

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Dezember 2004 (09.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/106516 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/005799

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Mai 2004 (28.05.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 24 511.1 28. Mai 2003 (28.05.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden (DE). **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH** [DE/DE]; 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MÜLLER, Markus** [DE/DE]; In Ückerath 100, 41542 Dormagen-Nievenheim (DE). **HUBBUCH, Jürgen** [DE/DE]; Deliusstrasse 5, 52064 Aachen (DE). **FRERIX, Andreas** [DE/DE]; Steinchensweg 5, 47546 Kallar-Kehrum (DE). **KULA, Maria-Regina** [DE/DE]; Geigenberger Strasse 35, 81477 München (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **QIAGEN GMBH**; Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING PLASMID-DNA BY MEANS OF AN AQUEOUS BIPHASIC SYSTEM

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON PLASTMID-DNA MITTELS EINES WÄSSRIGEN 2-PHASEN-SYSTEMS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the isolation of plasmid-DNA from biomasses, by means of an aqueous biphasic system, comprising a polymer and a salt component, characterised in that the resuspension of the applied biomass, the alkaline lysates of the biomass, the neutralisation of the alkaline lysate component and the separation of the plasmid-DNA from the contaminants (such as cell remains, RNA and gDNA, for example) is carried out in a single reaction vessel (one-pot method). According to the invention, the above is achieved, whereby the neutralisation of the alkaline lysate component is carried out in one and the same container by the addition of potassium phosphate and hence one component of the aqueous biphasic system is already present and the second component of the aqueous biphasic system is a PEG with a molecular weight of calculated average from about 600 g/mol to 1000 g/mol, however, said second component is preferably formed by a mixture of PEG 600 and PEG 1000.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Biomasse mittels eines wässrigen 2-Phasensystems mit einer Polymer- und einer Salz-Komponente, dadurch gekennzeichnet, dass die Resuspension der eingesetzten Biomasse, die alkalische Lyse der Biomasse, die Neutralisation des alkalischen Lyseansatzes und die Trennung der Plasmid-DNA von den Kontaminanten (wie z.B. Zelltrümmer, RNA, gDNA) in einem einzigen Reaktionsgefäß (Ein-Topf-Verfahren) durchgeführt wird. Dies wird erfindungsgemäss dadurch ermöglicht, dass die 10 Neutralisation des alkalischen Lyseansatzes in ein und demselben Behältnis durch Zugabe von Kaliumphosphat erfolgt und damit bereits eine Komponente des wässrigen 2-Phasensystems vorhanden ist, und dass die zweite Komponente des wässrigen 2-Phasensystems ein PEG mit einem Molekulargewicht von im rechnerischen Mittel etwa 600 g/mol bis 1000 g/mol ist, vorzugsweise aber von einem Gemisch aus PEG 600 und PEG 1000 gebildet wird.

WO 2004/106516 A1

Verfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNA mittels eines wässrigen 2-Phasensystems.

Die Erfindung betrifft ein zeitlich verkürztes und vereinfachtes Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Biomasse, wie z.B. Bakterien, mittels eines wässrigen 2-Phasensystems mit einer Polymer- und einer Salz-Komponente sowie die Verwendung der so gewonnenen Plasmid-DNA in der Gentherapie und in der genetischen Vakzinierung. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Eine der Möglichkeiten, Plasmid-DNA aus Biomasse zu isolieren, ist die Lyse der Biomasse und die sich anschließende Trennung der geklärten Lysate der Biomasse in einem wässrigen 2-Phasensystem. Der niederländische Mikrobiologe Beijerinck entdeckte bereits 1896, dass sich nach dem Vermischen von Agar und löslicher Stärke in Wasser nach einiger Zeit zwei wässrige Phasen ausbilden. Diese Eigenschaft einiger Polymere wurde von Per Albertson um 1960 wiederentdeckt und weiterverfolgt. Er erkannte das Potential eines solchen Systems zur Aufreinigung von Viren, Zellen und auch Zellbestandteilen. Aufgrund des hohen Wasseranteils des biokompatiblen Milieus sowie der stabilisierenden Eigenschaften der Phasenkomponenten eignen sich solche Phasensysteme entsprechend besonders zur Aufreinigung von sensiblen Biomolekülen. Wässrige 2-Phasensysteme werden entweder durch Zugabe zweier unterschiedlicher Polymere (Polymer/Polymer-System; z.B. Polyethylenglykol (PEG) und Dextran) erhalten oder durch ein Polymer (z.B. Polyethylenglykol) und ein hochkonzentriertes Salz (z.B. Citrate, Sulfate, Phosphate).

Die weitverbreiteten Techniken zur Herstellung rekombinanter DNA sowie das immer weiter steigende Interesse an der Gentherapie zur Behandlung unterschiedlichster Krankheiten und genetischer Vakzinierung hat den Bedarf an einem Verfahren zur Aufreinigung von Plasmid-DNA, welches auch im industriellen Maßstab genutzt werden kann, steigen lassen. Für einen therapeutischen Einsatz gewonnene Plasmid-DNA sind daher alternative Methoden, wie Zentrifugation im Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten oder Phenolextraktion, aufgrund der Toxizität der

Substanzen nicht vorstellbar, ebenso wie die für eine Produktion im industriellen Maßstab einzusetzende Menge der toxischen oder brennbaren Substanzen.

Im Stand der Technik finden sich auch Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA in denen wässrige 2-Phasensysteme mit einer Salz- und einer Polymer-Komponente verwendet werden. Cole (Biotechniques. 1991 Jul;11(1):18, 20, 22-24) veröffentlichte ein wässriges 2-Phasensystem zur Isolierung von Plasmiden unter Verwendung von PEG als Polymer-Komponente und z.B. Ammoniumsulfat oder Natriumdihydrogenphosphat als Salz-Komponente. Konkret beschrieben ist die Isolierung des Plasmids pTZ 18U aus *E.coli* DH5 α . Das entsprechende Zellpellet wurde mittels einem Lyse-Puffer beinhaltend SDS und NaOH aufgeschlossen. Das Lysat wurde in ein entsprechendes Phasen-bildendes System gegeben, das Gemisch wurde gemixt und anschließend zentrifugiert. Dieses wurde noch zweimal mit der Unterphase und einer frischen, kein Lysat enthaltenden Oberphase wiederholt. Anschließend wurde die Unterphase gegen einen Tris/EDTA-Puffer dialysiert und so das Plasmid schließlich isoliert.

