

73.819/SZE



DNS tisztítási eljárások és a tisztított DNS

KIVONAT

A találmány plazmidot tartalmazó vizes oldatból plazmid DNS tisztítási eljárásokat biztosít, beleértve a gazdasejt szennyezők, mint például az endotoxinok, RNS-ek, fehérjék és a gazdasejt DNS eltávolítását, valamint olyan eljárásokról gondoskodik, melyek hidrofób közeg segítségével a szupertekeredett, töréses vagy relaxált plazmid DNS keveréket tartalmazó vizes oldatból a szupertekeredett plazmid DNS elkülönítését és tisztítását biztosítják.

Jellemező a lra 0
Bent



73.819/SZE

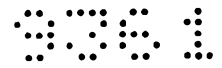
DNS tisztítási eljárások és a tisztított DNS

A jelen találmány plazmidot tartalmazó vizes oldatból plazmid DNS tisztítási eljárásokat biztosít, beleértve a gazdasejt szennyezők eltávolítását, mint amilyenek például az endotoxinok, RNS-ek, fehérjék és a gazdasejt DNS, valamint olyan eljárásokról gondoskodik, melyek hidrofób közeg segítségével a szupertekeredett, töréses vagy relaxált plazmid DNS keveréket tartalmazó vizes oldatból a szupertekeredett plazmid DNS elkülönítését és tisztítását biztosítják. Ezen kívül javított kismennyiségű, mint például laboratóriumi vagy asztali méret, DNS tisztítási eljárásokat és az ilyen eljárásokhoz eszközöket is biztosít. A jelen találmány tisztított és/vagy elkülönített DNS-ről gondoskodik, mint például plazmidról, előnyösen szupertekeredett DNS-ről.

A humán betegségek kezelésében a génterápia egy új kezelési paradigmát jelent. A genetikai hátterű betegségek, mint például cisztikus fibrózis, különböző rákbetegségek, stb., kezeléséhez és a betegség elleni immunizáláshoz DNS felhasználása a terápia ígéretes módját jelenti, amit napjainkban széles körben kipróbálnak. A géntermékkel kölcsönhatásba lépő, vagy magával a géntermékre ható szerek használata helyett, így a betegség fenotípusának megváltoztatása nélkül, a génterápia elméletileg azokat a specifikus géneket változtathatja meg, melyek a

betegség gyógyulását eredményezik, vagy kezelését jelentik. A génterápia mint gyógyszer szállítási rendszer is alkalmazható. Ennek megvalósításához a hasznos terméket (RNS, peptid, fehérje, stb.) előállító gént vagy magát a hasznos terméket (mint például az antiszensz DNS használata) a személy vagy gazdasejt homológ, heterológ vagy autológ DNS-ébe vagy sejtjébe beépíthetjük, hogy azt a későbbiekben egy személybe, akár *in vivo*, akár *in vitro* beadjuk. Például erek műtétjekor az antikoaguláns faktort készítő gén a sejt DNS-ébe beépíthető, felhasználva az ereket a veszélyes vérrögök képződésének megakadályozására. Számos más körülmény is kínálkozik ezen általános megközelítés terápiás megvalósításához.

A több mint 4000 ismert genetikai betegség közül számos esetében a génterápiás kezelés eredményes eszköznek tartható, beleértve a cisztikus fibrózist, a szívbetegségeket, a daganatos betegségeket és más betegségeket. Általában a génterápia a genetikai anyag (DNS) egyedbe való bevitelét igényli. A génszállítás vagy a genetikai anyag szállítása a vírus vagy plazmid DNS-t tartalmazó gén közvetlen vérbe vagy szövetekbe juttatásával érhető el, vagy közvetetten a laboratóriumban átalakított sejtek bejuttatásán át, melyek így idegen DNS-t hordoznak, amelyeket a szakirodalomban ismert különböző tokozó vagy hordozó technikák felhasználásával alakítottak ki. A napjainkban megjelent közlemények arra utalnak, hogy közvetlen DNS bevitel is lehetséges. A szomatikus génbevitelhez számos különböző rendszert alkalmaznak, vagy tartanak szem



előtt. Ezek közé tartozik például a DNS (lecsupaszított vagy komplexben lévő), RNS vírusok (retrovírusok) és DNS vírusok (adenovírus, adenoval társuló vírus [AAV], herpesz vírus és poxvírus).

A nem-virális génterápia, mint például a plazmid DNS használat, kulcselőnye a nagymennyiségű előállítás egyszerűsége, a nagyfokú biztonság, a gazdasejt DNS-be a heterológ DNS beépülésének általános hiánya, valamint a látszólag behatárolatlan méretű és számú gén(ek) vagy génfragmens(ek) használatának lehetősége. Továbbá, a génterápiában a plazmid DNS használata általában külső gén(ek) vagy fehérjék használatával nem jár, amelyek a befogadóban nem-kívánt immunválaszt indukálhatnának. Ráadásul a plazmid DNS használat alternatívájaként például a virális vektorok előállítás sokkal költségesebb.

A jelenlegi módszerek általában olyan plazmid DNS-t biztosítanak, melyek szupertekeredett plazmid DNS-t és műtermékként töréses (vagy relaxált) DNS-t tartalmaznak, melyek a plazmid DNS végső alkalmazásában általában nem hasznosak. A jelen találmány eljárásai a szuperterkeredett és réses plazmid DNS nem lebontó elkülönítési eljárásait biztosítja, teszi ezt úgy, hogy a szupertekeredett plazmid DNS kinyerése és használatának módszereit példákon keresztül bemutatja, és így a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy az elkülönített plazmid DNS bármely formája a jelen találmányban közzétett eljárás hasznos terméke lehet. Továbbá,

mivel a jelen szabadalmi bejelentés a génterápiával kapcsolatban a szupertekeredett plazmid DNS nagyobb tisztasága iránti igényét kihangsúlyozza, ezért a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a plazmid DNS széles körben a rekombináns molekuláris biológiai eljárásokban a génterápiás készítményeken túl is hasznosítható és a jelen közzététel az elkülönített és tisztított szupertekeredett plazmid DNS előállítási eljárásaként széles körben alkalmazható.

A jelenleg rendelkezésre álló eljárások a plazmid DNS két formájának elkülönítéséhez ioncserés kromatográfiát használnak (a génterápiához a plazmidok tisztításának új és gyors módszere a szakirodalomban megtalálható [Bhikhabhai és Blanche: Amersham Pharmacia Biotech R & D, 75184 Uppsala, Sweeden and RPR Gencell, Rhone-Poulenc Roer, Center de Recherche de VitryAlfortville, 13 quai Jules Guesde, 94400 Vitry sur Siene, Franciaország, publikáció száma: 18-1129-51]; a szupertekeredett plazmid DNS anioncserés kromatográfiával végzett preparatív tisztítási eljárását szintén leírták [Prazeres és mtsai: Journal of Chromatography A, 606 31-45 (1998)] vagy méretkizárásos kromatográfiával [Prazeres: A comparison of Gel Filtration Chromatographic Supports for Plasmid Purification, Biotechnology Techniques 11(6), 417-420 (1997)], amelyet adalékanyag használatával egészítettek ki, mint például polietilénlikol (PEG), detergenssek és más komponensek, mint például hexamin-kobalt, spermidin és poli(vinil-pirrolidon) (PVP). A szupertekeredett plazmid DNS PEG adalékanyagos eljárását napja-



inkban leírták a szakirodalomban [Horn és mtsai: 5,707,812 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Bár, a jelenlegi eljárások a szupertekeredett és a töréses (vagy relaxált) DNS hatékony és gazdaságos előállítására nem képesek. Továbbá, az ismert módszerek PEG-et vagy más adalékanyagot tartalmazó formái olyan hátrányokkal rendelkeznek, melyek a plazmid DNS-ek előállításában nem előnyösek, és így további elkülönítési, elöntési és minőségi módszereket igényelnek, melyek sokkal időigényesebbek és költségesebbek.

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elkülönítési módszereinek alternatív formái nagyon költséges, védjegyes gyantákat alkalmaznak, amelyekhez a folyamatban például acetonitrilt, etanolt és más komponenseket, mint például trietilamint és tetrabutyl-ammónium-foszfátot, használnak oldószerként. Az oldószerek használata miatt ezek az előállítási eljárások általában nagymennyiségű termék előállításához nem felelnek meg. Továbbá, kiindulási anyagként nem alkalmazhatunk olyan anyagokat, melyekben a relaxált plazmid DNS mennyisége jelentős, mivel a kiindulási anyagban a nagymennyiségű szennyező relaxált plazmid DNS e gyanták elválasztási képességeit csökkenti [Green és mtsai: Bio. Pharm., 10(5), 52-62 (1997)].

A szupertekeredett és a relaxált DNS-ek elkülönítésének további eljárásai méretkizárásos kromatográfián alapulnak, mely a két plazmidforma elkülönítését azok kis méretkülönbsége alapján végzi. Ezek az oszlopok viszonylag hosszúak, ami jelentős

méretnövelési problémához vezethet, és ezért a nagymennyiségű DNS termelésében keresztülvihetetlen. Ráadásul a méretkizárásos eljárásokhoz betöményített mintaoldatok szükségesek, ami a plazmid DNS oldatoknál keresztülvihetetlen, mivel a DNS igen viszkózus. A szakirodalomban a gélszűrési kromatográfiás plazmid-tisztítási eljárásokat összehasonlították [Ferreira és mtsai: *Biotechnology Techniques*, 11(6), 417-420 (1997)].

A bakteriális eredetű plazmid DNS készítmények, melyek gyakran relaxált és szupertekeredett plazmidok keverékeit tartalmazzák, gyakran endotoxin eltávolítást igényelnek. Ezt az FDA megköveteli, mivel sok bakteriális gazda által előállított endotoxin gyulladásos reakciót okoz, ami a plazmid DNS-sel kezelt személynél lázzal vagy végső esetben vérmérgezéssel járhat. Ezek az endotoxinok általában lipopoliszacharidok, vagy a Gram-negatív baktériumok külső membránjának alkotói, és ezek a DNS készítményben, melyeket például a génterápiában a plazmid DNS kifejezéséhez és gyártásához használunk, a gazdasejtek műtermékét jelentik vagy annak nagy részét adják, ezek lehetnek például a gazdasejt membránjai vagy makromolekulái. Így az endotoxinok eltávolítása a plazmid DNS tisztításánál a terápiás vagy megelőző használatához alapvető és szükséges lépés.

Az endotoxin plazmid DNS oldatból való eltávolítása elsődlegesen a negatívan töltött endotoxin stukturán alapul, bár a plazmid DNS is negatívan töltött, és így az elválasztás általában anioncserélő gyantán történik, melyhez ezek a molekulák kötődnek, és olyan körülmények között, melyek előnyösen eltávolítják a



plazmid DNS-t az oszlopról, míg az endotoxinokat kötve tartja. Ezek az elválasztási módszerek azonban a plazmid DNS-sel együtt jelentős mennyiségű endotoxint eredményeznek, és/vagy a plazmid kinyerés igen gyenge. A szakirodalomban számos szabadalmaztatott eljárásban detergens használatát írták le, ami szintén problémákat eredményez. (Az endotoxinok kimerítésére vagy eltávolítására szabadalmi bejelentést tettek [Coplan és mtsai: 5,747,663 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]). Továbbá a gyanták kötési kapacitása csak 10^3 - 10^4 EU (endotoxin egység)/ml gyanta nagyságrendbe esnek, mivel a gyantát mind az endotoxin, mind a plazmid DNS elfoglalja, például tipikusan 3-80 liter gyanta szükséges, a beszámolóban megadott 50000 EU/ml – 2000 EU/ml-hez [Green és mtsai: Bio. Pharm, 10(5), 52-62 (1997), Sterogene technical profile DNA Etox, Sterogene, 5922 Farnsworth Cr., Carlsbad, CA 92008].

A jelen találmány olyan plazmid DNS elválasztási, elkülönítési és/vagy tisztítási eljárásokat biztosít, melyek kombinációban vagy egymástól függetlenül is felhasználhatók. Részletesebben a jelen találmány a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elválasztási, tisztítási és vagy elkülönítési eljárásairól gondoskodik, valamint a gazdasejtek szennyezőitől, mint például az endotoxinokat tartalmazó alkotóktól és fragmensektől, való elválasztási, tisztítási és/vagy elkülönítési eljárásokat biztosítja. A tisztított, elválasztott és/vagy elkülönített plazmid DNS, elsősorban a szupertekeredett plazmid DNS, összetételeket a jelen ta-

lálomány szintén biztosítja. A jelen találmány a plazmid DNS laboratóriumi vagy laboratóriumi-méretű elválasztásához, elkülönítéséhez és/vagy tisztításához eljárásokat és készülékeket is biztosít.

A jelen találmány a keverékben lévő más komponensektől a kívánt polinukleotid típusok elkülönítéséhez eljárásokat biztosít, ahol a keverékben ezek a polinukleotidok előfordulnak, melyek eredményeként a kívánt típusú polinukleotidokkal gazdagított összetételeket kapunk. Az eljárás a hidrofób kölcsönhatást biztosító közegben az elegyeket szennyező nem-kívánt komponensektől a polinukleotidok elválasztását foglalja magában. A polinukleotidok más komponensektől történő elkülönítése, valamint a polinukleotid típusok elkülönítése a polinukleotidok és a többi nem kívánt komponens hidrofób közeggel mutatott különböző affinitása alapján, különböző ion-körülmények között történik. Így a találmány eljárásaiban hidrofób kölcsönhatást biztosító közegeket használnak, melyek a lipopoliszacharidokat és a lipoproteineket a polinukleotidokhoz képest jobban kötik, ez az előnyös kötődés az elválasztási eljárásban alkalmazott ion-körülmények tartományain belül fordul elő. A találmány a szupertekeredett DNS és a relaxált DNS elválasztását is magában foglalja. Az eljárások olyan ion-körülményeket alkalmaznak, melyeknél a szupertekeredett DNS előnyösen a hidrofób kölcsönhatás biztosító közeghez inkább kötődik, mint a relaxált DNS. A szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy amikor a jelen találmányban használt sókoncentrációkról beszélünk, akkor

ionerősségben egyenértékű különböző sók használhatók. Különösen az endotoxint kimerítő és eltávolító eljárásokra vonatkozóan azt is meg kell értenünk, hogy azok plazmid vagy nem-plazmid DNS esetében egyaránt alkalmazhatók.

