(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508416
(P2025-508416A)
(43)公表日　令和7年3月26日(2025.3.26)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/10 (2006.01)		C12N	15/10	112Z	4C085
B01D 15/36 (2006.01)		B01D	15/36		4C086
A61K 31/711 (2006.01)		A61K	31/711		4D017
A61K 39/00 (2006.01)		A61K	39/00	H	
A61P 31/16 (2006.01)		A61P	31/16		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全28頁）　最終頁に続く

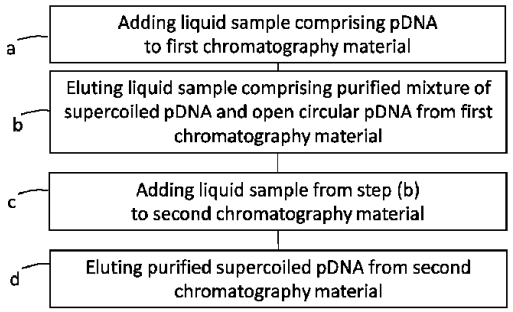
(21)出願番号　特願2024-548455(P2024-548455)
(86)(22)出願日　令和5年2月20日(2023.2.20)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月15日(2024.8.15)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/054159
(87)国際公開番号　WO2023/165831
(87)国際公開日　令和5年9月7日(2023.9.7)
(31)優先権主張番号　2202777.5
(32)優先日　令和4年3月1日(2022.3.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　516105833
サイティバ・バイオプロセス・アールアンドディ・アクチボラグ
スウェーデン国 エスイー－７５１８４
ウプサラ ブヨルクガタン ３０
(74)代理人　100188558
弁理士　飯田 雅人
(74)代理人　100154922
弁理士　崔 允辰
(74)代理人　100207158
弁理士　田中 研二
(72)発明者　シモン・オーバリ
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　超らせんプラスミドＤＮＡを分離するための方法

(57)【要約】
本開示は、液体試料から超らせんプラスミドDNA(pDNA)を分離するための方法であって、
(a)pDNAを含む液体試料を、(i)pDNAに結合するための陰イオン交換クロマトグラフィーリガンド及び(ii)第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする支持材を含む第一のクロマトグラフィー材に加え、当該液体試料が、細胞培養収集物に由来し、工程(a)の前にRNAを除去する工程に供されている、工程、(b)第一のクロマトグラフィー材から、超らせんpDNAと開環状pDNAとの精製された混合物を含む液体試料を溶出させる工程、(c)工程(b)由来の液体試料を、pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む、第二のクロマトグラフィー材に加える工程、(d)精製された超らせんpDNAを、第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程を含み、工程(d)で溶出した超らせんpDNAが、当該第一及び第二のクロマトグラフィー材以外にいかなる更なるクロマトグラフィー材を使用することなく、少なくとも95%の純度を有する、方法を提供する。工程(a)～(d)及びあらゆる中間の工

FIG. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)pDNAを含む液体試料を、(i)pDNAに結合するための陰イオン交換クロマトグラフィーリガンド及び(ii)第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする支持材を含む第一のクロマトグラフィー材に加える工程であって、前記液体試料が、細胞培養収集物に由来し、工程(a)の前にRNAを除去する工程に供されている、工程、
(b)第一のクロマトグラフィー材から、超らせんpDNAと開環状pDNAとの精製された混合物を含む液体試料を溶出させる工程、
(c)工程(b)由来の液体試料を、pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む、第二のクロマトグラフィー材に加える工程、
(d)精製された超らせんpDNAを、第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程
を含み、
工程(d)で溶出した超らせんpDNAが、前記第一及び第二のクロマトグラフィー材以外にいかなる更なるクロマトグラフィー材を使用することなく、少なくとも95%の純度を有する、
液体試料から超らせんプラスミドDNA(pDNA)を分離するための方法。
【請求項２】
陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドが、強陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドであり、場合により前記強陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドが、第四級アミン基又は第四級アミノエチル基を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドが、弱陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドであり、場合により前記弱陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドが、ジエチルアミノエチル(DEAE)基、トリメチルアミノエチル(TMAE)基、ジメチルアミノエチル(DMAE)基、又はトリメチルヒドロキシプロピル(QA)基を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項４】
第二のクロマトグラフィー材のリガンドが、pDNAへの塩促進性親和性結合及び/又は親硫黄性芳香族吸着結合を可能にする、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
第二のクロマトグラフィー材のリガンドが親硫黄基を含む、請求項4に記載の方法。
【請求項６】
第二のクロマトグラフィー材のリガンドが2-メルカプトピリジン基を含む、請求項5に記載の方法。
【請求項７】
第一のクロマトグラフィー材の支持材が、ナノファイバー、モノリス、膜状構造物、及びエクステンダーが結合した粒子からなる群から選択される材料を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
第一のクロマトグラフィー材の支持材が電界紡糸高分子ナノファイバーを含む、請求項7に記載の方法。
【請求項９】
第一のクロマトグラフィー材の支持材が、高分子ナノファイバーの不織ウェブを含む膜状構造物を含む、請求項7に記載の方法。
【請求項１０】
第一のクロマトグラフィー材の支持材が、エクステンダーが結合した粒子を含み、前記粒子が実質的に球状の粒子である、請求項7に記載の方法。
【請求項１１】
第二のクロマトグラフィー材が、リガンドが結合した支持材を含み、前記支持材が、ナノファイバー、モノリス、膜状構造物、及び粒子からなる群から選択される材料を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】
第二のクロマトグラフィー材の支持材が粒子を含み、前記粒子が実質的に球状の粒子である、請求項11に記載の方法。
【請求項１３】
第二のクロマトグラフィー材の支持材が電界紡糸高分子ナノファイバーを含む、請求項11に記載の方法。
【請求項１４】
第二のクロマトグラフィー材の支持材が、高分子ナノファイバーの不織ウェブを含む膜状構造物を含む、請求項11に記載の方法。
【請求項１５】
工程(a)の前に工程(a1)を更に含み、工程(a1)が、液体試料を前処置する工程を含み、前記前処置する工程が、細胞培養収集物を細胞溶解に供する工程、RNA沈殿剤の存在下でRNAを沈殿させる工程、清澄化、及び濾過の少なくとも1つを含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
工程(a1)が、
(a1-a)細胞培養収集物を細胞溶解に供すること、
(a1-b)RNA沈殿剤の存在下でRNAを沈殿させること、及び
(a1-c)清澄化
を含む、請求項15に記載の方法。
【請求項１７】
前記前処置する工程が、スタティックミキサーを使用して細胞培養収集物を溶解液と混合することによって、細胞培養収集物を細胞溶解に供することを含む、請求項15又は16に記載の方法。
【請求項１８】
細胞培養収集物を前記溶解液と接触させて組合せ組成物を形成し、前記組合せ組成物を、前記スタティックミキサーに流して、その混合を達成する、請求項17に記載の方法。
【請求項１９】
前記前処置する工程が、RNA沈殿剤の存在下でRNAを沈殿させることを含み、前記RNA沈殿剤が、塩化カルシウム、塩化リチウム、及びクエン酸三カリウムからなる群から選択され、好ましくは塩化カルシウムである、請求項15から18のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
(I)pDNA産生細胞を含む細胞培養収集物を提供する工程、
(II)前記細胞培養収集物を溶解液と接触させて、溶解組成物を形成する工程、
(III)スタティックミキサーを使用して溶解組成物を混合して、細胞溶解物を形成する工程、
(IV)中和溶液を細胞溶解物に加える工程、
(V)場合により、RNA沈殿剤の作用によって細胞溶解物中のRNAを沈殿させる工程
(VI)細胞溶解物を清澄化する工程、
(VII)細胞溶解物を濾過して、プラスミドDNA(pDNA)を含む溶液を得る工程、
(VIII)前記pDNAを含む溶液を、少なくとも1つのクロマトグラフィー精製工程に供して、pDNAを含む、精製された組成物を提供する、工程
を含む、pDNAを含む、精製された組成物を生成するための方法。
【請求項２１】
前記少なくとも1つのクロマトグラフィー精製工程が、pDNAを捕捉するための、少なくとも1つの結合-溶出クロマトグラフィー工程を含む、請求項20に記載の方法。
【請求項２２】
前記少なくとも1つのクロマトグラフィー精製工程が、pDNAを含む溶液を、pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含むク

