



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 945 T2** 2008.02.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 335 926 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 945.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB01/05114**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 997 500.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/042317**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.11.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **30.05.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.08.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C07H 1/08** (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0028361 21.11.2000 GB

(73) Patentinhaber:

Glaxo Group Ltd., Greenford, Middlesex, GB

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**CHARLTON, Henry, Beckenham, Kent BR3 3BS,
GB; EON-DUVAL, Alex, Beckenham, Kent BR3
3BS, GB; MacDUFF, Robert, Beckenham, Kent
BR3 3BS, GB**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ABTRENnung VON EXTRACHROMOSOMALER DNS AUS EINER ZELLSUSPENSION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung extra-chromosomaler DNA von anderen zellulären Bestandteilen, z.B. RNA, genomischer DNA, Proteinen und Endotoxinen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von extra-chromosomaler DNA in pharmazeutischer Qualität, ohne die extra-chromosomale DNA einem RNA-Verdau auszusetzen. Die Erfindung betrifft ebenfalls extra-chromosomale DNA, die durch das Verfahren hergestellt wird, und Pharmazeutika, die aus solch einer extrachromosomalen DNA abgeleitet sind, z.B. DNA-Impfstoffe oder Gentherapieprodukte. Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum Erzeugen extrachromosomaler DNA mit hohem Reinheitsgrad und in guten Ausbeuten.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Extra-chromosomale DNA, wie z.B. Plasmid-DNA, gewinnt selbst an zunehmender Bedeutung als ein Biopharmazeutikum. Als eine Konsequenz besteht der Bedarf, große Mengen solch einer extra-chromosomalen DNA mit hohem Reinheitsgrad und in guten Ausbeuten zu erzeugen.

[0003] Reinigungsschemata, die die Verwendung großer Mengen an entzündbaren organischen Lösungsmitteln (z.B. Ethanol und Isopropanol) und toxische Chemikalien (z.B. Ethidiumbromid, Phenol und Chloroform) einschließen, oder Techniken, wie z.B. Ultrazentrifugation und "Spinsäulen", solange für die Erzeugung kleiner Mengen an Untersuchungsmaterial angemessen, sind im allgemeinen nicht geeignet zur Erzeugung von Quantitäten an benötigtem Material für biopharmazeutische Anwendungen.

[0004] Zusätzlich schließen viele der gegenwärtigen Plasmid-Aufreinigungsverfahren die Zugabe von RNasen, typischerweise von bovinem Ursprung, ein. Materialien, die aus bovinen Quellen stammen, sind aufgrund von Bedenken hinsichtlich boviner spongiformer Enzephalopathien (BSE's) zunehmend unerwünscht in der Herstellung von Pharmazeutika.

[0005] Im allgemeinen können Plasmid-Aufreinigungsverfahren zwei verschiedene Arbeitsgänge umfassen: Einen ersten Arbeitsgang, der die Freisetzung der Plasmid-DNA von deren Zellen einschließt, um ein Lysat zu bilden; und einen zweiten Arbeitsgang, der das Trennen und Aufreinigen der Plasmid-DNA von den anderen zellulären Bestandteilen des Lysats einschließt.

[0006] Der am häufigsten vorkommende Weg für die Implementierung des ersten Arbeitsgangs (siehe [Fig. 1a](#)) ist das Freisetzen der Plasmid-DNA durch entweder:

- i) Aufkochen; oder
- ii) Verwenden einer durch alkalischen pH und Detergenz vermittelten Solubilisierung der bakteriellen Zellmembranen.

[0007] Der zweite Arbeitsgang (siehe [Fig. 1b](#)) schließt typischerweise einen Klärungsschritt ein, bei dem unlösliche Partikel, wie z.B. Zelltrümmer, entfernt werden, gefolgt von einer Vielzahl an Aufreinigungs- und Polierschritten, bei denen z.B. lösliche zelluläre Komponenten, wie z.B. genomische DNA, RNA, Proteine und Endotoxine, entfernt werden. Daher kann eine typische Aufreinigung eine Kombination aus verschiedenen Aufreinigungsschritten umfassen, wie z.B.:

Ultrazentrifugation über einen Cäsiumchlorid-Gradienten; selektive Präzipitation; Säulenchromatographie, z.B. Ionenaustausch-Chromatographie; und Zweiphasentrennung.

