

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3905132号

(P3905132)

(45) 発行日 平成19年4月18日(2007.4.18)

(24) 登録日 平成19年1月19日(2007.1.19)

(51) Int. Cl.

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数 10 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平10-508130	(73) 特許権者	バイカル インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成9年8月5日(1997.8.5)		アメリカ合衆国, 9 2 1 2 1 カリフォル
(65) 公表番号	特表2000-515385(P2000-515385A)		ニア, サン ディエゴ, スイート 100
(43) 公表日	平成12年11月21日(2000.11.21)		, タウン センター ドライブ 9373
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/013647	(74) 代理人	弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W01998/005767		弁理士 石田 敬
(87) 国際公開日	平成10年2月12日(1998.2.12)	(74) 代理人	弁理士 古賀 哲次
審査請求日	平成16年7月29日(2004.7.29)		弁理士 中村 和広
(31) 優先権主張番号	08/692,590	(74) 代理人	弁理士 西山 雅也
(32) 優先日	平成8年8月6日(1996.8.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PEG存在下でのカラムクロマトグラフィーを使用するプラスミドDNAの精製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プラスミドDNAを含む微生物細胞から当該プラスミドDNAを精製する方法であって、以下のステップ：

- (a) 細胞溶解産物を調製し；
- (b) 細胞破片から上記プラスミドDNAを回収し；
- (c) 凝集剤を含むバッファー中に上記プラスミドDNAを再懸濁させ；
- (d) 上記プラスミドを含む上記バッファーを、当該バッファーで平衡にしたクロマトグラフィー・マトリックスに適用することを含むクロマトグラフィーを行って、上記プラスミドを精製し；

ここで、上記マトリックスは、イオン交換クロマトグラフィー・マトリックス、ケイズ排除クロマトグラフィー・マトリックス、クロマトフォーカシング・マトリックス、アフィニティー・クロマトグラフィー・マトリックス、疎水性相互作用クロマトグラフィー・マトリックス、及び逆相クロマトグラフィー・マトリックスから成る群から選ばれる、を含む、前記方法。

【請求項2】

前記クロマトグラフィー・マトリックスが陰イオン交換クロマトグラフィー・マトリックスである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記溶解産物が、希釈塩基及び洗剤を用いて調製される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記溶解産物が、珪藻土によるろ過により清澄化される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記クロマトグラフィーに先立って、プラスミド DNA を、前記清澄化された溶解産物から沈澱させる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記凝集剤が、ポリエチレン・グリコールである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリエチレン・グリコールが、0.1% (W/V) ~ 4% (W/V) の量で添加される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ポリエチレン・グリコールが、約 1% (W/V) の量で添加される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリエチレン・グリコールが、7,000 ~ 9,000 の平均分子量を有する、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリエチレン・グリコールが、PEG - 8000 である、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の技術分野

本願発明はカラムクロマトグラフィー中でプラスミド DNA を精製する方法、特に遺伝子治療及び遺伝子免疫化における医薬品等級としての使用に適したプラスミド DNA を大規模的に処理する方法に関するものである。

発明の背景

微生物細胞からプラスミド DNA を分離する従来技術は小規模レベル又は実験室レベルの調製に対してのみ適したものである。広く使用されている技術の一つは、プラスミドを含む微生物細胞のアルカリ細胞溶解及び酢酸中性化を含み、これにより宿主ゲノム DNA 及びタンパク質は沈澱させられ、遠心により取り除かれる。残ったプラスミド DNA はエタノールで沈澱され、塩化セシウム/エチジウムブロミド (CsCl/EtBr) 密度勾配遠心かけられる。エチジウムブロミドはプラスミド DNA をスーパーコイル状、直鎖状及びニックのある環状形状のものに分け、そして所望する形状のものが回収される。残余のエチジウムブロミドはブタノールによる抽出で除かれ、DNA はエタノールにより沈澱される。宿主細胞タンパク質はフェノールによる抽出の繰り返しにより取り除かれ、次に DNA の沈澱そしてイソアミルアルコール/クロロホルムによる抽出の繰り返しによりフェノールは取り除かれる。プラスミド DNA の分離及び精製に使用されるこれらの一般的な実験法は製造方法には適していない。まして、これらの方法は遺伝子治療又は遺伝子免疫化における医薬品等級としての使用に適したプラスミド DNA の生産には適していない。密度勾配遠心は規模を拡張できないし、エチジウムブロミドは突然変異原であると知られており、フェノールは有害な化学物質であり、この方法は労働集約的である。

