

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 418**

51 Int. Cl.:

G02B 6/293 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2008 PCT/US2008/064726**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2008 WO08148010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2008 E 08756211 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2153260**

54 Título: **Composición que comprende alta concentración de moléculas biológicamente activas y procesos para preparar la misma**

30 Prioridad:

23.05.2007 US 939792 P

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

06.07.2017

73 Titular/es:

**VGXI, INC. (100.0%)
2700 Research Forest Drive, Suite 180
The Woodlands, TX 77381, US**

72 Inventor/es:

**DRAGHIA-AKLI, RUXANDRA;
HEBEL, HENRY y
CAI, YING**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 622 418 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

Composición que comprende alta concentración de moléculas biológicamente activas y procesos para preparar la misma

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para producir composiciones a granel que comprenden plásmidos de bajo número de copias en altas concentraciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Existen numerosos usos de moléculas biológicamente activas producidas en y aisladas de células. La Publicación de Estados Unidos serie No. 20050014245, describe dispositivos y métodos para la producción de biomateriales. Las moléculas biológicamente activas incluyen proteínas y moléculas de ácido nucleico. La producción de tales moléculas en células vivas ofrece numerosas ventajas sobre los métodos de producción alternativos, pero surgen problemas de aislamiento y purificación cuando se extraen moléculas biológicamente activas de las células. Existen varios componentes presentes en las células que impiden la realización de rendimientos elevados de moléculas biológicamente activas de interés, así como la representación de posibles contaminantes no deseados para un producto final.

La producción de plásmidos es un campo de interés debido a la aparición de los campos de terapia génica no viral y de vacuna de ADN. Los plásmidos son macromoléculas grandes y complejas, que se mantienen como estructuras de ADN superenrolladas a menos que se interrumpan. En lugar de usar medios sintéticos, en muchos casos es más rentable producirlos en sistemas biológicos, y posteriormente aislarlos y purificarlos de esos sistemas. La producción biológica de plásmidos asume comúnmente la forma de células de *Escherichia coli* ("*E. coli*") que fermentan con el plásmido de interés.

La lisis celular y las etapas de tratamiento subsiguientes utilizadas para preparar una corriente de proceso para la purificación, son los pasos más difíciles, complejos e importantes en cualquier procedimiento de plásmido. Es en este proceso donde se definen el rendimiento y la calidad para cada ciclo de producción del plásmido. La búsqueda de un método óptimo, que sea continuo, escalable y que produzca un producto de alta calidad que pueda formularse a alta concentración independientemente del tamaño del plásmido, ha sido un obstáculo para conseguir procesos aceptables a la capacidad comercial.

La lisis de bacterias para la purificación de plásmidos usando álcali y detergentes es una técnica común. Desafortunadamente, este método presenta desafíos significativos para preparaciones a gran escala (o producción ampliada). En primer lugar, la mezcla completa de las células suspendidas con la solución de lisis se maneja fácilmente a pequeña escala simplemente agitando con vórtice o invirtiendo el recipiente que contiene las células. Sin embargo, esto no es práctico a gran escala, donde los volúmenes pueden estar en el rango de decenas o cientos de litros. Las técnicas comunes para mezclar grandes volúmenes de líquido, tales como la mezcla con impulsor, son problemáticas porque a medida que algunas células comienzan a sufrir lisis después de la mezcla inicial, liberan ADN genómico que aumenta drásticamente la viscosidad de la solución. Este aumento en la viscosidad interfiere significativamente con la mezcla posterior. Otro desafío es que una incubación excesiva a pH alto después de la adición de una solución de lisis alcalina puede conducir a una desnaturalización permanente del plásmido, haciéndolo inadecuado para la mayoría de los usos posteriores, especialmente con fines terapéuticos. Además, es bien sabido que la mezcla en esta etapa debe ser completa pero suficientemente suave (es decir, con baja cizalladura) para evitar cantidades sustanciales de material de precipitado floculante en la solución que contiene el plásmido. Grandes cantidades de ADN genómico del huésped y endotoxinas están presentes en el precipitado floculante y si se mezclan con el plásmido pueden ser difíciles de separar del plásmido durante la posterior purificación. Por lo tanto, la producción a gran escala de plásmidos expone grandes cantidades de células a la solución de lisis, los mezcla y neutralizar el lisado de una manera que se optimice el rendimiento del plásmido, minimizar la degradación del plásmido y maximizar la eliminación de otros componentes celulares de modo que el material pueda ser purificado adicionalmente para producir un producto final de alta concentración, alta calidad y alta pureza en volúmenes relativamente grandes.

Hay una variedad de métodos existentes para purificar plásmidos; sin embargo, estos métodos no son adecuados para preparaciones a gran escala. Las técnicas de purificación a escala de laboratorio no pueden simplemente ampliarse para los volúmenes implicados en la preparación de plásmidos a gran escala. Las preparaciones a gran escala requieren la optimización del rendimiento y la integridad molecular al tiempo que maximicen la eliminación de los contaminantes y la concentración del plásmido. En la producción de grandes cantidades de ADN plasmídico a alta concentración, existe un problema de mantenimiento del plásmido como forma relajada de círculo superenrollado y abierto. Las condiciones de almacenamiento requieren generalmente alta concentración de sal y la degradación molecular con el tiempo sigue siendo un problema incluso en presencia de sal. Muchos métodos de purificación existentes dependen del uso de sustancias potencialmente peligrosas, tóxicas, mutagénicas o contaminadas, y/o sustancias o equipos caros, que, de nuevo, no son deseables para preparaciones a gran escala.

Algunos métodos de purificación existentes utilizan el uso de la enzima para digerir la proteína para su eliminación final y tales enzimas son costosas para la producción a gran escala y pueden causar un riesgo de contaminación biológica.

5 Sigue existiendo la necesidad de métodos de producción a gran escala de moléculas biológicamente activas de interés, tales como plásmidos, en los que el producto final pueda producirse de una manera rentable, tales como equipamiento mínimo y/o etapas mínimas de proceso, con alto rendimiento, alta concentración y degradación mínima y sin presencia de impurezas, contaminantes y sustancias no deseadas. Sigue existiendo la necesidad de grandes cantidades de soluciones de plásmidos que tengan alta concentración y degradación mínima y presencia de impurezas, contaminantes y sustancias no deseadas y métodos para preparar tales soluciones. La necesidad de grandes cantidades de plásmidos es mayor para aquellos plásmidos que son plásmidos de bajo número de copias, los cuales requieren cantidades mucho mayores de células para producir cantidades de plásmido en el intervalo de miligramos ("mg") y superiores.

15 RESUMEN DE LA INVENCION

El objeto para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

20 Un aspecto de la presente invención comprende procedimientos a gran escala para producir muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias de células bacterianas. Los procesos a gran escala comprenden las etapas de:

25 a) producir una solución de lisado poniendo en contacto una suspensión celular de dichas células bacterianas que comprende dichos plásmidos de bajo número de copias con solución de lisis;

b) neutralizar dicha solución de lisado con una solución neutralizante para producir una dispersión que comprende solución de lisado neutralizado y residuos y en donde el fluido de dispersión se mantiene durante menos de una hora para separar la solución de lisado neutralizado;

30 c) filtrar la dispersión a través de al menos un filtro;

d) realizar la separación de intercambio iónico sobre dicha solución de lisado neutralizado para producir un eluido de intercambio iónico; y

35 e) realizar la separación de interacción hidrófoba sobre dicho eluido de intercambio iónico para producir una solución de interacción hidrófoba;

40 en el que la etapa a) comprende mezclar dicha suspensión de células con una solución de lisis en un mezclador en línea de alto cizallamiento;

en el que la etapa b) comprende mezclar dicha solución de lisado con dicha solución neutralizante en un mezclador de burbujas; y

45 en el que la etapa e) comprende realizar la separación de interacción hidrófoba usando una columna de interacción hidrófoba o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba;

en el que el método comprende la transición de una etapa a una etapa subsiguiente sustancialmente continua.

50 En algunas realizaciones de este aspecto, los procedimientos a gran escala incluyen además la etapa de preparar una solución de al menos una molécula biológicamente activa por ultrafiltración de dicha solución de interacción hidrófoba.

55 Un aspecto adicional de la presente invención comprende procedimientos a gran escala para producir muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias de células bacterianas, que comprende las etapas de: poner en contacto las células bacterianas que comprenden dichos plásmidos de bajo número de copias en una dispersión de células con solución de lisis para formar una solución de lisado; neutralizar la solución de lisado mezclando una mezcla neutralizada y en donde el fluido de dispersión se mantiene durante menos de una hora para separar la solución de lisado neutralizado; filtrar la mezcla neutralizada a través de un filtro primario y un filtro secundario para formar una solución filtrada; pasar la solución filtrada a través de una columna de intercambio iónico para formar una solución de intercambio iónico; pasar la solución de intercambio iónico a través de una columna de interacción hidrófoba o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba; y ultrafiltración de la solución de interacción hidrófoba para formar una muestra de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias; en el que cada transición de un paso a un paso subsiguiente en el proceso a gran escala desde el paso de contacto hasta el paso de la etapa de solución filtrada se produce sustancialmente de manera continua.

En un aspecto de la presente descripción, se proporcionan composiciones que comprenden al menos una molécula biológicamente activa de interés preparada por el método descrito y divulgado en el presente documento, en el que al menos una molécula biológicamente activa de interés es un plásmido de ADN. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden al menos un plásmido de ADN en una cantidad de aproximadamente 10 mg o más en solución, en donde la alta pureza de dichos plásmidos son los plásmidos que están presentes en más del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los numerosos objetos y ventajas de la presente invención pueden ser mejor comprendidos por los expertos en la técnica haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra un esquema de una realización que se usa para aislar y purificar moléculas biológicamente activas de interés de células bacterianas en un proceso de flujo continuo.

La figura 2 muestra una imagen de un gel electroforético que incluye muestras del Ejemplo 1, a continuación. El carril 1 representa la escalera de plásmido superenrollada (Invitrogen); carril 2 el lisado celular; producto del carril 3 después del intercambio de aniones Q; carril 4 el producto después de la purificación con interacción hidrófoba; y el carril 5 el producto final mezclado después de UF.

La figura 3 muestra una imagen de un gel electroforético que incluye muestras del Ejemplo 3. El carril 1 representa la escalera de plásmido superenrollada (Invitrogen); el carril 2 representa el lisado después de la filtración primaria usando un cartucho de pliegue de 48 µm; el carril 3 representa el filtrado después de la filtración secundaria utilizando un cartucho de pliegue de 1 µm; el carril 4 representa el filtrado después de una tercera filtración usando un filtro C0HC Pod; el carril 5 representa la fracción #1 de producto eluido después de pasar por la etapa de intercambio de aniones Mustang Q; y el carril 6 representa la fracción secundaria del eluido Q.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS

Se proporcionan métodos para purificar moléculas biológicamente activas de interés a partir de células de forma que purifiquen moléculas biológicamente activas de interés a altos niveles de pureza y concentraciones a partir de las células. Las moléculas biológicamente activas de interés son plásmidos de número de copias bajos o plásmidos de ADN. Las células pueden ser cualesquiera células que contengan moléculas biológicamente activas de interés. En algunas realizaciones, las células son células microbianas tales como por ejemplo células procariotas tales como células bacterianas. En algunas realizaciones, son células de *E. coli*. Las células pueden ser producidas o generadas por cualquier medio, tal como por ejemplo por fermentación. Los métodos para fermentar células son bien conocidos por los expertos en la técnica. La presente invención puede emplearse para extraer plásmidos de bajo número de copias de células. También se describen en el presente documento métodos para aislar cualquier molécula biológicamente activa de interés de las células. En algunas realizaciones de la descripción, los procedimientos pueden emplearse para extraer más de un tipo de molécula biológicamente activa de interés. Las moléculas biológicamente activas de interés pueden ser una macromolécula tal como una molécula o proteína de ácido nucleico.

El término "plásmido" o "plásmido de ADN", utilizado indistintamente, se refiere a moléculas de ADN circulares que son moléculas de ADN extracromosómicas separadas del ADN cromosómico que son capaces de replicarse independientemente del ADN cromosómico. Una secuencia codificante o transgén se encuentra a menudo dentro del plásmido de ADN, y cuando está presente, el plásmido de ADN se denomina plásmido de expresión o construcción de expresión. La secuencia codificante, o "secuencia de ácido nucleico que codifica", puede incluir señales de iniciación y terminación operativamente ligadas a elementos reguladores que incluyen una señal promotora y de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico.

El término "a gran escala", como se utiliza en referencia a los procedimientos descritos, se refiere a procedimientos de purificación que producen, a partir de células bacterianas o una suspensión de cantidades de células bacterianas de al menos una molécula biológicamente activa, en particular un plásmido de ADN, desde aproximadamente 1 gramo o más y/o procedimientos de purificación que requieren la lisis de cantidades de pasta de células bacterianas de aproximadamente 1 kilogramo o más.

El término "alta pureza", tal como se utiliza en referencia al nivel de pureza de las moléculas biológicamente activas, en particular el plásmido de ADN, se refiere a la purificación de las moléculas de las células bacterianas huésped a un nivel de al menos aproximadamente 90%; y preferiblemente mayor o igual a aproximadamente 91%, mayor o igual que aproximadamente 92%, mayor o igual que aproximadamente 93%, mayor o igual que aproximadamente 94%, mayor o igual que aproximadamente 95%, mayor que o igual a aproximadamente 96%, mayor o igual que aproximadamente 97%, mayor o igual que aproximadamente 98%, o mayor o igual que aproximadamente 99%.

