

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-528035

(P2008-528035A)

(43) 公表日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A 4 B O 2 4

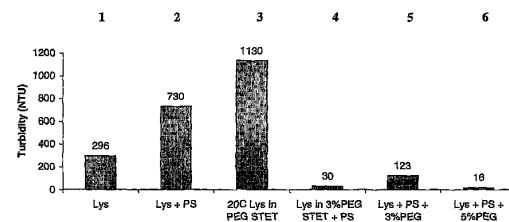
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁)

(21) 出願番号	特願2007-553283 (P2007-553283)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成18年1月27日 (2006. 1. 27)		メルク エンド カムパニー インコーポ レーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月28日 (2007. 9. 28)		MERCK & COMPANY INC OPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/003015		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ロー ウエイ、イースト リンカーン アヴェニ ュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02006/083721	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成18年8月10日 (2006. 8. 10)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/648, 670	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成17年1月31日 (2005. 1. 31)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミドDNAの精製方法

(57) 【要約】

プラスミドDNA精製方法において一般的なツーコア単位操作の代替の操作を包含する、大規模な発酵体制を含む製造プロセスから、臨床等級のプラスミドDNAを単離する方法が開示されている。本明細書に開示されている新規上流及び下流の精製方法は、製造コストの低下と方法の頑強性の増加をもたらす。ここに開示されている精製方法の一方又は両方は、DNAプラスミド精製技術に関連する本分野において公知の追加の精製工程と組み合わせて使用され得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 高次コイルプラスミド DNA を含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び

(b) 宿主細胞細片を凝集させることによって、前記宿主細胞可溶化液を清澄化すること

を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法。

【請求項 2】

前記宿主細胞可溶化液がポリエチレングリコール (PEG) 凝集剤により凝集される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

工程 (a) における宿主細胞がリゾチームを含有する標準的な STEET 緩衝液中で溶解される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(a) 高次コイルプラスミド DNA を含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び

(b) PEG で宿主細胞細片を凝集させることによって、前記宿主細胞可溶化液を清澄化すること、

を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法。

20

【請求項 5】

工程 (a) における宿主細胞がリゾチームを含有する標準的な STEET 緩衝液中で溶解される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

STEET 緩衝液が PEG を含有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

PEG が、溶解後に、宿主細胞可溶化液に添加される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

PEG 凝集剤の分子量が約 1450 Da と約 15,000 Da の間にある、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

宿主細胞可溶化液がアルカリ pH シフトに供され、及び、PEG の添加前に、その後の中和に供される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

アルカリ pH シフト及びその後の中和が、宿主細胞可溶化液の pH を約 pH 1.2 と約 pH 1.3 の間のアルカリ値に上昇させること、及び、その後、前記細胞可溶化液の pH を約 pH 7 と約 pH 9 の間の値に低下させることを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

PEG が、連続的遠心条件下で、前記アルカリシフトされ、中和された宿主細胞可溶化液に供給され、上清中に高次コイルプラスミド DNA を有する凝集された細胞細片の沈殿物を取得する、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

宿主細胞可溶化液がアルカリ pH シフトに供され、及び、PEG の添加後に、その後の中和に供される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

アルカリ pH シフト及びその後の中和が、PEG 含有宿主細胞可溶化液の pH を約 pH 1.2 と約 pH 1.3 の間のアルカリ値に上昇させること、及び、その後、前記可溶化液の pH を約 pH 7 と約 pH 9 の間の値に低下させることを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

50

(a) 生理的緩衝溶液中で、高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、

(b) 前記可溶化液のpHを約pH12と約pH13の間のpHまで上昇させることにより、工程(a)の宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフトに供すること、

(c) アルカリシフトされた工程(b)の細胞可溶化液を、概ね、溶解緩衝液のpHまで中和すること、

(d) PEGで宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(c)の細胞可溶化液を清澄化すること、及び

(e) 工程(d)の前記凝集された宿主細胞細片を除去し、可溶性高次コイルプラスミドDNAを含有する溶液上清を取得すること、

を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法。

【請求項15】

工程(a)の生理的溶解緩衝液が標準的なSTET緩衝液である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

細片及び非高次コイルプラスミドを沈殿させるために、工程(d)及び(e)の間に界面活性剤によって誘導される沈殿工程が追加され、細胞可溶化液をさらに清澄化する、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

界面活性剤が、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)である、請求項17に記載の方法。

【請求項18】

(a) 前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び

(b) 接線流る過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮すること、

を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法。

【請求項19】

高次コイルプラスミドDNAが、アルコール及びPEGからなる群から選択される沈殿剤を用いて、工程(a)において沈殿される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

高次コイルプラスミドDNAがPEGによって沈殿される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記沈殿された高次コイルDNAが、

(a) 接線流る過の下での精密ろ過を含む第一のろ過工程と、

(b) 高次コイルプラスミドDNAを沈殿された状態に保つのに十分なPEG及び塩を含有するPEG含有透析ろ過緩衝液に対する第一の透析ろ過工程と、

(c) 沈殿された高次コイルプラスミドDNAがエタノールの添加によって部分的に脱水される脱水工程と、

(d) 第二のろ過濃縮工程と、並びに

(e) 100%(v/v)エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む段階的ろ過プロセスにおいて濃縮される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

工程(b)の前記透析ろ過緩衝液が、約10%(w/v)PEG6000と約1.2MのNaClを含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

沈殿された高次コイルプラスミドDNAが、エタノールの添加により、約50%(v/v)の最終濃度まで部分的に脱水される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

10

20

30

40

50

前記第二のろ過濃縮工程が、攪拌された細胞フィルター乾燥機中で起こる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

高次コイルプラスミド DNA がエタノールによって沈殿される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA が、

(a) 接線流ろ過の下での精密ろ過を含む第一のろ過濃縮工程と、

(b) エタノール溶液中のエタノールの濃度が前記高次コイルプラスミド DNA を沈殿された状態に保つのに十分であるエタノール溶液に対する第一の透析ろ過工程と、

(c) 第二のろ過濃縮工程と、並びに

(d) 1 0 0 % (v / v) エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む段階的ろ過プロセスによって濃縮される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

工程 (b) のエタノール溶液中のエタノールの濃度が約 8 0 % (v / v) である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第二のろ過濃縮工程が、攪拌された細胞フィルター乾燥機中で起こる、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

(a) P E G で高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、

(b) 接線流ろ過下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA を濃縮すること、

(c) エタノールの添加により、前記濃縮され、沈殿された DNA を部分的に脱水すること、及び

(d) 攪拌された細胞フィルター乾燥機中で前記部分的に脱水され、沈殿された DNA を濃縮すること、

を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法。

【請求項 3 0】

(a) 生理的緩衝溶液中にて、高次コイルプラスミド DNA を含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、

(b) P E G 凝集剤で宿主細胞細片を凝集させることによって、前記宿主細胞可溶化液を清澄化すること、

(c) P E G により前記高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、及び

(d) 接線流ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA を濃縮すること、

を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法。

【請求項 3 1】

工程 (a) 中の前記宿主細胞が標準的な S T E T 緩衝液中で溶解される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

宿主細胞可溶化液がアルカリ pH シフトに供され、及び、P E G 凝集剤の添加前に、その後の中和に供される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

アルカリ pH シフト及びその後の中和が、宿主細胞可溶化液の pH を約 pH 1 2 と約 pH 1 3 の間のアルカリ値に上昇させること、及び、その後、前記可溶化液の pH を概ねアルカリシフト以前のその pH まで低下させることを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

- (a) 発酵ブロスから微生物宿主細胞を採集すること、
 - (b) 生理的溶解溶液の十分量の中で宿主細胞を溶解させること、
 - (c) 前記可溶化液の pH を約 pH 12 と約 pH 13 の間の pH まで上昇させることにより、宿主細胞可溶化液をアルカリ pH シフトに供すること、
 - (d) アルカリシフトされた細胞可溶化液を、概ね、溶解緩衝液の pH まで中和すること、
 - (e) PEG の添加により宿主細胞細片を凝集させることによって、工程 (d) の細胞可溶化液を清澄化すること、
 - (f) 前記凝集された宿主細胞細片を除去すること、
 - (g) ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドによって誘導される沈殿を用いて、高次コイルプラスミド DNA を選択的に沈殿させること、 10
 - (h) 最適化されたイオン強度の、及び水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムをさらに含有する十分に確定された緩衝液中に前記高次コイルプラスミド DNA を再溶解し、及び不純物を吸着させること、
 - (i) 水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムによって誘導される第二の吸着により、残りの不純物を吸着させること、
 - (j) PEG で高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、
 - (k) 接線流る過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイル DNA を濃縮すること、
 - (l) エタノールの添加により、前記沈殿された高次コイル DNA を部分的に脱水すること、 20
 - (m) 攪拌された細胞フィルター乾燥機で前記脱水された高次コイル DNA を濃縮すること、並びに
 - (n) エタノールを除去するために乾燥させること、
- を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法。

【請求項 35】

前記微生物細胞が標準的な STET 緩衝液中で溶解される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

細片及び非高次コイルプラスミドを沈殿させるために、低カットヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドによって誘導される、工程 (e) 及び (f) の間の沈殿工程が追加され、細胞可溶化液をさらに清澄化する、請求項 34 に記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2005 年 1 月 31 日に出願された米国仮出願 60 / 648 , 670 号の利益を主張し、参照により、本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、プラスミド DNA 精製プロセスにおいて一般的なツーコア単位操作の代替法を包含する、大規模発酵方式を含む製造プロセスから臨床等級のプラスミド DNA を単離する方法に関する。本明細書に開示されている新規上流及び下流精製プロセスは、製造コストの低下とプロセスの頑強性の増加をもたらす。本発明の一部として記載されている新規上流精製プロセスは、まず、プラスミド DNA を含有する宿主細胞可溶化液が生成され、次いで、宿主細胞細片の凝集によって清澄化される 2 段階溶解 / 可溶化液清澄化プロセスを含む。本発明の一部として記載されている新規下流精製プロセスは、プラスミド DNA が濃縮された宿主細胞可溶化液からのプラスミド DNA の沈殿と、及び接線流る過モード下での前記沈殿された DNA の精密ろ過を包含する。本明細書に開示された精製プロセスの一方又は両方は、プラスミド DNA 精製技術と関連する本分野で公知のさらなる精製 40 50

工程と組み合わせて使用し得る。

【背景技術】

【0003】

ポリヌクレオチドワクチンは、特定の疾病に対して防御免疫を誘導するための画期的アプローチであり、中和抗体を生成するとともに、より好ましい細胞媒介性免疫反応を活性化する (Montgomery, D. L. et al., 1993, Cell Biol. 169: 244 - 247; Ulmer, J. B. et al., 1993, Science 259: 1745 - 1749)。目的の抗原をコードする遺伝子と哺乳動物細胞中で活性なプロモーターを含むプラスミドDNAが身体に投与され、筋肉細胞によって内部に取り込まれる。抗原DNAは転写及び翻訳され、発現されたタンパク質は、T細胞提示のために細胞表面へと輸送される。疾病モデルでのDNAワクチンの前臨床免疫原性と有効性は、多数の感染性疾患に対して実証されている (総説として、Gurunathan S. et al., 2000, Ann. Rev. Immunol. 18: 927 - 974を参照。)。プラスミドDNAは、さらに、機能的遺伝子の体内への投与、標的細胞への前記遺伝子の送達及び疾病状態を選択的に調節するための治療用産物の発現を包含する遺伝子治療処置については認められている。

10

【0004】

従って、遺伝子治療は、遺伝的欠陥の予防、治療又は治癒に対する代替法となる。プラスミドDNAをベースとした多くの遺伝子治療臨床試験が開始されている (総説として、Mountain, A., 2000, TIBTECH 18: 119 - 128; and Ferber, D., 2001, Science 294: 1638 - 1642を参照)。

20

【0005】

医薬等級のプラスミドDNAの大量の製造及び精製は、ポリヌクレオチドワクチン及び遺伝子治療プロトコルの両者の適用性にとって極めて重要である。予防又は治療計画の一環として、疾病を撲滅するためにDNAワクチン又は遺伝子治療処置を使用する可能性があるヒト使用者の数は極めて多く、臨床等級プラスミドDNAに対する大きな需要をもたらしている。従って、DNAワクチンと遺伝子治療処置の選択肢が何れも提供しなければならぬ利点を完全に開発し、及び活用するために、高収率のプラスミドDNA産生プロセス及び精製プロセスが必要である (Shamlou, P. A., 2003, Biotechnol. Appl. Biochem. 77: 207 - 218)。小規模プラスミドDNA精製法に関する従来の調査にも関わらず、臨床等級プラスミドDNAの製造及び精製の規模を拡大することには問題が存在することが明らかとなっている (Prazeres, D. M. F. et al., 1999, TIBTECH 17: 169 - 174)。さらに、画期的な大規模製造プロセスは、最適化と市場化への早さに対する要求及び必要性に対する経済的な関心との釣り合いをとらなければならない (Shamlou, 2003, 上記)。本発明は、生産コストを低下させ、プロセスの頑強性を増加させるプラスミドDNAの精製のための、高度に生産性があり、拡張可能であり、及び再現性のあるプロセスを開示する。本プロセスは、宿主細胞細片のポリマー凝集を含む新しい溶解及び可溶化液清澄化手法を開示する。この新規溶解及び凝集手法は、(ポリエチレングリコール又はアルコールを使用する) プラスミドDNAの沈殿と、及び接線流過モード下でのその後の精密ろ過を包含する新規下流仕上げ工程と組み合わせ得る。

30

40

【0006】

増殖培地から細菌細胞を単離するために、化学的凝集が一般に使用され、遠心より安価な代替法となっている (例えば、Lee, J. and C. V. Viswanathan, 1974, Lab. Pract. 23: 297 - 298; Cumming, R. H., et al., 1996, Bioseparation 6: 17 - 23)。凝集の機序は複雑であり、温度、イオン環境、生理的熟成、凝集剤、表面剪断及び凝集されるべき材料など多くの変化要因に依存する (McGregor, W. C. and R. K. Finn, 1969, Biotechnol. Bioeng. 11: 127 - 138)。細菌細胞

50

細片に関しては、数個の研究が本機序について分析しているに過ぎない。Persson I. - L. 及び B. Lindman (" Flocculation of Cell Debris for Improved Separation by Centrifugation , " Flocculation in Biotechnology and Separation Systems , Ed. Y. A. Attia , Amsterdam : Elsevier , 1987 , 429 - 439) は、研究室及び予備生産研究で E. コリ細胞細片を凝集させるために、陽イオン性多価電解質、キトサン及びポリエチレンイミンの組み合わせを使用した。正に帯電したポリマー粒子は、E. コリ細胞細片を凝集させるためにも使用されている (Kim , C. W. , et al. , " Removal of Cell and Cell Debris by Electrostatic Adsorption of Positively Charged Polymeric Particles " , Flocculation in Biotechnology and Separation Systems , Ed. Y. A. Attia , Amsterdam : Elsevier , 1987 , 429 - 439) 。しかしながら、ポリマー凝集剤を使用して、拡張可能なプロセスの設計のために清澄化された細菌可溶化液を生成可能であることは認識されていなかった。

10

【 0007 】

微生物細胞発酵から臨床等級プラスミド DNA を精製する際の最後の工程は、先行する上流精製工程から持ち込まれた、宿主細胞由来の全ての残留不純物及び / 又はプロセス夾雑物を除去すること、並びに最終の産物を濃縮すること及び緩衝液交換を包含する。本発明は、プラスミド DNA 精製を完結させるための最終仕上げ操作において、接線流る過モードでの精密ろ過と組み合わせて、ポリエチレングリコール (例えば、Lis , J. T. and R. Schleif , 1975 , Nucleic Acids Res. 2 : 383 - 389 ; Sadhu , C. and L. Gedamu , 1988 , Biotechniques 6 : 20 - 21 ; Yeung , M. C. and A. S. Lau , 1993 , Biotechniques 15 : 381 - 382 ; and Horn , N. A. et al. , 1995 , Hum. Gene Ther. 6 : 565 - 573 を参照) 又はアルコール (例えば、Wallace , D. M. , " Precipitation of Nucleic Acids , " Methods in Enzymology : Guide to Molecular Cloning Techniques , Eds. S. L. Berger and A. R. Kimmel , 1987 , 41 - 48 ; Serghini , M. A. et al. , 1989 , Nucleic Acids Res. 17 : 3604 参照) を用いて DNA を沈殿させるという周知の方法を使用する。本プロセスは、最終仕上げプロセスにおいて一般に使用されている限外ろ過操作に必要とされる高い再循環速度及び大きな膜面積を省略する。

20

30

【 0008 】

1996 年 10 月 1 日に、Marquet , M. らに対して発行された米国特許第 5 , 561 , 064 号は、医薬等級プラスミド DNA の精製中に使用された分画的ポリエチレングリコール (「 PEG 」) 沈殿戦略を開示する。重要なことに、第一の PEG 沈殿工程は、清澄化された可溶化液の生産後及び陰イオン交換クロマトグラフィーのサイズ排除前に実施する。

40

【 0009 】

1998 年 1 月 13 日に Horn , N. らに発行された米国特許第 5 , 707 , 812 号は、クロマトグラフィーマトリックス (プラスミド DNA は、その後、クロマトグラフィーマトリックスから、PEG を含有する緩衝液中に溶出される。) へのプラスミド DNA の結合を増強させるための縮合剤として PEG を使用することを開示している。

【 発明の開示 】

【 0010 】

(発明の要旨)

本発明は、微生物細胞から医薬等級のプラスミド DNA を単離する方法に関し、本方法

50

は、製造プロセスからのプラスミドDNAの精製に代わる要素となり、大規模発酵方式を含み、製造コストの低下とプロセスの頑強性の増加をもたらす。本発明は、さらに、新規上流（すなわち、宿主細胞可溶化液の清澄化の前及び宿主細胞可溶化液の清澄化を含む。）及び新規下流（すなわち、可溶化液清澄化後）精製工程を含むプラスミドDNA精製プロセスにおいて一般的なツークア単位操作に関する。より具体的には、本明細書に開示されている上流精製工程は、目的の高次コイルプラスミドDNAを含有する宿主細胞からまず細胞可溶化液が生成され、次いで、宿主細胞細片を除去するための凝集によって前記細胞可溶化液が清澄化される2つの部分からなる溶解／可溶化液清澄化操作を含む。本発明の新規下流精製プロセスは、残留不純物を除去するために上流及び先行する下流精製工程を介して高次コイルプラスミドDNAが濃縮された細胞可溶化液をまず沈殿させた後、接線流る過モード下での精密ろ過に供される最終濃縮／仕上げ操作を包含する。これらの工程は、本分野で公知のさらなる精製工程とさらに組み合わせて使用することができ、及び／又は、好ましくはDNAプラスミド精製技術に関連する本分野で公知の他の方法と組み合わせて、上記工程の少なくとも1つが省略される。

10

20

30

40

50

【0011】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載されている方法は、細菌細胞、植物細胞、酵母及びバキュロウイルスを含む（但し、これらに限定されない。）微生物細胞（エシェリヒア・コリ（「E.コリ」）が好ましい微生物宿主である。）からの臨床等級DNAプラスミドの精製を可能とする。本明細書に記載されている方法によって精製された臨床等級プラスミドDNAは、ワクチンとして又は遺伝子治療ビヒクルとして、ヒトに投与するのに極めて有用である。本発明の方法は、臨床等級DNAプラスミド精製の微生物細胞からの精製について具体的に述べられているが、前記方法の適用は、微生物細胞からの精製に限定されない。従って、本発明は、さらに、本明細書に開示されている新規工程の1つ又はそれ以上を用いて、哺乳動物細胞から精製された臨床等級プラスミドDNAの単離並びに様々な宿主細胞（例えば、微生物又は哺乳動物）からの別の生物分子（例えば、タンパク質）の単離及び精製に関する。

【0012】

本発明は、（a）高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び（b）宿主細胞細片を凝集させることによって、工程（a）の前記可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。宿主微生物細胞の溶解は、リゾチームの存在下又は不存在下で行うことができる。本発明の一実施形態において、宿主細胞細片は、ポリエチレングリコール（「PEG」）で凝集される。細胞可溶化液を清澄化させるために使用されるPEGを含む（これに限定されない。）凝集剤は、溶解緩衝液（例えば、標準的なSTET緩衝液）の成分として含めることができ、又は溶解が起こった後に、細胞可溶化液に添加することができる。凝集された宿主細胞細片は、例えば、沈降及びデカント又は遠心法（連続的遠心を含むが、これに限定されない。）によって宿主細胞可溶化液から除去することが可能であり、清澄化された細胞可溶化液をもたらす。凝集された細胞細片が除去された後、清澄化された細胞可溶化液中の高次コイルプラスミドDNAは、さらに、下流の精製プロセスによって、残留夾雑物から精製される。従って、本発明の一実施形態は、本明細書に記載されている新規上流精製プロセスを用いて、高次コイルプラスミドDNAを含有する清澄化された宿主細胞可溶化液を生成する方法に関する。

【0013】

本発明は、さらに、（a）高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、（b）工程（a）の宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフト及びその後の中和に供すること、並びに（c）宿主細胞細片を凝集させることによって、前記pHシフトされた工程（b）の細胞可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本明細書に記載されているアルカリpHシフト及びその後の中和工程は、凝集操

作のために宿主細胞可溶化液を調製するのに役立つが、前記 pH シフトは、前記可溶化液への凝集剤の添加前又は添加後の何れにおいても行うことが可能である。本発明の一実施形態において、当初細胞可溶化液の pH は、濃縮された塩基溶液の添加により、アルカリ値（例えば、約 pH 12 - 13）へとシフトされ、可溶性宿主細胞染色体 DNA の変性を可能とする。アルカリシフトされた細胞可溶化液は、次いで、濃縮された酸溶液の添加により、概ね、最初の溶解緩衝液の pH まで中和され、好ましくは、約 8 - 9 の間の pH を有する細胞可溶化液をもたらす。従って、本発明の一実施形態は、（a）生理的緩衝溶液中で、高次コイルプラスミド DNA を含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、（b）塩基の添加により前記可溶化液の pH を約 pH 12 と約 pH 13 の間の pH まで上昇させることによって、工程（a）の宿主細胞可溶化液をアルカリ pH シフトに供すること、（c）アルカリシフトされた工程（b）の細胞可溶化液を、概ね、細胞がその中に溶解された生理的緩衝液の pH まで中和すること、及び（d）凝集剤（PEG を含むが、これに限定されない。）で宿主細胞細片を凝集させることによって、前記 pH シフトされ、中和された細胞可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法に関する。

10

【0014】

本発明の上流溶解及び可溶化液清澄化技術の後に、（i）CTAB を含む（これに限定されない。）陽イオン性界面活性剤を用いた、清澄化された可溶化液からのプラスミド DNA の沈殿、（ii）塩溶液によるプラスミドの溶解、（iii）水和したケイ酸カルシウム上への残留不純物の吸着、及び（iv）臨床等級プラスミド調製物の最終調合に先立つ、ポリエチレングリコール又はアルコールによる精製されたプラスミド DNA の沈殿、を含む（これらに限定されない。）多数の下流精製プロセスが続くことが可能である。

20

【0015】

本発明は、さらに、大規模発酵方式から臨床等級プラスミド DNA を単離するための新規下流精製プロセスに関し、粉末化されたプラスミド DNA 産物をもたらす最終濃縮 / 仕上げ工程に相当する。本発明の下流精製プロセスは、先行する精製工程の結果、高次コイルプラスミド DNA が濃縮された細胞可溶化液から残留不純物を除去するように作用する。従って、本発明は、（a）前記高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、及び（b）接線流ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA を濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法に関する。工程（a）における高次コイルプラスミド DNA の沈殿は、ポリエチレングリコール又はアルコール（エタノール、メタノール及びイソプロパノールを含むが、これらに限定されない。）を用いた周知の方法によって行い得る。工程（b）の精密ろ過プロセスは、プラスミド DNA 精製プロセスの最終濃縮 / 緩衝液交換操作において一般に使用されている限外ろ過操作を直接置換することができ、再循環速度、フィルター膜面積及び総バッチ容積を最小限に抑える。

30

【0016】

本発明の一実施形態において、高次コイルプラスミド DNA は、本明細書に開示されている新規下流濃縮 / 仕上げ精製プロセスにおける第一の工程として、濃縮され、清澄化された細胞可溶化液（すなわち、上流及び先行する下流精製プロセスにより、高次コイルプラスミド DNA が濃縮された宿主細胞可溶化液）から PEG を用いて沈殿される。前記沈殿されたプラスミド DNA は、次いで、接線流ろ過モード下で稼働される精密ろ過に供せられる。従って、本発明の一実施形態は、（a）PEG で前記高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、及び（b）接線流ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA を濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法に関する。本発明の精密ろ過プロセスは、段階的なろ過プロセスの一環であり得る。従って、本発明の一実施形態において、上記 PEG 沈殿された高次コイルプラスミド DNA は、精密ろ過及びその後の透析ろ過が沈殿されたプラスミド DNA スラリーを濃縮し、並びに残留 RNA 及び不純物を清澄化する第一のろ過工程を含む段階的なろ過プロセスを介して濃縮される。第二のろ過工程は、

40

50

DNA沈殿内のPEGをエタノールと置き換え、さらに、プラスミドDNAを濃縮し、微細な粉末化された形態を得るために乾燥させることが可能な脱水されたプラスミドDNAの最終湿潤産物が得られる。この第二のろ過工程は、攪拌された細胞操作下でのフィルター乾燥装置（例えば、単一プレートNutscheフィルター乾燥機）中で行うことが可能であり、圧力ろ過及び真空乾燥を可能とする。従って、本発明は、（a）PEGで前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び（b）接線流ろ過モードでの精密ろ過を含む段階的ろ過プロセスを用いて、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。前記段階的ろ過プロセスは、（a）接線流ろ過の下での精密ろ過を含む第一のろ過濃縮工程と、（b）高次コイルプラスミドDNAを沈殿された状態に保つのに十分なPEGの濃度を含有し、及び場合により十分な塩の濃度を含有するPEG含有透析ろ過緩衝液に対する第一の透析ろ過工程と、（c）沈殿された高次コイルプラスミドDNAがエタノールの添加によって部分的に脱水される脱水工程と、（d）第二のろ過濃縮工程と、並びに（e）100%（v/v）エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。さらなる実施形態において、（d）及び（e）の第二のろ過及び透析工程は、圧力ろ過の下で、及び攪拌された細胞モードで、単一プレートNutscheフィルター乾燥機を含む（但し、これに限定されない。）フィルター乾燥機中で行われる。

10

20

30

【0017】

さらに、本発明は、（a）エタノール、メタノール及びイソプロパノールを含む（但し、これらに限定されない。）アルコールで前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び（b）接線流ろ過下での精密ろ過によって、前記沈殿されたプラスミドDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本発明の本部分の一実施形態において、前記精密ろ過濃縮工程は、（a）接線流ろ過の下での精密ろ過を含む第一のろ過濃縮工程と、（b）エタノール性溶液のエタノール濃度が高次コイルプラスミドDNAを沈殿された状態に保つのに十分であるエタノール性溶液に対する第一の透析ろ過工程と、（c）第二のろ過濃縮工程と、並びに（d）100%（v/v）エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む段階的ろ過プロセスの一部である。さらなる実施形態において、（c）及び（d）の第二のろ過及び透析工程は、圧力ろ過の下で、及び攪拌された細胞モードで、単一プレートNutscheフィルター乾燥機を含む（但し、これに限定されない。）フィルター乾燥機中で行われる。

【0018】

本明細書において互換的に使用される「臨床等級のプラスミドDNA」と「医薬等級のプラスミドDNA」という用語は、遺伝子治療及び/又はポリヌクレオチドワクチン接種用途を含む（但し、これらに限定されない。）あらゆる公知の予防的又は治療的適応症のためのヒトへの投与に対して許容される純度のレベルである、宿主細胞から単離されたプラスミドDNAの調製物を表す。

【0019】

本明細書において使用される「非高次コイルプラスミドDNA」とは、切れ目が入った、開放環状及び直鎖などのプラスミドDNAの他のあらゆる形態を含む高次コイルプラスミドDNAでないあらゆるDNA並びに宿主ゲノムDNAを表す。