Weiterhin beschreiben Ribeiro et al. (Biotechnol Bioeng. 2002 May 20;78(4):376-84) ein wässriges 2-Phasensystem mit PEG als Polymer-Komponente und Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) als Salz-Komponente. Berichtet wird die Isolierung des Plasmids pCF1-CFTR aus *E.coli* DH5 α . Hierzu wurden die Zellen zunächst mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (Lyse-Puffer enthaltend NaOH und SDS) und das Lysat anschließend mit 3 M Natriumacetat neutralisiert. Nachfolgend wurden Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA (gDNA) durch Zentrifugation des Ansatzes entfernt. Das geklärte Lysat wurde in dem oben erwähnten wässrigen 2-Phasensystem eingesetzt. Dieses Verfahren weist jedoch die Nachteile auf, dass es apparativ und zeitlich sehr aufwendig ist. Der zeitliche Aufwand liegt nicht zuletzt darin begründet, dass in diesem System zunächst eine Lyse der Biomasse in einem getrennten Ansatz durchgeführt wird und damit für ein solches Verfahren mehr als ein Reaktionsgefäß notwendig ist.

Die vorliegende Erfindung soll die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren überwinden, insbesondere bezweckt die Erfindung die Vereinfachung und die zeitliche Verkürzung der aus dem Stand der Technik

bekannten Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Biomasse. Daneben stellt sich der vorliegenden Erfindung die Aufgabe, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das nicht nur im Labormaßstab, sondern auch im industriellen Maßstab durchführbar ist und mit dem z.B. Plasmid-DNA für den klinischen Einsatz in der Gentherapie oder
5 der genetischen Vakzinierung hergestellt werden kann. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das leicht automatisierbar ist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Isolierung von
10 Plasmid-DNA aus Biomasse mittels eines wässrigen 2-Phasensystems mit einer Polymer- und einer Salz-Komponente, dadurch gekennzeichnet, dass die Resuspension der eingesetzten Biomasse, die alkalische Lyse der Biomasse, die Neutralisation des alkalischen Lyseansatzes und die Trennung der Plasmid-DNA von den Kontaminanten (wie z.B. Zelltrümmer, RNA, gDNA) in einem einzigen
15 Reaktionsgefäß (Ein-Topf-Verfahren) durchgeführt wird. Dies wird erfindungsgemäß dadurch ermöglicht, dass die Neutralisation des alkalischen Lyseansatzes in ein und demselben Behältnis durch Zugabe von Kaliumphosphat erfolgt und damit bereits eine Komponente des wässrigen 2-Phasensystems vorhanden ist, und dass die
20 zweite Komponente des wässrigen 2-Phasensystems ein PEG mit einem Molekulargewicht von im rechnerischen Mittel etwa 600 g/mol bis 1000 g/mol ist, vorzugsweise aber von einem Gemisch aus PEG 600 und PEG 1000 gebildet wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- 25 a) Resuspension der Biomasse,
- b) Zugabe von Lyse-Puffer, Inkubation für einen zur Lyse der Biomasse ausreichend langen Zeitraum,
- 30 c) Zugabe der Salz-Komponente, Inkubation für einen ausreichend langen Zeitraum,
- d) Zugabe der Polymer-Komponente, durchmischen der Lösung, Phasenausbildung abwarten.

Vorteilhafterweise stellt das erfindungsgemäße Verfahren aufgrund der Einfachheit durch das Ein-Topf-Verfahren ein automatisierbares Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA dar. Es besteht ein immer weiter steigender Bedarf an der Automatisierbarkeit solcher Verfahren im kleineren Maßstab, z.B. zur schnellen

5 Identifizierung von Klonen. Eine solche Automatisierbarkeit ist jedoch mit den bekannten 2-Phasensystemen nur schwer realisierbar. Erst mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine solche Automatisierung leicht erreicht werden.

10 Ebenso vorteilhaft kann das beanspruchte Verfahren zur Produktion von Plasmid-DNA im industriellen Maßstab eingesetzt werden. Dies liegt in der Einfachheit, dem geringen apparativen Aufwand und der Verwendung nicht-toxischer sowie kostengünstiger Komponenten begründet.

15 Eines der erfindungswesentlichen Merkmale dieses Verfahrens ist, dass die Resuspension der eingesetzten Biomasse, die alkalische Lyse der Biomasse, die Neutralisation des Lyseansatzes und die Trennung der Plasmid-DNA von den Kontaminanten in einem wässrigen 2-Phasensystem nacheinander in einem einzigen Behältnis, also als Ein-Topf-Verfahren, stattfinden, ohne dass es einen

20 zwischenzeitlichen Zentrifugationsschritt mit anschließender Abtrennung eines Präzipitats gibt. Das erfindungsgemäße Verfahren wird hierüber stark vereinfacht, ist apparativ signifikant weniger aufwendig und ist zeitlich stark verkürzt im Vergleich zu den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren bedient sich eines 2-Phasensystems aus einer Polymer- und einer Salz-Komponente. Dies hat den Vorteil, dass die verwendeten Salze im Vergleich zu einer zweiten Polymer-Komponente (z.B. Dextran) bei einem 2-Phasensystem mit zwei unterschiedlichen Polymer-Komponenten relativ kostengünstig sind.

30

Im Falle der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff 'Plasmid-DNA' neben Plasmiden auch Cosmide sowie Phasmide, aber auch eukaryotische Vektoren, wie z.B. Hefe-Vektoren wie etwa yeast artificial chromosomes (YAC's) und ähnliche Strukturen. Der Begriff 'Biomasse' umfasst im Sinne der vorliegenden Erfindung alle

Lebensformen, die fähig sind, diese Plasmid-DNA zu tragen und zu vermehren bzw. auf ihre Nachfahren weiterzugeben, wie z.B. Bakterien, Hefen, etc.

Die Gewinnung der Biomasse, welche die Plasmid-DNA trägt, erfolgt dabei durch
5 Zentrifugation eines entsprechenden Inkubationsansatzes oder jedwede andere geeignete Methode zur Aufkonzentrierung der Biomasse. Solche Methoden so wie deren Durchführung sind dem Fachmann geläufig. Die Resuspension der Biomasse, z.B. des Bakterienpellets, sowie die alkalische Lyse der Biomasse laufen anschließend ebenfalls in für den Fachmann bekannter Art und Weise ab, z.B.
10 mittels der kommerziell erhältlichen QIAGEN Plasmid Kits und der darin enthaltenden Resuspensions-Puffer P1 sowie Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) oder sonstiger geeigneter Puffer, in einem dem Fachmann als geeignet erscheinenden Behälter. Üblicherweise wird bis zu diesem Punkt entsprechend der jeweiligen bekannten Vorschriften vorgegangen. Vorzugsweise enthält der Lyse-
15 Puffer als eine der Komponenten Natriumdodecylsulfat (SDS).