El término "continuo" o "sustancialmente continuo", tal como se utiliza en referencia a los procedimientos aquí

- 5 descritos, se refiere a un flujo continuo de materiales (o solución o dispersión) entre cada etapa del proceso de purificación a cada paso subsiguiente, partiendo del comienzo del proceso de purificación hasta la etapa de carga de la columna de cromatografía de intercambio iónico. Por ejemplo, cuando las células bacterianas de una dispersión se ponen en contacto con la solución de lisis en la etapa de contacto para formar una solución de lisado, dicha solución de lisado fluirá directamente en la siguiente etapa de neutralización con la solución de neutralización. Estas transiciones continuas entre etapas eliminan una etapa de mantenimiento o incubación entre las etapas del proceso de purificación.
- 10 El término “molécula biológicamente activa” se refiere a una molécula o una biomolécula contenida dentro de la bacteria que está en su estado funcional y, en algunas realizaciones, se refiere en particular a un plásmido de ADN. Tales plásmidos de ADN se pueden aislar y utilizar para transfectar células de interés. Las composiciones de la presente invención comprenden al menos un tipo de molécula biológica activa. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden más de un tipo de moléculas biológicamente activas.
- 15 Los plásmidos varían ampliamente en su número de copias dependiendo del origen de replicación que contienen, por ejemplo, pMB1 o pSC101, que determina si están bajo control relajado o estricto; así como el tamaño del plásmido y sus secuencias insertadas asociadas. Algunos plásmidos, como la serie pUC y derivados, tienen mutaciones que les permiten alcanzar números de copias muy altos dentro de la célula bacteriana. Los plásmidos basados en pBR322 se mantienen generalmente con números de copias más bajos. Los plásmidos muy grandes a menudo se mantienen a un número de copias muy bajo por célula. Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a un procedimiento de purificación de plásmidos que permite purificar plásmidos de células, preferiblemente células bacterianas, a gran escala para producir grandes cantidades de plásmido, tales como cantidades de gramo, en un proceso de fabricación rentable y de mínimos pasos (con el fin mantener mayores rendimientos). Los procedimientos de la presente invención producen muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias. Para los propósitos del proceso proporcionado y las moléculas biológicamente activas resultantes producidas, un plásmido de número de copias bajo es un plásmido que logra un número de copias menor o igual a aproximadamente 300, inferior o igual a aproximadamente 100, menor o igual a aproximadamente 50, inferior o igual a aproximadamente 20, inferior o igual a aproximadamente 10, o inferior o igual a aproximadamente 5.
- 30 Un aspecto de la presente invención comprende procedimientos a gran escala para producir muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias de células bacterianas. Los procesos comprenden las etapas de:
- 35 a) producir una solución de lisado poniendo en contacto una suspensión celular de dichas células bacterianas que comprende dichos plásmidos de bajo número de copias con solución de lisis;
- b) neutralizar dicha solución de lisado con una solución neutralizante para producir una dispersión que comprende solución de lisado neutralizado y residuos y en donde el fluido de dispersión se mantiene durante menos de una hora para separar la solución de lisado neutralizado;
- 40 c) filtrar la dispersión a través de al menos un filtro;
- d) realizar la separación de intercambio iónico sobre dicha solución de lisado neutralizado para producir un eluido de intercambio iónico; y
- 45 e) realizar la separación de interacción hidrófoba sobre dicho eluido de intercambio iónico para producir una solución de interacción hidrófoba;
- 50 en el que la etapa a) comprende mezclar dicha suspensión de células con una solución de lisis en un mezclador en línea de alto cizallamiento;
- en el que la etapa b) comprende mezclar dicha solución de lisado con dicha solución neutralizante en un mezclador de burbujas; y
- 55 en el que la etapa e) comprende realizar la separación de interacción hidrófoba usando una columna de interacción hidrófoba o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba;
- en el que el método comprende la transición de una etapa a una etapa subsiguiente sustancialmente continua.
- 60 Los procedimientos a gran escala comprenden una etapa de producción de solución de lisado que comprende mezclar dicha suspensión celular con solución de lisis en un mezclador en línea de alto cizallamiento.
- 65 En algunas realizaciones, la etapa de producción comprende poner en contacto la suspensión de células con la solución de lisis en un mezclador durante una duración de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos, preferiblemente de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 8 minutos, y más preferiblemente de aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, la etapa de separación de interacción hidrófoba de realización comprende realizar la separación de interacción hidrófoba usando una columna de interacción hidrófoba

o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba. La etapa de separación de interacción hidrófoba puede ser la separación de la molécula biológicamente activa de interés uniéndose a una membrana o columna de interacción hidrófoba, que permite que las impurezas fluyan o se eliminen por lavado. En algunas realizaciones, la molécula biológicamente activa de interés puede fluir a través de una columna de interacción hidrófoba mientras las impurezas se unen. En algunas realizaciones, las moléculas biológicamente activas de interés fluyen a través de una membrana de interacción hidrófoba (o membrana HIC) (denominada en el presente documento "Método I"). En algunas realizaciones, las moléculas biológicamente activas de interés se unen a una columna HIC, tal como una columna de butilo (denominada en el presente documento "Método II"). En algunas realizaciones, puede usarse una combinación de membrana HIC y columna HIC, tal como una columna de butilo (denominada en el presente documento como "Método III") para producir a gran escala cantidades de moléculas biológicamente activas de interés con alta pureza, a nivel de gramos o cantidades mayores de plásmidos de ADN. En algunas realizaciones, la separación de interacción hidrófoba comprende separación usando al menos cromatografía de interacción hidrófoba butílica para producir una solución de interacción hidrófoba que es un eluido en solución de cromatografía de interacción hidrófoba butílica.

En algunas realizaciones, los procedimientos a gran escala descritos pueden incluir además una etapa de preparación de una solución de al menos una molécula biológicamente activa por ultrafiltración de dicha solución de interacción hidrófoba. Además, puede realizarse una etapa de preparación de una solución estéril de moléculas biológicamente activas por filtración estéril de dicha solución de moléculas biológicamente activas.

Los procedimientos a gran escala incluyen una etapa de mantenimiento que requiere mantener la dispersión durante un periodo de tiempo para separar la solución de lisado neutralizado de los desechos y, a continuación, filtrar la solución de lisado neutralizado a través de al menos un filtro.

En algunas realizaciones, la ejecución de la etapa de separación de intercambio iónico se ejecuta utilizando una membrana de intercambio aniónico. Preferiblemente, la etapa de separación de intercambio iónico comprende el uso de una columna de intercambio iónico, y preferiblemente utilizando un cartucho Mustang® Q.

En algunas realizaciones, los procesos a gran escala incluyen procedimientos continuos o se hace referencia como un proceso continuo a gran escala para la producción de plásmidos de número de copias de alta pureza de bajo número de copias de células bacterianas. El método comprende la transición de una etapa a una etapa subsiguiente del proceso a gran escala de manera sustancialmente continua y comprende separar la solución de lisado neutralizado de los desechos en la dispersión recogiendo el lisado en un recipiente y pasar la dispersión a través de un filtro primario para producir una solución de lisado bruto neutralizado. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además el paso de la primera solución de lisado bruto neutralizado a través de un filtro secundario para producir una solución de lisado neutra bruta subsiguiente.

En una realización, la presente invención comprende procedimientos a gran escala para producir muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias de células bacterianas, que comprende las etapas de: poner en contacto las células bacterianas que comprenden plásmidos de bajo número de copias en una dispersión de células con solución de lisis para formar una solución de lisado; neutralizar la solución de lisado mezclando una solución de neutralización en la solución de lisado con un mezclador de columna de burbujas para formar una mezcla neutralizada y en donde el fluido de dispersión se mantiene durante menos de una hora para separar la solución de lisado neutralizado; filtrar la mezcla neutralizada a través de un filtro primario y un filtro secundario para formar una solución filtrada; pasar la solución filtrada a través de una columna de intercambio iónico para formar una solución de intercambio iónico; pasar la solución de intercambio iónico a través de una columna de interacción hidrófoba o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba; y ultrafiltración de la solución de interacción hidrófoba para formar una muestra de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias; en el que cada transición de un paso a un paso subsiguiente en el proceso a gran escala desde el paso de contacto hasta el paso de la etapa de solución filtrada se produce sustancialmente de manera continua.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan composiciones que comprenden moléculas biológicamente activas de interés preparadas por los procedimientos a gran escala descritos aquí, en donde las moléculas biológicamente activas de interés son plásmidos de ADN. En algunas realizaciones las composiciones comprenden plásmidos de ADN en una cantidad de aproximadamente 10 mg o más en solución, donde la alta pureza de dichos plásmidos son los plásmidos que están presentes en más del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. La concentración de plásmido puede ser de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 mg/ml. Algunas composiciones incluyen plásmido a un nivel de más del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%, y preferiblemente un plásmido superenrollado superior al 80%. Algunas composiciones contienen menos de o igual a 10 endotoxinas EU por mg de plásmido, y algunas realizaciones, las composiciones, inferiores o iguales a aproximadamente 1 endotoxina UE por mg de plásmido. Algunas realizaciones inferiores o iguales a aproximadamente 0.1 EU endotoxina por mg de plásmido. En algunas realizaciones, las composiciones incluyen solución que contiene menos o igual a aproximadamente 1.0% de ARN o menor o igual que aproximadamente 0.4% de ARN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones incluyen solución que contiene menos o igual a aproximadamente 1.0% de proteína, preferiblemente menor o igual que aproximadamente 0.20% de proteína. En algunas realizaciones, las

composiciones incluyen solución que contiene menos o igual a aproximadamente 1% de ADN genómico, preferiblemente menor o igual que aproximadamente 0.01% de ADN genómico.

5 Un ejemplo de una realización de la presente invención que incluye muchas de las etapas de procedimiento proporcionadas en el presente documento, incluye las siguientes etapas: primera etapa, se producen y se recogen células de interés; segundo paso, las células se lisan para liberar sus contenidos, incluyendo las moléculas biológicamente activas de interés, en solución; tercera etapa, se separan restos de células sólidas y componentes de células precipitadas del fluido que contiene al menos una molécula biológicamente activa de interés; cuarta etapa, las soluciones que contienen las moléculas biológicamente activas de interés se someten a cromatografía de intercambio iónico; quinto paso, el material parcialmente purificado resultante de la cromatografía de intercambio iónico se somete a cromatografía de interacción hidrófoba; sexta etapa, el material resultante de la cromatografía de interacción hidrófoba se somete a ultrafiltración y diafiltración, para concentrar al menos un tipo de moléculas biológicamente activas de interés, y para eliminar el exceso de sales de la solución; en el séptimo paso, el producto concentrado y desalado se somete opcionalmente a filtración estéril, para hacerla adecuada para usos farmacéuticos, incluyendo, por ejemplo, administración intramuscular, administración intravenosa, administración intranasal, suministro intracardíaco, suministro de aerosol, administración transdérmica, la administración al músculo, la electroporación *in vivo* facilitó la administración al tejido subcutáneo o intradérmico, así como otros métodos conocidos de administración farmacéutica.

20 Algunas realizaciones de la invención incluyen las etapas del proceso descritas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a, el funcionamiento de una combinación de etapas en un modo continuo que da como resultado la escala de producción que no está limitada por las etapas de mantenimiento del proceso. Tales procedimientos permiten la producción de biomoléculas de grado farmacéutico a gran escala, por ejemplo producción de aproximadamente 1 gramo o más de plásmido. Algunas realizaciones de la invención excluyen el uso de cualesquiera materiales o procedimientos que puedan resultar perjudiciales para la producción a gran escala o productos farmacéuticos incluyen, por ejemplo, la inclusión de enzimas, desnaturalización por calor, separación mecánica (máquinas que hacen tal separación), por ejemplo aparatos de centrifugación, o disolventes orgánicos o volátiles, por ejemplo, isopropanol.

30 Las células de interés pueden ser producidas y cosechadas tal como por medios rutinarios de fermentación y recolección. Está bien dentro de las capacidades de un experto en la técnica preparar cantidades suficientes de las células de interés. Por ejemplo, las células pueden ser *E. coli* que contienen un plásmido de alto número de copias de interés y las células que contienen plásmido pueden fermentarse a alta densidad usando técnicas por lotes o lotes de alimentación. Los métodos para preparar dichas células de *E. coli* que contienen plásmido y realizar tal fermentación discontinua o alimentada por lotes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las células pueden recogerse mediante medios rutinarios tales como centrifugación o filtración para formar una pasta celular. Tales métodos de recolección son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los expertos en la técnica reconocerán que las células cosechadas o la pasta celular pueden ser procesadas inmediatamente o almacenadas en un estado congelado o refrigerado para su procesamiento en una fecha posterior.

40 Las células cosechadas pueden ser lisadas usando una solución de lisis para liberar su contenido, incluyendo las moléculas biológicamente activas de interés, en una solución de lisado.

45 Generalmente, antes de lisar las células, la pasta celular puede usarse para preparar una suspensión de células que contienen la molécula biológicamente activa de interés. Las células pueden suspenderse en cualquier solución adecuada. La suspensión que contiene las células en solución de suspensión puede mantenerse en un tanque u otro recipiente de almacenamiento. Pueden utilizarse dos recipientes en los que el segundo recipiente se puede usar para resuspender cantidad adicional de células mientras que el primer recipiente se usa en el proceso de lisis. La solución en suspensión puede, en algunas realizaciones, contener una concentración moderada de regulador, una concentración moderada de un agente quelante, o ambos. En algunas realizaciones, la solución en suspensión puede comprender aproximadamente 25 mM Tris-hidrocloruro ("Tris-HCl") y aproximadamente 10 mM edetato disódico ("Na₂EDTA"), a un pH de aproximadamente 8. En algunas realizaciones, la suspensión celular puede ser preparada suspendiendo un peso conocido de pasta celular con un peso conocido de regulador de suspensión. Por ejemplo, una parte de la pasta celular puede ser resuspendida en aproximadamente 4-10 partes de regulador, en algunas realizaciones con aproximadamente 6-8 partes de regulador. En algunas realizaciones, la densidad óptica de la suspensión celular resultante puede ser de aproximadamente 50-80 unidades OD₆₀₀. En algunas realizaciones, puede ser de aproximadamente 60-70 unidades OD₆₀₀.

