

OBTENCIÓN A GRAN ESCALA DE ADN PLASMIDICO PARA USO TERAPÉUTICO Y VACUNAR EN HUMANOS.

Raysa Vázquez Campos, Mariela Pérez, Eduardo Martínez, Rolando Páez y José Brito. CIGB. Ave 31 entre 158 y 190. PO6162. C.Habana. Cuba. Fax: 537218070.

Raysa.Vazquez@cigb.edu.cu

Palabras claves: ADN plasmídico, Filtración de flujo tangencial (FFT) y ARN.

Introducción.

La purificación de DNA plasmídico para uso de laboratorio, como reactivo en biología molecular esta compuesta por una serie de técnicas surgidas en la década del 70, obteniéndose un DNA de gran calidad. El surgimiento de la terapia génica y la generalización al empleo de moléculas de DNA plasmídico con fines terapéuticos o como vacunas (terapéuticas o preventivas) hacen que los conceptos de pureza que se tenían se ampliaran. Además, la necesidad de contar con cantidades de producto que satisfagan un mercado potencial de dimensiones similares al existente para proteínas de uso farmacéutico y como vacunas, hace que los procesos de obtención utilizados puedan ser escalados con facilidad y garanticen el cumplimiento de las GMP y GLP.

Los procesos establecidos utilizan operaciones como ultracentrifugación con gradiente de CsCl, extracción líquido-líquido con solventes orgánicos, concentración utilizando solventes, y la precipitación como vía de concentración y purificación. La mayor parte de estos procesos son de difícil escalado, además son operaciones abiertas pocas sanitarias.

En este trabajo nosotros reportamos un procedimiento para la obtención a gran escala del ADN plasmídico puro, para uso terapéutico y vacunar, siguiendo la filtración de flujo tangencial en lugar de precipitaciones con solventes orgánicos.

Metodología: La ruptura se lleva a cabo en solución de NaOH y SDS, seguida por una neutralización con KAc. La concentración, diafiltración y purificación, se lleva a cabo, usando tres filtros de polyethersulfone de 0.1 μm .

Resultados y Discusión.

Realizando la concentración y diafiltración tangencial, mediante filtros amicon de 0.1 μm , resulta de gran utilidad, siendo el paso más importante en el proceso de purificación, ya que se obtiene un plasmido puro libre de RNA y otras proteínas contaminantes. El RNA resulta el contaminante más representado en esta fracción, el cual se logra eliminar totalmente en el efluente de la diafiltración. (Fig 1)

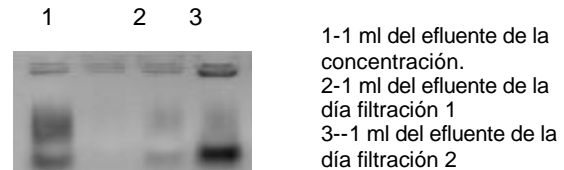


Fig. 1. Efluentes de la diafiltración

Después de diafiltrado y concentrado se filtra con filtros de 0.2 μm quedando este material puro. (Fig 2).



Fig 2. Obtención del ADN plasmidico puro

Conclusiones:

La FFT, con cartuchos amicon de 0.1 μm permite obtener un ADN plasmídico puro, eliminando el uso de solventes orgánicos y pasos de precipitación, reduciendo además el tiempo de purificación. Este método produce un ADN 30 mg de plasmido/L de cultivo el cual es mayor que lo reportado (1), libre de contaminantes como gDNA, RNA, nucleasas, endotoxinas y proteínas inespecíficas, alcanzándose más de un 95% de ADN superenrollado puro, (Fig 2), acorde a lo reportado. (2 y 3).

Agradecimiento: A Inalvis Herrera y Reinier Molina por los controles analíticos.

Bibliografía:

1. Kahn, D; Butler M; Cohen, D; Gordon, M; Kahn, J, Winkler, M. Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. 2000. *Biotechn. and Bioeng*, Vol.69, No1, July 5, 2000. pg 101-106.
2. Duarte M.F. Prazeres, Guilherme N.M. Ferreira, et al. 1999. Large scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Tibtech april* (Vol 17). Pg 169-174.
3. Guilherme N.M. Ferreira, Gabriel A. Monteiro, et al. 2000. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Tibtech 09* (vol 18).pg 380-387.