【0020】

本明細書において使用される「NTU」とは、標準化された濁度単位（normalized turbidity unit）を表す。濁度とは、浸漬されたプローブの光場によって通過する粒子の「計数」として定義される。溶液の濁度は、レーザーをベースとした光散乱装置を用いてモニタリングすることが可能である。

【0021】

本明細書において使用される「PEG」とは、ポリエチレングリコールを表す。

50

【 0 0 2 2 】

本明細書において使用される「 OD_{600} 」とは、 600nm での光学密度、 mL 当りの細胞の数の光散乱、分光光度法測定を表す。

【 0 0 2 3 】

本明細書において使用される「 $L.O.D$ 」とは、検出限界 (limit of detection) を表す。

【 0 0 2 4 】

本明細書において使用される「 MW 」とは、ダルトンで表した分子量を表す。

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用される「 LRA^{TM} 」とは、Lipid Removal AgentTMを表す。

【 0 0 2 6 】

本明細書において使用される「 $CTAB$ 」とは、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド又はセチルトリメチルアンモニウムブロミドを表す。

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用される「 $h c C a S i O_3$ 」とは、水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムを表す。

【 0 0 2 8 】

本明細書において使用される「 IPA 」とは、イソプロパノールを表す。

【 0 0 2 9 】

本明細書において使用される「 MF 」とは、精密ろ過を表す。

【 0 0 3 0 】

本明細書において使用される「 UF 」とは、限外ろ過を表す。

【 0 0 3 1 】

本明細書において使用される「 $STET$ 緩衝液」とは、約 50mM の $Tris-HCl$ (約 $pH7.0-9.0$)、約 $50-100\text{mM}$ の $EDTA$ 、約 8% スクロース及び約 2% $Triton^{(R)}-X-100$ を含む緩衝液を表す。

【 0 0 3 2 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、生産コストの減少とプロセスの頑強性の増加をもたらす、臨床等級プラスミドDNAを精製する大規模化可能な方法に関する。プラスミドDNA精製のための主要な単位操作は、細胞溶解、ろ過 (精密ろ過 / 限外ろ過) 及びクロマトグラフィーを含むと、しばしば考えられている。しかしながら、大規模なスケールで医薬等級プラスミドDNAを単離する場合、前記特定された主要な単位操作は、最低の単位コストで大きな量と高い品質をとともに得るという本プロセスの最終目標に適合させるために調整しなければならない。例えば、複数のクロマトグラフィー工程のための、樹脂及び緩衝液などの原材料の支出は、大規模なプラスミドDNA精製プロセスに適用される場合、非常に高い単位コストと乏しい能力をもたらすことが明らかとされている。最近開示された米国特許出願 $09/875,379$ 号 (米国公開番号 $US2002/0012990$) は、臨床等級品質 (すなわち、少なくともヒトワクチン接種及びヒト遺伝子治療用途において有用) のプラスミドDNAのグラム量の単離を確保しながら、相対的に高価なクロマトグラフィー工程を不要とする別のプラスミドDNA精製プロセスを明らかにした。本発明は、さらに、臨床等級プラスミドDNAの精製のための経済的で、大規模化可能なプロセスを与えるという最終目標に拡張される。この目的のために、本発明は、プラスミドDNA精製プロセスのツーコア操作の代替操作として、清澄化された細胞可溶化液の生成及び高次コイルプラスミドDNAの最終濃縮 / 仕上げを特定する。

【 0 0 3 3 】

従って、本発明は、新規上流 (すなわち、宿主細胞可溶化液の清澄化の前及び宿主細胞可溶化液の清澄化を含む。) 及び新規下流 (すなわち、可溶化液清澄化より後) 精製操作を含むプラスミドDNA精製プロセスに共通するツーコア単位操作に関する。開示されて

10

20

30

40

50

いる上流精製工程は、高次コイルプラスミドDNAを含有する宿主細胞（微生物細胞を含むが、これに限定されない。）からまず細胞可溶化液が生成され、次いで、前記細胞可溶化液を凝集によって清澄化し、宿主細胞細片を除去する、2つの部分からなる溶解/可溶化液清澄化手順を含む。目的のプラスミドDNAは清澄化された可溶化液中に残存し、目的のプラスミドDNAは、下流プロセスを介して、清澄化された可溶化液からさらに精製される。本発明の開示された下流精製工程は、先行する前記濃縮手順後に残存する残留不純物の除去を助けるために、まず、（先行精製工程の結果）プラスミドDNAが濃縮された溶液からプラスミドDNAを沈殿させ、接線流る過モードで精密ろ過（「MF」）に供されるプロセスを含む採集濃縮/仕上げ工程を包含する。次いで、プラスミドDNA産物粉末を形成するために、精製されたプラスミドDNAを乾燥させることができる。本明細書にさらに記載され、及び例示されているように、本発明の上流及び下流精製工程は、米

国特許出願09/875,379号（上記）に開示されている精製方法を含む（但し、これに限定されない。）さらなる精製プロセスを伴う。このため、臨床等級プラスミドDNAの回収をもたらす大規模化可能な総合的精製プロセスを策定するために、本明細書に記載されている精製工程の一方又は両方を使用することは、本発明の範囲に属する。プラスミドDNA及び必要とされるプラスミドDNAの品質の特定のロットに対して必要とされる精製スキームを適切に改変することは、当業者の裁量に属する。本発明の新規精製工程を使用する様々な実施例が、本明細書に記載されているが、これらの実施例は、決して、本明細書の開示を限定することを意図したものではない。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明の一実施形態は、（a）高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び（b）宿主細胞細片を凝集させることによって、工程（a）の前記可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本発明のさらなる実施形態において、宿主細胞細片は、ポリエチレングリコール（「PEG」）で凝集される。従って、本発明の一実施形態は、（a）高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び（b）宿主細胞細片をPEGで凝集させることによって、工程（a）の前記可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。

【0035】

微生物宿主細胞は、溶解前に発酵溶媒から採集され、適切な希釈になるように、滅菌された生理的に許容可能な緩衝液（例えば、標準的なSTET緩衝液）中に再懸濁される。当業者であれば、最適な溶解条件が、部分的に、溶解緩衝液内の微生物宿主細胞の濃度に依存することを認識する。最適な溶解が生じる溶解緩衝液中の宿主細胞濃度（OD₆₀₀）は、下記実施例1において、E. コリ宿主細胞を用いて示されるように、容易に測定することが可能である。最適な溶解条件は、宿主細胞の乾燥細胞重量（「DCW」）希釈に関して測定することも可能である。本発明の新規溶解/可溶化液清澄化プロセスによってE. コリ宿主細胞を溶解した場合には、70の当初OD₆₀₀が好ましいものであり得る（実施例1参照）。あるいは、本明細書において、本発明者らは、約23g/LのDCWで、目的の高次コイルプラスミドDNAを含有するE. コリ細胞の溶解が強固な溶解をもたらすことも決定した。前記宿主細胞の溶解は、精製されるべき染色体外高次コイルプラスミドDNA、可溶性の宿主細胞染色体DNA又はゲノムDNA及び宿主細胞細片（例えば、不溶性の宿主細胞染色体DNA又はゲノムDNA、細胞膜、細胞小器官及び修飾された固体）を含む（但し、これらに限定されない。）溶液を生成する。本発明の本実施形態の細胞溶解工程は、酵素リゾチームの存在下又は不存在下の何れにおいても起こり得る。細菌細胞中で、リゾチームは、細菌のペプチドグリカン細胞壁を分解するように作用して、ペプチドグリカン層のN-アセチルムラミン酸（NAM）及びN-アセチルグルコサミン（NAG）の間のβ結合を加水分解する。これは、内部細胞膜を露出させ、例えば、界面活性剤によるさらなる破壊に対して、内部細胞膜を脆弱な状態とする。従って、リゾチームの添加は、細菌細胞を溶解する穏やかな方法に相当し、より大きなプラスミドの機械

的破壊が生じる可能性をより少なくする。

【0036】

本明細書の実施例中に教示されているとおり、最終的なプロセスの収率に対するリゾチーム添加の効果は、容易に決定される。目的の高次コイルプラスミドDNAをその中で増幅するために選択された微生物の、好ましくは細菌の宿主細胞に応じて、当業者は、リゾチーム添加が前記プラスミドの精製をさらに補助する（例えば、精製されたプラスミドDNAの収率を最終的に最大化する。）かどうかを経験的に決定することが可能である。本発明の一実施形態において、E. コリ細胞を用いた本明細書の実施例中に例示されているように、目的の高次コイルプラスミドDNAを含む宿主微生物細胞は、リゾチームの存在下で、標準的なSTET緩衝液（例えば、50mMのTris-HCl、100mMのEDTA、2% v/vのTriton^(R)-X-100、8% w/vのスクロース、pH 8.2）中で溶解される。本明細書に開示されている全ての塩基性緩衝液再懸濁の処方に対して改変を行い得ること、及び、本発明での使用に適していることが、当業者に自明である。従って、本発明のプロセスの結果に対して実質的に影響を与えず又は変化させない全ての塩基性緩衝液の処方が、本明細書に記載されているプロセスの範囲に属するものとされる。しかしながら、特に、下流のCTABをベースとした沈殿が想定されている場合、本発明の溶解工程は、Mg⁺⁺及びCa⁺⁺などの二価陽イオンを効果的に除去するキレート物質（例えば、EDTA）、非イオン性界面活性剤（例えば、Triton^(R)）をベースとする界面活性剤）並びにスクロースを含む生理的に許容される緩衝液の存在下で実施する。EDTAは、EDTAによって会合されなければDNAseを活性化させる二価の金属イオンを会合させることにより、DNAse活性を阻害する。二価の金属イオンはプラスミドのCTABとの錯化を妨げるので、EDTAは、CTABをベースとした下流沈殿工程において好ましい役割を果たし続ける。さらに、プラスミドDNAを沈殿させるCTABの濃度範囲は、Triton^(R)及びDNA濃度の両方に依存する（例えば、米国特許出願09/875,379号参照、上記。）。緩衝液のpH範囲は、特定の微生物株に対して決定された最良の結果に従って調整し得るが、好ましいpH範囲は約7.0 - 9.0の間であり、約8.0 - 8.5のpH範囲が最適である。

【0037】

本発明の別の実施形態において、完全な細胞溶解は、PCT国際出願PCT/US95/09749号（公開番号WO96/02658）及びPCT/US96/07083（WO96/36706）（参照により本明細書に組み込まれる。）中に開示されている熱交換装置に宿主細胞を通過させることを含むことができ、前記細胞は、リゾチームで処理されてもよく、処理されなくてもよいが、好ましくは、熱に曝露する前に、リゾチームで処理される。著しい流体の動的力を生成することが知られている高圧ホモゲナイザーは、高次コイルプラスミドDNAを損傷するリスク及び/又は所望されるプラスミドのサイズと同等のサイズまでゲノムDNAを剪断するリスクのために、本発明の宿主細胞溶解工程に対しては好ましくない。しかしながら、剪断損傷からDNAを保護することが明らかとなっている機械的細胞溶解技術（例えば、2002年12月26日にUS20020197637号として公開された米国特許出願10/158,753号に記載されているような、圧縮剤、核酸を凝集させる小さなポリカチオン、の存在下での溶解）を使用することができる。

【0038】

本発明のさらなる態様には、上述のように、工程（a）で生成された宿主微生物細胞可溶化液を、アルカリpHシフトに供した後に、細胞が最初にその中で溶解された緩衝液によって規定される前記可溶化液の当初pHまで、概ね中和される。従って、本発明の一実施形態において、（a）高次コイルプラスミドDNAを含有する宿主微生物細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、（b）工程（a）の宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフト及びその後の中和に供すること、並びに（c）宿主細胞細片を凝集させることによって、前記pHシフトされた工程（b）の可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。

さらなる実施形態において、前記 pH シフトされた可溶化液は、PEG を用いて、宿主細胞細胞片を凝集させることによって清澄化される。宿主細胞可溶化液のアルカリ pH シフト及びその後の中和は、凝集剤の可溶化液への添加の前に行い得る。あるいは、凝集剤は、初期溶解緩衝液の成分として、宿主細胞可溶化液中に存在し、又はアルカリ pH シフト及び中和工程の前に、溶解が起こった後に添加され得る。本発明の一実施形態において、当初細胞可溶化液の pH は、その中に細胞が最初に懸濁及び溶解される緩衝液（例えば、50 mM の Tris - HCl、100 mM の EDTA、2 % v / v の Triton^(R) - X - 100、8 % w / v のスクロースからなる標準的な STEET 緩衝液、pH 8.2）の結果、概ね約 pH 7.0 と約 pH 9.0 の間、好ましくは約 pH 8.0 と約 pH 8.5 の間にある。アルカリ pH シフトは、可溶性宿主細胞染色体 DNA の完全な変性を可能とする値まで（例えば、概ね、約 pH 12 と約 pH 13 の間）、可溶化液の pH をシフトさせることを含む。時間が経過するにつれて、この上昇された pH に高次コイルプラスミド DNA を曝露させることにより、プラスミドの変性も引き起こされるが、プラスミド DNA のサイズが小さいために、条件が中和されると、容易に再度のアニリングを行う。可溶化液の pH は、プラスミド DNA が急速に変性し、剪断損傷に対して増加した感受性を有する約 pH 13 を超えて上昇されないことが重要である。可溶化液の pH は、5 N の水酸化ナトリウム（「NaOH」）を含む（但し、これに限定されない。）濃縮された塩基溶液の添加によって上昇させることが可能であり、次いで、染色体 DNA を確実に変性させるために、ある一定の長さの時間にわたり（例えば、約 60 分）、pH シフトされた細胞可溶化液を上昇された pH に保つ。次いで、細胞可溶化液の pH は、濃縮された酸溶液（濃縮された酢酸溶液（例えば、約 1.7 と 2.5 の間の規定度を有する酢酸）を含むが、これに限定されない。）の添加によって、中和され、宿主細胞がその中で最初に溶解された緩衝液の pH まで、概ね可溶化液の pH を減少させる。

10

20

30

40

50

【0039】

理論に拘泥するものではないが、本明細書に記載されている pH シフトは、Birnbom と Doly によって最初に記載された古典的なアルカリ溶解技術（1979、Nucleic Acid Res. 7: 1513 - 1523）に、大まかに比較し得る。Birnbom と Doly のアルカリ溶解法は、変性により、宿主細胞のゲノム DNA とタンパク質を同時に除去できること、及び、次いで、変性された材料を選択的に沈殿させることで周知である。伝統的なアルカリ溶解操作は、グルコース又はフルクトースを加えた Tris 緩衝液を含む細胞再懸濁溶液を使用し、この懸濁液には、高塩基溶液及びドデシル硫酸ナトリウム（「SDS」）界面活性剤が細胞溶解のために添加される。高塩基は、高分子量染色体 DNA を選択的且つ完全に変性させる。次いで、pH 5.5 の（酢酸を加えた）3 M 酢酸カリウムの添加によって可溶化液が中和されると染色体 DNA は沈殿するが、プラスミド DNA は上清中に保持される。しかしながら、重要なことには、大きなプロセス容量、複数のプロセス容器が必要であること、高 pH 及び酢酸ナトリウムの高レベルでの DNA の剪断感受性が報告されていることなど（これらに限定されない。）、プラスミド DNA の大規模な精製のためにこの伝統的なアルカリ溶解方法の使用に付随する大きな欠点が存在する（Chamsart, S. et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 75: 387 - 392 参照）。上記説明のとおり、本発明の本実施形態の塩基性 pH シフトは、当初微生物細胞可溶化液中に存在する染色体 DNA 又はゲノム DNA を変性させるためにも重要である。高次コイルプラスミド DNA に対する高 pH（例えば、pH 12）の影響を調べた本明細書に記載されている実験は（実施例 7 に記載されている。下記。）、高い羽根車先端速度で、1 時間超にわたり、pH 12 に曝露されたときに、高次コイルプラスミド DNA に対する損傷が存在しないことを示している。本明細書に記載されているアルカリ pH シフト及びその後の中和工程が宿主ゲノム DNA の一部を溶液から除去するのに対して、完全な排除は達成されず、続いて行われる凝集操作が必要となる。従って、本発明の塩基性 pH シフト工程及びその後の中和工程は、凝集操作のための宿主細胞可溶化液を調製するために実施されるのであって、細胞を溶解させ、又は可溶化液それ自体を清澄化させるために行われるのではない。従って、特定の

理論に拘泥するものではないが、本発明のpHシフトは、細胞細片のその後の凝集のために重要な調製工程であることが明らかとなっている（さらに以下に記載されている。実施例1参照。）。

【0040】

同じく、本発明の一実施形態は、(a)高次コイルプラスミドDNAを含有する宿主微生物細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び(b)宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(a)の前記可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。宿主細胞可溶化液が生成された後、並びに、上記アルカリpHシフト及びその後の中和工程の場合により供した後、宿主細胞細片（例えば、不溶性ゲノム宿主細胞DNA、細胞膜、修飾された固体）を除去するために、宿主細胞可溶化液は凝集され、高次コイルプラスミドDNA及び可溶性染色体DNA又はゲノムDNAを含む（これらに限定されない。）成分を含有する清澄化された可溶化液を生成する。本発明の一実施形態において、宿主細胞細片の凝集を達成する凝集剤が、当初溶解緩衝液の成分である。あるいは、前記凝集剤は、溶解が起こった後に、宿主細胞可溶化液に添加することが可能である。本明細書に開示されている方法による細胞可溶化液の凝集は、前記微生物細胞可溶化液の分離可能性を大幅に増大させる。低カット界面活性剤沈殿工程（例えば、CTAB）は、可溶性タンパク質のレベルをさらに減少させるために、凝集後に実施することが可能である。細胞細片は、凝集後に溶液から沈降することができ（例えば、沈降/デカント）、又は、連続的遠心を含む（但し、これに限定されない。）遠心（例えば、15,000×g、15分）を介して、容易に除去することが可能である。可溶化液から残留固体を除去するために、遠心に加えて、仕上げる過（例えば、セルロース又は珪藻土をベースとしたデプスフィルターを使用）も使用することが可能である。凝集された細胞細片が除去された後、可溶化液上清中に残存する高次コイルプラスミドDNAは、次いで、当業者に公知の精製プロセス（例えば、米国特許出願09/875,379号、上記）を包含する下流精製プロセス及び/又は本発明の一部として開示された新規下流工程によって、他の夾雑物からさらに精製除去される。

【0041】

宿主細胞細片の凝集とは、細胞粒子の凝集、すなわち細胞細片凝集塊の形成を表す。「凝集剤」又は「凝集因子」とは、粒子状懸濁液を清澄化するために使用される物質（例えば、ポリマー）であり、前記物質は、懸濁液に添加されたときに、凝集塊の形成を誘導する。凝集された物質（不溶性の粒子状物質に相当する。）は、通常、重力下で沈降する。しかしながら、本明細書に記載されている細胞細片浮遊塊を含む巨大な不溶性浮遊塊（すなわち、凝集の結果として形成される凝集された物質）は、低速遠心又は単純なる過方法によって、溶液から容易に分離することが可能である。表面電荷、凝集されるべき物質の化学的及び物理的特徴、凝集剤の吸着速度及び濃度、粒子衝突速度及び濃度並びに懸濁液の混合条件を含む（これらに限定されない。）多くの異なる因子が、凝集の程度に影響を与え得る。凝集は、添加された凝集剤の電荷（「電荷中和」）又はその分子量（「架橋凝集」）の何れかの結果として起こると考えられる（Cumming, R. H. et al., 1996, Bioseparation 6: 17-23参照）。電荷中和を介した凝集は、凝集されるべき物質の電荷とは反対の電荷を有する凝集剤間の接着によって起こり、表面電荷の全体的な中和又は電荷の局所的な反転を引き起こし、効果的な粒子の衝突と増加された浮遊塊の成長を可能とする。電荷中和機序を介した凝集の効率性は、凝集剤の分子量又はそのポリマー化の程度に依存しない。これと比べて、架橋凝集による細胞物質の凝集は、帯電した凝集剤又は非イオン性凝集剤とともに起こり得、凝集剤の分子量及び/又はポリマー化の程度に一層依存する。架橋凝集は、通常、コロイド状粒子の分散液に高分子量ポリマーを添加することによって達成される。凝集剤は、ループ及び尾部高次構造で粒子の2以上の表面に吸着することにより、これらを一緒に連結する。

【0042】

本明細書に記載されている宿主細胞細片を凝集させるために、帯電した（例えば、陰イ

オン性又は陽イオン性)又は帯電していない、合成(例えば、ポリエチレングリコール)又は天然に存在する(例えば、キトサン)ポリマーなど(但し、これらに限定されていない。)、多数の異なる凝集剤を使用することが可能である。従って、本発明の一実施形態において、上述のように作製された宿主細胞可溶化液中で細胞細片凝集を引き起こすために、ポリマー凝集剤が使用される。本プロセスにおける細胞細片の凝集塊形成に影響を与えるために凝集剤の種類を選択する場合には、凝集され、その後廃棄されることが予定されている物質の特徴及び留保される(すなわち、精製される)ことが予定されている物質の特徴をともに検討することが重要である。プラスミドDNA精製体制において、検討すべき重要事項は、DNAが負に帯電した生体分子であるので、細菌の細胞細片を凝集することが最も一般的に知られている凝集剤である正に帯電した凝集剤は望ましくないということである。正に帯電した凝集剤は、精製されることが予定されたプラスミドDNAとともに細胞細片を凝集させる。従って、本明細書に記載されている凝集工程を実施するために、負に帯電したポリマーを選択することが好ましく、より好ましくは帯電していないポリマーが選択される。この目的のために、ポリエチレングリコール(「PEG」)は、プラスミドを含有する可溶化液に対する費用対効果が優れた無毒の凝集剤であることが本明細書に示されている。PEGは、400から15,000超までの分子量ポリマーの範囲を作製する反復単位($-O-CH_2-CH_2-$)から構成される非イオン性ポリマーである(例えば、最大400,000の分子量を有するPEGポリマーが市販されている。)。PEGは、殆どの有機溶媒と適合性があり、優れた水溶解性を有する。PEGは、さらに、多くの市販薬及び軟膏中の成分であるので、証明された安全性特性を有している。本明細書の実施例に示されているように、PEGは、微生物可溶化溶液から宿主細胞細片の凝集を誘導するが、PEGによって誘導されるこの凝集の正確な機序は明確でない。PEGは、細胞細片がポリマーと直接相互作用する伝統的な架橋凝集機序を介して作用して、ポリマー表面上に吸着することが可能である。あるいは、PEGは、可溶化液の特定されていない成分を溶液から排除することができ、この排除された物質は、次いで、宿主細胞細片を凝集させるように作用する。従って、本明細書において、PEGは、微生物宿主細胞細片の凝集剤として特定されており、ここで、「凝集剤」は、直接又は間接的な機序を介して、宿主細胞細片の凝集を誘導する物質として定義される。

【0043】

十分なPEG濃度はDNAを沈殿させることが可能であることがLisとSchleif(1975;上記)によって示されており、従って、本明細書に記載されている方法において凝集剤としてPEGが選択されるのであれば、使用されるPEGの濃度は、本発明の凝集工程の間にプラスミドDNA沈殿の可能性を最小限に抑えることが重要である。上述のように、PEGは非イオン性ポリマーであるので、凝集の程度は、ポリマーの分子量及びポリマー化の程度の両方に依存する可能性がある。当業者であれば、精製されるべきプラスミドDNAのサイズ及びプラスミドDNA増幅のために使用される具体的な宿主細胞など、様々な要因に留意しながら、宿主細胞細片の最も効率的な凝集を達成するために、PEGの最も適切な濃度及び分子量を経験的に決定することが可能である。本明細書において使用される、特定の宿主細胞可溶化液を凝集するために使用されるPEGポリマーの最も適切な濃度及び分子量は、前記可溶化液の最も効率的な凝集(すなわち、プラスミドDNA沈殿の最小量と組み合される、凝集された細胞細片の最大量を達成する。)をもたらすものを表す。例えば、高濃度の低分子量PEGを使用する場合と同様、高分子量PEGを用いることにより、低濃度の比較的効率的な凝集が達成され得る。従って、PEGポリマー濃度と分子量の間に密接な相互作用が存在すること、従って、凝集目的のために、本明細書に開示されている全ての具体的なPEG濃度及びPEG分子量は指針と考えるべきであり、総じて、本発明に対する限定ではないことを理解すべきである。

【0044】

実施例1において、細菌細胞細片の沈降に対するPEG凝集の効果を一般的に特徴付けるために、最初に、スクリーニング研究を実施した。PEGは、特に、E.コリ細胞可溶化液の塩基/酸処理後(例えば、約pH8.5から約12.5までのpHシフト、次いで

10

20

30

40

50

、約 pH 8.5 まで戻る。)において、E. コリ細胞細片の高度に効率的な凝集剤であることが決定された。目的のプラスミド DNA を含有する E. コリ発酵から得られる細菌細胞可溶化液は、(1) STEET 緩衝液(上記)中に細胞を再懸濁し、及び 20 でリゾチームとともに温置すること、(2) STEET 緩衝液中に細胞を再懸濁し、20 でリゾチームとともに温置し、次いで、可溶化液を塩基/酸処理に供すること、並びに(4) 3% PEG 3000 を含有する STEET 緩衝液中に細胞を再懸濁し、20 でリゾチームとともに温置し、可溶化液を塩基/酸処理に供すること、という(図 1 に示されているような)4 つの異なる方法によって作製された。図 1 からの結果は、重力のみにより、2 日間にわたって物質を沈降させた後の、pH シフトされ、PEG 処理された可溶化液(可溶化液 # 4)中の細胞細片の高度に効率的な凝集を示している。図 1 に示されている可溶化液及びその変形は、観察された PEG 誘導性凝集を特徴付けるためにさらに検査された(図 2 参照)。前記可溶化液の一定分量を 15 分間温置し、次いで遠心した。濁度測定(図 3)は、塩基/酸処理に供された可溶化液に添加された場合の、凝集剤としての PEG の作用を示しており、対照可溶化液(可溶化液 # 2)の 730 NTU に比べて、5% PEG 3000 で凝集した後には(可溶化液 # 6)、16 NTU の溶液濁度であることを示している。プラスミド DNA 含有懸濁液から凝集された物質を分離するための清澄化戦略として、連続的な遠心を使用することが可能であり、清澄化された可溶化液を調製するための仕上げる過を用いずに、20 NTU 未満の清澄度が達成されることを、これらの結果は示している。実施例 1 は、さらに、細菌細胞細片の凝集に対する PEG 濃度及び分子量の効果を示しており、宿主細胞細片の最も効率的な凝集を達成するための戦略を設計する場合に、当業者が、どのようにして、適切な PEG 濃度及び分子量を特定できるかについて記載している。プラスミド DNA を含有する宿主細菌細胞からの細胞細片の凝集に対する PEG 濃度及び分子量の効果は、細胞細片の沈降性能に基づく迅速なスクリーニング法を用いて調べた。まず、プラスミド DNA を含有する E. コリ細胞をリゾチームの存在下で溶解し、上述のように、塩基/酸処理に供した。様々な PEG 原溶液(PEG 400 - 6000)を、可溶化液の 10 mL 分取試料中に混合して、約 1% と 15% (w/v) の間の PEG 濃度を得る。次いで、混合物を、約 16 時間、室温で沈降させた。沈降された固体の容積及び上清の濁度(OD₆₀₀)を測定した(図 4 A 参照)。さらに、PEG 3000 を凝集剤として用いて、DNA 濃度(AEX アッセイによって測定)及び上清の濁度を調べた(図 4 B)。これらの結果は、例えば、細胞細片は凝集するが、DNA は沈殿しない PEG 3000 濃度範囲が存在することを示している(図 4 B 参照)。約 0% と 10% (w/v) の間の濃度範囲にわたって、類似のプラスミド DNA 沈殿曲線も PEG 6000 に対して作製した(図 5 参照)。