Vorteilhafter- und überraschenderweise kann die Lyse der Biomasse sowie das Lysat bei und nach Zugabe der Salz-Komponente ferner auch unter Bewegung des Lyseansatzes bzw. Lysats, wie starkem Schütteln und/oder Rühren oder ähnlichem,
20 durchgeführt werden. Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen den Nachteil auf, dass die bei einer solchen Behandlung des Lyseansatzes bzw. Lysats zwangsläufig durch Scherung entstehenden Fragmente von gDNA nicht in befriedigendem Maße von der zu isolierenden Plasmid-DNA getrennt werden können. Daher wird eine solche Behandlung des Lyseansatzes bzw. Lysats vom
25 Fachmann für gewöhnlich vermieden. In dem erfindungsgemäßen wässrigen 2-Phasensystem werden jedoch auch die so entstehenden Fragmente von gDNA von der Plasmid-DNA abgetrennt. Damit ergibt sich zum einen eine geringere Anfälligkeit des Systems gegenüber Verunreinigungen der Plasmid-DNA durch gDNA, des weiteren erhöht Bewegung des Lyseansatzes, wie z.B. starkes Rühren, Schütteln
30 oder ähnliches, zusätzlich vorteilhafterweise die Freisetzung der Plasmid-DNA aus der Biomasse und die Bewegung des Lysats, wie z.B. starkes Rühren, Schütteln oder ähnliches, bei und/oder nach Zugabe der erfindungsgemäßen Salz-Komponente erhöht zusätzlich vorteilhafterweise die Freisetzung der Plasmid-DNA aus den sich bildenden Präzipitatagglomeraten, was zu einer deutlichen Erhöhung

der Ausbeute an Plasmid-DNA führt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die durch Bewegung des Lyseansatzes bzw. Lysats gescherte gDNA im Vergleich zur sonst üblichen Kaliumacetat-Fällung nach der Lyse der Biomasse zu >90% aus der Plasmid-DNA entfernt, besonders bevorzugt zu >95% und ganz besonders bevorzugt zu >99%.

Zur Neutralisation des Ansatzes der alkalischen Lyse und zur Fällung der Proteine wird nicht auf die für den Fachmann üblichen Substanzen, wie z.B. Kaliumacetat, zurückgegriffen. Erfindungsgemäß wird der alkalische Lyseansatz vorteilhafterweise mit der erfindungsgemäßen Salz-Komponente neutralisiert. Die Salz-Komponente im Sinne der Erfindung ist Kaliumphosphat, worunter erfindungsgemäß Trikaliumphosphat (K_3PO_4), Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) und/oder Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) verstanden werden. Vorzugsweise wird der alkalische Lyseansatz ausschließlich mit einem dieser oder einer Mischung dieser Kaliumphosphate versetzt. Besonders bevorzugt wird K_2HPO_4 und/oder KH_2PO_4 verwendet. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht bei Verwendung von SDS im Lyse-Puffer ferner die Fällung von Proteinen in Form von Kaliumdodecylsulfat (KDS)-Protein-Komplexen aus dem Lyseansatz.

Erfindungsgemäß wird die Salz-Komponente so eingesetzt, dass sich in Verbindung mit einer der erfindungsgemäßen Polymer-Komponenten-Zusammensetzungen und -Konzentrationen ein 2-Phasensystem ausbildet, wobei jedoch die Konzentration der Salz-Komponente, bei der die Plasmid-DNA aus der Unterphase (Salzphase), in der sie sich bei niedrigeren Konzentrationen befindet, in die Oberphase (Polymer-Phase) wechselt, nicht überschritten wird und Kontaminanten wie RNA und gDNA in der Oberphase bzw. in der Interphase verbleiben. Es ist wohlbekannt, dass 2-Phasensysteme erst bei Überschreiten von Grenzkonzentrationen auftreten. Der Verlauf solcher Grenzkonzentrationen kann in einem Phasendiagramm dargestellt werden. Dies ist für den Fachmann leicht zu bewerkstelligen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Abreicherung der Kontaminante RNA >80% aus der Plasmid-DNA im Vergleich zur üblicherweise verwendeten Kaliumacetat-Fällung nach der Lyse der Biomasse,

besonders bevorzugt ist die Abreicherung der Kontaminante RNA >85% und ganz besonders bevorzugt ist die Abreicherung der Kontaminante RNA >90%.

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird das Kaliumphosphat vorzugsweise in Form eines Puffers zugeführt. Dabei enthält der Puffer besonders bevorzugt ein Gemisch aus K_2HPO_4 und KH_2PO_4 . Die erfindungsgemäßen Puffer werden mit einem pH-Wert im Bereich von pH 5,8 bis pH 8,5 und bevorzugt mit einem pH Wert im Bereich von pH 6,5 bis pH 8 eingesetzt. Beispielsweise ist eine Zusammensetzung 3,83 M K_2HPO_4 und 2,45 M KH_2PO_4 (es ergibt sich ein pH-Wert von ca. 7) im erfindungsgemäßen Verfahren besonders bevorzugt anwendbar. Dabei werden K_2HPO_4 und KH_2PO_4 bezogen auf das 2-Phasensystem in einer Gesamtkonzentration von 5 – 30 %(w/w) eingesetzt, vorzugsweise in einer Gesamtkonzentration von 10 - 25 %(w/w) und besonders bevorzugt in einer Gesamtkonzentration von 20 %(w/w). Die Zugabe des Kaliumphosphats erfolgt für gewöhnlich in einem Temperaturbereich zwischen eisgekühlt und Raumtemperatur. Raumtemperatur im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet einen Temperaturbereich von 18 bis 25 °C. Vorzugsweise wird im erfindungsgemäßen Verfahren ein eisgekühlter Phosphatpuffer eingesetzt. Eine lange Inkubationszeit ist vorteilhafterweise nach der Zugabe des Kaliumphosphats nicht erforderlich, entscheidend ist eine möglichst vollständige und gleichmäßige Durchmischung der Lösung nach der Zugabe. Üblicherweise beträgt die Inkubationsdauer etwa 5 bis 15 Minuten. Vorzugsweise wird der Ansatz, wie oben erwähnt, während und/oder nach der Zugabe der Salz-Komponente bewegt, wie z.B. stark geschüttelt, gerührt oder ähnliches.