組換えプラスミド DNA を大規模的に精製する最近の努力はポリエチレングリコール (PEG) を使用した示差沈澱、そしてイオン交換及び/又はサイズ排除クロマトグラフィーに向けられている。Hornら、Hum.Gene.Ther., 6:565-573, 1995; PCT出願 No. W095/21250。この方法を使用したプラスミド DNA の収率は一般的に約 50% である。PCT出願 No. W096/02658 は細菌細胞の溶解、陰イオン交換クロマトグラフィー及び逆相 HPLC を含む大規模なプラスミド DNA の精製を開示している。DE 4 3 2 1 9 0 4 A 1 はカオトロピックの塩の存在下または 1 M 以上の塩濃度を有する溶液の存在下で、シリカまたはガラスクロマトグラフィーを使用して核酸混合物を分離する方法を教示している。しかし、プラスミド DNA のクロマトグラフィーによる精製の主な問題は、所望の生産物が鋭い

10

20

30

40

50

ピークではなく、広い尾を引いたスミアとして抽出され、そして通過物中に現れることであり、従って溶解成分からの分離が妨げられる。

ポリエチレングリコール (P E G)、三価陽イオン (例えば、ヘキサミンコバルト (I I I)、スペルミジン)、アルコール及びポリビニルピロリジンを含む多くの試薬は、D N A 分子が伸張したコイル状から緻密な球状に凝集するのを促進させる。吉川ら、J. Am. Chem. Soc., 118:929-930, 1996; 皆川ら Biopolymers, 34:555-558, 1994; アルスコットら Biopolymers, 30:619-630, 1990 及び ラーマンら Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68:1886-1890, 1971。ポリエチレングリコールの D N A 分子を凝集させる能力は、6 . 0 M で転移点になり (吉川ら)、1 . 9 - 1 0 . 0 M P E G 濃度 (皆川ら) で起こるようである。すなわち、低い P E G 濃度では、D N A 分子は伸張したコイル状態で存在し、高い P E G 濃度では D N A 分子は小さな球状の状態に縮んでいる (皆川ら)。

カラムクロマトグラフィー中でプラスミド D N A を精製する方法へのニーズは存在する。遺伝子治療及び遺伝子免疫化における医薬やワクチンに使用されるのに十分精製されたプラスミド D N A が大規模な量で必要性なことから、このニーズは、特に緊急である。

発明の概要

本願発明の一つの態様は、カラムクロマトグラフィーを使用して生物学的混合物からプラスミド D N A を精製する改良方法であり、

この混合物にポリエチレングリコールを加える工程、及び、

この混合物からこの D N A をクロマトグラフィーにより分離する工程、

を含む改良方法である。

好ましくは、このポリエチレングリコールは約 0 . 1 から約 4 % (w / v) の間の量、更に好ましくはポリエチレングリコールは約 1 % (w / v) の量で加えられる。この好ましい態様の一つの特徴は、ポリエチレングリコールは約 7 , 0 0 0 から約 9 , 0 0 0 の平均分子量を有しており、もう一つの特徴は、P E G が P E G - 8 0 0 0 である。この態様は更に分離する工程が陰イオン交換クロマトグラフィーであることを含む。