ロマトグラフィー材に加える工程、及び精製された超らせんpDNAを、第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程を含む、請求項20又は21に記載の方法。
【請求項２３】
スタティックミキサーがインラインスタティックミキサーである、請求項20から22のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
工程(I)～(VIII)が連続的に行われる、請求項24から27のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
工程(V)が行われ、工程(VIII)が
(a)pDNAを含む溶液を、(i)pDNAに結合するための陰イオン交換クロマトグラフィーリガンド及び(ii)第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする支持材を含む第一のクロマトグラフィー材に加える工程、
(b)第一のクロマトグラフィー材から、超らせんpDNAと開環状pDNAとの精製された混合物を含む液体試料を溶出させる工程、
(c)工程(VIII-b)からの液体試料を、pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む、第二のクロマトグラフィー材に加える工程、
(d)精製された超らせんpDNAを、第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程
を含み、
工程(d)で溶出した超らせんpDNAが、前記第一及び第二のクロマトグラフィー材以外にいかなる更なるクロマトグラフィー材を使用することなく、少なくとも95%の純度を有する、
請求項20から24のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
第一のクロマトグラフィー材及び/又は第二のクロマトグラフィー材が、請求項2から14のいずれか一項に規定される通りである、請求項25に記載の方法。
【請求項２７】
工程(b)と工程(c)との間に工程(c1)を更に含み、工程(c1)が、工程(b)で溶出した液体試料を、液体試料対希釈剤が1:3、1:4又は1:5等の少なくとも1:2の体積比で、希釈剤で希釈する工程を含み、前記希釈剤が塩を含む、請求項1から19又は25から26のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
希釈剤が硫化アンモニウムを含む、請求項27に記載の方法。
【請求項２９】
工程(c)と工程(d)との間に工程(d1)を更に含み、工程(d1)が、第二のクロマトグラフィー材から開環状pDNAを溶出させる工程を含む、請求項1から19又は25から28のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
工程(d)で溶出した超らせんpDNAを、下記の工程:
(e1)超らせんpDNAを、薬学的に適切な用量まで濃縮する工程、
(e2)請求項1の工程(d)で適用されたバッファーを、薬学的に許容され得るバッファーで置換する工程、及び/又は
(e3)超らせんpDNAを滅菌する工程
の1つ又は複数に供する工程を更に含み、それによって医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物を得て、場合により前記組成物が、医薬品グレードの超らせんpDNAを含む医薬組成物又は医薬品有効成分である、
請求項1から19又は25から29のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
請求項30に規定の方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物で細胞をインビトロでトランスフェクトする工程を含み、それによってウイ

ルスベクターの生成を可能にする、ウイルスベクターを生成するための方法。
【請求項３２】
請求項30に規定の方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物を、RNAを生成するための鋳型として使用する工程を含み、場合により前記RNAが医薬品有効成分としての使用のためである、RNAを生成するための方法。
【請求項３３】
対象に、請求項30に規定の方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む医薬組成物又は医薬品有効成分を投与する工程を含み、場合により前記医薬品有効成分がDNAワクチンの形態で投与され、予防される疾患又は障害が、SARS-CoV-2、ジカ、A型インフルエンザ、黄熱病ウイルス、又はヒト免疫不全ウイルス(HIV)等のウイルスによる感染によって引き起こされる、対象における疾患又は障害を予防又は処置するための方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、プラスミドDNA(pDNA)の分離の分野に関し、pDNAを含む精製された組成物を生成するための方法、及び細胞培養収集物(cell culture harvest)から超らせんpDNAを分離するための方法を対象とする。当該方法によって得られた超らせんpDNAの使用が、更に開示される。
【背景技術】
【０００２】
プラスミドは、染色体DNAから物理的に分離している、小さいDNA分子である。それらは、細菌中で独立して複製する、小さな環状の二本鎖DNA分子である。
【０００３】
プラスミドDNA(pDNA)は、遺伝学及びバイオテクノロジーの研究室において、遺伝子をクローン化及び増幅又は発現させるために使用される、重要な遺伝子工学的ツールである。ウイルスベクター及びmRNAの生成は、pDNAに依存する。これは、mRNA製造のための鋳型として使用でき、ベクターベースのDNAワクチンを生産するためのウイルスベクターを製造するために使用できるか、又は細胞治療及び遺伝子療法に適用できる。医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則(GMP)グレードのpDNAは、直接DNAワクチンとして、遺伝子療法において、及び、例えば組換えタンパク質生成におけるエクスビボ適用において、使用し得る。
【０００４】
プラスミドの供給及び質は、ウイルスベクター、mRNA、及びDNAワクチンの製造のために極めて重要である。pDNAのGMP製造のための方法は、生産高及び質の必要性を満たすよう設計しなければならない。異なるプラスミド及び適用(異なる療法等)は、異なる要件を有する。pDNAは、各適用の収率及び純度の目標を満たす、高い収率及び力価で発現及び精製される必要がある。
【０００５】
5～20kb対(kbp)の範囲の超らせん(SC)プラスミドは、バイオプロセスでの適用において、最も一般的である。超らせんプラスミドの精製のための、既に知られた方法は、例えば、Lemmens et al (2003)、Sandberg et al (2004)、及びHitchcock et al (2010)に記載されている。更に、アプリケーションノート28-4094-85 AA (Cytiva社、スウェーデン)は、1)サイズ排除クロマトグラフィーレジンでの群分離、2)SC pDNAの捕捉及び選択的脱離、並びに3)強陰イオン交換リガンドでの硬質ビーズクロマトグラフィーレジンを使用した研磨を伴う3工程の方法を提案している。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】US20140296464A1

【特許文献２】US20160288089A1
【特許文献３】WO2018011600A1
【特許文献４】WO2018037244A1
【特許文献５】WO2013068741A1
【特許文献６】WO2015052465A1
【特許文献７】US7867784B2
【特許文献８】US6,602,990(Berg)
【特許文献９】US6,428,707
【特許文献１０】国際特許出願第PCT/EP2022/077388号
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2)、393～398頁(1964)
【非特許文献２】「Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization」(R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9)、70～75頁(1988))
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００８】
しかしながら、例えば、pDNAの精製のための大規模な方法の、生産性及び持続可能性を上げるための、新しい精製戦略が常に必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本開示は、従来技術の欠点を克服するか、又は少なくとも部分的に緩和することを目指している。
【００１０】
したがって、本開示の目的は、超らせんpDNAを分離するための、より生産性の高い方法を提供するである。
【００１１】
一態様では、本開示は、
(a)pDNAを含む液体試料を、(i)pDNAに結合するための陰イオン交換クロマトグラフィーリガンド及び(ii)第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする支持材を含む第一のクロマトグラフィー材に加える工程であって、
当該液体試料が、細胞培養収集物に由来し、工程(a)の前にRNAを除去する工程に供されている、工程、
(b)第一のクロマトグラフィー材から、超らせんpDNAと開環状pDNAとの精製された混合物を含む液体試料を溶出させる工程、
(c)工程(b)由来の液体試料を、pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む、第二のクロマトグラフィー材に加える工程、
(d)精製された超らせんpDNAを、第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程
を含み、工程(d)で溶出した超らせんpDNAが、当該第一及び第二のクロマトグラフィー材以外にいかなる更なるクロマトグラフィー材を使用することなく、少なくとも95%の純度を有する、液体試料から超らせんプラスミドDNA(pDNA)を分離するための方法方法を提供する。
【００１２】
工程(a)の前に、液体試料を前処置する工程(a1)があってもよく、当該前処置する工程は、細胞培養収集物を細胞溶解に供する工程、RNA沈殿剤の存在下でRNAを沈殿させる工程、清澄化、及び濾過の少なくとも1つを含む。
【００１３】
スタティックミキサーを使用して細胞培養収集物を溶解液と混合することによって、細胞培養収集物を細胞溶解に供する工程を行ってもよい。細胞培養収集物を当該溶解液と接

触させて組合せ組成物(combined composition)を形成し、次いで当該組合せ組成物を、当該スタティックミキサーに流して、その混合を達成してもよい。

【００１４】

当該工程(a1)は、RNA沈殿剤の存在下でRNAを沈殿させることによって、RNA除去の当該工程を提供してもよい。RNA沈殿剤は、塩化カルシウム、塩化リチウム、及びクエン酸三カリウムからなる群から選択され得、好ましくは塩化カルシウムである。

【００１５】

別の態様では、本開示は、

(I)スラリーの形態の、pDNA産生細胞を含む細胞培養収集物を提供する工程、

(II)当該細胞培養収集物を溶解液と接触させて、溶解組成物を形成する工程、

(III)スタティックミキサーを使用して溶解組成物を混合して、細胞溶解物を形成する工程、

(IV)中和溶液を細胞溶解物に加える工程、

(V)場合により、RNA沈殿剤の作用によって細胞溶解物中のRNAを沈殿させる工程

(VI)細胞溶解物を清澄化する工程、

(VII)細胞溶解物を濾過して、プラスミドDNA(pDNA)を含む溶液を得る工程、

(VIII)当該pDNAを含む溶液を、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程に供して、pDNAを含む、精製された組成物を提供する、工程

を含む、

pDNAを含む組成物を生成するための方法を提供する。

【００１６】

工程(I)～(VIII)は、連続的に行ってもよく、使い捨て器具を使用してもよい。当該方法は、高速で、容易に制御可能である。

【００１７】

少なくとも1つのクロマトグラフィー工程は、pDNAを捕捉するための、少なくとも1つの結合－溶出クロマトグラフィー工程を含んでもよく、特に、本明細書に記載されるようなクロマトグラフィー工程(a)～(d)を含んでもよい。

【００１８】

本明細書に開示される方法は、典型的には、群分離等のサイズ排除クロマトグラフィー工程を含まない。よって、第一又は第二の態様の方法は、サイズ排除クロマトグラフィーレジンの使用なしに行われ得る。

【００１９】

サイズ排除クロマトグラフィーと対照的に、本方法の工程(a)は、高い負荷能力(loading capacity)を提供し、所定の処理体積に対して全体的な処理時間の短縮に大きく貢献する。例えば、工程(a)～(d)及びあらゆる中間の工程は、5時間以内に完了され得る。更に、実施例で証明されるように、硫酸アンモニウム消費の実質的な減少が達成され得る。当該方法は、GMPグレードのpDNAの産業の受入基準を満たす。

【００２０】

よって、本明細書で開示される2工程のクロマトグラフィー方法は、高純度の超らせんpDNAを提供し、より高い生産性を可能にする。また、本方法はまた、以前の方法と比較して、バッファー消費を減少させ、そのため、pDNA分離のための、より持続可能な方法が提供される。

【００２１】

上記で開示された方法は、工程(d)で溶出した超らせんpDNAを、下記の工程:

(e1)超らせんpDNAを、薬学的に適切な用量まで濃縮する工程、

(e2)上述の方法の工程(d)で適用されたバッファーを、薬学的に許容され得るバッファーで置換する工程、及び/又は

(e3)超らせんpDNAを滅菌する工程

の1つ又は複数に供する工程を更に含み得、それによって医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物を得て、場合により当該組成物は、医薬品グレードの超らせんpDNAを含

む医薬組成物又は医薬品有効成分である、方法である。
【００２２】
本開示は、対象に、本明細書で開示される分離方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む医薬組成物又は医薬品有効成分を投与する工程を含み、場合により当該医薬品有効成分がDNAワクチンの形態で投与され、予防される疾患又は障害が、SARS-CoV-2、ジカ、インフルエンザA型、黄熱病ウイルス、又はヒト免疫不全ウイルス(HIV)等のウイルスによる感染によって引き起こされる、対象における疾患又は障害を予防又は処置するための方法を更に提供する。
【００２３】
別の態様では、本開示は、本明細書で開示される分離方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物で細胞をインビトロでトランスフェクトする工程を含み、それによってウイルスベクターの生成を可能にし、場合により当該ウイルスベクターは、医薬品有効成分としての使用のためである、ウイルスベクターを生成するための方法を対象とする。
【００２４】
更なる態様では、本開示はまた、本明細書で開示される分離方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物を、RNAを生成するための鋳型として使用する工程を含み、場合により当該RNAが医薬品有効成分としての使用のためである、RNAを生成するための方法を提供する。
【００２５】
本開示の好ましい態様は、下記で、詳細な説明及び従属項において説明される。本発明は特許請求の範囲で列挙される特徴の全ての可能な組合せに関することに留意されたい。
【図面の簡単な説明】
【００２６】
【図１】本開示の、工程(a)～(d)を含む、超らせんpDNAを分離するための方法のフローチャートである。
【図２】工程(a)の前に更なる工程(a1)を更に含む、図1の、超らせんpDNAを分離するための方法のフローチャートである。
【図３】場合により工程(a)の前に工程(a1)を含み、工程(d)の後に1つ又は複数の更なる工程(e1)、(e2)及び/又は(e3)を更に含む、図1の、超らせんpDNAを分離するための方法のフローチャートである。
【図４】細胞溶解の間の$CaCl_2$沈殿によるRNA減少を示すアガロースゲルの写真である。
【図５】下記の実施例に記載される分離方法の第一のクロマトグラフィー工程の、3サイクルのpDNAの分離の溶出曲線を示すグラフである。
【図６】下記の実施例に記載される分離方法の第二のクロマトグラフィー工程の、超らせんpDNA及び開環状pDNAの分離の溶出曲線を示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
本開示は、図1で説明されるように、
(a)pDNAを含む液体試料を、(i)pDNAに結合するための陰イオン交換クロマトグラフィーリガンド及び(ii)第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする支持材を含む第一のクロマトグラフィー材に加える工程であって、
当該液体試料が、細胞培養収集物に由来し、工程(a)の前にRNAを除去する工程に供されている、工程、
(b)第一のクロマトグラフィー材から、超らせんpDNAと開環状pDNAとの精製された混合物を含む液体試料を溶出させる工程、
(c)工程(b)由来の液体試料を、pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む、第二のクロマトグラフィー材に加える工程、
(d)精製された超らせんpDNAを、第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程
を含み、工程(d)で溶出した超らせんpDNAが、当該第一及び第二のクロマトグラフィー

材以外にいかなる更なるクロマトグラフィー材を使用することなく、少なくとも95%の純度を有する、液体試料から超らせんプラスミドDNA(pDNA)を分離するための方法を提供することによって、超らせんプラスミドDNA(pDNA)を分離するための既存の方法に関連する問題を解決するか、又は少なくとも軽減する。

【００２８】

2つだけのクロマトグラフィー工程を含む、ここで開示された方法の有意な利点としては、下流処理のための生産時間が80%減少し、硫酸アンモニウム消費が50%減少して、高純度(少なくとも95%)の超らせんpDNAが得られ、それによって、アプリケーションノート28-4094-85 AA (Cytiva社、スウェーデン)に記載されている、既に知られたpDNA精製のための3工程の方法と比較して、持続可能性の増大がもたらされることが挙げられる。

【００２９】

本明細書で使用される場合、「液体試料」という用語は、細胞培養物から、又は細胞培養物に由来する流体から得ることができるあらゆるタイプの試料を包含し、当該流体は、分離及び精製のあらゆる手段によって、少なくとも部分的に精製されることが理解されるべきである。

【００３０】

「超らせんpDNA」という用語は、コイル状形態を有する閉ループの形態のプラスミドDNAをいう。DNAは、正の超らせん又は負の超らせんであり得る。例えば、超らせんプラスミドDNAは、末端にループのある二条の(two-start)右巻きのらせんを形成し得る。

【００３１】

「開環状pDNA」という用語は、プラスミドが超らせん立体配置をとる原因となる、二重らせんの鎖(strain)の少なくとも一部が遊離した影響によって、DNA二重らせんの一方の鎖が壊れたプラスミドDNAをいう。それによって、開環状pDNAは、コイル状でないが環状形態を維持する、閉ループを形成する。

【００３２】

超らせんプラスミドDNAに関する「純度」という用語は、プラスミドDNAの総量に関する、超らせんプラスミドDNAの含量をいう。「プラスミドDNA」としては、一般に、超らせんプラスミドDNA、開環状プラスミドDNA、及び存在する場合には直鎖状プラスミドDNAが挙げられる。したがって、95%の純度の超らせんpDNAは、超らせんpDNAが全pDNAの95%を構成することを意味する。

【００３３】

「分離マトリックス」という用語は、本明細書で、官能基を含む1つ又は複数のリガンドが結合している支持材を含む材料を意味するよう使用される。リガンドの官能基は、液体試料から分離される、及び/又は液体試料中に存在する他の化合物から分離される、本明細書で分析物とも呼ばれる化合物に結合する。分離マトリックスは、リガンドを支持材に結合させる化合物を更に含んでもよい。「リンカー」及び「エクステンダー」という用語は、かかる化合物を説明するために使用され得る。「レジン」という用語は、この分野における分離マトリックスのために使用される場合がある。「クロマトグラフィー材」及び「クロマトグラフィーマトリックス」という用語は、本明細書で、分離マトリックスの一種を意味するよう使用される。

【００３４】

一般に、分離マトリックスは、あらゆるタイプの分離装置に含まれ得る。「分離装置」という用語は、バイオプロセスの分野における、その従来の意味を有し、化合物の生成の副産物を含む流体からの化合物の分離及び精製をすることができ、分離及び精製に適した、あらゆるタイプの分離装置を包含すると理解されるべきである。分離装置は、上記で定義されるような分離マトリックスを含み得る。分離装置の非限定的な例としては、本明細書の他の部分で更に説明されるような、クロマトグラフィーカラム及び膜装置が挙げられる。非限定的な例によれば、多孔質粒子の形態のクロマトグラフィー材が、クロマトグラフィーカラムに含まれるクロマトグラフィー材に液体試料を加える前に、クロマトグラフ

ィーカラムに詰められ得る。別の非限定的な例によれば、膜状構造の形態のクロマトグラフィー材が、膜装置に含まれ得る。

【００３５】

この文脈において、「リガンド」は、所定の分析物に対する既知又は未知の親和性を有する分子であり、その表面に固定されたあらゆる官能基、又は捕捉剤が含まれるが、「分析物」は、リガンドに対するあらゆる特異的結合パートナーを含む。「リガンド」という用語は、本明細書で、「特異的結合分子」「特異的結合パートナー」「捕捉分子」及び「捕捉剤」という用語と互換可能に使用され得る。本明細書で、リガンドと相互作用する、液体試料中の分子は、「分析物」と呼ばれる。本開示の目的の分析物は、超らせんpDNAである。結果として、本明細書で、「分析物」及び「超らせんpDNA」という用語は、互換可能に使用され得る。

【００３６】

本明細書で開示される方法に適用されるクロマトグラフィー材は、リガンドが結合した支持材を含む。

【００３７】

上述のように、第一のクロマトグラフィー材の支持材は、第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする支持材である。「対流を可能にする支持材」という用語は、支持材の流入と流出との間の水圧差の適用によって支持材を灌流させ、実質的に、支持材への、又は支持材からの、物質の対流輸送を達成する、支持材を意味するよう意図される。

【００３８】

対流を可能にする支持材の非限定的な例は、ナノファイバー、モノリス、膜状構造物、及びエクステンダーが結合した粒子である。

【００３９】

第一のクロマトグラフィー材の支持材がナノファイバーを含む場合、かかるナノファイバーは、例えば、電界紡糸高分子ナノファイバーを含み得る。使用時に、かかるナノファイバーは、移動相が浸透し得る複数の孔を含む、固定相を形成する。

【００４０】

本明細書で、「モノリス」及び「モノリシック構造」という用語は、バイオプロセスの分野における、それらの従来の意味を有する。モノリスは、単一ユニットの構造であると説明され得る。バイオプロセスの適用において使用されるモノリスは、孔を含むスポンジ様構造を有する。第一のクロマトグラフィー材の支持材がモノリシック構造を含む場合、当業者は、液体試料からpDNAを分離する目的に適した孔径を有するモノリシック構造を選択することができる。

【００４１】

第一のクロマトグラフィー材のモノリシック支持材の非限定的な例は、CIMマルタス(商標)DEAE (Sartorius社)等のConvective Interaction Media (CIM(商標)モノリス(BIA Separations社))である。