25

Bei der Polymer-Komponente im Sinne der Erfindung handelt es sich um PEG. Ein weiteres wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von im rechnerischen Mittel 600 bis 1000 g/mol, vorzugsweise von im rechnerischen Mittel 700 - 900 g/mol und besonders bevorzugt von im rechnerischen Mittel 750 - 880 g/mol, als eine der beiden Komponenten des 2-Phasensystems eingesetzt wird. Das eingesetzte PEG besteht in der vorliegenden Erfindung vorzugsweise aus einem Gemisch aus Polyethylenglykol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 600 g/mol (PEG 600) und Polyethylenglykol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von

30

1000 g/mol (PEG 1000). Beide PEG sind kommerziell erhältlich (z.B. Fluka, Buchs, Schweiz). Das einsatzfertige PEG-Gemisch besteht dabei aus 30 – 50 %(w/w) PEG 600 und 50 – 70 %(w/w) PEG 1000, vorzugsweise 33 – 45 %(w/w) PEG 600 und 55 – 67 %(w/w) PEG 1000, besonders bevorzugt aus 36 – 40 %(w/w) PEG 600 und 60 – 64 %(w/w) PEG 1000 und ganz besonders bevorzugt aus 38 %(w/w) PEG 600 und 62 %(w/w) PEG 1000.

Die Konzentration des PEG im erfindungsgemäßen wässrigen 2-Phasensystem wird so gewählt, dass sich mit der Salz-Komponente zwei Phasen ausbilden, wobei jedoch die PEG-Konzentration, bei der die Plasmid-DNA aus der Unterphase, in der sie sich bei niedrigeren Konzentrationen befinden, in die Oberphase wechseln, nicht überschritten wird. Vorzugsweise beträgt der PEG-Gehalt aber mindestens 10 %(w/w) und wird nach oben begrenzt durch die Konzentration von PEG, bei der die Plasmid-DNA aus der Unterphase, in der sie sich bei niedrigeren Konzentrationen befinden, in die Oberphase wechseln. Nach der Zugabe von PEG sollte die Lösung vorzugsweise eine Temperatur von 10 bis 50 °C aufweisen, besonders bevorzugt eine Temperatur von 15 bis 40°C. Die Plasmid-DNA findet sich nach Ausbildung der Phasen, was je nach Volumen des Ansatzes einige Minuten bis Stunden in Anspruch nimmt, in der salzhaltigen Unterphase. Die Ausbildung der Phasen kann optional durch Zentrifugation des Ansatzes beschleunigt werden, wodurch es vorteilhafterweise zu einer weiteren zeitlichen Verkürzung des erfindungsgemäßen Verfahrens kommt. Die Bedingungen, unter welchen man einen solchen Zentrifugationsschritt durchführt, sind dem Fachmann geläufig.

Wässrige 2-Phasensysteme haben gegenüber Phasensystemen, die auf der Basis von Matrices oder anderen festen Phasen arbeiten, den Vorteil, dass sie eine weitaus höhere Kapazität für die aufzureinigende Plasmid-DNA, welche praktisch nur durch die Löslichkeit in den Phasen begrenzt ist, aufweisen. Weiterhin ist das Verfahren aufgrund extrem simpler Apparaturen nahezu beliebig dimensionierbar. Aber erst mit den hier beanspruchten Vereinfachungen können jedoch sowohl eine Automatisierung als auch unabhängig davon eine Produktion im industriellen Maßstab, beispielsweise zur Produktion von mehr als 2 g Plasmid-DNA pro Lyseansatz, leicht erreicht werden. Ebenso kann mit der vorliegenden Erfindung vorteilhafterweise die Plasmid-DNA in sehr hohem Maße von Proteinen, RNA und

gDNA befreit werden. Plasmid-DNA, welche nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert wird, kann nach einem weiteren Reinigungsschritt (beispielsweise über QIAGEN-Resin, QIAGEN, Hilden, Deutschland) problemlos in der Gentherapie oder der genetischen Vakzinierung eingesetzt werden. So können vorteilhafterweise große Mengen hochreiner Plasmid-DNA mit sehr geringem apparativen Aufwand unter Verwendung nicht-toxischer Substanzen und bei Anfall vergleichsweise geringer Kosten produziert werden. Hierzu sei erwähnt, dass die im erfindungsgemäßen 2-Phasensystem eingesetzten Substanzen z.B. im Vergleich zu anderen Isolierungsmethoden, wie z.B. CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation oder Phenolextraktion, jedoch unbedenklich sind und vollständig und leicht aus der aufgereinigten Plasmid-DNA entfernt werden können.

Einer der großen Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass es überraschenderweise zu einer Abreicherung von open circular Plasmid-DNA (ocDNA) aus der zu isolierenden Plasmid-DNA kommt. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierte Plasmid-DNA weist im Vergleich zu Plasmid-DNA, welche mit aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert wurde, einen kleineren Anteil der Kontaminante ocDNA auf im Vergleich zur bevorzugten supercoiled-Form (scDNA). Dieses Verfahren zeigt somit eine Selektivität zur Trennung von Plasmid-Topoisomeren, also von ocDNA und scDNA. Gerade diese Trennung der Plasmid-Topoisomere sowie die bereits erwähnte Abreicherung der gDNA sind besonders bei einer Isolierung von Plasmid-DNA im industriellen Maßstab und bei nachfolgender klinischer Verwendung der Plasmid-DNA bei einigen Applikationen von großer Bedeutung und mit den bisherigen Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA nicht in befriedigendem Maße zu erreichen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die die Plasmid-DNA enthaltende Unterphase entstehend in Schritt d) von der die Kontaminanten enthaltenden Oberphase getrennt. Darauf hin wird die Unterphase durch die Zugabe der Salz-Komponente in der Form, dass sich eine Konzentration der Salz-Komponente gemäß Schritt c) ergibt, und anschließend durch die Zugabe der Polymer-Komponente gemäß Schritt d) wieder zur Bildung eines 2-Phasensystems ausgerichtet. Bei dieser Wiederholung des letzten Teils des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach der Zugabe der Polymer-Komponente das

Gemisch nochmals durchmischt und die Phasenausbildung abgewartet. Die Plasmid-DNA findet sich auch hier in der Unterphase. Dieser Schritt kann optional einmal oder in einer dem Fachmann sinnvoll erscheinenden Anzahl durchgeführt werden. Die Durchführung dieses optionalen Schrittes führt zu einer wiederholten Reinigung der Plasmid-DNA und damit zu einer weiteren Abreicherung von Kontaminanten, wie z.B. RNA, aus der Plasmid-DNA. Der oder die zusätzliche(n) Reinigungsschritt(e) umfassen folgende Schritte:

e) die Trennung der Unterphase entstehend in Schritt d) von der in Schritt d) entstehenden und die Kontaminanten enthaltenden Oberphase,

f) Zusatz der Salz-Komponente in der Form, dass sich eine Konzentration der Salz-Komponente gemäß Schritt c) ergibt

g) erneuter Zusatz der Polymer-Komponente gemäß Schritt d),

h) durchmischen der Lösung, Phasenausbildung abwarten.