本願発明は宿主細胞不純物からプラスミド D N A を精製する方法において、

このプラスミド D N A と宿主細胞夾雑物を含む溶液に、カラムクロマトグラフィー中に宿主細胞不純物からプラスミド D N A を分離させるのに十分量のポリエチレングリコールを加える工程、及び、

カラムクロマトグラフィーを行い、これによりプラスミド D N A が宿主細胞不純物から精製されるようにする工程、

を含む方法も更に提供する。

好ましくは、ポリエチレングリコールの量は、約 0 . 1 から約 4 % (w / v) の間の量、更に好ましくはポリエチレングリコールは約 1 % (w / v) の量で加えられる。この好ましい態様の一つの特徴によれば、ポリエチレングリコールは約 7 , 0 0 0 から約 9 , 0 0 0 の平均分子量を有しており、もう一つの特徴によれば、P E G は P E G - 8 0 0 0 である。この態様は更にこのカラムクロマトグラフィーが陰イオン交換クロマトグラフィーであることを提供する。

本願発明のもう一つの態様は細胞溶解物の夾雑物からプラスミド D N A を精製する方法において、

このプラスミド D N A と分解夾雑物を含む溶液に、この D N A を凝集させるのに十分量の D N A 凝集剤を加える工程、及び、

この凝集剤を含む溶液をクロマトグラフィーカラムに通過させ、これによりこの溶解夾雑物からこのプラスミド D N A を精製する工程、

を含む方法である。

好適には、凝集剤はポリエチレングリコール、好ましくは約 7 , 0 0 0 から約 9 , 0 0 0 の平均分子量を有しているもの、更に好ましくは P E G - 8 0 0 0 である。好ましくは、ポリエチレングリコールの量は約 0 . 1 から約 4 % (w / v) の間の量、更に好ましくは、この量は約 1 % (w / v) である。この態様は、クロマトグラフィーカラムが陰イオン交換クロマトグラフィーカラムであることを含む。

好適な態様の詳細な説明

本願発明はカラムクロマトグラフィー中にプラスミドDNAを精製する方法を提供することである。短鎖重合アルコール、好ましくはポリエチレングリコール、またはもう一つのDNA凝集剤はカラムクロマトグラフィーにかける前にDNAサンプルに加えられる。短鎖重合アルコール又は凝集剤はプラスミドDNAの分離を改善し、大規模な精製に、特に医薬品等級としてのプラスミドDNAの製造に使用できるかもしれない。

宿主細胞の夾雑物からクロマトグラフィーによりプラスミドDNAを精製する際の大きな問題点は、所望の生産物がはっきりしたピークというよりむしろ広がった不純物として抽出され、そして通過物に現れることであり、従ってこれらの夾雑物からプラスミドDNAの分離を妨げることである。本願発明の方法はこの問題を解決する。ポリエチレングリコール(PEG)のような短鎖重合アルコールまたはもう一つのDNA凝集剤の存在で、プラスミドDNAははっきりしたピークになって抽出され、そして、通過物には現れず、従って精製を促進させ、収率を増加させる。

特別な理論により制限されることなく、クロマトグラフィーカラムへのプラスミドDNAの均一な結合は、DNA分子が伸張したコイル状態から緻密な球状態に凝集したことから起こるのかもしれない。プラスミドDNAはスーパーコイル状、直鎖状及びニックを持つ環状形状の混合物で存在する。イオン交換カラムにDNAサンプルを供することにより、多種類のプラスミドDNAは、異質な形態でそして異なった相対結合係数でクロマトグラフィーマトリックスへ結合するものと見ることができる。伸張したコイルの緻密は球状への収縮は、より均質な形態でそして類似の結合係数で陰イオン交換マトリックスへ結合するのを増大させる原因であるかもしれない。多種類のDNA凝集剤は、本願のクロマトグラフィーの方法によりプラスミドDNAの精製を促進させるものとして、従って予期することができる。

