

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4065405号  
(P4065405)

(45) 発行日 平成20年3月26日(2008.3.26)

(24) 登録日 平成20年1月11日(2008.1.11)

(51) Int.Cl. F 1  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-558498 (P2002-558498)	(73) 特許権者	591063176
(86) (22) 出願日	平成13年12月24日(2001.12.24)		デー エル エム ドクトル ミュラー
(65) 公表番号	特表2004-516850 (P2004-516850A)		アクチェンゲゼルシャフト
(43) 公表日	平成16年6月10日(2004.6.10)		スイス国 メンネドルフ アルテ ラント
(86) 国際出願番号	PCT/CH2001/000741		シュトラーセ415
(87) 国際公開番号	W02002/057446	(73) 特許権者	303024781
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)		ポリタッグ テクノロジー ソシエテ ア
審査請求日	平成16年9月22日(2004.9.22)		ノニム
(31) 優先権主張番号	80/01		スイス国 ローザンヌ ペエスウーア パ
(32) 優先日	平成13年1月19日(2001.1.19)		ルク スィアンティフィク ウペエフエル
(33) 優先権主張国	スイス(CH)	(74) 代理人	100061815
			弁理士 矢野 敏雄
		(74) 代理人	100094798
			弁理士 山崎 利臣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミドDNAを含有する細胞溶解物を製造するためのバイオマスの処理法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プラスミドDNAを含有する透明な細胞溶解物を製造するために、細胞培養法からのバイオマスを統合処理する方法において、それぞれ不活性なフィルター助剤の存在下に、第1の工程でフィルター中で濾過し、第2の工程でフィルターケーキ中に含有されるバイオマスを熱的に碎解し、次の工程で細胞溶解物を濾過し、その際不活性なフィルター助剤として、次の特性：

- ・二酸化ケイ素の割合 90%
- ・湿潤密度：0.2～0.4 g/cm<sup>3</sup>
- ・透過性：0.02～2 ダーシー
- ・BET表面積：2～20 m<sup>2</sup>/g
- ・幾何学的表面積：0.25～0.65 m<sup>2</sup>/g
- ・粒度：2.5～8.0 μm
- ・保持(99%)粒度：0.1～2 μm

を有する珪藻土を使用することを特徴とする、バイオマスの統合処理法。

【請求項2】

碎解を70～90 で実施する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

熱的な碎解を少なくとも30秒間実施する、請求項1記載の方法。

【請求項4】

3工程全てにおいて同じフィルター助剤を使用する、請求項1から3までのいずれか1項記載の方法。

【請求項5】

砕解を7～9のpH値で実施する、請求項1から4までのいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

砕解を一価のカチオンのみの存在で実施する、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

カチオンの最高濃度が $K^+$ に関しては最高で20ミリモル、 $Na^+$ に関しては最高で50ミリモルまたは $NH_4^+$ に関しては最高で150ミリモルである、請求項1から6までのいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明はプラスミドDNAを含有する透明な細胞溶解物を製造するための細胞培養法からのバイオマスの統合処理法、並びにこの方法により製造されたプラスミドDNA細胞溶解物に関する。

【0002】

処理とは透明な、プラスミドDNA含有細胞溶解物を製造するためのコンディショニング法であると理解する。統合処理法とは個々の工程が一体になって移行し、こうして生成物流が実質的に連続的に移動する方法であると理解するべきである。多工程の方法を連続的にまたはバッチ式に実施することができる。

【0003】

細胞培養工程からの生物学的材料の分離、生物学的材料の砕解および透明な、プラスミドDNA含有細胞溶解物の製造は分子生物学の分野においては、汎用される方法である。公知の方法においては、生物学的材料を、例えばE.コリバクテリア細胞からの生物学的材料を、培養上澄みから分離し、再懸濁後に砕解する。固体成分の分離後に、ゲノムDNA、RNA、蛋白質およびエンドトキシンと共にプラスミドDNAを含有するいわゆる透明な細胞溶解物を製造する。

【0004】

生物学的材料を細胞培養工程からバッチ式にまたは連続的に遠心により分離することは公知である。フィルター助剤のベッドを介して濾過することによるベーキング酵母細胞の分離がGB-A-1082862中に記載されている。これによれば、フィルター助剤を用いる、酵母自己溶解物からの細胞残分の分離も公知である。

