada y purificada (de sus contaminantes) que comprende esta molécula biológica de interés que puede obtenerse, preferentemente se obtiene, mediante el método indicado anteriormente descrito.

60 Más particularmente, esta molécula biológica purificada y aislada obtenida es un plásmido de ADN, incluyendo un plásmido de ADN que tiene un tamaño inferior a 3.000 bases (pares de bases).

65 Preferentemente, esta composición de ADN plasmídico, purificada y aislada de la invención, carece al menos de contaminantes: de ADN genómico, de ARN y comprende entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 unidades de endotoxina/mg de ADN (más preferentemente la composición de ADN plasmídico comprende aproximadamente 55 unidades de endotoxina/mg de ADN). Esta composición que también carece ventajosamente

de productos químicos (incluyendo RNasa) posiblemente añadidos a los medios usados en las diferentes etapas del método de la invención, también puede corresponder a una composición farmacéutica que comprende un transportador (o diluyente) farmacéutico adecuado y una cantidad suficiente de esta molécula biológica de interés, como se ha descrito anteriormente (purificada de sus contaminantes).

5 Ventajosamente, esta composición de ADN plasmídico, purificada y aislada de la invención, carece al menos libre de contaminantes: de ADN genómico, de ARN y comprende entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 100 (preferentemente entre aproximadamente 2y aproximadamente 10) unidades de endotoxina/mg de ADN. Esta composición, que también ventajosamente carece de productos químicos (incluyendo RNasa), posiblemente
10 añadidos a los medios usados en las diferentes etapas del método de la invención, también pueden corresponder a una composición farmacéutica que comprende un transportador (o diluyente) farmacéutico adecuado y una cantidad suficiente de esta molécula biológica de interés como se ha descrito anteriormente (purificada de sus contaminantes).

15 Como alternativa, el contenido de endotoxina de la composición de ADN plasmídico es de aproximadamente 55.

Posiblemente, el contenido de endotoxina de la composición de ADN plasmídico está comprendido entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2 unidades de endotoxina/mg de ADN.

20 Por el término "carece", se entiende que el contenido residual del contaminante de la composición es menor de 2 % (p:p), preferentemente menor de 1 % (p:p), o menor de 0,5 % o 0,1 % (p:p).

La presente invención se describe en referencia a las figuras que se adjuntan en los siguientes ejemplos preferidos presentados como realizaciones no limitantes de la presente invención.

25 Descripción detallada de la invención

La Fig. 1 ilustra el aparato o dispositivo de acuerdo con la invención y que permite realizar las etapas a a c del método de la presente invención y que es un conducto desechable de aproximadamente 45,6 metros de longitud, formado con tubos circulares (elementos de tubería).

30 Este aparato o dispositivo se provee en un elemento de tubería 2 que comprende las células recogidas a un flujo de 0,30 l/min. A aproximadamente 1,5 m, una bomba 11, con un flujo de bombeo de 0,30 l/min, se conecta a un tanque o un recipiente 13 que contiene una solución de lisis (para disgregar células), que está conectado al elemento de tubería 2 a través de un recinto de mezclado 4. El flujo es de 0,6 l/min.

35 Opcionalmente, a 21,3 m, otra bomba 31, con un flujo de bombeo de 0,6 l/min, está conectada a un tanque 32 que contiene una solución de neutralización que está conectado a través de una conexión de tipo Y (o de tipo T) y en el que se provoca una mezcla homogénea, no mecánica, mediante un efecto Venturi.

Después de aproximadamente 9,5 m, otra bomba 41, con un flujo de bombeo de 0,30 l/min y conectada con un tanque 43 que contiene la solución de precipitación que está conectado a través de una conexión de tipo Y (o de tipo T) y en el que se provoca una mezcla homogénea, no mecánica, mediante otro efecto Venturi.

40 Después de aproximadamente 11,8 m, existen medios para recoger la mezcla.

Ejemplos

Cultivo

45 Un vial de la semilla maestra GMP se retira del tanque de nitrógeno (-170 °C) y, antes de su proceder a su uso, se descongela a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se incuba en un medio adecuado usando agitación a 37 °C.

50 *Escherichia coli*, que tiene un plásmido de interés, se cultivó hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8 unidades.

Para inocular el fermentador, se selecciona un cultivo en las especificaciones (DO₆₀₀ - pureza).

Se toma una muestra del cultivo seleccionado para realizar ensayos de control de calidad (CC).

