

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 130**

51 Int. Cl.:

B01F 3/04 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2004 PCT/US2004/016806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2004 WO04108260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2004 E 04753608 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 1628749**

54 Título: **Dispositivos y métodos para la producción de un biomaterial**

30 Prioridad:

30.05.2003 US 474749 P

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

13.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HEBEL, HENRY;
RAMAKRISHNAN, SRIRAM;
GONZALEZ, HUGO y
DARNELL, JEFF**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 748 130 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivos y métodos para la producción de un biomaterial

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a un aparato y métodos escalables para lisar células. La invención también se refiere a métodos para aislar y purificar componentes celulares a partir de células lisadas. La invención es particularmente adecuada para la lisis escalable de células bacterianas que contienen plásmidos y la posterior preparación de grandes cantidades de plásmido sustancialmente purificado. El plásmido resultante es adecuado para una variedad de usos, incluidos, entre otros, la terapia génica, suplementación hormonal u otro tipo de terapia mediada por plásmidos, vacunas de DNA o cualquier otra aplicación que requiera cantidades sustanciales de plásmido purificado. En los últimos cinco años, ha habido un interés creciente en el campo del procesamiento de plásmidos. La aparición del área no viral ha provocado que los investigadores se centren en una variedad de métodos diferentes para producir plásmidos.

Debido a que los plásmidos son macromoléculas grandes y complejas, no es práctico producirlos en grandes cantidades por medios sintéticos. En cambio, deben producirse inicialmente en sistemas biológicos, y posteriormente aislarse y purificarse de esos sistemas. En prácticamente todos los casos, la producción biológica de plásmidos es en forma de fermentación de células de *Escherichia coli* (*E. coli*) que contienen el plásmido de interés. Los expertos en la técnica conocen varias técnicas para fermentar células de *E. coli* que contienen plásmidos desde hace muchos años. Se han publicado muchos procesos de fermentación, son bien conocidos y están disponibles al ser de dominio público.

La lisis celular y los pasos de tratamiento posteriores utilizados para preparar un proceso para la purificación son los pasos más difíciles, complejos e importantes en cualquier proceso con plásmidos. Es en este paso del proceso donde el rendimiento y la calidad del plásmido de interés se determinan principalmente para cada ejecución. La búsqueda de un método óptimo, que sea continuo y verdaderamente escalable, ha sido un obstáculo para obtener procesos aceptables de aplicabilidad comercial.

Existe una variedad de formas de lisar células bacterianas. Los métodos bien conocidos utilizados a escala de laboratorio para la purificación de plásmidos incluyen la digestión enzimática (por ejemplo, con lisozima), tratamiento térmico, tratamiento a presión, molienda mecánica, sonicación, tratamiento con caotrópicos (por ejemplo, isotiocianato de guanidinio) y tratamiento con disolventes orgánicos (por ejemplo, fenol). Aunque estos métodos se pueden poner en práctica fácilmente a pequeña escala, pocos se han adaptado con éxito para su uso en la preparación de plásmidos a gran escala.

Los métodos tales como el tratamiento a presión, la molienda mecánica o sonicación pueden ser difíciles de implementar a gran escala. Además, Carlson et al. (1995, *Biotechnol. Bioeng.* 48, 303-315) han demostrado que tales métodos mecánicos pueden conducir a una degradación inaceptable del plásmido. Los métodos que involucran caotrópicos y/o disolventes orgánicos son problemáticos de escalar porque estos químicos son normalmente tóxicos, inflamables y/o explosivos. La manipulación y eliminación de tales productos químicos es manejable a pequeña escala, pero generalmente crea problemas sustanciales a gran escala. La Patente de Estados Unidos N° 6.197.553 describe una técnica de lisis a gran escala que implica el tratamiento con lisozima y calor. Sin embargo, esta técnica requiere un calentamiento y enfriamiento cuidadosamente controlados de las células bacterianas tratadas enzimáticamente para lograr la lisis. La técnica también tiene la desventaja de que requiere el uso de una enzima que es un derivado animal (lisozima), que puede ser costosa y es una fuente potencial de contaminación biológica. El uso de materiales derivados animales pasa a ser rápidamente inaceptable si se preparan plásmidos u otros componentes celulares de interés para aplicaciones humanas o veterinarias.

Actualmente, el método preferido para lisar bacterias para la purificación de plásmidos es mediante el uso de álcali y detergente. Esta técnica fue descrita originalmente por Bimboim y Doly (1979, *Nucleic Acids Res.* 7,1513-1523). Una variación comúnmente utilizada de este procedimiento, como se describe en las págs. 1.38-1.39 de Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), consiste en suspender las células bacterianas en 10 ml de una solución de resuspensión, que consiste en glucosa 50 mM, Tris 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM. La suspensión se mezcla con 20 ml de una solución de lisis, que consiste en NaOH 0,2 N, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% y se incuba durante 5-10 minutos. Durante este período, las células se lisan y la solución se vuelve altamente viscosa. El pH alto desnaturaliza tanto el DNA genómico del huésped como el DNA plasmídico. El SDS forma complejos con las proteínas celulares, lípidos y componentes de membrana, algunos de los cuales están estrechamente asociados con el DNA genómico del huésped. La mezcla de lisado se trata luego con 15 ml de una solución de neutralización/precipitación enfriada con hielo, que consiste en acetato de potasio 3 M que se ha ajustado a pH 5,5 con ácido acético. Esta mezcla acidificada se incuba en hielo durante 5-10 minutos, en parte para permitir que el DNA plasmídico se renaturalice. Durante este tiempo, se forma un precipitado floculante blanco. El precipitado comprende SDS de potasio, que es poco soluble en estas condiciones. Además, el precipitado contiene DNA genómico del huésped, proteínas, lípidos y componentes de la membrana, que permanecen unidos al SDS. El precipitado se elimina posteriormente por filtración o centrifugación,

produciendo un lisado clarificado que contiene el plásmido deseado, que puede someterse a diversos procedimientos de purificación.

Este método de lisis tiene ventajas muy distintas sobre los descritos anteriormente. Además de proporcionar una liberación eficiente de las moléculas de plásmido de las células, este procedimiento proporciona una purificación sustancial del plásmido al eliminar gran parte de la proteína del huésped, los lípidos y el DNA genómico. La eliminación del DNA genómico es particularmente valiosa, ya que puede ser difícil separarlo del DNA plasmídico por otros medios. Estas ventajas han hecho de este un método preferido para lisar células bacterianas durante la purificación de plásmidos a escala de laboratorio.

Desafortunadamente, este método presenta desafíos importantes para el escalado. Primero, la mezcla completa de las células suspendidas con la solución de lisis se maneja fácilmente a pequeña escala simplemente agitando mediante vórtex o invirtiendo repetidamente 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, como la mezcla con palas del lote, son problemáticas porque a medida que algunas células comienzan a lisarse después de la mezcla inicial, liberan DNA genómico que aumenta drásticamente la viscosidad de la solución. Este aumento en la viscosidad interfiere significativamente con la mezcla adicional.

Un segundo desafío es que la incubación excesiva a pH alto después de la adición de solución de lisis alcalina puede conducir a la desnaturalización permanente del plásmido, haciéndolo inadecuado para la mayoría de los usos posteriores. Por lo tanto, es necesario asegurarse de que las células lisadas se mezclen completamente con la solución de neutralización/precipitación dentro de un período de tiempo relativamente corto, típicamente en 5-10 minutos. También es bien sabido que la mezcla en este paso debe ser suave (es decir, con cizallamiento bajo). La mezcla vigorosa (es decir, de cizallamiento alto) en este paso libera cantidades sustanciales de material del precipitado floculante en la solución que contiene el plásmido. Esto incluye grandes cantidades de DNA genómico del huésped y endotoxinas. Estas sustancias son difíciles de separar del plásmido durante la purificación posterior. Por lo tanto, aunque se requiere una mezcla completa para precipitar todas las impurezas asociadas al SDS y volver a renaturalizar todo el plásmido, la mezcla también debe ser lo más suave posible. Esto se logra fácilmente a pequeña escala mediante la adición cronometrada de la solución de neutralización/precipitación utilizando técnicas de mezcla manual, tales como la agitación rotatoria suave o la inversión de los contenedores. Por el contrario, la mezcla rápida pero suave es difícil de lograr a gran escala. La agitación o la mezcla con palas de bajo cizallamiento en modo discontinuo requiere de tiempos relativamente largos para lograr una mezcla completa, lo que podría dar como resultado niveles inaceptablemente altos de plásmido desnaturalizado permanentemente. Es probable que técnicas más rápidas, como la mezcla con palas de alta velocidad, den como resultado niveles inaceptablemente altos de DNA genómico y endotoxina en la solución que contiene el plásmido.

Previamente se creía que la mezcla de una suspensión celular y una solución de lisis se debe realizar a un cizallamiento muy bajo. Esto se ha reivindicado particularmente con respecto a la mezcla de suspensiones de bacterias que contienen plásmidos con soluciones de lisis que comprenden álcali y detergente. Por ejemplo, Wan et al., en la Patente de los Estados Unidos N° 5.837.529, al analizar métodos para lisar células que contienen plásmidos con álcali o enzimas, sostienen que es crucial manejar dichos lisados muy suavemente para evitar el corte del DNA genómico. De manera similar, Nienow et al., en la Patente de los Estados Unidos N° 6.395.516, al analizar los desafíos de la lisis alcalina, afirman que una mezcla demasiado vigorosa en cualquier etapa del procedimiento puede conducir a la fragmentación del DNA genómico, que puede contaminar sustancialmente el producto purificado final. Una vez más, Bridenbaugh et al., en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2002/0198372, enfatizan la necesidad de mezclar suavemente las células con la solución de lisis. Estas preocupaciones han llevado a estos investigadores a desarrollar medios ostensiblemente escalables para mezclar suavemente las células suspendidas con las soluciones de lisis. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.837.529 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2002/0198372 contemplan el uso de mezcladores estáticos para lograr una mezcla continua de bajo cizallamiento, mientras que la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 6.395.516 contempla el uso de un recipiente diseñado para la mezcla controlada en modo discontinuo. Tales métodos tienen inconvenientes claros. Por un lado, mientras se intenta minimizar el cizallamiento excesivo, la mezcla de la suspensión celular con la solución de lisis puede ser incompleta. En otro aspecto, el uso de mezcladores estáticos limita la flexibilidad del proceso. Como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 2002/0198372, es necesario optimizar el número de elementos de mezcla estáticos, así como los caudales de los fluidos que pasan a través de los elementos. Tal optimización restringe la cantidad de material que puede procesarse en un momento dado con el aparato de mezcla estática optimizado. Esto limita la capacidad de aumentar la escala del proceso, a menos que se construya y optimice un nuevo aparato mezclador estático de mayor capacidad. El uso de recipientes de mezcla por lotes, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.395.516, tiene inconvenientes comparables. El logro de una mezcla completa en todas las regiones de un recipiente de mezcla por lotes es bien conocido por los expertos en la técnica como un desafío. Además, los recipientes de mezcla por lotes son poco adecuados para las aplicaciones que requieren un tiempo de exposición controlado como en el que la suspensión celular se pone en contacto con la solución de lisis. En particular, es bien sabido que la exposición prolongada a álcali de células que contienen plásmidos puede conducir a la formación de cantidades excesivas de plásmido desnaturalizado permanentemente, que generalmente es inactivo, indeseable y difícil de separar posteriormente del plásmido biológicamente activo.

Típicamente, es deseable limitar tales tiempos de exposición a aproximadamente 10 minutos o menos. Lograr tiempos de exposición tan limitados es difícil o imposible utilizando la mezcla por lotes a gran escala.

La eliminación del precipitado floculante es otro desafío más en el escalado de la lisis alcalina. La eliminación completa es deseable para eliminar el DNA genómico y otras impurezas atrapadas en el precipitado. Al mismo tiempo, el precipitado no debe someterse a un cizallamiento excesivo. De lo contrario, se liberan grandes cantidades de DNA genómico, endotoxinas y otras impurezas del precipitado y contaminan la solución que contiene el plásmido. A escala de laboratorio, el precipitado se elimina fácilmente mediante filtración simple, centrifugación discontinua o ambas. Sin embargo, la centrifugación por lotes es muy poco práctica a gran escala. La centrifugación continua a gran escala tampoco es adecuada porque somete el precipitado a un alto esfuerzo cortante, liberando niveles inaceptables de impurezas. La filtración a gran escala es problemática debido a la consistencia gelatinosa del precipitado, similar a la del queso, que obstruye fácilmente incluso los filtros de profundidad o de bolsa.

A pesar de los desafíos anteriores, una serie de investigadores han desarrollado mejoras del método de lisis alcalina, o de otra manera han intentado adaptarlo a un proceso de producción escalable. Kresheck y Altschuler, en la Patente de Estados Unidos N° 5.625.053, describen el uso de detergentes de óxido de alquildimetilfosfina no iónicos en lugar de SDS. Se afirma que el uso de estos detergentes ofrece ciertas ventajas relevantes para la preparación a gran escala de plásmidos de grado farmacéutico. Sin embargo, las mejoras reivindicadas no abordan los problemas de escalabilidad descritos anteriormente.

Thatcher et al., en la Patente de Estados Unidos N° 5.981.735, describen una modificación en la que la cantidad de NaOH añadido a las células suspendidas se controla cuidadosamente para garantizar que el pH permanezca aproximadamente 0,1 unidades de pH por debajo del punto que da como resultado una desnaturalización permanente sustancial de plásmido. Este enfoque puede abordar el problema de la generación dependiente del tiempo del plásmido desnaturalizado permanentemente, pero requiere un control de pH muy preciso, que puede ser difícil a gran escala. Además, el nivel de pH preferido debe determinarse de antemano para cada combinación de plásmido y célula huésped. Lo más importante, este enfoque no aborda los desafíos de manejar y mezclar grandes volúmenes de líquido.

Wan et al., en la Patente de Estados Unidos N° 5.837.529, describen un proceso de lisis de células, que comprende el uso de mezcladores estáticos para mezclar células suspendidas con una solución de lisis (por ejemplo, NaOH 0,2 N, SDS al 1%), así como mezclar células lisadas con una solución precipitante (p. ej. acetato de potasio 3 M, pH 5,5). Se dice que los mezcladores estáticos son particularmente ventajosos al proporcionar un alto grado de mezclado a un cizallamiento relativamente bajo, y también son susceptibles de un proceso continuo de flujo continuo. Bridenbaugh et al. describen un proceso similar con mezcladores estáticos en el documento WO 00/05358. Tales procedimientos ofrecen ciertas ventajas, pero los inconvenientes permanecen. Como se muestra en el documento WO 00/05358, tanto el número de elementos de mezcla estáticos como los caudales lineales de la solución deben controlarse cuidadosamente en cada etapa. Usar muy pocos elementos de mezcla o una velocidad de flujo lineal baja conduce a una mezcla inadecuada y bajos rendimientos de plásmidos. El uso de demasiados elementos o una velocidad de flujo lineal alta conduce a un cizallamiento excesivo y a la liberación de DNA genómico en la solución. Estos parámetros deben optimizarse experimentalmente, y cualquier esfuerzo para aumentar la escala del proceso requiere una optimización del número de elemento y la velocidad de flujo, lo que limita la flexibilidad del proceso y la solidez de este método para el uso rutinario.

Marquet et al., (1995, Biopharm 8, 26-37) describen el uso de mezcladores por lotes diseñados originalmente para su uso en la industria alimentaria. Afirman que estos mezcladores pueden proporcionar una mezcla completa a velocidades de cizallamiento bajas, lo que los hace adecuados para su uso durante la lisis alcalina a gran escala de células que contienen plásmidos. Sin embargo, la mezcla por lotes de grandes volúmenes de fluido en tanques a menudo es muy difícil de escalar, particularmente cuando hay diferencias dramáticas en la viscosidad del fluido, o cuando la mezcla en sí misma conduce a aumentos dramáticos en la viscosidad. La mezcla por lotes también es problemática cuando se combina con pasos de incubación cortos y sensibles al tiempo. Todas estas preocupaciones pertenecen a la lisis alcalina, lo que hace que la mezcla por lotes sea particularmente inadecuada.

Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos de los investigadores anteriores, todavía existe una clara necesidad de procedimientos nuevos y mejorados para realizar la lisis alcalina a gran escala. Un proceso preferido abordaría una serie de desafíos clave, que incluyen: (1) una mezcla completa, rápida y robusta de células y solución de lisis, para lisar eficientemente las células y liberar el plásmido; (2) incubación controlada por tiempo de células lisadas en álcali, para evitar la desnaturalización permanente del plásmido; (3) mezcla completa, rápida y suave de lisado alcalino con solución de neutralización/precipitación, para precipitar eficientemente componentes celulares contaminantes sin liberar el exceso de DNA genómico y endotoxina en la solución que contiene el plásmido; y (4) eliminación eficiente pero suave del precipitado floculante, nuevamente sin liberar DNA genómico y endotoxina en exceso en la solución que contiene el plásmido. Además, dicho proceso preferido sería fácilmente escalable, robusto, adecuado para su uso en todas las aplicaciones, no contendría productos derivados de animales y sería rentable.

También existe la necesidad de procedimientos mejorados para purificar plásmidos a partir de lisados de células microbianas a gran escala. En particular, los campos emergentes de la terapia génica no viral, la terapia mediada

por plásmidos y las vacunas de DNA requieren cantidades de gramos o incluso kilogramos de plásmido purificado adecuado para uso farmacéutico. Por lo tanto, es necesario purificar bien los plásmidos de las impurezas primarias que quedan en el lisado, incluidos el DNA genómico residual, el RNA, las proteínas y las endotoxinas. Un proceso ideal debería proporcionar material sustancialmente puro con alto rendimiento, ser fácil de escalar, implicar un número mínimo de pasos, y ser simple y económico de realizar. Debe evitarse el uso de enzimas o productos derivados animales, ya que dichos reactivos tienden a ser caros y, lo que es más importante, son fuentes potenciales de contaminación. De manera similar, se debe evitar el uso de alcoholes y solventes orgánicos, ya que generalmente son tóxicos, inflamables, explosivos y difíciles de eliminar en grandes cantidades. No se deben usar compuestos conocidos o sospechosos de ser tóxicos, mutagénicos, cancerígenos, teratogénicos o dañinos. Finalmente, el proceso debe evitar la necesidad de equipos costosos como centrifugadoras continuas o de gran escala, o plataformas de cromatografía que producen gradientes.