Meg kell értenünk, hogy ha a jelen találmány eljárásában használt sókoncentrációról írunk, akkor a különböző sók egyenértékű ionerősségét használjuk. Azt is meg kell értenünk, hogy különösen az endotoxint kimerítő és/vagy eltávolító eljárásokkal kapcsolatban ezek mind plazmidra, mind nem plazmidra alkalmazhatók.

A jelen találmány egyik tárgyköre a gazdasejt szennyezőket tartalmazó készítményből a plazmid DNS elválasztási, elkülönítési és/vagy tisztítási eljárásait biztosítja.

A találmány egy másik tárgyköre a plazmid DNS és az endotoxin, mely komponenseket vagy fragmenseket tartalmaz, elválasztási, elkülönítési és/vagy tisztítási eljárásait biztosítja.

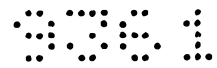
A jelen találmány egy további tárgyköre a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elválasztási, elkülönítési és/vagy tisztítási eljárásait biztosítja.

A tisztított, elválasztott és/vagy elkülönített plazmid DNS, különösen a szupertekeredett plazmid DNS, összetételeket a jelen találmány szintén biztosítja.

A jelen találmány egyik megvalósítási formájában az endotoxin és más sejtes szennyezők (például RNS, kromoszómális DNS, fehérje) elkülönítése a plazmid DNS-től hidrofób kölcsönhatást biztosító körülmények között történik, ahol az endotoxin és

más szennyező anyag a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeghez kapcsolódva komplexet képez és ezzel a plazmid DNS és a komplex elkülönülése biztosított. A jelen találmány eljárásában az elválasztott endotoxin a Gram-negatív mikroorganizmusokból származó endotoxint, valamint fragmenseket és ezekhez az endotoxinokhoz és endotoxin fragmensekhez kötődő celluláris és szubcelluláris komponenseket foglalja magában. A hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg az RNS-t is köti, beleértve a t-RNS-t, az r-RNS-t és az m-RNS-t, valamint a gazdasejt fehérjéit és kromoszómális DNS-ét. A jelen találmányban hasznos hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg gyanta, membrán vagy más alapot biztosító anyag lehet.

A jelen találmány egyik előnyben részesített megvalósítási formája a következőket foglalja magában: a plazmid DNS szabadon megválaszthatóan más szennyező gazdasejt komponenssel, beleértve a jelenlévő endotoxint, oszlopra vagy ágy-mátrixra történő felvitele, mely hidrofób kölcsönhatást biztosít, amire előnyösen az endotoxin és a gazdasejt szennyezők kötődnek, vagy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg visszatartja azokat, és az effluenssel (átáramló közeg) vagy szabadon megválaszthatóan a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg mosásával/mosásaival a plazmid DNS összegyűjtése, ami a gazdasejt szennyezők és az endotoxin visszatartását nem zavarja vagy szakítja meg, és/vagy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeget nem befolyásolja. Miután a plazmid DNS-t összegyűjtöttük, az oszlop vagy az ágy-mátrix, a kötés vagy a visszatartott sejtszennyezők és endotoxin



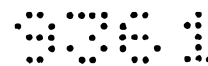
eluálásával, a hidrofób kölcsönhatás körülményeinek megváltoztatásával vagy módosításával regenerálható, például az oszlopon vagy az ágy-mátrixon lévő só koncentrációjának megváltoztatásával.

A jelen találmány egy alternatív megvalósítási formája az ioncserés vagy a méretkizárásos kromatográfia vagy mindkettő hiányában megvalósítható elválasztási eljárásokat biztosít.

Az egyik ilyen előnyben részesített megvalósítási formában az oszlop- vagy az ágy-térfogatot kezdetben ammónium-szulfáttal egyensúlyba hozzuk, amit olyan koncentrációban alkalmazunk, ami a szennyezők szelektív kötését a hidrofób kölcsönhatást biztosító oszlopon lehetővé teszi, ez előnyösen körülbelül 2 M-t jelent. A jelen találmány eljárásaiban használható sók az anionok és kationok keveréke, melyeket anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következők közül választhatunk ki: acetát, foszfát, karbonát, SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , NO_3^- , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ . Sókeverékek is használhatók. Továbbá a plazmid DNS és más szennyezők, mint például endotoxin, elegyét előnyösen dialízis pufferrel az oszlopra vagy ágy-mátrixra történő felvitelük előtt dializáljuk, ezzel eltávolítva azokat a sókat és más szennyezőket, melyek az endotoxin, a plazmid DNS és más szennyezők hidrofóbítását az ammónium-szulfát reakcióelegyben megváltoztathatják. A reakcióelegy előnyösen például a következőkkel pufferelt: trisz-HCl, melynek pH-tartománya anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat 6,8 – 8,5 közé esik, előnyösen 7,4. A szakirodalomban jártas szakemberek számára más pufferek is ismertek, anélkül, hogy

erre korlátoznánk magunkat a következők használhatók: trisz, TES (N-trisz(hidroximetil)metil-2-aminoetán-szulfonsav), Tricine (N-trisz(hidroximetil)metilglicin), foszfát, PIPES (Piperazin-N,N'-bisz(2-etán-szulfonsav), MOPS (3-(N-morfolino)-propánszulfonsav), MES (2-(N-morfolino)-etánszulfonsav), MEPES (3-N(N-morfolino)etilpiperazin-N'-2-etánszulfonsav) és Bicine (N,N-bisz(2-hidroxietyl)glicin).

A jelen találmány eljárásai elkülönített és/vagy tisztított plazmid DNS-t, és plazmid DNS-t tartalmazó összetételeket biztosítanak, melyek alapvetően csökkentett endotoxin tartalmúak, vagy endotoxin mentesek, így a plazmid DNS endotoxin terhelése több mint 95 %-ban csökkent, előnyösen több mint 98 %-ban, előnyösebben több mint 99 %-ban, alternatívaként több mint 99,9 %-ban, és legelőnyösebben 99,99-99,999 %-ban attól mentes. A jelen találmány eljárása nagy kiindulási koncentrációjú endotoxin mennyiség elválasztására használható, ez legalább 200000-400000 endotoxin egység (EU/milliliter oldat), feltéve, hogy a hidrofób mátrix kapacitása legalább 600000 – 3000000 EU/ml. Továbbá a jelen találmány folyamata plazmid DNS termékről gondoskodik, mely 1 mg DNS-re kevesebb mint 10-2500 EU, vagy kevesebb mint 1-300 EU endotoxint tartalmaz. Alternatívaként, a jelen találmány szerinti eljárás olyan plazmid DNS terméket biztosít, mely 1 mg DNS-re kevesebb mint körülbelül 50-1000 EU-t, vagy kevesebb mint körülbelül 10-50 EU-t tartalmaz. A jelen találmány szerinti eljárás a fehérjetartalmat kevesebb mint 0,1 tömeg%-ra, az RNS



tartalmat kevesebb mint 1 %-ra és a kromoszómális DNS-t kevesebb mint 1 %-ra csökkenti.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formája a szupertekeredett plazmid DNS és a relaxált plazmid DNS elválasztását biztosítja, ami a következő lépéseket tartalmazza: az első reakció-körülmények között a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elegy valamint a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kapcsolatba hozása, ahol mind a szupertekeredett plazmid DNS, mind a relaxált plazmid DNS az első elegy kialakításához a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeghez kötődik; az első reakcióelegy körülményeinek megváltoztatása olyan második körülménnyé, hogy az első reakcióelegyből a relaxált plazmid DNS-ek eltávolítása lehetővé váljon, a kialakult második kapcsolási elegy és a relaxált plazmid elkülönülése révén; és a második kötési elegy körülményeinek átalakítása harmadik reakció-körülménnyé, mellyel a hidrofób körülményeket biztosító közeg és a szupertekeredett plazmid DNS egymástól elkülöníthetővé válik.

A fenti eljárás másik megvalósítási formája szerint a változtatás vagy módosítás az eluáló puffer vagy oldat pH-változtatásával hajtható végre, úgy, hogy a só jellemzőinek megváltoztatásával vagy változatlanul hagyása mellett a relaxált és a szupertekeredett formák különböző pH körülmények között eluálhatóvá válnak.

A fenti eljárás egy másik megvalósítási formája a változtatást vagy módosítást izokratikus eluálás révén biztosítja, ahol

azonos összetételű oldat, ebben az esetben előnyösen a só koncentrációja a képes plazmid DNS két formájának eluálására, a kötött plazmidot tartalmazó oszlopon áteresztve a két formát egymás után külön-külön frakcióba eluálja.

Egy másik megvalósítási formában a só jellemzői és/vagy más körülmények úgy módosíthatók, hogy a relaxált formájú plazmid nem-kötött frakcióként gyűjthető, míg a szupertekeredett forma a gyantához kötve marad. A szupertekeredett formát ezután a fentiekben körvonalazott körülmények között eluálhatjuk.

Az eljárás egy másik megvalósítási formájában a változtatás vagy a módosítás úgy hajtható végre, hogy molekulákat vagy molekula keverékeket használunk, melyek a ligandokhoz teljes mértékben kötődnek ("displacers") és a kötött plazmid DNS formákat a mátrixról elkülönülő komponensenként biztosítják.

Egy másik megvalósítási formában a hidrofób kölcsönhatáson keresztül kapcsolódni képes molekulák vagy molekula keverékek a plazmid DNS oldattal összekeverhetők, melyek az oszlop-
ra vitel után sorbanleszoríthatók, eredményül megkapva a különböző formájú DNS-eket.

A megvalósítási forma utóbbi két kivitelezését általánosan „kiszorításos” és „frontális” kromatográfiás formáknak hívják, ahol a hozzáadott molekulák a termékkel együtt eluálódhatnak, amelyek ezután a legtöbb esetben a szakirodalomban ismert eljárásokkal hatásosan elválaszthatók.



A kiszorítási (displacement) kromatográfiában a gyantához kapcsolódott két vagy több molekula a gyantához nagyobb affinitást mutató kiszorító molekulával helyet cserél, melynek hatására a két vagy több kötött molekula eluálása megy végbe. Napjainkban a hidrofób kölcsönhatású gyanták kiszorítói háromszoros blokk-polimerek, így polimetil-metakrilátot, akrilsavat és polidimetilaminoetil-metakrilátot tartalmaznak [Ruaan és mtsai: "Hydrophobic displacement chromatography of proteins using triblock copolymers as displacers, 1998 AIChE meeting)]. A kiszorítási kromatográfia hidrofób kölcsönhatású gyantáinak más kiszorítóit is sikeresen kifejlesztették [Shukla és mtsai: Hydrophobic displacement chromatography of proteins in 1998 Annual AIChE meeting]. A fordított fázisú kromatográfiában például a 2-(2-butoxi)etanol kiszorító lehet hasznos.

A plazmid két formájának kötődése után a kiszorító, mint például a fentiekben felsoroltak egyike, a szupertekeredett és a relaxált DNS egymás utáni kicseréléséhez az itt leírt HIC-en (hidrofób kölcsönhatású oszlop) alkalmazható.

A "frontális" módszerű kromatográfiában az oszlopot kettős eleggyel töltjük, mely komponenseinek gyantához kötődési aktivitása eltérő, és az oszlop folyamatos túltöltésével az egyik komponens a másikat kicseréli, ami a két komponens egymás utáni elucióját eredményezi. A jelen találmány ezen módszerének alkalmazásában a két DNS forma például egy HIC oszlopra tölthető és a minta túltöltésével a relaxált forma kicserélődése

végbemegy, ami így a relaxált és a szupertekeredett forma külön-külön gyűjtését lehetővé teszi.

E kivitelezés egyik formájának megváltoztatása és módosítása a relaxált plazmid DNS és a szupertekeredett plazmid DNS folyamatos gradiens elúciójával valósítható meg, ahol az első elegyet sóoldattal, például ammónium-szulfáttal keverik, melynek koncentrációját előnyösen körülbelül 3 M-ról 1 M-ra változtatják. A relaxált plazmid DNS-t az első eluált térfogatban a találmány ezen megvalósítási formájának kivitelezésekor összegyűjtjük és a szupertekeredett plazmid DNS-t pedig a második eluált térfogatban gyűjtjük.

E kivitelezés egy másik előnyben részesített formájában mind a szupertekeredett, mind a relaxált plazmid DNS-eket úgy választjuk szét, hogy először mindkét formát a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeghez kapcsoljuk, egy ágyon vagy az oszlopon, magas sókoncentrációnál, vagy azzal egyenértékű ionerősségnél például 2,5-4 M, előnyösen 3 M ammónium-szulfátnál végezzük el, és ezután lépcsős vagy folyamatos gradienssel az oszlopról a két elváló forma lejön, a só koncentrációjának változtatásával, vagy azzal egyenértékű ionerősség mellett, ahol az első tartomány körülbelül 2,45-2,35 M ammónium-szulfát és a második tartomány szintén ammónium-szulfát esetében körülbelül 0 M-tól (valószínűleg 1 M-tól) körülbelül 2,3 M-ig (a lépcsős eluáláskor) terjed, vagy az ammónium-szulfátot folyamatosan körülbelül 2,5-4 M tartománytól egy második tartományig változtatjuk, ami körülbelül 0

M-tól (valószínűleg 1 M-tól) körülbelül 2,3 M-ig terjed, körülbelül 1-30 oszlop- vagy ágytérfogattal, előnyösen legalább 6 oszlop- vagy ágytérfogattal végezzük (folyamatos gradiens alkalmazásakor). A fenti formák mindegyikében a relaxált plazmid DNS az oszlopról vagy az ágyról körülbelül 2,35 M-tól körülbelül 2,45 M-ig (ammónium-szulfát) terjedő koncentrációnál jön le, míg a szupertekeredett plazmid DNS az oszlopról vagy az ágyról körülbelül 0 M-tól körülbelül 2,3 M-ig (ammónium-szulfát) terjedő koncentrációnál eluálható.