55 El pH se mantiene a 7,0 +/- 0,2 por adición periódica de NaOH y HNO₃. La temperatura se mantiene a 37 +/- 0,5 °C y el flujo de aire se fija a 1 vvm (=150 l/min); la presión se regula a 360 mbar y la agitación se fija a 700 RPM. Los parámetros de fermentación son constantes durante la fermentación. Si fuera necesario, se añaden pequeñas cantidades de antiespumante.

60 Después de 15 horas de fermentación, se toma una muestra cada hora para seguir la DO₆₀₀. Cuando la DO₆₀₀ alcanza al menos 35 unidades, el cultivo se enfría por debajo de 20 °C. Durante la etapa de enfriamiento, la agitación y el flujo de aire se reducen a 200 RPM y a 40 l/min, respectivamente.

65 Cuando la temperatura del cultivo está por debajo de 20 °C, se toma una muestra en condiciones estériles (para ensayos de CC) y el cultivo se centrifuga durante 20 min a 6700 g en dos centrifugas discontinuas Beckman Avanti J-20 dotadas de un rotor JLA-8.1000.

Los sedimentos se recogen y se mantienen a 4 °C hasta el final de la etapa de recogida (y centrifugación) del fermentador.

Después, los sedimentos se resuspenden en bolsas estériles para la lisis, o para su conservación a -20 °C.

5 Lisis y filtración

La escala de proceso documentada a continuación corresponde a 4.000 g de pasta celular reciente, equivalente a aproximadamente 1/3 del lote producido en el fermentador de 100 l.

10 Los 4.000 g de pasta celular reciente se descongelaron a 2-8°C durante 18 +/- 3 horas. La suspensión descongelada se diluyó en un tampón RM1 para obtener 40 l de suspensión (pasta celular 10 veces diluida).

15 La suspensión se introdujo después en el conducto a 0,3 l/min; véase la Fig. 1.

Ventajosamente, dado que el conducto es de un solo uso, no es necesario limpiarlo ni descontaminarlo.

20 La lisis (disgregación celular) se realizó usando un sistema continuo con 2 etapas de adición de tampón (RM2 60 l, NaOH 200 mM; SDS 1% p:v y RM3 100 l: CH₃COOK 3 M, CH₃COOH 15% v:v).

La primera etapa de lisis (disgregación celular) se realizó con la mezcla de la suspensión celular y de RM2 en un recinto de mezclado con un agitador orbital (usando una hélice de plástico (politetrafluoroetileno; PTFE) de un solo uso).

25 Los inventores observaron que, aunque la solución lisada (células disgregadas) era viscosa, se obtenía una homogeneización eficaz sin que se produjese ninguna degradación del plásmido.

30 Los inventores también optimizaron las longitudes de la tubería y el bombeo de flujo, para evaluar el tiempo de contacto medio óptimo de la célula y de la mezcla de lisis. Descubrieron que el sistema que desarrollaron era de corta duración, tal como inferior a 5 minutos, lo cual, ventajosamente, proporcionaba una contaminación reducida con ADN genómico, y observaron un tiempo óptimo de 2 o 3 minutos.

35 La segunda adición de tampón se realizó en el sistema de tubería aprovechando el efecto Venturi (de mezclado) que se producía en el elemento de tubería 33.

Los inventores observaron que, aunque la mezcla neutralizada era muy viscosa, el uso de un efecto Venturi producía una mezcla eficaz que se obtenía sin que se produjese la degradación del plásmido (sin la creación de fuerzas de cizalla alta en el líquido).

40 Dado que el proceso es continuo, el tiempo de contacto entre la suspensión celular y el medio RM2 es de 5 min, mientras que el tiempo de contacto entre las células lisadas (disgregadas) y el medio RM3 es de un minuto.

45 Después, a la suspensión neutralizada se le añadió una solución de CaCl₂·2H₂O 5 M ininterrumpidamente y el tiempo de contacto en el conducto fue de 1 minuto.

50 Ventajosamente, para garantizar este mezclado homogéneo no se necesitaba agitación, dado que el conducto descrito anteriormente incluía estructuras tubulares con efectos Venturi (de mezclado) y sorprendentemente permitía la formación de una solución homogénea, incluso después de la adición de esta solución tan viscosa. Por lo tanto, en la presente invención, no se observa degradación de las moléculas de ADN (que se sabe que se produce con un sistema de agitación fuerte o con fuerzas de alta cizalla, que se requieren dada la alta viscosidad de una solución de CaCl₂ 5 M).

55 La mezcla se recogió en una bolsa de 300 l y se conservó a 2-8°C o a temperatura ambiente durante una noche (20 +/- 4 horas) para permitir la sedimentación.