Se han realizado varios intentos de desarrollar un proceso de purificación de plásmidos que cumpla con estos ideales. Por ejemplo, Horn et al., en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.707.812, describen un proceso integrado que implica la lisis alcalina, filtración con tierra de diatomeas, concentración y desalación por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), precipitación durante toda la noche del plásmido con polietilenglicol (PEG) 8000 al 8%, centrifugación, resuspensión, precipitación de impurezas con acetato de amonio 2,5 M, centrifugación, precipitación del plásmido con isopropanol, centrifugación, resuspensión, cromatografía en columna de intercambio aniónico en presencia de PEG 8000 al 1% en Q Sepharose™ (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) con elución por etapas, precipitación de plásmido con isopropanol, centrifugación, resuspensión y cromatografía en columna de filtración en gel en Sephacryl™ S-1000 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ). No se describen los rendimientos, la calidad y la pureza del plásmido. Procesos similares son descritos por Marquet et al. en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.561.064. Estos procesos no se escalan fácilmente, debido a las múltiples precipitaciones y centrifugaciones de plásmidos. Además, lograr una resolución adecuada en una cromatografía en columna de filtración en gel requiere típicamente de columnas relativamente grandes. El uso de isopropanol en múltiples pasos es otra desventaja de este proceso.

La Patente de los Estados Unidos Nº 5.990.301, expedida a Colpan et al., describe un proceso integrado que implica una lisis alcalina, clarificación por centrifugación y filtración, incubación con sal (NaCl) y detergente no iónico, intercambio aniónico por cromatografía en columna de DEAE, precipitación con isopropanol, centrifugación y resuspensión. Se informa de que el plásmido resultante contiene RNA "no detectable", DNA genómico o endotoxina, pero no se describen los métodos y sus límites de detección. Este proceso tiene numerosos problemas de escalabilidad. Las resinas DEAE típicamente tienen una capacidad relativamente baja de plásmido. Además, el uso de precipitación y centrifugación con isopropanol para la concentración y desalado del producto no es factible a gran escala.

La Patente de Estados Unidos Nº 6.197.553, concedida a Lee y Sagar, describe un proceso integrado que implica la digestión de la pared celular con lisozima, una lisis pasando a través de un intercambiador de calor de flujo para calentar la suspensión celular a aproximadamente 80°C, clarificación por centrifugación, diafiltración, tratamiento con RNasa, diafiltración, cromatografía en columna de intercambio aniónico en POROS® P1/M (Applied Biosystems, Foster City, CA) con elución en gradiente de NaCl, cromatografía de fase inversa en POROS® R2/M con elución en gradiente de isopropanol y UF/DF. El producto final contenía un 2.9% de DNA genómico, <1% de proteína, <1% de RNA y niveles de endotoxina de 2,8 unidades de endotoxina (UE) por miligramo de plásmido. Sin embargo, este proceso adolece del uso de dos enzimas (lisozima y RNasa), de cromatografía de intercambio aniónico basada en gradiente y de cromatografía de fase reversa basada en gradiente usando isopropanol. Estos presentan problemas sustanciales de escalabilidad y/o regulación.

La Patente de Estados Unidos Nº 6.410.274, otorgada a Bhikhabhai, describe un proceso que implica la lisis alcalina, filtración, precipitación de RNA y DNA genómico con CaCl₂, centrifugación, filtración, cromatografía en columna de intercambio aniónico en Q Sepharose™ XL (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) con elución por etapas, y cromatografía en columna de intercambio aniónico adicional en Source™ 15Q (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) con elución por etapas. Se informó que el producto final contenía un 0,6% de DNA genómico (por PCR), el 100% de plásmido superenrollado (por cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico, "HPLC"), y RNA no detectable (por HPLC de fase inversa), proteína (por ensayo Micro BCA™, Pierce Biotechnology, Rockford, IL), o endotoxina (por lisado de amebocitos de limulus, "LAL"). El uso de dos pasos sucesivos de intercambio aniónico es una ineficiencia evidente de este proceso. Además, el proceso se basa en técnicas de cromatografía en columna, que implican hardware y resinas costosas.

El documento WO 00/05358, presentado por Bridenbaugh et al., describe un proceso en el que las células que contienen plásmidos se resuspenden en presencia de RNasa. Se describe un procedimiento de lisis continua, donde las células resuspendidas y una solución de lisis alcalina se bombean simultáneamente a través de un mezclador estático para lograr la lisis. El lisado se mezcla luego con una solución de precipitación de acetato de potasio a través de un segundo mezclador estático. El lisado precipitado luego pasa a una centrifuga continua para eliminar el precipitado floculante, lo que da como resultado un lisado clarificado. El lisado clarificado se filtra para eliminar las partículas finas y se purifica por cromatografía en columna de intercambio aniónico usando Fractogel® TMAE-650M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El eluato de intercambio aniónico se pasa a través de filtros de vidrio y nylon,

que se dice que ayudan a eliminar la endotoxina y el DNA genómico. El plásmido purificado se concentra y desala por UF/DF, y se esteriliza por filtración. Los niveles finales de endotoxina fueron de 16,2 EU/mg. Se dice que el RNA residual, la proteína y el DNA genómico eran habitualmente <2%, <0,1% y <1%, respectivamente. El uso de la centrifugación continua es un inconveniente significativo de este proceso, debido a las altas tasas de cizallamiento y la posterior liberación del exceso de DNA genómico en la solución, así como el alto coste de dicho equipo. El uso de RNasa es un inconveniente adicional de este proceso desde un punto de vista regulatorio.

La solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2001/0034435, presentada por Nochumson et al., describe un proceso en el que las células que contienen plásmidos se lisan con álcali y SDS en un proceso continuo usando mezcladores estáticos. El lisado se neutraliza mediante la adición continua (a través de un segundo conjunto de mezcladores estáticos) de una solución de neutralización/ precipitación. El lisado neutralizado se mantiene durante 6-12 horas a 4°C para precipitar la mayoría del RNA. El precipitado floculante y el RNA precipitado se eliminan por centrifugación y/o filtración, y la solución que contiene el plásmido se somete a cromatografía en columna de intercambio aniónico usando Fractogel® TMAE-650S (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El plásmido se eluye y se somete a cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), también en formato de columna, usando Octyl Sepharose™ 4FF (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ). En condiciones apropiadas, el DNA genómico, el RNA y la endotoxina se unen a la resina, mientras que el plásmido pasa. Después de la HIC, el producto se concentra y desala por UF/DF, y se filtra de forma estéril. La información detallada sobre rendimientos y pureza no se describe en esta solicitud. Sin embargo, las capacidades de unión del plásmido a las resinas son relativamente bajas (1-3 mg/ml para el intercambio aniónico, y <1 mg/ml para la HIC si se usa en modo de unión), y nuevamente, se depende de la cromatografía en columna.

Varley y col. (1999, Bioseparation 8, 209-217) describen un proceso que consiste en una lisis alcalina optimizada con tratamiento con RNasa, filtración de bolsa en profundidad, cromatografía de intercambio aniónico de lecho expandido, ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño. Procesos similares se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.981.735 de Thatcher et al. En estos procesos, el pH durante la lisis alcalina se controló cuidadosamente en un punto justo por debajo del nivel determinado empíricamente que conduce a la desnaturalización permanente del plásmido. Los investigadores afirman que esto permite una incubación prolongada en álcali, presumiblemente para maximizar la lisis y/o degradar el RNA sin dañar el plásmido. Se informó que las impurezas eran <2% de DNA genómico (por PCR), 0.2% de RNA (por HPLC), <0.1% de proteína, y 2,5 UE/mg de endotoxina. Sin embargo, el proceso contiene varios elementos indeseables, incluido el uso de RNasa, filtración de bolsa en profundidad, columna de intercambio de aniones y cromatografía de exclusión por tamaño. Realizar la lisis alcalina controlada requiere determinar cuidadosamente el pH ideal para una combinación dada de huésped, plásmido y condiciones de crecimiento, lo que sugiere que este paso puede no ser muy robusto.

Como sugieren los ejemplos anteriores, la cromatografía en columna es a menudo un elemento preferido en la purificación de plásmidos. La cromatografía de intercambio aniónico es muy adecuada para separar los plásmidos de ciertas impurezas, como las proteínas, porque los plásmidos, como todos los ácidos nucleicos, tienen una alta densidad de carga negativa. Por lo tanto, muchos procesos de purificación de plásmidos conocidos incluyen una etapa de intercambio aniónico. Sin embargo, la cromatografía de intercambio aniónico es menos adecuada para separar los plásmidos de otros ácidos nucleicos con densidades de carga negativa similares, como el DNA genómico o el RNA. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio aniónico se combina frecuentemente con otro paso cromatográfico para lograr un plásmido suficientemente puro. Como se discutió anteriormente, estos pueden incluir cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de fase inversa, cromatografía de interacción hidrófoba e incluso cromatografía de intercambio aniónico adicional. También se conocen otras técnicas cromatográficas. Por ejemplo, Wils y Ollivier, en el documento WO 97/35002, describen métodos para purificar plásmidos con hidroxiapatita cerámica. Yamamoto describe métodos comparables en la Patente de Estados Unidos N° 5.843.731. La cromatografía de iones emparejados o igualados puede usarse, como se describe, por ejemplo, por Gjerde et al. en la Patente de los Estados Unidos N° 5.986.085. También se puede usar sílice, cuentas de vidrio o fibras de vidrio, como se describe, por ejemplo, por Padhye et al. en la Patente de los Estados Unidos N° 5.808.041, por Woodard et al. en la Patente de los Estados Unidos N° 5.650.506, y por Woodard et al. en la Patente de los Estados Unidos N° 5.693.785. Alternativamente, pueden usarse cuentas o partículas magnéticas, como se describe, por ejemplo, por Reeve y Robinson en la Patente de Estados Unidos N° 5.665.554, y por Hawkins en la Patente de Estados Unidos N° 5.898.071. También se conocen métodos de afinidad, con ejemplos descritos por Ji y Smith en la Patente de los Estados Unidos N° 5.591.841, y por Cantor et al. en la Patente de los Estados Unidos N° 5.482.836.

A pesar del uso frecuente de la cromatografía en columna, sigue habiendo limitaciones sustanciales de esta técnica general. Las resinas de cromatografía a menudo son caras y deben empaquetarse cuidadosamente en hardware de columna especialmente diseñado. El empaquetamiento reproducible de columnas de cromatografía a gran escala es un desafío significativo, según lo discutido por Rathore et al. (2003, Biopharm International, marzo, 30-40). Además, en lo que respecta a los plásmidos, las resinas de cromatografía tradicionales suelen ofrecer capacidades de unión relativamente bajas. Por ejemplo, Levy et al. (2000, Trends Biotechnol. 18, 296-305) examinaron una variedad de resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente y descubrieron que todas mostraban capacidades de unión a plásmidos de aproximadamente 5 mg/ml o menos, y la mayoría exhibía capacidades de aproximadamente 2 mg/ml o menos. Además, la accesibilidad a los sitios de unión para moléculas grandes como los plásmidos es principalmente por difusión y las resinas tienen una presión de caída limitada que resulta en un bajo rendimiento, lo

que hace que estos pasos sean lentos, costosos y poco prácticos.

Por lo tanto, es deseable desarrollar un proceso de purificación que conserve las ventajas de la cromatografía en columna y evite sus inconvenientes. El uso de la cromatografía de membrana ofrece una potencial solución. Las técnicas basadas en membrana suelen ofrecer capacidades de unión sustancialmente más altas, así como caudales muy altos. No se requiere un hardware de columna costoso a gran escala. Además, se evitan las dificultades asociadas con el empaquetamiento de columnas, así como la necesidad de costosos estudios de validación de su limpieza.

Ciertos investigadores anteriores han revelado métodos basados en membranas para purificar plásmidos. Por ejemplo, Nieuwkerk et al., en el documento US 5.438.128, describen el uso de un conjunto que contiene una pluralidad de membranas microporosas de intercambio aniónico apiladas para purificar ácidos nucleicos, incluidos los plásmidos. Sin embargo, su método se describe para la purificación a pequeña escala de hasta varios cientos de microgramos de plásmido. Además, aunque se afirmó que el plásmido purificado estaba libre de RNA y proteínas, no se describió que los métodos proporcionados pudieran eliminar sustancialmente el DNA genómico o la endotoxina. Demmer y Nussbaumer, en la Patente de Estados Unidos nº 6.235.892, describen un método para purificar ácidos nucleicos, incluidos los plásmidos, a partir de una solución que contiene endotoxina, usando una membrana microporosa de intercambio aniónico débilmente básica. De manera similar, en el documento WO 01/94573, Yang et al. reivindica un proceso que involucra dos (o más) membranas separadas, en donde una une el plásmido y la segunda une la endotoxina. Los investigadores afirman que sus métodos proporcionan un plásmido adecuado para su uso en muchas aplicaciones farmacéuticas, pero no se proporcionan datos para respaldar esta afirmación.

Por lo tanto, ninguno de los procesos de purificación descritos basados en membranas es adecuado de forma demostrable para la preparación de un plásmido sustancialmente puro que sea aceptable para aplicaciones farmacéuticas, veterinarias o agrícolas. Por lo tanto, existe la necesidad de un proceso de purificación que emplee separaciones cromatográficas basadas en membranas, evite la cromatografía en columna y proporcione plásmidos sustancialmente puros u otras moléculas de interés biológicamente activas.

Ferreira et al., (Trends Biotechnol. 2000 sep; 18 (9): 380-8) discuten las operaciones posteriores para la purificación a gran escala de DNA plasmídico, describiendo sus principios y la estrategia utilizada para lograr un producto final que cumple con las especificaciones.

Ciccolini et al., (Bioprocess Engineering 21 (1999) 231-237) discuten las propiedades reológicas del DNA cromosómico y plasmídico durante la reacción de lisis alcalina.

Levy et al., (Trends Biotechnol. 2000 Jul; 18 (7): 296-305) discuten estrategias de ingeniería bioquímica para los desafíos de producir DNA plasmídico puro.

Resumen

El tema para el que se busca protección es el definido en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un dispositivo para lisar células bacterianas que contienen plásmidos de una manera controlada para extraer componentes celulares de interés, que comprende:

un primer tanque y un segundo tanque en comunicación fluida con un dispositivo de mezclado de bajo tiempo de residencia y alto cizallamiento, en el que el primer tanque está configurado para contener una suspensión de células que contienen componentes celulares de interés, el segundo tanque está configurado para contener una solución de lisis, y la suspensión de células del primer tanque y la solución de lisis del segundo tanque se dejan fluir ambas hacia el dispositivo de mezcla formando un primer fluido,

en el que el dispositivo de mezclado de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia tiene un tiempo de residencia igual o inferior a aproximadamente 1 segundo, y el dispositivo está configurado para hacer fluir el primer fluido desde el dispositivo de mezcla hasta una bobina de retención;

y una cámara mezcladora de burbujas en comunicación fluida con la bobina de retención;

una primera entrada configurada para introducir el primer fluido en la cámara mezcladora de burbujas;

una o más entradas adicionales configuradas para introducir un fluido adicional en la cámara mezcladora de burbujas;

un medio para introducir burbujas de gas en la cámara mezcladora de burbujas a una velocidad suficiente para causar una mezcla sustancial del primer fluido con el fluido adicional;

una ventilación configurada para permitir que el exceso de gas escape de la cámara mezcladora de burbujas;

y una salida para el primer fluido y el fluido adicional después de haberse mezclado sustancialmente;

en donde el tiempo de residencia de la bobina de retención es de 2 a 10 minutos;

en donde el medio configurado para introducir burbujas de gas en la cámara mezcladora es un tercer puerto de entrada;

en donde el componente celular de interés es DNA plasmídico; y

el fluido adicional comprende una solución de neutralización, una solución de precipitación o una combinación de las mismas.

La presente invención también proporciona un método para lisar células bacterianas que contienen plásmidos de una manera controlada para extraer componentes celulares de interés, que comprende:

- 5 (a) hacer fluir una suspensión celular y una solución de lisis a través de un dispositivo de mezclado de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia para producir un primer fluido, en el que el tiempo de residencia del dispositivo de mezcla es menor o igual a aproximadamente un segundo;
- (b) hacer fluir el primer fluido desde el dispositivo de mezcla a una bobina de retención y transportar el primer fluido a una cámara a través de la bobina de retención, en el que el tiempo de residencia de la bobina de retención es de 2 a 10 minutos;
- 10 (c) hacer fluir el primer fluido y el fluido adicional a través de la cámara, en donde el fluido adicional comprende una solución de neutralización, una solución de precipitación, o una combinación de las mismas;
- (d) introducir burbujas de gas en la cámara, en donde las burbujas se introducen a una velocidad suficiente para causar que el primer fluido y el fluido adicional se mezclen sustancialmente formando una suspensión con mezcla de gas, en donde la suspensión con mezcla de gas comprende el componente celular de interés en un tercer fluido y
- 15 (e) hacer flotar el precipitado sobre el tercer fluido; y
- (f) eliminar el precipitado del tercer fluido que forma un tercer fluido clarificado, por lo que el componente celular de interés en la tercera solución clarificada se separa sustancialmente de los restos celulares en el precipitado, en donde el componente celular de interés es el DNA plasmídico.