【0045】

従って、本発明の一実施形態において、高次コイルプラスミド DNA は、(a) 高次コイルプラスミド DNA を含有する宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、及び(b) ポリマー(ポリエチレングリコール(「PEG」)を含むが、これに限定されない。)で宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(a)の前記可溶化液を清澄化すること、を含む方法によって、大規模な微生物発酵から精製される。工程(a)の宿主細胞は、生理的緩衝液(例えば、上述のような標準的 STEET 緩衝液)中、リゾチームの存在下又は不存在下で、好ましくはリゾチームの存在下で溶解することが可能である。あるいは、採集された宿主細胞は、PCT 国際出願 PCT/US 95/09749 (上記)及び PCT/US 96/07083 (上記)中に開示されているような熱交換装置への通過を介して溶解することが可能である。ポリマー(PEG を含むが、これに限定されない。)による工程(b)の宿主細胞細片の凝集は、細胞細片の最大量が浮遊塊へと凝集されるように行われ、前記浮遊塊は沈殿されたプラスミド DNA の最小量を含有する。本発明の一実施形態において、宿主細胞細片は、PEG、好ましくは約 1000 超、より好ましくは約 1450 と約 15,000 の間の分子量の PEG、最も好ましくは PEG 600 の添加によって、約 2% と約 5% (w/v) の間、より好ましくは約 3% と約 4% (w/v) の間、最も好ましくは、約 3.7% (w/v) の最終濃度まで、凝集される。

【 0 0 4 6 】

本発明のさらなる実施形態において、宿主細胞細片の凝集の前に、特に、記載されている可溶化液清澄化プロセスのための凝集剤として P E G が選択される場合、宿主細胞可溶化液は、本明細書に記載されているように、アルカリ p H シフト及びその後の中和工程へと供される。従って、前記実施形態は、(a) 高次コイルプラスミド D N A を含有する宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、(b) 工程 (a) の宿主細胞可溶化液をアルカリ p H シフト及びその後の中和に供すること、並びに (c) ポリマー (ポリエチレングリコールを含むが、これに限定されない。) で宿主細胞細片を凝集させることによって、工程 (b) の前記 p H シフトされた可溶化液を清澄化することを含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド D N A を精製する方法を含む。本発明の一実施形態において、当初細胞可溶化液の p H は、その中に宿主細胞が最初に懸濁及び溶解される緩衝液 (例えば、5 0 m M の T r i s - H C l 、 1 0 0 m M の E D T A 、 2 % v / v の T r i t o n ^(R) - X - 1 0 0 、 8 % w / v のスクロースからなる標準的な S T E T 緩衝液、p H 8 . 2) の結果、概ね約 p H 7 と約 p H 9 の間、好ましくは約 p H 8 . 0 と p H 8 . 5 の間にある。次いで、細胞可溶化液の p H は、可溶性染色体 D N A の完全な変性を可能とする値まで (例えば、概ね、約 p H 1 2 と約 p H 1 3 の間) までシフトされる。上述のように、p H は、5 N の N a O H などの (但し、これに限定されない。) 濃縮された塩基溶液の添加によって上昇させることが可能であり、次いで、染色体 D N A を確実に変性させるために、ある一定の長さの時間にわたり (例えば、6 0 分) 、p H シフトされた細胞可溶化液を上昇された p H に保つ。しかしながら、p H は、プラスミド D N A が急速に変性し、剪断損傷に対して増加した感受性を示すような程度まで (すなわち、約 p H 1 3 超) 上昇されないことが重要である。次いで、細胞可溶化液の p H は、濃縮された酸溶液 ((例えば、約 1 . 7 と 2 . 5 の間の規定度を有する) 濃縮された酢酸溶液を含むが、これに限定されない。) の添加によって、中和され、宿主細胞がその中で最初に溶解された緩衝液の p H まで、概ね可溶化液の p H を減少させる。従って、本発明の一実施形態は、(a) 生理的緩衝溶液中で、高次コイルプラスミド D N A を含有する宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、(b) 前記可溶化液の p H を約 p H 1 2 と約 p H 1 3 の間の p H まで上昇させることにより、工程 (a) の宿主細胞可溶化液をアルカリ p H シフトに供すること、(c) アルカリシフトされた工程 (b) の細胞可溶化液を、概ね、宿主細胞がその中に溶解された当初の生理的緩衝液の p H まで、好ましくは約 p H 7 と約 p H 9 の間の p H まで、より好ましくは約 p H 8 . 0 と p H 8 . 5 の間の p H まで中和すること、並びに (d) ポリマー (ポリエチレングリコール (「 P E G 」) を含むが、これに限定されない。) で宿主細胞細片を凝集させることによって、前記 p H シフトされ、中和された細胞可溶化液を清澄化すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド D N A を精製する方法に関する。細胞がその中で溶解される生理的緩衝液 (例えば、本明細書に記載されているような標準的 S T E T 緩衝液は、リゾチームを含有してもよく、又は含有しなくてもよい。これに代えて、アルカリ p H シフト及びその後の中和工程は、P E G を細胞可溶化液に添加した後に行うことが可能である。例えば、P E G は、宿主細胞細片を凝集させるために経験的に決定された濃度で、当初の溶解緩衝液中に存在することができ、ここにおいて、前記 P E G 含有細胞可溶化液は、次いで、前記細胞細片の効率的凝集を達成するために、本明細書に記載されているアルカリ p H シフト / 中和工程に供される (実施例 1 参照) 。本発明は、さらに、(a) 生理的緩衝溶液中で、高次コイルプラスミド D N A を含有する宿主細胞を溶解し、宿主細胞可溶化液を形成すること、(b) 前記可溶化液の p H を約 p H 1 2 と約 p H 1 3 の間の p H まで上昇させることにより、工程 (a) の宿主細胞可溶化液をアルカリ p H シフトに供すること、(c) アルカリシフトされた工程 (b) の細胞可溶化液を、概ね、工程 (a) の宿主細胞可溶化液の p H まで中和すること、(d) P E G 6 0 0 0 の前記可溶化液への添加で宿主細胞細片を凝集させることによって、工程 (c) の細胞可溶化液を清澄化すること、及び (e) 工程 (d) の前記凝集された宿主細胞細片を遠心し、高次コイルプラスミド D N A を含有する上清を取得すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化

10

20

30

40

50

液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本発明の本部分の一実施形態において、工程(a)の生理的溶解緩衝液は、リゾチームを含有し、及び約pH7と約pH9の間のpH、好ましくは約pH8と約pH8.5の間のpHを有する標準的なSET緩衝液である。別の実施形態において、濃縮されたPEG6000溶液は、約3.7% (w/v)の濃度になるように、前記可溶化液に添加される。本発明の本部分のさらなる実施形態において、PEG凝集剤は、連続的な遠心条件下で、アルカリシフトされ、中和された宿主細胞可溶化液へ、工程(d)において供給され、上清中に残存するプラスミドDNAを有する凝集された細胞細片の沈殿物を取得する。

【0047】

本発明の一実施形態において、高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞は、リゾチームの存在下又は不存在下で、好ましくはリゾチームの存在下で、生理的緩衝液中において温置され、塩基性pHシフト及びその後の中和工程(上述のとおり)に供される。これは、高次コイルプラスミドDNAを上清中に保持しながら、細胞細片(例えば、不溶性の、ゲノム又は染色体宿主細胞DNA、細胞膜及び修飾された固体)を凝集することによって清澄化するために前記微生物細胞可溶化液をさらに調製する新規溶解手法に相当する。この溶解手法は、Lee及びSagarに付与された米国特許第6,197,553号に記載されており、リゾチーム溶解後に急速な加熱及び冷却を含む大規模なプラスミドDNAの精製のための以前に開示された溶解プロセスの濃縮を2回行うことが可能である。従って、本発明の新規溶解/可溶化液清澄化プロセスは、プロセス容積の大幅な減少を可能とする。さらに、本明細書に記載されている新規溶解プロセスは、より以前に開示された溶解技術に比べて、より単純な手法である。例えば、米国特許第6,197,533号の熱溶解手法に必要とされる2つの巨大なタンクと比べて、1つのタンク中で実施できるので、大幅な資本コストが節約され、複雑な直列の熱交換機ではなく、成分の混合と添加のみを必要とする。さらに、本発明の新規溶解及び凝集手法は、凝集された細胞細片の沈降及びプラスミドDNA含有上清のデカント及び遠心など(これらに限定されない。)、細胞細片が容易に除去されるフィードを生成する。プラスミドDNA含有上清が形成されるにつれて、これを連続的に除去するバッチ又は連続的遠心の何れも使用することが可能である。(宿主細胞細片の凝集を介した)本発明の新規溶解及び可溶化液清澄化技術の後には、(i)陽イオン性界面活性剤(好ましくは、CTAB)を用いた、清澄化された可溶化液からのプラスミドDNAの沈殿、(ii)塩溶液によるプラスミドの溶解、及び(iii)水和されたケイ酸カルシウム上への残留不純物の吸着を含む(但し、これらに限定されない。)下流精製プロセスが続くことが可能である。好ましい下流工程は、PEG又はアルコールの何れかによって誘導された沈殿後の精密ろ過分離による高次コイルプラスミドDNAの濃縮及び仕上げである(下記参照)。従って、本発明の別の実施形態は、本明細書に新規に開示されている新規2工程溶解/可溶化液清澄化プロセス以外のさらなる精製工程に依拠する。本発明の一部として含まれるプロセス工程の組み合わせには、例えば、以下のもの:(i)リゾチームの存在下又は不存在下、好ましくはリゾチームの存在下での細胞溶解、(ii)PEGによって誘導された凝集などの(但し、これに限定されない。)細胞細片の凝集を介した可溶化液清澄化、(iii)CTABなどの界面活性剤を用いたプラスミドDNAの単回又は段階的沈殿、(iv)塩溶液によるプラスミドの選択的溶解、(v)h c C a S i O₃上への単回又は段階的吸着による残留不純物の除去、及び(vi)濃縮された製剤溶液を容易にそこから調製することができる安定なバルク産物を与える、精製されたプラスミドDNAの、PEG又はアルコール(例えば、エタノール性)によって誘導された沈殿が含まれ得る。

【0048】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載されている方法は、細菌細胞、植物細胞、酵母及びバキュロウイルスを含む(但し、これらに限定されない。)微生物細胞(E. コリ)が好ましい微生物宿主である。)からの臨床等級プラスミドDNAの精製を可能とする。従って、E. コリ発酵以外の微生物発酵が本発明における使用に適していることが、当業者に自明である。さらに、本発明の方法は、専ら微生物細胞から臨床等級プラスミ

10

20

30

40

50

ドDNAを精製することに限定されるものではなく、従って、哺乳動物細胞を含む他の細胞種から前記プラスミドDNAを精製することを含み、適切な細胞密度が達成されると推測される。従って、哺乳動物培養系中で、又は微生物発酵から増幅された臨床等級プラスミドDNAの精製が、本発明の一部として想定される。異なる宿主細胞種の特異性に対して調整するために、本発明の細部を改変し、及び最適化することは、当業者の能力の範疇に属する。例えば、選択された宿主細胞に応じて、可溶化液凝集のための準備的工程として、アルカリpHシフト及びその後の中和に、増幅されたプラスミドDNAを含有する当初細胞可溶化液を供することは不要であり得る。リゾチーム温置のみ、及び/又は熱溶解と組み合わせたリゾチーム温置は、凝集し易い細胞可溶化液を効果的に調製するのに十分であり得る。当業者であれば、細菌細胞からの精製について本明細書に詳しく開示されている採集及び溶解/可溶化液清澄化プロセスを、哺乳動物細胞からの精製に容易に適合させることが可能である。例えば、前記当業者は、細菌細胞の溶解を補助するのに有効なリゾチームの添加が、哺乳動物細胞の溶解には必要でないことに気付く。代わりに、本明細書に記載されているアルカリpHシフトは、完全な哺乳動物細胞の溶解をもたらし得る。同様に、酵母細胞からのプラスミドDNAの精製は、リゾチームを酵母溶解酵素（例えば、リトカーゼ）に置換することによって有利となる可能性があるが、本明細書に開示されているアルカリpHシフトが好ましく、酵母溶解酵素は不要であり得る。従って、当業者は、本明細書の開示及び詳細な実施例を用いて、本発明の一部として記載されている方法を容易に改変することが可能であり、プラスミドDNAを増幅するために選択された宿主細胞がどのような種類であれ、これを適用できる。従って、本願は、大規模な「微生物発酵」からのプラスミドDNAの精製に焦点を絞って書かれているが、この用語は、本発明を微生物発酵に限定するものではない。従って、本明細書を通じて、「微生物発酵」という用語は、宿主細胞増殖又は増幅プロセスのあらゆる種類に対するものとして読み替えることができる。

10

20

30

40

50

【0049】

本明細書に開示されている方法によって単離及び精製されるべきプラスミドは、実質的にあらゆるサイズのあらゆる染色体外DNA分子（例えば、高コピー数又は低コピー数/細胞）であり得る。従って、宿主細胞（好ましくは、微生物宿主細胞）中で増幅できる実質的にあらゆるプラスミドを、本発明の方法によって単離することができることが当業者に自明である。本明細書に記載されている方法によって精製された臨床等級プラスミドDNAは、ワクチンとして又は遺伝子治療ビヒクルとして、ヒトに投与するのに極めて有用である。

【0050】

詳しく上述されているように、（微生物細胞細片の凝集を介した）本発明の新規溶解/可溶化液清澄化プロセスについて提案されている使用は、例えば、ポリヌクレオチドワクチン又は遺伝子治療ベクターとして使用するための大規模微生物発酵から臨床等級プラスミドDNAを精製することである。さらに、本発明は、本明細書に記載されている新規溶解/可溶化液清澄化プロセスを含む、高次コイルプラスミドDNAを含有する清澄化された宿主細胞可溶化液を生成する方法に関する。重要なことには、本明細書に記載されている新規溶解/可溶化液清澄化技術は、タンパク質、モノクローナル抗体、融合タンパク質、ゲノムDNA、RNA、脂質及び多糖など（但し、これらに限定されない。）、あらゆる組換え生物分子の微生物宿主からの精製に拡張することが可能である。従って、（i）宿主細胞可溶化液の生成、（ii）場合によって行われる、塩基性pHシフト及びその後の中和工程、並びに（iii）宿主細胞細片の凝集による前記細胞可溶化液の清澄化を包含する、本明細書に記載されている溶解/可溶化液清澄化プロセスは、例えば、E. コリ、他の細菌宿主、他の微生物宿主（例えば、酵母）又は哺乳動物細胞を用いた、あらゆる組換え生物分子の産生に拡張され得る。特定の宿主細胞種及び精製されるべき特定の生成物生物分子の両方の特異性に対して調整するために、（凝集を介した）本発明の溶解/可溶化液清澄化プロセスを改変することは、当業者の能力の範疇に属する。例えば、プラスミドDNA以外の生物分子の精製のために本発明に開示されているものに関連する効率的

及び効果的な溶解 / 可溶化液清澄化プロセスを設計する場合、最大の pH 安定性に加えて、本明細書に記載されているアルカリ pH シフト / 中和工程の間に上昇した pH 条件に曝露される時間を考慮する必要がある。アルカリ pH シフトを含む本明細書に記載されている上流精製工程は、上昇した pH への短期間の曝露に対して、精製されるべき生物分子が耐えることができる限り、及びポリエチレングリコールの低レベルによって沈殿されない限り、魅力的な精製工程である。さらに、DNA が夾雑物であると考えられるプロセス（例えば、タンパク質精製プロセス）において、PEG 濃度は、凝集された細胞細片とともに DNA を沈殿させるために PEG 濃度を上昇させることが可能である。

【0051】

本発明の大規模な微生物発酵は、選択された微生物細胞の増殖にとって適切であるいずれかの液体培地中で培養され得る。同じく、本発明は、哺乳動物細胞の増殖に適した全ての培地を使用することが可能である大規模な哺乳動物細胞培養からプラスミド DNA を精製する方法を提供するために容易に適合させることが可能である。開示されている方法は、より小さな発酵又は培養容量に対して適用可能であるが、本発明の特に有用な態様は、大規模な細胞発酵又は培養への拡張可能性である。本明細書において使用される「大規模」という用語は、約 5 リットルを超える総細胞発酵容量又は約 5 リットルを超える発酵容量から採集された細胞であると考えられる。本発明の大規模な発酵法は、約 300 ~ 2000 リットルの発酵に相当する（但し、これらに限定されない。）臨床サイズロットに適用可能である。本発明の一部として記載されている上流精製プロセスの場合、目的の高次コイルプラスミド DNA を含有する宿主細胞は、まず、細胞ペースト又はスラリーを提供するために、培地から採集される。採集工程の最終目標は、精製において使用するための細胞を濃縮及び洗浄することである。遠心又は精密ろ過など（但し、これらに限定されない。）液体培地から細胞を採集する全ての慣用的手段が適切である。例えば、採集工程は、(i) 500 kDa の見かけの分子量の A/G T e c h 膜を横切る接線流ろ過を用いて細胞を濃縮すること、及び (i i) 滅菌された生理的食塩水を用いて、濃縮された細胞を透析ろ過することを含むろ過プロセスからなり得る。このようなろ過プロセス中の重要なパラメータには、膜間圧力、入口圧力、クロスフロー速度、濃度因子及び流量が含まれる。さらに、細胞は、連続的遠心を用いて採集され得る。細菌細胞に対する採集手法の詳細な記載については、以下の実施例の部 9 を参照されたい。

【0052】

本発明は、さらに、大規模発酵体制から臨床等級プラスミド DNA を単離するための新規下流精製プロセスに関し、粉末化されたプラスミド DNA 産物をもたらす最終濃縮 / 仕上げ工程に相当する。プラスミド DNA 精製体制に関する場合のように、本明細書において使用される下流精製プロセスとは、上流精製プロセスの結果（例えば、本発明の一部として記載されている上流精製プロセスの凝集工程後）、当初の宿主細胞可溶化液が清澄化された後に起こる精製プロセスを表す。目的のプラスミド DNA は、前記上流精製プロセス後に、清澄化された可溶化液中に残存する。本発明の最終濃縮 / 仕上げ工程は、上流プロセス及び先行する下流プロセスの両方の結果として、高次コイルプラスミド DNA が濃縮された細胞可溶化液から残留不純物を除去するために使用される下流精製技術を表す。前記残留不純物には、宿主細胞ゲノム DNA、先行する精製プロセス後に残存する細胞タンパク質又は先行する精製工程の結果として存在するプロセス成分（例えば、プラスミド DNA を選択的に沈殿させるために使用される界面活性剤）が含まれ得る。本発明の一部として記載される新規下流精製工程は、高次コイルプラスミド DNA を濃縮し、及びより実行可能な緩衝液容量中への再懸濁を可能としながら、残留不純物から最終的に高次コイルプラスミド DNA を精製するためのより初期の工程のあらゆる様々な組み合わせとともに使用され得る。従って、本明細書に記載及び例示されているように、本発明の新規下流精製工程は、米国特許出願 09 / 875, 379 号（上記）に開示されている精製方法及び本発明の一部として開示された新規上流精製プロセスを含む（但し、これに限定されない。）さらなる精製プロセスを伴う。臨床等級プラスミド DNA の回収をもたらす拡張可能な総合的精製プロセスを設計する場合に、最終濃縮 / 仕上げ精製技術に相当する、本明

10

20

30

40

50

細書に記載されている新規下流精製工程を含めることは、本発明の範囲に属する。プラスミドDNA及び必要とされるプラスミドDNAの品質の特定のロットに対して必要とされる精製スキームを適切に改変することは、当業者の裁量に属する。

【0053】

従って、本発明の一実施形態は、下流濃縮／仕上げ工程を包含し、前記下流精製工程は、(a)前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び(b)接線流ろ過モード(「TFF」)下での精密ろ過(「MF」)によって、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮することを含む大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。プラスミドDNA精製体制の最終仕上げ工程の一部としてプラスミドDNAを濃縮するために、限外ろ過(「UF」)ではなく、MFを用いた沈殿を使用することは、数多くの理由のために好ましい。まず、溶液相プラスミドDNAは、工場生産量を精製するために限外ろ過法を大規模化した場合に、剪断損傷を受け易い。さらに、溶液粘度は、精密ろ過条件下で低下するので、増加した濃度でより管理可能であり、及びフィルター面積を減少させる物質を与える。これにより、透析ろ過緩衝液に対して必要な容量を大幅に低下させることもできる。上記(a)において沈殿させるべき高次コイルプラスミドDNAは、先行する上流及び下流プロセスの結果として、細胞可溶化液が濃縮されており、従って、本発明の濃縮／仕上げ精製技術は、全プラスミド精製体制における最後のプロセスの1つとなっている。例えば、本発明の一実施形態において、高次コイルプラスミドDNAは、以下の工程：(i)リゾチームの存在下又は不存在下での、好ましくはリゾチームの存在下での細胞溶解、(ii)本明細書に記載されているポリマー(例えば、PEG)による細胞細片の凝集など(但し、これに限定されない。)(iii)可溶化液の清澄化、(iv)陽イオン性界面活性剤(例えば、CTAB)など、界面活性剤による、プラスミドDNAの単回又は段階的沈殿、(v)塩溶液を用いた、プラスミドDNAの選択的溶解、(vi)HClCaSiO₃上への単回又は段階的な吸着による残留不純物の除去、及び(vii)接線流ろ過モード下での前記沈殿されたプラスミドの沈殿及び精密ろ過を介したプラスミドDNAの濃縮を含む(但し、これらに限定されない。)(viii)プロセスによって、大規模微生物発酵の細胞可溶化液から精製される。このリストのうち、本発明の最終濃縮／仕上げ工程は、単位操作(vii)に相当する。上に列記されているさらなる精製プロセスは、当業者に公知であるか、又は、例えば、本願及び/又は米国特許出願09/875,379号(上記)(参照により、本明細書に組み込まれる。)(ix)中に詳しく記載されている。

【0054】

本発明の最終下流濃縮／仕上げ精製工程を実行する前に、先行する上流及び下流精製プロセスの結果、高次コイルプラスミドDNAは宿主細胞可溶化液中に濃縮されている。例えば、本発明の前記最終濃縮／仕上げ精製工程は、米国特許出願09/875,379号(上記)に例示されている複数プロセスのプラスミドDNA精製方式内に組み込むことが可能であり、粉末化された形態の臨床等級プラスミドDNAの大量をもたらし、これは、所望であれば、選択した液体製剤中に再懸濁することが可能である。一例として、(例えば、本発明の一部として記載されている新規上流精製プロセスを含む(但し、これらに限定されない。)(x)上流精製プロセスによって)微生物宿主細胞可溶化液の清澄化後、前記清澄化された可溶化液からプラスミドDNAを沈殿させるために、陽イオン性界面活性剤(例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド又はクロリド(CTAB))を使用し得る。プラスミドDNAの選択的沈殿のためにはCTABが好ましいが、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド又はクロリド(TTA)、アルキルトリメチルアンモニウムクロリド、アルキルアールトリメチルアンモニウムクロリド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド又はクロリド、ドデシルジメチル-2-フェノキシエチルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルアミン：クロリド又はブロミド塩、ドデシルアミン又はクロリド塩及びセチルジメチルエチルアンモニウムブロミド又はクロリドを含む(但し、これらに限定されない。)(xi)その他のモノアルキルトリメチルアミノ塩を使用し得る。さらに、プラスミドDNAを選択的に沈殿させるために、モノアルキルジメチルベンジルアンモニウム塩

(例には、アルキルジメチルベンジルアンモニウムクロリド及びベンゾエトニウムクロリド(BTC)が含まれる。)、ジアルキルジメチルアンモニウム塩(市販の製品には、ドミフェンブロミド(DB)、ジデシルジメチルアンモニウムハロゲン化物及びオクチルドデシルジメチルアンモニウムクロリド又はブロミドが含まれる。)、ヘテロ芳香族アンモニウム塩(市販の製品には、セチルピリジニウムハロゲン化物(CPC又は臭化物塩及びヘキサデシルピリジニウムブロミド又はクロリド)が含まれる。)、シス異性体1-[3-クロロアリル]-3,5,7-トリアザ-1-アゾニアアダマンタン、アルキル-イソキノリニウムブロミド、及びアルキルジメチルナフチルメチルアンモニウムクロリド(BTCH110)、多置換された四級アンモニウム塩(市販の製品には、アルキルジメチルベンジルアンモニウムサッカリナート及びアルキルジメチルエチルベンジルアンモニウムシクロヘキシルスルファマート)、ビス四級アンモニウム塩(製品例には、1,10-ビス(2-メチル-4-アミノキノリニウムクロリド)-デカン、1,6-ビス[1-メチル-3-(2,2,6-トリメチルシクロヘキシル)-プロピルジメチルアンモニウムクロリド]ヘキサン又はトリクロロビソニウムクロリドBuckman BrochuresによってCDQと称されるビスクアット(bisquat)並びにポリマー製四級アンモニウム塩(ポリ[オキシエチレン(ジメチルイミノ)エチレン(ジメチルイミノ)エチレンジクロリド]、ポリ[N-3-ジメチルアンモニオ]プロピル]N-[3-エチレンオキシエチレンジメチルアンモニオ]プロピル]尿素ジクロリド及び α -4-[1-トリス(2-ヒドロキシエチル)アンモニウムクロリド]などのポリイオネンを含む。))などの、別の四級アンモニウム化合物を使用することが可能である。

【0055】

単回又は段階的様式の何れかで、凝集され及び/又は清澄化された宿主細胞可溶化液からプラスミドDNAを沈殿させるために、CTABを含む(但し、これに限定されない。))陽イオン性界面活性剤を使用することが可能であり、その例は、米国特許出願09/875,379号(上記)中に開示されている。段階的な沈殿プロセスには、低カット及び高カット沈殿工程が含まれる。細胞細片及び非高次コイルプラスミドDNAを細胞可溶化液から沈殿させるのを助けるために低カット沈殿工程を使用することが可能であり、目的の高次コイルプラスミドDNAは上清中に残存する。本発明の一実施形態において、前記細胞可溶化液は、凝集されるが、凝集された物質を未だ除去しなくてもよく、又は既に清澄化されていてもよい(すなわち、例えば、凝集された物質の遠心を介した後凝集及び可溶化液の清澄)。この低カット沈殿の後には、高カット沈殿工程が続くことが可能であり、これにより、目的の高次コイルプラスミドDNAは、タンパク質、RNA及びエンドトキシンなどの可溶性不純物から沈殿除去される。米国特許出願09/875,379号(上記)に詳述されているように、陽イオン性界面活性剤CTABの段階的添加は、STET緩衝液中の清澄化された可溶化液に2%(w/v)CTAB溶液を供給すること、約0.25%~約0.35%(w/v)のCTAB、より好ましくは、約0.1%から0.2%(w/v)のCTABからCTABによって誘導された第一の沈殿を生成した後、約0.40%~約0.60%からCTABによって誘導された第二の沈殿を生成することを含むことができ、前記範囲は、標準的なSTET溶解緩衝液(例えば、約50mMのTris-HCl、約pH7.0-9.0、約50-100mMのEDTA、約8%のスクロース及び約2%のTriton^(R)-X-100)と同時に使用するのが最良である。様々な緩衝液系の何れかの特性に対して調整するために沈殿範囲を変化させることは当業者の能力の範疇に属する。従って、本発明の一実施形態において、低カット界面活性剤沈殿工程は、凝集後に細胞可溶化液を含有するDNA-プラスミドから残留タンパク質及びエンドトキシンをさらに除去するために使用される(実施例1、下記参照。))。より具体的には、ホットスポットを過を防ぐために、約1時間にわたって、約0.15%の最終濃度まで、40mMのNaCl中の2%(w/v)CTABを細胞可溶化液に添加することが可能である。この低カット界面活性剤沈殿工程が、凝集された可溶化液に対して、前記可溶化液の清澄化前に(すなわち、凝集された細胞細片の除去前に)行われる場合には、前記可溶化液は、続いて、遠心法のみによって、又は仕上げる過工程と組み合わせた遠心法