【0005】

細胞砕解のための通常の方法は公知のアルカリ性溶解および熱的溶解である。細胞砕解を改善するために、しばしば酵素、例えばリソチーム、および/または細胞懸濁のための界面活性剤を添加する。アルカリ性溶解法においては、水酸化ナトリウム溶液およびナトリウムドデシルスルフェートの添加によるpH12での細胞砕解、および高いモル濃度の酢酸塩緩衝液での中和により沈殿物が得られ、これは実質的に細胞破壊屑およびゲノムDNAおよび蛋白質の一部を含有する。この沈殿物の完全な分離は強力な遠心分離によってのみ達成することができる。このためには、12000gの遠心加速度では十分ではない(L. Feliciello et al., Anal. Biochem. 212 (1993) 394-401)。4で30分間、遠心加速度26000gで初めて、この沈殿物は十分に分離される。これに対してこの沈殿物の濾過は、微細な濾過助剤を用いて、またはフロテーション工程と組み合わせて、低い工程速度とプラスミドDNAの高い損失と結びついている。プラスミドDNAのフィルター助剤表面への吸着は著しい損失を伴う。特にプラスミドDNAは、二価のカチオンの濃度が0.1ミリモルまたは一価のカチオンの濃度がカリウムの場合には20ミリモルまたはナトリウムの場合には50ミリモルに上昇する場合には、そのようなミネラル表面に非常に迅速にかつ強固に結合する(G. Romanowski et al., Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991) 1057-1061)。

10

20

30

40

50

## 【0006】

高分子量の核酸は剪断力に対して敏感である。強い剪断力は核酸の非可逆的な損傷、特に鎖切断に導く。このような理由から核酸処理のために機械的な碎解法はほとんど使用されない(A. Carlson et. al., Biothechnol. Bioeng. 48(1995) 303-315)。連続的な液体供給の工業的な遠心においては、高い剪断力がローター入口で核酸に作用し、必然的に鎖切断に導く。

## 【0007】

WO96/36706中には、微生物を界面活性剤(Triton<sup>(R)</sup>)の存在で、かつ貫流熱交換装置中で70 ~ 100 に加熱することにより碎解する方法が記載されている。これは熱的溶解と界面活性剤(場合によりリソチームをプラス)との組合せ法である。リソチームなしの場合には熱処理は30秒であると記載されており、リソチームを用いる場合には6秒間である。加熱による細胞碎解は、細胞屑、ゲノムDNAおよび蛋白質からなる固体化合物を形成する。更に、熱処理によりDNAを分解する酵素、いわゆるDNAアーゼの著しい変性が生じる。透明な細胞溶解物はバッチ式の遠心分離により得られる。この方法では、細胞碎解のみが連続的に実施され、固体成分の分離は遠心分離によるバッチ式により行われる。最終的な透明な細胞溶解物を獲得するためには、遠心分離に続けて、更にメンブランフィルターを介して濾過を実施しなければならない。

10

## 【0008】

WO9207863によれば細胞懸濁液から核酸を単離するための装置および方法が公知である。この文献によれば、細胞を予め装入した多孔性のマトリックスの中空室中に層の形で固定化する。このことはマトリックス中への深部濾過により達せられ、その際に中空室の大きさはほぼ細胞の大きさであり、マトリックス表面はイオン交換体特性を示す。マトリックスの粒度は10 ~ 50 μmである。イオン交換体特性により、DNAはマトリックスの表面に吸収される。DNAの吸収は本発明の課題ではない。公知の方法は精製したDNAを提供するが、透明なプラスミドDNAではない。

20

## 【0009】

EP-A-0814156によれば、DNAの清浄化法が記載されている。この中に使用した珪藻土は詳細には特定されていない。溶解はアルカリ法により行われる。熱溶解は記載されていない。

## 【0010】

こうして、公知技術からは多量のバイオマスを総合して加工することを可能にする方法も、統合的に多量のプラスミドDNA含有透明細胞溶解物を製造することができる方法も公知ではない。