Los inventores observaron que los contaminantes sedimentaban (en una capa fina) y flotaban en la parte superior de la mezcla (en su mayoría). Por lo tanto, la fase clarificada estaba en la parte central de la bolsa de 300 l.

60 La fase clarificada (que representaba aproximadamente del 80 al 90 %) se bombeó delicadamente fuera de la bolsa de 300 l (minimizando los movimientos del líquido en la bolsa para impedir una resuspensión de los flóculos) y se recogió en un tanque de 200 l y adicionalmente se decantó durante al menos 20 minutos.

La fase clarificada se filtró sucesivamente en tres filtros, uno de 1,5 µm y dos de 0,2 µm.

65 La fase filtrada se recogió y se conservó.

ES 2 614 429 T3

La ultrafiltración se realizó en membranas de PES de 100 kDa o, como alternativa, en membranas de 70 kDa (para plásmidos más cortos de 3.000 pares de bases).

5 Los inventores midieron la pureza de una alícuota del plásmido retenido y observaron una contaminación de aproximadamente 50 a 100 unidades de endotoxina (UE)/mg de ADN, y más generalmente de aproximadamente 55 UE/mg de ADN. Los inventores llegaron a la conclusión de que este nivel era notable, ya que aún no se habían efectuado etapas de purificación real.

10 Por tanto, la solución ultrafiltrada se diafiltró.

La solución ultrafiltrada, sin contaminantes, se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico. Los inventores ensayaron diversas cromatografías de intercambio aniónico. El experto en la técnica puede encontrar fácilmente la más adecuada.

15 Se realizaron etapas de lavado con una solución de Tris (-HCl) 50 mM, NaCl 0,54 M, pH 8,5.

Opcionalmente, antes de efectuar las etapas de lavado con Tris (-HCl) 50 mM, NaCl 0,54 M, pH 8,5, se realizó un lavado con Tris (-HCl) 50 mM, NaCl 0,54 M, pH 8,5 complementado con Triton X-100 de 0,1 a 1 %.

20 La elución se realizó mediante un gradiente lineal, hecho mezclando una solución de Tris (HCl) 50 mM, pH 8,5 complementada con NaCl 0,54 M con una solución de Tris (HCl) 50 mM pH 8,5 complementada con NaCl 1 M.

El material eluido se ultrafiltró en una membrana de 30 kDa, después el retenido concentrado se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y el filtrado se recogió y se conservó a -20 C.

25 El nivel de ARN no puede detectarse con HPLC (por debajo del límite de detección). El contenido de proteína está por debajo de 10 µg/mg de plásmido.

30 Después de la etapa cromatográfica, los inventores midieron un contenido de endotoxina de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 unidades /mg de ADN.

35 La endotoxina se midió mediante el método cromogénico de lisado de amebocitos de *Limulus* (KQCL). Las endotoxinas activan una proenzima en el reactivo KQCL que cataliza la separación del sustrato cromogénico, que se mide ininterrumpidamente fotométricamente, a 405 nm, durante todo el periodo de incubación. Una correlación log/log entre el tiempo necesario para la aparición de color (tiempo de reacción) y la concentración de endotoxina es lineal de 0,005 a 50 UE/ml. La concentración de endotoxina en una muestra se calcula a partir de su tiempo de reacción por comparación con el tiempo de reacción de soluciones que contienen cantidades conocidas de patrón de endotoxina.

40 Cuando se realizó la etapa cromatográfica, el contenido de endotoxina disminuyó a aproximadamente 1,42 unidades /mg de ADN.

Como alternativa, cuando todo el proceso, incluyendo la etapa cromatográfica, se optimizó, el contenido de endotoxina disminuyó a aproximadamente 0,2 unidades/mg de ADN.