ポリエチレングリコールの存在下でクロマトグラフィーカラムへのプラスミドDNAの結合の増大を説明するであろうもう一つの理論は、配座型への疎水性相互作用の貢献である。多種類の試薬により疎水性相互作用が崩されることで、DNA分子はより均質な形態でそして類似の結合係数でクロマトグラフィーマトリックスへ結合するのを促進させる配座型になると想定することができるかもしれない。疎水性相互作用を媒介する化学試薬も本願発明で有用なものとして当然想定することができる。

ポリエチレングリコールのような短鎖重合アルコール及びプラスミドDNAを精製の目的のために均質なものとして機能させる他のDNA凝集剤の使用は、イオン交換クロマトグラフィーに限定されるものではない。これはサイズ排除クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、アフィニティークロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーを含む他のクロマトグラフィー方法に拡張できる。確かに、この方法は、例えばダイアフィルトレーション、ウルトラフィルトレーション及びる過一般の他の精製方法にも広く拡張でき、多様なプラスミドDNA種を一種類のものとして機能させることにより、RNA、タンパク質及び他の夾雑物からのプラスミドDNAの分離は促進される。

本願発明の方法は、プラスミドDNAの高い生産物回収率を含む多くの利点を提供することができる。これらの方法を使用するDNAの収率はクロマトグラフィー工程に対して少なくとも90%である。更に、この発明は、人への使用に十分な精製純度のプラスミドDNAを大規模な量で生産するのに適用可能である。

プラスミドDNAは一般的に微生物の発酵物の構成成分から分離される。酵母細胞及び細菌細胞を含む多種多様な微生物細胞が、本願発明の方法の使用に適していることは当業者には明かである。好ましい微生物発酵は細菌発酵である。好ましい細菌発酵は大腸菌発酵である。微生物発酵物は使用される細菌の成長に適するいかなる液体培地中でも生育させることができる。

本願発明の方法により精製されるDNAプラスミドはいかなる染色体外DNAであってもよい。プラスミドは実質的にいかなる大きさ又は性質であってもよいということは当業者には明かである。これらのプラスミドは高コピー数、低コピー数のもの又は制御できない

10

20

30

40

50

プラスミドであってもよい。これらは、選択できる遺伝子、ポリリンカー、複製開始点、プロモーター、エンハンサー、リーダー配列、ポリアデニル化部位及び終結配列を含む遺伝子要素の領域を含む。プラスミドは基本的にはいかなる起源の人の遺伝子及び動物のものを含むことができる。

プラスミドDNAを含む微生物細胞は発酵培養液から最初に収集され、細胞ペーストを生じさせる。液体培養液から細胞を収集するいかなる従来方法も適用できる。そのような方法は遠心、ろ過及び沈殿法を含む。

次は、細胞溶解である。典型的には、細胞は緩衝液中に懸濁される。我々は細胞壁を弱くするいかなる酵素処理も奨励しない。これは、使用しなければならない動物の酵素はこれらの方法により生産されるプラスミドDNAの受容者に感染する動物ウイルスを保持する

10

かもしれないからである。細胞破片及び他の不純物は遠心、ろ過、沈殿のような標準的な方法により次に取り除かれる。我々は珪藻土でろ過することにより結果として生じる上清の不純物を取り除く。珪藻土によるろ過もこの上清に関して宿主RNAの濃度を減少させる。

この後、プラスミドDNAは適当な条件下で沈殿剤を使用して不純物を取り除いた上清から沈殿させ、収集されそして緩衝液中に再懸濁させることができる。次に、我々は、プラスミドDNAを妨害するものとして宿主RNA、タンパク質及びリポ多糖をこの目的に好適な条件下で沈殿剤により沈殿させる。最後に、ろ過物は収集され、そしてプラスミドDNAはこれらの好適な条件下で沈殿試薬を使用することにより再度沈殿される。次に、カラムクロマトグラフィーである。