10

20

30

40

50

によって清澄化することが可能である。本発明のさらなる実施形態において、単回の高カット界面活性剤沈殿工程は、全下流プラスミドDNA精製プロセスにおける第一の工程として（すなわち、可溶化液清澄化後に）使用することが可能である。従って、一実施形態において、約0.40%と約0.60%の間の最終濃度まで、本発明の新規上流精製プロセスによって作成された、凝集された及び/又は清澄化された可溶化液にCTABが添加され、前記範囲は、上記標準的なSTET溶解緩衝液とともに使用すると最良である。同じく、様々な緩衝液系の何れかの特性に対して調整するために前記沈殿範囲を変化させることは当業者の能力の範疇に属する。従って、（例えば、単独で、又は仕上げる過と組み合わせた、沈降/デカント又は遠心方法によって）宿主細胞細片浮遊塊を除去する前又は除去する後に、何れかの残留タンパク質及びエンドトキシン（低カット工程）及び/又は高次コイルプラスミドDNA（高カット工程）が沈殿されるような最終濃度まで、細胞可溶化液に2%（w/v）界面活性剤溶液を供給することによって、陽イオン性界面活性剤（例えば、CTAB）を添加することが可能であり、ここで、両界面活性剤沈殿工程は、プラスミドDNAを不純物からさらに分離させる機能を果たす。（米国特許出願09/875,379号、上記に記載されているような）その後の塩溶解のために、（高次コイルプラスミドDNAを含有する）フィルターケーキ沈殿物を生じさせるために、単回又は段階的な陽イオンベースの界面活性剤工程には、ろ過工程を伴う。（高次コイルされたプラスミドDNAを含む）回収されたフィルターケーキの塩溶解は、最適なイオン強度及び組成の緩衝溶液中で行われる。様々な塩の増分で、溶液中の高次コイルプラスミドの濃度を測定することによって、又は、間接的に、溶液粘度を測定することによって濃度が測定される。

10

20

【0056】

本発明の一部として記載されている新規濃縮/仕上げ工程を介して、そこから高次コイルプラスミドDNAが精製される、プラスミドDNAが濃縮された細胞可溶化液の生成を補助するために使用され得る別の先行する下流精製技術は、合成の水和されたケイ酸カルシウムLRATM（Advanced Minerals Corporation, Lompoc, CA 93438）など、水和され、結晶化されたケイ酸カルシウム（ h c C a S i O_3 ）上に、単回又は段階的な様式で、残存不純物を吸着させることである。米国特許出願09/875,379（上記）中に詳しく記載されているように、微生物宿主細胞可溶化液への h c C a S i O_3 の添加により、高次コイルプラスミドDNAから離れて残留不純物が吸着される。水和されたケイ酸カルシウムは、様々な不純物（界面活性剤（例えば、CTAB、Triton^(R)）、エンドトキシン、ゲノムDNA、プラスミド分解物、タンパク質及びRNAを含むが、これらに限定されない。）に結合する。添加に必要とされる h c C a S i O_3 の正確な量は、（i）存在する不純物の量、（ii）緩衝液の状態（例えば、塩濃度）、（iii）溶液中の総DNAの量、（iv）溶液の容量によって支配され、並びに、おそらくは（v）精製プロセスを通じて使用される塩の温度及び種類を含む他の変数によって支配される。従って、具体的な精製操作中に添加されるべき h c C a S i O_3 の量は変動し得ることが明白である。添加されるべき h c C a S i O_3 の量は、上述の条件に応じて、及び特定の操作に対して利用可能な h c C a S i O_3 のロットに応じて生じ得る差に応じて、最大約200gの h c C a S i O_3 /総DNAのグラムの範囲にある。実施例の部8は、約8から約200グラムの h c C a S i O_3 /総DNAのグラムの範囲についての指針を与える。典型的なプラスミドDNA精製操作の間、添加された h c C a S i O_3 の好ましい範囲は、約125から200グラムの h c C a S i O_3 /総DNAのグラム、より好ましくは、約30と約70グラムの h c C a S i O_3 /総DNAのグラムである。本発明者らは、典型的なプラスミド精製操作には、約30-70gの h c C a S i O_3 /総DNAのグラムが必要であることを見出した。但し、この場合にも、 h c C a S i O_3 吸着条件は、上で説明された条件に関して、上方向又は下方向に規模を変動させることができ、従って、200グラムの h c C a S i O_3 /総DNAグラムまで、前記範囲の高い方の末端で h c C a S i O_3 を添加する必要がある可能性がある。例えば、NaClのより高い濃度は、DNA及びその他の不純物に対するLRATM

30

40

50

T^M の能力を増加させる。従って、幾つかの例では、より高い塩濃度を検討することが有用であり、これは、必要とされる $h c C a S i O_3$ の量を減少させるはずである。有用な塩濃度は、例えば、最大約 5 M の $N a C l$ の $N a C l$ を用いた範囲であり得ると予測される。上述のように、 $h c C a S i O_3$ 上への不純物の吸着は、単回又は段階的な様式で起こり得る。本明細書の実施例 8 に記載されているように、第一の吸着工程が、界面活性剤によって誘導された沈殿されたプラスミド DNA の塩溶解と組み合わせられる段階的 L R A 吸着プロセスは、より頑強な再溶解をもたらす。次いで、(a) 再懸濁中のケイ酸カルシウムの量を最小化するために、及び (b) 残留宿主細胞ゲノム、開環プラスミド及び直鎖プラスミド DNA を低下させるための最初の仕上げ工程として作用するために、第二段階のケイ酸カルシウムバッチ吸着が使用される。

10

【 0 0 5 7 】

先行する様々な上流及び下流両精製技術の結果として高次コイルプラスミド DNA が濃縮された細胞可溶化液を生成すると共に、一般に、全プロセスの最終産物精製工程に相当する濃縮及び最終緩衝液交換工程の幾つかの種類が実施される。この最終濃縮 / 仕上げ工程によって、実質的に全ての残留不純物がプラスミド DNA 含有溶液から除去され、前記プラスミド DNA を、生理的に許容される緩衝液中に所望の産物濃度に濃縮することが確保される。本発明は、接線流る過モードでの精密ろ過と組み合わせ、DNA 沈殿剤 (例えば、ポリエチレングリコール、アルコール、P E I、ポリアミン、陽イオン性界面活性剤、込み合ったポリマー (c r o w d i n g p o l y m e r)、三重螺旋剤 (t r i p l e x a g e n t) 及びその他の有機剤) を用いる周知の方法によるプラスミド DNA の沈殿を含む新規最終濃縮 / 仕上げ工程の開示に関する。本明細書に記載されている新規濃縮 / 仕上げ工程の最終目標は、粉末製剤をもたらすプラスミド DNA の精製である。しかしながら、前記粉末化された産物が所望の液体中に再懸濁される場合には、液体製剤も実現することができる。本発明のこの部分は、大規模なプラスミド DNA 精製体制をしばしば悩ませるスケールアップの問題を解決する。例えば、精密ろ過濃縮と組み合わせ、P E G 又はアルコールの何れかによるプラスミド DNA 沈殿を使用することにより、プラスミド DNA 精製プロセスのための最終緩衝液交換 / 濃縮手法において一般的に使用される最終限外ろ過手法を直接置き換えることが可能である。限外ろ過は、しばしば、高い再循環速度と大きな膜面積を必要とし、夾雑物の排除を最小にする。以前の出願である米国特許出願 0 9 / 8 7 5 , 3 7 9 (上記) に開示されているバッチアルコール沈殿ベースのバッチプロセスは、これらの限界を回避し、必要な膜面積と再循環速度を劇的に減少させ、粉末化された DNA を作製して大量貯蔵の必要性を最小化する。しかしながら、バッチアルコール沈殿は、大きな溶媒比と過剰な溶媒廃棄物の廃棄を必要とし、大規模な溶媒沈殿に対しては非実用的である。精密ろ過をベースとした本発明のプロセスは、別の液体大量限外ろ過アプローチに必要とされる膜面積を大幅に減少させ、アルコール沈殿とともに使用されると、連続的な溶媒回収系が、アルコール沈殿された産物のバッチ型ろ過にしばしば伴う困難を回避する。

20

30

【 0 0 5 8 】

従って、本発明は、(a) 前記高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、及び (b) 接線流る過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA を濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を精製する方法に関する。本発明の一実施形態において、前記高次コイルプラスミド DNA は、ポリエチレングリコール (P E G) 及びアルコール (エタノール、メタノール及びイソプロパノールを含むが、これらに限定されない。) からなる群から選択される沈殿剤を用いて、工程 (a) において沈殿される。工程 (a) において高次コイルプラスミド DNA を沈殿させるために使用され得るさらなる DNA 沈殿剤には、P E I、ポリアミン、陽イオン性界面活性剤、込み合ったポリマー、三重螺旋剤及びその他の有機溶媒が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 0 5 9 】

従って、本発明は、(a) ポリエチレングリコールで前記高次コイルプラスミド DNA

50

を沈殿させること、及び(b)接線流ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。PEGによるプラスミドDNAの沈殿は急速且つ穏やかであり、DNAに対してほとんど損傷を引き起こさない(Humphreys, G. O. et al., 1975, Biochim. Biophys. Acta. 383: 457-463)。本明細書において先述されているように、プラスミドDNAのPEG沈殿は、DNA溶液中のポリマーの濃度に高度に依存する(Humphreys et al., 1975、上記参照)。10%の最終濃度になるように、清澄化された細胞質抽出物にPEGを添加することは、前記抽出物内に含有された全てのプラスミドDNAを沈殿させ、幾つかのRNA及び多くのタンパク質を溶液中に残存させることが示された(Pulleyleyblank, D. et al., 1983, Mol. Biol. Rep. 9: 191-195)。Lis及びSchlief(1975、上記)は、PEGを用いて、異なる分子量のDNA分子を分離できることを示した。より高い分子量のDNAがより低いPEG濃度で優先的に沈殿することを決定した後、彼らは、様々なPEG濃度を用いて前記分子を沈殿させることを基礎とした、プラスミドDNA分子用のサイズ分画法を開発した。PEGは、伸長されたコイル状態からコンパクトな球状状態へのDNA分子の凝集を促進し(Minagawa, K. et al., 1994, Biopolymers 34: 555-558)、ここにおいて、前記DNA分子は、一次相転移を行う(Yoshikawa, K. et al., 1996, J. Am. Chem. Soc. 118: 929-930)。PEGの低濃度において、DNA分子は伸長されたコイルとして留まるが、高い濃度では、DNA分子は小さな球状高次構造へと収縮する。いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、PEGがプラスミド含有溶液に添加されるにつれて、PEGは、DNAとではなく、水分子と相互作用するように、PEGは体積排除によってDNAを沈殿させるものと考えられる。DNAは、その負の表面電荷の故に、PEGとは相互作用しない。より多くのPEGが添加されるにつれて、この排除効果は、局所DNA濃度が最終的に溶解度の限界を超えるまで、より多くのDNAを小さなポケット中に無理に詰め込む。本明細書の実施例に示されているように、完全な沈殿に必要とされるPEGの濃度は、主に、塩濃度、PEG分子量、産物の不純度及びプラスミドサイズの関数である。

【0060】

上述のように、プラスミドDNAの、PEGによって誘導された沈殿の機序は、プラスミドDNA含有溶液中のPEG沈殿剤の濃度及び分子量の両方に大きく依存する。下記の実施例の部に記載されているように、400から10,000DaまでのPEG分子量が、溶液からプラスミドDNAを沈殿させる能力について調べた(図7B)。前記研究は、DNAが10%(w/v)のPEG400中で完全に可溶性であるが、PEGの分子量が増加するにつれて、DNAを沈殿させるのに必要なPEGの臨界質量が減少することを示している。従って、本明細書に例示されている精製プロセスは、本発明のこの本部分についての沈殿剤として、PEG6000又はPEG8000の何れかを使用するが、当業者であれば、プラスミドDNAを効果的に沈殿させるために、実質的にあらゆる分子量のPEG、特に、約3,000~約20,000のPEG分子量範囲の間で使うことが可能なことを理解する。しかしながら、本明細書に記載されている最終濃縮/仕上げ技術の一部として、高次コイルプラスミドDNAを沈殿させる具体的な分子量のPEGを選択する場合、前記PEG分子量を補完するためにPEG濃度を調整しなければならない。特に本願の教示に照らして、この決定を行うことは当業者の能力の範疇に属する。例えば、LRA後のろ液からプラスミドDNAを完全に沈殿させるためのPEG8000の適切な濃度を決定することは、本明細書に示されている(実施例の部3)。0.3と1.0mg/mLの間のDNA濃度は大規模な精製手法において遭遇する可能性があるので、この0.3と1.0mg/mLの間でDNA濃度を変動させて、異なる温度及び総DNA濃度の下でこの試験を行った。PEG濃度が約2%(w/v)を上回ると、PEG8000の溶液中でDNA溶解度の急減が認められた(図7A参照)。しかしながら、調べた範囲につい

10

20

30

40

50

ては、溶液温度又はDNA濃度によるDNA溶解度に対する影響は存在しなかった。図7A中の結果は、検査した濃度範囲内のDNAが約4%のPEG8000によって完全に沈殿されることを示しているのに対して、実施例の部3に記載されている研究の残りでは8%のPEG8000濃度が選択され、2倍の安全係数を与えた。あるいは、実施例8に例示されている精製プロセスは、プラスミドDNAを沈殿させるために10%のPEG6000溶液を使用する。図5に示されている濃度範囲は、プラスミドDNAが、少なくとも8%のPEG6000溶液中に完全に沈殿されることを示している。従って、本発明の一実施形態において、本発明の新規下流濃縮/仕上げプロセスにおける第一の工程として、濃縮されたPEG6000溶液(例えば、50%w/v)は、(例えば、CTABによって誘導されるプラスミドDNAの選択的沈殿及び水和されたケイ酸カルシウム上への不純物の吸着など(但し、これらに限定されない)の先行する精製プロセスの結果)、10%(w/v)の最終濃度まで高次コイルプラスミドDNAが濃縮された細胞可溶化液に供給される。DNA沈殿を確実に完結させるために、プラスミドDNA含有細胞可溶化液をPEGとともに温置する時間を評価することも重要である。PEG添加後の保持時間がDNA沈殿を完結させるのに十分であることを確保するために、PEG沈殿の速度論を調べることが可能である。下記の実施例の部(実施例3)に開示されている研究において、PEGとの約5分の温置期間後にDNAの99%超が沈殿し(図8参照)、例えば、本明細書に例示されている精製プロセスに使用されているように、2時間の保持時間が十分すぎることを示している。

10

20

30

40

50

【0061】

下記の実施例の部に詳述されているように、米国特許出願09/875,379(上記)に開示されている従来のDNA精製プロセスは、濃縮されたプラスミドDNAを含有するE.コリ細胞可溶化液(例えば、LRA後のろ液などの、ケイ酸カルシウム後のろ液)からプラスミドDNAを精製するための最終仕上げプロセスの一部として、膜限外ろ過/濃縮工程を使用した。この後に、調合緩衝液PBS中への緩衝液交換のために10倍の透析ろ過を行った(図6A参照)。この最終仕上げ工程は、約100L又はこれ以下の容量で満足できるが、これより大きな製造規模の精製プロセスは、ポンプサイズ及び流速が技術の限界に達し始めることを示した。従って、プロセスのスケールアップという問題の多い課題を回避するために、本発明は、プラスミドDNA精製方式において一般的に用いられる最終仕上げ技術(例えば、第一の限外ろ過、濃縮工程後の透析ろ過、緩衝液交換工程)を、PEG沈殿工程後に行われる、接線ろ過下での精密ろ過を含むDNA濃縮プロセスを置き換えることに関する(図6Aを図6Bと比較されたい。)。接線ろ過下での精密ろ過は、段階的ろ過プロセスの一要素に相当し(前記精密ろ過(及びその後の透析ろ過)は、前記プロセスの第一の部分である。)、沈殿されたDNA溶液から残留RNA及び不純物を排除するのに役立つ。第二のろ過工程(及びその後の透析ろ過)は何れも、DNAをさらに濃縮し、PEGをエタノールと置換して、微細な粉末化された形態を取得するために最終の湿潤産物を完全な真空下で乾燥できるように、DNAを脱水する。この最終濃縮/仕上げ技術には、先に開示されたプロセス(図6を参照)の限外ろ過/透析ろ過技術に比べて、より多くの工程を必要とするが、本明細書に記載されているPEG沈殿プロセスは、産物の品質を損なうことなく、又は極端に大きなポンプ及び流速の使用を必要とすることなく、大きな製造容積により容易に拡張することが可能である。重要なことに、この新しいプロセスは、さらに不純物を低下させる最終精製工程を含むが、先行するプロセスは、濃縮及び緩衝液交換のために使用されるに過ぎなかった。さらに、前記工程が無菌的に実施される限り、上記第二のろ過/透析ろ過工程中にエタノールを添加するために、DNA産物が乾燥された後の滅菌ろ過の必要性がなくなっている。重要なことに、粉末化された産物は、液体製剤中に再懸濁することも可能である。従って、本明細書に記載されている新規単位操作の利点は、おそらく2桁又はそれ以上、残留RNAレベルをさらに低下させること、過剰な流速及び大きなポンプが必要なくなること、サイクル時間が短縮すること、並びに粉末化された産物が生成されることであり、必要な保存スペースが減少し、おそらくは、より安定な産物が得られる。

【 0 0 6 2 】

プラスミドDNAが、一旦、上述のようにPEGにより沈殿されたら、PEGによって沈殿されたプラスミドDNAスラリーを同時に濃縮する精密ろ過工程を介して、溶液から不純物が排除され、ここにおいて、前記精密ろ過工程は、接線ろ過モード下で行われる。従って、この精密ろ過プロセスは、浸透液とともに失われた不純物を消費して、沈殿されたプラスミドDNAを保持液中に濃縮する。膜ろ過は、精製体制において広く使用されている分離技術である。膜の種類に応じて、膜ろ過は、精密ろ過又は限外ろ過として分類することが可能である。精密ろ過は、約0.1～約10.0ミクロンの間の典型的な膜孔径を用いた、サイズ排除圧力駆動膜プロセスを表す。(1)シングルパス、デッドエンド又はダイレクトフローろ過(「DFF」)及び(2)クロスフロー又は接線ろ過(「TFF」)という2つの主要な膜ろ過方法が存在する。DFFを使用すると、沈殿されたプラスミドDNAスラリーから排除されるべき不純物は、しばしば、沈殿されたプラスミドDNAとともに膜表面に目詰まりした状態になり得ることが見出された。TFFは、沈殿されたプラスミド溶液を再循環させることによって、この目詰まりの問題を解決し、溶液が、膜の表面まで接線方向に流れるようにする(クロスフローという用語と同義)。液体の掃引作用は、ゲル層の形成及び表面の汚損を最小限に抑えるように作用し、従って、TFFは、しばしば、DFFより速く、より効率的である。全ての接線流技術に関連する2つの重要な変数、すなわち、膜間圧力(すなわち、フィルターの孔を通じて不純物を押す力)及びクロスフロー速度(すなわち、膜を横切った可溶化液の流速)が存在する。液体は、フィルターの膜表面を横切って(クロスフロー)、試料フィードから汲み出され、保持液として、試料フィード中に戻される。締め具又はバルブによって保持液チューブに負荷される背圧は、膜孔より小さな不純物を、フィルターを通じて、ろ液(又は浸透液)画分中に誘導する膜間圧を生み出す。クロスフローは、膜の表面上に保持されているより大きな分子を掃引して、保持液としてフィードに戻す。従って、TFFを効率的に用いるための重要なポイントは、試料の最大容量が、孔の目詰まりを作り出すことなしにろ過できるように、膜間圧及びクロスフロー速度を制御することである。

10

20

【 0 0 6 3 】

下記実施例の部は、精密ろ過の間にTFFを使用することは、沈殿されたプラスミドDNAを濃縮し(すなわち、作業容積を低下させる。)、沈殿後に溶液中に残された全ての残留RNA及び非産物可溶性物質を洗浄除去するように作用する。開示されている特定の実施例では、米国特許出願09/875,379号(上記)に定義されているLRA後のろ液は、3MのNaCl、1.0mg/mLの精製されたDNA及び幾らかの残留RNAのプラスミド含有溶液である。プラスミドDNAを沈殿させるためにPEG8000MWを使用し、最終溶液濃度が約8%(w/v)になるまで、15分にわたって、約33%(w/v)の濃縮された溶液として添加した。沈殿を2時間放置した後、0.45ミクロンの中空ファイバー膜、接線流フィルターを用いて濃縮した。膜上への搭載は、180gのDNA/膜面積 m^2 であった。再循環速度は9L/ m^2 /分であり、流量は、2.5L/ m^2 /分に調節した。20倍濃縮が達成されるまで、浸透液を収集した。本発明の一実施形態において、TFF下で精密ろ過を用いて、本明細書に記載されているように、PEGによって沈殿されたDNAが濃縮された後、次いで、PEG溶液に対して沈殿を透析ろ過し、ここにおいて、前記透析ろ過緩衝液は、プラスミドDNAが透析ろ過中に沈殿された状態を確実に保つのに十分な濃度のPEG及び塩を含有する。例えば、透析ろ過緩衝液が、先行する沈殿工程で使用されたPEGの概ね同じパーセント(例えば、上記例では、及び実施例の部3でさらに記載されているように、8%w/vPEG8000)及び約1.2MのNaClを含有する場合には、プラスミドDNAは、沈殿された状態を保つ。実験は、約100と約600mMのNaClの間の塩濃度が、50%(v/v)エタノール溶液中にDNAを沈殿させ続けるのに好ましいことを示している。従って、以下でさらに記載されている第二のろ過/透析ろ過工程が600mM付近のNaCl限界で稼働するためには、第一の透析ろ過から出る塩濃度は約1.2Mであることが好ましい。より高いNaCl濃度値を使用することが可能であるが、これは、その後のエタノール添加/脱水工

30

40

50

程（以下でさらに記載されている。）の間に、残留塩のより大量の沈殿を引き起こし得る。あるいは、より低いNaCl濃度（例えば、100mM）を加えた緩衝液に対して、沈殿されたDNAを透析ろ過することが可能であるが、これらの条件下では、前記緩衝液のPEG濃度は、低い塩を補うように増加させるべきである。本明細書の実施例に示されているように、プラスミドDNAは、まず、約8%（w/v）の最終溶液濃度のPEG8000を用いて沈殿された場合には、上記TFE精密ろ過後に、沈殿されたDNAスラリーを透析ろ過するために、約1.2MのNaClを加えた約8%（w/v）のPEG8000溶液が好ましい。PEGは体積排除によってDNAを沈殿させ、エタノール沈殿を用いた場合のように脱水によって沈殿させるのではないので、PEGによって沈殿されたプラスミドは、混合によって、より小さな片へと解離され得る柔らかなゲル様沈殿を形成する。

10

【0064】

プラスミドDNAが、まず、PEGで沈殿される、本発明の最終濃縮仕上げ工程の第二のろ過／透析ろ過プロセスは、（a）エタノールの添加により、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを部分的に脱水すること、（b）ろ過によって、工程（a）の脱水されたプラスミドDNA沈殿を濃縮すること、及び（c）100%エタノールに対して、沈殿されたプラスミドDNAを透析ろ過することを含む。PEGによって沈殿され、（先行するMF／透析ろ過工程を介して）濃縮されたプラスミドは、沈殿の特徴が体積排除から脱水機序へと変化するような最終エタノール濃度になるように、透析ろ過された沈殿へ、エタノール性溶液（例えば、100%又は200アルコール度数）を供給することによって脱水することが可能である。その結果、沈殿されたプラスミドDNAの物理的特性は、ゲル様物質から、より硬く、より圧縮可能な沈殿へと変化する。得られた沈殿は、多孔性の構造へと詰め込まれて、第二のろ過工程（上記工程（b））において、優れた流量と高い搭載能力をもたらす。本発明によれば、約100%（v/v）未満のエタノールを含有するエタノール性溶液中で沈殿したDNAを温置すると、沈殿した高次コイルプラスミドDNAのエタノールによる部分的脱水が生じる。従って、上記工程（a）の部分的脱水を達成するために、異なるエタノール濃度を使用することが可能であるが、約30-80%（v/v）の間の範囲内の最終エタノール濃度が好ましい。約30%（v/v）を下回る濃度は、DNAを再び溶液中に再溶解させるリスクがあるのに対して、約80%（v/v）を上回る濃度は、プラスミドDNAとともに、塩を沈殿させ始める。本発明の一実施形態において、PEGによって沈殿され、（上記先行するMF／透析ろ過工程を介して）濃縮されたプラスミドは、50%（v/v）の最終濃度まで、100%（200アルコール度数）のエタノールの添加によって脱水される。プラスミドDNA沈殿を脱水させた後、前記沈殿されたDNAスラリーは、ろ過によってさらに（例えば、約30g/Lまで）濃縮され、次いで、真空乾燥の準備のために、100%エタノールに対して透析ろ過される。本明細書に記載されている実施例において、脱水されたプラスミドDNAスラリーは、圧力ろ過及び真空乾燥（一般に、単一プレートNutscheフィルター乾燥機として知られている。）を可能とする撹拌された細胞操作下において、フィルター乾燥機中での前記第二のろ過によって濃縮される。前記系の撹拌された細胞操作は、チャンネルを通じた前記溶液の再循環によるのではなく、羽根車によって、フィルター表面上に、アルコール沈殿されたDNA溶液の流れを作り出す。本明細書に開示された第二のろ過／透析ろ過プロセスを例示するために使用されたフィルター乾燥機には、25µmのステンレス鋼メッシュフィルターが装着される。従って、新規下流濃縮／仕上げプロセスの本部分の第二のろ過工程は、撹拌された細胞モード下で、約0.1µm未満と100µmの間の孔径、好ましくは、約25µmの孔径のフィルターを有する単一プレートNutscheフィルターを使用して行われる。孔径は、ろ液及び全ての付随する不純物をフィルターに通過させながら、プラスミドDNA沈殿物をフィルター上に捕捉するためにのみ重要である。下記の実施例において、濃縮されたDNA沈殿物は、次いで、同じフィルター-乾燥機ユニット中、3.2L/m²/分に制御された流量、100%（200アルコール度数）アルコールに対して透析ろ過される。ろ過に引き続き、25~37で約24時間、粉末を真空

20

30

40

50

下で乾燥し、微細な産物粉末を形成する。あるいは、粉末化されたDNA産物は、選択した製剤緩衝液中に再懸濁することも可能である。この第二のろ過/透析ろ過操作は、残存する全てのPEGを溶液から除去するために、産物をさらに脱水するために、及び可能な限り多くの塩を除去するために実施される。

【0065】

従って、本発明は、(a)ポリエチレングリコールで前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び(b)接線流ろ過モードでの精密ろ過を含む段階的ろ過プロセスを用いて、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。この段階的ろ過プロセスは、(a)接線流ろ過モード下での精密ろ過を含む第一のろ過濃縮工程と、(b)高次コイルプラスミドDNAを沈殿された形態に保つのに十分なPEGの十分な濃度を含有し、及び高次コイルプラスミドDNAを沈殿された形態に保つのに十分な塩の場合により含有するPEG含有透析ろ過緩衝液に対する第一の透析ろ過工程と、(c)沈殿された高次コイルプラスミドDNAがエタノールの添加によって部分的に脱水される脱水工程と、(d)第二のろ過濃縮工程と、並びに(e)100%(v/v)エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む。好ましい実施形態において、工程(b)の透析ろ過緩衝液は、約10%(w/v)のPEG6000と約1.2MのNaClを含有する。この沈殿された高次コイルプラスミドDNAは、精密ろ過及び第一の透析ろ過工程後に、約30%と約80%(v/v)の間の最終濃度になるようにエタノールを添加することにより、工程(c)において脱水することができる。好ましい実施形態において、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAは、精密ろ過/透析ろ過保持液へのエタノールの添加により、約50%(v/v)の最終濃度まで部分的に脱水される。さらなる好ましい実施形態において、上記工程(d)及び(e)の第二のろ過及び透析ろ過は、撹拌された細胞モードで動作される単一プレートNutscheフィルター乾燥機を含む(但し、これに限定されない。)ステンレス鋼のメッシュ(またな均等物)スクリーンが装着されたフィルター乾燥機中で行われる。従って、本発明は、(a)PEGで前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、(b)接線流ろ過下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮すること、(c)エタノールの添加により、前記濃縮された、沈殿されたDNAを部分的に脱水すること、及び(d)撹拌された細胞フィルター乾燥機中で前記部分的に脱水された、沈殿されたDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。