A találmány egy másik megvalósítási formája a szupertekeredett plazmid DNS elkülönítésére a következőket tartalmazó eljárást biztosítja:

a szupertekeredett plazmidot tartalmazó minta hidrofób kölcsönhatást biztosító közegre történő felvitele olyan ion-körülmények között, mely a szupertekeredett plazmidot elsődlegesen a közeghez köti, szemben a nem-supertekeredett plazmiddal; és

az ion-körülmények beállítása úgy, hogy azzal a szupertekeredett plazmidot a közegről eltávolíthatjuk.

Egy másik megvalósítási formában a jelen találmány a szupertekeredett DNS mennyiségét a relaxált DNS-hez képest, ezek keverékében, megnöveli, azzal jellemezve, hogy az eljárás a következő lépéseket foglalja magában: (1) a szupertekeredett DNS-t és a relaxált DNS-t tartalmazó elegyet a hidrofób kölcsönhatást biztosító, alkilcsoportot tartalmazó közeggel ionos körülmények között egyesítjük, amelyhez elsődlegesen a szupertekeredett DNS kötődik; (2) a szupertekeredett DNS-t és a relaxált DNS-t tartal-

mazó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg ionos körülmények között kezeljük, ami elsődlegesen a relaxált DNS eltávolítását teszi lehetővé; és (3) a hidrofób kölcsönhatást biztosító közegről a szupertekeredett DNS-t eluáljuk.

Egy további előnyben részesített megvalósítási formában a jelen találmány a DNS-t tartalmazó összetételekből a lipopoliszacharidok (LPS) eltávolításához biztosít eljárást, azzal jellemezve, hogy az eljárás a következő lépéseket foglalja magában: (1) a DNS-t és LPS-t tartalmazó elegy és az alkilcsoportot tartalmazó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg egyesítése, ahol az ionos körülmények között a kölcsönhatás elsődlegesen az LPS és a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kapcsolódását teszi lehetővé, szemben a DNS-sel; és (2) a DNS-t és LPS-t tartalmazó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kezelése, mellyel a DNS szelektíven eltávolítható.

A jelen találmány eljárása elkülönített és/vagy tisztított plazmid DNS-t, és szupertekeredett plazmid DNS-t tartalmazó összetételeket biztosít, melyek előnyösen endotoxin mentesek, azzal jellemezve, hogy az összetételben lévő szupertekeredett plazmid teljes mennyisége a jelen találmányban közzétett eljárás eredményeként legalább körülbelül 50-99 tömeg%, előnyösen legalább körülbelül 60-95 tömeg%, előnyösebben legalább körülbelül 70-90 tömeg%, legelőnyösebben legalább körülbelül 75-85 tömeg% szupertekeredett plazmid DNS.

Az itt bemutatott példákban a tömeg%-ot HPLC-vel mértük, DNS-NPR HPLC oszlopon, gradienssel, ahol az eredményül



kapott csúcsok alatti terület a megfelelő komponens tömegével arányos. A szupertekeredett forma százalékát a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS csúcsok teljes területe és a megfelelő szupertekeredett csúcs alatti terület arányából számítottuk ki.

Az előnyben részesített hidrofób kölcsönhatást biztosító közegek, melyek a jelen találmány gyakorlatában felhasználhatók, olyan hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiás gyanták, melyek például metakrilát polimert vagy kopolimer vázakat, mint például metakrilát/etilénglikol és/vagy metakrilát/propilénglikol kopolimereket (TosoHaas, Montgomeryville, PA), és/vagy agarózt vagy Sepharose-t (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, 20 NJ), mint például keresztkötött vagy nem-keresztkötött agarózt, Sepharose-t, dextránt, szilikát-tartalmú polimert, szerves polimereket (természetes vagy szintetikus), kerámia-tartalmú, vagy gélmátrixokat, vázakat tartalmaznak, vagy ezek bármelyikének C_3 - C_{10} alkállal alkotott kombinációját, mely utóbbiak egyenes vagy elágazó láncú kinyúló ligandok lehetnek. Előnyben részesítjük a következő kinyúló ligandokat: propil-, butil-, hexil- és/vagy oktil-csoport. Ezek a ligandok előnyös kötési kölcsönhatást biztosítanak, amit a jelen találmány elválasztási, tisztítási és/vagy izolálási eljárásainál fel is használunk. A szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító gyanták alkil ligandjai kicserélhetők, és a jelen találmány szempontjából ezek is hasznosak. Az ilyen ligandok példái, anélkül, hogy erre

korlátoznánk magunkat a következők: fenil, oktil, butil, propil, neopentil, hidroxipropil, benzil, oktadecil, difenil és metil, valamint ezek szubsztituált és szubsztituálatlan származékai, és ezek kombinációi. A jelen találmányban megfelelően alkalmazható gyantákat vagy közegeket a szakirodalomban leírták [EP 964057, EP 99109441, JP 2000035423, JP 99127700 és JP 98127665 (Kitamura és mtsai), melyeket itt teljes terjedelmükben hivatkozásként építettük be].

A hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg gyöngyök formájában lehet, amely oszlopokba vagy reaktorokba tölthető, vagy kereszttekötött pórusos közegként fordulhat elő. A gyöngy mérete 2,5-100 μm között lehet. A gyöngy átmérője előnyösen körülbelül 30-110 μm , például 35-100 μm , vagy alternatívaként 35-90 μm . A hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg membrán is lehet, mint például cellulóz, vagy cellulóz vázú származék, poliéterszulfon, poliszulfon és ezek származékai, és/vagy más, az elválasztási szakirodalomban ismert anyag, beleértve a műanyagokat, és ide tartoznak a mikrotiter lemezek, petricsészék vagy sejttenyésztő edények is.

A "Streamline" (Amersham Pharmacia Biotech) oszlopban használt gyöngyök tipikusan nagyobbak, eltérő sűrűséggel, és ezeket különböző gyártók állítják elő, beleértve, de nem korlátozva magunkat az Amersham Pharmacia Biotech-re, ahol a kitisztult lizátumot ezeken a "magnövelt ágyakon" áteresztik, melyeken a szennyezések gyöngyökhöz kötődésével azok elválaszthatók,

amikor a gyöngyök hidrofób kölcsönhatást biztosító ligandokat tartalmaznak.

Kisebb gyöngyöket tipikusan a nagy kitermelést biztosító elválasztásoknál alkalmazzuk, beleértve a HPLC-t, ami ennél a találmánynál azt biztosítja, hogy a plazmidokat vagy a különböző formájú DNS-eket mennyiségileg, analitikai minőségben elválasztja.

A jelen találmány szempontjából a gyöngyök különösen a plazmid DNS-ek két formájának elválasztására szolgálnak, nem szükséges, hogy pórusosak legyenek, mivel a plazmid DNS általában túl nagy ahhoz, hogy a pórusokat elfoglalja, és azért sem szükséges, mivel ez további kapacitást biztosít. Bár, a szennyezők kötésére a pórusok a kapacitást hatékonyan növelhetik, mivel ezek a szennyező molekulák RNS-ek, fehérjék, endotoxinok és DNS fragmensek, melyek a pórusoknál kisebb méretűek. Ebben az esetben a porozitás fontos tényező lehet, és így a pórusos gyanták előnyösek számunkra.

Előnyösen a jelen találmány eljárásai szerves oldószereket, adalékanyagokat vagy detergenset, mint például glikolok, polietilén-glikol, hexamin-kobalt, spermidin vagy poli(vinil-pirrolidon) nem igényelnek, melyek a szupertekeredett plazmid DNS termék elválasztását követelnék azok felhasználása előtt, például a génterápiában.

Ezután röviden ismertetjük az ábrákat.

Az 1. ábra a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS különböző elválasztási lépéseit mutatja be.

A 2. ábra a példákban leírt eljárásokhoz a ligand-kémiával kapcsolt különböző hidrofób alapok konceptuális leírását mutatja be.

A 3. ábra az endotoxin és a plazmid DNS elválasztási eljárásának különböző lépéseit mutatja be.

A 4. ábra (inszert) az 5. példából származó agarózgél (butil HIC) pásztázott képét mutatja be, melyet SYBR GOLD-dal festettünk, és ahol az 1. oszlop a szupertekeredett DNS létrát, a 2. és a 3. oszlop az 1. csúcsból származó (relaxált) mintát és a 3-5. oszlop a 2. csúcsból származó (szupertekeredett) mintát mutatja be. (Az oszlopokat balról jobbra számoztuk.) Az abszorbanciát a térfogat függvényében bemutató 5. példából származó kromatogramm a relaxált (1. csúcs) és a szupertekeredett DNS (2. csúcs) szétválasztását mutatja be.

Az 5. ábra (betűzés) a 6. példából származó agarózgél (butil HIC) pásztázott képét mutatja be, melyet SYBR GOLD-dal festettünk, és ahol az 1. oszlop a markert, a 2. és a 3. oszlop az 1. csúcsból származó (relaxált) mintát és a 4-6. oszlop a 2. csúcsból származó (szupertekeredett) mintát mutatja be. (Az oszlopokat balról jobbra számoztuk.) A 6. példából származó kromatogramm a relaxált (1. csúcs) és a szupertekeredett DNS (2. csúcs) szétválasztását mutatja be.

A 6. ábra (betűzés) a 7. példából származó agarózgél (butil HIC) pásztázott képét mutatja be, ahol az 1. oszlop a markert, a 2. és a 3. oszlopra vitt anyagot, a 4. oszlop a műtermékből származó anyagot, az 5. oszlop a 2,4 M AS eluálásból származó anya-

got, és a 6. oszlop az 1 M AS eluálásból származó anyagot mutatja be. (Az oszlopokat balról jobbra számoztuk.) A 6. példából származó kromatogramm a relaxált és a szupertekeredett plazmid szétválasztását mutatja be, ahol a műtermék a legszélesebb csúcs (balra), amit jobbra a relaxált és a szupertekeredett DNS csúcsok követnek.

A 7. ábra (inszert) a 8. példából származó agarózgél (hexil HIC) pásztázott képét mutatja be, ahol az 1. oszlop a markert, a 2-4. oszlop az 1. csúcsból származó (relaxált) anyagot és az 5. és a 6. oszlop a 2. csúcsból származó (szupertekeredett) mintát mutatja be. (Az oszlopokat balról jobbra számoztuk.) A kromatogramm a relaxált és a szupertekeredett formák szétválasztását mutatja be.

A 8. ábra (inszert) a 9. példából származó agarózgél pásztázott képét mutatja be, melyet SYBR GOLD-dal festettünk, és ahol az 1. oszlop a markert, a 2. oszlop az oszlopra vitt anyagot és a 3-5. oszlop az 1-3. mosások mintáit, a 6. oszlop az 1 M elúció mintáját és a 7. oszlop a vízzel történt eluálás mintáját mutatja be.

A jelen találmány eljárásai a szupertekeredett plazmid DNS, a relaxált plazmid DNS és a sejtszennyezők, mint például endotoxin, hidrofóbitásának különbözőségeit használják fel.

Az itt közzétett eljárások a szupertekeredett plazmid DNS, kozmidok és fagemid vektorok elválasztására és tisztítására hasznosak. Ezek a vektorok és plazmid DNS-ek bármely forrásból származhatnak. Ráadásul, az élesztőben és az emlős sejtekben

A "hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg" a következőket tartalmazhatja: (a) támasztócsoporthoz és (b) hidrofóbcsoporthoz, ami akár közvetlenül, akár közvetetten a támasztócsoporthoz kötve lehet. Az itt leírt támasztó csoportok és hidrofób csoportok a szakirodalomban ismertek. Az itt leírt eljárásokban a hidrofób csoportok a kötődés elsődleges alapját biztosítják. A "hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg" példái a szakirodalomban ismertek, és ezek közül néhányat leírtunk. A hidrofób kölcsönhatást biztosító közeggel kapcsolatos itt használt, egyéb kifejezések például a következők: "gyanta", "mátrix", "oszlop", "közeg", "gyöngyök" és "hidrofób kölcsönhatású ligand".

A "töréses" vagy "relaxált" DNS jellemzője, hogy nem szupertekeredett. A "szupertekeredett" DNS fogalma a szakirodalomban jól ismert.

A "szennyeződés" bármely anyag lehet, amitől a DNS-t elválasztjuk vagy elkülönítjük. A szennyezők közé, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat a következők tartoznak, gazdasejt fehérjék, endotoxin, gazdasejt DNS és/vagy RNS. Meg kell értenünk, hogy a szennyeződés jelentése attól függ, hogy a jelen találmány melyik eljárásával van dolgunk. A "szennyeződés" lehet sejtes eredetű, vagy nem, azaz lehet sejtszennyező, vagy más mint sejt-szennyező.

Az első komponens, (mint például DNS) „elkülönítése” vagy „tisztítása” az első komponensnek más, az első komponenssel már kezdetben is együtt előforduló, komponensekhez viszonyított megnövelését jelenti. A kívánt és/vagy a kapható tisztítás mértékét itt biztosítottuk. Előnyösen a találmány eljárásai ötszörös növelést eredményeznek, előnyösen körülbelül 10-szerest, előnyösen körülbelül 20-szorost, előnyösen körülbelül 50-szerest, előnyösen körülbelül 100-szorost, előnyösen körülbelül 200-szorost, előnyösen körülbelül 500-szorost, és legelőnyösebben körülbelül 1000-szeres növekedést jelentenek. Alternatívaként a tisztítás foka az első komponens másik komponenshez, vagy az eredményül kapott készítményhez viszonyított százalékát jelenti. Az ilyen százalékok példáit megadtuk.

A komponens „elsődleges” vagy „szelektív” kötődése vagy eltávolítása adott körülmények között azt jelenti, hogy az első komponens a másik komponenshez képest nagyobb mértékben kapcsolódik vagy távolítható el.

A „vizes” oldat általában vizes alapú oldatot jelez (azaz a fő oldószer a víz), ami vagy 100 %, vagy nem.