20

DNAペレットはカラムクロマトグラフィーに先立ちカラム緩衝液中に再懸濁させる。この緩衝液はポリエチレングリコールまたはもう一つのDNA凝集剤を、単独でまたは組み合わせで含む。典型的には、DNA溶液中のPEGの濃度は約0.1から約4% (w/v)、好ましくは約1% (w/v)である。もし、PEGの濃度が0.1% (w/v)以下の場合、プラスミドDNAの結合の増加は起こらない。もしPEG濃度が4% (w/v)以上の場合、DNAは溶液から沈殿しはじめる。PEG-8000に対しては、約0.1%から約4%の範囲は、 1.7×10^{-4} Mから 6.7×10^{-3} Mのモル濃度に対応する。プラスミドDNAはDNAサンプルと同様の緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラムに供された。多種多様な入手可能な陰イオン交換マトリックスは、POROS陰イオンレンジ、Qiagen、Toso Hass、Sterogene、Spherodex、Nucleopac及びファルマシアから得られるもの

30

を含むが、これらに限定されず、本願発明に使用するのに適している、このカラムはベッド容量の数倍の緩衝液で洗浄される。通過するピークは実質的にプラスミドを含まず、このことはカラムマトリックスにほとんど完全にDNAが結合していることを示す。これとは反対に、ポリエチレングリコールを含まない緩衝液を使用するときはプラスミドDNAは通過する部分に存在する。

プラスミドDNAはポリエチレングリコールを含む緩衝液中で1段階の塩溶出によりカラムから溶出される。カラムフラクションはアガロースゲル電気泳動によりプラスミドDNAが分析される。プラスミドDNAを含むフラクションはプールされ、沈殿させられ、再懸濁させられ、そして更なる処理のためゲルろ過カラムに供される。最後にカラムで精製されたDNAは究極的最終的な組成、無菌フィル、最終品に調製される。

40

イオン交換カラムから溶出されたプロファイルは異なるDNA調製物に対応する。この成功は下記の実施例4に示す大規模なDNAの調製に拡張することができる。こうように、DNA凝集剤がカラム緩衝液中に存在する場合に、再現可能なクロマトグラフィーによる精製が達成される。

本願方法において多くのDNA凝集剤を使用することは予期できる。そのような試薬は、炭素を1~4個有する短鎖重合アルコール(例えばポリエチレングリコール)、3価の陽イオン(例えばヘキサミンコバルト(III)、スペルミジン)、短鎖アルコール(例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール)及び他のポリマー(例えばポリビニルピロリドン)を含むが、これに限定させるものではない。平均分子量が7,000~9,000であるポリエチレングリコールが好ましく、そして平均分子量が8,000であるポ

50

リエチレングリコール、PEG-8000が本願発明で使用するのに特に好ましいが、他の平均分子量を有するポリエチレングリコールも更に予期できる。これらは例えば、PEG-200、PEG-500、PEG-1000、PEG-8000及びPEG-10,000を含む。ここで述べる方法で使用する特定のDNA凝集剤の好ましい選択及び量は、例えば、実施例1~5の述べる実験を行い、そしてコントロール試験を行う一方で、試験変数に科学的方法論を適用することにより、当該技術分野の当業者によって容易に決定することができる。