【００４２】

第一のクロマトグラフィー材の支持材は、単一の膜、重なった膜又はフィルター等の、膜状構造物を含んでもよい。膜は、吸着性の膜であってもよい。クロマトグラフィー材の支持材が膜状構造物を含む場合、当業者は、液体試料からpDNAを分離する目的に適した孔径を有する膜状構造物を選択し得る。クロマトグラフィー材が膜状構造物を含む場合、かかる膜状構造物、例えば、高分子ナノファイバーの不織ウェブを含んでもよい。

【００４３】

適切なポリマーの非限定的な例は、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、ナイロン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、及びポリエチレンオキシド、並びにそれらの混合物から選択され得る。

【００４４】

或いは、ポリマーは、セルロース及びセルロースの部分的な誘導体、特にセルロースエステル、架橋セルロース、グラフト型セルロース又はリガンド結合型セルロース(ligand

-coupled cellulose)からなる群から選択されるようなセルロース系ポリマーであってもよい。セルロースファイバークロマトグラフィー(Fibroクロマトグラフィーとして公知;Cytiva社、スウェーデン)は、短い処理時間及び高い生産性のための超高速クロマトグラフィー精製であり、高流速及び高能力のセルロースファイバーを利用する。

【００４５】

適切な膜状構造物の非限定的な例は、強化セルロースを含む。

【００４６】

適切な膜状構造物の別の非限定的な例は、ナイロンを含む。

【００４７】

適切な膜状構造物の別の非限定的な例は、ポリエーテルスルホン、例えばMustang(商標)Q(Pall社)を含む。

【００４８】

本明細書で開示される分離方法の工程(a)で適用される第一のクロマトグラフィー材の非限定的な例は、本明細書の他の部分で詳細に説明されるように、陰イオン交換クロマトグラフィーリガンド、及びセルロース又はセルロースの部分的な誘導体を含む膜状構造を有する支持材を含む。

【００４９】

第一のクロマトグラフィー材の膜状支持材の別の非限定的な例は、Sartobind(登録商標)Q膜吸着剤(Sartorius社)であり、これは〉３μmの孔径のマクロ多孔質構造を有する。第四級アンモニウムリガンドは、膜の完全な内面に共有結合する。

【００５０】

「膜クロマトグラフィー」という用語は、バイオプロセスの分野における、その従来の意味を有する。膜クロマトグラフィーには、流体に接触した固相の表面への、流体の成分、例えば個々の分子、結合(associates)又は粒子の結合がある。固相の表面活性は、対流輸送による分子に到達可能である。充填されたクロマトグラフィーカラムにまさる、膜吸着剤の利点は、より高い流速で流されることへの適切さである。これはまた、対流ベースのクロマトグラフィーとも呼ばれる。対流ベースのクロマトグラフィーマトリックスとしては、マトリックスの流入と流出との間の水圧差の適用によってマトリックスを灌流させ、非常に迅速に高流速でもたらされる、実質的に、マトリックスへの、又はマトリックスからの、物質の対流輸送を達成する、あらゆるマトリックスが挙げられる。対流ベースのクロマトグラフィー及び膜吸着剤は、例えば、全体が参照によって本明細書に組み込まれている、US20140296464A1、US20160288089A1、WO2018011600A1、WO2018037244A1、WO2013068741A1、WO2015052465A1、US7867784B2に記載されている。

【００５１】

第一のクロマトグラフィー材の支持材は、実質的に球状の粒子、細長い粒子、又は不規則に形成された粒子等の、粒子の形態であってもよい。

【００５２】

適切な粒径は、５～５００μmの粒径範囲であってもよい。実質的に球状の粒子の場合、平均粒径は、５～１０００μmの範囲であってもよい。当業者は、使用される方法に依存して、適切な粒径及び多孔性を選択し得る。例えば、大規模な方法については、経済的な理由で、特に捕捉工程について、大容量の処理を可能にするために、より多孔質であるが厳密な支持体が好ましくあり得る。クロマトグラフィーにおいて、カラムのサイズ及び形状等のプロセスパラメータは、選択に影響を及ぼすであろう。エクスパンデッドベッド方法で、マトリックスは、一般に、高密度の充填剤、好ましくはステンレス鋼充填剤を含む。他の方法については、他の基準がマトリックスの性質に影響を及ぼし得る。

【００５３】

支持材は、有機又は無機の材料から作成され得、多孔質又は非多孔質であり得る。一実施形態では、支持材は、架橋炭水化物材料、例えばアガロース、寒天、セルロース、デキストラン、キトサン、コンニャク、カラゲナン、ジェラン、アルギン酸塩、ペクチン、デ

ンプン等の、天然のポリマーから調製される。天然のポリマーの支持材は容易に調製され、場合により、逆相懸濁ゲル化(inverse suspension gelation)(S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2)、393～398頁(1964))等の標準的な方法に従って架橋される。特に有利な実施形態では、支持材は、一種の、比較的厳密だが多孔質のアガロースであり、これはその流動性を増強する方法によって調製され、例えばUS6,602,990(Berg)を参照されたい。代替的な実施形態では、支持材は、架橋合成ポリマー、例えばスチレン又はスチレン誘導体、ジビニルベンゼン、アクリルアミド、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、ビニルエステル、ビニルアミド等の合成ポリマー又はコポリマーから調製される。かかる合成ポリマーは容易に調製され、場合により標準的な方法に従って架橋され、例えば「Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization」(R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9)、70～75頁(1988))を参照されたい。天然又は合成のポリマー支持材はまた、Cytiva社、スウェーデン等の商業的供給源からも、例えば多孔質粒子の形態で、入手可能である。更に代替的な実施形態では、支持材は、シリカ等の無機ポリマーから調製される。無機多孔質及び非多孔質支持体は当該分野で周知であり、標準的な方法に従って容易に調製される。

【００５４】

本明細書に開示される、超らせんpDNAを分離するための方法において、第一のクロマトグラフィー材が粒子の形態の支持材を含む場合、リガンドは、エクステンダーとしても公知の、より長いリンカー分子を介して支持材に結合する。エクステンダーは当該分野で周知であり、一般に、リガンドと支持体との間の距離を立体的に増大させるために使用される。エクステンダーは、テンタクル(tentacle)又はフレキシブルアームを意味する場合もある。可能な化学構造の、より詳細な説明については、例えば、参照によって本明細書に含まれるUS6,428,707を参照されたい。手短にいえば、エクステンダーは、ホモポリマー又はコポリマー等のポリマーの形態であってもよい。親水性ポリマー性エクステンダーは、合成由来であってもよく、即ち、合成骨格を有してもよく、又は生体由来であってもよく、即ち、天然起源の骨格を有するバイオポリマーであってもよい。典型的な合成ポリマーは、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド及びポリメタクリルアミド、ポリビニルエーテル等である。典型的なバイオポリマーは、デンプン、セルロース、デキストラン、アガロース等の多糖である。

【００５５】

第一のクロマトグラフィー材の粒子ベースの支持材の非限定的な例は、機能性リガンドに共有結合した線状ポリマー鎖のテンタクルを有する合成メタクリル酸ベースのポリマービーズからなるFractogel(商標)(Merck Millipore社)である。

【００５６】

第一のクロマトグラフィー材の陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドは、強陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドであってもよい。強陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドは、例えば、第四級アミン基又は第四級アミノエチル基を含んでもよい。

【００５７】

或いは、第一のクロマトグラフィー材の陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドは、弱陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドであってもよい。弱陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドは、例えば、ジエチルアミノエチル(DEAE)基、トリメチルアミノエチル(TMAE)基、ジメチルアミノエチル(DMAE)基、又はトリメチルヒドロキシプロピル(QA)基を含んでもよい。

【００５８】

本明細書の実施例で使用される第一のクロマトグラフィー材は、Mustang(商標)Q(Pall社)であり、これは、第一のクロマトグラフィー材を通した対流を可能にする膜状構造物の形態の支持材、及び第四級アミン基を有する強陰イオン交換リガンドを含み、このリガンドは支持材に共有結合している。