30

## 【0011】

プラスミドDNA精製を可能にする、細胞培養工程から透明なプラスミドDNA含有細胞溶解物を製造するための効果的なコンディショニング法に対する要求がある。

## 【0012】

従って、本発明方法の基礎となる課題は、アルカリ性溶解法および遠心分離の欠点を回避して効果的で制御された方法で多量の透明な細胞溶解物をバイオマスから高いプラスミドDNA収率で製造する、統合処理法を提供することである。

40

## 【0013】

この課題は、第1の工程でそれぞれ濾過助剤の存在下にフィルター中で濾過し、第2の工程でフィルターケーキ中に含有されるバイオマスを熱的に碎解し、次の工程で細胞溶解物を濾過することにより解決する。

## 【0014】

本発明方法により50 ml ~ 10000 lの全ての体積量のバイオマスを迅速に、プラスミドDNAを含有する透明な細胞溶解物に処理することができることが確認された。本発明の方法を用いて、濾過においてかけられる過圧に関して、核酸に作用する剪断力に関してのコントロールが加えられるということが、特に有利である。本発明により製造した細胞溶解物はゲル電気泳動による分離の後に、ゲノムDNAおよびRNAのためのバンドの

50

他に、鎖切断による核酸の認識できる損傷を有さないプラスミドDNAのためのバンドを明らかに示す。更に得られた細胞溶解物は熱処理による不快な臭気を有さない。

【0015】

砕解の際にフィルター助剤が存在しているということは有利である。このことは引き続き細胞溶解物の透明濾過のために必要な濾過助剤がすでに存在しているという利点を有する。全ての部分工程（分離、砕解、透明化）にわたって、同じ濾過助剤を連続的に使用するという事は、更に技術的に効果的であり、こうして経済的である。溶解のためにフィルターケーキを懸濁する代わりに、存在するフィルターケーキ中で直接熱的砕解および透明濾過を組み合わせ実施し（例えば熱溶解緩衝液のポンプによる通過）、こうして直接非常に透明な細胞溶解物を獲得することができる場合、特に有利である。こうして、全方法を個々の工程の数を減らすことにより更に効果的に、こうして経済的に、より有利になる。

10

【0016】

フィルター助剤の選択は決定的な意味を有する。フィルター助剤は、吸着効果を最少にするために不活性でなければならない。フィルター助剤としては、SiO<sub>2</sub>含量が少なくとも90質量%であり、かつ更に以下の特性：

- ・ 湿潤密度：0.2 ~ 0.4 g / cm<sup>3</sup>
- ・ 透過性：0.02 ~ 2 ダーシー
- ・ BET 表面積：2 ~ 20 m<sup>2</sup> / g
- ・ 幾何学的表面積：0.25 ~ 0.65 m<sup>2</sup> / g
- ・ 粒度：2.5 ~ 8.0 μm
- ・ 保持（99%）粒度（Partikelgroessenretention(99%））：0.1 ~ 2 μm

20

を有するか焼した珪藻土を使用するのが有利であることが示された。

【0017】

このことは濾過工程において非常に透明な濾液が、中程度の圧力差で十分に高い濾過流で得られるという利点を有する。

【0018】

この高純度濾過助剤の使用は、この効率性および有効性とからなる組合せのほかに、その表面が規格化されており、こうしてその特性をコントロールすることができるという利点を提供する。

【0019】

全ての工程で同じ濾過助剤を使用するという事も、同様に有利である。このことは個々の工程が一体になって移行し、こうして生成物流が実質的に連続的に移動する利点を有する。

30

【0020】

濾過すべき溶液の固体含量に対する濾過助剤の量、濾過面積および負荷する最大濾過過圧の高さは経験的にのみ決定することができる。

【0021】

砕解を熱的に実施することは、特に有利であるとして示されている。この方法はこの砕解を緩和な例えば、生理学的なpH範囲で、非常に良好に制御可能に、かつ再現性の条件下に実施することができるという利点を有する。細胞懸濁液のバッチ式の加熱の代わりに、貫流熱交換器を使用する場合、この方法の速度を著しく上昇させることができる。更に、DNA分解酵素の一部が加熱の際に不活性化すると思われる。臭気による負荷は、アルカリ性溶解に比較して、熱溶解において明らかに僅かである。