20 La presente invención se refiere a un proceso para lisar células de manera controlada para separar eficientemente componentes insolubles de un lisado fluido que contiene componentes celulares de interés, seguido de técnicas de cromatografía de membrana para purificar los componentes celulares de interés. Este proceso utiliza un aparato de lisis único, intercambio iónico y, opcionalmente, membranas de cromatografía de interacción hidrofóbica en forma de

25 cartucho, y ultrafiltración. Este proceso está optimizado para la producción de plásmidos, pero puede aplicarse a cualquier producto biológico extraído de una fuente celular. De forma ventajosa, el proceso no utiliza productos derivados animales, solventes orgánicos o carcinógenos, y es rápido y rentable. El proceso puede utilizarse para extraer y purificar plásmidos de la bacteria *E. coli*, y proporciona material adecuado para una variedad de usos, incluida la producción clínica y comercial de productos farmacéuticos. El proceso divulgado utiliza un aparato de lisis,

30 que incluye un mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia para mezclar de forma ventajosa una suspensión celular con una solución de lisis, con un tiempo de retención que desnaturaliza las impurezas y un mezclador de burbujas que burbujea aire y que mezcla suave pero completamente las células lisadas con un tampón de neutralización/ precipitación y hace flotar el material celular precipitado compactado. El material celular precipitado flotante puede separarse fácilmente del fluido restante mediante el simple recurso de drenar o bombear el fluido por debajo del precipitado flotante, permitiendo que los componentes celulares de interés se purifiquen

35 posteriormente a partir del fluido (preferiblemente) o del precipitado.

El método para producir un componente celular de interés a partir de una población celular comprende someter la población celular al aparato y métodos de lisis celular y de separación descritos para preparar un lisado clarificado.

40 Los componentes celulares de interés se purifican del lisado clarificado sometiéndolo a un cartucho de intercambio iónico, opcionalmente seguido de un cartucho de interacción hidrofóbica. Después de la purificación, se realiza una ultrafiltración/diafiltración para concentrar y desalar el material sustancialmente purificado. Si se desea, el material purificado se puede someter a una filtración estéril para proporcionar un material estéril, sustancialmente purificado.

45 La presente invención ofrece numerosos beneficios sobre los métodos descritos previamente. En un aspecto, la presente invención describe una forma mejorada de mezclar una suspensión celular con una solución de lisis. Claramente, es deseable lograr la mezcla completa de una suspensión celular con la solución de lisis, de modo que sustancialmente todas las células se lisen y liberen los componentes celulares de interés en el lisado para su posterior purificación. La mezcla incompleta de una suspensión celular con una solución de lisis puede dar como

50 resultado que una porción sustancial de las células permanezca intacta. Esto dará como resultado rendimientos subóptimos de los componentes celulares de interés, incrementando los costos del producto y requiriendo mayores escalas de producción para recuperar la cantidad deseada de producto final.

La presente invención reconoce que no es necesaria una mezcla de bajo cizallamiento de una suspensión celular y una solución de lisis, incluso para la exigente aplicación de lisar células que contienen plásmidos con álcali. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para mezclar una suspensión celular y una solución de lisis usando un dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia. La naturaleza de alto cizallamiento del método descrito asegura una mezcla sustancialmente completa de la suspensión celular y la solución de lisis. El bajo tiempo de residencia proporcionado por el método descrito evita someter los componentes

60 celulares liberados por las células de lisis a períodos prolongados de alto cizallamiento. En una realización preferible, la mezcla se realiza en un modo de flujo continuo, que proporciona una ventaja sustancial en el procesamiento de grandes volúmenes, y es particularmente ventajosa en el control del tiempo de exposición a la solución de lisis. A diferencia de la mezcla estática, la presente invención proporciona una gran flexibilidad de proceso. La mezcla sustancialmente completa no depende de las velocidades de flujo del fluido, y la velocidad de agitación del dispositivo de mezcla se ajusta fácilmente. Por lo tanto, un experto en la materia reconocerá fácilmente que las velocidades de flujo de fluido a través del dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de

65

residencia pueden variar en un amplio intervalo. Esto proporciona una libertad sustancial para aumentar la cantidad de material procesado en un momento dado sin modificar el aparato.

En otro aspecto, la presente invención describe un método mejorado para mezclar un lisado celular con uno o más fluidos adicionales mientras se evita el cizallamiento de componentes sensibles. Por ejemplo, mientras que la presente invención describe que las células que contienen plásmidos pueden mezclarse con una solución de lisis alcalina en condiciones de alto cizallamiento, sigue siendo cierto que los pasos de mezcla posteriores que implican la solución de células lisadas deben realizarse en condiciones de bajo cizallamiento. En particular, es común mezclar lisados alcalinos de células que contienen plásmidos con una solución neutralizante y precipitante que neutraliza simultáneamente el álcali y precipita varios componentes celulares. La neutralización evita la formación de plásmidos desnaturalizados permanentemente, mientras que la precipitación secuestra grandes cantidades de DNA genómico, endotoxina, proteínas, lípidos, lipopolisacáridos, pared celular y componentes de la membrana en un material sólido floculante. Es bien sabido que la mezcla vigorosa o de alto cizallamiento en este paso libera cantidades excesivas de DNA genómico, endotoxina y otras impurezas en la solución que contiene el plásmido. Estas impurezas son difíciles de purificar posteriormente del plásmido activo. Por lo tanto, es altamente deseable realizar este paso utilizando un proceso de mezcla suave y de bajo cizallamiento. Al mismo tiempo, es necesario lograr una mezcla sustancialmente completa en este paso. De lo contrario, algunas porciones del plásmido se someterán a álcali durante tiempos excesivos y se desnaturalizarán permanentemente. Del mismo modo, una mezcla insuficiente puede conducir a una precipitación incompleta de los componentes celulares, lo que complica los esfuerzos posteriores para preparar el plásmido sustancialmente purificado.

Como se discutió anteriormente, los investigadores anteriores han intentado abordar estas necesidades utilizando técnicas como la mezcla estática o la mezcla discontinua de bajo cizallamiento. Los inconvenientes de estas técnicas se han descrito anteriormente y son claramente evidentes para un experto en la materia. La presente invención describe el uso de un mezclador de burbujas para mezclar lisados celulares con fluidos tales como soluciones de neutralización/ precipitación. La presente invención también describe un dispositivo de mezcla de burbujas que puede usarse para realizar el método divulgado. De forma ventajosa, el método y el dispositivo descritos en el presente documento usan burbujas de gas para lograr una mezcla completa de los fluidos. Simultáneamente, algunas de las burbujas de gas quedan atrapadas en los componentes celulares precipitados resultantes. Esto facilita la flotación del material precipitado, ayudando de forma ventajosa a su posterior separación del fluido que contiene los componentes celulares de interés. Este es un beneficio notable de la presente invención.

La presente invención proporciona métodos integrados para preparar un lisado clarificado que contiene componentes celulares de interés, así como un aparato útil para realizar los métodos. En este aspecto, los métodos descritos individualmente descritos anteriormente se combinan en un proceso continuo que comprende: (1) mezclar una suspensión celular con una solución de lisis usando un mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia; (2) hacer pasar la suspensión de células y la solución de lisis mezcladas a través de una bobina de retención para proporcionar un tiempo de exposición fijo suficiente para proporcionar una lisis celular sustancialmente completa y una desnaturalización del DNA genómico; (3) mezclar las células lisadas con una solución tal como una solución de neutralización/ precipitación usando un mezclador de burbujas, atrapando así las burbujas de gas en los componentes celulares precipitados; y (4) recoger el material resultante en un tanque de sedimentación.

De forma ventajosa, estos pasos se realizan como un proceso continuo, ofreciendo al operador una flexibilidad sustancial y facilidad de realización. En realizaciones adicionales, el material recogido en el tanque de sedimentación se mantiene durante el tiempo suficiente para que los componentes celulares precipitados formen una capa flotante. La formación de esta capa es apoyada por las burbujas atrapadas introducidas por el mezclador de burbujas. Opcionalmente, se puede aplicar vacío al material en el tanque de sedimentación para compactar aún más los componentes celulares precipitados y desgasificar el fluido. Posteriormente, el fluido puede separarse de los componentes celulares precipitados bombeándolo o drenándolo por debajo de los componentes celulares precipitados. El fluido separado resultante comprende un lisado clarificado que luego puede someterse a varios métodos para purificar sustancialmente los componentes celulares de interés presentes en el lisado. Una ventaja de la invención descrita es que los componentes celulares precipitados floculantes se separan del fluido sin recurrir a filtración profunda o centrifugación.

La presente invención proporciona métodos para purificar componentes celulares de interés a partir de células lisadas. En los métodos de la invención, los componentes celulares de interés son plásmidos, y las células son células que contienen plásmidos. Los métodos utilizan la purificación de membrana de intercambio iónico, opcionalmente seguida de una segunda purificación de membrana que elimina la endotoxina y el RNA, para proporcionar un producto sustancialmente purificado. Preferiblemente, el intercambio iónico toma la forma de intercambio aniónico. Preferiblemente, la segunda purificación de membrana toma la forma de interacción hidrofóbica. Se pueden realizar pasos adicionales tales como la ultrafiltración/ diafiltración y filtración estéril para concentrar, desalar y esterilizar el componente celular de interés. De forma ventajosa, los métodos descritos en este documento evitan el uso de la cromatografía en columna tradicional, que emplea resinas de cromatografía costosas y hardware de columna, normalmente está limitada por una capacidad de unión pobre, y está típicamente limitada a caudales bajos de flujo de fluido. Por el contrario, los métodos de purificación basados en membrana descritos en

este documento ofrecen un coste reducido, alta capacidad de unión y altos caudales, lo que da como resultado un proceso de purificación superior. Se demuestra además que el proceso de purificación produce productos plasmídicos sustancialmente libres de DNA genómico, RNA, proteína y endotoxina.

5 En una realización particularmente preferida, todos los aspectos descritos de la presente invención se combinan de forma ventajosa para proporcionar un proceso integrado para preparar componentes celulares sustancialmente purificados de interés a partir de células. De nuevo, las células son preferiblemente células que contienen plásmidos, y los componentes celulares de interés son más preferiblemente plásmidos. Los plásmidos sustancialmente purificados son adecuados para diversos usos, que incluyen, entre otros, terapia génica, terapia mediada por
10 plásmidos, como vacunas de DNA para uso humano, veterinario o agrícola, o para cualquier otra aplicación que requiera grandes cantidades de plásmido purificado. En este aspecto, todas las ventajas descritas para los aspectos individuales de la presente invención se derivan del proceso completo e integrado, proporcionando un método altamente ventajoso que es rápido, escalable y económico. Se evitan las enzimas y otros productos derivados de animales o de origen biológico, al igual que las sustancias cancerígenas, mutagénicas o tóxicas. Los disolventes
15 orgánicos potencialmente inflamables, explosivos o tóxicos se evitan de manera similar.

Un aspecto de la presente invención es un aparato para aislar DNA plasmídico de una suspensión de células que tienen tanto DNA plasmídico como DNA genómico. Una realización del aparato comprende un primer tanque y un
20 segundo tanque en comunicación fluida con un mezclador. El primer tanque se usa para contener las células de suspensión y el segundo tanque se usa para contener una solución de lisis. La suspensión de células del primer tanque y la solución de lisis del segundo tanque pueden fluir hacia el mezclador formando una mezcla de lisado o fluido de lisado. El mezclador comprende un dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia con un tiempo de residencia igual o inferior a aproximadamente 1 segundo. En una realización preferible, el
25 dispositivo de mezcla comprende un mezclador de rotor/estator o emulsificador de flujo con caudales lineales de aproximadamente 0,1 l/min a aproximadamente 20 l/min. La mezcla de lisado fluye desde el mezclador a una bobina de retención durante un período de tiempo suficiente para lisar las células y formar una suspensión de lisado celular, en donde la mezcla de lisado tiene un tiempo de residencia en la bobina de retención en un rango de aproximadamente 2-8 minutos con un flujo lineal continuo.

30 La suspensión de lisado celular luego se deja fluir dentro de una cámara mezcladora de burbujas para la precipitación de los componentes celulares a partir del DNA plasmídico. En la cámara mezcladora de burbujas, la suspensión de lisado celular y una solución de precipitación o una solución de neutralización de un tercer tanque se mezclan usando burbujas de gas, que forman una suspensión de gas mixta que comprende un precipitado y un
35 lisado no aclarado o fluido que contiene plásmido. El precipitado de la suspensión con mezcla de gas es menos denso que el fluido que contiene el plásmido, lo que facilita la separación del precipitado del fluido que contiene el plásmido. El precipitado se retira de la suspensión con mezcla de gas para dar un lisado clarificado que tiene el DNA plasmídico, y el precipitado tiene los restos celulares y DNA genómico.

En una realización preferible, la cámara mezcladora de burbujas comprende una columna vertical cerrada con una
40 parte superior, una parte inferior, un primer y un segundo lado con una ventilación proximal a la parte superior de la columna. Un primer puerto de entrada de la cámara mezcladora de burbujas está en el primer lado proximal al fondo de la columna y en comunicación fluida con la bobina de retención. Un segundo puerto de entrada de la cámara mezcladora de burbujas está próximo al fondo en un segundo lado opuesto al primer puerto de entrada y en
45 comunicación fluida con un tercer tanque, en donde el tercer tanque se usa para contener una solución de precipitación o neutralización. Un tercer puerto de entrada de la cámara mezcladora de burbujas está próximo al fondo de la columna y aproximadamente en medio entre las entradas primera y segunda, y está en comunicación fluida con una fuente de gas por la tercera entrada que ingresa a la cámara mezcladora de burbujas. Una realización preferible utiliza un burbujeador sinterizado dentro de la columna vertical cerrada del tercer puerto de entrada. El
50 puerto de salida que sale de la cámara mezcladora de burbujas está próximo a la parte superior de la columna vertical cerrada. El puerto de salida está en comunicación fluida con un cuarto tanque, en donde la suspensión mezcla de gas que contiene el DNA plasmídico puede fluir desde la cámara mezcladora de burbujas al cuarto tanque. El cuarto tanque se usa para separar el precipitado de la suspensión mezcla de gas que tiene un fluido que contiene plásmido, y también puede incluir un mezclador de palas suficiente para proporcionar una mezcla uniforme de fluido sin alterar el precipitado. Se utiliza un quinto tanque para contener el lisado clarificado o el fluido clarificado
55 que contiene plásmido. El lisado clarificado se filtra al menos una vez. Un primer filtro tiene un límite de tamaño de partícula de aproximadamente 5-10 μm y el segundo filtro tiene un umbral de aproximadamente 0.2 μm .

Aunque se pueden usar la gravedad, la presión, el vacío o una mezcla de los mismos para transportar la suspensión de células, soluciones de lisis, soluciones de precipitación, soluciones de neutralización o suspensiones mezcla de
60 gases desde cualquiera de los tanques a los mezcladores, bobinas de retención o diferentes tanques, en una realización preferible se utilizan las bombas. En una realización más preferible, se usa al menos una bomba que tiene un caudal lineal de al menos 0,1-1 pie/segundo.

En otra realización específica, un conector en Y que tiene una primera rama bifurcada, una segunda rama bifurcada
65 y una rama de salida, se utiliza para poner en contacto la suspensión celular y las soluciones de lisis antes de que entren en el dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia. El primer tanque que contiene la

suspensión celular está en comunicación fluida con la primera rama bifurcada del conector Y a través de la primera bomba y el segundo tanque que contiene la solución de lisis está en comunicación fluida con la segunda rama bifurcada del conector Y a través de la segunda bomba. El dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia está en comunicación fluida con la rama de salida del conector Y, en donde la primera y la segunda bombas proporcionan una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 0,1 a 2 pies/segundo para el fluido puesto en contacto que sale del conector Y.

Otro aspecto específico de la presente invención es un método para separar sustancialmente el DNA plasmídico y el DNA genómico de un lisado de células bacterianas. El método comprende: administrar un lisado celular en una cámara; suministrar un fluido de precipitación o un fluido de neutralización a la cámara; mezclar el lisado celular y el fluido de precipitación o un fluido de neutralización en la cámara con burbujas de gas que forman una suspensión con mezcla de gas, en donde la suspensión con mezcla de gas comprende el DNA plasmídico en una porción del fluido (es decir, el lisado no clarificado) y el DNA genómico está en un precipitado que es menos denso que la porción fluida; flotando el precipitado en la parte superior de la porción de fluido; retirar la porción fluida del precipitado formando un lisado clarificado, por lo que el DNA plasmídico en el lisado clarificado se separa sustancialmente del DNA genómico en el precipitado. En realizaciones preferibles: la cámara es la cámara mezcladora de burbujas como se ha descrito anteriormente; la solución de lisis comprende un álcali, un ácido, un detergente, un solvente orgánico, una enzima, un caótopo o un desnaturalizante; el fluido de precipitación o el fluido de neutralización comprende acetato de potasio, acetato de amonio o una mezcla de los mismos; y las burbujas de gas comprenden aire comprimido o un gas inerte. Además, la porción de fluido decantado que contiene el DNA plasmídico preferiblemente se purifica adicionalmente con uno o más pasos de purificación seleccionados de un grupo que consiste en: intercambio iónico, interacción hidrofóbica, exclusión por tamaño, purificación de fase reversa, eliminación de endotoxinas, purificación por afinidad, adsorción a sílice, vidrio o materiales poliméricos, cromatografía de lecho expandido, cromatografía de modo mixto, cromatografía de desplazamiento, purificación de hidroxapatita, precipitación selectiva, purificación acuosa en dos fases, condensación de DNA, purificación tioflica, purificación por pares de iones, purificación de quelatos metálicos, filtración a través de nitrocelulosa, o ultrafiltración.