Im Anschluss an das erfindungsgemäße Verfahren muss die Plasmid-DNA noch aus der in Schritt d) entstehenden Unterphase gewonnen werden. Die Isolierung und Entsalzung der Plasmid-DNA aus der in Schritt d) entstehenden Unterphase erfolgt üblicherweise durch Ultrafiltration/Diafiltration. Es kann jedoch im Sinne der vorliegenden Erfindung auch jede weitere dem Fachmann sinnvoll erscheinende Methode zur Isolierung und/oder Entsalzung der Plasmid-DNA aus der Unterphase verwendet werden.

In einer alternativen Ausführungsform kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren auch anstelle der Biomasse als Ausgangsmaterial ein geklärtes Lysat, welches die zu isolierenden Plasmid-DNA enthält, eingesetzt werden. In dieser Ausführungsform der Erfindung entfällt naturgemäß der Lyse-Schritt bzw. findet nach dem Lyse-Schritt zusätzlich eine Klärung des Lysats statt. Alle dem Fachmann als geeignet erscheinenden Methoden können zur Herstellung eines geklärten Lysats angewendet werden. Eine im Stand der Technik übliche Methode ist die Klärung des

Lysats durch Fällung mit Kaliumacetat und anschließende Zentrifugation des Gemisches zur Abtrennung des entstehenden Präzipitats. Für diesen Fall wird das geklärte Lysat zunächst mit Kaliumphosphat entsprechend der oben gemachten Angaben versetzt und anschließend erfindungsgemäß mit PEG versetzt. Alle weiteren Schritte sind identisch zu dem erfindungsgemäßen Verfahren, in dem als Ausgangspunkt Biomasse eingesetzt wird. Wird der oben beschriebene Fällungsschritt zur Klärung des Lysats mit Kaliumphosphat durchgeführt, erfolgt die Zugabe von PEG wie beschrieben direkt zum geklärten Lysat. Alle weiteren Schritte sind identisch zu dem erfindungsgemäßen Verfahren, in dem als Ausgangspunkt Biomasse eingesetzt wird. Die Versuchsbedingungen, welche für eine Fällungsreaktion wie oben beschrieben sowohl bei Verwendung von Kaliumphosphat als auch bei Verwendung von Kaliumacetat erforderlich sind, sind dem Fachmann wohlbekannt.

15

Erläuterung der Abbildung

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der Isolierung von pCMV β aus *E.coli* DH5 α nach dem erfindungsgemäßen Verfahren (siehe Beispiel 1) in Form einer Gelelektrophorese (0,8% Agarose). In Spur 1 ist ein Längenstandard zu sehen, Spur 2 zeigt die unbehandelte Oberphase, in der sich massiv RNA findet. Plasmid-DNA konnte in der Oberphase nicht nachgewiesen werden. Spur 3 zeigt die unbehandelte Unterphase, in der sich das Plasmid stark angereichert findet (große unscharfe Bande), RNA konnte hier nicht nachgewiesen werden. Spur 4 zeigt die Unterphase nach Entsalzung mittels Ultrafiltration. Auch hier kann nur Plasmid-DNA nachgewiesen werden, größtenteils liegt das Plasmid in der gewünschten supercoiled-Form (scDNA) vor, Spuren von open circular Plasmid-DNA (ocDNA) konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Spur 5 zeigt einen pCMV β -Standard (18 μ g/ml) und Spur 6 zeigt einen gDNA-Standard (23 μ g/ml).

30

Beispiel 1: Gewinnung von pCMV β aus *E.coli* DH5 α

Zur Isolierung des Plasmids pCMV β wurden 0,6 g Biomasse aus einer Übernachtskultur von *E.coli* DH5 α (1 l LB-Medium: 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 85,6 mM NaCl) durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, 4°C) gewonnen. 6,9 ml des Resuspensions-Puffers P1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurden hinzugefügt und das Bakterienpellet durch kräftiges Schütteln bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach vollständiger Resuspension wurden 7,5 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) hinzugefügt und durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Nach 5 min wurde der gesamte Ansatz mit K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer (2,5 g KH₂PO₄, 5 g K₂HPO₄, 7,5 ml H₂O; pH 7; eisgekühlt) versetzt, vorsichtig invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde der gesamte Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt, PEG (2,137 g PEG 600, 3,488 g PEG 1000, 1,875 ml H₂O) wurde zugefügt und vorsichtig vermischt. Die Phasenseparation dauerte wenige Minuten.

In der Unterphase konnte mittels Gelelektrophorese keine gDNA und keine RNA nachgewiesen werden. Die Bande der Plasmid-DNA erscheint in der Abbildung 1 (Spur 3) untypisch groß und unscharf aufgrund der hohen Salzkonzentration in der Unterphase. Entsalzung der Unterphase mittels Ultrafiltration (Spur 4) führte zu einer entsprechend distinkten Bande, welche nahezu dem Plasmid-Standard entspricht (Spur 5). Genomische DNA und Proteine finden sich im Kaliumdodecylsulfat (KDS)-Flockulat und in der Interphase.

25

Beispiel 2: Gewinnung von pCMV β aus *E.coli* DH5 α (20% PEG; 12% Phosphat)

Zur Isolierung des Plasmids pCMV β wurde eine 10%ige (w/w) Biomassesuspension (*E.coli* DH5 α) in Resuspensions-Puffer P1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durch kräftiges Schütteln bei Raumtemperatur hergestellt. Nach vollständiger Resuspension wurden 10 g von diesem Ansatz mit 10 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) vermischt und mehrmals invertiert. Nach 5 min wurde der gesamte Ansatz mit K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer (2 g KH₂PO₄; 4 g K₂HPO₄; 6 ml H₂O; pH 7,4; eisgekühlt) versetzt, und 10 min auf einem

Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde der gesamte Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt, PEG (3,8 g PEG 600; 6,2 g PEG 1000; 8,003 ml H₂O) wurde zugefügt und weitere 10 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur vermischt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1300 x g wurde die
5 Phasenseparation beschleunigt. Die resultierende Unterphase hatte ein Volumen von etwa 15 ml.

Die Analytik erfolgte mittels HPLC (HP1090, Agilent, Waldbronn, Deutschland) und Source 15PHE 4.6/100 (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) unter Einsatz
10 eines (NH₄)₂SO₄-Gradienten. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm. Folgende Werte wurden für die Unterphase des 2-Phasensystems ermittelt: 44 µg/ml Plasmid-DNA und 123 µg/ml RNA.