プラスミドDNAは、以下の実施例で述べるように細菌細胞溶解及びカラムクロマトグラフィーにより分離された。

実施例 1

10

小規模な細菌細胞溶解及びプラスミドの回収

大腸菌細胞を含むVCL-1005G/A、約50グラムを使用した。プラスミドDNA(VCL-1005G/A)はpBR322プラスミドに由来した。これは約5,000bpの大きさであった。これはカナマイシン耐性タンパク質(Tn903)をコードする遺伝子を発現した。これは、HLA-B7と呼ばれるクラス1の主要組織適合性遺伝子複合体のH鎖(ヒトHLA-B7 cDNA)及びL鎖(チンパンジー - 2 ミクログロブリン cDNA)タンパク質もコードした。これらの2つのタンパク質は、バイシストロニック mRNAで発現された。このmRNAの真核細胞転写は3'ロングターミナルリピート(LTR)由来のラウス肉腫瘍ウイルスプロモーター配列及びウシ成長ホルモン遺伝子由来の転写終結/ポリアデニル化シグナル配列に依存した。H鎖の真核細胞発現は5'キャップ依存性タンパク質翻訳開始部位より調節された。L鎖の発現は、脳心筋炎ウイルス由来のキャップ非依存性翻訳エンハンサー(CITE)配列によって調節された。細菌細胞におけるこのプラスミドの複製は細菌性複製開始点の存在下で調節された。プラスミドDNAを含む細胞は61mMグルコース、50mM EDTAを含む10mM Tris-HCl、pH8.0、300ml中に懸濁した。溶解は1%SDSを含む0.2N NaOH、600mlを添加し、そして8分間インキュベートした後に生じた。細胞破片は3M酢酸カリウム、pH5.0、450mlにより沈殿させ、そして8分間インキュベートした。溶解物中に残る細胞破片はセライト ハイフロ スーパーセル(Celite Hyflo Super cel, flux calcined, Celite Corp., Lompoc, CA) 130gを加えることで取り除かれ、そして真空下でブフナーフィルター(Buchner filter)中でセライト プレコー

20

30

ト A/Eフィルター ディスク(Celite pre-coated A/E filter disk, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)を通過させた。ろ過物はワットマン#4フィルターカップ(Whatman#4 filter cup)で微粒子を取り除き、そして1.6M NaCl中に30%PEGを最終的に8%PEG濃度となるよう加えることにより、プラスミドDNAを沈殿させた。このサンプルは4-8 で一晩攪拌された。プラスミドDNAは6,000xgで40分間遠心することにより集めた。このペレットは10分間乾燥され、50mlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、pH8.0、1mM EDTA)に懸濁させた。同量の5M酢酸アンモニウムをサンプルに加え、そして氷上で15分間インキュベートした。サンプルは2,000xgで30分間遠心された。上清中のプラスミドDNAは0.6容量の-20 のイソプロパノールを加えることで沈殿させた。-20 で2時間インキュベートした後、サンプルは2,000xgで30分間遠心された。DNAペレットは10分間乾燥され、0.15M NaClを含むTE、30ml中に懸濁された。

40

プラスミドDNAはPEGの存在及び不存在の両方で、下記に述べるように陰イオン交換クロマトグラフィーに供された。

実施例 2

陰イオン交換クロマトグラフィー

実施例1に従って調製した30mlのプラスミドDNAを2つに分けた。そのサンプルの一つに固体のPEG-8000で最終濃度で1%(w/v)となるように加えた。PEG-8000は他の15mlのサンプルには加えなかった。Q-セファロース(登録商標)

50

ファーストフロー (Fast Flow)陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (ファルマシア、Piscataway, NJ) (5.0 X 5.0cm)はファルマシア バイオパイロット (登録商標) システムを使用して圧力充填された。このカラムは、PEG-8000を含む緩衝液A (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.7 M NaCl, 1 mM EDTA) または緩衝液Aで平衡化された。各15 mlのアリコートはそれぞれこのバイオパイロット スーパーレープにかけられた。PEGを含むサンプルをかけた後、4倍のベット容量のPEGを含む緩衝液Aで洗浄した。コントロールサンプル (PEGなし) がかけられた後、4倍のベット容量の緩衝液Aで洗浄した。通過ピークを集め、アガロースゲルでの分析のため保存した。このDNAはその後、PEGを含むDNAサンプルに対してPEG-8000を含む100%緩衝液B (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) を、コントロールDNAサンプルに対しては緩衝液B (PEGなし) を、4ベット容量用いてカラムから溶出した。50 mlのフラクションを得た。通過物及び緩衝液Bで洗浄後に溶出したフラクションの両方はエチジウムブロミドの存在下、0.8%アガロースゲル電気泳動により分析した。結果は1%PEGの存在下で、ほぼすべてのDNAサンプルがカラム上に保持され、実質的に通過物中にDNAは存在しないことを示した。これに対して、PEG-8000の不存在では、カラムからプラスミドDNAがかなり漏出し、そこではプラスミドDNAは多様な夾雑物とともに通過物中に溶出され、DNAの完全な結合は得られていないことを示した。PEG-8000の存在により、プラスミドDNAの回収率を20%と少ないものから一般的には80%まで改善した。