A rekombináns bakteriális sejtekben előállított plazmid DNS izolálása a sejtek lízisét és a sejttörmelékek eltávolítását foglalja magában, ami különböző eljárásokkal megvalósítható. A végeredményként kapott oldat plazmid DNS-t tartalmaz, tipikusan többek között nagy mennyiségű endotoxin kíséretében. A jelen találmány eljárásai a kulcs-szennyezők, mint például RNS, genomiális DNS, fehérje és endotoxin, jelentős mennyiségű eltávolítását biztosítják, első lépésként felhasználva a hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiát, ahol a plazmid szabadon, kötődés nélkül átfolyik. A jelen találmány egyik eljárása szabadon megválaszthatóan a bakteriális lizátumból kapott oldat dializálását foglalja magában, egy olyan pufferbe, melynek pH-ja 6,8-8,5 között van, előnyösen a pH 6,8-7,4 közötti értéket vesz fel, és amely előnyösen 2 M ammónium-szulfátot tartalmaz, 10 mM etiléndiamintetraecetsavval (EDTA) kiegészítve vagy anélkül, és ezután ebben az eljárásban szabadon megválaszthatóan a dializált vagy nem dializált oldatot a kromatográfiás oszlopon áteresztjük, mely a hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiás alapon ligandot vagy ligandokat tartalmaz, mint például propil, butil, oktil, hexil ligand vagy ezek bármilyen keveréke, amelyet előzőleg 6,8-8,5 pH-tarto-



mányú (előnyösen pH 6,8-7,4) pufferrel egyensúlyba hozhatunk, ami egyben 2 M ammónium-szulfátot is tartalmaz, 10 mM EDTA-val, vagy anélkül. Az átáramló oldat tipikusan körülbelül 2 M-os sóoldat, mint például ammónium-szulfát, és főleg plazmid DNS-t (a szupertekeredett és a relaxált formák elegyét) tartalmaz, kevesebb mint 2 % szennyező jelenlétében. A méretnöveléstől függően a szupertekeredett DNS százaléka 50 és 95 tömeg% között lehet, tipikusan körülbelül 75-85%, alternatívaként 80-85%, ami további tisztításra szorul, beleértve a plazmid DNS relaxált formájának eltávolítását az elegyből.

A jelen találmány eljárásai tisztított plazmid DNS előállítását teszik lehetővé, melyeknek endotoxin szintje a meghatározott szint alatt van, azaz tipikusan < 10 EU/mg plazmid DNS. A jelen találmány endotoxint eltávolító eljárásai nagy és kis mennyiségben történő előállításához adaptálhatók, lehetővé téve a terápiás és a laboratóriumi minőségű anyagok gazdaságos termelését. Ezek az eljárások az endotoxin itt leírt hidrofób gyantákhoz történő szelektív kötődését használják ki, ami a nagyüzemi termeléshez a használt gyanta milliliterére vonatkoztatva meghaladja az 1000000 egységet.

Az endotoxin eltávolítás hagyományos eljárásainak kapacitása alacsony (1000-50000 EU/milliliter gyanta), és/vagy plazmid DNS kitermelésük alacsony és/vagy olyan kémiai vegyületeket és/vagy eljárásokat használnak, melyek a terápiás minőségű anyagok előállításához nem jól alkalmazhatók [5,747,663 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi

bejelentés]. A jelen találmány endotoxin eltávolító eljárása az endotoxin és a plazmid DNS sóoldatba, mint például körülbelül 2 M ammónium-szulfát vagy nátrium-klorid oldatba való felvételét foglalja magában, ami az endotoxint lényegesen hidrofóbbá teszi mint a plazmid DNS-t, és az endotoxin kötődését vagy elsődleges kölcsönhatását, és az endotoxinhoz képest az endotoxin elválasztását a gyantán biztosítja, mely hidrofób kölcsönhatású ligandokat tartalmaz, mint például butil-, oktil- és/vagy hexilcsoportok, biztosítja. Az alkalmazott sókoncentráció az RNS, a fehérje és az endotoxin jobb kötődésének érdekében optimalizálható. Az alacsonyabb sókoncentráció csak az endotoxin kötődéséhez lehet megfelelő, mivel az endotoxinnak az itt leírt hidrofób kölcsönhatást biztosító ligandokhoz nagyobb az affinitása. Az endotoxin-eltávolítás e módszerének vonzó jellege a gyanta roppant nagy endotoxin kapacitásának köszönhető, ami 1 ml gyantánál 1000000 EU, ráadásul az egyszerű, több mint 95 %-os plazmid DNS visszanyerés is fokozza ezt az előnyt. Például az 500 mg plazmidot és 10 millió EU endotoxint tartalmazó plazmid DNS oldat 10 ml gyanta felhasználásával tisztíthatóvá válik, míg legalább 1000-4000 ml anioncserélő gyanta kellene a plazmid DNS és az endotoxin kötődéséhez, azzal a hátránnyal, hogy az ilyen anioncserélő gyantán a visszanyerés szegényes. A jelen találmány eljárása ezért 100-400-szoros gyantaköltség megtakarítást jelent, valamint ehhez járul a termék nagyobb mennyisége. A kereskedelemben vásárolható DNS Etox gyanta napjainkban legalább nyolcszor drágább, mint azok a gyanták, amelyeket

a jelen találmány eljárásaiban használunk. Egy másik kereskedelemben beszerezhető gyanta (PolyFlo - PureSyn Inc., 87 Great Valley Pkwy Malvern, PA 19355) szabadalmaztatott kémiával, az endotoxin eltávolítására 5-10-szer drágább, és oldószerek, valamint ionpár-képző vegyületek alkalmazását igényli.

A jelen találmány eljárásai jó minőségű plazmid DNS-t biztosítanak, melyek a gyengébb minőségű anyagból (azaz a kiindulási anyagból, mely a relaxált és a szupertekeredett DNS elegyét tartalmazza) több mint 90 % szupertekeredett plazmid DNS-t állítanak elő. Továbbá a jelen találmány eljárásai a tipikusan génterápiában használható plazmid DNS előállításához megnövelt méretben is alkalmazhatók. A jelen találmány eljárásai a jó minőségű plazmid DNS megbízható termelését teszik lehetővé, függetlenül az eltérésekből, melyek tipikusan a minőség csökkenéséhez vezetnek, azaz a relaxált/töréses formájú plazmid DNS kialakulásához. Ezek az eltérések a plazmid DNS-t termelő baktérium növesztése alatt, és ezen kívül az ezt követő elkülönítési és tisztítási lépésekben léphetnek fel.

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elválasztási eljárásai és a plazmid DNS és az endotoxin elválasztási eljárásai a jelen találmányban azon a megfigyelésen alapulnak, hogy a plazmid DNS formái és az endotoxin a hidrofób kölcsönhatást biztosító, kromatográfiás gyantán különböző kötési specifitást mutatnak, például ezek a gyanták C₄-C₁₀-alkilcsoportot, elágazó vagy egyenesláncú ligandokat és előnyösen butil vagy hexil

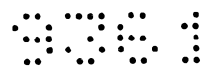
ligandokat tartalmaznak. Ezek a ligandok biztosítják az elsődleges kötődést, amit a jelen találmány eljárásaiban az elválasztásnál, a tisztításnál és az elkülönítésnél kihasználunk. A szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a hidrofób gyanták ezen alkil ligandokon kívül másokat is tartalmazhatnak, melyek a jelen találmány gyakorlatában szintén hasznosak. Az ilyen ligandok példáit a fentiek szintén leírtuk. A következő nem korlátozó jellegű példák a közzétett találmányt részletesebben bemutatják. A következő általános eljárásokat használtuk, vagy használhattuk volna.

A génterápiás alkalmazáshoz plazmidokat a megfelelő gazdaszervezetből, például *Escherichia coli*-ból tenyésztés után kivontuk. A találmány közzétett következő példáiban az *Escherichia coli* STBL-2 törzset használtuk, mely a pE1A-K2 plazmidot tartalmazza. A pE1-A-K2 plazmid egy pUC plazmidszármazék, mely az 5. adenovírus típus szupresszor génjét, és szelekciós markerként a kanamicin gént tartalmazza. A mikroorganizmus tenyésztését aerob körülmények között a megfelelő élesztőkivonatot/glukózt, valamint szervesetlen sókat, mint például kálium-hidrogénfoszfátot, nátrium-dihidrogénfoszfátot, ammónium-szulfátot és magnézium-szulfátot tartalmazó táptalajban végeztük ahol a pH-t 6,5-7,8 között tartottuk, előnyösen a pH = 7,0, és a hőmérséklet pedig 37 °C-on. A levegőztetés biztosítására a tenyészeteket 800 rpm-mel körkörös mozgást végző rázógépen ráztuk. A sejteket a glukóz kimerüléséig a fenti körülmények között tenyésztettük, majd a fermentáció oldott oxigén szintjét a

glükóz utánpótlással és rázatással szabályoztuk. A tápanyagkiegészítést a következő összetételű táptalajjal végeztük: glükóz (160 g/l) életszókivonat (80 g/l) és sók (1,5 g/l ammónium-szulfát, MgSO_4 , 1,5 g/l foszfát pufferben). Miután a tenyésztést befejeztük a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, vagy ultra vagy mikrofiltrációs membránokon átszűrtük, és TE pufferrel (lásd később) mostuk ($\text{pH} = 7,4$). A sejteket egyenlő térfogatú 0,15 N - 0,2 N NaOH-t és 1 % nátrium-dodecilszulfátot ($\text{pH} = 11,5-13$) tartalmazó oldattal gyenge keverés közben lizáltuk. A lúgos oldatot kálium-acetáttal semlegesítettük. Az anyagot ezután centrifugálással, vagy sorozatszűréssel tisztítottuk. A plazmid oldatokat ultraszűrő membránokkal betöményítettük és TE pufferrel szemben diafiltráltuk ($\text{pH} = 7$). A diafiltrálás visszamaradt részét közvetlenül az itt leírt közegre vittük fel.

A lizátum plazmid DNS tartalma az összes nukleinsavhoz viszonyítva, ami RNS-t és kromoszómális DNS-t tartalmaz, általában kevesebb mint 2 %. Ráadásul a lizátum endotoxinnal és sejtfehérjékkel szennyezett.

A jelen találmány gondoskodik a kis-, laboratóriumi és a kísérleti üzemi -méretű DNS izolálási és tisztítási eljárásokról is, és az ezekhez felszerelt oszlopokról valamint az ezekhez itt hasznos elválasztó berendezésekről is. A szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a kisméretű plazmid DNS termelés más kihívásokat tartogat mint a nagy méretekben megvalósított termelés. Részletesebben, a kisméretű elválasztás a kiindulási anyagban lévő szennyező RNS nagyobb részének elvá-



lasztását eredményezi, miközben a nagy méretben végzett termelésnél a plazmid : RNS arány, ahogy azt a fentiekben megjegyeztük, körülbelül 2 tömeg%, szemben a kisméretű eljárás körülbelül 0,1 térfogat%-ával. Továbbá a kisméretű minták tenyésztési térfogata általában körülbelül 2 ml és 2 liter között van, szemben a nagyméretű elválasztás 5-1000 literével. A jelen találmány kisméretű elválasztása körülbelül 100 µg-tól 1 mg plazmidot tartalmaz, ahol a reaktor vagy az oszlopágy térfogata körülbelül 1-20 ml; általában körülbelül 10-15 ml-ben. Ezért a jelen találmány kismértékű izolált és/vagy tisztított DNS termelést biztosít, ahol előnyösen mentesíti a szupertekeredett DNS-t a szennyezőktől, mint például endotoxintól, RNS-től és relaxált DNS-től.

Bár a jelen találmány példáiban különböző eljárásokat használtunk, mégis a szakirodalomban jártas szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a jelen találmány kivitelezésénél más preparatív eljárások és kiindulási anyagok is lehetségesek.

1. Példa

Az endotoxin eltávolítása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával (kis méretű)

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot tisztítottuk. A használt pufferek mindegyikét 0,2 µm szűrőn szűrtük át, és az endotoxin meghatározásához a mintákat polisztirol csövekben tároltuk.

A diafiltrációs maradékot (~ 400 ml) TE-vel szemben (50 mM trisz, 10 mM EDTA, melynek pH-ját sósavval 7,4-re állítottuk be) dializáltuk, pH = 7,4. Hozzáadtuk a 2 M-hoz szükséges ammónium-szulfátot (AS), majd az oldatot TE-vel 100 ml-re kiegészítettük (pH = 7,4), így részleges oldódást kaptunk. Ezt az oldatot hozzáadtuk a dializált mintához, mellyel a végtérfogat 575 ml-re nőtt, ebből a kísérlethez 475 ml-t használtunk fel.

A 2,6 cm átmérőjű és 15 cm ágymagasságú butil 650S oszlopot (Butyl 650S gyanta, TosoHaas Inc., 156 Keystone Drive, Montgomeryville, PA 18936) hozzávetőleg 75 ml ágytérfogatra töltöttük, és 2 M AS-t tartalmazó TE pufferrel pH = 7,4 egyensúlyba hoztuk. A mintát 5 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az átáramlott folyadékot összegyűjtöttük, és a DNS analízishez mintákat vettünk (DNS betöményítés, agaróz gél, és endotoxin vizsgálat). Az endotoxin vizsgálatot a csúcsoknál végeztük, és a mintákat hozzávetőleg úgy hígítottuk, hogy a PPC (pozitív termékkontroll) visszanyerés elfogadható tartományba kerüljön. Az endotoxin koncentrációkat BioWhittaker Kinetic-QCL Chromogenic LAL vizsgálattal határoztuk meg, ahogy azt a BW közzétette (BW publication No. P50-650U-5, Kinetic-QCL Test Kit Manual). A minta felvitele után 2 M ammónium-szulfátot tartalmazó TE-t engedtünk át az oszlopon és a mintákat gyűjtöttük. Ezután az oszlopot TE puffer - pH 7.4, USP tisztított vízzel mostuk, és 0,5 N nátrium-hidroxiddal tisztítottuk, majd több mint 15-szörös térfogatú USP tisztított vizet engedtünk át rajta. E mosásokban lévő endotoxin mennyiséget az 1. táblázatban



tüntettük fel. Ráadásul ez a kiváló endotoxin eltávolítási hatékonyság jelentős mennyiségű RNS, fehérje és DNS fragmens eltávolításával társult, eredményül jelentősen tisztított mintát kaptunk.

1. Táblázat

Minta	DNS konc. EU/ml	Endotoxin EU/ml	Összes EU egység	Endo- toxin	EU/mg DNS
töltés	0,70	472200	22400000	100	674571
átáramol- tatott	0,38	1,64	771	0,003	4,31
mosás	0,56	7,48	1196	0,005	13,42

1 ml gyanta endotoxin kapacitása: 3 millió EU/ml.

Az endotoxin csökkenés a mintában: 99,992 %.