60 Una solución de lisis preferiblemente contiene uno o más agentes de lisis, tales como un álcali, un ácido, una enzima, un disolvente orgánico, un detergente o una mezcla de los mismos. Sin embargo, no se prefiere el uso de enzimas o disolventes orgánicos derivados de animales, ya que son perjudiciales para la producción de productos farmacéuticos. En algunas realizaciones, la solución de lisis comprende un álcali, un detergente o una mezcla de los mismos. Los álcalis adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Los detergentes pueden ser no iónicos, catiónicos o aniónicos. Los detergentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, dodecilsulfato de sodio ("SDS"), Tritón, Tween o agentes de tipo pluriónico (copolímeros de bloques a base de etilenoóxido y propilenoóxido). La selección de un álcali o detergente adecuado estará dentro de los conocimientos

normales de la técnica. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender hidróxido sódico ("NaOH") y SDS. En algunas realizaciones, la concentración de NaOH puede ser de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3 N, y en algunas realizaciones, aproximadamente 0.2 N. En algunas realizaciones, la concentración de SDS puede ser de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5%, y en algunas realizaciones aproximadamente 1 %. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede mantenerse en un tanque u otro recipiente de almacenamiento.

La suspensión celular y la solución de lisis se pueden combinar para lisar las células y producir una solución de lisado. En algunas realizaciones, se combinan, mezclan y mantienen como una mezcla durante un tiempo suficiente para facilitar altos niveles de lisis de células y liberación de materiales biológicos, formando de esta manera la solución de lisado.

En algunas realizaciones, la suspensión celular y la solución de lisis se mantienen en tanques separados y se recuperan desde dichos tanques usando una o más bombas. La suspensión celular y la solución de lisis pueden ponerse en contacto entre sí usando un conector "Y". En algunas realizaciones, volúmenes iguales de suspensión celular y solución de lisis pueden ser bombeados a velocidades de flujo iguales usando una bomba de cabeza doble. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que la suspensión celular y la solución de lisis de diferentes volúmenes pueden ser bombeadas a diferentes velocidades, usando bombas individuales, si se desea. En algunas realizaciones, la suspensión de células y la solución de lisis se bombean simultáneamente a través de una bomba de cabeza doble frp, de aproximadamente 0.3 L/min a aproximadamente 2 L/min, con los fluidos de contacto que salen del conector "Y" a una velocidad de aproximadamente 0.6 L/min a aproximadamente 4 L/min. Los expertos en la técnica reconocerán que estas velocidades de flujo pueden aumentarse o disminuirse fácilmente, y el tamaño del tubo aumentado o disminuido, para satisfacer cualquier requerimiento de rendimiento. Después de salir del conector "Y", la suspensión de células y la solución de lisis contactadas pueden pasar a través de un mezclador en línea de alto cizallamiento. El mezclador puede ser cualquier dispositivo que proporcione un mezclado rápido y de alto cizallamiento en un modo de flujo continuo (en oposición a un modo discontinuo). En algunas realizaciones, el mezclador es un mezclador rotor/estátor o un emulsionante. Los expertos en la técnica reconocerán que una variedad de tales mezcladores en línea de alto cizallamiento están disponibles comercialmente. El uso de cualquiera de tales mezcladores está dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, el mezclador es un mezclador rotor/estátor Silverson L4R equipado con una pantalla Emulsor estándar (Silverson Machines, Inc. East Longmeadow, MA) y un ensamblaje en línea. El rotor puede ser operado a una velocidad tal como de aproximadamente 500 rpm a aproximadamente 900 rpm, 500-600 rpm, de aproximadamente 500 rpm a aproximadamente 700 rpm, de aproximadamente 500 rpm a aproximadamente 800 rpm, de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 700 rpm, de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 800 rpm, de aproximadamente 600 rpm a aproximadamente 900 rpm, de aproximadamente 700 rpm a aproximadamente 800 rpm o de aproximadamente 700 rpm a aproximadamente 900 rpm. Tal mezclador es adecuado para procesar suspensiones de células de aproximadamente 0.3 L/min a aproximadamente 2 L/min. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que los mezcladores a gran escala pueden ser sustituidos para procesar volúmenes sustancialmente mayores de suspensión de células. Dicha sustitución será fácilmente realizada por un experto en la técnica sin más que la experimentación ordinaria. El uso de un mezclador en línea de alto cizallamiento facilita la mezcla completa y rápida de la suspensión celular y la solución de lisis, poniendo las células en contacto íntimo con el agente o agentes de lisis para lograr una lisis eficaz. Además, los mezcladores pueden adaptarse fácilmente a diferentes velocidades de flujo de fluido, y proporcionan la flexibilidad de la mezcla de velocidad ajustable para diferentes velocidades de flujo. Los materiales que salen del mezclador en línea de alto cizallamiento pueden entonces pasar a través de una bobina de retención. Esta bobina puede comprender simplemente una longitud de tubo suficiente para proporcionar que el fluido pase a través de la bobina durante un tiempo determinado. La función de la bobina es proporcionar un tiempo de contacto suficiente entre las células y el(los) agente(s) de lisis para asegurar una lisis sustancialmente completa. Al mismo tiempo, la bobina asegura que el tiempo de contacto no sea tan largo como para tener consecuencias negativas. En algunas realizaciones, tales como aquellas en las que las células son células que contienen plásmido y la solución de lisis comprende un álcali, es deseable asegurar que la exposición a álcali dura el tiempo suficiente para lograr una lisis celular sustancialmente completa así como una desnaturalización sustancialmente completa de proteínas, ADN genómico y otros componentes celulares. Sin embargo, también es deseable que la exposición a álcali no se prolongue de tal manera que resulte en cantidades sustanciales de plásmido permanentemente desnaturalizado. La bobina puede ser una tubería completa, o segmentada en 2-10 tubos para permitir la flexibilidad de las ratas de flujo de fluido. La bobina de retención permite controlar este tiempo de contacto. En algunas realizaciones, este tiempo de contacto puede ser de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, este tiempo de contacto puede ser de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 9 minutos, de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 8 minutos, de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 7 minutos, de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 6 minutos, de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 9 minutos, de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 8 minutos, de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 7 minutos, de aproximadamente 3 minutos a aproximadamente 6 minutos, de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente de 4 minutos a 9 minutos, de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 8 minutos, de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 7 minutos, de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 6 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 9 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 8 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 7 minutos, o de

aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 6 minutos. Preferiblemente, el tiempo de contacto es de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 8 minutos o de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 6 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo de contacto es de aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, la longitud y el diámetro de la bobina de retención son tales que el tiempo de exposición deseado se alcanza cuando las células lisadas se fluyen a través a la velocidad deseada. En algunas realizaciones, la bobina de retención puede ser de aproximadamente 10 pies de longitud a aproximadamente 150 pies de longitud, de aproximadamente 25 pies de longitud a aproximadamente 100 pies de longitud, o de aproximadamente 40 pies de longitud a aproximadamente 60 pies de longitud. En algunas realizaciones, la bobina de retención tiene aproximadamente 50 pies de longitud, y en algunas realizaciones la bobina de retención es de aproximadamente 100 pies de longitud. La bobina de retención puede tener un diámetro interior de aproximadamente 0.5 pulgadas a aproximadamente 2 pulgadas, y en algunas realizaciones 0.625 pulgadas. También en algunas realizaciones, las células lisadas pueden salir del mezclador en línea de alto cizallamiento y pasar a través de la bobina de retención a una velocidad de aproximadamente 100 mL/min a aproximadamente 10 L/min, de aproximadamente 200 mL/min a aproximadamente 8 L/min, de aproximadamente 300 mL/min a aproximadamente 6 L/min, de aproximadamente 400 mL/min a aproximadamente 4 L/min, de aproximadamente 400 mL/min a aproximadamente 2 L/min, o de aproximadamente 600 mL/min a aproximadamente 1.2 L/min. Preferiblemente, la velocidad a través de la bobina de retención es de aproximadamente 0.6 L/min a aproximadamente 10 L/min. En algunas realizaciones preferidas, la velocidad de paso a través de la bobina de retención es de aproximadamente 600 mL/min y en algunas realizaciones es de aproximadamente 1200 mL/min. El ajuste de la longitud y el diámetro de la bobina puede ser realizado por un experto en la técnica para acomodar o ajustar el caudal mayor a medida que se aumenta la producción de moléculas biológicamente activas. La solución de lisado se recoge de la bobina de retención.

La solución de lisado se neutraliza combinándola con una solución neutralizante (que también se denomina solución de precipitación neutralizante) para producir una dispersión que comprende solución de lisado neutralizado y escombros. La dispersión resultante puede entonces mantenerse para facilitar la separación de la solución de lisado neutralizado de los desechos.

En algunas realizaciones, la solución de lisado, que comprende las células lisadas, puede neutralizarse mezclándola con una solución neutralizante en una cámara de neutralización. Esta neutralización de la solución de lisado se puede facilitar mezclando en la cámara de neutralización. En algunas realizaciones, esta neutralización puede ser seguida por una mezcla de burbujas en un mezclador de columna de burbujas. Preferiblemente, la neutralización ocurre junto con la mezcla de burbujas en un mezclador de columna de burbujas. En algunas realizaciones, la solución de lisado que sale de la bobina de retención puede entrar en un mezclador de columna de burbujas mientras simultáneamente una bomba puede suministrar una solución de neutralización/precipitación desde otro tanque al mezclador de columna de burbujas. En algunos ejemplos, también simultáneamente, el gas comprimido de otro tanque puede ser rociado en el fondo del mezclador de columna de burbujas. En algunas realizaciones, la solución de lisado puede entrar en la columna en el fondo desde un lado, mientras que la solución de neutralización/precipitación puede entrar en el fondo desde el lado opuesto. El gas comprimido puede ser inyectado a través de un rociador sinterizado diseñado para suministrar burbujas de gas sustancialmente uniforme a través de la sección transversal de la columna. La solución de lisado, que comprende las células lisadas, y la solución de neutralización fluyen verticalmente por la columna y salen a través de un orificio de salida en el lado cerca de la parte superior. El paso de las burbujas de gas a través de la columna vertical de líquido sirve para mezclar la disolución de lisado con la solución de neutralización/precipitación. La mezcla proporcionada por las burbujas de gas ascendentes es cuidadosa pero suave y de bajo cizallamiento. A medida que la solución de neutralización/precipitación se mezcla con las células lisadas de la solución de lisado, los componentes celulares se precipitan a partir de la solución. Se puede proporcionar un respirador en la parte superior del mezclador de columna de burbujas para ventilar el exceso de gas.

En algunas realizaciones, la solución de lisado comprende células que contienen plásmido lisadas con un álcali, un detergente o una mezcla de los mismos, y la solución de neutralización/precipitación neutraliza el álcali y precipita componentes de células hospedadoras tales como proteínas, membranas, endotoxinas y ADN genómico. En algunas realizaciones, el álcali puede ser NaOH, el detergente puede ser SDS, y la solución de neutralización/precipitación puede comprender acetato de potasio, acetato de amonio o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la solución de neutralización/precipitación puede comprender una solución sin regulador que contiene aproximadamente 1 M de acetato de potasio y de aproximadamente 3 M a aproximadamente 7 M de acetato de amonio. El uso de tal solución de neutralización/precipitación produce una suspensión con un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, que es preferible a un pH ácido porque las condiciones ácidas pueden conducir a la depuración del ADN. En algunas realizaciones, la solución de neutralización/precipitación puede proporcionarse en una forma enfriada de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C.

El mezclador de columna de burbujas proporciona el mezclado en una manera de bajo cizallamiento y evita así la liberación excesiva de ADN genómico y endotoxinas en la solución de lisado neutralizado. Un experto en la técnica será capaz de determinar velocidades adecuadas para fluir gas a través del mezclador de columna de burbujas. Los caudales de gas se pueden utilizar a aproximadamente 2 litros estándar por minuto a aproximadamente 20 litros estándar por minuto ("slpm"). Puede utilizarse cualquier gas adecuado, incluyendo, pero no limitado a, aire, nitrógeno, argón y dióxido de carbono. El gas puede ser aire comprimido filtrado.

La combinación de solución de lisado y solución de neutralización da como resultado la generación de una dispersión que contiene solución de lisado neutralizado y residuos. La solución de lisado neutralizado puede recogerse en un tanque u otro recipiente de almacenamiento. En algunas realizaciones, el recipiente se enfría a 5-10°C. El tiempo de retención del lisado neutralizado en el recipiente es inferior a 1 hora. En una realización, se empleó un período de retención suficiente para conseguir una separación sustancialmente completa del residuo celular de la solución de lisado neutralizado, resultando ventajoso el lisado bruto obtenido de partículas sólidas limitadas para el proceso subsiguiente de clarificación. Sin embargo, la escala de proceso se limita al tanque de retención de lisado bruto y el tiempo de proceso es alargado por este periodo de retención.

Con el fin de conseguir una purificación a gran escala de un producto de plásmido de bajo rendimiento, el período para la retención de lisado neutralizado puede reducirse a menos de 1 hora. En algunas realizaciones, la solución de lisado neutralizado puede procesarse simultáneamente en el momento en que se genera, por lo que el tiempo de retención en el recipiente es insignificante. En algunas realizaciones, la solución de lisado se procesa simultáneamente por el siguiente proceso después de un período de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos de recoger el lisado en el recipiente. La reducción o eliminación del tiempo de retención del lisado también elimina el límite de la capacidad del proceso por los envases ya que el lisado se procesa inmediatamente en su generación.

La solución de lisado neutralizado puede aclararse con cualquier aproximación de separación sólido/líquido, por ejemplo, filtración de bolsas, filtración de cartuchos, centrifugación por lotes, centrifugación continua. La eliminación completa de las partículas en la solución es deseable para evitar la obstrucción de la membrana o columna en los siguientes procesos de purificación. Al mismo tiempo, el lisado no puede ser sometido a un cizallamiento excesivo que fragmentará el ADN genómico y provocará la liberación de ADN genómico, ADN genómico triturado, endotoxina y otros contaminantes que se liberarán en la solución que contiene el plásmido. La filtración por lotes puede usarse para procesar un pequeño volumen de lisado, pero poco práctico a gran escala. La centrifugación continua también es inadecuada debido a que el precipitado puede someterse a un alto esfuerzo cortante y liberar un alto nivel de contaminante a la solución. En algunas realizaciones se puede utilizar una serie de filtraciones que emplean diferentes grados de medio filtrante. La filtración primaria se puede usar para eliminar la mayoría de los flocúlos de células grandes en tamaños de micrones, mientras que la filtración secundaria consecutiva retiene las partículas finas restantes. Puede realizarse una tercera filtración opcional cuando se desea una claridad estricta para el siguiente proceso y la filtración secundaria es insuficiente.