大規模なプラスミドの精製は以下に述べるように行った。

10

20

実施3

大規模な細菌細胞溶解及びプラスミドの回収

細胞含む500gのVCL-1005G/Aを8ガロンのASME 316Tで溶解した。細胞は、61 mM グルコース、50 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl、3 L中に懸濁した。1% SDSを含む0.2 N NaOH、6 Lを加え、そして8分間インキュベートした後、溶解が起こった。細胞破片は3 M 酢酸カリウム、pH 5.0、4.5 Lを使用し、そして8分間インキュベートすることにより沈殿させた。溶解中の細胞破片は675gのセライト ハイフロ スーパーセル (Celite Hyflo Super cell, flux calcined) を加え、そして7 cell SP50 カートリッジ (CUNO, Inc., Meriden, CT) を含む Cuno 8ZP1P316T ステンレス カートリッジ ホルダーを加圧下で通過させた。不純物を取り除いた溶解物は濃縮され、そして、6 FT² PTQK TFFカートリッジ (Millipore Corp., Bedford, MA) を使用して緩衝液の交換を行った。701 S ポンプ (Watson Marlow, Inc., Wilmington, MA) は4 L/minの流速で使用した (チューブは3/8" ID Masterflex Pharmed)。6倍容量に減少させ、そして2容量の1 mM EDTAを含む10 mM Tris、pH 8.0でダイアフィルトレーションを行った。

30

プラスミドDNAは、1.6 M NaCl中で、4で一晩、ゆっくり攪拌しつつ、30% PEG-8000を最終濃度で8%と成るように加えることにより、不純物を除いた溶解物から沈殿させた。プラスミドDNAは、Jouan KR4 22遠心器を使用して、6,000 x gで40分間遠心することにより集めた。ペレット化したプラスミドDNAを400 ml TE中に懸濁し、そして等量の5 M 酢酸アンモニウムを加えた。この溶液は完全に混合し、氷上で15分間インキュベートし、そして6,000 x gで20分間遠心した。プラスミドDNAは、-20の最上級の2-プロパノール (Fisher)、0.6倍容量を加えることにより、上清から沈殿させた。-20で最低2時間インキュベートした後、沈殿したDNAは、Jouan KR4 22遠心器を使用して6,000 x gで20分間で、ペレット化した。このペレットは1% PEG-8000を含む緩衝液A、300 ml中に再懸濁された。260 nmの吸光度により決定される最終的なプラスミド濃度は約4 mg/mlであり、核酸の全量は1.3 gであった。