[0008] Eine Technik, die für das Aufreinigen von DNA verwendet wird, ist die Tangentfluss-Ultrafiltration. PCT/US97/13494 lehrt das Aufreinigen einer Nukleinsäure aus einer Lösung, das das Filtrieren der Lösung durch eine Ultrafiltrationseinheit umfasst, die eine Gelschicht umfasst, um eine Permeatlösung und eine Retentatlösung bereitzustellen. Die Nukleinsäure wird in der Retentatlösung zurückgehalten. Um die RNA zu entfernen, wird das Lysat zuerst mit RNase behandelt, um diese in eine Größe zu verdauen, die das Erreichen einer Auftrennung durch z.B. Ionenaustauschchromatographie erlaubt.

[0009] Die Verfahrensbedingungen schließen im Speziellen folgende ein:

1. Die Verwendung eines Tris-HCl-Diafiltrationspuffers mit einem pH von 8,5, jedoch mit unspezifischer Konzentration. Da das Retentat jedoch auf eine Chromatographiesäule geladen wird, die mit einem Anio-

nen austauschchromatographie-Säulenmaterial gepackt ist, kann angenommen werden, dass der Diafiltrationspuffer eine typische Salzkonzentration von 10 bis 50 mS hat. Dies wird durch die Anmerkung unterstützt, dass, wo eine DNA mit einem flüssigen Träger zur Verwendung in der Gentherapie zu komplexieren ist, es wünschenswert ist, die DNA in einen niedrigleitenden Puffer, vorzugsweise durch Diafiltration, auszutauschen. Ein niedrigleitender Puffer schließt jeden Puffer ein, der weniger als 10 mS hat, vorzugsweise weniger als 1 mS;

2. Die Verwendung von ungefähr 50 Volumenaustauschungen eines Diafiltrationspuffers;
3. die Verwendung einer open-channel-Kassette mit einer Porengröße von 300 K; und
4. eine Plasmidbeladung von 100 mg an Nukleinsäure/ft² einer Membran. Dieses Verfahren leidet unter dem Nachteil, dass RNase notwendig ist, um die RNA zu verdauen, damit die RNA von der Plasmid-DNA getrennt werden kann.

[0010] Vor kurzem hat Kahn et al, Biotechnology and Engineering, Band 60, Nr. 1, 05. Juli 2000, ein Tangentialflussverfahren zur Plasmidaufreinigung offenbart, das die Verwendung von RNase vermeidet. Um jedoch die RNA zu entfernen, mussten sie zuerst diese unter Verwendung einer verlängerten alkalischen Lyse, die 24 Stunden dauerte, verdauen.

[0011] Es gibt zwei prinzipielle Nachteile für dieses Verfahren:

1. Zum Einen ist die Gesamtzeit, um das Verfahren durchzuführen, signifikant verlängert und ist daher ein potenzieller Geschwindigkeits-begrenzender Schritt; und
2. zum Zweiten läuft die verlängerte Lyse Gefahr, die extra-chromosomale DNA selbst zu beschädigen.

[0012] Dem Schriftstück zufolge, wurde die Plasmid-DNA durch Tangentialfluss unter den folgenden Bedingungen hergestellt:

1. der Puffer war ein 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,6;
2. das Verfahren verwendete 8 bis 10 Volumenaustauschungen des Diafiltrationspuffers;
3. die Membran hatte eine Porengröße von entweder 500 oder 1.000 K; und
4. die Plasmid-Beladungen waren 10 bis 15 g an Zellen/0,5 ft² der Membran. (Ungefähr 16 mg an Plasmid/ft²).

[0013] Weitere anzumerkende Punkte schließen die Tatsache ein, dass die Plasmidgröße von zwischen 5,6 Kb und 7,9 Kb für eine Membran mit einer Porengröße von 500 KDa variierte und 10,0 Kb für eine Membran mit einer Porengröße von 1.000 KDa war.

[0014] In beiden Verfahren ist es notwendig, zuerst die RNA zu verdauen, damit diese von der extra-chromosomalen DNA durch Tangentialfluss-Ultrafiltration getrennt werden kann.

[0015] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Trennen der DNA von RNA ohne RNase bereitzustellen, wobei das Verfahren einfach ist, schnell skalierbar ist und nicht die Nachteile hat, die mit dem Verfahren von Kahn et al. assoziiert sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0016] Der Anmelder hat festgestellt, dass eine DNA, die substanziell frei an RNA ist, z.B. eine extra-chromosomale DNA, einfach und in einer leicht skalierbaren Weise unter Verwendung einer Tangentialfluss-Ultrafiltration durch vorsichtiges Kontrollieren einer oder mehrerer der Betriebsbedingungen erhalten werden kann.

[0017] Solange die besten Resultate durch die sorgfältige Kontrolle einer Anzahl an Betriebsbedingungen erhältlich sind, sollte verstanden werden, dass die Optimierung jeder einzelnen oder mehrerer der Betriebsbedingungen ein signifikantes Entfernen der RNA bereitstellen kann, und konsequenterweise wird jede optimierte Bedingung unabhängig als auch in Kombination mit einer oder mehreren der anderen Betriebsbedingungen beansprucht.