En algunas realizaciones, se pueden emplear filtros de bolsa y cartucho debido a su alta capacidad de retención de contaminación y una perturbación mínima a la solución. Las bolsas de filtro o cartucho pueden ser de cualquier tamaño, forma, clasificación de tamaño de poro, configuración y tipo de medio. Se prefiere que el medio filtrante esté hecho de materiales de grado farmacéutico o que cumplan con los requisitos de la Food and Drug Administration (FDA). El material de filtro también se prefiere que no tenga carga o que tenga una unión limitada del producto. El límite de tamaño de partícula de los materiales de filtro puede variar desde aproximadamente 0.1 µm hasta unos pocos cientos de micras, con la condición de que sea mayor que el tamaño del producto diana que el producto no sea retenido por el medio filtrante. Los filtros de bolsa y los medios de filtro de cartucho pueden ser de una sola capa, multicapa, plisado o plisado múltiple.

En algunas realizaciones, se pueden usar dos o más filtros con clasificaciones de tamaño de poros similares en paralelo para acomodar el proceso a gran escala. La mayoría de las partículas sólidas en la solución de lisado, incluyendo la pared celular y los componentes de membrana, los precipitados, el ADN genómico, la proteína, los lípidos, los lipopolisacáridos y otros contaminantes, se eliminarán por filtración. Sin embargo, cuando la filtración primaria es insuficiente para proporcionar una solución de la claridad deseada, se puede colocar posteriormente una filtración secundaria con un tamaño de poro reducido o una tasa de retención más alta. En algunas realizaciones, dos o más filtros secundarios pueden colocarse en paralelo para acomodar el proceso a gran escala. El uso de múltiples filtros puede ser requerido en un proceso a gran escala, y un experto en la técnica reconocerá que se pueden variar fácilmente detalles tales como el número de filtros usados, así como sus límites de tamaño de partícula.

En algunas realizaciones, la dispersión puede recogerse y mantenerse en un tanque de sedimentación para permitir que los residuos se precipiten o floten. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la dispersión puede recogerse como una suspensión de lisado celular bruto y componentes de células huésped precipitado del mezclador de columna de burbujas y mantenerse en un tanque de sedimentación para permitir que los residuos se precipiten o floten. La dispersión puede mantenerse, tal como conservarse en el depósito de decantación, durante un tiempo suficiente para conseguir una separación sustancialmente completa de los componentes de la célula huésped precipitada, que constituyen los residuos, de la solución de lisado neutralizado. Los componentes precipitados pueden elevarse a la superficie de la dispersión, ayudados por las burbujas de gas atrapadas introducidas por el mezclador de columna de burbujas. En algunas realizaciones, la dispersión puede mantenerse en el depósito de sedimentación durante aproximadamente 6 a aproximadamente 24 horas, en algunas realizaciones de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 18 horas. En algunas realizaciones, la dispersión puede enfriarse a menos de aproximadamente 15°C durante el período de mantenimiento, en algunas realizaciones de

aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C, para ayudar a precipitar el ARN u otras impurezas. En algunas realizaciones, la dispersión se puede mezclar suavemente durante el período de mantenimiento, tal como por un mezclador impulsor que funciona a una velocidad muy baja, preferiblemente de aproximadamente 15 rpm a aproximadamente 25 rpm.

5 En algunas realizaciones, se puede aplicar un vacío al recipiente que contiene la dispersión, tal como, por ejemplo, un tanque de sedimentación. Esto ayuda a llevar los componentes precipitados a la superficie del líquido. Además, esto compacta el precipitado/desecho floculento flotante, ayudando a su posterior eliminación y también permitiendo que un mayor porcentaje de solución de lisado neutralizado sea recuperado en etapas posteriores. Además, esto
10 elimina el aire atrapado en una solución que puede contaminar etapas posteriores de cromatografía. En algunas realizaciones, el vacío aplicado puede ser de aproximadamente 15 pulgadas de Hg a aproximadamente 30 pulgadas de Hg (pulgadas•Hg), en algunas realizaciones, de aproximadamente 20 en Hg a aproximadamente 30 pulgadas•Hg, y en algunas realizaciones, de aproximadamente 25 en Hg a aproximadamente 30 pulgadas•Hg. En algunas realizaciones, el vacío puede mantenerse a lo largo de este período de mantenimiento. El vacío se puede aplicar usando una bomba de vacío, o cualquier otro dispositivo de vacío disponible o de presión negativa disponible. En
15 algunas realizaciones, antes de comenzar la separación sólido/líquido, cualquier vacío aplicado al depósito se libera cuidadosamente. El lisado de células en bruto, es decir, la solución de lisado neutralizado, se recoge después del tanque usando una bomba y se pasa a través de un filtro en profundidad y un filtro final, y después se recoge en un tanque de retención. En algunas realizaciones, el tanque de sedimentación está provisto de un visor, que permite al operador observar la posición del nivel de líquido y los componentes de célula huésped precipitados compactados. El bombeo de material desde el tanque se controla visualmente, y se detiene antes de que los componentes precipitados de la célula huésped entren en la línea. Esto evita la obstrucción de los filtros subsiguientes. No se requiere filtración de bolsas (o filtración de cartuchos) o centrifugación. Además, la alteración de los desechos minimiza de este modo la liberación de componentes tales como ADN genómico o endotoxinas en la solución de lisado neutralizado. Después de que la solución de lisado neutralizado se bombea desde el tanque de sedimentación, se puede hacer pasar a través de uno o más filtros para eliminar partículas finas. En algunas realizaciones, se pueden usar aproximadamente de uno a aproximadamente tres filtros en serie, con el primer filtro eliminando partículas más grandes, y filtros subsiguientes quitando partículas sucesivamente más pequeñas. En algunas realizaciones, se pueden usar dos filtros en serie. En algunas realizaciones, el primer filtro es un filtro de profundidad de prefiltración con un límite de tamaño de partícula de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 15 µm, preferiblemente de aproximadamente 7.5 µm a aproximadamente 12 µm, o más preferiblemente de aproximadamente 9 µm a aproximadamente 11 µm. En algunas realizaciones, el filtro de profundidad de prefiltrado tiene un límite de tamaño de partícula de aproximadamente 10 µm. El segundo filtro es preferiblemente un filtro de membrana con un corte de aproximadamente 0.01 µm a aproximadamente 0.25 µm, o preferiblemente de aproximadamente 0.05 µm a aproximadamente 0.15 µm. En algunas realizaciones, el filtro de membrana tiene un corte de aproximadamente 0.1 µm. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que se pueden variar fácilmente detalles tales como el número de filtros usados, así como sus límites de tamaño de partícula.

40 Una amplia selección de filtros está comercialmente disponible en diferentes proveedores. Un tipo particular es los filtros de cartón plisados serie 720 (filtros CPI, Houston, TX), que demostraron una gran capacidad de sujeción de la contaminación y una capacidad de procesamiento superior. Las bolsas de filtro de múltiples capas de alta eficiencia, tales como las series 300 y 500 (Knight Corporation, Houston, TX) han mostrado una considerable retención a partículas finas. Las bolsas de filtro PROGAF™ (Eaton Filtration, Cleveland, OH) con un diseño de densidad progresiva de hasta 12 capas de medio pueden proporcionar alta eficiencia en la eliminación de partículas con una variedad de tamaños. En algunas realizaciones, una combinación de filtración de cartucho plisada seguida por filtración de cartucho multicapa o plisada puede proporcionar el mejor rendimiento para la clarificación de partículas en la solución de lisado neutralizado.

50 Los filtros de cartucho o filtros de bolsa se prefieren para ser montados en los alojamientos de filtro o recipientes de filtro para la facilidad de operación y capacidad de proceso más alta. El material del recipiente puede ser acero inoxidable de tipo 304 o 316, o acero carbón, mientras que todas las carcasas de plástico con una opción de policloruro de vinilo (PVC), cloruro de polivinilo cloruro (CPVC), poliéster plástico (PPL) o la construcción de fluoruro de polivinilideno (PVDF) pueden ser ventajosas para aplicaciones ultrapuras o corrosivas. Los recipientes de filtro pueden ser diseñados a medida o fácilmente disponibles de varios fabricantes. Por ejemplo, Eaton Filtration (Cleveland, OH) ofrece una amplia selección de carcasas/recipientes diseñados para satisfacer cualquier aplicación exigente, como TOPLINE, SIDELINE, DUOLINE, MODULINE, POLYLINE, FLOWLINE, ECOLINE, MAXILINE. Un experto en la técnica será capaz de determinar la construcción y las características de la carcasa del filtro para acomodarse a los requisitos del proceso.

60 Opcionalmente, después de la filtración secundaria puede aplicarse un filtro adicional de profundidad o filtro de membrana. Se prefiere que el filtro tenga un corte de aproximadamente 0.1 µm a aproximadamente 0.2 µm para la eliminación adicional de partículas finas en la solución de lisado neutralizado. Los filtros de cartucho, tales como Vanguard PP y Alpha PP de Meissner (Camarillo, CA), Clarigard de Millipore (Billerica, MA), HP y PreFlow de Pall (East Hills, NY), pueden contemplarse como desechables o con la ayuda de alojamientos. Sin embargo, la mayoría de estos filtros de cartucho están limitados por su capacidad de proceso, especialmente en los formatos desechables. Preferible es el uso de componentes desechables que pueden ofrecer un formato escalable para

acomodar aplicaciones a gran escala. Millipore (Billerica, MA) ha desarrollado un sistema de filtro de profundidad desechable de alto rendimiento, Millistak+ Pod, para las aplicaciones en el laboratorio o en escala de proceso. El medio de filtro en los filtros de vaina está compuesto de fibra de celulosa de grado selecto y tierra de diatomeas, y se demuestra que tiene gran retención de contaminantes y retención superior. El diseño del disco apilado de la ayuda del formato de la vaina por el sostenedor inoxidable permitió la filtración grande del área superficial en espacios apretados. Un experto en la técnica puede determinar el grado de medio y el área de membrana del filtro Pod para satisfacer necesidades de operación específicas.

La solución clarificada de lisado neutralizado, que contiene las moléculas biológicamente activas de interés, puede someterse luego a cromatografía de intercambio iónico, incluyendo cromatografía en columna o basada en membrana. Preferiblemente, se puede usar un enfoque basado en membrana, tal como cromatografía de membrana de intercambio aniónico. Por ejemplo, la solución de lisado neutralizado puede aplicarse a una membrana de intercambio iónico. De acuerdo con algunas realizaciones, la molécula biológicamente activa de interés puede entrar en contacto con una membrana por lo que la molécula biológicamente activa de interés puede unirse a la membrana, mientras que las impurezas fluyen o son eliminadas de la membrana, separando así la molécula biológicamente activa de interés de las impurezas. Alternativamente, la molécula biológicamente activa de interés puede fluir a través de la membrana, mientras que las impurezas son retenidas. En algunas realizaciones, la molécula biológicamente activa de interés se une a la membrana y, después de lavar para eliminar las impurezas unidas débilmente, la molécula biológicamente activa de interés se eluye de la membrana. La elución se puede conseguir fluyendo una solución salina a través de la membrana. La solución salina tiene una resistencia, concentración o conductividad suficiente para superar la unión de la molécula biológicamente activa de interés a la membrana. La molécula biológicamente activa de interés se recupera así en el eluido de intercambio iónico.

Aunque cualquier membrana de intercambio iónico puede ser adecuada, en algunas realizaciones se puede usar una membrana de intercambio aniónico tal como una membrana de intercambio aniónico fuerte, que comprende grupos amina cuaternarios. Ejemplos de tales membranas incluyen, pero no pueden limitarse a, Mustang Q (Pall Corporation, East Hills, NY), Sartobind Q (Sartorius, Edgewood, NY) e Intercept Q (Millipore Corporate, Billerica, MA).

En algunas realizaciones, las células que contienen plásmido se lisan y neutralizan para producir una solución de lisado neutralizado que puede procesarse mediante purificación de membrana de intercambio aniónico que comprende la purificación usando un cartucho Pall Mustang Q (Pall Corporation, East Hills, NY). En algunas realizaciones, la solución de lisado neutralizado puede ajustarse a una conductividad de aproximadamente menos de 95 mS/cm, o aproximadamente 85 mS/cm, por dilución con una cantidad adecuada de agua purificada. La conductividad puede ser ajustada de aproximadamente 80 mS/cm a aproximadamente 85 mS/cm en algunas realizaciones. Para la dilución se puede utilizar agua purificada igual a aproximadamente 1.5 veces el volumen del lisado para conseguir la conductividad deseada. El cartucho Mustang® Q se puede acondicionar fluyendo una solución de sal adecuada a través de ella. En algunas realizaciones, la solución puede comprender desde aproximadamente cloruro de sodio 0.5 M a aproximadamente cloruro de sodio 1.0 M ("NaCl") y en algunas otras realizaciones NaCl 0.67 M. La solución de equilibrio también puede incluir un agente tamponador, un agente quelante o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, esta solución de equilibrio/lavado puede comprender, además de NaCl 0.67 M, Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 1 mM, con un pH de 8. En algunas realizaciones, la solución de equilibrio/lavado puede ser bombeada a través del cartucho a aproximadamente 800 mL/min a aproximadamente 1500 mL/min. La disolución de lisado neutralizado diluido puede ser bombeada sobre el cartucho, en algunas realizaciones a menos de aproximadamente 4800 mL/min, en algunas realizaciones de aproximadamente 2000 mL/min a aproximadamente 20.000 mL/min. El cartucho cargado puede lavarse con un regulador de equilibrio/lavado, preferiblemente a un caudal de aproximadamente 800 mL/min a aproximadamente 1500 mL/min. El lavado puede continuar en algunas realizaciones hasta que la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) del efluente vuelva a aproximadamente la línea de base. El plásmido puede eluirse con una solución que comprende NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 1 mM, y pH 8. La elución puede realizarse en algunas realizaciones a un caudal de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 9000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 8000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 7000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 6000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 5000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 4000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 3000 mL/min, de aproximadamente 500 mL/min a aproximadamente 2000 mL/min, de aproximadamente 600 mL/min a aproximadamente 5000 mL/min, de aproximadamente 600 mL/min a aproximadamente 4000 mL/min, de aproximadamente 600 mL/min a aproximadamente 3000 mL/min, de aproximadamente 600 mL/min a aproximadamente 2000 mL/min, o de aproximadamente 600 mL/min a aproximadamente 1500 mL/min. En algunas realizaciones la elución se continúa hasta que la A₂₆₀ del eluido vuelve a aproximadamente la línea de base. Los expertos en la técnica reconocerán que las velocidades de flujo pueden aumentarse fácilmente utilizando grandes áreas de membrana y que las concentraciones de sales específicas de las soluciones enumeradas pueden alterarse para maximizar el rendimiento y la pureza de biomoléculas específicas utilizando no más que la experimentación ordinaria. El eluido recogido es un eluido de intercambio iónico y se utiliza en la purificación subsiguiente por etapas de interacción hidrófoba.