Un aspecto específico preferido es un método para aislar un DNA plasmídico de las células que comprende: mezclar una suspensión de células que tienen el DNA plasmídico y el DNA genómico con una solución de lisis en un dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y tiempo de residencia bajo, durante un primer período de tiempo formando un fluido de lisado celular, incubar el fluido de lisado celular durante un segundo período de tiempo en una bobina de retención que forma una suspensión de lisado celular, administrar la suspensión de lisado celular en una cámara, suministrar un fluido de precipitación/ neutralización a la cámara, mezclar la suspensión de lisado celular y el fluido de precipitación/ neutralización en la cámara con burbujas de gas que forman una suspensión mezcla de gas, en donde la suspensión mezclada de gas comprende un lisado no clarificado que contiene el DNA plasmídico y un precipitado que contiene el DNA genómico, en donde el precipitado es menos denso que el lisado no clarificado; flotando el precipitado sobre el lisado no clarificado, eliminar el precipitado del lisado no clarificado formando un lisado clarificado, por lo que el DNA plasmídico se separa sustancialmente del DNA genómico, precipitar el DNA plasmídico del lisado clarificado formando un DNA plasmídico precipitado, y resuspender el DNA plasmídico precipitado en una solución acuosa.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de flujo resumido de los pasos descritos en el presente documento para aislar un componente celular de interés tal como un plásmido, que comienza con la fermentación celular y conduce a un producto purificado a granel.

La figura 2 es un diagrama del aparato utilizado en este documento para la lisis celular continua y la neutralización/ precipitación.

La Figura 3 es un diagrama del mezclador de burbujas descrito aquí.

La figura 4 es un diagrama de la separación sólido/ líquido.

La Figura 5 es un diagrama de flujo de la purificación, concentración/ desalación y filtración estéril del producto.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Como se usa en el presente documento, el término "un" o "una" puede referirse a uno o más de uno. Como se usa en el presente documento en las reivindicaciones, cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Como se usa en el presente documento, el término "álcali" se refiere a una sustancia que proporciona un pH mayor de aproximadamente 8 cuando se agrega una cantidad suficiente de la sustancia al agua. El término álcali incluye, pero no se limita a, hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de litio (LiOH).

Como se usa en el presente documento, el término "detergente" se refiere a cualquier agente anfipático o tensioactivo, ya sea neutro, aniónico, catiónico o zwitteriónico. El término detergente incluye, entre otros, dodecilsulfato de sodio (SDS), Triton® (éter de polietilenglicol terc-octilfenilo, Dow Chemical Co., Midland, MI), Pluronic® (copolímero de bloques de óxido de etileno/óxido de propileno, BASF Corp., Mount Olive, NJ), Brij® (éter de polioxietileno, ICI Americas, Bridgewater, NJ), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO), Tween® (polietilenglicol sorbitano, ICI Americas, Bridgewater, NJ), sales de ácidos biliares, cetiltrimetilamonio, N-lauroilsarcosina, Zwittergent® (n-alkuil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, Calbiochem, San Diego, CA), etc.

Como se usa en el presente documento, el término "intercambio iónico" se refiere a una técnica de separación basada principalmente en interacciones iónicas entre una molécula o moléculas de interés y un material de intercambio iónico adecuado. Aunque el material de intercambio iónico puede tomar la forma de una resina o membrana de cromatografía, puede ser cualquier material adecuado para realizar separaciones basadas en interacciones iónicas. El término intercambio iónico abarca intercambio aniónico, intercambio catiónico y combinaciones de intercambio aniónico y catiónico.

Como se usa en el presente documento, el término "intercambio aniónico" se refiere a una técnica de separación basada principalmente en interacciones iónicas entre una o más cargas negativas en una molécula o moléculas de interés, y un material de intercambio aniónico cargado positivamente adecuado. Aunque el material de intercambio aniónico puede tomar la forma de una resina o membrana de cromatografía, puede ser cualquier material adecuado para realizar separaciones basadas en las interacciones iónicas descritas.

Como se usa en el presente documento, el término "intercambio catiónico" se refiere a una técnica de separación basada principalmente en interacciones iónicas entre una o más cargas positivas en una molécula o moléculas de interés, y un material de intercambio catiónico cargado negativamente adecuado. Aunque el material de intercambio catiónico puede tomar la forma de una resina o membrana de cromatografía, puede ser cualquier material adecuado para realizar separaciones basadas en las interacciones iónicas descritas.

Como se usa en el presente documento, los términos "interacción hidrofóbica" y "HIC" se refieren a una técnica de separación basada principalmente en interacciones hidrofóbicas entre una molécula o moléculas de interés, y un material adecuado principalmente hidrofóbico o hidrofílico. Aunque el material principalmente hidrofóbico o hidrófilo puede tomar la forma de una resina o membrana de cromatografía, puede ser cualquier material adecuado para realizar separaciones basadas en interacciones hidrofóbicas.

Como se usa en el presente documento, el término "plásmido" se refiere a cualquier entidad distinta de ácido nucleico derivada de células que no es parte o un fragmento del genoma primario de la célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término "plásmido" puede referirse a moléculas circulares o lineales compuestas de RNA o DNA. El término "plásmido" puede referirse a moléculas monocatenarias o bicatenarias, e incluye entidades de ácido nucleico tales como virus y fagos.

Como se usa en el presente documento, el término "DNA genómico" se refiere al DNA derivado del genoma de una célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término incluye moléculas de DNA que comprenden todo o parte del genoma primario de la célula huésped, ya sea lineal o circular, monocatenario o bicatenario.

Como se usa en el presente documento, el término "endotoxina" se refiere a material de lipopolisacárido que se deriva de las bacterias Gram negativas y que causa efectos adversos en animales. La endotoxina se puede detectar típicamente mediante el ensayo de lisado de amebocitos de limulus ("LAL").

Como se usa en el presente documento, el término "mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia" describe cualquier dispositivo que someta un fluido o fluidos, tales como un fluido o fluidos biológicos (que contienen, entre otros, plásmidos, suspensión celular, solución de lisis, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, otros, o una mezcla de los mismos) durante breves períodos de alto cizallamiento, a una velocidad de cizallamiento de al menos 4000/s, lo que resulta en una mezcla sustancialmente completa de todos los elementos y componentes del fluido o fluidos en aproximadamente 1 segundo o menos.

Como se usa en el presente documento, el término "cromatografía" incluye cualquier técnica de separación que implica una molécula o moléculas que interactúan con una matriz. La matriz puede tomar la forma de cuentas sólidas o porosas, resina, partículas, membranas o cualquier otro material adecuado. A menos que se especifique lo contrario, la cromatografía incluye tanto técnicas de flujo continuo como discontinuas.

Como se usa en el presente documento, el término "precipitación" se refiere al proceso mediante el cual uno o más componentes presentes en una solución, suspensión, emulsión o estado similar forman un material sólido.

Como se usa en el presente documento, los términos "solución de precipitación" y "solución precipitante" se refieren a cualquier solución, suspensión u otro fluido que induce la precipitación. A menos que se especifique lo contrario,

una solución de precipitación también puede proporcionar neutralización.

Como se usa en este documento, el término "neutralización" se refiere a un proceso mediante el cual el pH de un material ácido o alcalino se acerca a la neutralidad. Típicamente, la neutralización lleva el pH a un rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 8.

Como se usa en el presente documento, los términos "solución de neutralización" y "solución neutralizante" se refieren a cualquier solución, suspensión u otro fluido que da como resultado la neutralización cuando se mezcla con un material ácido o alcalino. A menos que se especifique lo contrario, una solución de neutralización también puede proporcionar precipitación.

Como se usa en el presente documento, el término "solución de neutralización/ precipitación" se refiere a cualquier solución, suspensión u otro fluido que proporciona tanto neutralización como precipitación.

Como se usa en el presente documento, el término "componentes celulares" incluye cualquier molécula, grupo de moléculas o porción de una molécula derivada de una célula. Los ejemplos de componentes celulares incluyen, entre otros, DNA, RNA, proteínas, plásmidos, lípidos, carbohidratos, monosacáridos, polisacáridos, lipopolisacáridos, endotoxinas, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "membrana", como se usa con respecto a los métodos y materiales de cromatografía o separación, se refiere a cualquier material sólido sustancialmente continuo que tiene una pluralidad de poros o canales a través de los cuales puede fluir el fluido. Una membrana puede, sin limitación, comprender geometrías tales como una lámina plana, capas dobladas o plegadas, y monolitos porosos fundidos o reticulados. Por el contrario, cuando se usa en referencia a un componente celular, el término "membrana" se refiere a todo o parte de la envoltura a base de lípidos que rodea una célula.

Como se usa en este documento, el término "mezclador de burbujas" se refiere a cualquier dispositivo que usa burbujas de gas para mezclar dos o más materiales no mezclados o mezclados de forma incompleta.

Como se usa en el presente documento, el término "suspensión celular" se refiere a cualquier fluido que comprende células, agregados celulares o fragmentos celulares.

Como se usa en el presente documento, el término "lisado celular" se refiere a cualquier material que comprende células, en el que una porción sustancial de las células se ha roto y liberado sus componentes internos.

Como se usa en el presente documento, el término "solución de lisis" se refiere a cualquier solución, suspensión, emulsión u otro fluido que causa la lisis de las células que se ponen en contacto.

Como se usa en el presente documento, el término "lisado clarificado" se refiere a un lisado al que se le han eliminado sustancialmente las partículas sólidas visibles.

Como se usa en el presente documento, el término "macropartículas" se refiere a materia sólida que comprende partículas mayores que o de aproximadamente 100 μm de diámetro.

Como se usa en el presente documento, el término "micropartículas" se refiere a materia sólida que comprende partículas menores que o de aproximadamente 100 μm de diámetro.

Como se usa en este documento, los términos "ultrafiltración" y "UF" se refieren a cualquier técnica en la que una solución o una suspensión se somete a una membrana semipermeable que retiene macromoléculas mientras permite el paso de solventes y pequeñas moléculas de soluto. La ultrafiltración se puede usar para aumentar la concentración de macromoléculas en una solución o suspensión. A menos que se especifique lo contrario, el término ultrafiltración abarca tanto técnicas continuas como discontinuas.

Como se usa en el presente documento, los términos "diafiltración" y "DF" se refieren a cualquier técnica en la que el disolvente y las moléculas de soluto pequeñas presentes en una solución o suspensión de macromoléculas se eliminan por ultrafiltración y se reemplazan con diferentes moléculas de disolvente y soluto. La diafiltración puede usarse para alterar el pH, la fuerza iónica, la composición de sal, la composición de tampón u otras propiedades de una solución o suspensión de macromoléculas. A menos que se especifique lo contrario, el término diafiltración abarca tanto técnicas continuas como discontinuas.

Como se usa en este documento, los términos "ultrafiltración/ diafiltración" y "UF/ DF" se refieren a cualquier técnica o combinación de técnicas que logren tanto la ultrafiltración como la diafiltración, ya sea de forma secuencial o simultánea.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para lisar células de manera controlada para extraer componentes celulares de interés. Las células pueden ser cualquier célula que contenga componentes celulares de

interés. Preferentemente, son células microbianas. Más preferiblemente, son células de E. coli. Las células pueden producirse o generarse por cualquier medio, pero preferiblemente se generan por fermentación. Los métodos para fermentar células son bien conocidos por los expertos en la materia. La presente descripción puede emplearse para extraer cualquier componente celular de interés de las células. Preferiblemente, estas serán macromoléculas tales como plásmidos o proteínas. Más preferiblemente, son plásmidos. Por lo tanto, en una realización preferible, la presente invención se refiere a un método ventajoso para lisar células de E. coli que contienen plásmidos para extraer los plásmidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para purificar componentes celulares de interés de un lisado celular. El lisado celular puede ser un lisado de cualquier tipo de células que contengan los componentes celulares de interés. Además, el lisado celular puede producirse por cualquier medio conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, el lisado comprende células que contienen plásmidos lisados. Más preferiblemente, el lisado comprende células que contienen plásmidos lisados con álcali, detergente o una combinación de los mismos. Preferiblemente, los componentes celulares de interés son plásmidos.

La figura 1 presenta un resumen general de una realización especialmente preferible que combina todos los aspectos de la presente invención. En el primer paso, las células de interés son producidas y recogidas. Preferiblemente, las células se producen por fermentación. Se puede utilizar cualquier método de fermentación, y está dentro de las capacidades de un experto en la materia preparar cantidades suficientes de las células de interés. En realizaciones particularmente preferidas, las células son E. coli que contiene un alto número de copias del plásmido de interés, y las células que contienen plásmido se fermentan a alta densidad usando técnicas discontinuas o alimentadas por lotes. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para preparar tales células de E. coli que contienen plásmidos y realizar dicha fermentación continua o discontinua. Las células se recogen por cualquier medio, como la centrifugación o filtración, para formar una pasta celular. Tales métodos de recogida son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, los expertos en la materia reconocerán que las células o la pasta celular recogidas pueden procesarse inmediatamente o almacenarse en estado congelado o refrigerado para su procesamiento en una fecha posterior.

En el segundo paso, las células se lisan para liberar su contenido, incluidos los componentes celulares de interés, en la solución. Los métodos preferibles para realizar este paso se describen en este documento, y se describen en detalle a continuación.

En el tercer paso, los restos celulares sólidos y los componentes celulares precipitados se separan de un lisado clarificado. Los métodos preferibles para realizar este paso se describen en este documento, y se describen en detalle a continuación.

En el cuarto paso, las soluciones que contienen los componentes celulares de interés se someten a cromatografía de intercambio iónico. Preferiblemente, esto se realiza usando un enfoque basado en membrana. Preferiblemente, esta es una cromatografía de membrana de intercambio aniónico. Los métodos específicos para realizar este paso se describen adicionalmente en detalle a continuación.

En el quinto paso, el material parcialmente purificado resultante de la cromatografía de intercambio iónico se somete a una cromatografía de interacción hidrófoba. Preferiblemente, esto se realiza usando una estrategia basada en membranas. Los métodos específicos para realizar este paso se describen adicionalmente en detalle a continuación. En ciertas realizaciones, este paso puede omitirse.

En el sexto paso, el material resultante de la cromatografía de interacción hidrofóbica (si se realiza) o de la cromatografía de intercambio iónico (si se omite la HIC) se somete a una ultrafiltración y diafiltración, para concentrar los componentes celulares de interés y eliminar el exceso de sales de la solución. El uso de ultrafiltración/diafiltración es bien conocido por los expertos en la técnica, especialmente para macromoléculas biológicas tales como proteínas o plásmidos.

En el séptimo paso, el producto concentrado y desalado se somete opcionalmente a una filtración estéril, por ejemplo, para hacerlo adecuado para usos farmacéuticos. Una vez más, los métodos para realizar este paso están dentro del conocimiento de los expertos en la materia.

El resultado de estos pasos es una preparación en masa de los componentes celulares de interés sustancialmente purificados. Preferiblemente, estos componentes celulares son plásmidos. Más preferiblemente, están sustancialmente libres de DNA genómico, RNA, proteína y endotoxina.

La figura 2 es un diagrama del aparato utilizado para la lisis celular. En particular, el aparato es adecuado para un proceso continuo que implica poner en contacto una suspensión celular con una solución de lisis, mezclar los fluidos en contacto usando un mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia, pasando la mezcla de lisado a través de una bobina de retención durante un tiempo determinado suficiente para proporcionar una lisis celular sustancialmente completa y la desnaturalización del DNA genómico sin desnaturalizar permanentemente los componentes celulares de interés, mezclando el lisado celular resultante con una solución precipitante usando un

mezclador de burbujas y recogiendo el material resultante en un tanque de sedimentación.

Las células que contienen una molécula biológicamente activa de interés se convierten en una suspensión adecuada y se cargan en un tanque (201 en la Fig. 2). Las células pueden suspenderse en cualquier solución adecuada. Preferiblemente, las células son células de *E. coli* que contienen plásmidos. La solución de suspensión contiene preferiblemente una concentración moderada de tampón, una concentración moderada de un agente quelante, o ambos. Más preferiblemente, la solución de suspensión comprende Tris a aproximadamente 25 mM y Na₂EDTA a aproximadamente 10 mM, a pH de aproximadamente 8. En una realización preferible, la suspensión celular se prepara suspendiendo un peso conocido de pasta celular con un peso conocido de tampón de suspensión. Preferiblemente, una parte de pasta celular se resuspende en aproximadamente 4-10 partes de tampón, más preferiblemente con aproximadamente 6-8 partes de tampón. La densidad óptica de la suspensión celular resultante es preferiblemente de aproximadamente 50-80 unidades de DO₆₀₀. Más preferiblemente es de aproximadamente 60-70 unidades de DO₆₀₀.

Una solución de lisis se carga en un tanque (202 en la Fig. 2). La solución de lisis contiene preferiblemente uno o más agentes de lisis, tales como un álcali, un ácido, una enzima, un disolvente orgánico, un detergente, un caótopo, un desnaturalizante o una mezcla de dos o más de dichos agentes. Más preferiblemente, la solución de lisis comprende un álcali, un detergente o una mezcla de los mismos. Los álcalis adecuados incluyen, pero no se limitan a, NaOH, LiOH o KOH. Los detergentes pueden ser no iónicos, catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos. Los detergentes adecuados incluyen, entre otros, SDS, Triton®, Tween®, Pluronic®, Brij® y CHAPS, CHAPSO, sales de ácidos biliare, cetiltrimetilamonio, N-lauroilsarcosina y Zwittergent®. La selección de un álcali o detergente adecuado forma parte de la experiencia ordinaria de la técnica. En una realización preferible, la solución de lisis comprende NaOH y SDS. La concentración de NaOH es preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 N, y más preferiblemente de aproximadamente 0,2 N. La concentración de SDS es preferiblemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%, y más preferiblemente de aproximadamente 1%.

La suspensión celular y la solución de lisis se recuperan de los tanques 201 y 202 (respectivamente) usando una bomba (203 en la Fig. 2), y se ponen en contacto a través de un conector en "Y" (204 en la Fig. 2). En una realización preferible, se bombean volúmenes iguales de suspensión celular y de solución de lisis a caudales iguales usando una bomba de doble cabezal, como se muestra. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que diferentes volúmenes de la suspensión celular y las soluciones de lisis pueden bombearse a diferentes velocidades, utilizando bombas individuales, si así se desea. Dichas variaciones están dentro del alcance de la presente invención. En una realización preferible, la suspensión celular y la solución de lisis se bombean simultáneamente a través de una bomba de doble cabezal a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 0,1-1 pies/s, más preferiblemente de aproximadamente 0,2-0,5 pies/s. Los fluidos contactados salen preferiblemente del conector "Y" a aproximadamente 0,2-2 pies/s, más preferiblemente aproximadamente 0,4-1 pies/s.