2. Példa

Az endotoxin eltávolítása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával (nagy méretű)

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd a kapott oldatot szűrővel tisztítottuk.

A diafiltrációs maradékot (~ 650 ml) TE-vel szemben (50 mM trisz, 10 mM EDTA, melynek pH-ját sósavval 7,4-re állítottuk be) dializáltuk, pH = 7,4. Hozzáadtuk a 2 M-hoz szükséges

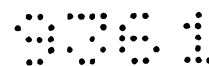
ammónium-szulfátot (AS), majd az oldatot 1200 ml-re kiegészítettük TE-vel ($\text{pH} = 7,4$), így feloldottuk. Az oldat végtérfogatát 1300 ml-re állítottuk be. Ezt az oldatot a dializált mintához hozzáadtuk, mellyel a végtérfogat 1950 ml-re nőtt, és a pH-t sósavval 7,4-re beállítottuk.

Az 5 cm átmérőjű és 15 cm ágymagasságú butil 650S oszlopot (Butyl 650S gyanta, TosoHaas Inc., 156 Keystone Drive, Montgomeryville, PA 18936) hozzávetőleg 275 ml ágytérfogatra töltöttük, és 2 M AS-t tartalmazó TE pufferrel ($\text{pH} = 7,4$) egyensúlyba hoztuk. Az átáramlott folyadékot összegyűjtöttük, és a DNS analízishez mintákat vettünk (DNS betöményítés, agaróz gél, és endotoxin vizsgálat, ahogy azt a fentiekben leírtuk).

Miután a mintákat felvittük 2 M ammónium-szulfátot tartalmazó TE-t engedtünk át az oszlopon és a mintákat gyűjtöttük. Ezután az oszlopot TE puffer - $\text{pH} 7,4$, USP tisztított vízzel mostuk, és 0,5 N nátrium-hidroxiddal tisztítottuk, majd több mint 15-szörös térfogatú USP tisztított vizet engedtünk át. E mosásokban lévő endotoxin mennyiséget a 2. táblázatban tüntettük fel. Ráadásul ez a kiváló endotoxin eltávolítási hatékonyság jelentős mennyiségű RNS, fehérje és DNS fragmens eltávolításával társult, eredményül jelentősen tisztított mintát kaptunk.

2. Táblázat

Minta	DNS konc. EU/ml	Endotoxin EU/ml	Összes EU egység	Endo- toxin	EU/mg DNS
-------	--------------------	--------------------	---------------------	----------------	--------------



töltés	1,59	271500	17647500 0	100	170754
átáramolta- tott + mosás	0,34	<0,5	1325	0,007	1,45

1 ml gyanta endotoxin kapacitása: 0,64 millió EU/ml.

Az endotoxin csökkenés a mintában: 99,993 %.

3. Példa

Az endotoxin eltávolítása hexil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával (kis méretű)

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd a kapott oldatot szűréssel tisztítottuk. A felülúszót 20 mM kálium-fosztát pufferrel (20 mM kálium-hidrogénfosztát, 20 mM kálium-dihidrogénfoszfát megfelelő arányban, hogy a pH 6,8 legyen) szemben dializáltuk, és a 2 M koncentráció biztosításához a mintákhoz 20 ml KPB-t (20 mM kálium-foszfát puffer) adtunk, mely 2 M AS-t tartalmazott, pH = 6,8, amivel feloldottuk. Ezt az oldatot 5 ml dializált mintához adtuk, így a végtérfogat 25 ml volt, melynek pH-ját 6,8-ra állítottuk be.

Az 1,6 cm átmérőjű és 4 cm ágymagasságú hexil 650C oszlopot (TosoHaas) hozzávetőleg 8 ml ágytérfogatra töltöttük, és 2 M AS-t tartalmazó KPB pufferrel (pH = 6,8) egyensúlyba hoztuk. A mintát 2 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az átáramlott folyadékot összegyűjtöttük, és a DNS analízishez

mintákat vettünk (DNS betöményítés, agaróz gél, és endotoxin vizsgálat, ahogy azt a fentiekben leírtuk). A minta felvitele után az oszlopon a 2 M ammónium-szulfátot tartalmazó KBP-t engedtünk át és a mintákat gyűjtöttük. Ezután az oszlopot KPB puffer - pH 6,8, USP tisztított vízzel mostuk, és 0,5 N nátrium-hidroxiddal tisztítottuk, majd az oszlopon több mint 15-szörös térfogatú USP tisztított vizet engedtünk át. E mosásokban lévő endotoxin mennyiséget az 3. táblázatban tüntettük fel. Ráadásul, mivel ez a kiváló endotoxin eltávolítási hatékonyság jelentős mennyiségű RNS, fehérje és DNS fragmens eltávolításával társult, eredményül jelentősen tisztított mintát kaptunk.

3. Táblázat

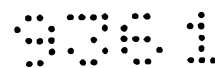
Minta	DNS konc. EU/ml	Endotoxin EU/ml	Összes EU egység	Endo- toxin	EU/mg DNS
töltés	2,43	593500	29675000	100	244238
átáramolta- tott + mosás	0,037	0,5	35	0,0001	14

1 ml gyanta endotoxin kapacitása: 3,7 millió EU/ml.

Az endotoxin csökkenés a mintában: 99,9999 %.

4. Példa

Az endotoxin eltávolítása oktil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával (kis méretű)



A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot tisztítottuk. A kísérletben a felülúszót használtuk. A mintát ammónium-szulfáttal 2 M-ra állítottuk, amit 20 ml TE-ben lévő oldatban oldottunk fel, pH = 7,4. Ezt az oldatot 10 ml dializált mintához adtuk, így a végtérfogat 25 ml volt, melynek pH-ját 7,4-re állítottuk be.

Az 1,0 cm átmérőjű és 10 cm ágymagasságú Octyl Sepharose 4 Fast oszlopot (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) aminek hozzávetőleg 8 ml az ágytérfogata, 2 M AS-t tartalmazó TE pufferrel (pH = 7,4) egyensúlyba hoztuk. A mintát 2 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az átáramoltatott folyadékot összegyűjtöttük, és a DNS analízishez mintákat vettünk (DNS betöményítés, agaróz gél, és endotoxin vizsgálat, ahogy azt a fentiekben leírtuk). A minta felvitele után a 2 M ammónium-szulfátot tartalmazó TE-t engedtünk át az oszlopon és a mintákat gyűjtöttük. Ezután az oszlopot TE puffer - pH 6,8, USP tisztított vízzel mostuk, és 0,5 N nátrium-hidroxiddal tisztítottuk, majd több mint 15-szörös térfogatú USP tisztított vizet engedtünk át. Az ezekben a mosásokban lévő endotoxin mennyiséget az 4. táblázatban tüntettük fel.

4. Táblázat

Minta	DNS konc. EU/ml	Endotoxin EU/ml	Összes EU egység	Endo- toxin	EU/mg DNS



töltés	2,43	593500	59350000	100	244238
átáramoltatott + mosás	0,037	32	2240	0,004	280

1 ml gyanta endotoxin kapacitása: 7,42 millió EU/ml.

Az endotoxin csökkenés a mintában: 99,996 %.

5. Példa

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS formák elválasztása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával - gradiens elúció

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot tisztítottuk, ahogy azt a fentiekben leírtuk. A fő szennyezők, mint például endotoxin, RNS, fehérje, kromoszómális DNS stb. eltávolítására a plazmid DNS nagymértékű tisztításánál butil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiát alkalmaztunk, melynél 2 M ammónium-szulfát koncentrációnál a plazmid DNS az oszlopon átfolyik, míg a szennyezők az oszlophoz kötődnek (lásd a fentieket).

A plazmid DNS-t tartalmazó átfolyó oldatot dializáltuk és anioncserélő (Bio Septra) oszlopra vittük, mely további tisztítást nem eredményez. A butil-oszlopos elválasztáshoz a Q anioncserélő oszlopon történő átengedést nem feltétlenül kell végrehajtani. A Q anioncserélő eluátumát 30 kD-os regenerált cellulóz membránon (0,1 m², Millipore Corporation) diafiltráltuk. A

dializált anyagot szilárd ammónium-szulfáttal 3 M-ra beállítottuk.

A 2,6 cm átmérőjű és 15 cm ágymagasságú Butyl (Toyopearl Butyl 650S - TosoHaas) oszlopot hozzávetőleg 15-20 ml/perc sebességgel megtöltöttük. Az oszlopot 3 M trisz-EDTA pufferben lévő (pH = 7,4) ammónium-szulfáttal egyensúlyba hoztuk. A mintát 5 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az oszlopot ezután 2-3 oszloptérfogatnyi pufferes 3 M ammónium-szulfáttal mostuk. Az oszlopot ezek után 3 M - 1 M 6 oszloptérfogatnyi ammónium-szulfát gradienssel eluáltuk. A gradiens eluálás alatt két csúcsot kaptunk, az első a relaxált formájú plazmid DNS-t tartalmazta, míg a második a szupertekeredett plazmid DNS-t, ahogy azt agaróz gélelektroforézissel megállapítottuk (4A. ábra). A kromatogramot a 4B. ábrán mutattuk be. Az eredményeket HPLC vizsgálattal tovább erősítettük, melynél a két forma százalékat meghatároztuk (5. táblázat).

A vizsgálat érzékenységi tartományán belül megerősítettük, hogy a második csúcs 85 % szupertekeredett formát tartalmaz, míg a kiindulási anyagban a szupertekeredett forma 50-60 %. A kiindulási szupertekeredett plazmid DNS legalább 90 %-át ki nyertük. A csúcsok elkülönülése a szétválasztás hatékonyságával jó egyezést mutatott, még a 15 cm-es oszlopmagasságnál is. Ez arra utal, hogy a szupertekeredett és a relaxált plazmidformák elválasztása butil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával hatásos. Ráadásul ez a kiváló endotoxin eltávolítási hatékonyság jelentős mennyiségű RNS, fehérje és DNS fragmens el-

távolításával is társult, eredményül jelentősen tisztított mintát kaptunk, ami a génterápia igényeinek megfelel.

5. Táblázat

Minta	Szupertekeredett forma (%)
Kiindulási anyag	63
1. csúcs	8
2. csúcs	83

6. Példa

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS formák elválasztása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával - gradiens elúció hosszú oszloppal

A pE1A-K2-t hordozó *E. coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot tisztítottuk, ahogy azt a fentiekben leírtuk. A fő szennyezők, mint például endotoxin, RNS, fehérje, kromoszómális DNS stb. eltávolítására a plazmid DNS nagymértékű tisztításánál butil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiát alkalmaztunk, melynél 2 M ammónium-szulfát koncentrációnál a plazmid DNS az oszlopon átfolyik, míg a szennyezők az oszlophoz kötődnek (lásd a fentieket). A plazmid DNS-t tartalmazó átfolyó oldatot dializáltuk és anioncserélő oszlopra vittük, mely további tisztítást nem eredményez. A Q anioncserélő oszlopon történő átengedést nem feltétlenül kell végrehajtani a butil oszlopos elválasztáshoz.

A 2,6 cm átmérőjű és 30 cm ágymagasságú Butyl (Toyoparl Butyl 650S - TosoHaas) oszlopot hozzávetőleg 15-20 ml/perc sebességgel megtöltöttük. Az oszlopot 3 M trisz-EDTA pufferben lévő (pH = 7,4) ammónium-szulfáttal egyensúlyba hoztuk. A mintát 5 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az oszlopot ezután 2-3 oszloptérfogatnyi pufferes 3 M ammónium-szulfáttal mostuk. Az oszlopot ezek után 3 M - 1 M 6 oszloptérfogatnyi ammónium-szulfát gradienssel eluáltuk. A gradiens eluálás alatt két csúcsot kaptunk, az első a relaxált formájú plazmid DNS-t tartalmazta, míg a második a szupertekeredett plazmid DNS-t, ahogy azt agaróz gélelektroforézissel megállapítottuk (5A. ábra). A kromatogramot a 5B. ábrán mutattuk be. Az eredményeket HPLC vizsgálattal tovább erősítettük, melynél a két forma százalékat meghatároztuk (6. táblázat).

A vizsgálat érzékenységi tartományán belül megerősítettük, hogy a második csúcs 90 % szupertekeredett formát tartalmaz, míg a kiindulási anyagban a szupertekeredett forma 50 %. A hosszabb oszlopnál a csúcsok elkülönülése alapvonali szinten nagyobb. Ez a példa azt mutatja, hogy a szupertekeredett és a relaxált plazmidformák elválasztása butil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával hatásos. Ráadásul ez a kiváló endotoxin eltávolítási hatékonyság jelentős mennyiségű RNS, fehérje



és DNS fragmens eltávolításával társult, eredményül jelentősen tisztított mintát kaptunk, mely a génterápia igényeinek megfelel.

6. Táblázat

Minta	Szupertekeredett (%)
Kiinduló anyag	53
1. csúcs, 36. frakció	15
2. csúcs, 47. frakció	83
3. csúcs, 49. frakció	95
4. csúcs, 52. frakció	91

7. Példa

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS formák elválasztása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával - lépcsős elúció

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot tisztítottuk, ahogy azt a fentiekben leírtuk. A fő szennyezők, mint például endotoxin, RNS, fehérje, kromoszómális DNS stb. eltávolítására a plazmid DNS nagymértékű tisztításánál butil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiát alkalmaztunk, melynél 2 M ammónium-szulfát koncentrációnál a plazmid DNS az oszlopon átfolyik, míg a szennyezők az oszlophoz kötődnek (lásd a fenti 1. példát). A plazmid DNS-t tartalmazó átfolyó

oldatot és a mosatot összegyűjtöttük és 30 kD ultrafiltrációs membránnal, tangenciális áramlási szűréssel, betöményítettük. A koncentrált plazmid DNS-t szilárd ammónium-szulfáttal 3 M ammónium-szulfát végkoncentrációra állítottuk be.