【0066】

本発明は、さらに、(a)前記高次コイルプラスミドDNAを、アルコール(エタノール、メタノール及びイソプロパノールを含むが、これらに限定されない。)沈殿させること、及び(b)接線流ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿されたプラスミドDNAを濃縮することを含む大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。前記限外ろ過が、標準的なポンプ(例えば、ローブポンプ)を用いた工場規模の製造方法に改変される場合に、溶液相プラスミドが剪断損傷を受け易いので、産物プラスミドDNAを濃縮するために、限外ろ過ではなく、(PEG又はアルコールの何れかによる)沈殿の使用が好まれる。米国特許出願09/875,379(上記)中に記載されている、より初期の開発作業は、プラスミドDNAの乾燥粉末形態を得るためにバッチモードで沈殿溶媒としてエタノールを使用できることを示した。しかしながら、このアプローチは、沈殿後ろ過及び洗浄工程に関して一貫しておらず、洗浄グラジエントを徐々に負荷しなければ、遅いろ過速度と著しいケーキの圧縮を示す。従って、本発明の一実施形態において、本発明の最終下流濃縮/仕上げ工程は、プラスミドDNAの精製された原末形態を最終的に生成するために、接線流ろ過モードでの精密ろ過によって増強されたアルコール沈殿を特徴とする。本アプローチの強化として、精密ろ過を同時に行う連続的沈殿は、バッチアルコール沈殿法に比べて、容器容積を著しく減少させ得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

前述されているように、細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを沈殿させる（PEG又はアルコールにより沈殿させることを含むが、これに限定されない。）という第一の工程を包含する本発明の最終下流濃縮／仕上げ工程を実施する前に、上流精製プロセス及び先行する下流精製プロセス（上で詳しく記載されている。）の両方の結果として、前記細胞可溶化液中では高次コイルプラスミドDNAが濃縮されている。高次コイルプラスミドDNAが濃縮された細胞可溶化液が生成されたら、前記プラスミドDNA含有可溶化液は、全ての残留不純物を除去するためにさらに処理され、プラスミドDNA精製体制中の最終仕上げ工程に相当する。アルコール沈殿を含む本発明の最終下流濃縮／仕上げ工程を実証するために、まず、（米国特許出願09/875,379号（上記）に記載されているように）LRA後のろ液から、高次コイルプラスミドDNAを沈殿させる。何らかの特定の理論に拘泥するものではないが、様々な溶媒（エタノール、イソプロパノール及びメタノール）及び塩がプラスミドDNAを沈殿する能力を調べる、本明細書の実施例の部に記されている実験は、DNA沈殿の機序に対して洞察を与える。DNAは、互いに反発する、負に帯電したリン酸基に加えて、疎水性の塩基対を含有する。ホスファートの反発が克服されれば、疎水性領域が堆積し、DNAが溶液から沈殿する。図9Bは、プラスミドの溶解度が、塩又は溶媒の何れかを添加することによって減少することを示している。溶液のイオン強度（塩濃度）は、静電的に溶解度に対して影響を与え、ここで、陽イオンは、負に帯電したホスファート基の反発を遮蔽する。当業者は、本明細書に記載されている調査及び本分野で既に開示されている調査を用いて、本発明の最終濃縮／仕上げ精製工程中の第一の工程として、プラスミドDNAをアルコールで沈殿させるときの、溶媒と塩の間の相互作用を理解する。

10

20

【 0 0 6 8 】

上述のように、本発明の一実施形態は、（a）エタノールで前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び（b）接線流ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿されたプラスミドDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本明細書の実施例の部に詳しく記載されている研究は、約30%と33%（v/v）の間のエタノール濃度及び約1.8と3.4Mの間のNaCl濃度により、0.5g/Lのプラスミド溶液中で、プラスミドDNAの溶解度の鋭い減少が起こることを示す。上述のように、当業者であれば、アルコールによるプラスミドDNA沈殿の効率において、溶液イオン強度（塩濃度）が役割を果たしていることを認識し、従って、前記プラスミドの沈殿を達成するために特定のDNA濃度のプラスミド溶液に対して十分な濃度で塩及びエタノールを与える必要があることを認識する。さらに、プラスミドDNAがその後のろ過及び洗浄工程の間に沈殿された状態を確実に保つために、前記成分の適切な濃度を維持することの重要性が、当業者によって認識される。本発明の一実施形態において、本明細書に開示されている下流濃縮／仕上げプロセス（上記工程（a））の第一の工程として、約40%（v/v）の最終濃度まで、プラスミドDNAが濃縮された細胞可溶化液（細胞可溶化液は、概ね約3MのNaClを含有する。）にエタノールを添加することにより、高次コイルプラスミドDNAを沈殿させる。

30

40

【 0 0 6 9 】

本発明のさらなる実施形態において、プラスミドDNAがアルコール（エタノール、メタノール及びイソプロパノールを含むが、これらに限定されない。）によって沈殿された後に、前記沈殿されたプラスミドは、次いで、段階的ろ過プロセスを介して濃縮される。前記段階的ろ過プロセスは、（a）接線流ろ過モード下での精密ろ過を含む第一のろ過濃縮工程と、（b）エタノール性溶液のエタノール濃度が高次コイルプラスミドDNAを沈殿された状態に保つのに十分であるエタノール性溶液に対する第一の透析ろ過工程と、（c）第二のろ過濃縮工程と、並びに（d）100%（v/v）エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む。本明細書に記載されている実施例において、枝付きフラスコ及び0.2ミクロンの膜フィルター（2.1cm²のフィルター面積）を用いて、直接フ

50

ろ過の下、80% (v/v) EtOH に対して、沈殿したプラスミド溶液 (約 40% (v/v) エタノール及び約 3 M NaCl で沈殿された 0.86 g/L のプラスミド溶液) を透析ろ過する試みが行われた。ろ過が進行するにつれて、流動の著しい減少が顕著であり、ゲル様フィルターケーキの形成がもたらされた。大規模なバッチろ過の場合、従って、5 フィートの直径の 0.2 ミクロンフィルター (19.6 平方フィートの膜面積) を用いると、直接フロー下でのろ過は、243 時間後に完了すると推定された。この非実用的なろ過時間のために、表面積の大きな接線ろ過 (「TFF (tangential flow filtration)」) 膜が代替法として検討された。この目的のために、0.22 µm PVDF 接線ろ過膜を用いて、約 40% (v/v) エタノール及び約 3 M の NaCl で沈殿されたプラスミド DNA を精密ろ過した。懸濁液は 15 mL / 分で容易にろ過され、実験中、浸透液の流量は減少しない。このことは、膜表面から固体が自由に除去され、ケーキ層を形成しなかったことを示している。

10

【0070】

アルコールによって誘導されるプラスミド沈殿を伴う段階的ろ過プロセスの精密ろ過工程及び第一の透析ろ過工程は、残留塩及び過剰の水を溶液からともに除去するために、並びに同時に、アルコール沈殿された (例えば、エタノール沈殿された) プラスミド DNA を濃縮するために行われる。このプロセスは、浸透液とともに失われた塩及び水を消費して、沈殿されたプラスミド DNA を保持液中に濃縮する (すなわち、作業容積を減少する)。濃縮され、沈殿されたプラスミド DNA は、次いで、透析ろ過され、同じく、塩の除去を補助する。本発明の一実施形態において、TEF 精密ろ過によって濃縮された、エタノールで沈殿されたプラスミド DNA は、続いて、約 60% と約 100% の間のエタノールを含む溶液に対して透析ろ過される。プラスミド DNA は、塩の不存在下でさえ、80% v/v エタノール溶液中に完全に不溶性であるので、プラスミド DNA が不溶性である条件を維持しながら、懸濁液から NaCl を除去するために、80% エタノールを用いた透析ろ過を使用することが可能である。次いで、沈殿されたプラスミド DNA スラリーを、第二のろ過工程によってさらに濃縮し、100% (アルコール度数 200) エタノールに対して、二度目の透析ろ過を行う。本発明の一実施形態において、この第二のろ過 / 透析ろ過プロセスは、上述のように、単一プレート Nuttall フィルター乾燥機を含む (但し、これに限定されない。) フィルター乾燥機中で実施される。湿潤粉末は (例えば、25 ~ 37 で) 真空乾燥することが可能であり、得られた粉末化された DNA 産物は、選択した調合緩衝液中に再懸濁され得る。

20

30

【0071】

バッチモードでの、アルコールによって誘導されたプラスミド沈殿は、バッチ容量及び沈殿のために必要とされるエタノールの量の両方を保持するのに十分大きな容器を必要とする。しかしながら、一定の容量を維持するために精密ろ過がそこから同時に液体を除去する、より小さな中間の容器中に、フィード及びエタノールの両方を連続的に汲み入れることができるのであれば、高い溶媒比で沈殿が実施される場合でも、大きな沈殿容器はもはや必要とされない。このモードでは、溶媒廃棄液は、浸透液を継続的に蒸留し、沈殿容器へとリサイクルすることによっても最小化することが可能である。従って、本発明の一実施形態は、(a) アルコール (エタノール、メタノール及びイソプロパノールを含むが、これらに限定されない。) を用いて前記高次コイルプラスミド DNA を沈殿させること、及び (b) 接線ろ過モード下での精密ろ過によって、前記沈殿された高次コイルプラスミド DNA を濃縮することを含み、工程 (a) 及び工程 (b) が、連続的な沈殿 / 精密ろ過条件下で行われる、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミド DNA を生成する方法に関する。前記連続的沈殿 / 精密ろ過プロセスは、精密ろ過が同じ容器から同時に実施されて一定容積を保ちながら、攪拌された容器に、エタノールとプラスミド溶液が連続的に添加される場合に行われる。このアプローチに対する補助として、浸透液の連続的な蒸留は、濃縮されたエタノールの沈殿へのリサイクルを提供して、必要とされる溶媒容量を最小化し、より高く、より好ましいアルコール濃度での沈殿を可能とする。従って、本発明の一部として含まれる連続的な沈殿 / 精密ろ過プロセスは、アルコー

40

50

ル（例えば、エタノール）の回収を含んでもよく、又は含まなくてもよい。以下の実施例の部に詳しく記載されているように、精密ろ過膜の目詰まりを避けるために、精密ろ過の開始前に、プラスミド粒子が完全に脱水できる十分な待機時間が必要である。沈殿されたプラスミドDNAが完全に脱水されることを確実にすることは、水和された大きな粒子によるチャンネルの目詰まりのために引き起こされ得る圧力の増加をなくすことにも役立つ。連続的な沈殿／精密ろ過アプローチは、沈殿のために高いアルコールレベルを必要とするある種の調製に対して特に魅力的であり得る。

【0072】

本発明の一実施形態において、本明細書に記載されている新規上流及び新規下流精製プロセスは、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から得られる高次コイルプラスミドDNAの単離のための単一のプロセス中に組み合わされる。従って、本発明は、さらに、（a）生理的緩衝液中に、高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解して、宿主細胞可溶化液を形成させること、（b）宿主細胞細片を凝集することによって前記宿主細胞可溶化液を清澄化させ、高次コイルプラスミドDNAを溶液中に保持すること、（c）前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、及び（d）接線流ろ過モード下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮すること、を含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本発明の本部分の一実施形態において、上記工程（a）の宿主細胞可溶化液は、リゾチームを含有する標準的なSTET緩衝液中での微生物宿主細胞の溶解によって作製される。本発明の本部分の別の実施形態において、工程（a）の宿主細胞可溶化液は、PCT国際出願PCT/US95/09749号及びPCT/US96/07083号に開示されているように、熱交換装置を通じて微生物宿主細胞を通過させることによって作製される。詳しく上述されているように、ポリエチレングリコール（PEG）は、微生物細胞からの高次コイルプラスミドDNAの下流精製のための準備において、清澄化された細胞可溶化液を作製するための、宿主細胞細片の効果的な凝集剤であることが本明細書において示されている。従って、本発明の本部分の一実施形態において、宿主細胞可溶化液は、PEGを用いて、上記工程（b）において清澄化される。PEG凝集剤は、当初の溶解緩衝液の成分であることができ、又は溶解が起こった後に、細胞可溶化液に添加することができる。上で説明されているように、宿主細胞可溶化液を清澄化するために使用されるPEG凝集剤の量は、その分子量に依存する。本発明の好ましい実施形態において、本明細書に記載されているように、宿主細胞細片を凝集するために、約3.7%（w/v）のPEG6000が使用されるが、凝集の達成に対するPEGポリマー濃度と分子量の間の密接な相互関係の故に、本明細書に開示されている全ての具体的PEG濃度及びPEG分子量は指針と解すべきであり、全体として本発明を限定すると解すべきではない。凝集用の細胞可溶化液を調製するために、前記可溶化液は、アルカリpHシフトに供されることができ、続いて、凝集の前に中和に供されることができ。アルカリpHシフトは、濃縮された塩基の添加により、宿主細胞可溶化液のpHを約pH12と約pH13の間のアルカリ値へと上昇させることを含む。アルカリシフトされた宿主細胞可溶化液のその後の中和は、約pH7と約pH9の間の値まで、前記細胞可溶化液のpHを低下させる（すなわち、アルカリシフト前の可溶化液の概ね同じレベルまでpHを低下させる。）ことを含む。アルカリpHシフト及びその後の中和プロセスは、PEG凝集剤の添加前又は添加後の何れにおいても行い得る。従って、本発明は、（a）リゾチームを含有するSTET緩衝液中で、高次コイルプラスミドDNAを含有する微生物宿主細胞を溶解させること、（b）アルカリpHシフト及びその後の中和へ、前記宿主細胞可溶化液を供すること、（c）PEG凝集剤で宿主細胞細片を凝集させることにより、前記宿主細胞可溶化液を清澄化すること、（d）前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、並びに（e）接線流ろ過モード下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルプラスミドDNAを濃縮することを含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する方法に関する。本発明の一実施形態において、溶液中に存在する高次コイルプラスミドDNAは、アルコール（例えば、40% v/v エタノール）及びPEG

10

20

30

40

50

(例えば、10% w/v PEG 6000) からなる群から選択される沈殿剤を用いて、工程(d)において沈殿される。さらに、上記工程(e)の濃縮工程は、段階的な過プロセスであり得る。前記プラスミドDNAが、まず、PEGで沈殿されるのであれば、前記段階的な過プロセスは、(a)接線流過の下での精密ろ過を含む第一の過濃縮工程、(b)高次コイルプラスミドDNAを沈殿された状態に保つのに十分なPEG及び塩を含有するPEG含有透析ろ過緩衝液に対する第一の透析ろ過工程と、(c)沈殿された高次コイルプラスミドDNAがエタノールの添加によって部分的に脱水される脱水工程と、(d)第二の過濃縮工程と、並びに(e)100%(v/v)エタノールに対する第二の透析ろ過工程と、を含む。前記プラスミドDNAが、まず、アルコール(例えば、エタノール)で沈殿されるのであれば、前記段階的な過プロセスは、(a)接線流過の下での精密ろ過を含む第一の過濃縮工程、(b)アルコール性溶液の濃度が前記高次コイルプラスミドDNAを沈殿されたままに保つのに十分であるアルコール性溶液(例えば、エタノール)に対する第一の透析ろ過工程と、(c)第二の過濃縮工程と、並びに(d)100%(v/v)アルコール(例えば、100%エタノール)に対する第二の透析ろ過工程と、を含む。

10

20

30

40

50

【0073】

この目的のために、本発明は、さらに、(a)発酵ブロス又は培地から微生物宿主細胞を採集すること、(b)生理的溶解溶液の十分量の中で宿主細胞を溶解させること、(c)前記可溶化液のpHを約pH12と約pH13の間のpHまで上昇させることにより、宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフトに供すること、(d)アルカリシフトされた細胞可溶化液を、概ね、溶解緩衝液のpHまで中和すること、(e)PEGで宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(d)の細胞可溶化液を清澄化すること、(f)前記凝集された宿主細胞細片を除去すること、(g)ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドによって誘導される沈殿を用いて、高次コイルプラスミドDNAを選択的に沈殿させること、(h)最適化されたイオン強度の、水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムをさらに含有する十分に確定された緩衝液中に前記高次コイルプラスミドDNAを再溶解し、及び不純物を吸着させること、(i)水和され、結晶化された、ケイ酸カルシウムによって誘導される第二の吸着により、残留不純物を吸着させること、(j)PEGで高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、(k)接線流過モード下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルDNAを濃縮すること、(l)エタノールの添加により、前記沈殿された高次コイルDNAを部分的に脱水すること、(m)攪拌された細胞フィルター乾燥機中で前記脱水された高次コイルDNAを濃縮すること、並びに(n)エタノールを除去するために乾燥させ、微細な粉末化されたDNA産物を残存させることを含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する組み合わせられた方法に関する。本発明の一実施形態では、直前に記載されている精製プロセスにおいて、段階的な界面活性剤の沈殿が使用される。前記段階的なプロセスは、細胞可溶化液から残留タンパク質とエンドトキシンを除去するための第一の低カット沈殿工程に続き、プラスミドDNAを沈殿させるための高カット沈殿工程を含む。第一の低カット工程は、凝集された宿主細胞細片の除去の前に実施することが可能である。このような事例では、高カット沈殿工程は、清澄化された可溶化液を用いて(すなわち、宿主細胞細片の除去後に)行われ、上記工程(g)によって代表される。

【0074】

本発明は、(a)発酵ブロス又は培地から微生物宿主細胞を採集すること、(b)リゾチームを含有する標準的なSTET緩衝液の十分量に宿主細胞を溶解させること、(c)宿主細胞可溶化液のpHを約pH12と約pH13の間のpHまで上昇させることにより、宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフトに供すること、(d)アルカリシフトされた細胞可溶化液を、概ね、STET緩衝液のpHまで中和すること、(e)PEGで宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(d)の細胞可溶化液を清澄化すること、(f)前記凝集された宿主細胞細片を除去すること、(g)ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドによって誘導される沈殿を用いて、高次コイルプラスミドDNAを選択的に沈殿

させること、(h)最適化されたイオン強度の、及び水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムをさらに含有する十分に確定された緩衝液中に前記沈殿されたプラスミドDNAを再溶解し、及び不純物を吸着させること、(i)水和され、結晶化された、ケイ酸カルシウムによって誘導される第二の吸着により、残留不純物を吸着させること、(j)PEGで高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、(k)接線流ろ過モード下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルDNAを濃縮すること、(l)エタノールの添加により、前記沈殿された高次コイルDNAを部分的に脱水すること、(m)攪拌された細胞フィルター乾燥機中で前記脱水された高次コイルDNAを濃縮すること、並びに(n)エタノールを除去するために乾燥させ、微細な粉末化されたDNA産物を残存させることを含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する組み合わせられたプロセスに関する。本発明の一実施形態において、直前に記載されている精製プロセスにおいて、段階的な界面活性剤の沈殿が使用される。前記段階的プロセスは、細胞可溶化液から残留タンパク質とエンドトキシンを除去するための第一の低カット沈殿工程に続き、プラスミドDNAを沈殿させるための高カット沈殿工程を含む。第一の低カット工程は、凝集された宿主細胞細片の除去の前に実施することが可能である。前記高カット沈殿工程は、清澄化された可溶化液を用いて(すなわち、宿主細胞細片の除去後に)行われ、上記工程(g)によって代表される。

10

【0075】

本発明は、さらに、(a)発酵ブロス又は培地から微生物宿主細胞を採集すること、(b)生理的溶解溶液の十分量の中で宿主細胞を溶解させること、(c)宿主細胞可溶化液のpHを約pH12と約pH13の間のpHまで上昇させることにより、宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフトに供すること、(d)アルカリシフトされた細胞可溶化液を、概ね、溶解緩衝液のpHまで中和すること、(e)PEGで宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(d)の細胞可溶化液を清澄化すること、(f)前記凝集された宿主細胞細片を除去すること、(g)ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドによって誘導される沈殿を用いて、高次コイルプラスミドDNAを選択的に沈殿させること、(h)最適化されたイオン強度の、及び水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムをさらに含有する十分に確定された緩衝液中に前記沈殿されたプラスミドDNAを再溶解し、及び不純物を吸着させること、(i)水和され、結晶化された、ケイ酸カルシウムによって誘導される第二の吸着により、残りの不純物を吸着させること、(j)エタノールで高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、(k)接線流ろ過モード下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルDNAを濃縮すること、(l)攪拌された細胞フィルター乾燥機中で前記脱水された高次コイルDNAをさらに濃縮すること、並びに(m)エタノールを除去するために乾燥させ、微細な粉末化されたDNA産物を残存させることを含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する組み合わせられたプロセスに関する。本発明の一実施形態において、直前に記載されている精製プロセスにおいて、段階的な界面活性剤の沈殿が使用される。前記段階的プロセスは、細胞可溶化液から残留タンパク質とエンドトキシンを除去するための第一の低カット沈殿工程に続き、プラスミドDNAを沈殿させるための高カット沈殿工程を含む。第一の低カット工程は、凝集された宿主細胞細片の除去の前に実施することが可能である。このような事例では、高カット沈殿工程は、次いで、清澄化された可溶化液を用いて(すなわち、宿主細胞細片の除去後に)行われ、上記工程(g)によって代表される。

20

30

40

【0076】

本発明は、(a)発酵ブロス又は培地から微生物宿主細胞を採集すること、(b)リゾチームを含有する標準的なSTET緩衝液の十分量で宿主細胞を溶解させること、(c)前記可溶化液のpHを約pH12と約pH13の間のpHまで上昇させることにより、宿主細胞可溶化液をアルカリpHシフトに供すること、(d)アルカリシフトされた細胞可溶化液を、概ね、STET緩衝液のpHまで中和すること、(e)PEGで宿主細胞細片を凝集させることによって、工程(d)の細胞可溶化液を清澄化すること、(f)前記凝集された宿主細胞細片を除去すること、(g)ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロ

50

ミドによって誘導される沈殿を用いて、高次コイルプラスミドDNAを選択的に沈殿させること、(h)最適化されたイオン強度の、及び水和され、結晶化されたケイ酸カルシウムをさらに含有する十分に確定された緩衝液中に前記沈殿されたプラスミドDNAを再溶解し、及び不純物を吸着させること、(i)水和され、結晶化された、ケイ酸カルシウムによって誘導される第二の吸着により、残留不純物を吸着させること、(j)エタノールで高次コイルプラスミドDNAを沈殿させること、(k)接線流過モード下での精密ろ過を用いて、前記沈殿された高次コイルDNAを濃縮すること、(l)攪拌された細胞フィルター乾燥機中で前記脱水された高次コイルDNAをさらに濃縮すること、並びに(m)エタノールを除去するために乾燥させ、微細な粉末化されたDNA産物を残存させることを含む、大規模な微生物発酵の細胞可溶化液から高次コイルプラスミドDNAを精製する組み合わせられたプロセスにも関する。本発明の一実施形態において、直前に記載されている精製プロセスにおいて、段階的な界面活性剤の沈殿が使用される。前記段階的プロセスは、細胞可溶化液から残留タンパク質とエンドトキシンを除去するための第一の低カット沈殿工程に続き、プラスミドDNAを沈殿させるための高カット沈殿工程を含む。第一の低カット工程は、凝集された宿主細胞細片の除去の前に実施することが可能である。次いで、前記高カット沈殿工程が、清澄化された可溶化液を用いて(すなわち、宿主細胞細片の除去後に)行われ、上記工程(g)によって代表される。

10

【0077】

本明細書に挙げられている全ての公報は、本発明に関連して使用され得る方法及び材料を記載及び開示する目的で含められる。本明細書の記載は、以前の発明に基づいて、本発明がこのような開示の日付に先行させる権利を有しないことを認めるものと解釈すべきではない。

20

【0078】

添付の図面を参照しながら本発明の好ましい実施形態について記載してきたが、本発明はこれらの厳密な実施形態に限定されないこと、及び添付の特許請求の範囲に定義されている本発明の範囲又は精神から逸脱することなく、本発明の中に様々な変化及び改変が当業者によって実施され得ることを理解すべきである。

【0079】

以下の実施例は、本発明を例示するが、本発明を以下の実施例に限定するものではない。

30

【実施例1】

【0080】

PEGによる宿主細胞細片の凝集

分析方法—利用される分析方法是、(i)陰イオン交換(「AEX」)HPLCアッセイ、(ii)Eゲル(In vitro gen; 臭化エチジウム含有0.8%アガロース)を使用するゲル電気泳動、及び(iii)Taqman PCRアッセイを使用するqPCRを含む。Eゲルは、ウェルあたり20 μ Lの負荷で、60Vで50分間行った。Eゲルアッセイを行う前に、試料をエタノール沈殿(2当量)により前処理し、Eppendorf微量遠心管中で5分間遠心分離し、上清を注ぎ移し、ペレットを、5分間乾燥させた後、pH 8.0の10mMトリス緩衝液中に再懸濁した。その後、前処理した試料を1 $\times$ TAE緩衝液中に希釈した後、Eゲルに負荷した。qPCR分析に提供される試料にういて、同一の前処理を実施した。

40

【0081】

リゾチームによる溶解—まず、E. コリの可溶化研究を実施して、溶解性能に及ぼすリゾチームの影響、塩基/酸処理(pH 12-13になるように塩基添加及びその後、pH 約7-9になるように、酸の添加により中和)及び温度を評価した。45のOD₆₀₀になるように再懸濁した細胞を使用して、細胞の可溶化を評価した。リゾチームなしでの可溶化は温度又は塩基/酸処理にかかわらず、より低い収量をもたらした。標準的なSTET緩衝液(50mMトリス-HCl、100mMのEDTA、2%(v/v) Triton (R)-X-100、8%(w/v)スクロース、pH 8.2)中で、塩基/酸処理を行

50

わずに、リゾチーム (500 U/mL Ready-LyseTM; Epicentre) を用いて 20 で行った溶解は、37 での溶解と比較したとき、より低いプラスミド DNA 回収 (約 0.3 g/L のプラスミド DNA 濃度) を生じた。リゾチーム温置 (500 U/mL) の使用後に塩基/酸処理を行うことによって、最大収量が達成された。塩基/酸処理は、濃 NaOH (5 M ストック; 0.25 M の最終溶液濃度) の添加、15 分の温置及び酢酸 (5 M ストック; 0.25 M の最終溶液濃度) の添加からなった。プラスミド DNA 収量は、20 又は 37 のいずれかで温置され、塩基/酸処理へ供された、OD₆₀₀ が 45 の可溶化液から、約 0.5 g/L であった。

【0082】

可溶化液凝集研究—スクリーニング研究を実施して、細胞細片の沈殿に及ぼす PEG 凝集の効果を特徴付けた。図 1 は、OD₆₀₀ が 45 の異なる E. コリ可溶化液 (プラスミド DNA 含有) の入った 4 つの Nalgene 瓶を示す。瓶 1 は、STET 緩衝液 (上述) 中に細胞を再懸濁し、20 でリゾチーム (500 U/mL Ready-Lyse (商標)) とともに温置することによって生成された可溶化液を含有する。瓶 2 は、瓶 1 と同じ可溶化液を含有するが、塩基/酸工程は、リゾチーム温置後に実施した (pH シフトは約 8.5 から約 12.5 まで進み、約 8.5 へ戻る)。3% の PEG 3000 を含有する STET 緩衝液中に細胞を再懸濁し、20 でリゾチーム (500 U/mL) とともに温置することによって、瓶 3 中の可溶化液を生成した。瓶 4 は、瓶 3 と同じ可溶化液を含有するが、塩基/酸工程は、リゾチーム温置後に実施した。pH のシフトされ、PEG 処理された材料は、2 日にわたって重力のみにより沈殿し、遠心分離中の成果の改善が得られるであろうことを示した。PEG は、細胞細片の、特に宿主細胞可溶化液の塩基/酸処理後 (すなわち、pH シフトは pH 約 8.5 から pH 約 12.5 まで進んだ後、pH 約 8.5 まで戻った; 上述のとおり) の凝集剤として特によく作用すると判定した。実際、PEG の添加は、逆の効果をもたらし、すなわち、塩基/酸処理へ供されなかった可溶化液へ適用された場合、細片はペレットにするのがより困難となった。