【００５９】

第二のクロマトグラフィー材は、リガンドが結合した支持材を含み、この支持材は、ナ

ノファイバー、モノリス、膜状構造物、又は粒子を含む。
【００６０】
第一のクロマトグラフィー材の支持材に関して上記で見られる、ナノファイバー、モノリス、膜状構造物及び粒子の詳細な説明は、第二のクロマトグラフィー材の支持材に関するナノファイバー、モノリス、膜状構造物及び粒子に同様に適用可能である。
【００６１】
しかしながら、第一のクロマトグラフィー材の支持材と比較した相違は、第二のクロマトグラフィー材の支持材は、必ずしも対流を可能にする支持材である必要はない点である。
【００６２】
したがって、使用される第二のクロマトグラフィー材の支持材が粒子である場合、粒子はエクステンダーを含む必要はないが、それらは場合により、リガンドを支持体に連結させるリンカーを含んでもよく、即ち、支持材へのリガンドの結合は、支持材とリガンドとの間にリンカーを導入することによって提供され得る。結合は、エピクロロヒドリン;エピブロモヒドリン;アリルグリシジルエーテル;ブタンジオールジグリシジルエーテル等のビスエポキシド;ジクロロプロパノール等のハロゲン置換脂肪族物質;及びジビニルスルホンの使用によるような、あらゆる従来の共有結合方法に従って行われ得る。適切なリンカーの、他の非限定的な例は、2～6個の炭素原子を有するポリエチレングリコール(PEG)、3～6個の炭素原子を有する炭水化物、及び3～6個の炭素原子を有するポリアルコールである。これらの方法は全て当該分野で周知であり、当業者によって容易に行われる。更に上記で詳細に説明されるように、場合により、リンカーはエクステンダーである。
【００６３】
更に上記で言及されるように、第二のクロマトグラフィー材は、pDNAに結合して開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む。選択的分離は、超らせんpDNAとの結合相互作用が開環状pDNAとの結合相互作用と比較して増大し得ること(超らせんpDNAが開環状pDNAより強く第二のクロマトグラフィー材のリガンドに結合することを意味する)によって、又は開環状pDNAとの結合相互作用が超らせんpDNAとの結合相互作用と比較して増大し得ること(開環状pDNAが超らせんpDNAより強く第二のクロマトグラフィー材のリガンドに結合することを意味する)によって、第二のクロマトグラフィー材のリガンドによって達成され得る。
【００６４】
第二のクロマトグラフィー材のリガンドは、pDNAへの塩促進性(salt-promoted)親和性結合及び/又は親硫黄性芳香族吸着結合を可能にし得る。
【００６５】
第二のクロマトグラフィー材のリガンドは、例えば、親硫黄基、好ましくは2-メルカプトピリジン基を含み得る。
【００６６】
本明細書の実施例で使用される第二のクロマトグラフィー材は、Capto(商標)PlasmidSelect(Cytiva社、スウェーデン)であり、これは多孔質アガロース粒子(累積体積分布(d50V)の中央粒径が36～44μm)の形態の支持材、及び2-メルカプトピリジン基を含む親硫黄性芳香族吸着リガンドを含む。このリガンドは、開環状pDNAとの結合相互作用と比較して、超らせんpDNAとの結合相互作用を増大させ得る。
【００６７】
第二のクロマトグラフィー材の別の非限定的な例は、PlasmidSelect Xtra(Cytiva社、スウェーデン)であり、これは多孔質アガロース粒子(累積体積分布(d50V)の中央粒径がおよそ34μm)の形態の支持材、及び2-メルカプトピリジン基を含む親硫黄性芳香族吸着リガンドを含む。
【００６８】
「表面」という用語は、本明細書で、全ての外面(external surface)を意味し、多孔質支持材の場合、外表面(outer surface)及び細孔表面を含む。

【００６９】
「溶出液」という用語は、当該分野における従来の意味で使用され、即ち、分離マトリックスから1つ又は複数の化合物を遊離させるための適切なpH及び/又はイオン強度のバッファーである。
【００７０】
「溶出液」という用語は、当該分野における従来の意味で使用され、即ち、液体試料を分離マトリックスに加えた後に分離マトリックスから溶出する液体試料の一部である。
【００７１】
上述のように、超らせんpDNAを分離するための方法において、液体試料は細胞培養収集物に由来する。
【００７２】
本明細書で、「細胞培養物」という用語は、細胞の培養物又は培養されている細胞の群をいい、ここで細胞は、細菌細胞、ウイルス細胞、真菌細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞等のあらゆるタイプの細胞であり得る。細胞培養物は、清澄化されていなくてもよく、即ち、細胞を含んでもよく、又は細胞除去されていてもよく、即ち、細胞を全く含まないか、若しくは少ししか含まないが、細胞を除去する前に細胞から放出された生体分子を含む、培養物であってもよい。更に、清澄化されていない細胞培養物は、完全細胞、破砕された細胞、細胞ホモジネート、及び/又は細胞溶解物を含んでもよい。
【００７３】
「細胞培養収集物」という用語は、本明細書で、細胞が培養されていた容器又は器具から収集及び除去された細胞培養物を意味するよう使用される。
【００７４】
上述のように、上述の分離方法の工程(a)で第一のクロマトグラフィー材に加えられた液体試料は、細胞培養収集物に由来し、工程(a)の前にRNAを除去する工程に供される。
【００７５】
当業者は、細胞培養収集物に由来する液体試料が、精製方法のある時点で除去される必要のある、RNAを含む多くの異なるタイプの生体化合物を含むことを理解する。
【００７６】
本明細書で、「RNAを除去する」という用語は、液体試料中に存在するRNAの量を減少させることを意味するよう意図される。現在開示される方法の文脈において、RNAは捕捉工程、即ち第一のクロマトグラフィー材への結合においてpDNAと競合するので、RNAを除去する工程は、工程(a)の前に行われる。よって、工程(a)の前にRNAを除去して、工程(a)で適用される第一のクロマトグラフィー材のpDNA結合能を向上させることは有利である。好ましくは、工程(a)の前のRNAの除去は、液体試料中のRNAの量の有意な減少をもたらす。
【００７７】
工程(a)で第一のクロマトグラフィー材に加えられる液体試料は、このように、前処置された液体試料であってもよい。
【００７８】
したがって、上述の方法は、図2に示されるように、工程(a)の前に工程(a1)を更に含んでもよく、工程(a1)は、液体試料を前処置する工程を含み、場合により当該前処置する工程は、細胞培養収集物を、細胞溶解、RNA沈殿剤の存在下でのRNAの沈殿、清澄化、及び濾過の1つ又は複数に供する工程を含む。好ましくは、当該前処置する工程は、少なくとも、細胞溶解、RNA沈殿剤の存在下でのRNAの沈殿、及び清澄化を含む。沈殿したRNAは、濾過によって除去し得る。
【００７９】
細胞溶解を行うための種々の技術は当該分野で周知である。一般に、収集された細胞は、アルカリ溶解液と混合されて、細胞溶解物とも呼ばれる、溶解された細胞の組成物を形成する。溶解は、その後、細胞溶解物への中和溶液の添加によって中断され、次いで、断片化された細胞を含む細胞片、宿主細胞タンパク質及び宿主細胞ゲノムDNAが除去され

得る。

【００８０】

例えば、細胞培養物は、国際特許出願第PCT/EP2022/077388号に記載されるように、アルカリ溶解、中和、及び/又は清澄化に供され得る。例えば、細胞培養物は、当該細胞のアルカリ溶解のために、使い捨てバッグ等の使い捨て容器中で、アルカリ溶解液と接触させ得、ここで使い捨て容器は、一体型ミキサー(integrated mixer)を含み、細胞培養物は、アルカリ溶解液と混合される。溶解は、細胞培養物への中和溶液の添加によって中断し得る。

【００８１】

或いは、液体試料中に存在する収集された細胞(例えば、スラリーの形態で)は、スタティックミキサーによってアルカリ溶解液と混合され得る。そのようなスタティックミキサーは公知である。この文脈において有用なスタティックミキサーは、管状部材を通過する流体の流路を部分的に妨害するよう管状部材の内部に配置された複数の隔壁を含む細長い管状部材であってもよい。スタティックミキサーは、このように、通過する流体の成分の混合を提供する、混濁した流れを達成する。スタティックミキサーの隔壁は、丸い形を有してもよい。かかる形状で、細胞溶解物及び遊離プラスミドを含む流体の流れは、プラスミドへの損傷を避けて、穏やかに向け直される。

【００８２】

収集された細胞のスラリーをアルカリ溶解液と混合するために、アルカリ溶解液は、流体入口を介して、細胞スラリーを含む容器又は管に加えてもよく、次いで、組合せ組成物は、スタティックミキサーへ送られ(例えばポンプで)、スタティックミキサーを通り得る。例えば、細胞スラリーは、1つの入口を介して接合部に提供してもよく、アルカリ溶解液は、別の入口を介して当該接合部に提供してもよい。接合物はY字分岐接合部(Y joint)であってもよい。混合物は、スタティックミキサーを通して、継続的に一定の流速でポンプによって送られ得る。

【００８３】

場合によりスタティックミキサーを使用して、混合した後、アルカリ溶解液は、細胞溶解が十分な程度、好ましくは完全に進行するのに十分な時間、細胞スラリーと接触し続ける。接触時間は1分間から10分間までの範囲であってもよく、2～3分間等の、2～5分間の間であってもよい。接触時間が長い程、プラスミドDNAの一部も分解されるリスクが高くなる。そのため、10分間より短い接触時間が好ましい。

【００８４】

溶解反応は、得られた細胞溶解物を上述のように中和溶液と混合することによって中断される。

【００８５】

中和溶液の添加は、アルカリ溶解の間に使用されたのと同じ使い捨て容器であってもよい、使い捨て容器中で起こってもよく、又は、別の使い捨て容器であってもよく、これはスタティックミキサーが上述のように使用される場合である。細胞溶解物が中和溶液と接触する使い捨て容器は、一体型ミキサーを含んでもよい。

【００８６】

細胞スラリー及びアルカリ溶解液を混合するためにスタティックミキサーが使用される場合、スタティックミキサーの後(下流)に配置された流体入口を介して中和溶液を細胞溶解物に加えてもよく、次いで、中和された細胞溶解物を、RNA沈殿、清澄化及び/又は濾過等の更なる処理が起こり得る容器に移してもよい。溶解及び中和の後、細胞溶解物を、場合により、RNA沈殿剤を使用したRNA沈殿に供してもよい。RNA沈殿剤は、塩化カルシウム($CaCl_2$)、塩化リチウム(LiCl)、及びクエン酸三カリウム($C_6H_5K_3O_7$)からなる群から選択され得、好ましくは塩化カルシウムであり得る。