40

【0022】

砕解は、70 ~ 90、有利に70 ~ 85、特に有利には80の温度で実施する。70より低い温度では熱的砕解は不完全である；90を越える温度ではプラスミドDNAは溶融する。熱負荷の時間は経験的にのみ決定することができる。これは30秒 ~ 数分間である。

【0023】

砕解は7 ~ 10のpH値で実施しなければならない。このpH - 範囲においてはプラスミ

50

ドDNAの吸着損失は最少であり、リソチームの活性は最適である。更に、得られた透明な細胞溶解物中のプラスミドDNAはすでに生理学的なpH - 範囲に存在する。

【0024】

砕解を一価のカチオンの存在で実施するのが有利である。このことは引き続き透明なプラスミドDNA - 細胞溶解物への濾過の際の、濾過助剤表面への吸着による損失が最少である、という利点を有する。細胞砕解の際に遊離される多価のカチオン、は錯形成剤によりマスクされる。

【0025】

カチオンの最高濃度は $K^+$ に関しては最高で20ミリモル、 $Na^+$ に関しては最高で50ミリモルまたは $NH_4^+$ に関しては最高で150ミリモルである。この最高濃度を越える際にはフィルター助剤表面への吸収によるプラスミドDNAの損失が生じる。多くのカチオンの種類が存在する場合には、許容される全濃度を特定する際に、効果の相加性も考慮に入れなければならない。

10

【0026】

透明なプラスミドDNA含有細胞溶解物は少なくとも99%の混濁の減少に相当する、0.05 U / cm以下の透明度 $OD_{600}$ を特徴とする。得られたプラスミドDNAを含有する透明な細胞溶解物をクローン化のために、形質転換のために、トランスフェクションのために、細胞中へのマイクロインジェクションのために、遺伝子治療のために、DNAワクチン化のために、および/またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のために使用することができる。

20

【0027】

実施例により、本発明をより詳細に説明する。

【0028】

例1

E.コリ株TG1中のプラスミドDNA pHEN1 (4618bp)を2TY媒体中で、振盪フラスコ中で37°Cで16時間増殖させた。それぞれ125mlの3つのE.コリ懸濁液( $OD_{600} = 6$ )にCelpureP300<sup>(R)</sup> (World Minerals Inc. 社の商標)を15、30もしくは60g/l添加し、20°Cで連続的に攪拌する。次いで、それぞれの懸濁液を吸引フィルター(フィルター面積10cm<sup>2</sup>、充填体積200ml)中に入れ、その際予めCelpureP300<sup>(R)</sup> 2kg/m<sup>2</sup>の前フィルターケーキをポリプロピレンモノフィラメントからなるフィルター媒体(孔径10µm)上に設けた。濾過を0.5バールの過圧および20°Cで実施した。

30

【0029】

全ての場合に透明な濾液が得られた。最も高い平均濾過流(2.8m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>h)はCelpureP300(R) 30g/lで達せられた。

【0030】

結果を第1表中にまとめた。

【0031】

【表1】

第1表

CelpureP300 <sup>®</sup> (*) (g/l)	平均濾過流 (m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> h)	濾液のOD <sub>600</sub> (U/cm)	混濁の減少 (%)
60	1.8	0.04	99
30	2.8	0.05	99
15	2.4	0.03	99

10

(\*) 特性：二酸化ケイ素の割合：98.65%；湿潤密度：0.26 g/cm<sup>3</sup>；  
透過性：0.15～0.30ダーシー；BET表面積：4～6 m<sup>2</sup>/g；  
幾何学的表面積：0.62 m<sup>2</sup>/g；保持(99%)粒度：0.6～0.75 μm。

## 【0032】

例2

溶解緩衝液A：

Tris・HCl 150ミリモル、Na<sub>2</sub>EDTA 25ミリモル、サッカロース8質量% (pH9)