Az 1 cm átmérőjű és hozzávetőleg 30 cm ágymagasságú Butyl (Toyopearl Butyl 650S - TosoHaas) oszlopot hozzávetőleg 6 ml/perc sebességgel megtöltöttük. Az oszlopot 3 M TRISZ-EDTA pufferben lévő (pH = 7,4) ammónium-szulfáttal egyensúlyba hoztuk. A mintát 2 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. A plazmidot 3 M ammónium-szulfáttal pufferrel 2-3 ágytérfogatnyi mennyiséggel mostuk. Az oszlopot ezek után különböző koncentrációjú 2-3 oszloptérfogatnyi ammónium-szulfáttal eluláltuk: 2,8 M, 2,7 M, 2,6 M, 2,55 M, 2,5 M, 2,4 M, 1 M. A csúcsok agaróz gélelektroforézis képét a 6A. ábrán mutattuk be. A csúcsok gélelektroforézise a szupertekeredett és a relaxált formák éles elválását mutatta. A 2,4 M-os eluálás a relaxált formát eredményezi, míg az 1 M-os a szupertekeredett plazmid DNS-t. A kromatogramot a 6B. ábrán mutattuk be. Az eredményeket HPLC vizsgálattal tovább erősítettük, melynél a két forma százalékat meghatároztuk (7. táblázat).

A vizsgálat érzékenységi tartományán belül megerősítettük, hogy a második csúcs 93 % szupertekeredett formát tartalmaz, míg a kiindulási anyagban a szupertekeredett forma csak 62 % volt. A hosszabb oszlopnál a csúcsok elkülönülése alapvonali szinten nagyobb. Ezeket az eredményeket a következő kísérletben megerősítettük, ahol a 2,3 és a 2,2 M-os elulálások

nem eredményeznek elválást, és a 2,4 M-os eluálás ismételt a relaxált forma eltávolítását biztosította, amivel az 1 M-os eluálásnál a szupertekeredett forma növekedését okozta. A lépcsős eluálási elválasztás a nagy mennyiségű elválasztásnál jelentős, ezzel az megbízhatóbban végrehajtható. Ez a példa tisztán bemutatja, hogy a szupertekeredett és a relaxált plazmidformák elválasztása butil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával hatásos. Ráadásul ez a kiváló endotoxin eltávolítási hatékonyság jelentős mennyiségű RNS, fehérje és endotoxin eltávolításával társult, eredményül jelentősen tisztított mintát kaptunk, mely a génterápia igényeinek megfelel.

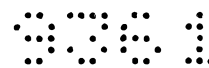
7. Táblázat

Minta	Szupertekeredett (%)
Kiindulási anyag	62
2,4 M-os eluálás	8
1 M-os eluálás	93

8. Példa

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS formák elválasztása hexil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával - gradients elúció hosszú oszlopon

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot



tisztítottuk, ahogy azt a fentiekben leírtuk. A fő szennyezők, mint például endotoxin, RNS, fehérje, kromoszómális DNS stb. eltávolítására a plazmid DNS nagymértékű tisztításánál hexil hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiát alkalmaztunk, melynél 2 M ammónium-szulfát koncentrációnál a plazmid DNS az oszlopon átfolyik, míg a szennyezők az oszlophoz kötődnek (lásd a fenti 1. példát). A plazmid DNS-t tartalmazó átfolyó oldatot dializáltuk és anioncserélő oszlopra vittük, mely további tisztítást nem eredményez. A Q anioncserélő oszlop eluátumát 30 kD-os regenerált cellulóz membránon diafiltráltuk. A dializált anyagot szilárd ammónium-szulfáttal 3 M-ra beállítottuk (lásd a fentieket).

Az 1 cm átmérőjű és hozzávetőleg 30 cm ágymagasságú Hexyl (Toyopearl Butyl 650S - TosoHaas) oszlopot hozzávetőleg 5-10 ml/perc sebességgel megtöltöttük. Az oszlopot 3 M TRISZ-EDTA pufferben lévő (pH = 7,4) ammónium-szulfáttal egyensúlyba hoztuk. A mintát 2 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az oszlopot ezután 2-3 oszloptérfogatnyi pufferes 3 M ammónium-szulfáttal mostuk. Az oszlopot ezek után 3 M - 1 M 6 oszloptérfogatnyi ammónium-szulfát gradienssel eluáltuk. A gradiens eluálás alatt két csúcsot kaptunk, az első főleg a relaxált formájú plazmid DNS-t tartalmazta, míg a második a szuper-tekeredett plazmid DNS-t, ahogy azt agaróz gélelektroforézissel megállapítottuk (7A. ábra). A kromatogramot a 7B. ábrán mutattuk be. Mennyiségileg a második csúcs agaróz gélelektroforézis alapján jelentősen több szupertekeredett plazmidot

tartalmazott, mint a kiindulási anyag. Igen kiváló csúcsfelbontást kaptunk, mivel a hexilnél az ágyméret 100:μm, míg a butilnál 35:μm.

9. Példa

Az endotoxin eltávolítása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával (nátrium-kloriddal)

A pE1A-K2-t hordozó *Escherichia coli* sejteket tenyésztettük és kémiai eljárásokkal lizáltuk, majd szűréssel a kapott oldatot tisztítottuk. A kísérlethez a felülúszót használtuk. A mintákat anioncserélő oszlopon (Q Hyper D - BIOSEPRA Inc.) tisztítottuk. Ehhez a kísérlethez eluensként 2 M nátrium-kloridot használtunk. A minták 2 M NaCl-t tartalmazó 50 mM TRISZ, 10 mM EDTA pufferben voltak (pH = 7,4). Az 1 cm átmérőjű és hozzávetőleg 20 cm ágymagasságú Butyl HIC-t (Butyl 650S gyanta, TosoHaas Toyopearl Butyl 650S - TosoHaas) oszlopot hozzávetőleg 10 ml/perc sebességgel megtöltöttük, és 3 M nátrium-kloridot tartalmazó TE-vel egyensúlyba hoztuk. A mintát 10 ml/perc sebességgel vittük fel az oszlopra. Az átáramoltatott folyadékot összegyűjtöttük, és a DNS analízishez mintákat vettünk (DNS betöményítés, agaróz gél, és endotoxin vizsgálat). A minta felvitele után a 2 M ammónium-szulfátot tartalmazó TE-t engedtünk át az oszlopon és a mintákat gyűjtöttük. Ezután az oszlopot TE pufferrel mostuk.

Minta	DNS konc. EU/ml	Endotoxin EU/ml	Összes EU egység	Endo- toxin	EU/mg DNS
töltés	0,27	642	16050	100	2377
átáramolta- tott + mosás	0,13	5	350	2	38

1 ml gyanta endotoxin kapacitása: 1570 EU/ml.

Az endotoxin csökkenés a mintában: 98 %.

10. Példa

Plazmid tisztítása butil alapú hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával (kis méretű)

A kis méretű plazmid DNS tisztítást a kereskedelemben vásárolható készlet segítségével hajtottuk végre, ezek közül a legismertebb a Qiagen's Miniprep készlet. Az itt leírt plazmid DNS tisztítási eljárások a kereskedelemben beszerezhető készletekkel szemben számos előnyt mutatnak. A következő példa a jelen táblamány szerinti hidrofób kölcsönhatást biztosító kromatográfiával végzett kis méretű plazmid DNS tisztítási eljárást mutatja be.

A tisztításhoz a kiindulási anyagot standard eljárásokkal kaptuk meg. Részletesebben, a körülbelül 4,65 kb. méretű plazmidot hordozó *Escherichia coli* sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó Luria Broth-on 37 °C-on növesztettük. A sejteket OD 2,7-nél összegyűjtöttük. A sejteket a táptalajból centrifugálással választottuk el. Majd ezek után az üledéket 50 mM TRISZ-HCl,

10 mM EDTA-ban felvettük (pH = 8,0). Egyenlő térfogatú 200 mM NaOH-t és 1 % SDS-t tartalmazó oldatot adtunk hozzá, jól összekevertük, és szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltuk. Ezzel a lépéssel a sejtek lizálását értük el, ami a sejttartalom felszabadulásával jár, beleértve a plazmid DNS-t. Az oldat semlegesítését egyenlő (eredeti) térfogatú 3,1 M kálium-acetát oldattal végeztük (pH = 5,5), amit előzőleg jól összekevertünk. A csapadék eltávolítása érdekében a semlegesített lizátumot ezután gézen átszűrtük. A kitisztult lizátumot 70 % izopropánollal kicsaptuk (3 ml tiszta lizátumhoz 2,1 ml izopropanolt adtunk). A csapadékot centrifugálással elválasztottuk, és az üledéket 70 % etanollal mostuk, szárítottuk és 10 mM TRISZ-HCl, 0,1 mM EDTA pufferben (pH = 8,0) feloldottuk. Ezt a készítményt felhasználásáig -20°C -on fagyasztva tároltuk, és ez képezte a tisztítási kísérlet kiindulási anyagát.

A Butyl 650S oszlopot, melynek térfogata 20 ml, magassága 10 cm és átmérője 1,6 cm (Pharmacia XKl6/20), 2,2 M ammónium-szulfátot (AS) tartalmazó 10 mM TRISZ-HCl, 10 mM EDTA (TE) pufferrel (pH = 7,4) egyensúlyba hoztuk. A felvitelhez a mintát szilárd ammónium-szulfáttal 2,2 M végkoncentrációra állítottuk be. A mintát 2,2 M AS-t tartalmazó TRISZ-EDTA-ban (pH = 7,4) 10 ml-re hígítottuk.

A tisztítási körülményeket úgy állítottuk be, hogy a plazmid DNS az eluátumban, míg a szennyezők az oszlophoz kötötten legyenek.



A mintát 2 ml/perc sebességgel vittük fel, és az átáramló folyadékot összegyűjtöttük. Az oszlopot 35 ml 2,2 M AS-t tartalmazó TE pufferrel mostuk és a mosatokat gyűjtöttük: 1. mosás (10 ml), 2. mosás (14,5 ml) és 3. mosás (10 ml). A mosás alatt csúcs jelentkezett. Az oszlopot 55 ml 1 M AS-t tartalmazó TE-pufferrel mostuk (pH = 7,4) és az 1 M-os 1. mosást (10 ml) és az 1 M 2. mosást (45 ml) összegyűjtöttük. Az 1 M-os AS-nél csúcsot kaptunk. Az oszlopot 50 ml USP-tisztított vízzel eluáltuk. Csúcsot kaptunk. Az alábbi táblázat a fenti frakciókban lévő összes nukleinsav mennyiségét mutatja be. A koncentrációkat a 260 nm-es abszorbancia alapján számítottuk ki. (konc (µg/ml) = A₂₆₀ * 50)

9. Táblázat

Oszlopfrakciók	Koncentráció µg/ml	Tömeg µg
Töltés	550,0	5503
1. mosás	7,6	76
2. mosás	40,4	607
3. mosás	5,0	50
Gyűjtött (plazmid DNS)	20,9	733
1 M-os eluálás	35,8	1611
Vizes eluálás	30,5	1523

A mintákat agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk. A 8. ábra a gél fotóját mutatja be. A gélfoto a mosási frakciókban (3.,4.,5. oszlop) a plazmid DNS-t mutatja. A felviteli mintával egybevetve



(2. oszlop) a mosási frakciókban RNS-t nem láthatunk. Az RNS-t tartalmazó frakciók eluálódását a 6. és 7 oszlopon láthatjuk. A gyűjtött mosatban az endotoxint Kinetic QCL endotoxin vizsgálati módszerrel határoztuk meg. A mintákban a kimutatási határ alatti endotoxint nem mutattunk ki, mely egyébként 0,005. EU/ml. A plazmid kitermelése 100 ml tenyészetből 733 µg, ami a kereskedelemben kapható készletekkel nyert mennyiséggel megegyezik.

Az itt és az alábbiakban idézett hivatkozások tartalmát teljes egészében hivatkozásként építettük be [Marquet és mtsai: Production of pharmaceutical-grade plasmid DNA, 5,561,064 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Cole, Kenneth: Concentration and size-fractionation of nucleic acids and viruses in porous media, 5,707,850 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Horn és mtsai: Purification of plasmid DNA during column chromatography, 5,707,812 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés].

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás legalább egy sejtszennyezőt tartalmazó plazmid elegyből a plazmid DNS tisztítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza:

- (1) a szóban forgó elegyhez kellő mennyiségű só adása annak elérésére, hogy az így nyerhető oldatból legalább egy sejtszennyező a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeghez szelektíven kötődjön;
- (2) a plazmid DNS-t tartalmazó szóban forgó oldat egyesítése a szóban forgó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeggel, olyan körülmények között, ami a komplex kialakítása érdekében a szóban forgó szennyeződés legalább egyikét a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeghez köti; és
- (3) a szóban forgó komplexből és a hidrofób kölcsönhatást biztosító közegből a nem-kötődött plazmid DNS összegyűjtése;

ahol a szóban forgó eljárást oldószerek, detergenssek, glikolok, hexamin-kobalt, spermidin és poli(vinil-pirrolidon) nélkül végezzük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a legalább egy szennyezőt a következők közül választjuk ki: RNS, endotoxin, kromoszómális DNS és fehérje.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy legalább az egyik szennyező endotoxin.



4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a só anionokat és kationokat tartalmaz, amelyeket a következő csoportból választunk ki: acetát, foszfát, karbonát, SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , NO_3^- , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ .

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a só ammónium-szulfát, amit a 2-4 M tartományban alkalmazunk.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ammónium-szulfát koncentrációja 2 M.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat 2-4 M koncentráció tartományban nátriumsókat tartalmaz.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a só nátrium-klorid.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nátrium-klorid koncentrációja körülbelül 2 M.

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat pH-ja a körülbelül 6,8-7,4-ig terjedő tartományban van.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat pH-ja körülbelül 7,4.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kromatográfiás alapot tartalmaz kinyúló hidrofób csoportokkal.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kinyúló hidrofób csoportokat a C_3 - C_{10} alkilt tartalmazó csoportból, vagy ezek keverékéből választjuk ki.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeget a következőket tartalma-

zó csoportból választjuk ki: metakrilát polimer vagy kopolimer váz legalább egy következő liganddal: propil, butil, hexil, oktil, nonil vagy decil.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a közeg legalább egy metakrilát etilén-glikol kopolimer váz vagy keresztkötéses agaróz váz.

16. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyanta 15-100 μm -es gyöngy formájában van.