40

プラスミドDNAは下記に述べるように陰イオン交換クロマトグラフィーに供された。

実施例4

陰イオン交換クロマトグラフィー

50

ファルマシア B P E 1 0 0 / 5 0 0 カラムは、製造業者の指示に従いファルマシア バイオパイロット (登録商標) システムを使用して圧力充填された。最終的なカラムの大きさは $10 \times 13 \text{ cm}$ であり、ベット容量は約 $1,000 \text{ ml}$ であった。このカラムは $1\% \text{ PEG-8000}$ を含む緩衝液 A を 4 容量用いて 35 ml/min の流速で平衡化した。実施例 3 に従って調製された部分的に精製されたプラスミド DNA は、 $0.45 \mu\text{m}$ 滅菌アクロディスク シリンジ フィルター (sterile Acrodisc syringe filter, Gelman Sciences) を通し、バイオパイロット スーパーチューブをかけた。サンプルをカラムにかけた後、3 倍ベット容量の緩衝液 A で洗浄した。通過したピークは 2 L のローラーボトル (roller bottle) に集め、ゲル分析用に保存した。この DNA は次に、追加的な 2 倍のベット容量に対して、 $1\% \text{ PEG-8000}$ を含む 100% 緩衝液 B を 2 倍のベット容量を用いてカラムから溶出させた。フラクション (45 ml) は 100% 緩衝液 B へのステップの後に集められた。クロマトグラフィーの後に、カラムは 1 カラム容量の 2 M NaCl で洗浄され、そして 2 カラム容量の 1 M NaOH で洗浄された。フラクションと通過物は、 0.8% アガロースゲルによる電気泳動により分析され、プラスミド DNA を含むフラクションはプールされ、そして 0.6 容量の冷却 2 - プロパノールで沈殿された。実施例 2 で得られた結果と同様に、通過物には基本的にプラスミド DNA は存在しなかった。プラスミド DNA は塩勾配 (緩衝液 B) の工程の適用後にのみ溶出された。 $1\% \text{ PEG-8000}$ の存在下で陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られたプラスミド DNA は下記に述べるようにゲルろ過クロマトグラフィーにより更に精製された。

10

実施例 5

20

ゲルろ過クロマトグラフィー

ファルマシア B P E 1 0 0 / 9 5 0 ゲルろ過カラムは SEPHACRYL (登録商標) S-1000 バイオパイロット システムを使用して圧力充填された。最終的なカラムの大きさは、 $10 \times 85 \text{ cm}$ であり、ベット容量は約 6.5 L であった。実施例 4 からイソプロパノールで沈殿させたプラスミド DNA は、 $6,000 \times \text{g}$ で 20 分間遠心することにより集められ、 10 mM Tris 、 $\text{pH} 8.0$ 、 150 mM NaCl 、 1 mM EDTA に懸濁させ、 $0.22 \mu\text{m}$ 滅菌酢酸セルロース アクロディスク シリンジ フィルター (sterile cellulose acetate Acrodisc syringe filter) を通過させた。この DNA をカラムにかけた。このカラムのランニング緩衝液は 10 mM Tris 、 $\text{pH} 8.0$ 、 150 mM NaCl 、 1 mM EDTA であり、流速は 8 ml/min であった。フラクション (45 ml) は集められ、 0.8% アガロースゲル電気泳動により分析された。大部分がスーパーコイルである DNA を含むフラクションはプールされ、2 倍容量の冷エタノールにより沈殿された。

30

本願発明は詳細な説明に記載したこれらの態様のみ限定されるものではないことを注意すべきである。本願発明の精神を含むいかなる態様もこの範囲内にあるものと考慮すべきである。しかしながら、この発明は下記の請求の範囲によってのみ限定される。

フロントページの続き

- (72)発明者 ホーン, ナンシー
アメリカ合衆国, 9 2 1 2 6 カリフォルニア, サン ディエゴ, ハーダー ドライブ 1 1 5 4
5
- (72)発明者 ブダハジ, グレグ
アメリカ合衆国, 9 2 1 0 9 カリフォルニア, サン ディエゴ, ベイサイド レーン 3 2 6 8
エー
- (72)発明者 マークェット, マグダ
アメリカ合衆国, 9 2 0 3 7 カリフォルニア, ラ ホラ, アベニーダ デ ラス オンダス
8 5 4 0

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 特表平8 - 5 0 1 3 2 1 (J P , A)
特表平9 - 5 0 9 3 1 3 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12N 15/00 - 90
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed
Science Direct