【００８７】

溶解及び中和の後、細胞溶解物を、清澄化及び/又は濾過に供してもよい。当業者は、細胞培養収集物に由来する液体試料の、種々の清澄化のための方法及び濾過のための方法

の知識を有する。例えば、細胞溶解物は、本質的に、PCT/EP2022/077388に記載されるように、
- 溶解を中断するために中和溶液を添加した後、場合により細胞溶解物を、使い捨ての混合バッグ等の使い捨て容器に移す工程、
- 凝集物を取り除く薬剤(flocculate lifting agent)を使い捨て容器に加えることによって使い捨て容器内で細胞溶解物を清澄化させ、それによって使い捨て容器内で少なくとも2つの相が分離し、それによって当該相の一方が中和及び清澄化された、プラスミドDNAを含むアルカリ性溶液である、工程、
- 使い捨て容器から、中和及び清澄化されたアルカリ性溶液を除去する工程、
- 中和及び清澄化されたアルカリ性溶液を濾過する工程

によって、清澄化し得る。

【００８８】

清澄化が行われる使い捨て容器は、一体型ミキサーを含んでもよい。清澄化工程の使い捨て容器は、可撓性プラスチックバッグ等の使い捨てバッグであってもよい。

【００８９】

本明細書に記載される工程段階の1つ又は複数は、好ましくは使い捨てバッグ、管及びミキサー等の使い捨て器具を使用して、連続的な方法の一部として行われ得る。例えば、上述のようなスタティックミキサーを使用した細胞溶解と、その後の中和は、連続的な方法で行われ得る。有利なことに、かかる方法は、細胞収集物スラリー、溶解液及び中和溶液の流速を制御する1つ又は複数のポンプの設置を調節することによって容易に制御し得る。

【００９０】

連続的でない場合、工程は、バッチ式で行われる。例えば、細胞溶解及び中和は、連続的に行われ得、その後にバッチ式のRNA沈殿、清澄化及び濾過が行われ得る。しかしながら、全ての工程がバッチ式で行われ得ることも考えられる。更に、連続的又はバッチ式のいずれで行われても、上述のようなスタティックミキサーを使用した細胞溶解と、その後の中和、RNA沈殿、清澄化及び濾過を伴うプラスミドDNAの精製のための方法は、その後に、本明細書で上述されるようなクロマトグラフィー工程、又は他のクロマトグラフィー及び/若しくは濾過技術が続き得る。

【００９１】

上述のように、工程(d)で溶出した超らせんpDNAは、当該第一及び第二のクロマトグラフィー材以外にいかなる更なるクロマトグラフィー材を使用することなく、96%、97%、98%、99%、又は99.5%等の、少なくとも95%の純度を有する。したがって、現在開示されている、超らせんpDNAを分離するための方法は、2つだけのクロマトグラフィー工程を採用することによって、優れた程度の精製を達成する。少なくとも95%の純度を有する超らせんpDNAを得るために、更なるクロマトグラフィー工程は必要ない。

【００９２】

上述の方法は、工程(b)と工程(c)との間に工程(c1)を含み得、工程(c1)は、工程(b)で溶出した液体試料を、液体試料対希釈剤が1:3、1:4又は1:5等の少なくとも1:2の体積比で、希釈剤で希釈する工程を含む。希釈剤は塩を含む。現在好ましい塩は、硫酸アンモニウム($(NH_4)_2SO_4$)である。現在好ましい体積比は、液体試料対硫酸アンモニウムが1:4である。現在好ましい硫酸アンモニウムの濃度は、3Mである。ホーフマイスター系列に従って硫酸アンモニウムと同様の特性を有する他の塩が、硫酸アンモニウムの代わりの使用に適し得ることが考えられる。ホーフマイスター系列は、タンパク質を塩析又は塩溶する能力の順位の、イオンの分類である。希釈剤は、場合により、緩衝剤として作用し得る。

【００９３】

上述の方法は、工程(c)と工程(d)との間に工程(d1)を含み得、工程(d1)は、第二のクロマトグラフィー材から開環状pDNAを溶出させる工程を含む。一部の処理条件下で、開環状pDNAは、第二のクロマトグラフィー材に結合し、この場合は第二のクロマトグラフ

ィー材から溶出させる必要がある。更に上記で説明されたように、第二のクロマトグラフィー材は、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にする。第二のクロマトグラフィー材が、超らせんpDNAとの結合相互作用を開環状pDNAとの結合相互作用と比較して増大させることができる場合、超らせんpDNAが開環状pDNAより強く第二のクロマトグラフィー材に結合する。それによって、開環状pDNAは、超らせんpDNAよりも、より容易に第二のクロマトグラフィー材から溶出するようになる。この場合、工程(d1)は工程(d)の前に行われる。

【００９４】

更に上記で言及されるように、本明細書で開示される方法の利点の1つは、下流の処理での生産時間の有意な減少である。実際、本明細書で開示される、超らせんpDNAを分離するための方法は、工程(a)～(d)及びあらゆる中間の工程が5時間以内に完了し得るように最適化されている。これは、上述の特徴の組合せの結果である。より具体的には、工程(a)の前に液体試料を、RNAを除去する工程に供していること、対流を可能にする支持材を含む第一のクロマトグラフィー材、及び開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む第二のクロマトグラフィー材の組合せによって、上述の工程(a)、(b)、(c)、及び(d)、並びに上述の工程(c1)及び(d1)等のあらゆる中間の工程が5時間以内に完了することが可能になる。

【００９５】

工程(a)～(d)及びあらゆる中間の工程に必要な、上述の「5時間以内」という時間枠は、上述の工程(a1)等の、工程(a)の前に行われるいかなる工程も含まず、後述の工程(e1)、(e2)、(e3)等の、工程(d)の後に行われるいかなる工程も含まない。

【００９６】

本明細書で開示される、超らせんpDNAを分離するための方法は、図3に示されるように、工程(d)で溶出した超らせんpDNAを、下記の工程:

(e1)超らせんpDNAを、薬学的に適切な用量まで濃縮する工程、

(e2)上述の方法の工程(d)で適用されたバッファーを、薬学的に許容され得るバッファーで置換する工程、及び/又は

(e3)超らせんpDNAを滅菌する工程

の1つ又は複数に供する工程を更に含み得、それによって医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物を得て、場合により当該組成物は、医薬品グレードの超らせんpDNAを含む医薬組成物又は医薬品有効成分である。

【００９７】

当業者は、薬学的に適切な用量は、限定されないが、処置される疾患又は障害、並びに医薬組成物又は医薬品有効成分で処置される対象の体重及び状態等の種々の要因に依存することを理解する。

【００９８】

薬学的に許容され得るバッファーは当該分野で周知であり、当業者によって容易に選択され得る。

【００９９】

得られた組成物が、医薬組成物及び医薬品有効成分についての全ての法的規制を満たすために、通常、上述の3つの工程e1～e3の全てが行われなければならない。

【０１００】

本開示は、対象における疾患又は障害を予防又は処置するための方法であって、当該対象に、(上記で詳細に説明されるように)工程e1～e3の1つ又は複数を含む上記で開示された分離方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む医薬組成物又は医薬品有効成分を投与する工程を含む、方法を更に提供する。

【０１０１】

当該医薬品有効成分はDNAワクチンの形態で投与され得、予防される疾患又は障害は、SARS-CoV-2、ジカ、インフルエンザA型、黄熱病ウイルス、又はヒト免疫不全ウイルス(HIV)等のウイルスによる感染によって引き起こされる。

【０１０２】
本開示はまた、インビトロで、細胞を、工程e1～e3の1つ又は複数を含む上記で開示された分離方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物でトランスフェクトする工程を含み、それによってウイルスベクターの生成を可能にする、ウイルスベクターを生成するための方法を提供する。
【０１０３】
ウイルスベクターは、医薬品有効成分としての使用のためであってもよい。当該ウイルスベクターは、治療上適切な、医薬品グレードの超らせんpDNAに由来する遺伝子材料を含み得ることが理解されるべきである。医薬品有効成分は、ウイルスによる感染によって引き起こされる疾患又は障害を予防する方法における使用のための、ウイルスベクターワクチンの形態であってもよい。医薬品有効成分は、細胞治療、遺伝子療法又は腫瘍溶解療法の方法における使用のためであってもよい。腫瘍溶解療法は、乳癌、肺癌、卵巣癌又は白血病等の癌の処置を含んでもよい。医薬品有効成分は、嚢胞性線維症、レーバー先天性黒内障、又は脊髄性筋萎縮症等の疾患又は障害を処置又は予防するための方法における使用のためであってもよい。
【０１０４】
本開示は、工程e1～e3の1つ又は複数を含む上記で開示された分離方法を行うことによって得られた医薬品グレードの超らせんpDNAを含む組成物を、RNAを生成するための鋳型として使用する工程を含む方法を更に提供する。
【０１０５】
場合により、このようにして生成されたRNAは、医薬品有効成分としての使用のためであってもよい。当該RNAは、治療上適切な、医薬品グレードの超らせんpDNAに由来する遺伝子材料を含み得ることが理解されるべきである。医薬品有効成分は、SARS-CoV-2、ジカ、インフルエンザA型、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、又は狂犬病ウイルス等のウイルスによる感染によって引き起こされる疾患又は障害を予防する方法における使用のための、RNAワクチンの形態であってもよい。医薬品有効成分は、遺伝子療法、腫瘍溶解療法、又は個別化医療の方法における使用のためであってもよく、又は、希少疾患、嚢胞性線維症、レーバー先天性黒内障、又は脊髄性筋萎縮症等の疾患又は障害を処置又は予防するためであってもよい。腫瘍溶解療法は、乳癌、肺癌、卵巣癌又は白血病等の癌の処置を含んでもよい。
【０１０６】
当業者は、医薬組成物又は医薬品有効成分が、所望の薬効を達成するために、薬学的に有効な量又は用量で対象に投与されなければならないことを理解する。薬学的に有効な量及び用量は、限定されないが、処置又は予防される疾患又は障害、並びに処置される対象の体重及び状態等の種々の要因に依存する。
【０１０７】
1つ又は複数の列挙される成分を「含む」装置又は組成物はまた、特に列挙されていない他の成分も含み得る。「含む」という用語は、サブセットとして、装置又は組成物が、他の特徴又は成分の存在なしで、列挙される成分を有することを意味する、「から実質的になる」を含む。同様に、1つ又は複数の列挙される工程を「含む」方法はまた、特に列挙されていない他の工程を含み得る。
【０１０８】
単数形「a」及び「an」は、複数形も含むと解釈されるべきである。
【実施例】
【０１０９】
細胞培養収集物からの超らせんpDNAの分離
方法及び材料
7.3kbpのサイズを有するプラスミドDNA(pDNA)を含む大腸菌(E.coli)細胞(クローンDH5α)を、15L撹拌槽反応器での流加プロセスからの発酵液の遠心分離によって収集した。発酵条件は、pH=7.2±0.2、溶存酸素(DO)=30%、及び温度=37℃を含んだ。供