Diese Werte wurden mit den Werten aus einem geklärten Lysat verglichen. Zur
15 Herstellung dieses geklärten Lysats wurde 1 ml der anfangs beschriebenen 10%igen Biomassesuspension mit 1 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) durch mehrmaliges Invertieren vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Neutralisationspuffer P3 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; eisgekühlt) zugegeben und 10 min auf einem
20 Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 1300 x g, Raumtemperatur) wurde die Plasmid- sowie die RNA-Konzentration im Überstand (geklärtes Lysat) mittels HPLC gemessen. Die eingesetzte Biomasse enthielt im geklärten Lysat 710 µg Plasmid-DNA pro g Biomasse sowie 11 mg RNA pro g Biomasse.

25

Bezogen auf die Ausgangswerte der Biomasse im geklärten Lysat ergeben sich für das 2-Phasensystem 93% Plasmid-Ausbeute und 83% RNA-Abreicherung.

30 Beispiel 3: Gewinnung von pCMVβ aus *E.coli* DH5α (13% PEG; 16% Phosphat)

Zur Isolierung des Plasmids pCMVβ wurde eine 10%ige (w/w) Biomassesuspension (*E.coli* DH5α) in Resuspensions-Puffer P1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durch kräftiges Schütteln bei Raumtemperatur hergestellt. Nach vollständiger

Resuspension wurden 10 g von diesem Ansatz mit 10 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) vermischt und mehrmals invertiert. Nach 5 min wurde der gesamte Ansatz mit K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer (2,666 g KH_2PO_4 ; 5,333 g K_2HPO_4 ; 8 ml H_2O ; pH 7,4; eisgekühlt) versetzt und 10 min auf einem
5 Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde der gesamte Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt, PEG (2,471 g PEG 600; 4,032 g PEG 1000; 7,498 ml H_2O) wurde zugefügt und weitere 10 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur vermischt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1300 x g wurde die Phasenseparation beschleunigt. Die resultierende Unterphase hatte ein Volumen von
10 etwa 25 ml.

Die Analytik erfolgte mittels HPLC (HP1090, Agilent, Waldbronn, Deutschland) und Source 15PHE 4.6/100 (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) unter Einsatz eines $(NH_4)_2SO_4$ -Gradienten. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei
15 260 nm. Folgende Werte wurden für die Unterphase des 2-Phasensystems ermittelt: 28,4 $\mu g/ml$ Plasmid-DNA und 187 $\mu g/ml$ RNA.

Diese Werte wurden mit den Werten aus einem geklärten Lysat verglichen. Zur Herstellung dieses geklärten Lysats wurde 1 ml der anfangs beschriebenen 10%igen
20 Biomassesuspension mit 1 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) durch mehrmaliges Invertieren vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Neutralisationspuffer P3 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; eisgekühlt) zugegeben und 10 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min,
25 1300 x g, Raumtemperatur) wurde die Plasmid- sowie die RNA-Konzentration im Überstand (geklärtes Lysat) mittels HPLC gemessen. Die eingesetzte Biomasse enthielt im geklärten Lysat 710 μg Plasmid-DNA pro g Biomasse sowie 11 mg RNA pro g Biomasse.

30 Bezogen auf die Ausgangswerte der Biomasse im geklärten Lysat ergeben sich für das 2-Phasensystem >99% Plasmid-Ausbeute und 58% RNA-Abreicherung.

Beispiel 4: Gewinnung von pCMV β aus *E.coli* DH5 α (30% PEG, 10% Phosphat)

Zur Isolierung des Plasmids pCMV β wurde eine 10%ige (w/w) Biomassesuspension (*E.coli* DH5 α) in Resuspensions-Puffer P1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durch
5 kräftiges Schütteln bei Raumtemperatur hergestellt. Nach vollständiger Resuspension wurden 10 g von diesem Ansatz mit 10 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) vermischt und mehrmals invertiert. Nach 5 min wurde der gesamte Ansatz mit K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer (1,666 g KH₂PO₄; 3,333 g K₂HPO₄; 5 ml H₂O; pH 7,4; eisgekühlt) versetzt und 10 min auf einem
10 Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde der gesamte Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt, PEG (5,7 g PEG 600; 9,3 g PEG 1000; 5 ml H₂O) wurde zugefügt und in einem Wasserbad bei 40°C für 15 min und unter mehrmaligem Invertieren temperiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1300 x g wurde die Phasenseparation beschleunigt. Die resultierende Unterphase hatte ein
15 Volumen von etwa 11 ml.

Die Analytik erfolgte mittels HPLC (HP1090, Agilent, Waldbronn, Deutschland) und Source 15PHE 4.6/100 (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) unter Einsatz eines (NH₄)₂SO₄-Gradienten. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei
20 260 nm. Folgende Werte wurden für die Unterphase ermittelt: 61,8 μ g/ml Plasmid-DNA und 173 μ g/ml RNA.

Diese Werte wurden mit den Werten aus einem geklärten Lysat verglichen. Zur Herstellung dieses geklärten Lysats wurde 1 ml der anfangs beschriebenen 10%igen
25 Biomassesuspension mit 1 ml Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) durch mehrmaliges Invertieren vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Neutralisationspuffer P3 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; eisgekühlt) zugegeben und 10 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min,
30 1300 x g, Raumtemperatur) wurde die Plasmid- sowie die RNA-Konzentration im Überstand (geklärtes Lysat) mittels HPLC gemessen. Die eingesetzte Biomasse enthielt im geklärten Lysat 710 μ g Plasmid-DNA pro g Biomasse sowie 11 mg RNA pro g Biomasse.

Bezogen auf die Ausgangswerte der Biomasse im geklärten Lysat ergeben sich für das 2-Phasensystem 96% Plasmid-Ausbeute und 83% RNA-Abreicherung.

5 Beispiel 5: Abreicherung von gDNA

Durch Einwiegen von 4 g Resuspensions-Puffer P1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) und 1 g Biomasse (*E.coli* DH5 α , kein Plasmid enthaltend) wurde eine 20%ige Biomassesuspension hergestellt. Diese wurde mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, mit Konverter Typ 102, Einstellungen: Cylce 40%; Intensität 4, 2 mal 3 min) auf Eis aufgeschlossen. Die gDNA wurde hierdurch aus der Zelle freigesetzt und stark geschert bzw. fragmentiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. 300 μ g vom Überstand wurden mit 300 μ l Lyse-Puffer P2 (QIAGEN, Hilden, Deutschland; Raumtemperatur) versetzt und vermischt. Nach 5 min wurde der gesamte Ansatz mit K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer (100 μ g KH₂PO₄; 200 μ g K₂HPO₄; 300 μ l H₂O; pH 7,4; eisgekühlt) vermischt, und 10 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde der gesamte Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt, PEG (85,5 μ g PEG 600; 139,5 μ g PEG 1000; 75 μ l H₂O) wurde zugefügt und weitere 10 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur vermischt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1300 x g wurde die Phasenseparation beschleunigt. Die Unterphase hatte ein Volumen von etwa 0.75 ml.