El eluido de intercambio iónico recuperado de la membrana de intercambio iónico se somete a purificación por

cromatografía de interacción hidrófoba (en el presente documento, "HIC"). En algunas realizaciones, la molécula biológicamente activa de interés puede unirse a la membrana o columna HIC, mientras que las impurezas fluyen a través de o se lavan. En algunas realizaciones, la molécula biológicamente activa de interés puede fluir mientras las impurezas se unen. En algunas realizaciones, la molécula biológicamente activa de interés fluye a través de una membrana HIC (denominada en el presente documento "Método I"). En algunas realizaciones, las moléculas biológicamente activas de interés se unen a una columna HIC, tal como una columna de butilo (denominada en el presente documento "Método II"). En algunas realizaciones, puede usarse una combinación de membrana HIC y columna HIC, tal como una columna de butilo (denominada en el presente documento como "Método III") para producir cantidades a gran escala de molécula biológicamente activa de interés con alta pureza.

El eluido de intercambio iónico puede acondicionarse antes de fluir sobre la membrana de interacción hidrófoba. Típicamente, el acondicionamiento consiste en añadir una cantidad deseada de una sal deseada. En algunas realizaciones, el sulfato de amonio puede usarse en una cantidad adecuada para proporcionar la unión del producto o de las impurezas, según se desee. Típicamente, en los métodos III, no es necesario ningún acondicionamiento para el filtrado de HIC antes de cargar a la columna de butilo.

En algunas realizaciones, el eluido de intercambio iónico se produce por cromatografía de intercambio aniónico utilizando un cartucho Pall Mustang® Q y se purifica adicionalmente mediante interacción hidrófoba. En algunas realizaciones, se puede usar una membrana HIC tal como una cápsula Pall Kleenpak™ Nova (Pall Corporation, East Hills, NY) con filtros Supor PES. El cartucho puede acondicionarse fluyendo una solución de equilibrio/lavado que comprende la concentración de sulfato de amonio a través de él. En algunas realizaciones, la solución de equilibrio/lavado comprende de aproximadamente 1 M de sulfato de amonio a aproximadamente 3 M de sulfato de amonio y en algunas realizaciones comprende 2.4 M sulfato de amonio y 10 mM Tris-HCl a aproximadamente pH 8. En algunas realizaciones, la conductividad de la solución de lavado es de aproximadamente 240 mS/cm a aproximadamente 260 mS/cm. En algunas realizaciones, la conductividad de la solución de equilibrio/lavado es de aproximadamente 240 mS/cm a aproximadamente 300 mS/cm, en algunas realizaciones y la solución de equilibrio/lavado es de aproximadamente 250 mS/cm a aproximadamente 270 mS/cm y en algunas realizaciones la solución de equilibrio/lavado es de aproximadamente 245 mS/cm a aproximadamente 255 mS/cm. En algunas realizaciones, una columna HIC empleada puede ser una columna que está empaquetada con resina de Toyopearl butil 650M (Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA). En algunas realizaciones, la columna puede equilibrarse con una solución compuesta de aproximadamente 1.5 M de sulfato de amonio a aproximadamente 3.0 M de sulfato de amonio. En algunas realizaciones, la columna puede equilibrarse con una solución compuesta de sulfato de amonio 2.5 M y Tris-HCl 10 mM.

Las membranas de interacción hidrófobas pueden ser cualquier membrana que se una a moléculas biológicamente activas de interés o impurezas basadas principalmente en interacciones hidrófobas. Ejemplos de membranas HIC incluyen, pero se limitan a filtros de polietersulfona de supor de Pall ("PES"), filtros de PVDF, filtros de cápsulas GE PES y membranas hidrófilas similares con baja unión a proteínas y amplia compatibilidad química. Las resinas HIC típicas incluyen, pero sin limitación, butilo, hexilo, fenilo, octilo, propilo, neopentilo, hidroxipropilo, bencilo, metilo y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, el eluido de intercambio iónico puede acondicionarse por dilución con sulfato de amonio 3 M o 4.1 M para elevar la conductividad entre aproximadamente 240 mS/cm hasta aproximadamente 290 mS/cm, y en algunas realizaciones, de aproximadamente 245 mS/cm hasta aproximadamente 255 mS/cm. Cuando se utiliza el método HIC I, el eluido de intercambio iónico diluido puede fluir a través del cartucho HIC acondicionado, a una velocidad de flujo, en algunas realizaciones, de aproximadamente 100 mL/min a aproximadamente 200 mL/min. El flujo a través puede ser recogido para posterior ultrafiltración/diafiltración. Opcionalmente, el cartucho HIC se puede lavar con agua y la solución de lavado se recupera para analizar los contaminantes eliminados del producto. Cuando se utiliza el método II, el eluido de intercambio iónico diluido puede cargarse en la columna a una velocidad de flujo de 10-20 litros de volumen/minuto (BV/min). La molécula biológicamente activa de interés puede lavarse, tal como desde aproximadamente sulfato de amonio 1.0 M hasta aproximadamente sulfato de amonio 2.5 M hasta que la absorbancia vuelve a la línea de base, después se eluye con, por ejemplo sulfato de amonio 0.5 a 2.0 M. Las impurezas pueden separarse con agua estéril para inyección (WFI) para que la columna pueda regenerarse para un uso repetible. El método III utiliza una membrana HIC como se describe en el método I, seguido de columna HIC como se describe en el método II. La elección del método I, II o III depende de los requisitos de propiedad y calidad del producto, que puede ser determinado por un experto en la materia. Usando cualquier método HIC, se genera un eluido HIC que contiene el material biológicamente activo de interés. Los expertos en la técnica reconocerán que las velocidades de flujo se pueden aumentar fácilmente usando grandes áreas de membrana o diámetros de columna y que las concentraciones de sales específicas de las soluciones enumeradas pueden ser alteradas para maximizar el rendimiento y la pureza de biomoléculas específicas usando no más que ordinarias experimentación.

Opcionalmente, el material biológicamente activo de interés, que está presente en el eluido de HIC, puede purificarse adicionalmente. En algunas realizaciones, el eluido HIC puede someterse a ultrafiltración/diafiltración para concentrar el material biológicamente activo de interés, eliminar las sales en exceso y, si se desea, cambiar la composición del diluyente. Los métodos para realizar la ultrafiltración/diafiltración son bien conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, se utiliza filtración de flujo tangencial. En algunas realizaciones, se

utilizan métodos discontinuos.

Las membranas de ultrafiltración/diafiltración pueden seleccionarse basándose en el corte nominal del peso molecular ("NMWCO") para retener el material biológicamente activo de interés en el retenido, permitiendo a los materiales de bajo peso molecular tales como sales pasar al filtrado. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar tales membranas basándose en el tamaño y naturaleza del producto de interés, acoplado con no más que la experimentación ordinaria. En algunas realizaciones, tales como algunas realizaciones cuando el material biológicamente activo de interés es un plásmido, la ultrafiltración/diafiltración se puede llevar a cabo usando una unidad de Pall Centramate (Pall Corporation, East Hills, NY) o Millipore Pellicon® XL (Millipore Corporate, Billerica, MA) o una unidad con características similares y las membranas utilizadas pueden ser casetes de membrana de pantalla suspendida Pall Omega™ (Pall Corporation, East Hills, NY) o casetes de membrana de pantalla media Millipore (Millipore Corporate, Billerica, MA) o uno similar conocido en la técnica con un NMWCO de 100 kD o 50 kD. En algunas realizaciones, el plásmido puede concentrarse hasta al menos aproximadamente 2.5 mg/mL, en algunas realizaciones hasta al menos aproximadamente 5.0 mg/mL, en algunas realizaciones a al menos aproximadamente 10.0 mg/mL, mientras que en otras realizaciones la concentración es al menos 12.5 mg/mL, y en otras realizaciones la concentración es de al menos 15 mg/ml o más. En algunas realizaciones, la conductividad de la solución de plásmido concentrada es menor que aproximadamente 50 mS/cm.

El material biológicamente activo desalado concentrado de interés recuperado en el retentado de la ultrafiltración/diafiltración puede someterse opcionalmente a filtración estéril, si se desea un producto estéril. Los métodos para la filtración estéril son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se puede seleccionar cualquier método de este tipo. El material resultante consiste en un producto biológicamente activo purificado sustancialmente. El producto puede usarse para una variedad de propósitos, incluyendo, pero sin limitarse a, aplicaciones farmacéuticas, veterinarias o agrícolas. Por lo tanto, los métodos proporcionan una preparación en masa de moléculas biológicamente activas sustancialmente purificadas. Estas moléculas pueden ser plásmidos. En algunas realizaciones, pueden ser plásmidos que están sustancialmente libres de ADN genómico, ARN, proteína y endotoxina.

En algunas realizaciones, tales como las realizaciones en las que la molécula biológicamente activa es un plásmido, la filtración estéril puede preferiblemente realizarse usando un filtro Pall AcroPak™ 200 (Pall Corporation, East Hills, NY) con un corte de 0.22 µm.

El ADN plasmídico producido por el procedimiento proporcionado ha mostrado una alta pureza y contaminaciones extremadamente bajas. En algunas realizaciones, la alta pureza del ADN plasmídico es el ADN plasmídico presente a niveles mayores o iguales al 90%, mayores o iguales al 91%, mayores o iguales al 92%, mayores o iguales al 93%, superior o igual al 94%, superior o igual al 95%, superior o igual al 96%, superior o igual al 97%, superior o igual al 98%, superior o igual al 99%. Es evidente que la pureza puede caracterizarse por un nivel bajo de contaminantes, incluyendo niveles bajos de ARN, ADN genómico, endotoxina y proteína. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico puede estar en cantidades de aproximadamente 10 mg o más, 20 mg o más, 30 mg o más, 100 mg o más, 200 mg o más, 300 mg o más, 500 g o más, 1 g o más, 10 g o más, 20 g o más, 30 g o más, 100 g o más, 200 g o más, 300 g o más, 1 kg o más, o 2 kg o más. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico puede estar en una concentración de 1 mg/mL o más. La figura 1 muestra un esquema de una realización del proceso de fabricación.

La realización muestra un proceso continuo que se utiliza para tomar una muestra dada de células y que tiene las mismas etapas de procesos de purificación desde el comienzo, incluyendo las etapas de lisis y neutralización, hasta las etapas de separación (es decir, inicio del intercambio iónico cromatografía) en un flujo continuo de muestra. Las células se resuspenden en solución de resuspensión contenida en un tanque de suspensión celular 101. La solución de lisis está contenida en un tanque 102 de disolución de lisis. La suspensión celular y la solución de lisis se bombean en las dos entradas de un conector "Y" con la bomba 104 o 105, respectivamente. La solución que sale del conector "Y" se mezcló mediante un mezclador 107 en línea de alto cizallamiento. La solución de lisado que sale del mezclador 107 pasa a través de una bobina 108 de retención durante un período de retención de 4-6 minutos. La solución de lisis/mezcla de células que sale de la bobina de retención entra en un mezclador 109 de columna de burbujas mientras que simultáneamente una bomba 106 suministra solución de neutralización/precipitación (NP) desde otro tanque 103 de reserva de NP al mezclador de columna de burbujas. Simultáneamente, el gas comprimido del tanque 110 de gas comprimido se alimenta al rociador que está situado en la parte inferior del mezclador 109 de columna de burbujas. La solución de lisado neutralizado se recoge en un recipiente 111. La solución de lisado se procesa simultáneamente por el siguiente proceso después de un periodo de 1-60 minutos de recogida del lisado en el recipiente 111. Una bomba 112 para la filtración primaria entrega la disolución de lisado bruto a través de un filtro 113 primario. La solución filtrada primaria después del filtro 113 es bombeada simultáneamente en un filtro 115 secundario a través de la bomba 114. La solución filtrada resultante de 115 se filtra a través de un tercer filtro 117 a través de la bomba 116. Una bomba 118 para el lisado clarificado impulsa el flujo de un recipiente 119 para el lisado clarificado a un mezclador 121 que se mezcla con agua del tanque 120 de agua. La mezcla y la solución diluida se recogen en un recipiente 122 para el lisado diluido. La disolución de lisado neutralizado diluido se bombea al cartucho 124 precompuesto de Mustang® Q, que se realiza mediante la bomba 123.