給プロファイルは、0.25時間$^{-1}$の特定の増殖速度を維持した。標的とされる最終的なODは、45～50であった。プロセスは、16.5時間後に終了させた。

【0110】

それによって得られた大腸菌細胞収集物をアルカリ溶解に供して細胞を破壊し、その後得られた液体試料を中和に供し、即ち、pHを約5に調節した。

【0111】

その後、当該液体試料への$CaCl_2$の添加によってRNAを沈殿させた。その後の捕捉クロマトグラフィー工程において、クロマトグラフィー材への結合で、RNAはpDNAと競合するので、捕捉工程の前にRNAを除去して、クロマトグラフィー材へのpDNAの結合能を向上させることが有利である。図4は、RNA沈殿剤として$CaCl_2$を加えることによって液体試料中のRNAの量が有意に減少することを示す。図4:レーン(1)1M $CaCl_2$、レーン(2)0.75M $CaCl_2$、レーン(3)0.5M $CaCl_2$、及びレーン(4)$CaCl_2$の添加なし。

【0112】

その後、液体試料を、凝集物を取り除く工程と、その後の濾過工程に供し、それによってRNA沈殿物及び凝集物を液体試料から除去することによって、清澄化した。条件:デプス濾過(PDP8、Pall社):流速100LMH(L/m^2/時間)、投入量220L/m^{2}限外濾過/ダイアフィルトレーション(UF/DF):せん断速度6000秒$^{-1}$、膜間圧(TMP)0.07MPa(0.7バール、10.2psi)、投入量70L/m^2。

全量濾過(NFF)(NFFフィルター、Pall社):流速600LMH(L/m^2/時間)、投入量180L/m^2。

【0113】

得られた、前処置された液体試料を、次いで、下記で詳細に説明される2つのクロマトグラフィー工程に供し、それによって、95%より高い純度で超らせんpDNAを得た。

【0114】

第一のクロマトグラフィー工程

pDNAに結合することができる陰イオン交換クロマトグラフィーリガンドを含む第一のクロマトグラフィー材の使用による、pDNAの捕捉、即ち、前処置された液体試料からのpDNAの分離。

【0115】

第一のクロマトグラフィー材:第四級アミン基を含むリガンドを有するMustang(商標)Q膜(Pall社)。

Mustang(商標)QXT5(5mL)膜カプセルを使用した。

【0116】

分離条件:

それぞれ150mL(サイクル1)、200mL(サイクル2)、及び200mL(サイクル3)の液体試料を投入して、Mustang(商標)Q膜上で3回サイクルを行った。

投入量12mg pDNA/膜体積(MV)

500mM NaCl、50mM Tris、pH8.0での結合

3M NaCl、50mM Tris、pH8.0での溶出

流速5MV/分

収率の増大のために、UV増大で30分間溶出を停止する。

CIP洗浄(CIP)1M NaOH

再生1M NaCl、0.1M NaOH

【0117】

第二のクロマトグラフィー工程

pDNAに結合し、開環状pDNAからの超らせんpDNAの選択的分離を可能にするリガンドを含む第二のクロマトグラフィー材の使用による、開環状pDNAからの超らせんpDNAの分離。

【0118】

第二のクロマトグラフィー材:2-メルカプトピリジン基を含むリガンドを有するCapto

(商標)PlasmidSelectレジン(Cytiva社、スウェーデン)。
レジンをHiScale(商標)16(20mL)カラム、10cm層高に充填した。
【０１１９】
分離条件:
投入量2mg pDNA/mLレジン
溶出液希釈3M$(NH_4)_2SO_4$中1+4
2.25M$(NH_4)_2SO_4$での結合
流速:平衡及び投入220cm/時間、溶出120cm/時間
水に対する直線勾配による溶出、11カラム体積(CV)、55%
【０１２０】
結果及び結論
第一のクロマトグラフィー工程
図5は、Mustang Q(商標)膜での、再現可能で迅速なサイクル、及び異なる投入量での一貫性を示す。図5のクロマトグラムにおいて、下部の実線は、サイクル1(150mL試料)を表し、中央の破線はサイクル2(200mL試料)を表し、上部の点線はサイクル3(200mL試料)を表す。左側のピークは、pDNA(超らせんpDNAと開環状pDNAとの混合物)の溶出を表し、中央のピークはCIPを表し、右側のピークは膜の再生を表す。
【０１２１】
第二のクロマトグラフィー工程
図6は、Capto(商標)PlasmidSelectレジンを使用した、開環状pDNAから分離した超らせんpDNAの精製の成功を示す。図6のクロマトグラムにおいて、開環状pDNAが最初に溶出し(左側の小さいピーク)、その後に超らせんpDNAが溶出する(大きいピーク)といえる。超らせんpDNAの後の勾配の終わりに、RNA及びエンドトキシン等の不純物が溶出する。不純物ピークはまた、pDNAの工程収量低下を含む。「Conc B」と呼ばれる点線は、純水に対する溶出バッファーの塩勾配(減少する塩濃度)を示す。最後の限外濾過/ダイアフィルトレーションの後、得られた超らせんpDNAの純度は、著しく高かった(99.3%)。アガロースゲル電気泳動(AGE)及び毛管ゲル電気泳動(CGE)によって、超らせんpDNAの分離の成功が確認された(図示せず)。
【０１２２】
Table 1(表1)は、この実施例に記載される分離方法の各工程の後の、超らせん(SC)pDNAの純度及び開環状(OC)pDNAの含量を示す。
【０１２３】
【表１】

Table 1. 分離方法全体を通しての超らせん pDNA 及び開環状 pDNA の含量

方法中の工程	SC (%)	OC (%)
最初の UF/DF	97.4	2.6
全量濾過 (NFF)	97.7	2.3
Mustang(商標)Q 溶出液	92.1	7.9
Capto(商標)PlasmidSelect 溶出液	97.4	2.6
最終的な UF/DF 残余分	99.3	0.7

【０１２４】
Table 2(表2)は、上記の実施例に従った200L規模の方法(「新しい方法」)についての、及びアプリケーションノート28-4094-85 AA(Cytiva社)に開示される方法(「従来技術の方法」)と比較した、硫酸アンモニウムバッファー消費の計算を示す。
【０１２５】

【表２】

Table 2. 細胞培養収集物 200L あたりに、従来技術の方法及び新しい方法でそれぞれ消費される硫酸アンモニウムバッファーの体積(L)

		従来技術の方法		**新しい方法**	
		群分離	捕捉	第一のクロマトグラフィー工程	第二のクロマトグラフィー工程
詳細な工程段階	平衡化	96 L	30 L	0	30 L
	洗浄	0	30 L	0	20 L
	溶出	64 L	20 L	0	80 L
	希釈*	-	-	200 L	-
	サイクル当たりの合計	*160 L*	*80 L*	*200 L*	*130 L*
サイクルの数		5	2	1	2
体積		800 L	160 L	200 L	260 L
細胞培養収集物 200L 当たりの総体積		**960 L**		**460 L**	

*希釈は、本明細書で開示される方法の第一のクロマトグラフィー工程と第二のクロマトグラフィー工程との間に行われるが、第二のクロマトグラフィー工程の一部とも呼ばれ得る。しかしながら、試料は、続く第二のクロマトグラフィー工程が繰り返される場合であっても、一度だけ希釈される。

【０１２６】

３つのクロマトグラフィー工程を含む、超らせんpDNAの精製のための、既に知られた方法(アプリケーションノート28-4094-85 AA、Cytiva社、スウェーデン)と比較して、下流の処理のための生産時間の８０％の減少、及び硫酸アンモニウム消費の５０％の減少が達成された。

【０１２７】

本開示は、上述の、その例示的な実施形態に制限されないこと、及び本開示のいくつかの考えられる改変が添付の特許請求の範囲内で可能であることが、理解されるべきである。

【０１２８】

（参考文献）

Lemmens R et al., Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption, Journal of Chromatography B, 5 Feb 2003, 784(2):291-300

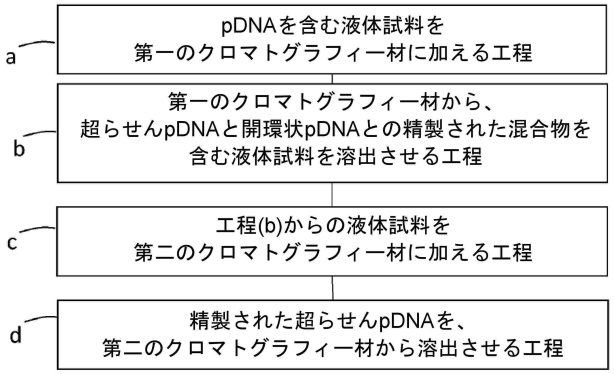
Sandberg L M et al., Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification, Journal of Biotechnology, 8 Apr 2004, 109(1-2):193-199