Die Analytik erfolgte mittels HPLC (HP1090, Agilent, Waldbronn, Deutschland) und Source 15PHE 4.6/100 (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) unter Einsatz eines (NH₄)₂SO₄-Gradienten. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm. Die gDNA-Konzentration im Aufschlussüberstand (Zentrifugation nach Ultraschall-Behandlung) wurde mit 433 μ g gDNA/ml bestimmt. In der Unterphase des 2-Phasensystems wurde mittels HPLC eine Restkonzentration von 1,7 μ g gDNA/ml ermittelt, was einer Abreicherung von >99% stark gescherter gDNA entspricht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Biomasse mittels eines wässrigen 2-Phasensystems mit einer Polymer- und einer Salz-Komponente, dadurch gekennzeichnet, dass die Resuspension der eingesetzten Biomasse, die alkalische Lyse der Biomasse, die Neutralisation des alkalischen Lyseansatzes und die Trennung der Plasmid-DNA von den Kontaminanten in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt wird, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Resuspension der Biomasse,
- b) Zugabe von Lyse-Puffer, Inkubation für einen zur Lyse der Biomasse ausreichend langen Zeitraum,
- c) Zugabe der Salz-Komponente, Inkubation für einen ausreichend langen Zeitraum,
- d) Zugabe der Polymer-Komponente, durchmischen der Lösung, Phasenausbildung abwarten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Polymer-Komponente des wässrigen 2-Phasensystems Polyethylenglykol (PEG) verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das eingesetzte PEG ein Molekulargewicht von im rechnerischen Mittel 600 bis 1000 g/mol, vorzugsweise von im rechnerischen Mittel 700 - 900 g/mol und besonders bevorzugt von im rechnerischen Mittel 750 - 880 g/mol, aufweist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das eingesetzte PEG eine Mischung aus 30 – 50 %(w/w) PEG mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 600 g/mol (PEG 600) und 50 – 70 %(w/w) PEG mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 1000 g/mol (PEG 1000),
5 vorzugsweise aus 33 – 45 %(w/w) PEG 600 und 55 – 67 %(w/w) PEG 1000, besonders bevorzugt aus 36 – 40 %(w/w) PEG 600 und 60 – 64 %(w/w) PEG 1000 und ganz besonders bevorzugt aus 38 %(w/w) PEG 600 und 62 %(w/w) PEG 1000 darstellt.
- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des PEG so gewählt wird, dass sie mindestens so hoch ist, dass sich mit der Salz-Komponente des 2-Phasensystems zwei Phasen ausbilden, und maximal so hoch ist, dass die Konzentration, bei der die Plasmid-DNA aus der Unterphase in die Oberphase wechselt, nicht
15 überschritten wird und Kontaminanten wie RNA und gDNA in der Oberphase bzw. in der Interphase verbleiben.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt von PEG mindestens 10 %(w/w) und maximal so hoch ist, dass die Konzentration,
20 bei der die Plasmid-DNA aus der Unterphase in die Oberphase wechselt, nicht überschritten wird und Kontaminanten wie RNA und gDNA in der Oberphase bzw. in der Interphase verbleiben.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Salz-Komponente Trikaliumphosphat (K_3PO_4), Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) und/oder Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), bevorzugt K_2HPO_4
25 und/oder KH_2PO_4 , verwendet werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Salz-Komponente in Form einer Pufferlösung zugeführt wird, vorzugsweise als
30 K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer.

- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Salz-Komponente so gewählt wird, dass sie mindestens so hoch ist, dass sich mit der Polymer-Komponente des 2-Phasensystems zwei Phasen ausbilden, und maximal so hoch ist, dass die Konzentration der Salz-Komponente, bei der die Plasmid-DNA aus der Unterphase in die Oberphase wechselt, nicht überschritten wird und Kontaminanten wie RNA und gDNA in der Oberphase bzw. in der Interphase verbleiben.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass K_2HPO_4 und/oder KH_2PO_4 in einer Gesamt-Konzentration von 5 – 30 % (w/w), bevorzugt in einer Gesamt-Konzentration von 10 - 25 % (w/w) und besonders bevorzugt in einer Gesamt-Konzentration von 20 % (w/w) eingesetzt werden.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Puffersystem der Salz-Komponente einen pH-Wert im Bereich von pH 5,8 bis pH 8,5 und bevorzugt einen pH-Wert im Bereich von pH 6,5 bis pH 8 aufweist.
- 20 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zur Neutralisation des alkalischen Lyseansatzes K_3PO_4 , K_2HPO_4 und/oder KH_2PO_4 , vorzugsweise ausschließlich die Salz-Komponente(n) des wässrigen 2-Phasensystems, eingesetzt werden.
- 25 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die zu isolierende Plasmid-DNA Plasmide, Cosmide, Phasmide sowie eukaryotische Vektoren umfasst.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotischen Vektoren Hefe-Vektoren sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die eingesetzte Biomasse alle Lebensformen umfasst, die fähig sind, die Plasmid-DNA zu tragen und zu vermehren bzw. auf ihre Nachfahren weiterzugeben, bevorzugt handelt es sich um Bakterien und/oder Hefen.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die eingesetzte Biomasse mittels einer alkalischen Lyse, bevorzugt mit einem Puffer enthaltend Natriumdodecylsulfat (SDS), in an sich bekannter Weise aufgeschlossen wird.

5

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Biomasse unter Bewegung des Lyseansatzes lysiert wird.

10

18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass anstelle der Biomasse ein geklärtes Lysat als Ausgangsmaterial verwendet wird.

15

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterphase entstehend in Schritt d) aus Anspruch 1 zusätzlich mindestens einmal von Kontaminanten gereinigt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die zusätzliche(n) Reinigungsschritt(e) umfassen:

20

e) die Trennung der Unterphase entstehend in Schritt d) aus Anspruch 1 von der in Schritt d) aus Anspruch 1 entstehenden und die Kontaminanten enthaltenden Oberphase,

25

f) Zusatz der Salz-Komponente in der Form, dass sich eine Konzentration der Salz-Komponente gemäß Schritt c) aus Anspruch 1 ergibt

30

g) erneuter Zusatz der Polymer-Komponente gemäß Schritt d) aus Anspruch 1,

h) durchmischen der Lösung, Phasenausbildung abwarten.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierung und Entsalzung der Plasmid-DNA aus der Unterphase, entstehend in Schritt d) aus Anspruch 1, durch Ultrafiltration/Diafiltration erfolgt.