En algunas realizaciones, el producto del procedimiento proporcionado aquí es un plásmido purificado, concentrado, desalado, esterilizado filtrado puede estar sustancialmente libre de impurezas tales como proteína, ADN genómico, ARN y endotoxinas. Se proporcionan aquí niveles bajos de estas impurezas o contaminantes, preferiblemente cantidades libres sustanciales, siendo los niveles más preferidos cantidades indetectables de tales impurezas o contaminantes. En algunas realizaciones, la proteína residual, determinada por el ensayo de proteína BCA (ácido bicinconínico) (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL), en la solución de molécula biológicamente activa, preferiblemente plásmido, producida por los métodos de producción proporcionados, puede ser menor que o igual a aproximadamente 1% (en peso), inferior o igual a 0.9%, inferior o igual a 0.8%, inferior o igual a 0.7%, inferior o igual a 0.6%, inferior o igual a 0.5%, inferior o igual a 0.4%, inferior o igual a 0.3%, inferior o igual a 0.2%, o inferior o igual a aproximadamente 0.1%. En algunas realizaciones, la proteína residual es menor o igual a 0.2% y, más preferiblemente, menor o igual a 0.1%. En algunas realizaciones, la endotoxina residual en la solución de molécula biológicamente activa, preferiblemente plásmido, producida por los métodos de producción proporcionados, puede ser menor de aproximadamente 100 unidades de endotoxina por miligramo de plásmido (UE/mg), menor que aproximadamente o igual a aproximadamente 20 UE/mg, inferior o igual a aproximadamente 10 UE/mg, inferior o igual a aproximadamente 1.0 UE/mg, inferior o igual a aproximadamente 0.9 EU/mg, inferior o igual a aproximadamente 0.8 EU/mg, inferior o igual a aproximadamente 0.7 EU/mg, menor o igual a aproximadamente 0.6 EU/mg, menor o igual a aproximadamente 0.5 UE/mg, menor o igual a aproximadamente 0.4 EU/mg, inferior o igual a aproximadamente 0.3 UE/mg, inferior o igual a aproximadamente 0.2 UE/mg, o inferior o igual a aproximadamente 0.1 UE/mg. Preferiblemente, en algunas realizaciones, el nivel de endotoxina es menos bronceado o igual a aproximadamente 0.2 UE/mg, y más preferiblemente, menor o igual a aproximadamente 0.1 UE/mg. En algunas realizaciones, el ARN residual, determinado por la interacción hidrófoba HPLC, en la solución de molécula biológicamente activa, preferiblemente plásmido, producido por los métodos de producción proporcionados, puede ser menor o igual a aproximadamente 5% (en peso), menor o igual a aproximadamente 1%, menor o igual a 0.9%, menor o igual a 0.8%, menor o igual a 0.7%, menor o igual a 0.6%, menor o igual a 0.5%, menor o igual a 0.4, inferior o igual a 0.3%, inferior o igual a 0.2%, o inferior o igual a aproximadamente 0.1%. Preferiblemente, en algunas realizaciones, la cantidad de ARN es menor o igual a aproximadamente 0.5%, y más preferiblemente, menor o igual que aproximadamente 0.4%. En algunas realizaciones, el ADN genómico residual, determinado por qPCR, en la solución de molécula biológicamente activa, preferiblemente plásmido, producido por métodos de producción proporcionados, puede ser menor o igual a aproximadamente 5% (en peso), menor o igual que aproximadamente 1%, inferior o igual a 0.9%, inferior o igual a 0.8%, inferior o igual a 0.7%, inferior o igual a 0.6%, inferior o igual a 0.5%, inferior o igual a 0.4%, inferior o igual a 0.3%, inferior o igual a 0.2%, inferior o igual a aproximadamente 0.1%, inferior o igual a aproximadamente 0.01%, inferior o igual a aproximadamente 0.001%, inferior o igual a aproximadamente 0,0001%, menor o igual que aproximadamente 0,00001%, o menor o igual a aproximadamente 0,000001%. Preferiblemente, en algunas realizaciones, la cantidad de ADN genómico es menor o igual a aproximadamente 0.1%, y más preferiblemente menor que aproximadamente 0.001%, y lo más preferiblemente menor o igual que aproximadamente 0.00001%.

Se pueden producir grandes cantidades de ADN plasmídico con altos rendimientos y altas concentraciones mediante los métodos proporcionados en el presente documento. El ADN plasmídico producido por el procedimiento proporcionado incluye soluciones de ADN plasmídico de alta pureza. En algunas realizaciones, la alta pureza del ADN plasmídico es mayor o igual que aproximadamente 90%, mayor o igual que aproximadamente 91%, mayor o igual que aproximadamente 92%, mayor o igual que aproximadamente 93%, mayor que o igual a aproximadamente 94%, mayor o igual que aproximadamente 95%, 5 mg/mL o más, 6 mg/mL o más, 7 mg/mL o más, 8 mg/mL o más, 9 mg/mL o más, 10 mg/mL o más, 11 mg/mL o más, 12 mg/mL o más, 13 mg/mL o más, 14 mg/mL o más, 15 mg/mL o más. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico puede estar en una concentración de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 11 mg/mL, de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 9 mg/mL, de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 8 mg/mL, una concentración de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 11 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 9 mg/mL, de aproximadamente 6 mg/mL a aproximadamente 8 mg/mL, una concentración de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 11 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 9 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 8 mg/mL, de aproximadamente 7 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 8 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 8 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 8 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 8 mg/mL a aproximadamente 11 mg/mL, de aproximadamente 8 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, de aproximadamente 8 mg/mL a aproximadamente 9 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 9 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 9 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 9 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 9 mg/mL a aproximadamente 11 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 11 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 9 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 8 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 7 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 6 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 5 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 4 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 3 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 2 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 1 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.5 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.1 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.05 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.01 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.001 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.0001 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.00001 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 0.000001 mg/mL.

mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 12 mg/mL, de aproximadamente 11 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 11 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, de aproximadamente 11 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL, de aproximadamente 12 mg/ml a aproximadamente 15 mg/mL, de aproximadamente 12 mg/mL a aproximadamente 14 mg/mL, o de aproximadamente 13 mg/mL a aproximadamente 15 mg/mL. En algunas realizaciones, el ADN de plásmido puede estar en tal concentración como se indica con un porcentaje de superenrollado de más del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%, y preferiblemente más 80% de plásmido superenrollado. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico puede estar en tal concentración como se indica con un porcentaje de superenrollado de 50-90%, 50-80%, 50-75%, 50-70%, 50-65%, 50-60%, 60-90%, 60-80%, 60-75%, 65-70%, 65-90%, 65-80%, 65-75%, 65-70%, 70-90%, 70-80%, 70-75%, 80-90%, 85-90%, 90-95%, o más. En algunas realizaciones, el ADN de plásmido puede estar en tal concentración como se indica con un porcentaje de superenrollado y relajado (círculo abierto no degradado) de 90% o más, 95% o más, o 98% o más. En algunas realizaciones, el ADN de plásmido puede estar en tal concentración como se indica con un porcentaje de superenrollado de 50% o más con esencialmente el resto como plásmido relajado (círculo abierto no degradado) después de almacenamiento durante 2 años o más, 60% o más con esencialmente el resto como plásmido relajado (círculo abierto no degradado) después de almacenamiento durante 2 años o más, 65% o más con el resto como plásmido relajado (círculo abierto no degradado) después de almacenamiento durante 2 años o más, 85% o más con esencialmente el resto como plásmido relajado (círculo abierto no degradado) después de almacenamiento durante 2 años o más, donde el almacenamiento por debajo del punto de congelación del agua. En algunas realizaciones, el ADN plasmídico puede estar en tal concentración como se indica con un porcentaje de superenrollado y relajado (círculo abierto no degradado) de 90% o más, 95% o más, 98% o más después de almacenamiento durante 2 años o más, en el que el almacenamiento está por debajo del punto de congelación del agua. Tales preparaciones de plásmido como las descritas aquí pueden producirse como productos por los procedimientos descritos en el presente documento.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que las partes y los porcentajes son en peso y los grados son Celsius, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente. A partir de la discusión anterior y de estos Ejemplos, el experto en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención, y sin apartarse de su alcance, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por lo tanto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones también están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

Las células de *Escherichia coli* ("E. coli") que contenían un plásmido A se fermentaron a alta densidad de una densidad de células ópticas ("OD600") a 72°C cuando se cosecharon por centrifugación. El plásmido A tiene un tamaño de 6549 pb. El plásmido típicamente se replica a un número de copia bajo de ~250 copias/célula. Se suspendieron aproximadamente 3.1 kg de peso de células húmedas ("WCW") de pasta celular en un regulador de resuspensión que consistía en Tris-hidrocloruro 25 mM ("Tris-HCl", JT Baker, Phillipsburg, NJ), edetato disódico 10 mM (Na₂EDTA), Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), pH 8, hasta un volumen final de aproximadamente 21.5 L. Esta suspensión de células se bombeó a 300 mL/min en un lado de un conector en "Y". Simultáneamente, se bombeó solución de lisis que constaba de hidróxido sódico 0.2 N ("NaOH", JT Baker, Phillipsburg, NJ), dodecil sulfato de sodio al 1% ("SDS", JT Baker, Phillipsburg, NJ) a 300 mL/min en el otro Lado del conector "Y". Los fluidos combinados que salían del conector "Y" se pasaron inmediatamente a través de un mezclador de rotor/estátor Silverson Modelo L4R equipado con una Emulsor Screen estándar (Silverson Machines, Inc. East Longmeadow, MA) y un ensamblaje en línea. El mezclador fue operado a una velocidad del rotor de 800 rpm.

El fluido que salía del mezclador rotor/estátor se hizo pasar a través de una bobina de retención de 50 pies y 0.625 pulgadas (diámetro interno). A un caudal total de aproximadamente 600 mL/min, el tiempo de tránsito a través de la bobina de retención fue de aproximadamente 5 minutos para permitir la lisis celular completa.

Se hizo pasar el lisado celular (solución de lisado) que salía de la bobina de retención en un mezclador de columna de burbujas. Simultáneamente, una solución de neutralización/precipitación fría (aproximadamente 4°C) consistente en acetato de potasio 1 M (JT Baker, Phillipsburg, NJ), acetato de amonio 7 M (EMD Chemicals, Inc., Bibbstown, NJ) se bombeó de forma independiente al mezclador de columna de burbujas a 600 mL/min. La solución de lisado y las soluciones de neutralización/precipitación fluyeron verticalmente por la columna de mezcla y por la salida cerca de la parte superior. Mientras las soluciones pasaban a través de la columna de mezcla, se introdujo aire comprimido en el fondo de la columna a una velocidad de aproximadamente 3.0 slpm a través de un rociador sinterizado diseñado para proporcionar una corriente constante de burbujas finas a lo largo del diámetro de la mezcla. El exceso de aire se ventiló a través de la parte superior de la columna. A medida que la disolución de lisado y las soluciones de

neutralización/precipitación pasaron a través de la columna, se mezclaron continuamente por la suave turbulencia de las burbujas ascendentes. Esto se evidenció por la formación de un precipitado floculento blanco (componentes de residuos) que consistía en SDS de potasio, proteínas celulares desnaturalizadas, lípidos unidos y componentes de pared celular, y ADN genómico asociado.

El lisado precipitado neutralizado (dispersión de solución de lisado neutralizado y residuos) que sale del mezclador de columna de burbujas se recogió en un recipiente de sedimentación. Este procedimiento se operó en un modo continuo hasta que toda la suspensión de pasta celular se lisó, neutralizó y precipitó, y se recogió en el tanque de sedimentación. Los volúmenes totales de solución fueron 21.5 L de suspensión de células más 5 L de lavado del depósito de resuspensión con regulador de resuspensión, 26,5 L de solución de lisis y 53 L de solución de neutralización, para un volumen total de aproximadamente 106 L.

Después de la recogida, el material en el tanque de sedimentación se observó a través de un visor. El precipitado floculante podía verse subiendo a la superficie del líquido, ayudado por burbujas de aire claramente visibles que estaban atrapadas en los sólidos. Se aplicó un vacío de aproximadamente 28 pulgadas de Hg al tanque de sedimentación, lo que condujo a una compactación significativa y visible del precipitado flotante.

El material se mantuvo al vacío en el tanque de decantación a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. El vacío se ventiló entonces lentamente para evitar la interrupción del precipitado compactado. El licor que contenía el plásmido (solución de lisado neutralizado) se bombeó cuidadosamente desde el tanque a través de un accesorio sanitario en el fondo. Los niveles de líquido y precipitado en el tanque se monitorizaron continuamente, y el bombeo se detuvo a tiempo para asegurar que el precipitado no saliera del tanque. Este se sometió a una filtración de 10 μm de profundidad, seguido por una filtración final de 0.1 μm . Una parte de la solución de lisado neutralizado se perdió durante la filtración, debido a la obstrucción de los filtros. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 69 L de disolución neutralizada de lisado. La solución de lisado neutralizado se diluyó entonces con aproximadamente 93 L de agua purificada consiguiendo un volumen total de 162 L y aproximadamente conductividad de 97 mS/cm, en preparación para su posterior procesamiento con intercambio aniónico. Se estimó que la concentración de plásmido en la solución de lisado neutralizado filtrada era de aproximadamente 17 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a aproximadamente 1170 mg de plásmido total.

La solución de lisado neutralizada, clarificada y diluida, se purificó adicionalmente mediante intercambio aniónico. Se equilibró un cartucho Pall Mustang Q de 260 mL de volumen de cama con 4 L de cloruro de sodio 0.67 M ("NaCl", JT Baker, Phillipsburg, NJ) en 1 x regulador Tris-EDTA ("TE") compuesto de Tris-HCl 10 mM (JT Baker, Phillipsburg, NJ) y EDTA 1 mM (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) a pH 8. El volumen de 162 L de disolución de lisado neutralizado diluido se bombeó sobre el cartucho Q a un caudal de 1.2 L/min. La absorbancia ultravioleta ("UV") del efluente del cartucho a 260 nm se monitorizó y se registró usando un registrador de gráfico de banda. Después de la carga, el cartucho se lavó con regulador de equilibrio a 1.2 L/min hasta que la A_{260} del efluente se aproximó a la línea de base. El plásmido se eluyó después del cartucho con 1 x regulador TE que contenía NaCl 1M (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), se bombeó a 1.2 L/min. La elución se terminó con el A_{260} devuelto a la línea de base. El volumen total de eluido era de aproximadamente 4.8 L y contenía un total de aproximadamente 915 mg de ADN basado en A_{260} . El rendimiento del intercambio de aniones Q es de aproximadamente 78%. Los contaminantes incluyendo la proteína, la mayor parte del ARN, el ADN genómico y la endotoxina se eliminaron en el flujo pasante y se lavaron en este paso.