Después de salir del conector "Y", la suspensión celular y la solución de lisis puestas en contacto se pasan a través de un mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia (205 en la Fig. 2). El mezclador puede ser cualquier dispositivo que proporcione una mezcla rápida y de alto cizallamiento mientras minimiza el tiempo de residencia durante el cual una parte dada de los fluidos está expuesta a un alto cizallamiento. Preferiblemente, el dispositivo mezcla en un modo de flujo continuo (en oposición a un modo por lotes). En una realización preferible, el mezclador es un mezclador de rotor/estator o un emulsionante. Los expertos en la materia reconocerán que una variedad de tales mezcladores de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia están disponibles comercialmente. Tales mezcladores se caracterizan generalmente por su capacidad de someter los fluidos a microambientes de alto cizallamiento durante periodos muy cortos de tiempo, típicamente menores o de aproximadamente un segundo. El uso de cualquiera de tales mezcladores está dentro del alcance de la presente invención. En una realización preferible, el mezclador es un mezclador de rotor/estator Silverson L4R equipado con una pantalla Emulsor estándar y un conjunto en línea (Silverson Machines, East Longmeadow, MA). En esta realización, el rotor funciona preferiblemente a una velocidad de 500-900 rpm, más preferiblemente a una velocidad de 700-800 rpm. Tal mezclador es adecuado para procesar un amplio volumen de suspensiones celulares. El modelo L4R, por ejemplo, puede procesar fluidos a velocidades de flujo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 l/min. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá que los mezcladores de mayor escala pueden sustituirse para procesar volúmenes sustancialmente mayores de suspensión celular. Dicha sustitución la realizará fácilmente un experto en la materia con no más que la experimentación ordinaria.

Una ventaja de usar un mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia, como se proporciona aquí, es que el alto cizallamiento se aplica virtualmente instantáneamente en dos o más fluidos, lo que proporciona una mezcla superior con un tiempo de residencia muy corto. Preferiblemente, el tiempo de residencia será menor o de aproximadamente un segundo. Más preferiblemente, el tiempo de residencia será menor o de aproximadamente 100 ms. Este corto tiempo de residencia asegura que los componentes celulares extraídos no se deterioren por la exposición excesiva a condiciones de alto cizallamiento. Una ventaja adicional es que los mezcladores proporcionados en este documento pueden acomodar fácilmente diferentes velocidades de flujo del fluido y proporcionar la flexibilidad de los rotores de mezcla de velocidad ajustable. Tales mezcladores son, por lo tanto, más flexibles y útiles que otros mezcladores en línea, como los mezcladores estáticos. Es un hallazgo novedoso de la

presente invención que el uso de tales mezcladores de alto cizallamiento no es perjudicial cuando se realizan procedimientos de lisis que anteriormente se consideraban sensibles al cizallamiento, como al lisar células que contienen plásmidos con álcali y detergente.

5 El material que sale del mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia pasa luego a través de una bobina de retención (206 en la Fig. 2). Esta bobina comprende una longitud de tubo suficiente para permitir 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 y constante 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
10 para tener consecuencias negativas. En una realización preferible, donde las células son células que contienen plásmidos y la solución de lisis comprende un álcali, es deseable asegurar que la exposición al álcali dure lo suficiente como para lograr una lisis celular sustancialmente completa, así como una desnaturalización sustancialmente completa de proteínas, DNA genómico y otros componentes celulares. Sin embargo, también es deseable que la exposición al álcali no sea tan prolongada como para dar como resultado cantidades sustanciales de plásmido desnaturalizado permanentemente. La bobina de retención proporcionada en el presente aparato permite controlar este tiempo de contacto. Preferiblemente, este tiempo de contacto es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 minutos. El tiempo de contacto deseado puede proporcionarse mediante una combinación adecuada de longitud de la bobina, diámetro interno (DI) de la bobina y velocidad de flujo lineal. Seleccionar una combinación adecuada de estos parámetros
20 estará dentro de la capacidad de un experto en la materia. En una realización preferible, la longitud y el diámetro de la bobina de retención son tales que se alcanza el tiempo de exposición deseado cuando las células lisadas fluyen a la velocidad deseada. Preferiblemente, la bobina de retención tiene aproximadamente 50 pies de longitud, con un diámetro interno de aproximadamente 0,625 pulgadas. En esta realización, las células lisadas salen preferiblemente del mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia y pasan a través de la bobina de retención a aproximadamente 0,17 pies/s, proporcionando un tiempo de contacto de aproximadamente 5 minutos.

Las células lisadas que salen de la bobina de retención entran en un mezclador de burbujas (207 en la Fig. 2). Simultáneamente, una bomba (209 en la Fig. 2) suministra una solución de neutralización/ precipitación desde un tanque (208 en la Fig. 2) hasta el mezclador de burbujas. También simultáneamente, el gas comprimido de un tanque (210 en la Fig. 2) se vierte en el fondo del mezclador de burbujas. A medida que la solución de células lisadas ingresa al mezclador con columna de burbujas, se agrega al menos una solución adicional. Esta puede ser una solución de neutralización, una solución de precipitación, o una combinación de las mismas, que es la solución de neutralización/ precipitación. El factor determinante de una solución para precipitar selectivamente los componentes celulares no deseados o deseados se basa en la concentración iónica total y el ion o iones
35 seleccionados. Típicamente, se usan sales de acetato para este propósito. El tipo de sal y la concentración también tendrán un efecto sobre el pH final de la mezcla resultante. El pH de la solución puede controlarse adicionalmente mediante la adición de un ácido, como el ácido acético. Este ácido se puede agregar a la solución neutralizante o directamente como un puerto adicional en el mezclador con columna de burbujas a lo largo del proceso para lograr un control independiente de la neutralización y la precipitación. En algunos casos es ventajoso neutralizar primero la mezcla y precipitar en un paso posterior, si se desean nuevas adiciones, tales como los agentes de compactación. Bajo ciertas circunstancias, es ventajoso determinar a través del cálculo y el procedimiento experimental una solución única (solución de neutralización/ precipitación) con los iones apropiados, la fuerza iónica y el pH final que también puede cumplir las funciones de neutralización de la solución de células lisadas, así como precipitar selectivamente ciertos componentes celulares. La figura 3 muestra un diagrama detallado de una realización preferible del mezclador de burbujas. Como se muestra, las células lisadas ingresan al mezclador en la parte inferior desde un lado (301 en la Fig. 3), mientras que la solución de neutralización/ precipitación ingresa en el fondo desde el lado opuesto (302 en la Fig. 3). El gas comprimido (306 en la Fig. 3) se vierte a través de un burbujeador sinterizado colocado aproximadamente en el punto donde se encuentran las corrientes de fluido (303 en la Fig. 3). Las células lisadas y la solución de neutralización fluyen verticalmente hacia arriba en una columna y salen a través de un puerto de salida en el lado cerca de la parte superior (304 en la Fig. 3). El paso de las burbujas de gas a través de la columna vertical de líquido sirve para mezclar las células lisadas con la solución de neutralización/ precipitación. Una ventaja de la presente invención es que la mezcla proporcionada por las burbujas de gas ascendentes es exhaustiva pero suficientemente suave para evitar la fragmentación excesiva de componentes sensibles tales como DNA genómico o endotoxinas. A medida que la solución de neutralización/precipitación se mezcla con el lisado celular, los componentes celulares se precipitan. Una ventaja adicional de la presente invención es que algunas de las burbujas de gas quedan atrapadas en el precipitado resultante, facilitando su posterior separación de la fracción fluida. Se proporciona un tubo respirador en la parte superior del mezclador de burbujas para ventilar el exceso de gas (305 en la Fig. 3).

60 En la realización utilizada en los ejemplos proporcionados, el mezclador de burbujas tiene las siguientes dimensiones: los puertos de entrada inferiores tienen 0,625 pulgadas de diámetro interno ("DI"); el burbujeador sinterizado mide 1 pulgada de alto con un diámetro de 0,5 pulgada; el área real de la columna donde se produce la mezcla es 1,375 pulgadas de DI y 24 pulgadas de alto; el puerto de salida tiene un DI de 1,375 pulgadas; y el tubo respirador que proporciona la eliminación del exceso de gas y cualquier espuma tiene 12 pulgadas de alto con un DI de 1,375 pulgadas. Sin embargo, un experto en la materia reconocerá que mezcladores de mayor o menor escala o de dimensiones o geometrías alternativas pueden utilizarse para el procesamiento de diferentes volúmenes de

5 soluciones o soluciones con diferentes propiedades tales como, entre otras, viscosidad, densidad y otras. Un experto en la materia también reconocerá que pueden usarse diversos medios para introducir las burbujas de gas. Como ejemplo no limitante, en lugar de un burbujeador sinterizado, el gas puede introducirse a través de una pluralidad de pequeños orificios diseñados en las paredes, los lados o el fondo del mezclador. Dichas sustituciones serán realizadas fácilmente por un experto en la materia, y están dentro del alcance de la presente invención.

10 Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que el mezclador de burbujas proporcionado en la presente invención es beneficioso para mezclar cualquier fluido de interés con uno o más fluidos adicionales. Los ejemplos de fluidos de interés incluyen, entre otros, suspensiones celulares, lisados celulares y fluidos que contienen componentes celulares de interés. Los ejemplos de fluidos adicionales incluyen, entre otros, soluciones tampón, soluciones salinas, soluciones de lisis, soluciones de neutralización, soluciones de precipitación, soluciones de neutralización/ precipitación, etc. Se puede mezclar cualquier cantidad de fluidos simplemente proporcionando un número apropiado de puertos de entrada. Por lo tanto, aunque dos puertos de entrada son una realización preferible, un experto en la técnica puede proporcionar fácilmente un mezclador de burbujas que comprenda tres o más puertos de entrada, permitiendo la mezcla de tres o más fluidos. Dichas modificaciones están claramente abarcadas dentro de la presente invención. Además, un experto en la materia reconocerá que la geometría precisa y el diseño del mezclador de burbujas proporcionado en este documento pueden alterarse fácilmente. De nuevo, tales alteraciones están dentro del alcance de la presente invención.

20 El mezclador de burbujas proporcionado en este documento es particularmente beneficioso para mezclar un lisado celular y una solución de neutralización/ precipitación sin un cizallamiento excesivo de los componentes sensibles. En una realización preferible, el lisado celular comprende células que contienen plásmidos lisados con un álcali, un detergente o una mezcla de los mismos, y la solución neutralizante/precipitante neutraliza el álcali y precipita los componentes celulares tales como las proteínas, membranas, endotoxinas y el DNA genómico. Preferiblemente, el álcali es NaOH, el detergente es SDS, y la solución de neutralización/ precipitación comprende acetato de potasio, acetato de amonio, ácido acético o una combinación de los mismos. Más preferiblemente, la solución de neutralización/ precipitación comprende una solución no tamponada que contiene acetato de potasio a aproximadamente 1 M y acetato de amonio a aproximadamente 7 M. A diferencia de la solución tradicional de neutralización/ precipitación que comprende acetato de potasio a aproximadamente 3 M a pH de aproximadamente 5, esta solución preferible de neutralización/ precipitación ofrece al menos dos ventajas. Primero, después de mezclar con un lisado alcalino, el pH del lisado bruto resultante es de aproximadamente 8. Esto es preferible al pH ácido proporcionado por la solución tradicional de neutralización/ precipitación, ya que es bien sabido que la incubación prolongada de plásmidos y otros DNA en condiciones ácidas pueden conducir a la depurinación. Una segunda ventaja es que la alta concentración de acetato de amonio proporcionada en la solución de neutralización/ precipitación preferible ayuda a precipitar el exceso de RNA de la solución de lisado en bruto, lo que ayuda a obtener un producto plasmídico sustancialmente purificado. Esta precipitación de RNA aumenta a temperaturas más bajas. Por lo tanto, en una realización preferible, la solución de neutralización/ precipitación se proporciona en forma refrigerada a aproximadamente 2-8°C. Una ventaja particular del mezclador de burbujas y los métodos de mezcla asociados aquí descritos es que los lisados alcalinos de células que contienen plásmidos pueden mezclarse con soluciones de neutralización/ precipitación de una manera que evite la liberación excesiva de DNA genómico y endotoxinas en la solución que contiene plásmidos. Una ventaja adicional es que a medida que las burbujas mezclan los fluidos, una porción de las burbujas queda atrapada sustancialmente en el material precipitado. Estas burbujas de gas atrapadas ayudan a hacer flotar el material precipitado, facilitando su posterior separación del lisado clarificado, como se detalla a continuación.

45 Un experto en la materia podrá determinar las velocidades adecuadas para el flujo de soluciones a través del mezclador de burbujas usando no más que la experimentación ordinaria. Preferiblemente, las células lisadas y la solución de neutralización/ precipitación se hacen fluir hacia el mezclador de burbujas a velocidades iguales de aproximadamente 0,1-1 pie/s cada una, más preferiblemente a aproximadamente 0,2-0,5 pies/s cada una. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente las velocidades adecuadas para el flujo de gas a través del mezclador de burbujas. Preferiblemente, las velocidades de flujo de gas son de al menos aproximadamente 1 litro estándar por minuto (slpm), más preferiblemente de al menos aproximadamente 2 slpm. Se puede usar cualquier gas adecuado, incluidos, entre otros, aire, nitrógeno, argón, dióxido de carbono, etc. Preferiblemente, el gas es aire comprimido filtrado. Sin embargo, en ciertas aplicaciones, puede ser preferible usar un gas inerte como nitrógeno o argón, especialmente si se determina que cualquiera de las soluciones o cualquier componente de las soluciones es sensible al oxígeno. El uso de tales gases inertes está dentro del alcance de la presente invención.

60 Con referencia a la figura 2, la suspensión de lisado de células fluido y los componentes celulares precipitados sale del mezclador de burbujas y se recoge en un tanque de sedimentación (211 en la figura 2). La suspensión se puede mantener en el tanque de sedimentación durante un tiempo suficiente para lograr una separación sustancialmente completa de los componentes celulares precipitados del lisado de células fluido. Preferiblemente, los componentes precipitados flotan, ayudados por las burbujas de gas atrapadas introducidas por el mezclador de burbujas. En una realización preferible, se puede aplicar vacío al tanque de sedimentación. Este procedimiento compacta parcialmente el precipitado floculante en flotación, lo que ayuda a su posterior separación y también permite recuperar un mayor porcentaje de lisado celular clarificado en las etapas posteriores. Como ventaja adicional, la aplicación de vacío en este paso ayuda a desgasificar el lisado, lo cual es deseable antes de los pasos de

purificación posteriores. Preferiblemente, el vacío aplicado es de al menos aproximadamente 15 pulgadas de Hg, más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 pulgadas de Hg, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 25 pulgadas de Hg. En una realización preferible, la suspensión se mantiene en el tanque de sedimentación durante aproximadamente 6 a aproximadamente 24 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 12-18 horas. Preferiblemente, el vacío se mantiene durante todo este período de mantenimiento. Preferiblemente, la suspensión también se enfría a menos de aproximadamente 15 °C durante el período de mantenimiento, más preferiblemente a aproximadamente 2-8 °C, para ayudar a precipitar el RNA u otras impurezas. En una realización, el lisado celular bruto puede mezclarse suavemente durante el período de mantenimiento, tal como por un mezclador impulsor operado a bajas revoluciones, suficiente para proporcionar una mezcla y enfriamiento uniformes del fluido sin alterar el precipitado floculante. Seleccionar el equipo adecuado y los parámetros de operación para lograr estas condiciones de mezcla deseadas estará dentro de las capacidades de un experto en la materia.

Se pueden hacer una variedad de modificaciones en el aparato descrito en la Figura 2. Por ejemplo, los tanques que se muestran en la Figura 2 pueden ser cualquier tipo de contenedor adecuado para contener los materiales indicados. Los ejemplos de recipientes adecuados incluyen, entre otros, bolsas de plástico desechables o reutilizables, así como recipientes rígidos de plástico, acero inoxidable u otro material adecuado. De manera similar, aunque es conveniente y preferible transportar fluidos usando bombas, como se muestra, también se pueden usar otros métodos, que incluyen, entre otros, el flujo por gravedad, presión, vacío o cualquier otro medio. Además, aunque se prefiere un conector "Y" para poner en contacto la suspensión celular y la solución de lisis, se puede usar cualquier método que suministre la suspensión celular y la solución de lisis al dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia en las proporciones apropiadas. Como ejemplo, y sin limitar el alcance de la presente descripción, la suspensión celular y la solución de lisis se pueden alimentar por separado al dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia a través de puertos de admisión independientes. Además, aunque es preferible usar un tanque de gas comprimido para introducir burbujas de gas en el mezclador de burbujas, se puede usar cualquier método que proporcione un flujo de gas adecuado para lograr la mezcla deseada. Todas estas modificaciones al aparato descrito están dentro del alcance de la presente invención.

La figura 4 proporciona un diagrama esquemático de separación sólido/líquido. El tanque de sedimentación que se muestra como el tanque 211 en la Figura 2 se etiqueta en la Figura 4 como el tanque 401, y contiene la solución de lisado celular bruto, con los componentes celulares precipitados flotantes. Si se usa, el vacío se aplica usando una bomba de vacío (402 en la Fig. 4), como se describió anteriormente. Antes de comenzar la separación sólido/líquido, cualquier vacío aplicado al tanque se libera cuidadosamente. El lisado celular fluido se recoge luego del tanque usando una bomba (403 en la Fig. 4). En este punto, el fluido comprende un lisado clarificado que está sustancialmente libre de desechos celulares y materia sólida macroparticulada. Una ventaja de la presente invención es que el lisado clarificado se separa de los componentes celulares precipitados sin recurrir a técnicas de centrifugación o filtración de macropartículas. Dichas técnicas requieren equipos costosos y, a menudo, son poco prácticas y difíciles de escalar. Además, someter los componentes celulares precipitados a centrifugación o macrofiltración puede conducir a una liberación excesiva de DNA genómico, endotoxinas u otros componentes en el lisado clarificado. Estos pueden ser difíciles de separar posteriormente de los componentes celulares de interés en el lisado clarificado, particularmente en el caso preferido donde los componentes celulares de interés son plásmidos. La presente invención evita estos eventos indeseables.