20

溶解緩衝液B：

溶解緩衝液Aと同様であるが、付加的にTriton X-100<sup>(R)</sup> (Roehm und Haas社の商標) 2%

CelpureP300<sup>(R)</sup> 30 g/lを有する、例1からの2つのフィルターケーキをそれぞれ溶解緩衝液AまたはB 190 ml中で再懸濁させる。リソチーム500 U/mlをそれぞれ添加し、この懸濁液を連続的な攪拌下に、80℃に30秒間加熱する。まだ熱い懸濁液を、予めCelpureP300<sup>(R)</sup> 2 kg/m<sup>2</sup>の前フィルターケーキ(相応する溶解緩衝液中で15分間インキュベートした)がポリプロピレンモノフィラメントからなるフィルター媒体(孔径10 μm)上に設けられた吸引フィルターに供給する。濾液を0.5バールの過圧で実施した。

30

## 【0033】

溶解緩衝液Aにより平均濾過流0.4 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>hで透明な細胞溶解物(OD<sub>600</sub> = 0.02)が得られた。これに対して、Triton X-100<sup>(R)</sup>の添加により(溶解緩衝液B)、平均濾過流は50%だけ減少した。溶解緩衝液A中での平均濾過流の1.5 m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>hへの明らかな上昇は、CelpureP300<sup>(R)</sup>の全量が100 g/lに調節しており、かつPVDFたて糸/PTFE緯糸モノフィラメント(孔径11.5 μm)をフィルター媒体として使用している場合に達成された。

## 【0034】

例3

DNA (E.コリ；dsDNA 48.5 kb；0.51 mg/ml) 3.7 mlを、Tris・HCl 250ミリモル、Na<sub>2</sub>EDTA 25ミリモル、サッカロース8質量% (pH9.09)からなる緩衝溶液25 ml中に添加した。CelpureP300<sup>(R)</sup> (30 g/l)を添加し、この懸濁液を20℃で、30分間200 rpmで振盪する。

40

## 【0035】

260 nmでのUV吸収測定およびPicoGreen<sup>(R)</sup>テスト(Molekular Probes Inc.社のキット)は懸濁液の上澄み中のDNA濃度と出発溶液中の濃度との間に差を示さない。

## 【0036】

例4

プラスミドDNA pEGFP-N1を有するE.コリ細胞DH5αをTris・HClおよびEDTA 10ミリモルからなる緩衝液中に4等分して懸濁する。これらの懸濁液の1

50

つから細胞をNucleobond<sup>(R)</sup> AXキット(Macherey-Nagelの商標)を用いて、アルカリ性溶解法により碎解し、プラスミドDNAを単離し、精製した。他の3つの懸濁液においては細胞を熱的に70℃/pH9、70℃/pH10もしくは60℃/pH10で5分間碎解し、かつプラスミドDNAをそれぞれ同じキットで単離し、精製した。この4つの試料のPicoGreen<sup>(R)</sup>テストによるプラスミドDNA定量は、アルカリ性溶解法による碎解および70℃およびpH9もしくはpH10での熱的溶解は同じ収率のプラスミドDNAに導き、一方60℃でpH10の熱的碎解は、他の3つの方法により得られたプラスミドDNAの収率の約30%に導く。例3からは記載した熱的溶解条件下に、フィルター助剤表面にプラスミドDNAの吸着が期待されないことを知ることができる。

【0037】

測定法：

透明性の測定

濾液の透明性(光学密度、OD)はPerkin-Elmer社のUV/Vis Spektrometer Lamda 20を用いて、参照としての水に対して、吸収モード600nmで、1cmの行程で、室温で測定する。

---

フロントページの続き

- (74)代理人 100099483  
弁理士 久野 琢也
- (74)代理人 100114890  
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
- (72)発明者 イーヴォ シューマッハー  
スイス国 ヨナ チュルヒャーシュトラーセ 178
- (72)発明者 ルート フライターク  
ドイツ連邦共和国 バイロイト ドンドルファー シュトラーセ 53
- (72)発明者 フランク ヒルブリッヒ  
ドイツ連邦共和国 バイロイト ドンドルファー シュトラーセ 53

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第99/015645(WO, A1)  
特表平11-502403(JP, A)  
米国特許第05075430(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
PubMed  
JMEDIus(JDream2)  
JST7580(JDream2)  
JSTPlus(JDream2)