El eluido Q se purificó adicionalmente mediante interacción hidrófoba a través del método II de la columna de butilo. Se cargó una columna de K5/15 Amersham (Piscataway, NJ) con 290 mL de volumen de lecho ("BV") de resina de Toyopearl butil 650M (Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA). Se mezcló un volumen de 24 L de sulfato de amonio 3M (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) con 4.8 L de Q eluyente antes de cargar. La columna se equilibró con 2 L de sulfato de amonio 2.5 M (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ), se bombeó a 43 mL/min. El eluido Q acondicionado se cargó a la columna de butilo a 43 mL/min, seguido de lavado con 5 L de sulfato de amonio 2.5 M (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) a 43 mL/min y el producto se eluyó con 1.5 L de sulfato de amonio 1.8 M (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) a 43 mL/min. La columna se separó con agua estéril para inyección ("WFI", Baxter Healthcare, Deerfield, IL) para eliminar contaminantes unidos incluyendo ARN y endotoxina, y se regeneró para uso repetible. El eluido alcanzó aproximadamente 870 mg de plásmido con un rendimiento del 95%, mientras que el porcentaje superenrollado del plásmido se enriqueció de 66% después de Q a más del 80% después de la etapa de la columna de butilo.

El eluido de HIC de butilo se concentró y se desalinizó por ultrafiltración/diafiltración ("UF/DF"), utilizando un soporte de casete Pall Centramate™ provisto de un casete de membrana de pantalla suspendida Pall Omega (Pall Corporation, East Hills, NY), con un área de 1 ft^2 y un límite nominal de peso molecular de 50 kDa. Se recuperó un volumen de 41.2 ml de retenido en bloque, con una concentración de ADN de 9.026 mg/ml (por A_{260}). El primer lavado de WFI para el equipo UF/DF produjo 46.9 mL con una concentración de 1.6 mg/mL. El segundo lavado de WFI produjo 65.8 mL con una concentración de 0.268 mg/mL. La recuperación combinada de ADN después de la UF fue de aproximadamente 47.6 mg con un rendimiento del 55%. El porcentaje superenrollado final del plásmido logrado fue más del 87% después de la UF.

Las muestras del Ejemplo 1 se sometieron a análisis por electroforesis en gel de agarosa, que se muestra como la figura 2. Tres bandas principales están presentes en todos los carriles de muestra (carril 2-5), mientras que la banda más baja es el formato superenrollado del plásmido diana A (6.5 Kb). El carril 1 representa la escalera de plásmido superenrollada (Invitrogen). El carril 2 representa el lisado celular que contiene un producto de plásmido de 6.5 kb, mientras que también estaba presente una gran cantidad de ARN en la muestra. El carril 3 representa el producto después del intercambio de aniones Q, que mostró que el plásmido se concentró con menos ARN. El carril 4 mostró el producto después de la purificación con interacción hidrófoba, y el carril 5 representa el producto final mezclado después de UF. El ARN contaminante en el lisado se eliminó y la pureza del plásmido superenrollado deseado aumentó sustancialmente de 60% a >85%.

EJEMPLO 2

Se resuspendió una cantidad de células de *E. coli* de 3140 gramos que contenían el plásmido B en regulador de resuspensión constituido por Tris-HCl 25 mM (JT Baker, Phillipsburg, NJ) a pH de 8 y Na₂EDTA 10 mM, hasta un volumen final de 18.8 L. El plásmido B tiene un tamaño de 4.7 kb. Las células resuspendidas se mezclaron con la solución de lisis que constaba de NaOH 0.2 N (JT Baker, Phillipsburg, NJ) y SDS al 1% (JT Baker, Phillipsburg, NJ) a un caudal igual a 300 mL/min mediante un rotor/estátor Silverson Modelo L4R, que funcionaba a una velocidad del rotor de 800 rpm. El efluente de lisado del mezclador conservó un tiempo de retención de 5 minutos en la bobina de retención antes de entrar en la columna de burbujas para mezclar con la solución de neutralización/precipitación (NP) precalentada (4-5°C). La solución de NP que contenía acetato de potasio 1 M (JT Baker, Phillipsburg, NJ) y acetato de amonio 3 M (EMD Chemicals, Inc., Bibbstown, NJ) se alimentó al mezclador de columna de burbujas a 600 mL/min, simultáneamente, se introdujo desde el rociador inferior a una velocidad de flujo de 3-5 slpm.

El lisado celular neutralizado fue recibido primero por una bolsa de malla tejida de 200-400 µm que cuelga por debajo del orificio de salida de la columna de burbujas. El floculante de células grandes se mantuvo en la bolsa, mientras que la solución de lisado bruto que contenía el ADN plasmídico y los restos celulares reducidos se recogió en el tanque de sedimentación preenfriado (5°C). Simultáneamente, el lisado crudo generado se bombeó a un filtro de cartucho plegado de 48 µm (filtros CPI, Houston, TX) instalado en un recipiente de filtro ECOLINE (Eaton Filtration, Iselin, New Jersey) a un caudal de 2 L/min. El lisado primario filtrado se recogió en un recipiente con un volumen total de 75 L recuperado. Después se realizó una segunda filtración. El lisado primario filtrado se bombeó a un filtro de bolsa multicapa 523 (Knight Corporation, Barrington, IL) instalado en un recipiente de filtro ECOLINE (Eaton Filtration, Iselin, New Jersey) a un caudal de 2 L/min. La solución recuperada se recogió en un recipiente con un volumen total de 65 L recuperado. Finalmente, se realizó una filtración en profundidad con el sistema de filtro de profundidad desechable Millistak Pod (Millipore, Bellerica, MA). El medio filtrante tenía una distribución de tamaño de poro de 0.2-2.5 µm. Se utilizó un filtro Pod con el área de membrana de 0.11 m² para clarificar el lisado secundario filtrado a un caudal de 0.5 L/min. Se consiguió un volumen de lisado clarificado final de 60 L, que demostró una alta claridad de valor NTU inferior a 2. La pureza del plásmido y las formas en las muestras de lisado en cada etapa de filtración eran indistinguibles.

EJEMPLO 3

Se fermentaron células de *E. coli* que contenían un plásmido C (tamaño de plásmido de 3.5 kb) a alta densidad celular y se cosecharon por centrifugación. Se recuperó un peso de células húmedas de 24.4 kg de células de 400-L de volumen de trabajo de fermentación. Las células se resuspendieron con 171 L de regulador de resuspensión que consistía en Tris-HCl 25 mM (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) a un pH de 8 y Na₂EDTA 10 mM (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ) durante un período de 3 horas. Las células resuspendidas se mezclaron con una solución de lisis fresca mediante un mezclador de alto cizallamiento Silverson a la misma velocidad de flujo de 600 mL/min, y se mantuvieron durante aproximadamente 5 minutos por medio de un bucle de retención. La solución de neutralización/precipitación que consta de acetato de potasio 1 M (JT Baker, Phillipsburg, NJ) y acetato de amonio 3 M (EMD Chemicals, Inc., Bibbstown, NJ) se bombearon al mezclador de burbujas a un caudal de 1.2 L/min para mezclar con las células lisadas. El aire comprimido alimentado con un caudal de gas de 5-6 slpm sirvió como fuerza de mezcla y transporte del lisado neutralizado a un tanque de recogida. Se utilizó un período aproximado de 5 horas para el proceso de lisis. Las células neutralizadas que salían del dispositivo mezclador de burbujas fueron desviadas a un tanque colector y sometidas a continuación de filtración continua.

El lisado bruto neutralizado se procesó con tres filtraciones secuenciales durante su generación y estos procesos de clarificación se operaron simultáneamente con el proceso de lisis. La filtración inicial se realizó bombeando los floculantes celulares que contenían lisado bruto en un recipiente de filtro TOPLINE (Eaton Filtration, Iselin, New Jersey) equipado con un filtro de cartucho plisado de 48 µm (filtros CPI, Houston, TX) a un caudal de 2.4 L/min. La filtración primaria se empleó para eliminar la mayoría de partículas grandes tales como flóculos de células, y una membrana plisada ofrece más área de filtración, por lo tanto mayor caudal y capacidad de proceso más grande que una construcción de capa única o multicapa. Se utilizaron cuatro cartuchos plisados para procesar un volumen de 680 L de lisado bruto que contenía lisado bruto, mientras que el lisado primario filtrado recuperado se estimó en 600 L. La solución que salía del filtro de cartón plisado de 48 µm se bombeó directamente a un recipiente ECOLINE secundario (Eaton Filtration, Iselin, New Jersey) equipado con un filtro de cartucho multicapa de 1 µm (filtros CPI, Houston, TX) a un caudal de 2.4 L/min. Este paso eliminó una mayoría de partículas pequeñas que oscilaban entre 1

5 μm y 50 μm en el lisado filtrado secundario. El Mustang Q siguiente tiene un tamaño de poro equivalente a 0.2 μm y, por lo tanto, se realizó una tercera filtración en profundidad mediante un filtro con un tamaño de poro de base absoluta de 0.2 μm o inferior. El filtro de profundidad del sistema de filtro Millitak + Pod es capaz de lograr un gran volumen de proceso y una alta retención de partículas finas. Se utilizó el filtro Millitak C0HC (Millipore, Bellerica, MA) instalado en un soporte de acero inoxidable para reducir la turbidez del lisado a la unidad de turbidez nefelométrica (NTU). Un área de membrana de 1.1 m^2 de filtro C0HC procesó un volumen de 400 L de lisado secundario filtrado.

10 El lisado filtrado que sale del filtro Millitak se recogió en un recipiente. Se bombeó una fracción de solución de este recipiente a un conector "Y" a un caudal de 2.2 L/min para mezclar con agua que se bombeó al mismo conector "Y" a un caudal de 0.7 L/min. La mezcla se hizo fluir en un mezclador Kenics en línea que conducía a otro tanque de retención. La conductividad de dicho lisado diluido en el tanque de retención tenía un intervalo de 90-95 mS/cm. Se cargó un volumen de 400 L de lisado diluido a un Mustang Q de 10 pulgadas (Pall, East Hills, NY) que tenía un volumen de lecho de 260 mL. La cápsula Q se saturó antes de 200 L de carga Q. Se recuperaron aproximadamente 15 3 g de ADN plasmídico en el eluido Q. El porcentaje superenrollado del producto Q estaba entre 80%-90%, y el contenido de ARN en los eluidos Q no era perceptible por análisis de gel.

20 Las muestras del Ejemplo 3 se sometieron a análisis por electroforesis en gel de agarosa, que se muestra en la Figura 3. La banda de la intensidad más alta en cada carril representa la forma superenrollada (SC) del plásmido, que está presente en un porcentaje que oscila entre 80-90%. El carril 1 representa la escalera de plásmido superenrollada (Invitrogen). El carril 2 representa el lisado después de la filtración primaria usando un cartucho de 48 μm plisado, y muestra un alto contenido de ARN. El carril 3 representa el filtrado después de la filtración secundaria usando un cartucho de pliegue de 1 μm , y también muestra un alto contenido de ARN. El carril 4 representa el filtrado después de una tercera filtración usando un filtro C0HC Pod, y muestra una proporción de ARN reducida. El carril 5 representa la fracción de producto eluido #1 después de pasar por la etapa de intercambio de aniones Mustang Q, que demostró una alta pureza con ARN limitado. El carril 6 representa la fracción secundaria del eluido Q, con una pureza similar al eluido #1.

30 EJEMPLO 4

35 Se resuspendió un peso de células húmedas de 25 kg de células de *E. coli* que contenían el plásmido C en 105 L de regulador de resuspensión que consistía en Tris-HCl 25 mM (JT Baker, Phillipsburg, NJ) a pH 8 y Na_2EDTA 10 mM, para un periodo total de 3 horas. El plásmido C tiene un tamaño de 3.5 kb. Las células resuspendidas se bombearon a un mezclador rotor/estátor Silverson Modelo L4R a un caudal de 1500 mL/min, simultáneamente, la solución de lisis consistente en NaOH 0.2 N (JT Baker, Phillipsburg, NJ) y SDS al 1% (JT Baker, Phillipsburg, NJ) se suministró al mismo mezclador a un caudal de 1500 mL/min. La mezcla que contiene células lisadas pasa a través de una bobina de retención con el diámetro interior (ID) de 1 pulgada y longitud de 100 pies. El tiempo aproximado de retención fue de 5 minutos para que el lisado entrara en el mezclador hasta salir de la bobina de retención. Las células lisadas entraron entonces en la columna de burbujas para estar en contacto con la solución de neutralización/precipitación (NP) precalentada (4-5°C). La solución de NP que contenía acetato de potasio 1 M (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) y acetato de amonio 3 M (EMD Chemicals, Inc., Bibbstown, NJ) se alimentó al mezclador de columna de burbujas a 3000 mL/min. Simultáneamente, se introdujo aire comprimido desde el rociador de fondo a una velocidad de flujo de 6-10 slpm para servir como fuerza de mezcla y facilitar la solución neutralizada en una tubería de desviación dirigida a un tanque de lisado bruto.