Por lo tanto, la presente invención proporciona la separación ventajosa de un lisado celular clarificado de componentes celulares precipitados. Un experto en la materia reconocerá que pueden aplicarse diversas técnicas de purificación al lisado clarificado o a los componentes celulares precipitados proporcionados por los métodos anteriores. Dichas técnicas de purificación pueden usarse para proporcionar una preparación sustancialmente pura de un componente celular de interés. El componente celular de interés puede purificarse a partir de los componentes celulares precipitados proporcionados anteriormente, o del lisado clarificado. Preferiblemente, el componente celular de interés se purifica del lisado clarificado. Preferiblemente, el componente celular de interés es un plásmido que está presente en el lisado clarificado. En esta realización preferible, se puede aplicar cualquiera de una variedad de procedimientos de purificación, individualmente o en combinación, para proporcionar plásmidos sustancialmente purificados. Dichos procedimientos de purificación incluyen, entre otros, intercambio iónico, interacción hidrófoba, exclusión de tamaño, purificación de fase inversa, agotamiento de endotoxinas, purificación por afinidad, adsorción a sílice, vidrio o materiales poliméricos, cromatografía de lecho expandido, cromatografía de modo mixto, cromatografía de desplazamiento, purificación de hidroxiapatita, precipitación selectiva, purificación acuosa de dos fases, condensación de ADN, purificación tiofílica, purificación de pares de iones, purificación de quelatos metálicos, filtración a través de nitrocelulosa y ultrafiltración. Un experto en la materia podrá aplicar cualquier técnica de purificación conocida a un lisado clarificado preparado de acuerdo con la presente invención, sin más experimentación ordinaria.

En la realización preferible en la que los componentes celulares de interés están presentes en el lisado clarificado, es ventajoso pasar el lisado clarificado a través de uno o más filtros de micropartículas y recogerlo en un tanque de retención (406 en la figura 4). Preferiblemente, el lisado clarificado se recupera del tanque 401 y se somete a filtración en micropartículas como una operación continua. Alternativamente, el lisado clarificado puede recuperarse del tanque 401 y recogerse en un recipiente intermedio. La filtración en micropartículas se puede realizar como una

operación independiente. Preferiblemente, el tanque de sedimentación 401 está equipado con una mirilla, lo que permite al operador observar la posición del nivel del líquido y los componentes celulares precipitados. El bombeo de material desde el tanque se controla visualmente y se detiene antes de que los componentes celulares precipitados entren en la línea. Esto evita la obstrucción de los posteriores filtros de micropartículas. Preferiblemente, se pueden usar de uno a aproximadamente tres filtros de micropartículas en sucesión, con el primer filtro eliminando partículas más grandes, y los filtros posteriores eliminando sucesivamente partículas más pequeñas. Como se muestra en la Figura 4, se prefieren dos filtros en serie. En una realización preferible, el primer filtro (404 en la Fig. 4) es un prefiltro con un límite de tamaño de partícula de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 μm , más preferiblemente de aproximadamente 10 μm . El segundo filtro (405 en la figura 4) es preferiblemente un filtro de membrana con un tamaño de corte de aproximadamente 0,2 μm . Sin embargo, un experto en la materia reconocerá que los detalles tales como el número de filtros utilizados, así como sus límites de tamaño de partícula, pueden variar fácilmente. Además, un experto en la materia podrá determinar situaciones en las que no se requiere filtración, en cuyo caso las unidades de filtro mostradas en la Figura 4 pueden omitirse. Se contempla que cualquier combinación de filtros, que incluye ningún filtro, está dentro del alcance de la presente invención.

Como antes, se pueden hacer varias modificaciones al aparato representado en la Figura 4. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, medios alternativos para transportar fluidos, medios alternativos para aplicar un vacío y recipientes alternativos para contener los materiales descritos. Todas estas modificaciones están dentro de las capacidades de un experto en la materia, y están dentro del alcance de la presente invención.

La Figura 5 representa un diagrama de flujo del proceso de purificación del producto, comenzando con el lisado clarificado o filtrado y terminando con el producto purificado a granel. De forma ventajosa, el proceso se basa completamente en pasos de separación de membrana y evita cualquier cromatografía en columna. Como resultado, el proceso tiene alta capacidad, altas tasas de flujo de fluidos, es económico, escalable y puede realizarse de manera fácil y rápida. El producto a purificar puede ser cualquier componente celular de interés. Preferiblemente, es una macromolécula tal como una proteína o un plásmido. Más preferiblemente es un plásmido. El lisado utilizado como material de partida para el proceso de purificación puede producirse por cualquier medio adecuado. Preferiblemente, el lisado se prepara de acuerdo con los métodos y aparatos proporcionados en la presente invención. Sin embargo, un experto en la materia conocerá muchos otros métodos para producir lisados celulares, y podrá aplicar el presente proceso de purificación a dichos lisados utilizando no más que la experimentación ordinaria.

En la primera etapa de purificación, el lisado se aplica a una membrana de intercambio iónico. El componente celular de interés puede unirse a la membrana, mientras que las impurezas fluyen a través de la membrana o se eliminan para separarlas del producto de interés. Alternativamente, el producto puede fluir a través de la membrana, mientras se retienen las impurezas. En una realización preferible, el producto se une a la membrana. En tal caso, es preferible asegurar que la fuerza iónica del lisado sea lo suficientemente baja como para proporcionar una unión sustancialmente completa del componente celular de interés a la membrana de intercambio iónico. Si es necesario, esto se puede lograr diluyendo un lisado de alta fuerza iónica con una cantidad suficiente de agua u otra solución de baja fuerza iónica. Después de lavar para eliminar las impurezas débilmente unidas, el producto se eluye de la membrana. Preferiblemente, la elución se logra haciendo fluir una solución salina a través de la membrana. La solución salina tiene una resistencia, concentración o conductividad suficiente para superar la unión del producto a la membrana. El producto se recupera así en el eluato.

En la segunda etapa de purificación, el producto parcialmente purificado recuperado de la membrana de intercambio iónico se somete opcionalmente a una membrana de interacción hidrófoba. El producto puede unirse a la membrana, mientras las impurezas fluyen a través o son lavadas, o el producto puede fluir mientras las impurezas se unen. En una realización preferible, el producto fluye a través. El eluato de la membrana de intercambio iónico puede acondicionarse antes de fluir sobre la membrana de interacción hidrófoba. Típicamente, dicho acondicionamiento implica agregar una cantidad deseada de una sal deseada. Se prefiere el sulfato de amonio, en una cantidad adecuada para proporcionar la unión del producto o las impurezas, según se desee. Este paso puede omitirse del proceso para ciertas aplicaciones.

El producto purificado recuperado de la membrana de interacción hidrófoba se somete luego a ultrafiltración/diafiltración para concentrar el producto, eliminar el exceso de sales y, si se desea, cambiar la composición del diluyente. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para realizar ultrafiltración/diafiltración, y se han empleado para moléculas biológicamente activas tales como proteínas y plásmidos durante muchos años. Se prefiere la filtración de flujo tangencial, pero también se conocen métodos discontinuos. Se puede emplear cualquier método que satisfaga las necesidades del profesional.

El producto desalado concentrado recuperado en el retenido de la ultrafiltración/diafiltración se somete opcionalmente a filtración estéril, si se desea un producto estéril. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para la filtración estéril, y se puede seleccionar cualquier método de este tipo. El material resultante comprende un componente celular sustancialmente purificado de interés. El producto puede usarse para una variedad de propósitos, que incluyen, entre otros, aplicaciones farmacéuticas, veterinarias o agrícolas.

Un experto en la materia reconocerá que el proceso de purificación proporcionado en el presente documento puede aplicarse a una amplia variedad de componentes celulares de interés, mientras conserva los beneficios descritos. Los detalles del proceso, incluida la naturaleza preferida de las membranas utilizadas, y las condiciones preferidas para usarlas, dependerán de la naturaleza del producto de interés. Preferiblemente, el producto es un plásmido, y el lisado se prepara a partir de células que contienen plásmido. Más preferiblemente, las células que contienen plásmidos se lisan con álcali, detergente o una combinación de los mismos, y el lisado alcalino se neutraliza posteriormente y precipita con acetato de potasio, acetato de amonio, ácido acético o una combinación de los mismos. Lo más preferiblemente, el lisado se prepara por los métodos y aparatos proporcionados en la presente invención. Aunque cualquier membrana de intercambio iónico puede ser adecuada, preferiblemente es una membrana de intercambio aniónico. Más preferiblemente, es una membrana de intercambio aniónico fuerte, que comprende grupos de amina cuaternaria. Los ejemplos de tales membranas incluyen, pero no se limitan a Mustang™ Q (Pall Corp., East Hills, NY), Sartobind® Q (Sartorius, Goettingen, Alemania) e Intercept™ Q (Millipore, Billerica, MA). De manera similar, la membrana de interacción hidrofóbica puede ser cualquier membrana que se una a componentes celulares de interés o impurezas basadas principalmente en interacciones hidrofóbicas. La siguiente discusión proporciona una descripción detallada de las realizaciones preferidas cuando se purifica un plásmido a partir de un lisado preparado por los métodos y aparatos proporcionados aquí. Esta descripción no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la presente descripción, ya que un experto en la materia podrá ajustar lo descrito proceso de purificación para acomodar cualquier componente celular adecuado de interés, utilizando no más que la experimentación ordinaria. Dichos ajustes pueden incluir, entre otros, seleccionar diferentes membranas; seleccionar diferentes condiciones de solución para acondicionar, cargar, lavar o eluir membranas; seleccionando diferentes caudales; Los detalles de tales selecciones serán dictados principalmente por la naturaleza y las propiedades del componente celular de interés. Todas estas realizaciones están destinadas a ser abarcadas por la presente invención.

Preferiblemente, cuando las células que contienen plásmidos se lisan de acuerdo con los métodos y aparatos proporcionados aquí, la etapa de purificación de la membrana de intercambio iónico comprende la purificación usando un cartucho Pall Mustang™ Q. Preferiblemente, el lisado filtrado y clarificado se ajusta a una conductividad de menos de aproximadamente 85 mS/cm por dilución con una cantidad adecuada de agua purificada. Más preferiblemente, la conductividad se ajusta a aproximadamente 80-85 mS/cm. Preferiblemente, se usa una cantidad de agua purificada igual a aproximadamente 1,5 veces el volumen de lisado para la dilución. El cartucho Mustang™ Q se acondiciona haciendo fluir una solución adecuada de equilibrio/lavado Q a través de él. Preferiblemente, la solución de equilibrio/lavado Q comprende aproximadamente 0,67 M de NaCl. Todas las soluciones también pueden incluir un agente tamponador, un agente quelante o una combinación de los mismos. Preferiblemente, estas soluciones contienen aproximadamente Tris 10 mM y aproximadamente Na₂EDTA 1 mM, con un pH de aproximadamente 8. Preferiblemente, la solución de equilibrio/lavado Q se bombea a través del cartucho a aproximadamente 180-350 volúmenes de lecho por hora (BV/hr). El lisado diluido se bombea luego sobre el cartucho, preferiblemente al menos a aproximadamente 1.200 BV/h, más preferiblemente a aproximadamente 450-700 BV/h. El cartucho cargado se lava luego con tampón de equilibrio/lavado Q, preferiblemente a un caudal de aproximadamente 180-350 BV/h. El lavado se continúa preferiblemente hasta que la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) del efluente regrese aproximadamente a la línea base. El plásmido se eluye con una solución que preferiblemente comprende aproximadamente NaCl 1 M, Tris aproximadamente 10 mM, Na₂EDTA aproximadamente 1 mM y aproximadamente pH 8. La elución se realiza preferiblemente a una velocidad de flujo de 140-350 BV/h, más preferiblemente a 160-210 BV/h. Preferiblemente, la elución continúa hasta que el A₂₆₀ del eluato vuelve a aproximadamente la línea de base. Alternativamente, se puede aplicar un volumen de elución determinado empíricamente. El eluato se recoge para la purificación posterior usando interacción hidrófoba.

Opcionalmente, cuando se purifica el plásmido de acuerdo con la presente invención, el eluato del cartucho Pall Mustang™ Q se somete a continuación a una purificación adicional usando una membrana de interacción hidrófoba. Preferiblemente, la membrana es cualquiera de una clase de cartuchos "hidrofílicos" (HIC). El cartucho se acondiciona preferiblemente haciendo fluir una solución de lavado/equilibrio HIC que comprende sulfato de amonio concentrado a través de él. Preferiblemente, la solución de equilibrio/lavado HIC comprende aproximadamente sulfato de amonio 2,4 M, aproximadamente Tris 10 mM, aproximadamente Na₂EDTA 1 mM y aproximadamente pH 8. Preferiblemente, la conductividad de la solución de equilibrio/lavado HIC es de aproximadamente 240-260 mS/cm, más preferiblemente aproximadamente 245-255 mS/cm.

El eluato de la membrana de intercambio iónico se acondiciona preferiblemente diluyéndolo con aproximadamente 2 volúmenes de una solución que comprende aproximadamente 4,1 M de sulfato de amonio. La conductividad del eluato diluido resultante es preferiblemente de aproximadamente 240-260 mS/cm, más preferiblemente de aproximadamente 245-255 mS/cm. El eluato diluido se hace fluir a través del cartucho HIC acondicionado, preferiblemente a una velocidad de flujo de aproximadamente 100-200 BV/h. El flujo continuo se recoge para la ultrafiltración/diafiltración posterior. Opcionalmente, el cartucho HIC se puede lavar con agua, y la solución de lavado se puede recuperar para analizar las impurezas eliminadas del producto.

El producto purificado recuperado de la membrana de interacción hidrófoba se concentra y desala por ultrafiltración/diafiltración. Estará dentro de la capacidad de un experto en la materia realizar ultrafiltración/diafiltración utilizando métodos conocidos. Las membranas de ultrafiltración/diafiltración pueden

seleccionarse en función del límite de peso molecular nominal ("NMWCO") para retener el producto de interés en el producto retenido, al tiempo que permite que materiales de bajo peso molecular tales como sales pasen al filtrado. Un experto en la materia podrá seleccionar tales membranas basándose en el tamaño y la naturaleza del producto de interés, junto con no más que la experimentación ordinaria. En una realización preferible, donde el producto es un plásmido de aproximadamente 1-8 kb de tamaño, la ultrafiltración/diafiltración se realiza usando una unidad Pall Centramate™, y las membranas utilizadas son casetes de membrana de pantalla suspendida Pall Omega™ con un NMWCO de 100 kD. Preferiblemente, el plásmido se concentra al menos a aproximadamente 2,5 mg/ml. Se puede usar cualquier solución tamponante o agua estéril durante el paso final de intercambio de tampón, y afectará el pH final y la conductividad del producto.

El producto concentrado y desalado puede, si se desea, ser sometido adicionalmente a una filtración estéril. Varios métodos para realizar tal operación son bien conocidos, y estarán dentro de la capacidad de los expertos en la materia. Cuando el producto es un plásmido, la filtración estéril se puede realizar preferiblemente usando un filtro Pall AcroPak™ 200 con un corte de 0,22 µm. El plásmido purificado, concentrado, desalado, filtrado estéril resultante está sustancialmente libre de impurezas tales como proteínas, DNA genómico, RNA y endotoxina. La proteína residual, según lo determinado por el ensayo de ácido bicinónico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) será preferiblemente inferior a aproximadamente 1% (en peso), y más preferiblemente inferior o igual a aproximadamente 0,1%. La endotoxina residual, según lo determinado por el ensayo de lisado de amebocitos del limulus ("LAL"), preferiblemente será inferior a aproximadamente 100 unidades de endotoxina por miligramo de plásmido (UE/mg). Más preferiblemente, la endotoxina será inferior a aproximadamente 50 UE/mg, lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 20 UE/mg. El RNA residual es preferiblemente menor o aproximadamente 5% en peso, más preferiblemente menor o aproximadamente 1% (por electroforesis en gel de agarosa o HPLC de interacción hidrófoba). El DNA genómico residual es preferiblemente inferior a aproximadamente 5% en peso, más preferiblemente inferior a aproximadamente 1% (por electroforesis en gel de agarosa o transferencia de ranura).

En una realización, la presente invención comprende todos los métodos y aparatos descritos aquí, como se describe en la Figura 1. Un experto en la materia reconocerá que la presente invención puede modificarse añadiendo, restando o sustituyendo etapas seleccionadas o métodos. Se contempla que todas estas modificaciones son parte de la presente invención. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona métodos para lisar células mezclando una suspensión celular con una solución de lisis usando un dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia. En otra realización, la invención proporciona métodos para mezclar una suspensión celular, un lisado celular o un fluido que contiene componentes celulares de interés con uno o más fluidos adicionales usando un mezclador de burbujas. En una realización adicional, la invención proporciona mezclar un lisado celular con una solución precipitante usando un mezclador de burbujas, mientras que simultáneamente atrapa burbujas de gas en los componentes celulares precipitados. En otra realización más, la presente invención proporciona un dispositivo que comprende un mezclador de burbujas que puede usarse para practicar los métodos anteriores. Aún más, la presente invención proporciona métodos para lisar células, que comprenden una combinación de mezclar una suspensión celular con una solución de lisis usando un mezclador de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia, seguido de mezclar las células lisadas con una solución precipitante usando un mezclador de burbujas. En otra realización, la invención proporciona un método para separar componentes celulares precipitados de un lisado fluido, que comprende atrapar burbujas de gas en los componentes celulares precipitados usando un mezclador de burbujas, recogiendo los materiales en un tanque, permitiendo que los componentes celulares precipitados formen una capa flotante, opcionalmente aplicando un vacío para compactar los componentes precipitados y desgasificar el lisado, y recuperar el lisado fluido drenándolo o bombeándolo desde debajo de los componentes precipitados. En otra realización más, la presente invención proporciona un método para purificar componentes celulares de interés de un lisado celular, que comprende someter el lisado a una membrana de intercambio iónico, opcionalmente una membrana de interacción hidrófoba, un procedimiento de ultrafiltración/diafiltración y, opcionalmente, un procedimiento de filtración estéril. Cada una de las realizaciones actuales, así como cualquier combinación de una o más realizaciones, está abarcada además por la presente invención.