5

22. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausbildung der Phasen in Schritt d) aus Anspruch 1 durch Zentrifugation des Ansatzes beschleunigt wird.

10

23. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aus Schritt c) aus Anspruch 1 während und/oder nach der Zugabe der Salz-Komponente bewegt wird.

15

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren in einem automatisierten Prozess eingesetzt wird.

20

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass Plasmid-DNA im industriellen Maßstab, vorzugsweise zur Produktion einer Menge von mehr als 2 g Plasmid-DNA pro Lyseansatz, hergestellt wird.

25

26. Plasmid-DNA, dadurch gekennzeichnet, dass diese mittels eines Verfahrens gemäß der Ansprüche 1 bis 25 isoliert wurde.

27. Verwendung der Plasmid-DNA gemäß Anspruch 26 in der Gentherapie oder in der genetischen Vakzinierung.

30

28. Kit zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 25
enthaltend die Komponenten:

a) PEG und/oder

5

b) Kaliumphosphat-Puffer und/oder

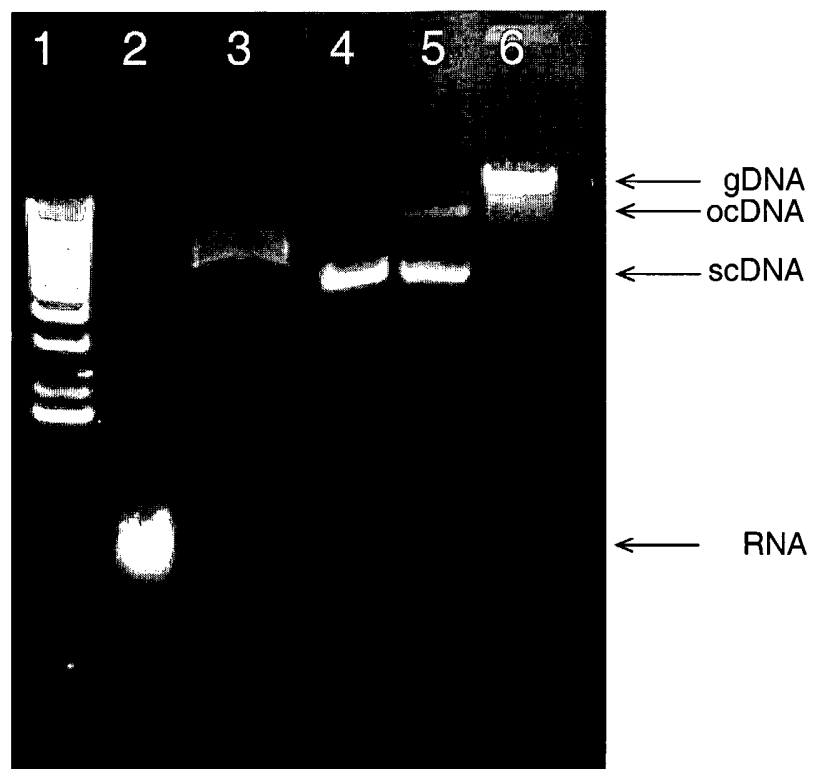
c) Alkalischer Lyse-Puffer und/oder

10

d) Resuspensions-Puffer.

15

Abbildung 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/005799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/10

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)
IPC 7 C12N

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 practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLE K D: "PURIFICATION OF PLASMID AND HIGH MOLECULAR MASS DNA USING PEG-SALT TWO-PHASE EXTRACTION" BIOTECHNIQUES, NATICK, MA, US, vol. 11, no. 1, 1 July 1991 (1991-07-01), page 18,20,22,24, XP002049728 cited in the application page 18, left-hand column, paragraph 2 - middle column, paragraph 1; table 1 page 20, right-hand column, paragraph 2 page 22, middle column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 page 24, middle column, paragraph 1 ----- -/--	1-3,5,6, 12-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2004

Date of mailing of the international search report

12/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weiland, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/005799

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RIBEIRO S C ET AL: "Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 78, no. 4, 20 May 2002 (2002-05-20), pages 376-384, XP002962664 ISSN: 0006-3592 cited in the application abstract; table I page 380, left-hand column, paragraph 4 page 383, left-hand column, paragraph 3-6 -----	18,19, 24-28
X	GB 2 333 526 A (ADVANCED BIOTECH LTD) 28 July 1999 (1999-07-28)	26
A	page 5, paragraph 4 page 6, paragraph 3 - page 7, paragraph 2; examples 1-5 -----	1-25,27, 28
A	PRAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 169-174, XP004162836 ISSN: 0167-7799 page 172, right-hand column, paragraphs 3,4; figure 2 -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/005799

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **27**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 27 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/005799

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2333526	A	28-07-1999	NONE

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/005799

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	COLE K D: "PURIFICATION OF PLASMID AND HIGH MOLECULAR MASS DNA USING PEG-SALT TWO-PHASE EXTRACTION" BIOTECHNIQUES, NATICK, MA, US, Bd. 11, Nr. 1, 1. Juli 1991 (1991-07-01), Seite 18,20,22,24, XP002049728 in der Anmeldung erwähnt Seite 18, linke Spalte, Absatz 2 - mittlere Spalte, Absatz 1; Tabelle 1 Seite 20, rechte Spalte, Absatz 2 Seite 22, mittlere Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 1 Seite 24, mittlere Spalte, Absatz 1 ----- -/--	1-3,5,6, 12-28



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. September 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/10/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Weiland, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RIBEIRO S C ET AL: "Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING - COMBINATORIAL CHEMISTRY, WILEY, NEW YORK, NY, US, Bd. 78, Nr. 4, 20. Mai 2002 (2002-05-20), Seiten 376-384, XP002962664 ISSN: 0006-3592 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Tabelle I Seite 380, linke Spalte, Absatz 4 Seite 383, linke Spalte, Absatz 3-6 -----	18,19, 24-28
X	GB 2 333 526 A (ADVANCED BIOTECH LTD) 28. Juli 1999 (1999-07-28)	26
A	Seite 5, Absatz 4 Seite 6, Absatz 3 - Seite 7, Absatz 2; Beispiele 1-5 -----	1-25,27, 28
A	PRAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 169-174, XP004162836 ISSN: 0167-7799 Seite 172, rechte Spalte, Absätze 3,4; Abbildung 2 -----	1-28

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 27
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl der Anspruch 27 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/005799

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2333526	A	28-07-1999	KEINE