17. Eljárás szupertekeredett plazmid DNS-t és a relaxált plazmid DNS-t, valamint szabadon legalább egy sejtszennyezőt tartalmazó oldatból a szupertekeredett plazmid DNS elválasztására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza:

- (1) egy olyan elegy elkészítése só hozzáadásával, melyben szupertekeredett plazmid DNS és a relaxált plazmid DNS, valamint szabadon megválaszthatóan legalább egy sejtszennyező található;
- (2) az első reakció-körülmények között a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elegy, valamint a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kapcsolatba hozása, ahol mind a szupertekeredett plazmid DNS, mind a relaxált plazmid DNS az első elegy kialakításához a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeggel kötődik;
- (3) az első elegy reakciókörülményeinek megváltoztatása olyan második körülménnyé, hogy az első elegyből a relaxált plazmid DNS-eket eltávolítja, a kialakult második kapcsolási elegy és a relaxált plazmid elkülönítésével; és

- (4) a második kötési reakcióelegy körülményeinek átalakítása harmadik körülménnyé, mellyel a hidrofób körülményeket biztosító közeg és a szupertekeredett plazmid DNS egymástól elkülöníthetővé válik.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a legalább egy sejtszennyezőt a következők közül választjuk ki: RNS, endotoxin, kromoszómális DNS és fehérje.

19. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy legalább az egyik sejtszennyező endotoxin.

20. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kromatográfiás alapot tartalmaz kinyúló hidrofób csoportokkal.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kinyúló hidrofób csoportokat a C_3 - C_{10} alkilcsoportok közül választjuk ki.

22. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeget a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: metakrilát polimer vagy kopolimer váz legalább egy következő liganddal: propil, butil, hexil, oktil, nonil vagy decil.

23. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a közeg legalább egy metakrilát etilénlikol kopolimer váz vagy keresztkötéses agaróz váz.

24. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyanta 15- 100 μm -es gyöngy formájában van.



25. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a só anionokat és kationokat tartalmaz, amelyeket a következő csoportból választunk ki: acetát, foszfát, karbonát, SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , NO_3^- , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ .

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a só ammónium-szulfát, amit 2-4 M tartományban alkalmazunk.

27. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az első állapot a szóban forgó közeggel történő egyensúlyba hozást foglalja magában egy olyan sóoldattal, melyben az ammónium-szulfát koncentrációja 2,5-4 M.

28. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a második állapot mosást tartalmaz egy olyan oldattal, melyben az ammónium-szulfát koncentrációja 2,35-2,45 M.

29. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a harmadik állapot a szóban forgó második elegy sóval történő mosását tartalmaz egy olyan oldattal, melyben az ammónium-szulfát koncentrációja 1-2,3 M.

30. Eljárás az endotoxin elválasztására a plazmid DNS-től, azzal jellemezve, hogy az endotoxin és a plazmid DNS elegyét a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeggel olyan körülmények között egyesíti, melynél az endotoxin a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeggel kapcsolódva komplexet alkot, és a szóban forgó plazmid DNS-t és a szóban forgó komplexet elválasztja.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a só anionokat és kationokat tartalmaz, amelyeket a következő

csoportból választunk ki: acetát, foszfát, karbonát, SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , NO_3^- , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ .

32. A 30. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó elegy ammónium-szulfátot tartalmaz, amit az 1,5-4 M koncentráció-tartományban alkalmazunk.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó ammóniumsó ammónium-szulfát, körülbelül 2 M koncentrációban.

34. A 30. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kinyúló hidrofób csoportokat tartalmaz.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kinyúló hidrofób csoportokat a C_3 - C_{10} alkilcsoportok közül választjuk ki.

36. A 34. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeget a következőket tartalmazó csoportból választjuk ki: metakrilát polimer vagy kopolimer váz legalább egy következő liganddal: propil, butil, hexil, oktil, nonil vagy decil.

37. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a közeg legalább egy metakrilát etilén-glikol kopolimer váz vagy keresztkötéses agaróz váz.

38. A 34. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyanta 15-100 μm -es gyöngy formájában van.

39. A 30. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó elegy pH-ja körülbelül 6,8-7,4-ig terjedő tartományban van.

40. A 35. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az oldat pH-ja körülbelül 7,4.

41. A szupertekeredett plazmid DNS és a relaxált plazmid DNS elválasztási eljárása, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza: az első körülmények között a szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elegy valamint a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kapcsolatba hozása, ahol mind a szupertekeredett plazmid DNS, mind a relaxált plazmid DNS az első elegy kialakításához a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeggel kötődik; az első elegy körülményeinek megváltoztatása olyan második körülménnyé, hogy az első elegyből a relaxált plazmid DNS-ek eltávolítása lehetővé váljon, a kialakult második kapcsolási elegy és a relaxált plazmid elkülönülése révén; és a második kötési elegy körülményeinek átalakítása harmadik körülménnyé, mellyel a hidrofób körülményeket biztosító közeg és a szupertekeredett plazmid DNS egymástól elkülöníthetővé válik.

42. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kinyúló hidrofób csoportokat tartalmaz.

43. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kinyúló hidrofób csoportokat a C₃-C₁₀ alkilcsoportok és ezek keverékei közül választjuk ki.

44. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó hidrofób kölcsönhatást biztosító gyanta metakrilát polimer vagy kopolimer váz legalább egy következők közül választott liganddal: propil, butil, hexil, oktil, nonil vagy decil.

45. A 44. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó gyanta legalább egy metakrilát etilénlglikol kopolimer váz vagy keresztkötéses agaróz váz.

46. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gyanta 15-100 μm -es gyöngy formájában van.

47. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az első állapot a szóban forgó közeggel történő egyensúlyba hozást foglalja magában egy olyan sóoldattal, melyben az ammónium-szulfát koncentrációja 2,5-4 M.

48. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a második állapot a szóban forgó első kötött elegy mosását tartalmazza egy olyan oldattal, melyben az ammónium-szulfát koncentrációja 2,35-2,45 M.

49. A 48. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a harmadik állapot a szóban forgó második elegy sóval történő mosását tartalmaz egy olyan oldattal, melyben az ammónium-szulfát koncentrációja 1-2,3 M.

50. A 17. és a 41. igénypontok bármelyike szerint eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó megváltoztatást és a szóban forgó módosítást egy folyamatot eljárásban egyesítjük, ami a szóban forgó relaxált plazmid DNS és szupertekeredett plazmid DNS gradiens eluálását tartalmazza, úgy, hogy a kötött első elegyet



sót tartalmazó ammónium-szulfáttal 3 és 1 M között folyamatosan változtatva eluálják, és a szóban forgó relaxált plazmid DNS-t az első eluálási térfogattal összegyűjtjük és a szóban forgó szupertekeredett DNS-t pedig a második térfogattal nyerjük ki.

51. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó elválasztott relaxált és a szóban forgó elválasztott szupertekeredett plazmid DNS-eket elkülönítve összegyűjtjük.

52. A szupertekeredett DNS mennyiségének a relaxált DNS-hez képest történő megnövelési eljárása ezek keverékénél, azzal jellemezve, hogy az eljárás a következő lépéseket foglalja magában:

- (1) a szupertekeredett DNS-t és a relaxált DNS-t tartalmazó elegyet a hidrofób kölcsönhatást biztosító, alkilcsoportot tartalmazó közeggel ionos körülmények között egyesítjük, amelyhez elsődlegesen a szupertekeredett DNS kötődik;
- (2) a szupertekeredett DNS-t és a relaxált DNS-t tartalmazó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg ionos körülmények között végzett kezelése, mely elsődlegesen a relaxált DNS eltávolítását teszi lehetővé; és
- (3) a hidrofób kölcsönhatást biztosító közegről a szupertekeredett DNS eluálása.

53. DNS-t tartalmazó összetételekből a lipopoliszacharidok (LPS) eltávolítási eljárása azzal jellemezve, hogy az eljárás a következő lépéseket foglalja magában:

- (1) a DNS-t és LPS-t tartalmazó elegy és az alkilcsoportot tartalmazó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg egyesítése, ahol az ionos körülmények között lezajló kölcsönhatás elsődlegesen az LPS-nek a hidrofób kölcsönhatást biztosító közeghez való kapcsolódását teszi lehetővé, szemben a DNS-sel; és
- (2) a DNS-t és LPS-t tartalmazó hidrofób kölcsönhatást biztosító közeg kezelése, mellyel a DNS szelektíven eltávolítható.

A meghatalmazott:

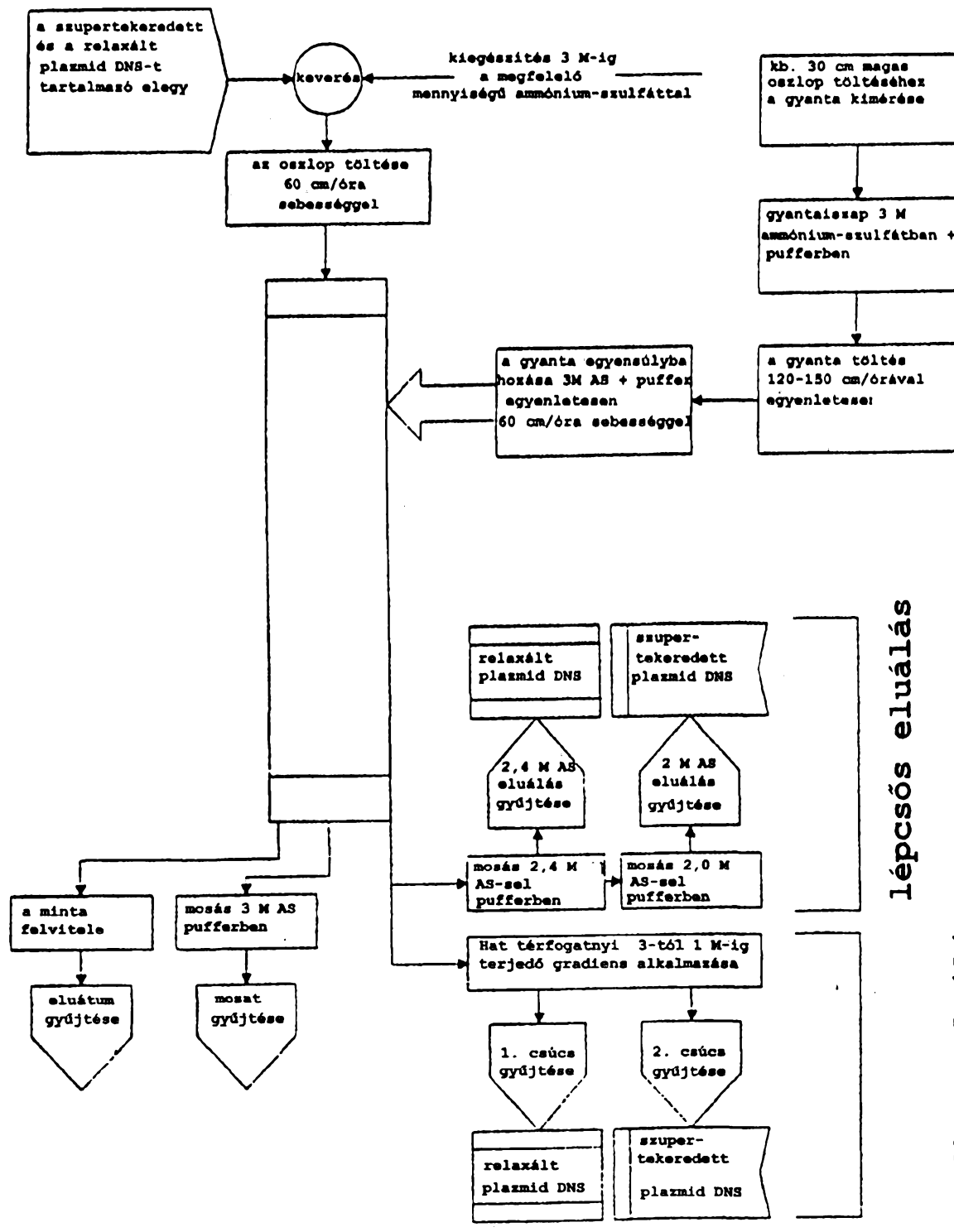
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