45 La recuperación de plásmido es de aproximadamente 30 %. Sin embargo, los inventores descubrieron que esta proporción podía aumentarse a costa de la pureza, y dependiendo de las necesidades del experimento, el experto en la técnica puede encontrar la mejor solución.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de un plásmido de ADN de interés, y que comprende las etapas de:
- 5 b) introducir células que contengan un plásmido de ADN de interés en un conducto y disgregarlas ininterrumpidamente, mezclando dichas células con una solución de lisis alcalina para formar células lisadas y realizar una etapa de neutralización de las células lisadas con una solución de neutralización que es una composición de ácido acético/acetato para formar una primera mezcla en la que el pH de dicha solución de neutralización está dentro del intervalo comprendido entre aproximadamente 5,0 y 6,0;
- 10 c) realizar ininterrumpidamente en el conducto, una precipitación de contaminantes de plásmidos de ADN, añadiendo a la primera mezcla de la etapa b), una solución que contenga una o más sales, para formar una segunda mezcla usando medios que provoquen un efecto Venturi, en el que dicha sal, o sales, se seleccionan del grupo que consiste en CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , SrCl_2 y BaCl_2 , LiCl , acetato de amonio, sulfato de amonio, sulfato de sodio y sulfato de magnesio o una mezcla de los mismos y en el que dicha una o más sales están en dicha solución añadida que contiene una o más sales, a una concentración comprendida entre 2 M y 6 M;
- 15 d) recuperar la segunda mezcla y permitir que se separe un precipitado de la solución de la segunda mezcla; y e) recuperar un material soluble, que comprenda el plásmido de ADN de interés, de la solución de la segunda mezcla, excluyendo al mismo tiempo la recuperación del precipitado de la segunda mezcla.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la sal añadida es CaCl_2 a una concentración comprendida entre 2 M y 6 M.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 anteriores, en el que el tiempo de contacto de las células disgregadas y de la solución de lisis alcalina está comprendido entre 15 segundos y 15 minutos.
- 25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 anteriores, en el que el tiempo de contacto de las células lisadas y de la solución de neutralización está comprendido entre 15 segundos y 5 minutos.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores, que adicionalmente comprende una etapa f) de realizar una etapa de filtración, del material soluble recuperado, sobre uno o más filtros que tienen un tamaño de poro comprendido entre 0,22 μm y 1,5 μm , posiblemente seguido de una ultrafiltración del material soluble sobre una membrana de 50 kDa a 500 kDa y recuperar un primer retenido que comprende el plásmido de ADN de interés.
- 30 6. El método de acuerdo la reivindicación 5, que adicionalmente comprende una etapa g) de realizar una cromatografía de intercambio aniónico del primer retenido.
7. El método de las reivindicaciones 5 o 6, que adicionalmente comprende una etapa h) de realizar una ultrafiltración del primer retenido sobre una membrana de 30 kDa, de recoger un segundo retenido y una filtración de este segundo retenido sobre una membrana de 0,22 μm para recoger el plásmido de ADN de interés.
- 40 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 anteriores, en el que las etapas del método se realizan a temperatura ambiente, preferentemente a una temperatura comprendida entre 15 °C y 35 °C.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 anteriores, en el que las etapas b) y c) (método) se realizan de manera ininterrumpida usando bombas peristálticas y en el que dichos flujos de bombeo se controlan pesando los viales de las soluciones de suministro.
- 45 10. El método de la reivindicación 1 a 9 en el que, antes de la etapa b), el método comprende la etapa a) de cultivar células que comprendan uno o más plásmidos de ADN de interés y recoger dichas células.
- 50 11. Un aparato para realizar el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 anteriores, que está formado por tuberías circulares, comprendiendo dicho aparato:
- una bomba (1) con un flujo de bombeo comprendido entre 0,1 l/min a 1 l/min y que está conectada a un vial (3) que contiene una mezcla de células y a un elemento de tubería (2);
 - un recinto de mezclado (4);
 - una bomba (11), que tiene un flujo de bombeo comprendido entre 0,1 l/min y 1 l/min, estando dicha bomba (11) unida a un tanque (13) y a los otros elementos del dispositivo, a través de dicho recinto de mezclado;
 - un elemento de tubería (12) que comienza desde dicho recinto de mezclado (4), que tiene un diámetro interno comprendido entre 0,5 cm y 5 cm y una longitud comprendida entre 5 m a 60 m;
 - opcionalmente, una bomba (31), unida a un tanque (32) y conectada al extremo de los elementos de tubería (12), unidos a través de una conexión de tipo Y o de tipo T para formar un elemento de tubería (33), y que tiene preferentemente un flujo de 0,2 a 3 l/min;
 - una bomba (41) unida a un tanque (43), estando dicha bomba (41) conectada en el extremo de los elementos de tubería (12 o 33), teniendo dicha bomba (41), un flujo de bombeo comprendido entre 0,1 l/min y 1 l/min y estando unida a través de una conexión de tipo Y o tipo T a elementos de tubería (42);
- 65

- en el que los elementos de tubería (42) tienen una longitud total comprendida entre 1 m y 50 m y un diámetro interno comprendido entre 0,5 cm y 5 cm.

5 12. El aparato de la reivindicación 11, que adicionalmente comprende medios (34, 44) para provocar un efecto Venturi en los elementos de tubería (33 o 42).

13. El aparato de la reivindicación 11 o 12, en el que las bombas son bombas peristálticas.

10 14. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 anteriores, que adicionalmente comprende medios para pesar las diferentes soluciones de suministro.

Figura 1