Application Note 28-4094-85 AA, Cytiva, Sweden

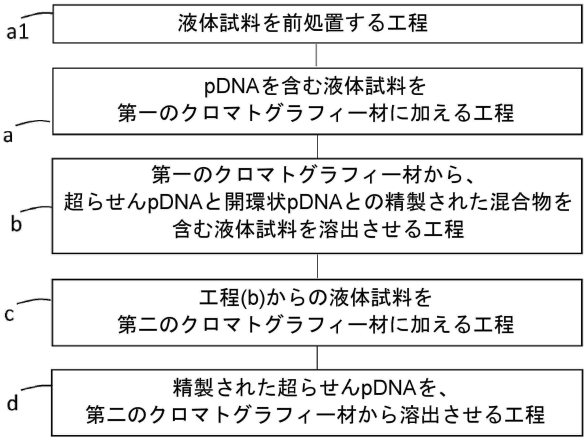
Hitchcock A G et al., Scale-up of a plasmid DNA purification process, Use of a commercial resin to produce GMP-grade pDNA for clinical studies, BioProcess International, Dec 2010, 8(11):46-54

【図面】

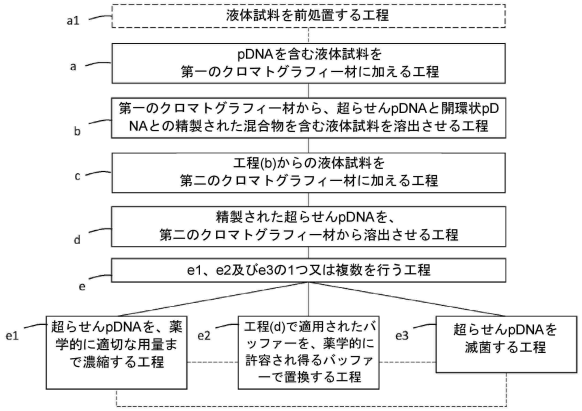
【図１】



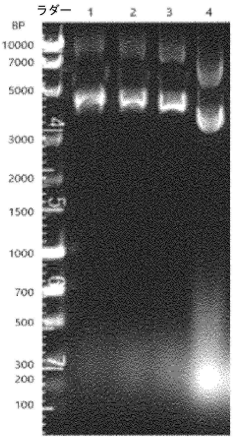
【図２】



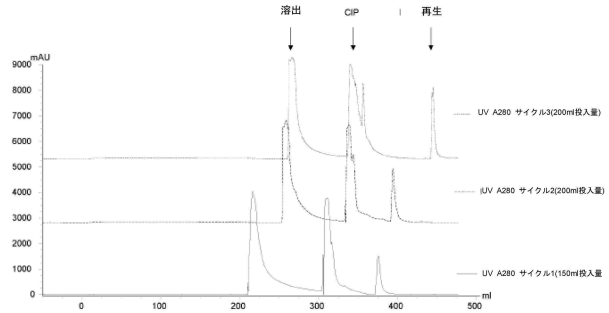
【図３】


a1
液体試料を前処置する工程
a
pDNAを含む液体試料を
第一のクロマトグラフィー材に加える工程
b
第一のクロマトグラフィー材から、超らせんpDNAと開環状pD
NAとの精製された混合物を含む液体試料を溶出させる工程
c
工程(b)からの液体試料を
第二のクロマトグラフィー材に加える工程
d
精製された超らせんpDNAを、
第二のクロマトグラフィー材から溶出させる工程
e
e1、e2及びe3の1つ又は複数を行う工程
e1
超らせんpDNAを、薬
学的に適切な用量ま
で濃縮する工程
e2
工程(d)で適用されたバ
ッファーを、薬学的に
許容され得るバッファ
ーで置換する工程
e3
超らせんpDNAを
滅菌する工程

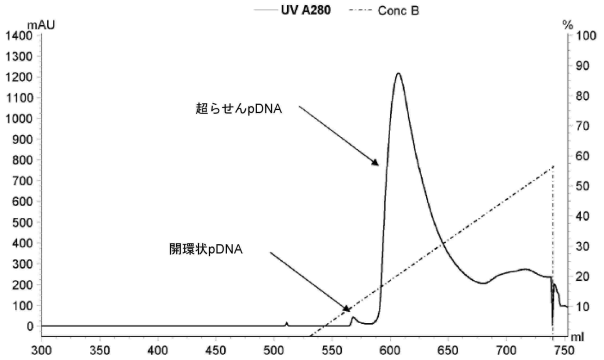
【図４】


ラダー
1
2
3
4
BP
10000
7000
5000
3000
2000
1500
1000
700
500
300
200
100

【図５】


溶出
CIP
再生
mAU
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
100
200
300
400
500
ml
UV A280 サイクル3(200ml投入量)
UV A280 サイクル2(200ml投入量)
UV A280 サイクル1(150ml投入量

【図６】


UV A280
Conc B
mAU
%
超らせんpDNA
開環状pDNA
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
ml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 B01D15/36 B01J20/28
ADD. C07K1/22

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)
C12N G01N C07K B01D B01J

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)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 6 410 274 B1 (BHIKHABHAI RAMAGAURI [SE]) 25 June 2002 (2002-06-25) see claims and examples -----	1,2,20, 21 1-33
Y	US 2010/273254 A1 (BUDAHAZI GREGG [US] ET AL) 28 October 2010 (2010-10-28) see claims and examples -----	1-33
Y	US 2001/034435 A1 (NOCHUMSON SAMUEL [US] ET AL) 25 October 2001 (2001-10-25) see claims, example 2 and Fig. 3 ----- -/--	1-33

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 May 2023	01/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vix, Olivier

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054159

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TIAGO MATOS ET AL: "Plasmid DNA purification using a multimodal chromatography resin", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION., vol. 27, no. 4, 10 February 2014 (2014-02-10), pages 184-189, XP055340234, GB ISSN: 0952-3499, DOI: 10.1002/jmr.2349 see abstract and pages 185-186	1-33
Y	WO 2013/068741 A1 (UCL BUSINESS PLC [GB]) 16 May 2013 (2013-05-16) cited in the application see claims 1-21	1-33
Y	SANTOS TIAGO ET AL: "l-tryptophan and dipeptide derivatives for supercoiled plasmid DNA purification", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 87, 4 March 2016 (2016-03-04), pages 385-396, XP029493039, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2016.02.079 see abstract and pages 392-394	1-33
Y	SANDBERG LENA M ET AL: "Thiophilic interaction chromatography for supercoiled plasmid DNA purification", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 109, no. 1-2, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 193-199, XP093048602, Amsterdam NL ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2003.10.036 cited in the application the whole document	1-33
Y	LEMMENS R ET AL: "Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 784, no. 2, 5 February 2003 (2003-02-05), pages 291-300, XP004399446, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00805-X cited in the application see abstract and pages 292-294	1-33

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054159

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106 884 011 B (GU'AN DINGTAI HAIGUI BIOLOGICAL TECH CO LTD) 17 November 2020 (2020-11-17) see claims 1-5	1-33
Y	CAI Y ET AL: "Production of pharmaceutical-grade plasmids at high concentration and high supercoiled percentage", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 8, 23 February 2010 (2010-02-23), pages 2046-2052, XP026921826, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2009.10.057 [retrieved on 2009-11-05] see abstract, Fig. 1 and pages 2047-2050	1-33

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/054159

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6410274 B1	25-06-2002	EP 0964923 A1	22-12-1999
		US 6410274 B1	25-06-2002
		WO 9916869 A1	08-04-1999
US 2010273254 A1	28-10-2010	AT 420167 T	15-01-2009
		AU 2003293042 A1	29-07-2004
		CA 2509337 A1	22-07-2004
		EP 1578763 A2	28-09-2005
		JP 4723254 B2	13-07-2011
		JP 2006511228 A	06-04-2006
		US 2004157244 A1	12-08-2004
		US 2010273254 A1	28-10-2010
		WO 2004060277 A2	22-07-2004
US 2001034435 A1	25-10-2001	US 2001034435 A1	25-10-2001
		US 2006106208 A1	18-05-2006
WO 2013068741 A1	16-05-2013	EP 2776154 A1	17-09-2014
		EP 4088812 A1	16-11-2022
		US 2014296464 A1	02-10-2014
		US 2018094022 A1	05-04-2018
		US 2019276491 A1	12-09-2019
		US 2020392179 A1	17-12-2020
		WO 2013068741 A1	16-05-2013
CN 106884011 B	17-11-2020	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
A61P	*31/18*	*(2006.01)*	A61P	31/18	
A61P	*31/14*	*(2006.01)*	A61P	31/14	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　リンダ・ハーグマン
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
(72)発明者　ミカエル・バーリ
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
(72)発明者　ハンス・ブローム
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
(72)発明者　アルビン・ラーション
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
(72)発明者　ヨアキム・バッゲ
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
(72)発明者　イェリン・モニエ
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
(72)発明者　マルクス・ピッカネン
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ

Ｆターム（参考）　4C085　AA03 BA99 DD21 DD33 DD34 EE01
4C086　AA01 AA02 AA04 EA16 NA14 ZB33 ZC55
4D017　AA20 BA07 CA13 CA14 CA17 CB01 DA03 DB00 DB05 EA05

【要約の続き】
程は、5時間以内に完了され得る。当該分離方法によって得られた超らせんpDNAの使用が、更に開示される。