【0083】

PEG により誘導される凝集をさらに検査するため、図 2 に記載のように処理された様々な細胞可溶化液を 50 mL の遠心管へ一定分量に分けた。瓶を回転式ミキサーにおいて 15 分間温置した後、遠心分離した。図 2 に示された結果は、塩基/酸処理へ供された可溶化液へ添加されたときの、凝集剤としての PEG の作用を示す。図 3 は、図 2 において検査された 6 つの試料の上清についての濁度測定結果を示す。コントロールの 730 NTU 濁度 (チューブ 2) と比較した、5% の最終 PEG 濃度での遠心分離後の 15.5 NTU の溶液濁度 (チューブ 6) を示した。このことは、遠心分離が、仕上げのろ過を使用せずに 20 未満の NTU 清澄に到達する清澄戦略として使用できることを示す。これらの結果は、PEG は、塩基/酸処理前又は後のいずれかで添加される場合、効果的な凝集剤であることも示す。

【0084】

細胞細片の凝集に及ぼす PEG 分子量の効果—細胞細片の沈殿性能に基づいた迅速スクリーニング法を使用して、凝集に及ぼす PEG の濃度及び分子量の効果を研究した。リゾチーム (500 U/mL) の存在下で細胞を温置し、上述の塩基/酸処理へ供した。様々な PEG ストック溶液を可溶化液の 10 mL 量へと混合し、生じた混合物を室温で約 16 時間沈殿させた。沈殿した固体の体積及び上清の濁度 (OD₆₀₀) を測定した (図 4 A)。高濃度の PEG は、公知の DNA 沈殿剤であり、DNA 濃度も測定した。図 4 B は、PEG 3000 を使用した研究に関する (AEX アッセイによって測定される) DNA 濃度及び上清濁度の両者を示す。細胞細片は凝集するが DNA は沈殿しない PEG 3000 濃度範囲があることも結果は示す。結果は、PEG 3000 濃度が約 5% より上に増加された場合、DNA が沈殿することも示す。

【0085】

PEG 6000 DNA 凝集実験—アルカリにより pH シフトされた後中和された可溶化液を利用して、プラスミド DNA 沈殿曲線を PEG 6000 に関して作成した。沈殿曲線

10

20

30

40

50

を図 5 に示す。このデータから、本発明の可溶化 / 可溶化液清澄化工程の間の約 3 . 7 % の P E G 6 0 0 0 濃度が、宿主細胞細片の凝集の間にプラスミド D N A を沈殿させる何らかの危険性を十分に排除する (6 % 超の P E G 6 0 0 0) 。

【 0 0 8 6 】

効果的な可溶化に関する細胞スラリー濃度の上限—リゾチーム温置後の、可溶化液の清澄化のための塩基 / 酸処理及び P E G 添加を含む、上述の新規の可溶化法を使用して可溶化できる細胞の最大濃度を測定するための研究を実施した。幾つかの細胞スラリー濃度 (6 0 0 n m の光学密度 OD_{600}) に関して表される。) を研究した。70 の初期の OD_{600} が最適であることを決定し、約 0 . 7 g / L の全 D N A 濃度で可溶化液が清澄化された。この初期の細胞可溶化液へ塩基、酸及び P E G 溶液を添加した後、そのもとの値から ~ 6 0 まで OD_{600} をわずかに希釈する。

10

【 0 0 8 7 】

C T A B 低カット不純物沈殿—P E G 6 0 0 0 による凝集の後、溶解性タンパク質のレベルを低下させるために (可溶化液の清澄化の前に) 凝集された可溶化液へ、C T A B が添加されることがわかった。40 m M の N a C l 中の 2 % (w / v) C T A B を 0 . 1 5 % (w / v) の最終濃度へ 1 時間かけて添加することによって、このことを実施した。図 1 8 は、最終的な C T A B 濃度の関数として B C A アッセイによって測定されたタンパク質レベルを示す。0 . 1 % (w / v) と 0 . 2 % (w / v) との間の C T A B で最小のタンパク質濃度が得られる。

20

【 0 0 8 8 】

凝集手法時の連続的な遠心分離—連続的な遠心分離条件をシミュレートするため、高次コイルプラスミド D N A を含有する宿主細胞可溶化液の P E G 凝集を、(C T C 3) W e s t f a l i a 遠心分離モデルで検査した。この遠心分離モデルは、固体を除去することはできないが、より大きな生成量の遠心分離と同じ内部幾何学構造を有する。前記遠心分離は、固体に関する保持能力 1 L の 2 L ボールを有する。(リゾチーム温置、アルカリ p H シフト及びその後の中和を介して生成される) 関心対象の高次コイルプラスミド D N A を含有し、P E G 6 0 0 0 で凝集された宿主細胞可溶化液は、250 m L / 分で 10 , 000 × g で作動するユニットを通過した。可溶化液の約 18 L が、ボールを充填する前にユニットを通過できた。固体は非常に厚く、圧縮されたが、実施の時間経過にわたって D N A 濃度に損失はなかった。濁度は、最終清澄化可溶化液において 30 N T U 未満であった。

30

【 0 0 8 9 】

仕上げる過—上述の遠心分離手法に加え、遠心分離された可溶化液から残留固体を除去するために、仕上げ深層ろ過が利用できる。例えば、セルロース又は珪藻土をベースとした深層フィルター (例、M i l l i p o r e D E 4 0 又は C E 5 0 フィルター) は、約 70 L / m² の概算負荷で利用できる。

【実施例 2】

【 0 0 9 0 】

リゾチーム温置、塩基 / 酸処理及び P E G 凝集後のプラスミド D N A 精製

分析方法—実施例 1 の方法を参照してほしい。

40

30 L の可溶化 : 2 , 000 L の E . コリ発酵工程から回収される高次コイルプラスミド D N A を含有する凍結細胞を、温かい (約 35 °C) の水槽中で解凍し、5 インチの A 310 羽根車を備えた 50 L の L e e T a n k 中の S T E T 緩衝液 (50 m M トリス H C l 、100 m M の E D T A 、2 % (v / v) T r i t o n (R) X - 100 、8 % (w / v) スクロース、p H 8 . 2) を使用して、 OD_{600} が 70 になるよう希釈した。30 L の再懸濁容積を達成した。R e a d y - L y s e ^{T M} リゾチーム (500 U / m L 、E p i c e n t r e) を添加し、生じた細胞スラリーを 37 °C で約 2 時間温置した。細胞スラリーをその後 20 °C へ冷却し、5 M N a O H を 60 分間かけて表面下モードでゆっくり添加し、リゾチームの可溶化液の p H を約 12 まで増大させた。30 分の保持時間の後、2 . 5 M 酢酸を 60 分かけて添加し、p H を 8 ないし 9 へ低下させた。R C M 6 (塩類溶

50

液、150 mMのNaCl)中のPEG3000(50%(w/v))をその後ゆっくり添加して、5%(w/v)のPEGの最終濃度にした。NaOH、酢酸、及びPEG3000の添加後の総可溶化液容積は、30 L(約70のOD₆₀₀)から35 L(約60のOD₆₀₀)まで増大した。PEGで凝集された可溶化液をその後、1 LのJLA8.1000遠心瓶に移し、15.9 kGで15分間遠心した。上清をプールし、約17 NTUの濁度を有する清澄化した可溶化液を生じた。プールした清澄化可溶化液をその後、4で保存した。

【0091】

4.3 Lの溶解：直径3インチのA310羽根車を有する7 Lのジャケットのついたガラス容器を使用して、高次コイルプラスミドDNAを含有する1 LのE. コリ発酵から同じ4.3 Lの溶解を完了した。容器は丸底で、直径は10インチであり、液体レベルは約8インチであった。羽根車を、概ね15度の角度で配置し、400 rpmの速度で作動させた。Ready-LyseTM リゾチーム(500 U/mL)を添加し、pHシフト前に37で2.5時間温置した。その後、温度を20ないし25まで低下させ、60分かけて、5 N NaOH(0.0150 L、0.25 Mの最終溶液濃度)を添加した。塩基添加後のpHは12.5であった。塩基の添加後、(羽根車の剪断によるいずれかのDNA分解を防止するのを補助するために)混合速度を250 rpmまで下げ、可溶化液を高pHで30分間温置した。60分かけて、0.25 Mの最終溶液濃度になるように、濃酢酸(2.5 N、0.3 L)を添加した。酸添加の5分間、より良好な混合のために、羽根車速度を350 rpmまで上昇させた。酸添加後の最終的なpHは8.4であった。その後1時間かけて、濃縮したPEG3000(50%; 0.475 L)ストックを添加した。約30分間置いた後、1 LのBeckman遠心瓶中に、可溶化液を一定分量に分け、15 kGで15分間遠心分離した。20 µm、直径4インチのステンレス鋼スクリーンを通じて、得られた上清を10 LのNalgene容器中に傾斜して移し、全ての大きな粒子を捕捉した。

【0092】

結果—実施例1に記載のプロープ実験の結果のように、4.3 Lの溶解手法を実施した。清澄化された可溶化液の総DNA濃度は、ゲル電気泳動アッセイによって測定されたとことによれば、0.8 g/Lであった。宿主ゲノムDNA濃度のqPCR分析から得られた結果を表1に示す。清澄化された可溶化液は、約2%のゲノムDNAを含有するに過ぎないことが測定され、これは、熱溶解法を使用して典型的に達成されるゲノムDNAレベルの有意な低下(約10ないし15%)である。このゲノムDNAの低下は、プラスミドDNAと比較して、E. コリゲノムDNAの低い拡散能による。E. コリゲノムDNAが約400 kbであり、典型的なプラスミドDNA分子が約10 kbであるため、質量の差は、劇的に異なる拡散能を引き起こす。塩基性条件下でDNAを変性させると、プラスミドDNAは迅速に再アニールできるのに対し、ゲノムDNAは再アニールできないので、細胞細片との二次的な相互作用を生じ及び総ゲノムDNAレベルの低下を生じる。

【0093】

【表1】

表1 4.3 L可溶化についてのqPCRの結果

記載	総DNA 濃度* (g/L)	容積 (L)	プラスミドDNA 質量 (g)	ゲノムDNA 濃度 (µg/mL)	ゲノムDNA (%)	ゲノムDNA 低下 (%)
OD ₆₀₀ 70 可溶化液	0.96	4.3	4.1	64.2 ± 13.1	6.3 ± 1.3	-
pHシフト後	0.85	4.7	4.0	20.9 ± 2.1	2.4 ± 0.2	62 ± 12
清澄化可溶化液	0.82	4.8	3.9	18.5 ± 2.8	2.2 ± 0.3	65 ± 17

*総和された電気泳道ゲル由来の値

【0094】

溶解手法を、30 L規模でも実施した。結果は、87%のピーク3を有する、総DNA

の 0.74 g/L の収量であり、ピーク 3 の百分率 (%) は、2 つの陰イオン交換ピークの比であり、高次コイルの DNA の百分率と相関している。この相関は、ピーク 3 の百分率が高ければ高いほど、高次コイルプラスミド DNA の百分率が高いことになる。表 2 は、溶解時の異なる工程での AEX アッセイの結果を示す。表 2 の最後の列は、本明細書に記載されている上流精製プロセスで到達可能な増大された DNA 濃度を示す。さらに、清澄化可溶化液の最終濁度は、12.1 NTU であった。

【0095】

【表 2】

表 2 30 L 可溶化に関する AEX アッセイの結果

記載	AEX アッセイに 使用された 希釈因子	総 DNA 濃度 (g/L)	ピーク 3 中の % 総 DNA	ピーク 3 濃度 (g/L)	測定された総 DNA 濃度 (もとの可溶化液 1 mL あたりの プラスミド DNA の g)
OD ₆₀₀ 70 可溶化液	30	0.862	93.9%	0.809	0.862
pH シフト後	30	0.820	74.4%	0.610	0.906
清澄化可溶化液	30	0.742	87.0%	0.646	0.902

10

【0096】

本明細書に記載されている新規溶解は、約 0.9 g/L の DNA 濃度及び 70 の OD₆₀₀ で実施できる。従って、この高濃度のために、タンクを実質的により小さくすることができ、熱可溶化手法と比べ、大きな処理容器を必要としない。この溶解は、従来のプラスミド DNA 生産処理の濃度のほぼ 2 倍で実施でき、単一のタンクを利用し、E. コリ染色体 DNA レベルを低下させ、及び新規の PEG をベースとした凝集工程を介する下流の固体分離を簡素化する。

20

【実施例 3】

【0097】

最終的な DNA 仕上げプロセス：

PEG 沈殿及び PEG 沈殿物の精密ろ過法

参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第 09/875,379 号 (米国公報番号 US 2002/0012990) に記載されている従来の DNA 精製処理は、ケイ酸カルシウム (例、LRA) のろ液を、約 7 + mg/mL の DNA まで濃縮するために、プロセスの終了時に限外ろ過 (「UF」) 工程を利用し、その後、製剤緩衝液 PBS への緩衝液交換のための 10 × の透析ろ過を利用した (図 6A 参照)。この最終的な仕上げ工程は、約 100 L 以下の容積では満足のいくものであったが、より大きな製造規模の精製処理は、ポンプサイズ及び流速が技術の限界に到達し始めることを示した。これらのプロセス規模の拡大の問題を回避するため、プラスミド DNA プロセスの最終 UF 工程を、PEG 沈殿手法及びその後の 2 つの個別のろ過 / 透析ろ過工程と置換した (図 6B 参照)。接線ろ過モードの下での微量ろ過を含む第一のろ過 / 透析ろ過工程は、沈殿したスラリーを濃縮し、残留 RNA 及び不純物を除去する。第二のろ過 / 透析ろ過工程は、PEG をエタノールと置換し、DNA を脱水する。最終湿潤生成物を十分な真空下で乾燥させ、DNA の微細粉末形態を得る。この工程を無菌的に実施する限り、エタノール添加により生成物を乾燥させた後にろ過滅菌する必要はない。従来の仕上げ処理は、新規の PEG 沈殿処理の 4 工程と比較して、2 つの工程を必要とするだけであったが、PEG 処理は、生成物の品質に欠陥を生じたり、非常に大きなポンプ及び流速の使用を必要としたりせず、製造容積に対して大規模に実現可能である。新規の処理には、不純物をさらに低下させるためのさらなる精製工程も含まれるのに対し、従来の処理は、プラスミドを濃縮し、緩衝液交換のために提供されるのみであった。この新規のユニット操作には、残留 RNA レベルをおそらくは 2 対数以上まで低下させる能力があり、過剰の流速及び大きなポンプを必要とせず、周期時間を短縮し、必要な貯蔵空間を削減し、おそらくはより安定した生成物を提供する粉末化した生成物を提供する。

30

40

50

【0098】

P E G中のDNA溶解性（沈殿のキネティクス）—L R A後のろ液中のプラスミドDNAを完全に沈殿させる必要のあるP E G 8000の濃度を、変動する温度及び総DNA濃度の下で検討した。DNA濃度は0.3 mg/mLと1.0 mg/mLとの間で変動させた。何故ならばこれが大規模精製手法において遭遇する値と見込まれるからである。図7Aは、P E G濃度が2%（w/v）超であるとき、P E G 8000の溶液中のDNAの溶解度の急激な低下があることを示す。研究された範囲に関する溶液温度又はDNA濃度によって、DNA溶解度は何ら影響はなかった。図7Aの結果は、DNAが約4%のP E G 8000によって完全に沈殿することを示すが、しかしながら、2×の安全要素を提供するため、本研究の残りにおいて8%のP E G 8000濃度を選択した。

10

【0099】

別のサイズのポリマーが沈殿により適しているかどうかを決定するため、P E Gの異なる分子量を評価した。図7Bは、研究された範囲に関して400分子量のP E G中でDNAが完全に溶解性であることを示し、ポリマーの分子量が増大するにつれ、DNAを沈殿させるのに必要なP E Gの臨界的な質量は低下する。このことは、例えば、分子量3,000と10,000の間の何らかのP E GがDNAを効果的に沈殿させるのに使用でき、結果的にP E G濃度が調整されることを示す。

【0100】

P E G添加後の2時間の保持時間が、DNA沈殿を完了させるのに十分であることを確認するため、P E G沈殿のキネティクスを研究した。図8は、約5分後、DNAの99%超が沈殿することを示し、2時間の保持時間が十分すぎることを示す。

20

【0101】

実験手法—残留RNA及び他の溶解性不純物を除去することによってプラスミドDNAをさらに精製するため、以下の仕上げプロセスを開発し、高次コイルDNA及び幾らかの残留塩からなる最終的な粉末化した生成物を生じた。粉末化した生成物は、液体製剤中再懸濁できる。

【0102】

本発明の新規の下流濃縮/仕上げ処理を示すために使用される出発溶液は、米国特許出願第09/875,379号（上述）に記載のL R A後のろ液である。溶液の組成は、3 M NaCl、1.0 mg/mLの精製されたDNA及び幾らかの残留RNAである。P E G 8000分子量（Fluka）を使用して、DNAを沈殿させ、3000ないし10,000の分子量範囲を検討した。L R A後のろ液をまず20℃に加温し、中程度の速度（50 rpm）で攪拌バーを使用して攪拌した。最終溶液濃度が8%（w/v）になるまで、約33%（w/v）の濃縮ストック溶液としてP E G 8000を15分かけて添加した。沈殿物を2時間寝かした後、Amer sham Biosciences社製の0.45ミクロンの中空のファイバー膜の接線流フィルターを使用して濃縮した。膜上での負荷は、膜の面積1 m²あたり180 gのDNAであった。再循環速度は、9 L/m²/分であり、流量を2.5 L/m²/分で調節した。20×濃度に到達するまで、透過を調節し、濃縮した保持液をその後、5透析容積のための1.2 MのNaCl中の8%（w/v）のP E G 8000に対して透析ろ過した。この保持液を回収し、膜の4.5 L/m²の容積で1.2 MのNaCl中の8%（w/v）P E G 8000を使用して膜を洗浄した。この洗浄を保持液産物と組み合わせることができる。200度数のエタノールの1当量の表面下の添加によって、最終的な保持液を50%（v/v）エタノールまで調整した。エタノール添加の間、沈殿したスラリーを十分に攪拌したままにし、エタノールの「ホットスポット」の形成を回避した。250ミクロンの316 Lステンレス鋼（SS）フィルタースクリーンが装備されたフィルター乾燥機中で、この溶液を約30 g/Lの沈殿したDNAスラリーまで濃縮した後、6透析容積のための200度数のエタノールに対して透析ろ過し、流量は3.2 L/m²/分に調節した。スラリーを懸濁したままにするために、この透析ろ過の間、中程度の攪拌を使用した。フィルターの負荷は0.3 kg DNA/m²であったが、この数は不十分負荷のフィルターを使用して実施した実験から得られたため

30

40

50

、この負荷は下限値であると考慮されるべきである。ろ過後、粉末を真空下で、25ないし37 で24時間乾燥させた。

【0103】

分析方法—260、280、及び320nmの波長での紫外線分光法によって、DNA濃度を得た。DNAは、260nmの波長での1吸収単位あたり50($\mu\text{g}/\text{mL}$)⁻¹(cm)⁻¹の消衰係数を有する。純度を評価するために、260/280nmの比を算出した。1cm経路長のクォーツ微量キュベットへ試料(500 μL)を負荷した。フーリエ変換赤外分光法(「FTIR」)を使用して、PEG濃度を評価した。Ribogreenアッセイによって、RNA濃度を評価した。

【0104】

PEGにより沈殿したスラリーの濃縮(TFFでの精密ろ過法を含む第一のろ過/透析ろ過工程)—PEG沈殿の後、接線ろ過(「TFF」)モードでの精密ろ過法、続く透析ろ過を介する第一の濃縮工程(図6B参照)を使用して、生成物の作業容積を低下させ、沈殿後の溶液中に残留するいずれもの残留RNA及び非生成物可溶性物質を除去した。透析ろ過緩衝液は、透析ろ過中にプラスミドDNAが沈殿したままになっていることを確かにするために適切なPEG濃度及び塩濃度であるべきである。例えば、透析緩衝液が従来の沈殿工程において使用されているPEGのほぼ同一の百分率(例えば、上述の実施例中の8%(w/v)PEG)及び約1.2MのNaClを含有する場合、プラスミドDNAは沈殿したままである。上述の実施例条件において、NaCl濃度が1.2Mをはるかに下回って低下する場合、DNAを沈殿したままにするためにさらなるPEGが必要であり得る。実験は、100mMと600mMの間のNaClの最小の必要な塩濃度が、50%(v/v)エタノール溶液中でDNAを沈殿したままにするのに必要であることを示している。従って、上限の600mMのNaCl近くで操作するため、第一透析ろ過後の塩濃度は、少なくとも1.2MNaClである必要がある。1.2MNaClの値は、その後のエタノール添加工程のためにも十分効果がある。

【0105】

本明細書に記載のPEG沈殿、それに続く精密ろ過法/透析ろ過工程は、RNAの相当な低下を示す。表3は、上述の精製処理の1.2MのNaCl中の8%PEGに対する第一の透析ろ過工程にわたるRNAクリアランスを示す。表4は、PEG沈殿工程にわたる総クリアランスを示す。表3は、RNAのほとんどが初期の透析容積の後に除去され、第三の値まで定量可能な限界を下回ること示す。表4は、残留RNAがほぼ2対数まで低下すること示す。この低下は、RNAの供給濃度がより高い場合、おそらくより大きくなる。最終生成物のRNA濃度は、L.O.D.近くであった。

【0106】

【表3】

表3：第一透析ろ過中のRNAの除去

	RNA濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)
LRA後のろ液	37.1
透過液透析容積1×	3.136
透過液透析容積2×	0.948
透過液透析容積3×	<0.8**
透過液透析容積4×	<0.8**
透過液透析容積5×	<0.8**
透過液透析容積6×	<0.8**
最終生成物	1.12

**検出限界未満

10

20

30

40

50

【 0 1 0 7 】

【表 4】

表 4：PEG 工程へ供給されるものと最終生成物との間の RNA 百分率の比較

	DNA 濃度 (mg/mL)	%RNA
LRA 後のろ液	7.1	0.523
最終生成物*	4.94	0.023

* 3M NaCl へと希釈した先行試行から、LRA 後のろ液を採取し、LRA ろ液を近似するのに使用した。

10

【 0 1 0 8 】

PEG クリアランス（第二ろ過 / 透析ろ過工程）— プラスミド DNA を濃縮し不純物を除去するための、第一ろ過（すなわち精密ろ過法）並びに PEG 及び NaCl に対する透析工程の後、200 度数のエタノールを 15 分かけて供給することによって、50%（v/v）エタノールになるように、プラスミド DNA 生成物を調整した。これにより、沈殿の特徴を容積排除から脱水機序まで変化させ、沈殿した DNA の物理的特性をゲル状の物質からより硬質のほとんど圧縮できない沈殿物へと変化させる。得られた沈殿は、第二のろ過工程での良好な流量及び高い負荷容量に至る多孔性構造へと充填する。異なるエタノール濃度が、調整工程について可能であるが、約 30%（v/v）と 80%（v/v）の間の範囲内のエタノール濃度が好ましい。30% の危険性を下回る濃度は、DNA を溶液へと再溶解する一方、80% を上回る濃度は、DNA とともに塩を沈殿し始める。

20

【 0 1 0 9 】

第二ろ過工程後の 200 度数のエタノールに対する透析ろ過（図 6 B 参照）を使用して、溶液中のいずれもの残留 PEG を除去し、粉末をさらに脱水し、できるだけ多くの塩を除去した。攪拌されたセルモードのもとでのフィルター乾燥機システムでのろ過の後、200 度数のエタノールに対する 6 × 透析ろ過によって、エタノールで調整されたフィードを 50 mg/mL の DNA 濃度まで低下させた。上述の実施例において、フィルター負荷は、0.3 kg DNA / m² であったが、この負荷は、使用されたフィルターの設定は不十分負荷であるため、下限値であると考えられる。フィルターを通じての流量を、3.2 L / m² / 分で調節した。最終 PEG 濃度を FTIR によってアッセイしたとき、全ての読み取りは検出限界を下回った（0.05% PEG 未満）。湿潤粉末をその後回収し、25 ないし 37 °C で真空乾燥した。乾燥した生成物中に過剰の塩が残留する場合、硬く光沢があり、再溶解するのが非常に困難になる。

30

【 0 1 1 0 】

検査されたプラスミド DNA の最終収率は、90% を超えており、約 90% の DNA、5% の NaCl、残留水、残留エタノール、及びおそらくは残留 PEG の純度を有する。

【実施例 4】

【 0 1 1 1 】

アルコールによるプラスミド DNA 沈殿

材料及び方法— 米国特許出願第 09 / 875,379 号（上述）で記載の方法により、以下の実験に使用されるプラスミド DNA を精製した後、表記の濃度になるように希釈した。エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、塩化ナトリウム及び酢酸ナトリウムを Fisher から購入した。渦巻攪拌で混合した検査チューブの実験において、プラスミド溶解性データを得た。沈殿剤をプラスミド溶液へ添加した後、シリンジフィルターを使用して上清試料を採取し、ろ過した試料中のプラスミドの濃度を Molecular Devices による紫外線プレートリーダーで測定した。アルコールは紫外線光を吸収するため、Speed Vac を使用してアルコールを含有する全ての試料を乾燥させ、測定前に水中で再溶解した。ジクロロフルオレセインを指示薬として使用して、硝酸銀で滴定することによって、塩化ナトリウムイオン濃度を測定した。

40

【 0 1 1 2 】

50

エタノールによるプラスミド沈殿—図 9 A は、33、50 及び 67 % のエタノールレベルで、1.8 M と 3.4 M の間の NaCl 供給濃度で回収されたプラスミド DNA 溶解性データを示す。急激な溶解性の低下が、30 % エタノールと 33 % エタノールの間で生じた。30 % エタノールで、プラスミドは、使用される塩濃度では沈殿しなかった。33 % 以上のエタノールで、溶解性は、0.5 g/L の初期のプラスミド濃度に関して約 99 % の沈殿収率に対応した。エタノール添加前に基づいて全ての NaCl 濃度を報告し、その報告は、最終溶液中の NaCl 濃度が報告されたものよりも低かったことを意味する。図 9 A は、1.8 ないし 3.4 M のエタノール添加前濃度でのプラスミド溶解性に及ぼす NaCl の効果がほとんどないことを示す。しかしながら、NaCl を使用しないとき、70 % の過剰量のエタノール濃度が、1.0 g/L のフィード原液を使用して溶液からプラスミドを沈殿し始めるのに必要であることを観察した。従って、NaCl は、明らかにプラスミド溶解性にある役割を担っている。

【0113】

これをさらに探究するため、NaCl のより低い濃度を、エタノールの様々な濃度とともに使用した。結果を図 9 B に要約する。点線は、沈殿が生じなかった場合の各溶液に関して存在するプラスミド濃度を表す。この値は、供給プラスミド濃度が一定のままであるため、エタノールレベルとともに変動する。明確な「塩析」効果を観察する。図 9 B の結果は、ろ過した DNA から塩を洗浄する重要性を提示する。例えば、プラグタイプの洗浄がほとんどなされない場合、低塩及び低アルコールの組み合わせが生じ得、プラスミドを再溶解する。プラスミドを溶解せずに塩化ナトリウムを除去する洗浄プロトコルの開発を援助するため、様々なエタノール組成での NaCl の溶解度を測定した。このデータを図 10 に示す。

【0114】

イソプロパノール（「IPA」）によるプラスミド沈殿—表 5 は、IPA - NaCl 系の限界値を検査する実験に関して集められた全ての溶解度データを要約する。アルコール添加前に基づいて、NaCl 濃度を報告する。95 % 超の収率が観察される条件を灰色で強調する。アルコール又は塩の濃度の増大がまず、プラスミド溶解度の低下を生じたことは明白である。しかしながら、高いアルコール濃度又は塩濃度では、さらなる添加が溶解度を増大させた。

【0115】

【表 5】

表 5 : NaCl との IPA-水混合物中の DNA プラスミドの測定された溶解度

		NaCl 濃度 (モル濃度、NaCl 添加前ベース)									
		0	0.1	0.5	1	1.8	2	2.6	3	3.4	4
% IPA	予想されるプラスミド濃度 (g/L)	測定されたプラスミド濃度 (g/L)									
10	0.45				0.331		0.284		0.398		
25	0.375		0.368	0.250	0.015		.0042		.0056		0.365
33	0.335	0.293	0.337	.0084	.0031	.0013		.0014		0.333	
50	0.25	.0047	.0021	.0017	.0017	.0041		.0025		0.245	
67	0.165	.0019				0.166		0.164		0.165	