61 oldal
62 oldal

67 oldal
Bent

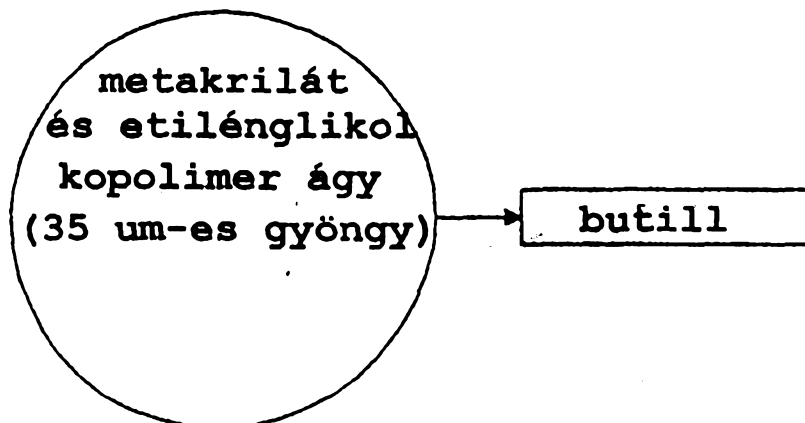
1. ÁBRA

A szupertekeredett és a relaxált plazmid DNS elválasztási eljárása

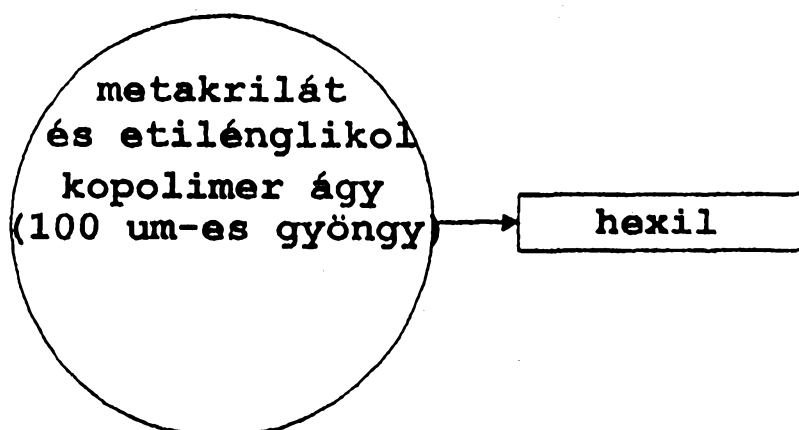


2. ÁBRA

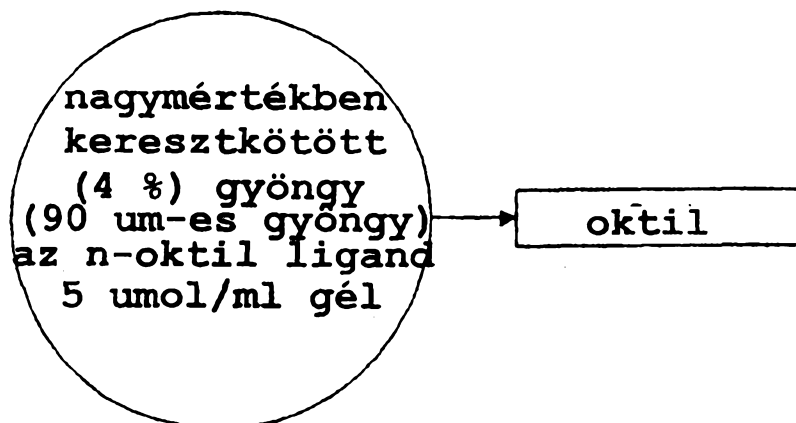
Butil HIC gyantaágy



hexil HIC gyantaágy

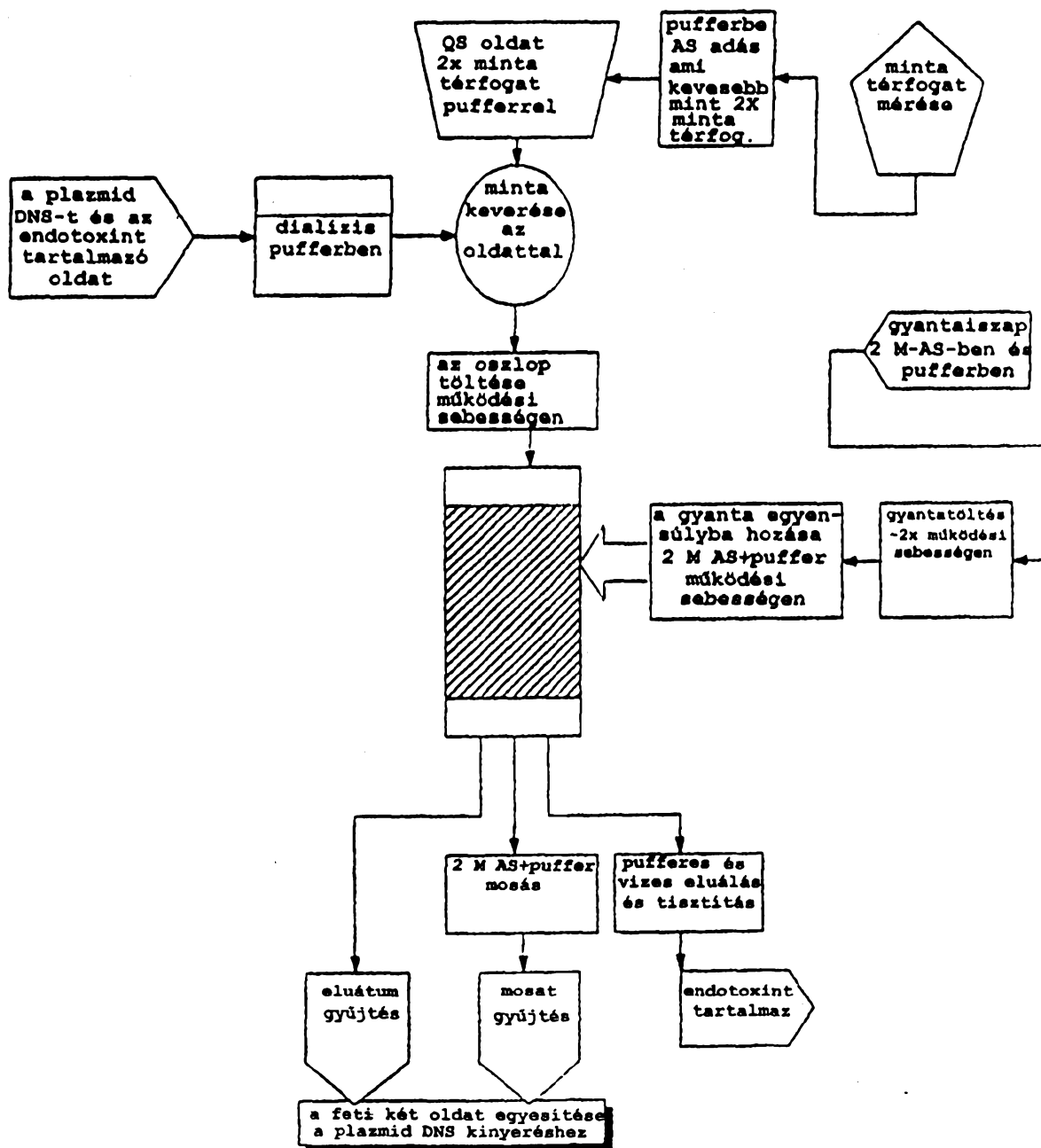


oktil HIC gyantaágy



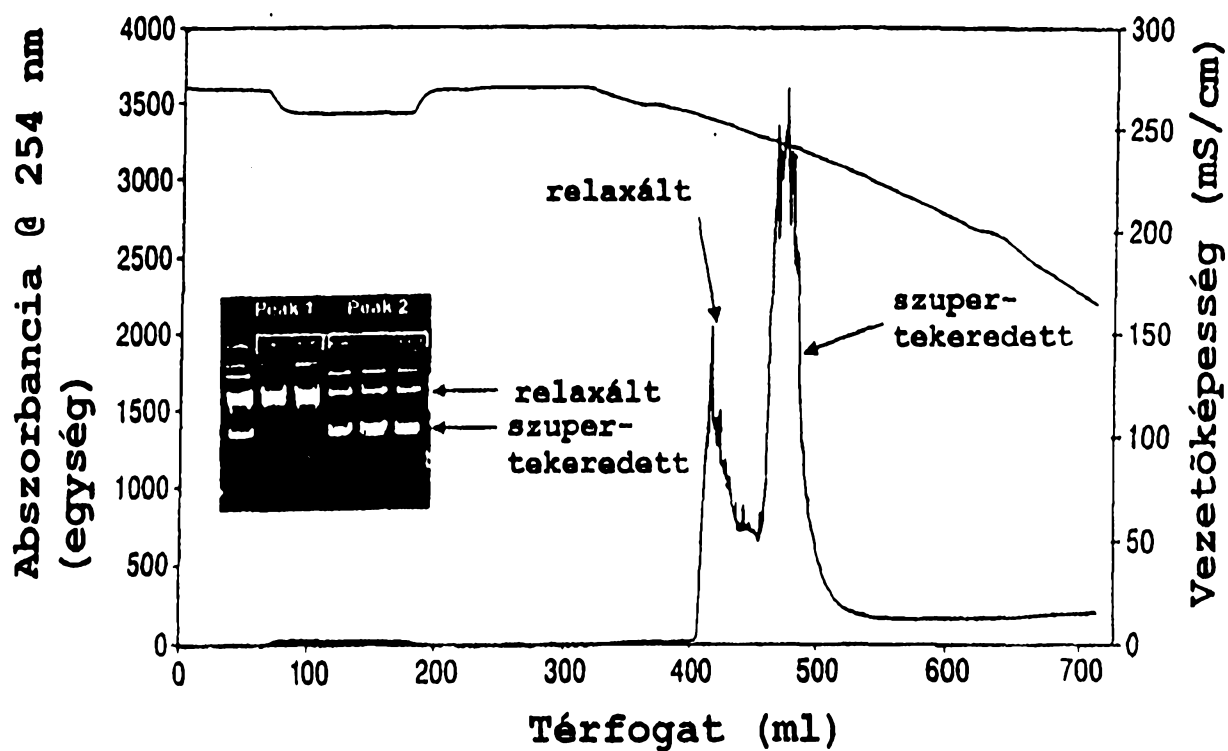
3. ÁBRA

A plazmid DNS oldatból az endotoxin eltávolítása

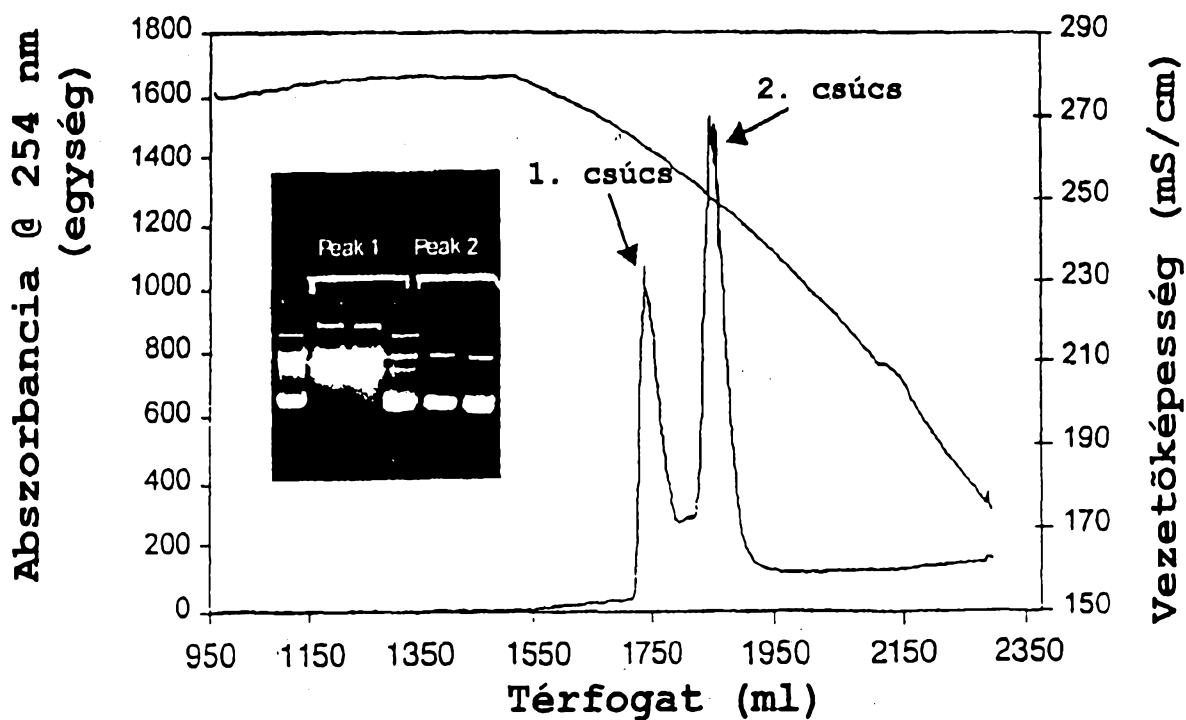


4. ÁBRA

Butil HIC gradiens elúció

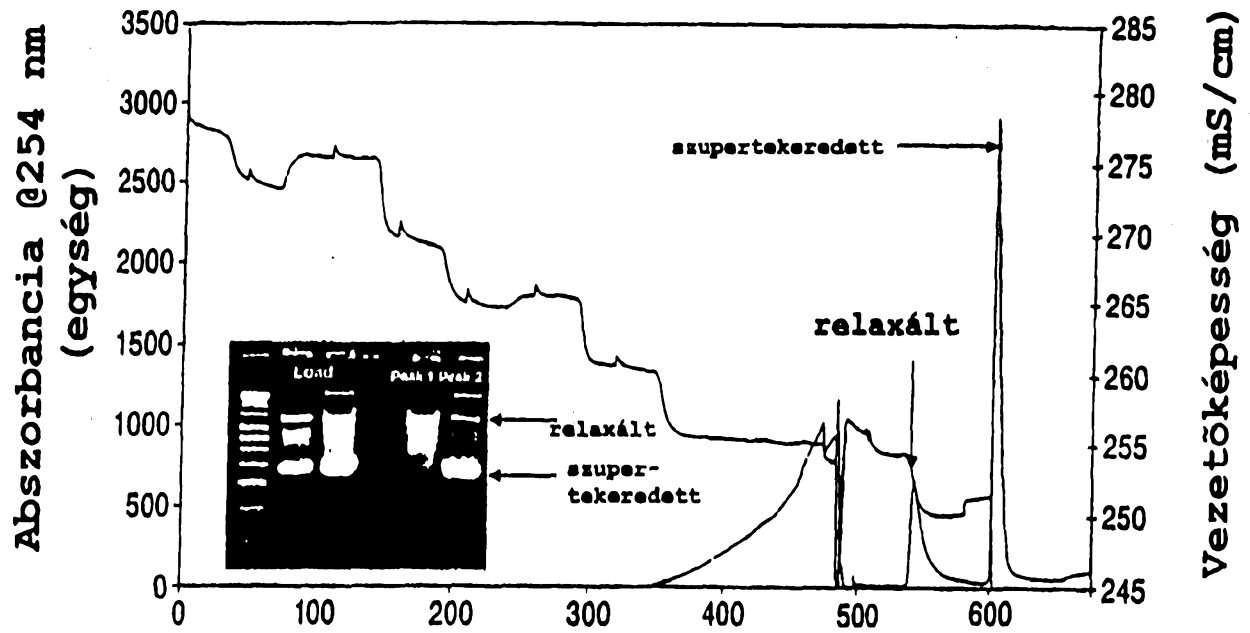


5. ÁBRA

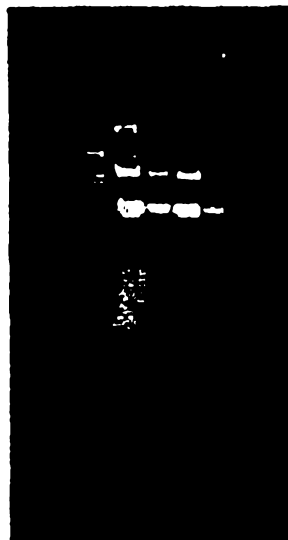


6. ÁBRA

Butil HIC lépcsős eluálás



8. ÁBRA



7. ÁBRA

Hexil HIC gradiens elució