45 Después de recoger el lisado crudo durante un periodo de 20 minutos, la solución se bombeó desde el fondo del depósito de lisado bruto a un recipiente de filtro TOPLINE (Eaton Filtration, Iselin, New Jersey) equipado con un filtro de cartucho plisado de 48 μm (CPI Filtros, Houston, TX) a un caudal de 6 L/min. Simultáneamente, se bombeó el filtrado del recipiente de filtro primario a un recipiente de filtro TOPLINE secundario (Eaton Filtration, Iselin, New Jersey) equipado con un filtro de cartucho plisado de 1 μm (filtros CPI, Houston, TX) a un caudal de 6 L/min. La filtración primaria eliminó el 99% de las partículas de más de 48 μm , y cinco de 10 pulgadas cartucho filtros clarificado el volumen total de 700 L de lisado bruto. El uso de tres filtros de cartucho de 10 pulgadas de 1 μm permitió completar la filtración secundaria para eliminar el 99% de las partículas de más de 1 μm . El filtrado del recipiente secundario se recogió en un tanque de lisado clarificado con la ayuda de una bomba a un caudal de 5-6 L/min. Se empleó un tercer sistema de filtro de filtro Millitak + C0HC Pod (Millipore, Bellerica, MA) montado en un soporte de vaina a escala piloto de acero inoxidable para conseguir una alta claridad para la subsiguiente purificación de Mustang Q. La solución del tanque de lisado clarificado se bombeó al filtro de vaina a una velocidad de flujo de 6 L/min. Un área de membrana de 2.2 m^2 de filtro C0HC procesó un volumen de 650 L de lisado secundario filtrado antes de que la presión de entrada alcanzara 10 psi. El filtrado mediante el tercer filtro Pod se recogió en el recipiente de lisado filtrado.

65 El lisado filtrado se suministró a un conector "Y" y se mezcló con agua a una relación de 0.3-0.4 V de lisado de agua/V a través de un mezclador Kenics en línea antes de cargar a un Mustang Q. El lisado se bombeó a un caudal de 5 L/min, mientras que el agua se alimentó a un caudal de 1.75-2 L/min. La mezcla se recogió en el tanque de lisado diluido. La conductividad de dicho lisado diluido en el tanque de retención tenía un intervalo de 90-95 mS/cm. Se cargó un volumen aproximado de 800 L de lisado diluido a un Mustang Q XT5000 (Pall, East Hills, NY) que tenía

un volumen de lecho de 5000 mL. Se recuperaron aproximadamente 25 g de ADN plasmídico en el eluido Q. El eluido Q recuperado exhibía un alto porcentaje de forma superenrollada y niveles limitados de contaminaciones.

EJEMPLO 5

5 La siguiente Tabla I representa catorce preparaciones de plásmido producidas usando el Método II con el plásmido A, un plásmido de copia baja, y algunos parámetros de pureza detectados en el mismo. Los protocolos para la producción fueron los que se discutieron en el Ejemplo 3, anterior.

10 **ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PLÁSMIDOS**

El plásmido C tiene un tamaño de 3.5 kb (como en el Ejemplo 3 y Ejemplo 4). El plásmido D1-D3 oscila entre 4.4-4.7 kb, con una construcción similar a la de los genes de expresión. El plásmido E1-E2 tiene un tamaño de 3.8 kb, con una construcción similar excepto de otros genes de expresión. El plásmido F tiene un tamaño de 2.5 kb.

15

Tabla I

Ensayo	Unidades	Plásmido C Lote #1	Plásmido C Lote #2	Plásmido C Lote #3	Plásmido C Lote #4	Plásmido D Lote #1
Concentración por A260	mq/mL	2.5	2.5	2.4	3.0	4.4
ARN de la célula huésped	%	0.4	0.63	0.31	0.62	≤ 0.1
Proteína de la célula huésped	%	≤ 0.1	≤ 0.12	≤ 0.13	≤ 0.1	≤ 0.07
ADN de la célula huésped	%	0.0000002	≤ 0.000002	≤ 0.000002	≤ 0.000002	≤ 0.0000003
Endotoxina	EU/mg	1	3.76	≤ 1.25	1.383	0.4
pH		7.1	6.87	5.70	6.22	5.2
Osmolalidad	mOsm/ kg H ₂ O	19	19	11	15	15
Ensayo	Unidades	Plásmido D1 Lote #1	Plásmido D2 Lote #1	Plásmido D3 Lote #1	Plásmido E1 Lote #1	Plásmido E2 Lote #1
Concentración por A260	mq/mL	9.2	8.1	8.5	6.0	6.0
ARN de la célula huésped	%	≤ 0.06	≤ 0.08	≤ 0.07	≤ 0.1	1
Proteína de la célula huésped	%	≤ 0.03	≤ 0.04	≤ 0.04	≤ 0.1	≤ 0.1
ADN de la célula huésped	%	0.00000005	0.00000005	≤ 0.0000005	≤ 0.000000001	≤ 0.000000001
Endotoxina	EU/mg	1.1	1.2	1.9	≤ 0.1	≤ 0.1
pH		6.2	5.8	6.0	6.5	5.5
Osmolalidad	mOsm/ kg H ₂ O	58	32	47	10	32

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento a gran escala para producir muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias a partir de células bacterianas, que comprende las etapas de:
- 5 a) producir una solución de lisado poniendo en contacto una suspensión celular de dichas células bacterianas que comprende dichos plásmidos de bajo número de copias con solución de lisis;
- 10 b) neutralizar dicha solución de lisado con una solución neutralizante para producir una dispersión que comprende solución de lisado neutralizado y residuos y en donde el fluido de dispersión se mantiene durante menos de una hora para separar la solución de lisado neutralizado;
- c) filtrar la dispersión a través de al menos un filtro;
- 15 d) realizar la separación de intercambio iónico sobre dicha solución de lisado neutralizado para producir un eluido de intercambio iónico; y
- e) realizar la separación de interacción hidrófoba sobre dicho eluido de intercambio iónico para producir una solución de interacción hidrófoba;
- 20 en el que la etapa a) comprende mezclar dicha suspensión de células con una solución de lisis en un mezclador en línea de alto cizallamiento;
- en el que la etapa b) comprende mezclar dicha solución de lisado con dicha solución neutralizante en un mezclador de burbujas; y
- 25 en el que la etapa e) comprende realizar la separación de interacción hidrófoba usando una columna de interacción hidrófoba o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba;
- 30 en el que el método comprende la transición de una etapa a una etapa subsiguiente de forma sustancialmente continua.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa:
- 35 f) preparar una solución de plásmidos de bajo número de copias por ultrafiltración de dicha solución de interacción hidrófoba y que opcionalmente comprende además la etapa de:
- g) preparar de una solución estéril de plásmidos de bajo número de copias mediante filtración estéril de dicha solución de plásmidos de bajo número de copias.
- 40 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la etapa de producción comprende poner en contacto la suspensión de células con la solución de lisis en un mezclador durante una duración de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos o de aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 8 minutos o aproximadamente 5 minutos.
- 45 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho intercambio iónico es una membrana de intercambio aniónico.
- 50 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa e) comprende realizar la separación de interacción hidrófoba que comprende cromatografía de interacción hidrófoba butílica para producir una solución de interacción hidrófoba que es un eluido de solución de cromatografía de interacción hidrófoba butílica.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método comprende además pasar la primera solución de lisado bruto neutralizado a través de un filtro secundario para producir una solución de lisado neutra bruta subsiguiente.
- 55 7. Un procedimiento a gran escala para producir muestras de alta pureza de plásmidos de bajo número de copias de células bacterianas, que comprende las etapas de:
- 60 poner en contacto las células bacterianas que comprenden dichos plásmidos de bajo número de copias en una dispersión de células con solución de lisis para formar una solución de lisado que neutraliza la solución de lisado mezclando una solución de neutralización en la solución de lisado con un mezclador de columna de burbujas para formar una mezcla neutralizada y en la que el fluido de dispersión se mantiene durante menos de una hora para separar la solución de lisado neutralizado;
- 65 filtrar la mezcla neutralizada a través de un filtro primario y un filtro secundario para formar una solución filtrada;

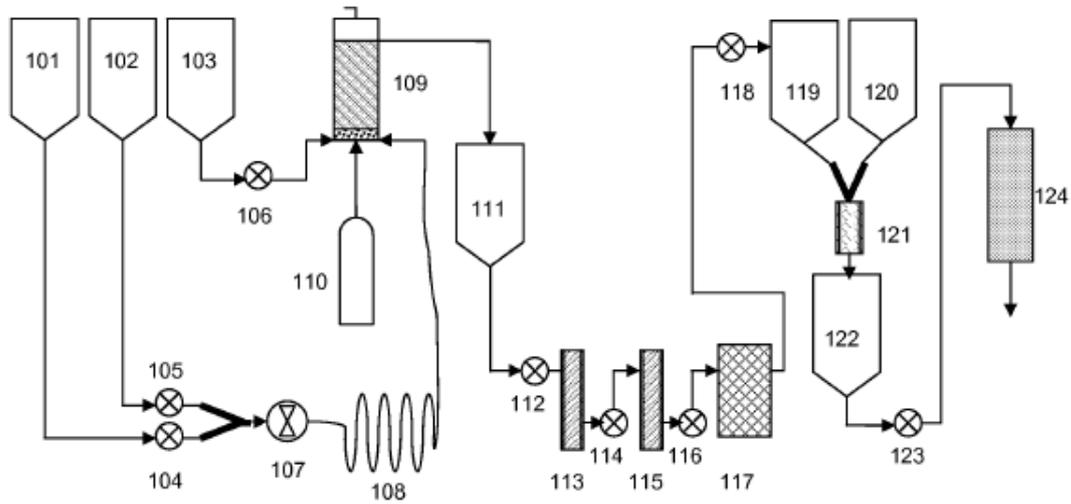
pasar la solución filtrada a través de una columna de intercambio iónico para formar una solución de intercambio iónico;

- 5 pasar la solución de intercambio iónico a través de una columna de interacción hidrófoba o una membrana de interacción hidrófoba para formar una solución de interacción hidrófoba; y

ultrafiltrar la solución de interacción hidrófoba para formar una muestra de alta pureza de plásmidos;

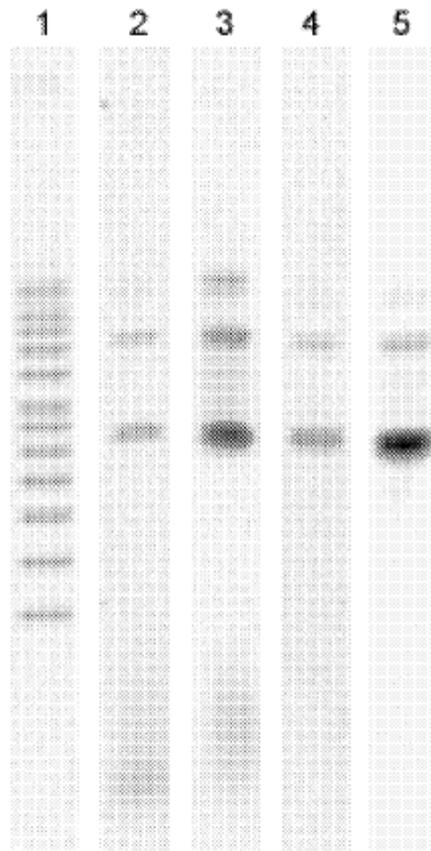
- 10 en el que cada transición de un paso a un paso subsiguiente en el proceso a gran escala desde el paso de contacto hasta el paso de la etapa de solución filtrada se produce sustancialmente de manera continua.

Figura 1



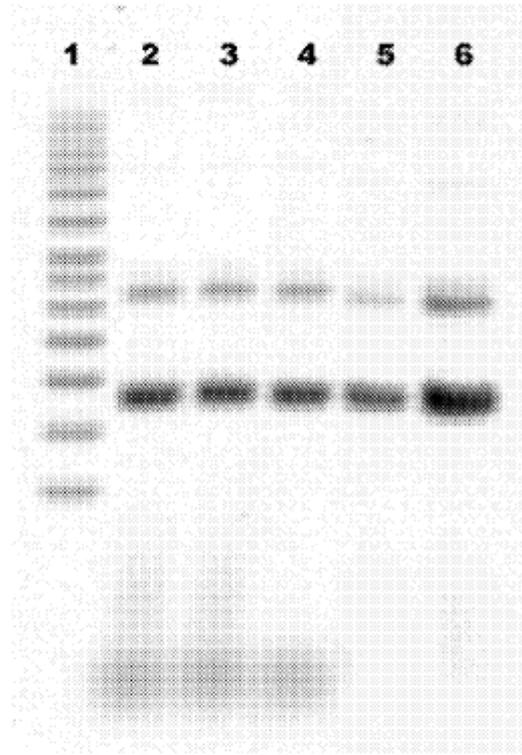
- 101: Tanque de suspensión celular
- 102: Tanque de disolución de lisis
- 103: Tanque de solución NP
- 104: Bomba para la resuspensión celular
- 105: Bomba para la solución de lisis
- 106: Bomba para la solución NP
- 107: Mezclador en línea
- 108: Bobina de retención
- 109: Mezclador de columna de burbujas
- 110: Gas comprimido del depósito
- 111: Recipiente para el lisado crudo
- 112: Bomba para la filtración primaria
- 113: Filtro primario
- 114: Bomba para la filtración secundaria
- 115: Filtro secundario
- 116: Bomba para el tercer filtro (opcional)
- 117: Tercer filtro (opcional)
- 118: Bomba para el lisado clarificado
- 119: Recipiente para el lisado clarificado
- 120: Tanque de agua
- 121: Mezclador
- 122: Recipiente para el lisado diluido
- 123: Bomba para el Mustang Q
- 124: Cartucho de Mustang Q

Figura 2



Carril 1: Escalera de ADN superenrollada (Invitrogen)
Carril 2: Lisado celular que contiene el plásmido A
Carril 3: Eluido Q que contiene el plásmido A
Carril 4: Eluido HIC que contiene el plásmido A
Carril 5: Producto UF del plásmido A

Figura 3



Carril 1: Escalera de ADN superenrollada (Invitrogen)
Carril 2: Lisado de la filtración primaria
Carril 3: Lisado de la filtración secundaria
Carril 4: Lisado de la tercera filtración
Carril 5: Eluido #1 del Mustang Q
Carril 6: Eluido #2 del Mustang Q