【0116】

図 11 は、2 つの IPA 濃度での IPA - NaCl 系に関する「塩析」及び「塩溶」の極値を示す。この図は、塩のみの効果を示すが、表 5 は、この効果が一定の塩濃度での IPA に関しても達成されることを示す。これらの結果は、タンパク質沈殿に対して類似であり、そこでは静電遮蔽が「塩析」を生じるが、十分な濃度のカオトロープは「塩溶」を生じる。このことは、DNA 沈殿が塩基対間の分子間疎水性相互作用の結果であることを

示す。穏やかにカオトロピックのNaClを使用して得られる結果と比較して、コスモトロップである酢酸ナトリウムを有するIPA中のプラスミドの溶解度を、様々な条件で測定した。図12及び12Bは、本実験の結果を要約する。67%エタノールで、酢酸ナトリウムの存在は、プラスミドの溶解度を低下させるが、他の百分率点では、プラスミド溶解度は、NaClの等しい濃度を用いた場合と比べて、酢酸ナトリウムを用いた場合に、実際により高い。

【0117】

メタノールによるプラスミド沈殿—1ないし3MのNaClと組み合わせられた33%及び50%のメタノール濃度では、プラスミドを沈殿することができなかった。これは、プロセスへの使用に関してメタノールが望ましくなくなるが、67%ではプラスミドを沈殿できた。表6は、これらの結果を表示する。「塩析」現象は、はっきりと明白である。

【0118】

【表6】

表6：メタノール-水混合物中でのプラスミド溶解度。
プラスミドは50%以下のメタノールで完全に溶解した。

%メタノール	[NaCl], メタノール添加前	プラスミド 溶解度	0.5 g/L プラスミド供給での収率
67	1.8 M	0.102 g/L	38.7 %
67	2.6 M	0.028 g/L	82.9 %
67	3.4 M	0.0023 g/L	98.6 %

【0119】

アルコール沈殿実験の要約—3MのNaClを含有するプラスミド溶液へエタノールを添加すると、プラスミド溶解度の急激な低下が、30%と33%の間のエタノール濃度で生じる。33%以上のエタノールで、0.5 g/Lのプラスミド溶液に関する溶解度をベースとした収率は、約99%である。水-エタノール混合物中で、NaClの濃度の増大は、プラスミドの溶解度を低下させる（すなわち「塩析」）。水-EPA混合物中で、塩析濃度を超える塩の添加は、溶解度を増大させる（「塩溶」）。コスモトロピックの酢酸ナトリウムを置換するとき、塩析及び塩溶の両効果は低減した。メタノールには、高濃度の塩溶液からプラスミドを沈殿させる能力があるが、50%超の溶媒レベルを必要とする。

【実施例5】

【0120】

最終的なDNA仕上げプロセス：アルコール沈殿

上述のように、TFFモードでのプラスミドDNAのPEG沈殿及び精密ろ過法は、大規模プラスミドDNA精製処理の最終濃縮/仕上げ工程において限外ろ過を置換する実行可能な選択肢である。米国特許出願第09/875,379号（上述）に記載の初期の開発作業は、エタノールが、沈殿溶媒として利用でき、プラスミドDNAの乾燥粉末形態を獲得できることを示した。しかしながら、速度はゆっくりで、ケーキの極度の圧縮は、段階的な洗浄勾配を適用するにもかかわらず明白であった。本実施例は、精密ろ過法によって増大されるアルコール沈殿を特徴とするプラスミドDNAの精製されたバルクの粉末形態を調製するための処理を記載する。本アプローチを強化するものとして、精密ろ過法と同時の連続的な沈殿が、バッチ法と比較して容器の容積を有意に低下させ得る。

【0121】

材料及び方法—実施例4の「材料及び方法」を参照してほしい。圧力ゲージ及び0.45 µmシリンジフィルター付きのPellicon XL精密ろ過カートリッジを、Milliporeから購入した。真空ろ過装置及び膜をFisherから購入した。

【0122】

バルクのプラスミド粉末を調製するための段階的なろ過/透析ろ過処理—プラスミド沈

殿に関して必要な条件を溶解度データが一度確立した時点で、ろ過による沈殿した粉末の回収を試行した。

【0123】

メタノールに対するその少量の容積の必要性及びIPAに対するその頑強性のため、沈殿のための最適な溶媒としてエタノールを選択した。

【0124】

沈殿したプラスミドをろ過する第一の試行において、 0.86 g/L プラスミド及び 3 M NaCl を含有するLRA後のろ液溶液 200 mL へエタノール 134 mL をゆっくり添加し、 40% (v/v) エタノールの最終濃度を生じた。枝つきフラスコ及びフィルター面積が 2.1 cm^2 の 0.2 ミクロンの膜フィルターを使用して、ろ過を試行した。枝つきフラスコに真空 20 in を供給した。初期のろ過試行は、ろ過が進行するにつれ、流量の有意な低下を示し、ゲル状のフィルターケーキを形成した。使用されたフィルターは、酢酸セルロース及び硝酸セルロースからなるFisherブランドの膜であった。図13は、この懸濁液を使用する実験中に回収されるろ過データを示す。もとの 40% (v/v) エタノール濃度でデータを採取し、 50% (v/v) の濃度を生じるためにエタノールを添加した後に再度採取した。時間/容積 (t/V) 対容積 (V) のプロットにおける比較的真っ直ぐな線は、ほぼ非圧縮性のケーキを示す。 50% エタノールによる有意に高いろ過速度を観察する。本データを使用して、直径5フィートのフィルター (19.6 平方フィートの膜面積) を使用する大規模バッチろ過に必要な時間を概算した。算出された概算値は、 40% エタノールを使用する場合には 243 時間であり、 50% (v/v) エタノールを使用する場合には 44 時間である。これらの実用的でないろ過時間のため、大きな面積の接線ろ過 (「TFF」) 膜を代替法として検討した。

10

20

【0125】

沈殿したプラスミドの精密ろ過法での第一の試行には、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のPVDF膜を備えたMillipore Pellicon XL TFFカートリッジを使用した。整流装置のついたガラス混合容器中で攪拌されたプラスミド溶液へエタノールをゆっくり添加することによって沈殿を達成し、 40% (v/v) エタノールの濃度に到達した。プラスミド溶液の初期のNaCl濃度は 3 M であった。沈殿剤を2時間かけて添加し、約30分寝かした後、 30 mL/分 の再循環流速を使用して、精密ろ過法を試行した。図14Aは、経時的に回収された透過液の容積を示す。沈殿した懸濁液中のDNAの初期濃度も、各データセットに関して示す。懸濁液は、 15 mL/分 で簡単にろ過し、実験の時間経過にわたって透過液流量に減少はなかった。供給圧力ゲージは、ろ過を通じて約 10 psi の読み取りを維持した。本結果は、固体を膜表面から自由に除去し、ケーキ層を形成しなかったことを示す。初期懸濁液の容積は、各場合において 500 mL であった。

30

【0126】

スラリーを脱水してろ過及び乾燥に適するようにするため、濃縮した懸濁液をその後、エタノールの高濃度に対して透析ろ過した。この透析ろ過は、単離前及びフィルター乾燥機中での乾燥の前にどのようなNaClも除去する。プラスミドは 80% (v/v) エタノール溶液中で不溶性であるため、 80% (v/v) での透析ろ過を使用して、懸濁液からNaClを除去できる一方、プラスミドが不溶性である条件を維持できる。図14Bは、透析ろ過中のエタノール及び塩の濃度を示し、図9Bは、エタノール濃度が 80% (v/v) に到達する前の残留する塩の少量が、再溶解からプラスミドを保護することを示す。ろ過を通じてのエタノール濃度でのNaCl溶解度も示す。沈殿した懸濁液の透析ろ過において、透過液の流量は、約 15 mL/分 で一定のままであった。

40

【0127】

乾燥粉末を調製する第一試行において、約 4 g/L のDNAになるように濃縮した後、 80% (v/v) エタノールの2つの容積に対してプラスミド懸濁液を透析した。その後、 25 mm 直径、 0.2 ミクロンのPES膜での真空ろ過により、固体を回収した。一晚乾燥させた後、生成物の様相は、 89.4% エタノールでのエタノール/水の共沸混合物により、塊状になった。湿潤ケーキのエタノール濃度が共沸混合物の組成よりも低かった

50

ため、水の組成は乾燥中に濃縮され、固体を塊にした。その後の調合の試行も 80 % (v / v) エタノールによる透析ろ過後のろ過を使用した。その後、純粋なエタノールによる幾度ものケーキ透析ろ過洗浄を付加して、ケーキ中に残留する 80 % (v / v) エタノールを置換した。洗浄は、湿潤ケーキ中のエタノールレベルが乾燥前の共沸混合物組成を超過することを確実にした。粉末を、37 で一晚真空乾燥させた。残りの材料は、乾燥した、自由に流動する白色粉末であった。水中の材料を再溶解し、260 nmでの吸光度を測定すると、粉末は97 %の純度であることが示された。沈殿及び精密ろ過に関する収率は93 %であった。

【0128】

要約—エタノール (40 ないし 50 % (v / v)) を使用して沈殿させたプラスミドの真空ろ過は、ゲル状にもかかわらず、ほぼ非圧縮性のケーキを生じたが、ろ過速度は受容できないほどゆっくりであり、接線ろ過の必要性を示した。沈殿したプラスミドを濃縮した後 (アルコール透析ろ過により) 脱水するために、接線流精密ろ過法を首尾よく使用した。全量ろ過及びアルコールの多いスラリーの洗浄は実用的となり、真空乾燥によって自由に流動する粉末を生じた。沈殿、精密ろ過法、回収及び乾燥の組み合わせた工程に関する収率は93 %であり、固体は (A₂₆₀ による) 97 %純度であった。研究室規模で観察される流量に基づいて、本処理は、膜面積 215 平方フィートを使用して8時間で40,000 Lのバッチに関して実施できた。

【実施例6】

【0129】

プラスミドDNAの連続的なアルコール沈殿及び精密ろ過法：容器及びアルコール容積の縮小

バッチモードでのプラスミド沈殿は、沈殿に必要なバッチ容積及びエタノール量の両者を保持するのに十分大きな容器を必要とする。精密ろ過法がアルコールを同時に除去して一定の容積を維持する比較的小さな中間的な容器へと、供給物及びエタノールの両者が連続的に汲み出され得る場合、大きな沈殿容器はもはや必要ではなく、高い溶媒比で沈殿が実施される場合でさえ不要である。このモードにおいて、溶媒廃棄物は、透過液を連続的に蒸留し、沈殿容器へとリサイクルすることによって最小化できる。

【0130】

エタノール回収のない連続的な沈殿 / 精密ろ過アプローチをまず、限外ろ過及び精密ろ過の両膜を使用して試行した。これらの実験において、エタノールを、攪拌した容器中のフィード溶液へゆっくり添加して、約 40 % (v / v) のアルコール濃度に到達することによって、最初の 500 mL の沈殿した懸濁液を調製した。粒子は、約 30 分かけて完全に脱水できた。ろ過面積 50 cm² の Pellicon XL TFF カートリッジを使用して、得られた懸濁液の精密ろ過を実施した。懸濁液の容積が一度約 300 mL まで低下すると、供給溶液及びエタノール溶液を添加して、懸濁液の容積を一定に維持した。図 15A は、100 kD の PES 膜を使用する連続的な沈殿 / 精密ろ過に関するデータを示す。ろ過カートリッジに対する供給流速は、30 mL / 分であった。図が示すように、透過液約 200 mL を連続処理の間に回収した後、流量は、その初期値の約 20 % まで低下した。0.22 µm カートリッジを使用する試行において、同様の流量の低下を観察した。カートリッジを経由する圧力の上昇は、添加開始直後に明らかであった。圧力のこの上昇は、観察されたバッチ精密ろ過においては存在しない。この試行は、大きさ 1/4、内径 5/16" の柔軟な Masterflex チューブを使用し、ろ過中に供給物及びエタノールを添加した。この柔軟なチューブは、バッチ沈殿に使用される細いチューブよりも大きかった。

【0131】

精密ろ過が成功裏に実施できるためには、先立って脱水時間が必要であるように考えられるため、容器とフィルターとの間の保持容積は、粒子が膜に到達する前に乾燥しきることができる時間のずれを作成することによって、ろ過速度を改善し得る。沈殿容器とフィルターとの間のチューブの長さを挿入して、30 mL / 分の流速で1分の時間のずれを作

10

20

30

40

50

成することによって、この理論を研究室規模で検査した。図 1 5 B は、容器とフィルターとの間の 1 分の時間のずれを挿入した試行に関するデータを示す。この試行は、40 % (v/v) エタノール及び 30 mL / 分へ設定された供給ポンプも使用したが、この場合、0.1 ミクロンの P V D F 膜を使用した。時間のずれを伴う処理が、200 mL の透過液の容積を上回って、図 1 5 A で見られるよりも小さな流量 % の損失を示すことは明白である。しかしながら、図 1 5 A のデータよりも初期速度はゆっくりである。時間のずれを作成するために使用されるチューブの長さが、ペリスタポンプのスリップを生じ、攪拌した容器からの流速を低下させる摩擦抵抗をもたらすことが起こり得る。カートリッジを経由した迅速な圧力の増大を、ろ過中の供給物及びエタノールの添加のために 14 サイズの Masterflex チューブも使用したこの試行に関して再度観察する。

10

【0132】

図 1 5 C は、エタノール濃度を 50 % (v/v) に上昇させ、一方で図 1 5 B と同一の時間のずれの設定を使用した実験に関するデータを示す。この試行において、透過液流量のゆっくりとした低下は、40 % (v/v) エタノール試行から幾分小さくなったが、圧力の増大はさらにより劇的であった。圧力の増大により実行できなくなった 30 分後にのみろ過を停止した。この試行はまた、ろ過中の供給物及びエタノールの添加のために 14 サイズの Masterflex チューブを使用した。

【0133】

図 1 5 A ないし C の迅速な圧力増大は、半連続的沈殿 / 精密ろ過処理の実行可能性に関する問題である。透過液の速度が受容可能である場合でさえ、望ましいスラリー濃度に到達する前にチャネル閉塞によって生じる圧力の増大は、ろ過を終結させる。チャネル閉塞は大きな水和した粒子によって生じるようである。連続処理アプローチの間により小さな粒子を作製する試行において、ろ過の間に供給物及びエタノールを添加するために、先行実験で使用された 5 / 16 " の Masterflex チューブに替えて、細い H P L C チューブを使用した。図 1 6 A は、H P L C チューブを使用して、供給物及び 40 % (v/v) エタノールを時間のずれなく添加した試行に関するデータを示す。カートリッジを介する圧力の増大は、先行実験ほどには劇的ではなく、図 1 5 A に示すように、時間のずれのない先行実験と比較して相対的な流量の低下を改善する。細いチューブを出るより高い直線速度が、プラスミド溶液へのより細かなアルコール分散を生じ、それによりアルコールの局所的な過剰を回避するようである。アルコールの組成が不均一であるため、一連の沈殿及び再水和が生じ、膜チャネルを閉塞し得る大きな粘着性のある粒子が生じる。図 1 6 B は、50 % (v/v) エタノールによる同様の試行に関するデータを示す。透過液流量のゆっくりとした低下の速度は、50 % (v/v) エタノールでのより迅速な脱水により、図 1 6 A よりも非常にゆっくりである。より高い溶媒濃度での性能の改善は、沈殿のためにエタノールを多量に使用する他の生成物に対して良好な兆しである。

20

30

【0134】

要約—プラスミド沈殿容器のサイズは、一定の容積を維持するように、同一の容器から精密ろ過を同時に実施しながら、攪拌した容器へエタノール及びプラスミド溶液を連続的に添加する連続的な処理によって縮小できる。このアプローチに付随して、透過液の連続的な蒸留は、沈殿への濃縮したエタノールのリサイクルを提供し、必要な溶媒容積を最小化し、より高くより好ましくさえあるアルコール濃度で沈殿を可能にする。精密ろ過及び限外ろ過の両膜を使用する連続沈殿 / ろ過の実験運転において、バッチ沈殿後に得られる定常な透過液の流量とは対照的に、透過液の流量が低下した後、定常速度に到達した。バッチの場合とは対照的に、カートリッジを介する圧力の増大も観察した。L A S E N T E C によるバッチの沈殿の粒子サイズのモニタリングは、たぶん凝集及び脱水が同時に起こることを反映するアルコールの添加後約 15 分の寝かし時間をとって、粒子の平衡サイズを増大させる必要があることを示す。新たに形成された孔を目詰まりさせる粒子は接線フィルターへ直ちに引き抜かれるので、連続処理アプローチにおいて、この寝かし時間を提供できなかったことが、流量値の低下の原因と説明し得る。連続沈殿 / 精密ろ過アプローチにおける容器とフィルターとの間の粒子の寝かしを可能にする 1 分間のホールドアップ

40

50

量の追加により、透過液の流量を改善した。半連続的アプローチの間の供給物及びエタノールの添加のためのより小さな直径のチューブの使用は、カートリッジを介する圧力を低下させ、流量も改善させた。細いチューブ口を出る液体のより高い直線的な速度は、バルクの懸濁液へのエタノール及び供給物の分散を改善しているようであり、これにより迅速に脱水し膜チャネルを詰まらせない、より均一でより小さな粒子を供給する。

【実施例 7】

【0135】

pHシフトされたDNA可溶化液への剪断

材料及び方法—7 Lのジャケット付きガラス容器に、目的の高次コイルプラスミドDNAを含有する $OD_{600} = 300$ のE. コリ細胞2 Lを懸濁して、STET緩衝液中 $OD_{600} = 70$ にした。これに、組換えリゾチーム500単位/mLを添加し、 37 ± 2 に加温した。回収した細胞を、この可溶化緩衝液中で少なくとも2時間温置した。材料約5 Lをさらなる研究のために採取し、残りの4.7 Lを利用して、300フィート/分から2000フィート/分までの尖端速度を用いて、増加した剪断速度へこの可溶化液を暴露した。速度を最終的な尖端速度2000ft/分まで、増大させる前に、各尖端速度で材料を10分間保持した。最後に、尖端速度を300ft/分まで低下させ、pH12の可溶化液を一晩混合した。

10

【0136】

結果—本発明の上流の可溶化/可溶化液清澄化プロセスの実施（すなわち、リゾチームの可溶化/pHシフト/PEG凝集）による可能性ある分解問題を判断するため、多様な尖端速度へ暴露したpH12の可溶化液の剪断感度を測定した。表7は、DNA濃度（g/L）及び0.8%アガロースゲルによって測定された高次コイルプラスミドDNA含有量の百分率（「%SC」）を定量した結果を示す。尖端速度が2000フィート/分に増大するまで、高い総DNA濃度及び高次コイルプラスミドDNAの百分率を維持した。従って、2000フィート/分までの尖端速度ではプラスミドDNAに対する損傷を記録せず、本発明の一部として開示される可溶化技術が、可溶化容器中でDNAを剪断せずに宿主細菌細胞を可溶化するのに十分であることを示した。

20

【0137】

【表 7】

表 7 : pHのシフトした可溶化液剪断研究からのデータ

30

尖端速度 (ft/分)	RPM	サンプリグ 時間	DNA 濃度 (g/L)	ゲル からの %SC
300	255	0 分	0.51	51.7%
500	425	11 分	0.51	54.0%
700	594	22 分	0.56	---
900	764	33.3 分	0.60	64.2%
1100	934	44 分	0.64	67.3%
1300	1104	55.7 分	0.67	72.9%
1500	1274	67 分	0.69	74.5%
2000	1699	78 分	0.67	77.3%
一晩	255	~16 時間	0.52	60.6%

40

【実施例 8】

【0138】

プラスミドDNAの精製

可溶化/可溶化液の清澄化—目的のプラスミドDNAを含有するE. コリ細胞を、まず、STET緩衝液（50 mMトリス、100 mMのEDTA、2% Triton X-100、及び8%（w/v）スクロース、~pH8.2）中で、 OD_{600} が約70になるまで懸濁する。組換えリゾチームを1167 U/mLで添加し（Epicentre te

50

chnologies)、混合物をまず 37 ± 5 にした後、2 時間温置した。温置が完了した後、1 時間かけて、5 N NaOH を可溶化液へ添加して、最終濃度を 0.24 N にし、1 時間温置させた。0.5 ないし 1 時間かけて、2.5 N 酢酸を添加することによって、溶液を pH 8.0 ± 1.0 に戻した。可溶化液をその後、50% (w/v) スラリー (150 mM の NaCl 中) に 1 時間かけて 3.7% (w/v) になるまで添加した PEG 6000 により凝集させた。凝集した可溶化液の清澄化を遠心分離 (例、Sharples AS 26 遠心分離機) により実施し、凝集した細胞細片を除去する (バッチの遠心分離も選択肢の一つであるが)。遠心分離後の濁度は 30 NTU 未満である。遠心分離後のより低い値を望む場合、仕上げのろ過を使用して、残留する細胞細片を除去するのに役立てられる。例えば、約 70 L/m^2 の負荷で Millipore DE 40 又は CE 50 デプスフィルターを有する 12 インチの Cuno ろ過ハウジングを使用して、10 NTU 未満の濁度に到達することができる。

10

【0139】

さらに、特に下流の LRAII ろ過を実施する場合には、可溶性タンパク質及びエンドトキシンを除去するために、CTAB 低カット沈殿工程を約 0.15% (w/v) まで実施することが可能である。これは、40 mM の NaCl 中の 2% (w/v) CTAB を、凝集した可溶化液へ 1 時間かけて添加してホストスポットろ過を防止することによって実施できる。材料はその後、上述の清澄化のために使用できる状態となる。

【0140】

CTAB 沈殿—高次コイルプラスミド DNA を、清澄化した宿主細胞可溶化液から、10 g/L の Cel pure P300 (珪藻土) の存在下で 0.50% (w/v) CTAB により誘導される単一の沈殿工程により沈殿させる。40 mM の NaCl 中の 2% (w/v) CTAB 溶液を、清澄化した可溶化液へ 2 時間かけて添加し、ホストスポット形成を防止する。可溶化液をろ過し、フィルターケーキをまず、50 mM の NaCl 含有の 5% IPA のバッチ容積の 4 分の 1 で洗浄する。その後、50 mM の NaCl のバッチ容積の 10 分の 1 で、フィルターケーキを洗浄する。CTAB 及び Triton (登録商標) X-100 のミセルは、DNA 沈殿の原因である。遊離 CTAB を上回るプラスミド DNA に関する CTAB/Triton X-100 ミセルの選択性の増大は、二本鎖 DNA の主鎖上でのリン酸塩の電荷の配置によるミセル中での CTAB の電荷の整列による。洗浄したケーキをその後、再溶解工程へ持ち込む。

20

30

【0141】

再溶解及びケイ酸カルシウムバッチ吸着—再溶解は、CTAB 沈殿した DNA 含有ケーキを、攪拌したフィルタータンクから手動で取り出すことを必要とする。このケーキをその後、3 M NaCl 中に再懸濁し、1.2 g/L の DNA 濃度にする (ここで、該標的 DNA 濃度は、約 0.3 ないし約 1.2 g/L の範囲であり得る。)。当初の 3 M NaCl 負荷は、1 g の DNA あたり 25 g の LRAII を含有し、最小 4 時間温置する。この最初の LRAII 温置は、段階的な処理で実施でき、ここで、1 g の DNA あたり 12.5 g の LRAII の初期負荷を最小 4 時間温置した後、1 g の DNA あたり 12.5 g の 2 回目の LRAII をさらなる時間 (最小 6 時間) 温置する。懸濁した材料をその後、濃度に関して (例、AEX アッセイ)、及びゲル電気泳動 (60 V で 30 ないし 50 分間の E

40

【0142】

バルク溶液中の Cel pure 及び LRAII の総量に比例する膜面積を有する 12 インチの Cuno ハウジング (高さ 4) を使用して、再溶解したプラスミド DNA 溶液をろ過する。一般に、Cel pure 又は LRAII 1 g は、容積 ~ 4 mL までを必要とする。LRA 及び Cel pure の総量に基づいて、Millipore CE 50 深層ろ過

50

カートリッジ (1 2 i n 円、 6 セル) の適切な数を、上述の C u n o フィルターハウジングにおいて利用する。ろ過が完了した後、 3 M N a C l の十分量を負荷して、ハウジングを充填し、 3 0 分間再循環させる。この材料を保存し、洗浄を反復する。これらの洗浄工程は、 C e l p u r e 及び L R A I I ケーキに伴われているプラスミド D N A の大きな百分率を回収するためである。第二の L R A I I 処理のために、材料をその後、別のタンクの中に置く。

【 0 1 4 3 】

第二のケイ酸カルシウムバッチ吸着—第二の L R A I I 温置を実施し、残留する E . コリ宿主細胞 D N A の実質的な除去を確実にする。 1 g の D N A あたり約 1 0 g の L R A I I をプラスミド溶液へ添加し、 4 時間温置する。その後、ゲル電気泳動 (E ゲルで 6 0 V で 3 0 ないし 5 0 分間) により溶液をアッセイし、高次コイルプラスミド D N A 純度が 9 0 % 超に到達するまで 2 時間ごとに、 1 g の D N A あたり 2 g で L R A I I を負荷し、その後の各添加の前にアッセイする。この第二の L R A I I 段階が、単一の 3 0 " の 0 . 4 5 μ m の D u r a p o r e フィルターを保持する 1 ないし 2 の M i l l i p o r e S e r i e s 2 0 0 0 ハウジングを利用する場合、ろ過は、適切なケーキ容量を有し、下流工程への水和したケイ酸カルシウムのバイパスを防止する。

10

【 0 1 4 4 】

P E G に基づく沈殿及びエタノール粉末化—ポリエチレングリコール (P E G) の添加による沈殿工程後の 2 つの個別のろ過 / 透析ろ過工程は、 D N A 精製処理における最後の仕上げ工程である。 5 0 % (w / v) の P E G 6 0 0 0 溶液を第二の L R A I I 液へ添加して、最終濃度を 1 0 % (w / v) にし、 1 . 2 M の N a C l の最終的な塩濃度に調製した。中空ファイバーの M F 膜工程を使用して第一のろ過工程を実施し、沈殿したスラリーを濃縮し、残留 R N A 及び不純物を清澄化する。その後、 5 透析容積のための 1 . 2 M の N a C l 中の 1 0 % (w / v) P E G 6 0 0 0 に対して、濃縮したスラリーを透析ろ過する。攪拌したフィルター容器をベースとした第二ろ過工程を使用して、その後、保持液をさらに濃縮する。まず、 2 0 0 度数のエタノール 1 当量を 3 0 分かけて表面下で添加することによって、 5 0 % (v / v) エタノールになるように保持液を調整し、 P E G をエタノールと置換し、 D N A を脱水する。その後、 2 5 μ m の孔サイズのステンレス鋼スクリーンを使用してユニットの中で溶液を濃縮し、 6 透析容積のための 2 0 0 度数のエタノールに対して透析ろ過する。最終的なエタノール沈殿した生成物を真空乾燥して、 D N A の微細な粉末形態を得る。粉末バルクが一度生じると、材料は再懸濁できる (例、 5 ないし 9 g / L) 。 1 5 0 0 m L / 分 / m ² の流速で約 4 0 0 g / m ² の負荷で M i l l i p o r e M i l l i p a k 2 0 0 フィルター (0 . 2 2 μ m、 P V D F) を使用して、再懸濁した D N A 溶液のろ過滅菌を実施できる。

20

30

【 0 1 4 5 】

代表的な処理の収量 / 不純物 (除去) データ— 2 つの D N A プラスミドであるプラスミド A 及びプラスミド B に関する上述の処理の収量は、プラスミド 1 7 . 2 g 及び 1 9 . 0 g であった (図 1 7 A 及び B 参照) 。図 1 7 A は、両生産運転の高次コイルプラスミド D N A の総収量を示し、図 1 7 B は、処理の時間経過にわたる重要な不純物レベルを示す。本アッセイ結果は、全ての重要な不純物が、アッセイの定量化レベルを下回って低下したことを示す。