Las enseñanzas innovadoras de la presente invención se describen con referencia particular a los pasos descritos aquí con respecto a la producción de plásmidos. Sin embargo, los expertos en la materia deben comprender y apreciar que el uso de estos pasos y procesos con respecto a la producción de plásmidos proporciona solo un ejemplo de los muchos usos ventajosos y enseñanzas innovadoras en este documento. Se pueden realizar diversas alteraciones, modificaciones y sustituciones no sustantivas en el proceso descrito sin apartarse de ninguna manera del espíritu y alcance de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar los métodos y dispositivos descritos en el presente documento, y de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Las células de E. coli que contenían el plásmido pAV0124 se fermentaron a alta densidad y se recuperaron por centrifugación. Aproximadamente 4,0 kg (peso húmedo) de pasta celular se suspendieron en un tampón de resuspensión que comprende Tris 25 mM, Na₂EDTA 10 mM, pH 8, hasta un volumen final de aproximadamente 28

L. La suspensión celular resultante tenía una DO_{600} de 65,8. Esta suspensión celular se bombeó a 300 ml/min en un lado de un conector "Y". Simultáneamente, la solución de lisis que comprende NaOH 0,2 N y SDS al 1% se bombeó a 300 ml/min al otro lado del conector "Y". Los fluidos combinados que salen de la conexión "Y" se pasaron inmediatamente a través de un mezclador de rotor/estator Silverson Modelo L4R equipado con una pantalla de Emulsor estándar y un ensamblaje en línea. El mezclador funcionaba a una velocidad del rotor de 765 rpm.

El fluido que sale del rotor/estator mezclador se hizo pasar a través de una bobina de retención de 50 pies y 0,625 pulgadas de ID. A una velocidad de flujo total de aproximadamente 600 ml/min, el tiempo de tránsito a través de la bobina de retención fue de aproximadamente 5 minutos, lo que permitió la lisis celular completa.

El lisado celular que salía de la bobina de retención entró en un mezclador de burbujas como se muestra en la Figura 3. Simultáneamente, se bombeó independientemente solución de neutralización/precipitación fría (aproximadamente 4°C) que comprende acetato de potasio 1 M y acetato de amonio 7 M en el mezclador de burbujas en 600 ml/min. Las soluciones de lisado y neutralización/precipitación fluyeron verticalmente por la columna de mezcla y a través de la salida cerca de la parte superior. Mientras las soluciones pasaban por la columna de mezcla, se introdujo aire comprimido en el fondo de la columna a una velocidad de aproximadamente 2 slpm a través de un burbujeador sinterizado diseñado para proporcionar una corriente constante de burbujas finas. El aire no atrapado fue ventilado a través de la parte superior de la columna. A medida que las soluciones de lisado celular y neutralización/precipitación pasaban a través de la columna, se mezclaban continuamente por la turbulencia de las burbujas ascendentes. Esto se evidenció por la formación de un precipitado floculante blanco que comprende SDS de potasio, proteínas celulares desnaturalizadas, lípidos unidos y componentes de la pared celular y DNA genómico asociado. El lisado precipitado neutralizado que sale del mezclador de burbujas se recogió en un recipiente de sedimentación.

Este proceso se hizo funcionar en modo continuo hasta que toda la suspensión celular se había lisado, neutralizado y precipitado, y recogido en el tanque de sedimentación. Los volúmenes totales de la solución incluyeron 28 L de suspensión celular, un lavado de 5 L del tanque de resuspensión con tampón de resuspensión, 33 L de solución de lisis y 56 L de solución de neutralización/precipitación, para un volumen total de aproximadamente 122 L.

Después de la recolección, el material en el tanque de sedimentación se observó a través de una mirilla en el costado del tanque de sedimentación. El precipitado floculante se podía ver 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 (Hg) al tanque de sedimentación, lo que condujo a una cierta compactación del precipitado flotante y la desgasificación del lisado fluido.

El material se mantuvo al vacío en el tanque de sedimentación a temperatura ambiente durante aproximadamente 17 horas. El vacío se ventilaba lentamente para evitar alterar el precipitado compactado. El lisado clarificado que contiene el plásmido 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 visualmente a través de la mirilla, y el bombeo se detuvo a tiempo para asegurar que el precipitado no saliera del tanque. Se recuperaron aproximadamente 106 l de lisado clarificado. Esto se sometió a una filtración de 5 μm , seguido de una filtración final de 0,2 μm . Una parte del lisado se perdió durante la filtración, debido a la obstrucción de los filtros. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 80 l de lisado filtrado. Se tomó una pequeña muestra de este material para el análisis de concentración de plásmido, y el resto del lisado filtrado se diluyó luego con aproximadamente 140 l de agua purificada, en preparación para una purificación adicional. La concentración de plásmido en el lisado filtrado (antes de la dilución) se estimó por HPLC de intercambio aniónico en aproximadamente 41 $\mu\text{g/ml}$, que corresponde a aproximadamente 3300 mg de plásmido total.

Ejemplo 2

El lisado diluido filtrado del Ejemplo 1 se purificó adicionalmente mediante intercambio aniónico. Se equilibró un cartucho Pall Mustang™ Q de 260 ml de volumen con 4 litros de solución de equilibrio/lavado Q, que comprende Tris 10 mM, Na_2EDTA 1 mM, NaCl 0,67 M, pH 8. Se bombearon 220 L de material preparado en el Ejemplo 1 sobre el cartucho Q a un caudal de aproximadamente 2-3 L/min. Después de cargar, el cartucho se lavó con tampón de equilibrio a aproximadamente 1 l/min hasta que el A_{260} del efluente se acercó a la línea de base. El plásmido se eluyó del cartucho con tampón de elución Q, que comprende Tris 10 mM, Na_2EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8, bombeado a 800 ml/min. La absorbancia del efluente del cartucho a 260 nm fue monitorizada y registrada usando un registrador de gráficos de tiras. La elución se terminó cuando el A_{260} volvió a la línea de base. El volumen total de eluato fue de aproximadamente 7,0 L y contenía un total de aproximadamente 3900 mg de DNA basado en A_{260} (suponiendo que una solución de DNA de 1 mg/ml tiene un A_{260} de 1,0 en una celda de longitud de trayectoria de 1 cm).

El eluato Q se purificó adicionalmente por interacción hidrófoba. La conductividad del eluato se llevó a aproximadamente 250 mS/cm añadiendo 13,9 l de sulfato de amonio 4,1 M. Un cartucho HIC de 60 ml de volumen de lecho se equilibró con aproximadamente 1,3 l de sulfato de amonio 2,4 M, bombeado a 400 ml/min. El eluato Q condicionado luego se bombeó a través del cartucho HIC a aproximadamente 200 ml/min. El flujo contuvo

aproximadamente 3800 mg de DNA por A260.

Una parte del material de flujo de HIC, correspondiente a aproximadamente 2700 mg de ADN, se concentró y desaló por ultrafiltración/diafiltración ("UF/DF"), usando un soporte de casete Pall Centramate™ equipado con cuatro Pall Omega™ casetes de membrana de pantalla suspendida, con un área de 1 pie² por casete y un límite de peso molecular nominal de 100 kD. Se recuperaron 826 ml de material retenido en masa, con una concentración de DNA de 2,6 mg/ml (por A₂₆₀). El aparato UF/DF se lavó una vez con agua para inyección ("WFI"), produciendo 291 ml a una concentración de 1,6 mg/ml. La recuperación combinada de DNA después de UF/DF fue de aproximadamente 2600 mg.

Una parte del material UF/DF, correspondiente a aproximadamente 2300 mg de ADN, se sometió a filtración estéril pasando a través de un filtro Pall AcroPak™ 200 de 0,22 μm. Se recuperó un total de 893 ml de producto final, a una concentración de DNA de 2,5 mg/ml, correspondiente a un total de 2200 mg.

El producto final fue sometido a una batería de pruebas de pureza y calidad. Los niveles de proteína residual fueron ≤ 0,1% por el ensayo de ácido bicinónico ("BCA"). El RNA residual fue ≤ 0,3% por HPLC de interacción hidrofóbica. El DNA genómico residual fue de aproximadamente 0,2% por electroforesis en gel de agarosa. Los niveles de endotoxina fueron de 5 EU/mg por lisado de amebocitos lisados. Estos valores se comparan favorablemente con los proporcionados por los métodos descritos anteriormente, e indican que los plásmidos preparados por los métodos descritos aquí son adecuados para una variedad de usos, que incluyen, pero no se limitan a, terapia génica humana o veterinaria, terapia mediada por plásmidos no virales y aplicaciones de vacunas de ADN.

Ejemplo 3

Las células de E. coli que contenían el plásmido pAV0124 se fermentaron a alta densidad y se recuperaron por centrifugación. Aproximadamente 3,8 kg (peso húmedo) de pasta celular se suspendieron en 31,6 l de tampón de resuspensión, a una DO₆₀₀ de 79,4. La lisis, la neutralización/precipitación y la recolección en el tanque de sedimentación se realizaron como en el Ejemplo 1. Los caudales fueron de 300 ml/min para la suspensión celular y la solución de lisis, y 600 ml/min para la solución de neutralización/precipitación. El Silverson L4R, instalado como antes, funcionaba a una velocidad del rotor de 747 rpm. El tiempo de tránsito a través de la bobina de retención entre la lisis y la neutralización/precipitación fue de aproximadamente 5 minutos. El aire comprimido se roció a través del mezclador de burbujas a 2 slpm. Los volúmenes totales de fluido incluyeron 26,6 L de suspensión celular, 5 L de lavado del tanque de resuspensión con tampón de resuspensión, 31,6 L de solución de lisis y 53,2 L de solución de neutralización/precipitación, para un total nominal de 116,4 L.

Una vez que todo el material se recogió en el tanque de sedimentación, se aplicó un vacío de 26 pulgadas de Hg, y el tanque se enfrió y se mantuvo durante aproximadamente 18,3 horas a 2-8 °C. El lisado crudo se recuperó y se filtró como antes, produciendo 85 L de lisado clarificado. Se tomó una pequeña muestra del lisado filtrado para el análisis de concentración de plásmido (véase más adelante), y el resto se diluyó con 135 L de agua purificada, produciendo un total de 220 L de lisado diluido, filtrado y diluido.

El análisis por HPLC indicó que la concentración de plásmido en el lisado filtrado sin diluir era de aproximadamente 37 μg/ml, correspondiente a aproximadamente 3100 mg de plásmido total. A modo de comparación, se lisó una pequeña muestra de la misma pasta celular a escala de banco, usando las mismas soluciones de resuspensión, lisis y neutralización/precipitación en proporciones comparables a la lisis a gran escala. Se utilizó una suave mezcla manual en todos los pasos. La concentración de plásmido en el lisado mezclado a mano se estimó en 42 μg/ml, comparable a la concentración en el lisado a gran escala. Esto demuestra que el procedimiento de lisis a gran escala es efectivo para liberar el plásmido de las células. Además, la comparabilidad de estos resultados con los obtenidos en el Ejemplo 1 demuestra la reproducibilidad y robustez de las invenciones descritas.

Ejemplo 4

El lisado diluido, filtrado y diluido del Ejemplo 3 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de membrana de intercambio aniónico Pall Mustang™ Q. Después de la desinfección y la regeneración, se equilibró un cartucho de volumen de lecho de 260 ml con 4 L de solución de equilibrio/lavado Q, como en el Ejemplo 2. Se bombearon 220 L de material preparado en el Ejemplo 3 en el cartucho Q a un caudal de 2 L/min. El cartucho se lavó con 4 l de solución de equilibrio/lavado Q a 1,2 l/min. El plásmido se eluyó del cartucho con solución de elución Q, se bombeó a 600 ml/min. La absorbancia de eluato a 260 nm se controló y se registró usando un registrador de gráficos de tiras, y la elución se terminó cuando A₂₆₀ volvió a la línea de base. El volumen total de eluato fue de 4,0 l, con una concentración de DNA de 0,89 mg/ml (por A₂₆₀). El DNA total recuperado fue de aproximadamente 3600 mg.

El eluato Q se concentró y desaló por ultrafiltración/diafiltración, usando un portacasete Pall Centramate™ equipado con cuatro casetes de membrana de pantalla suspendida Pall Omega™, con un área de 1 pie² por casete y un límite de peso molecular nominal de 100 kD. Se recuperaron 679,3 ml de material retenido a granel, con una concentración de DNA de 4,1 mg/ml (por A₂₆₀). La plataforma UF/DF se lavó dos veces con WFI. El lavado 1 produjo

187,8 ml con una concentración de 1,7 mg/ml. El lavado 2 produjo 257,7 ml con una concentración de 0,55 mg/ml. El retenido a granel se combinó con todos los lavados 1 y 2, más 179,9 ml adicionales de WFI. Esto dio como resultado 1275,5 ml de producto final a una concentración de 2,5 mg/ml, para una recuperación final de 3200 mg de plásmido.

5 El análisis de pureza del producto final indicó que la proteína residual era $\leq 0,1\%$, y el DNA genómico residual era aproximadamente 0,1%, comparable a lo observado en el Ejemplo 2. Los niveles de RNA y endotoxina fueron más altos que en el ejemplo anterior, a 6 % y 142 EU/mg, respectivamente. Estos resultados demuestran que el paso de HIC puede omitirse si se aceptan niveles más altos de RNA y de impurezas de endotoxinas. Además demuestran que el paso HIC es particularmente efectivo en la eliminación de RNA residual y endotoxinas para aplicaciones críticas.

Ejemplo 5

15 Las muestras de los ejemplos enumerados anteriormente se sometieron a análisis por electroforesis en gel de agarosa para confirmar adicionalmente la calidad del producto y la cantidad relativa de impurezas. El gel de agarosa se sobrecargó significativamente con el plásmido. El gel se diseñó para detectar trazas de impurezas de ácido nucleico en el producto plasmídico en masa. Las ubicaciones de DNA y RNA genómico contaminante se observaron como bandas muy débiles en las muestras del producto final. El porcentaje de impurezas visualizadas en este gel fue consistente con los valores cuantificados proporcionados por otros métodos.

20 También se cargó un gel de masa constante con cantidades razonablemente consistentes de plásmido superenrollado en cada carril. El gel comparó la técnica actual de lisis con el método clásico de lisis manual, tanto en términos de cantidad como de calidad del producto extraído. Otros carriles mostraron la eliminación de impurezas en diferentes etapas del proceso, así como un enriquecimiento de la forma superenrollada. Una muestra preparada por lisis manual vigorosa mostró grandes cantidades de DNA y RNA genómico contaminante. La cantidad de impurezas en las muestras que contenían lisado filtrado fue comparable a la de las muestras que contenían plásmido preparado mediante lisis manual suave. Las muestras que contenían plásmido que se sometió a cromatografía de intercambio iónico mostraron incluso menos impurezas, al igual que las muestras que contenían la sustancia farmacológica a granel. Ambos lotes verifican la consistencia del proceso.

Referencias citadas

Documentos de patentes de Estados Unidos

35 US 5.438.128 Método para la purificación rápida de ácidos nucleicos utilizando membranas de intercambio iónico en capas, Nieuwkerk
 US 5.482.836 Purificación de DNA por electroforesis de captura por afinidad y captura de afinidad por triplex, Cantor
 US 5.561.064 Producción de DNA plasmídico de grado farmacéutico, Marquet
 40 US 5.591.841 Purificación rápida de DNA circular por captura de afinidad mediada por triplex, Ji
 US 5.625.053 Método de aislamiento de DNA plasmídico purificado utilizando una solución detergente no iónica, Kresheck
 US 5.650.506 Membranas de fibra de vidrio modificada útiles para la purificación de DNA por extracción en fase sólida, Woodard
 US 5.665.554 Método de precipitación con cuentas magnéticas, Reeve
 45 US 5.693.785 Purificación de DNA sobre sílices hidroxilados, Woodard
 US 5.707.812 Purificación de DNA plasmídico durante la cromatografía en columna, Horn
 US 5.808.041 Purificación de ácido nucleico usando gel de sílice y partículas de vidrio, Padhye
 US 5.837.529 Método para lisar células, Wan
 US 5.843.731 Método para purificar DNA plasmídico sobre compuestos de fosfato de calcio, Yamamoto
 50 US 5.898.071 Purificación y aislamiento de DNA utilizando partículas magnéticas, Hawkins
 US 5.981.735 Método de producción y purificación de DNA plasmídico, Thatcher
 US 5.986.085 Proceso de cromatografía de polinucleótidos de iones emparejados (MIPC) para la separación de fragmentos de polinucleótido, Gjerde
 US 5.990.301 Proceso para la separación y purificación de ácidos nucleicos de fuentes biológicas, Colpan
 55 US 6.011.148 Métodos para purificar ácidos nucleicos, Bussey
 US 6.197.553 Método de purificación de plásmidos a gran escala, Lee
 US 6.235.892 Proceso para la purificación de ácidos nucleicos, Demmer
 US 6.395.516 Recipiente para mezclar un lisado celular, Nienow
 US 6.410.274 Purificación de DNA plasmídico utilizando iones divalentes de metales alcalinotérreos y dos intercambiadores de aniones, Bhikhabhai
 60 US 2001/0034435 Proceso y equipo para la purificación de plásmidos, Nochumson
 US 2002/0198372 Métodos para purificar ácidos nucleicos, Bridenbaugh

Documentos de patentes extranjeras

65 WO 97/35002 Purificación de DNA plasmídico de grado farmacéutico, Wils

WO 98/30685 Purificación y/o concentración de DNA por filtración de flujo cruzado, separación de endotoxinas de una preparación de ácido nucleico, Kuhne

WO 00/05358 Métodos para purificar ácidos nucleicos, Bridenbaugh

WO 01/94573 Procesamiento de fluidos que contienen plásmidos, Yang

5 WO 04/024283 Aparato y método para la purificación a escala preparativa de ácidos nucleicos, AU-Yeung,

Otras referencias

Birnboim y Doly, 1979, Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.