40

【実施例 9】

【 0 1 4 6 】

細菌細胞採集手法

採集工程の目的は、精製において使用するために、目的の生体分子 (高次コイルプラスミド D N A を含むが、これに限定されるわけではない。) を含有する宿主細胞 (細菌細胞、例えば、 E . コリを含むが、これに限定されるわけではない。) を濃縮し、洗浄することである。この実施例は、目的の高次コイルプラスミド D N A を保持する E . コリ宿主細胞の回収を記載する。

【 0 1 4 7 】

50

500MWCO (UFP-500-E-75) の $6 \times 3.7 \text{ m}^2$ の GE Health care (旧 A/G Tech) の、平行に置かれた中空ファイバークートリッジ (合計 22.2 m^2) を操作する。重要なパラメータは、膜通過圧力 (「TMP」)、入り口圧、交差流速、濃縮因子及び流量である。回収時の培養物の光学密度は 80 ないし 100 の OD_{600} の範囲に及び容積生産性は約 1 g プラスミド / L である。回収時に、発酵槽ブросを 10 未満に冷却する。精密ろ過及び分散を通じて、保持容器及び / 又は保持回線の冷却によってこの温度を維持する。調節バルブによって保持液背圧を制御することによって TMP を初期的に 10 psi に維持することによって、採集工程を操作する。交差流速を $50 \text{ mL} / \text{分} / \text{ファイバ}$ (22.2 m^2 には 300 LPM) に設定する。バッチが濃縮されると、供給圧力は増大する。供給圧力が 25 psi (TMP ~ 15 psi) に到達すると、~ 25 psi の供給圧力を維持する必要のため、交差流速は低下する。濃縮因子は、 OD_{600} 測定結果と相関する乾燥細胞重量 (DCW) に基づく。300 の最終的な OD_{600} は、精製のための目標である。開発運転において得られた 80 ないし 100 の当初培養物の OD_{600} に基づいて、3 ないし 4 倍の濃縮因子が必要である。

【0148】

目的の濃縮因子に到達するまで、又は (多量のバイオマス培養の場合) 有意な流動性低下を観察されるまで、濃縮を実施する。流動性レベル限界値は、濃縮の終了のかぎとするために定義できる。濃縮の終了時に、リン酸ナトリウム溶液 (RCM635—0.12 M の NaCl 、5 mM 二塩基性リン酸ナトリウム (無水 Na_2HPO_4)、1 mM 塩基性リン酸ナトリウム (NaH_2PO_4 1 水和物)) の約 4 透析容積を使用して、透析ろ過を実施し、濃縮した細胞を洗浄する。濃縮時に目的の濃縮因子に到達しなかった場合、透析ろ過終了時にバッチをさらに濃縮する。濃縮及び透析ろ過は、ブrossのタンクへの供給速度を調整して透過液の速度を補正することによって、保持液容器中で定常液体レベルを維持しながら、供給及び滲出モードで実施すべきである。

【0149】

透析ろ過の終了時において、細胞ペーストは、分配の間、10 未満にて十分に混合された状態で維持されるべきである。一定分量を、2 L の NaI gene 瓶又は 8 L の Stedim バッグのいずれかに分配し、その後の保存のために -60 未満に凍結する。ドライアイス槽又は直立型冷凍庫中での静止凍結が、許容される凍結方法である。

【0150】

宿主細胞の回収に使用される処理装置の仕様の例を表 8 に列挙する。この例において、保持液容器と命名される 600 L 容器は、処理できる材料の量を制限する。3 × の最小濃縮因子を仮定すると、培養物約 1200 L の最適な処理容積を回収し得る。この容積は、透析ろ過前の濃縮されたペーストの任意の希釈のための、タンク中における十分な上部空気を確保にする。1200 L の培養物容積による膜への負荷は、 $54 \text{ L} / \text{m}^2$ であろう。

【0151】

【表 8】

表 8 : DNA 回収工程に関する装置の仕様

保持液容器	600 L 携帯用タンク (VE-5140)
保持液容器作業容積	420 L
ろ過スキッド	大きな精密ろ過スキッド (MF-4510)
供給ポンプ最大値*	420 LPM
膜ホルダー能	22.2 m^2 ($6 \times 3.7 \text{ m}^2$)

* 0 の背圧時のポンプ最大値。ポンプの能力は、背圧の増大とともに低下する。

【0152】

バッチのための濃縮因子はブross光学密度のプロセス中の測定および濃縮後の約 300

の OD_{600} の目的を基礎に算出されることが推奨される。この例を使用する場合、1200 L の当初培養物容積は、下流処理のための細胞ペースト 300 L 超を生成する。バッチをまず少なくとも 3 倍に（又は多量のバイオマス培養物の場合、流量低下を観察するまで）濃縮した後、リン酸ナトリウム溶液の 4 透析容積で透析ろ過し、最終的に 300 の OD_{600} の最終標的まで濃縮する。緩衝液最小 1600 L が透析ろ過に必要であり、さらなる 400 L が使用前の膜調整に必要とされる。

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図 1】図 1 は、2 日間にわたって沈降させた E. コリ細胞可溶化液を示している。ボトル 1 中の可溶化液は、STET 緩衝液（本明細書中に定義されている。）中に細胞を再懸濁し、20 にてリゾチームと共に（500 U/mL）温置することによって作製された。ボトル 2 中の可溶化液は、リゾチーム温置後に、pH 12 まで pH を上昇させるために第一の塩基が添加され、次いで、pH を中和するために酸が添加されたことを除き、ボトル 1 中の可溶化液と同様である。ボトル 3 中の可溶化液は、3% の PEG 3000 を含有する STET 緩衝液中に細胞を再懸濁し、20 にてリゾチームと共に温置することによって作製された。ボトル 4 の可溶化液は、アルカリ pH シフトを誘導し、続いて中和を誘導するために、リゾチーム温置後に、ボトル 2 について記載されているとおりに塩基及び酸を順次添加したことを除き、ボトル 3 中の可溶化液と同様である。この図は、アルカリ可溶化液由来の細胞細片に対する凝集剤としての PEG の可能性を示している。

【図 2】図 2 は、45 の当初 OD_{600} を有する様々な細胞可溶化液を含有し、及び 16,000 × g で 5 分間遠心された 50 mL の遠心管を示している。チューブ 1 中の可溶化液は、STET 緩衝液中に細胞を再懸濁し、20 でリゾチームと共に温置することによって作製された。リゾチーム温置後にアルカリ pH シフト及びその後の中和（図 1 に対して上述されているとおり。）に供されたことを除き、チューブ 2 中の可溶化液はチューブ 1 中の可溶化液と同じである。チューブ 3 中の可溶化液は、3% の PEG 3000 を含有する STET 緩衝液中に細胞を再懸濁し、20 でリゾチームと共に温置することによって作製された。リゾチーム温置後にアルカリ pH シフト及びその後の中和に供されたことを除き、チューブ 4 中の可溶化液はチューブ 3 中の可溶化液と同じである。アルカリ pH シフト / 中和工程後に PEG が添加されたことを除き、チューブ 5 中の可溶化液はチューブ 2 中の可溶化液と同じである。アルカリ pH シフト / 中和工程後に 5% の PEG 3000 の最終濃度が添加されたことを除き、チューブ 6 中の可溶化液はチューブ 2 中の可溶化液と同じである。

【図 3】図 3 は、図 2 に示されている可溶化液についての濁度測定を示す。Lys = リゾチーム；PS = pH シフト；PEG-STET = 3% PEG 3000 + STET。

【図 4】図 4 A 及び 4 B は、E. コリ細胞細片の凝集に対する PEG 分子量の効果を示している。リゾチームの存在下で細胞を温置し、アルカリ pH シフト / 酸中和に供した。異なる分子量（PEG 400 - 6000）の PEG 原溶液を、可溶化液の 10 mL 分取試料に添加して、約 1.0% と 15.0% の間の最終 PEG 濃度を達成する。得られた混合物を、約 16 時間、室温で沈降させた後、 OD_{600} 測定を行った（図 4 A）。図 4 B は、PEG 3000 のみを用いた検討について、 OD_{600} 依存性及び溶液中の DNA 濃度のプロットを示している。

【図 5】図 5 は、リゾチーム / pH シフトされた可溶化液中の PEG 6000 の漸増濃度（0 - 8% w/v）に対するプラスミド DNA 沈殿曲線を示している。

【図 6】図 6 A 及び 6 B は、大規模なプラスミド DNA 精製プロセスの 2 つの最終濃縮 / 仕上げ操作の一般的なプロセスフロー図を比較している。

【図 7】図 7 A 及び 7 B は、異なる PEG 溶液中での DNA の溶解度を図示している。図 7 A は、PEG 濃度が 2% w/v 超である場合に、PEG 8000 の溶液中の DNA の溶解度が急減することを示していて、調べた範囲について溶液の温度又は DNA 濃度に起因する DNA 溶解度への影響は存在しない。図 7 B は、研究した範囲について、DNA が 400 MW PEG 中で完全に可溶性であるが、分子量が増加するにつれて、DNA を沈殿

10

20

30

40

50

させるのに必要な PEG の臨界質量が減少することを示している。

【図 8】図 8 は、PEG 8000 溶液中での DNA 沈殿の速度論を図示している。図 8 は、約 5 分後に、当初 DNA の 99% 超が沈殿することを示している。

【図 9】図 9 A 及び 9 B は、プラスミド DNA の水 - エタノール混合物中溶解度データを示している。NaCl の濃度は、エタノールを除いた濃度に基づいている。図 9 A は、1.8 ~ 3.4 M の NaCl 濃度は、プラスミドの溶解度に対して殆ど影響がないことを示している。図 9 B では、エタノールの様々な濃度を用いて NaCl のより低濃度を研究した。破線は、沈殿が起こらないときに、各溶液について存在するであろうプラスミド濃度を表している。

【図 10】図 10 は、様々なエタノール濃度での NaCl の溶解度を示している。

10

【図 11】図 11 は、2 つの IPA 濃度での IPA - NaCl 系についての「塩析」及び「塩溶」の極限を表している。

【図 12】図 12 A 及び 12 B は、塩化ナトリウム及び酢酸ナトリウム塩を加えた、25% (A) 又は 67% (B) IPA 中でのプラスミド溶解度を図示している。

【図 13】図 13 は、3 M の NaCl 溶液から沈殿されたプラスミド DNA についてのデッドエンドろ過データの V_{max} プロットを示している (0.22 ミクロンセルロース膜、 2.1 cm^2 ろ過面積、20 インチ Hg 真空)。このろ過データは、まず、最初の 40% エタノール濃度から得られ、次いで、再び、50% の濃度を得るためにエタノールを添加した後に得られた。t/V 対 V プロット中の相対的にまっすぐな線は、ほぼ非圧縮性のケーキを示している。50% エタノールを用いると、有意により高いろ過速度が観察される。

20

【図 14】図 14 A は、沈殿されたプラスミドの精密ろ過の間に経時的に収集された透過液の容量を示している。沈殿された懸濁液中の DNA の当初濃度が、各データセットについて示されており、当初の懸濁液容量は 500 mL であった。懸濁液は 15 mL / 分で容易にろ過され、実験中、透過液の流量は減少せず、ろ過の全体を通じて、10 psig の圧力測定値を維持した。図 14 B は、80% v/v エタノールを加えた沈殿されたプラスミド懸濁液の透析ろ過中のエタノール及び NaCl 濃度を示している。

【図 15】図 15 A - C は、ろ過時にフィード及びエタノールの添加をするための Masterflex サイズ 14 (5/16") 導管を用いる接線ろ過 (「TFF」) 条件下での精密ろ過の間に試みた 3 つの連続的アルコール沈殿を示している。図 15 A は、100 kD の PES 膜を使用し、40% v/v エタノールで沈殿させる連続的沈殿 / 精密ろ過研究から得られた結果を示している。ろ過カートリッジへのフィード流速は、約 30 mL / 分であった。浸透液の約 200 mL を集めた後、流量は、その初期値の約 20% まで減少した。図 15 B は、0.1 ミクロンの PVDF 膜を使用し、40% v/v エタノールで沈殿させた連続的沈殿 / 精密ろ過研究から得られた結果を示している。フィード流速は、同じく約 30 mL / 分であったが、容器とフィルターの間に 1 分のラグタイムを導入した。図 15 C は、図 15 B 中の実験と同様に行われた実験 (0.1 μm の PVDF 膜、1 分のラグタイム) から得られた結果を示しているが、プラスミド DNA を沈殿させるために、40% のエタノールではなく 50% エタノールを使用した。浸透液流量の減少は、40% v/v エタノール実験 (図 15 B) から僅かに低下し、圧力の増加により、30 分を超えてろ過実験の実験を継続することは不可能であった。

30

40

【図 16】図 16 A 及び 16 B は、ろ過時にフィード及びエタノールを添加するための HPLC 導管を用いる TFF 下での精密ろ過を用いて試みた 2 つの連続的アルコール沈殿を示している。図 16 A は、40% エタノール濃度を使用し、ラグタイムを用いない連続的沈殿 / 精密ろ過を示している。

【図 17】図 17 A 及び 17 B は、実施例 8 に記載されているプラスミド DNA 精製プロセスを用いた 2 つの精製操作のプロセス収率 (A) 及び不純物レベル (B) を示している。各プラスミドの精製は、OD₆₀₀ = 70 の 75 - 80 L、17.5 - 18.6 L の発酵から得られた E. コリ可溶化液を用いて開始した。図 17 A は、高次コイルプラスミド DNA のグラムで表した量 (「scDNA (g)」) 及び精製プロセスの様々な段階にお

50

ける高次コイルDNAのパーセント(「% s c DNA」)を比較している。細胞可溶化液(「L y s」); 宿主細胞細片の凝集後の清澄化された可溶化液(「C L」); 第一のケイ酸カルシウムバッチ吸着及びろ過後のDNAスラリー(「L R A 1 F」)、第二のケイ酸カルシウムバッチ吸着及びろ過後のDNAスラリー(「L R A 2 F」)、並びにPEG沈殿及びその後の精密ろ過工程の間に粉末化された、再懸濁されたDNA(「F R B」)。図17Bは、図17Aに記載されている精製プロセスの同じ段階でのエンドトキシン(log EU/mL)、タンパク質(%)及びRNA(%)の量を比較している。

【図18】図18は、PEG6000で凝集された細胞可溶化液中の、最終CTAB濃度の関数としてのタンパク質レベル(BCAアッセイによって測定)を示しており、ここで、CTABは、40 mMのNaCl中に2%(w/v)CTABを添加することによって、可溶化液中に導入される。

10

【図1】

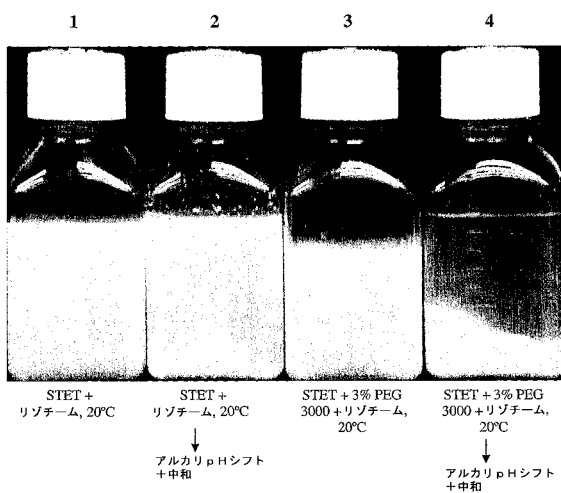


FIG.1

【図2】

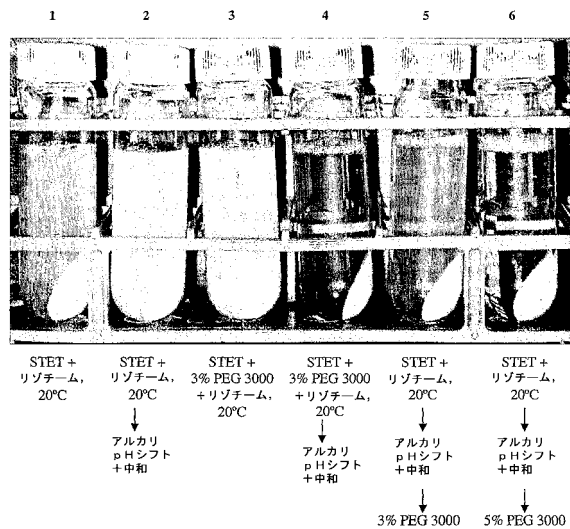


FIG.2

【図 3】

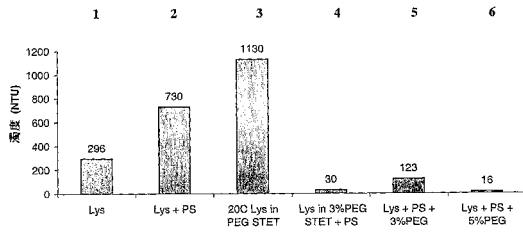
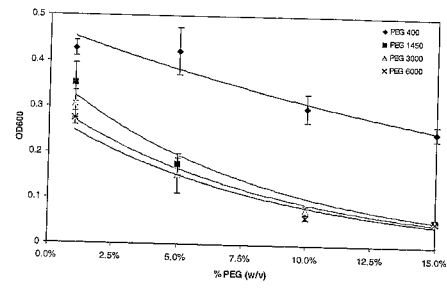


FIG.3

【図 4】

A.



B.

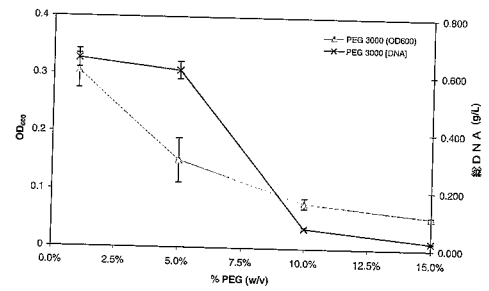


FIG.4A & B

【図 5】

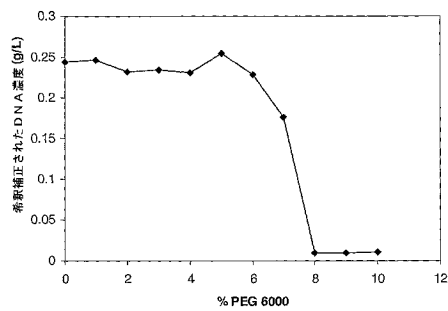


FIG.5

【図 6】

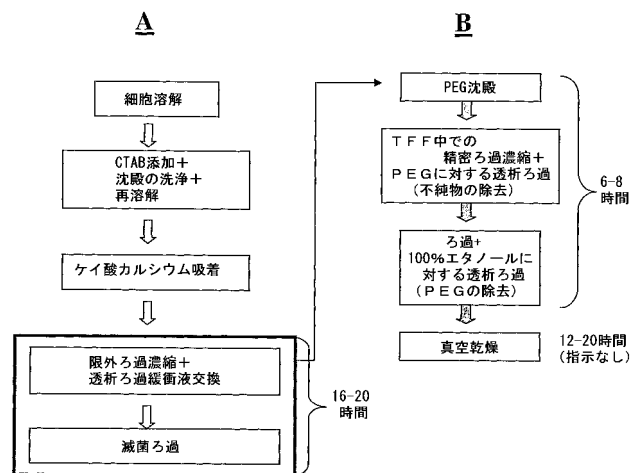
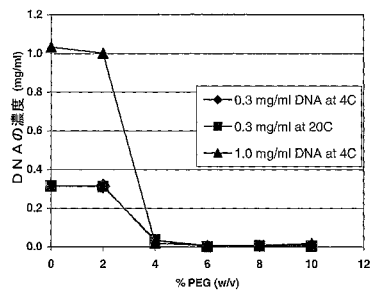


FIG.6A & B

【図 7】

A.



B.

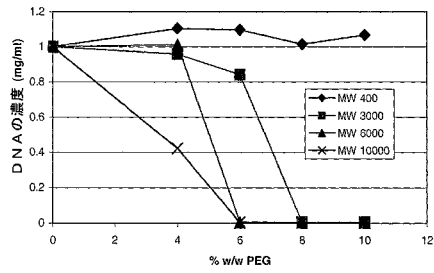


FIG.7A & B

【図 8】

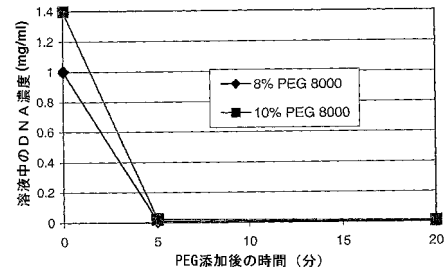
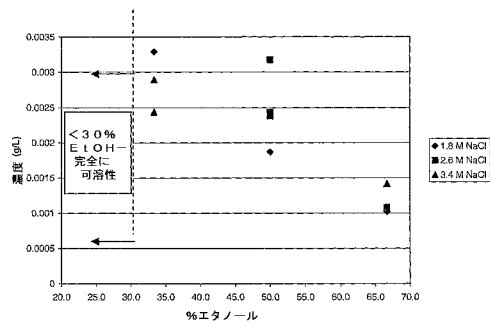


FIG.8

【図 9】

A.



B.

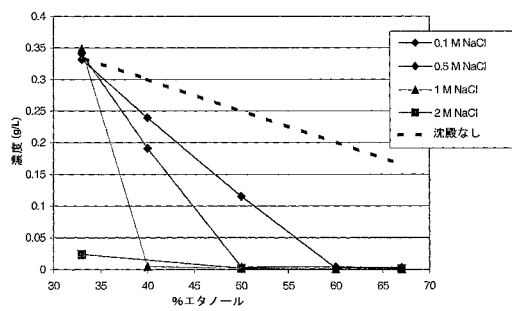


FIG.9A & B

【図 10】

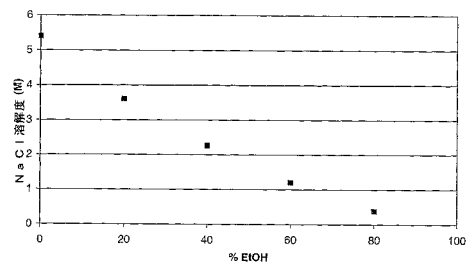


FIG.10

【図 1 1】

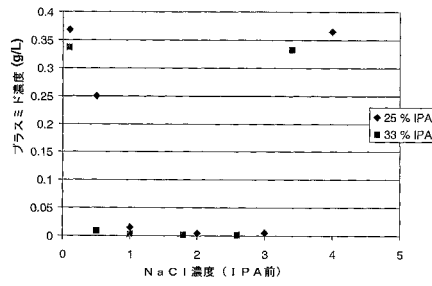
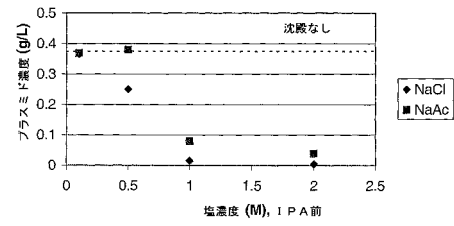


FIG.11

【図 1 2】

A.



B.

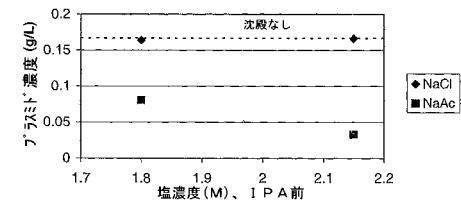


FIG.12A & B

【図 1 3】

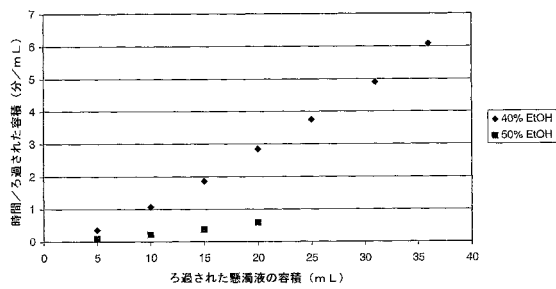
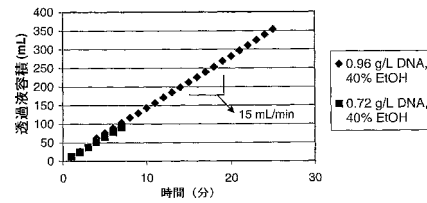


FIG.13

【図 1 4】

A.



B.

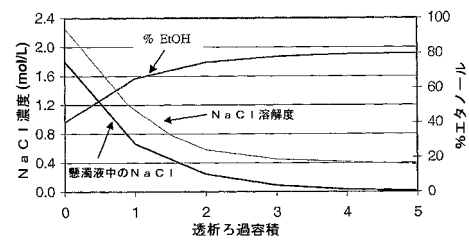
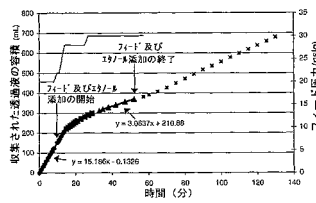


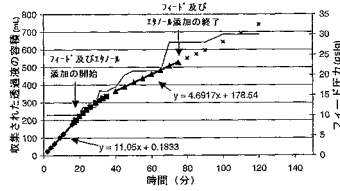
FIG.14 A & B

【図 15】

A.



B.



C.

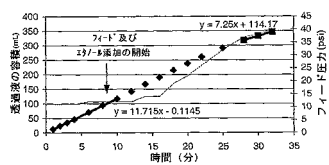
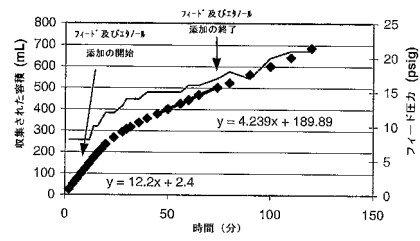


FIG.15A, B & C

【図 16】

A.



B.

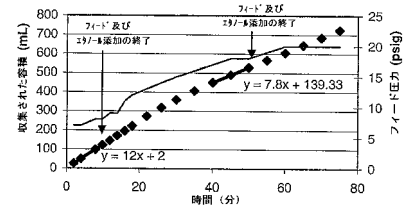
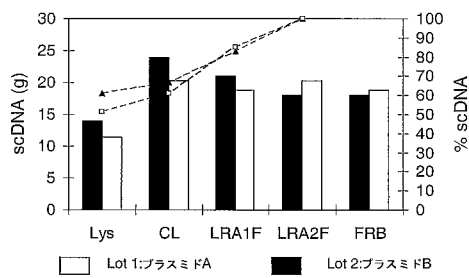


FIG.16A & B

【図 17】

A.



B.

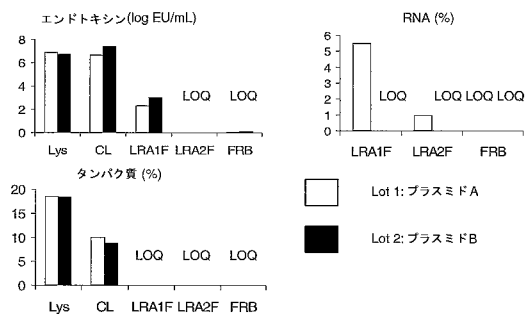


FIG.17A & B

【図 18】

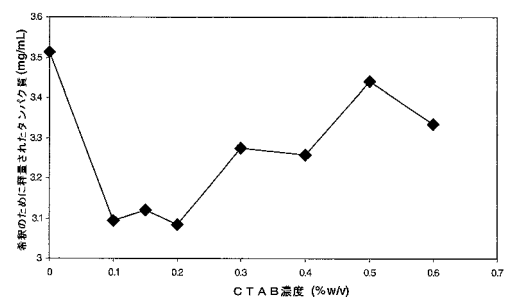


FIG.18

【国際調査報告】

60700820064


11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/03015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8): C12Q 1/68(2006.01)

USPC: 435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST and medline

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 20020012990 A1 (LANDERS et al) 03 JANUARY 2002 (31-01-2002), see entire references, especially columns 0011,0029, 0051-0063.	1-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
31 July 2007 (31.07.2007)

Date of mailing of the international search report

28 AUG 2007

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Cynthia B. Widen, Ph.D.
Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

19.12.2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ボイド, デイビッド・ビー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 クリストバート, アダム・ジョエル

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 ランダー, ラッセル・ジャクソン

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 マーフィー, ジェイソン・シー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 ウインターズ, マイケル・アルバート

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

Fターム(参考) 4B024 AA20 EA04 HA20