10 Carlson et al., 1995, Biotechnol. Bioeng 48, 303-315.

Levy et al., 2000, Trends Biotechnol. 18, 296-305.

Marquet et al., 1995, Biopharm 8, 26-37.

Rathore et al., 2003, Biopharm, International, marzo, 30-40.

15 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Varley et al., 1999, Bioseparation 8, 209-217.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para lisar células bacterianas que contienen plásmidos de forma controlada para extraer componentes celulares de interés, que comprende:

5 un primer tanque y un segundo tanque en comunicación fluida con un dispositivo de mezclado de bajo tiempo de residencia y alto cizallamiento, en el que el primer tanque está configurado para contener una suspensión de células que contienen componentes celulares de interés, el segundo tanque está configurado para contener una solución de lisis, y la suspensión de células del primer tanque y la solución de lisis del segundo tanque se dejan fluir ambas hacia el dispositivo de mezcla formando un primer fluido, en el que el dispositivo de mezclado de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia tiene un tiempo de residencia igual o inferior a aproximadamente 1 segundo, y el dispositivo está configurado para hacer fluir el primer fluido desde el dispositivo de mezcla hasta una bobina de retención; y una cámara mezcladora de burbujas en comunicación fluida con la bobina de retención; 10 una primera entrada configurada para introducir el primer fluido en la cámara mezcladora de burbujas; una o más entradas adicionales configuradas para introducir un fluido adicional en la cámara mezcladora de burbujas; un medio para introducir burbujas de gas en la cámara mezcladora de burbujas a una velocidad suficiente para causar una mezcla sustancial del primer fluido con el fluido adicional; 20 una ventilación configurada para permitir que el exceso de gas escape de la cámara mezcladora de burbujas; y una salida para el primer fluido y el fluido adicional después de haberse mezclado sustancialmente; en donde el tiempo de residencia de la bobina de retención es de 2 a 10 minutos; en donde el medio configurado para introducir burbujas de gas en la cámara mezcladora es un 25 tercer puerto de entrada; en donde el componente celular de interés es DNA plasmídico; y el fluido adicional comprende una solución de neutralización, una solución de precipitación o una combinación de las mismas.

30 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la cámara de mezcla comprende una columna vertical con un respiradero dispuesto en la parte superior de la columna, en donde la primera entrada y la una o más entradas adicionales ingresan a la cámara de mezcla cerca del fondo de la columna, en donde las burbujas son rociadas desde el fondo de la columna, en donde la salida sale de la cámara de mezcla cerca de la parte superior de la columna, y en donde el exceso de gas sale a través de la ventilación.

35 3. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además al menos una bomba que tiene un caudal lineal de al menos 3,048-30,48 cm/segundo (0,1-1 pie/segundo).

40 4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la bobina de retención está en comunicación fluida con la primera entrada.

45 5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que la cámara comprende una columna vertical cerrada con una parte superior, una parte inferior, un primer y un segundo lado con una ventilación proximal a la parte superior de la columna; y además en el que:

el primer puerto de entrada del mezclador está en el primer lado proximal al fondo de la columna y está en comunicación fluida con la bobina de retención; el segundo puerto de entrada del mezclador está próximo al fondo del segundo lado opuesto al primer puerto de entrada y está en comunicación fluida con un tercer tanque; y 50 el tercer tanque está configurado para contener una solución de precipitación o neutralización; y el dispositivo comprende además un tercer puerto de entrada que entra en la cámara de mezcla que está próximo al fondo de la columna y aproximadamente en el medio de las entradas primera y segunda y está en comunicación fluida con una fuente de gas.

55 6. El dispositivo de la reivindicación 5, que comprende además: un burbujeador sinterizado ubicado dentro de la columna vertical cerrada del tercer puerto de entrada; y en el que:

el puerto de salida sale de la cámara cerca a la parte superior de las columnas verticales cerradas y está en comunicación fluida con un cuarto tanque, y 60 en el que se permite que una suspensión de gas mixto que contiene los componentes celulares de interés fluya desde la cámara al cuarto tanque, en el que el cuarto tanque está configurado para separar un precipitado de la suspensión de gas mixto que contiene los componentes celulares de interés.

65 7. El dispositivo de la reivindicación 6, que comprende además: un conector en Y que tiene una primera ramificación bifurcada, una segunda ramificación bifurcada y una ramificación de salida configurada para contactar con la suspensión celular que contiene componentes celulares de

interés y las soluciones de lisis antes de que entren en el dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia; en donde:

5 el dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia está en comunicación fluida con la rama de salida del conector Y; el primer tanque que contiene la suspensión celular está en comunicación fluida con la primera rama bifurcada del conector Y a través de una primera bomba; y el segundo tanque que contiene la solución de lisis está en comunicación fluida con la segunda rama bifurcada del conector Y a través de una segunda bomba.

10 8. Un método para lisar células bacterianas que contienen plásmidos de manera controlada para extraer componentes celulares de interés, que comprende:

15 (a) hacer fluir una suspensión celular y una solución de lisis a través de un dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia para producir un primer fluido, en el que el tiempo de residencia del dispositivo de mezcla es menor o igual a aproximadamente un segundo;

(b) hacer fluir el primer fluido desde el dispositivo de mezcla a una bobina de retención y transportar el primer fluido a una cámara a través de la bobina de retención, en donde el tiempo de residencia de la bobina de retención es de 2 a 10 minutos;

20 (c) hacer fluir el primer fluido y el fluido adicional a través de la cámara, en donde el fluido adicional comprende una solución de neutralización, una solución de precipitación, o una combinación de las mismas;

(d) introducir burbujas de gas en la cámara, en donde las burbujas se introducen a una velocidad suficiente para causar que el primer fluido y el fluido adicional se mezclen sustancialmente formando una suspensión de mezcla de gas, en donde la suspensión de mezcla de gas comprende el componente celular de interés en un tercer fluido y los restos celulares en un precipitado que es menos denso que el tercer fluido;

25 (e) hacer flotar el precipitado sobre el tercer fluido; y

(f) eliminar el precipitado del tercer fluido que forma un tercer fluido clarificado, por lo que el componente celular de interés en la tercera solución clarificada se separa sustancialmente de los restos celulares en el precipitado, en donde el componente celular de interés es el DNA plasmídico.

30 9. El método de la reivindicación 8, en el que las burbujas de gas comprenden aire o un gas inerte.

10. El método de la reivindicación 8, en el que el fluido adicional provoca la precipitación de componentes celulares del primer fluido, para producir una mezcla de componentes celulares precipitados y lisado celular clarificado, y en el que una porción de las burbujas de gas queda sustancialmente atrapada en los componentes celulares precipitados, facilitando la flotación de los componentes celulares precipitados.

35 11. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:

40 el primer fluido contiene componentes celulares y ha sido sometido a un dispositivo de mezcla de alto cizallamiento y bajo tiempo de residencia;

el fluido adicional comprende fluido de neutralización/precipitación, que provoca la precipitación de algunos o todos los componentes celulares para producir una mezcla de fluidos;

y en el que una porción de las burbujas de gas queda atrapada sustancialmente dentro de los componentes celulares precipitados, para producir una suspensión;

45 y que comprende además someter la suspensión a vacío para producir una mezcla de componentes celulares precipitados y lisado celular clarificado.

50 12. El método de la reivindicación 10, que comprende además la etapa de separar los componentes celulares precipitados del lisado celular clarificado.

13. El método de la reivindicación 12, que comprende además la etapa de purificar el lisado celular clarificado para recuperar un componente celular de interés.

55 14. El método de la reivindicación 13, en el que la purificación del lisado clarificado comprende someter el lisado clarificado a uno o más pasos de purificación seleccionados del grupo que consiste en: intercambio iónico, interacción hidrófoba, exclusión por tamaño, purificación de fase inversa, agotamiento de endotoxinas, purificación por afinidad, adsorción a sílice, vidrio o materiales poliméricos, cromatografía de lecho expandido, cromatografía de modo mixto, cromatografía de desplazamiento, purificación de hidroxapatita, precipitación selectiva, purificación acuosa en dos fases, condensación de ADN, purificación tiofílica, purificación por pares de iones, purificación de quelatos metálicos, filtración a través de nitrocelulosa o ultrafiltración.

60 15. El método de la reivindicación 14, en el que la etapa de purificación es intercambio iónico y en donde el intercambio iónico es intercambio aniónico.

65 16. El método de la reivindicación 15, en el que el intercambio aniónico usa una membrana.

17. El método de la reivindicación 13, en el que la purificación del lisado celular clarificado comprende:
- 5 someter el lisado celular clarificado a una membrana de intercambio iónico;
 y someter el lisado celular clarificado a una membrana de interacción hidrófoba.
18. El método de la reivindicación 12, que comprende además:
- 10 filtrar el lisado clarificado con un filtro, en el que el filtro tiene un límite de tamaño de partícula en el intervalo
 de 0,2 μm a 10 μm .
19. El método de la reivindicación 8, en el que las células se lisan mediante un álcali, un detergente o una
combinación de los mismos o la solución de lisis comprende un álcali, un detergente o una combinación de los
mismos.
- 15 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 u 11, en el que el fluido adicional comprende acetato de
potasio, acetato de amonio, ácido acético o una combinación de los mismos.
21. El método de la reivindicación 20, en el que más del 90% en peso de los restos celulares está en el precipitado.
- 20 22. El método de la reivindicación 20, en el que más del 99% en peso de los restos celulares está en el precipitado.
23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22, en el que el método se lleva a cabo usando un
dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

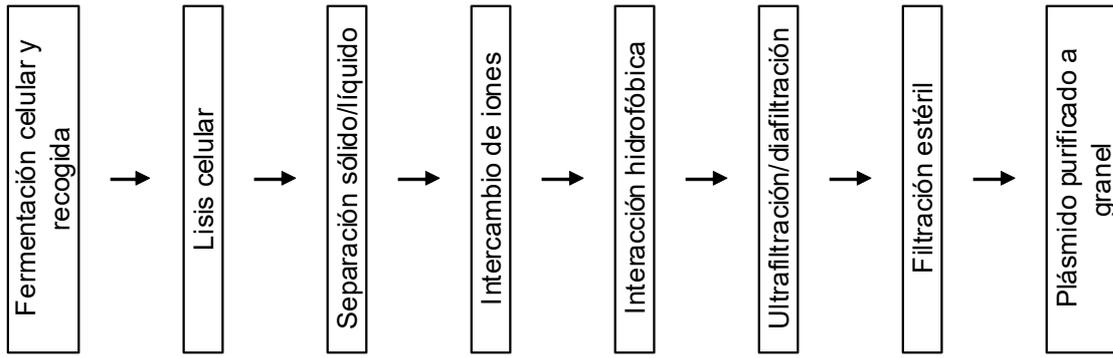


Figura 1

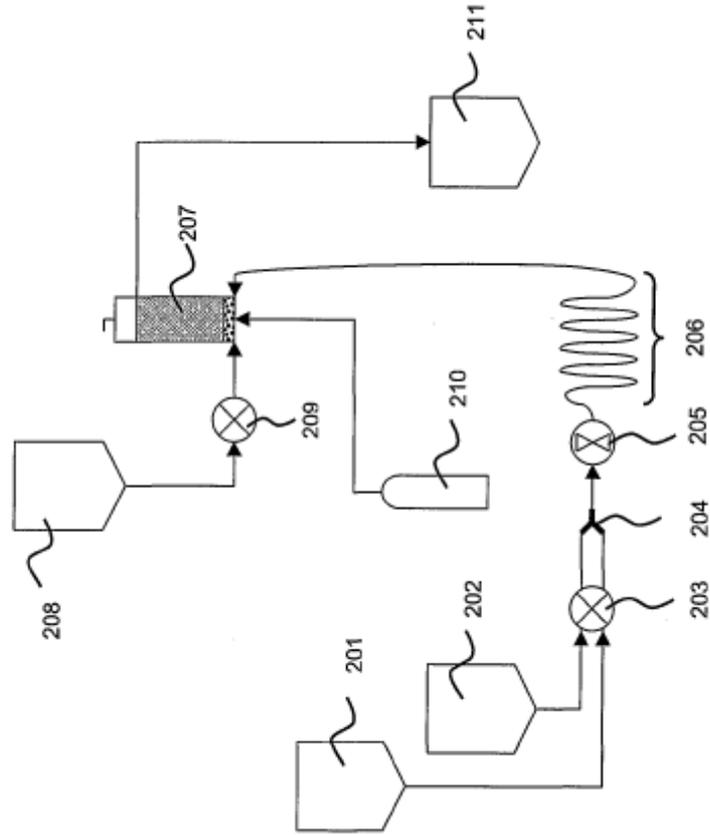


Figura 2

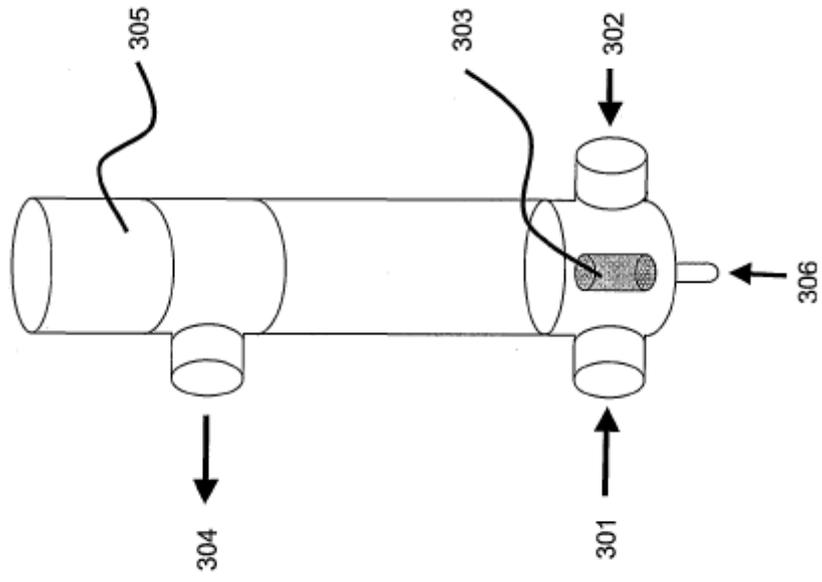


Figura 3

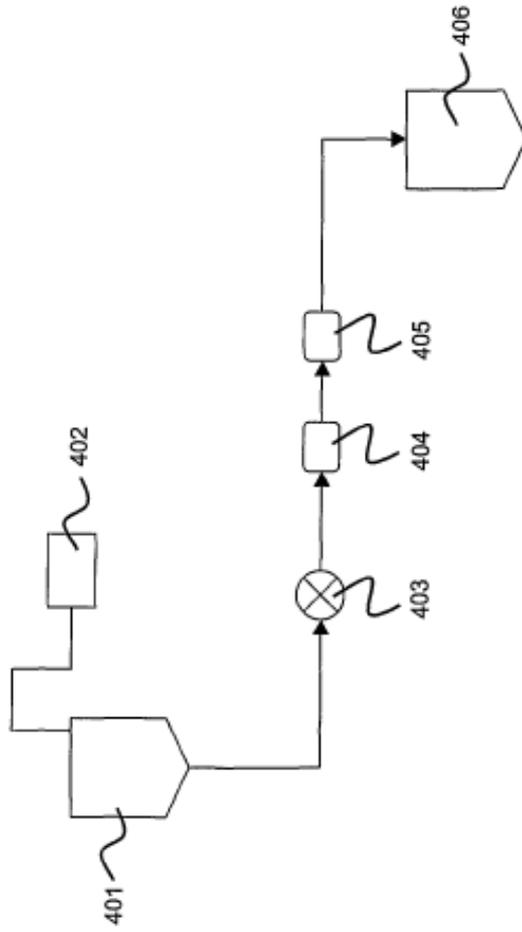


Figura 4

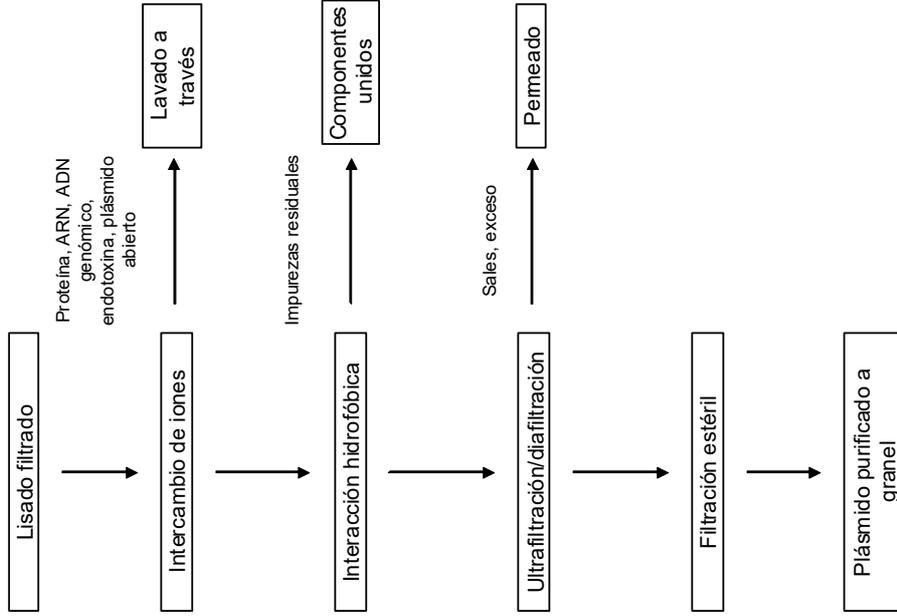


Figura 5