[0018] Daher hat der Anmelder festgestellt, dass im Gegensatz zu dem, was von den Fachleuten vorgeschlagen wird, es möglich ist, durch sorgfältiges Kontrollieren einer oder mehrerer der Betriebsbedingungen des Ultrafiltrationsverfahrens, extrachromosomale DNA von RNA zu trennen, ohne zuerst die RNA durch entweder Behandlung mit RNase oder durch Durchführen einer verlängerten Lyse verdaut zu haben.

[0019] Diese schließen ohne Einschränkung die folgenden ein:

1. Auswählen des Puffers auf der Basis seiner Ionenstärke, dessen Ionenstärke durch Bezug auf seine Leit-

fähigkeit definiert sein kann;

2. Bereitstellen ausreichender Volumenaustauschungen des Diafiltrationspuffers, um die RNA durch die Membran zu waschen;
3. Auswählen einer angemessenen Membran mit einer angemessenen Porengröße zum Aufreinigen der extrachromosomalen DNA;
4. Auswählen eines angemessenen Transmembrandrucks; und
5. Kontrollieren der Beladungen.

[0020] Insbesondere durch das Optimieren sowohl der Ionenstärke als auch durch Bereitstellen ausreichender Volumenaustauschungen des Diafiltrationspuffers, und besonders bevorzugt durch das zusätzliche Auswählen einer angemessenen Membran mit einer angemessenen Porengröße zum Aufreinigen der extrachromosomalen DNA, ist es möglich, eine substantielle Entfernung der RNA zu bewirken, ohne den Bedarf an entweder eines RNase-Verdau oder einer verlängerten Lyse.

[0021] Des weiteren kann als eine Konsequenz des Verfahrens die Anzahl oder Komplexität der notwendigen Schritte, um ein erwünschtes Niveau der Aufreinigung zu erreichen, reduziert werden. Diese Reduzierung in der Anzahl oder Komplexität der Aufreinigungsschritte ist eindeutig vorteilhaft, da es die Verfahrenszeiten, Kosten und Plasmidverluste reduziert.

[0022] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird hier ein Verfahren zum Auftrennen extra-chromosomaler DNA von RNA, ohne die RNA zuvor zu verdauen, bereitgestellt, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

- i) Lysieren von Zellen, die die extra-chromosomale DNA umfassen, um ein Lysat zu bilden;
- ii) Klären des Lysats; und
- iii) Unterziehen des geklärten Lysats einer Tangentialfluss-Ultrafiltration unter Bedingungen, die es erlauben, dass eine substantielle Menge der in dem Lysat vorliegenden RNA durch eine Membran passiert, während der überwiegende Teil der extra-chromosomalen DNA zurückgehalten wird.

[0023] Unter substantieller Menge ist größer als 50 %, besonders bevorzugt größer als 90 %, darüber hinaus besonders bevorzugt sogar größer als 95 % und darüber hinaus am meisten bevorzugt sogar größer als 98 % gemeint.

[0024] Das signifikante Entfernen der RNA, das mit dem Ultrafiltrationsschritt erreicht wurde, bedeutet, dass extrachromosomale DNA von pharmazeutischer Qualität mit nicht mehr als einem einzelnen weiteren Aufreinigungs- oder Polierschritt erhalten werden kann.

[0025] Ein oder mehrere zusätzliche Aufreinigungs- oder Polierschritte können entweder vor und/oder nach dem Ultrafiltrationsschritt durchgeführt werden. Der/die Schritt(e) kann/können eingesetzt werden, um zusätzliche RNA oder andere zelluläre Komponenten, wie z.B. Endotoxine, Proteine und genomische DNA, zu entfernen. Es wird natürlich einzusehen sein, dass ein Großteil dieser anderen zellulären Bestandteile ebenfalls durch das Ultrafiltrationsverfahren entfernt werden. In einer Ausführungsform ([Fig. 1b](#), Weg A) folgt dem Tangentialfluss-Ultrafiltrationsschritt ein Chromatographieschritt, wie z.B. Hydroxylapatit-Schritt, der entworfen wurde, um speziell RNA mit hohem Molekulargewicht zu entfernen. Unter RNA mit hohem Molekulargewicht ist RNA mit einem Molekulargewicht gemeint, das an das der extrachromosomalen DNA heranreicht, von der es getrennt wird.

[0026] In noch einer anderen Ausführungsform ([Fig. 1b](#), Weg B) wird ein zusätzlicher RNA-Entfernungsschritt nach dem Ultrafiltrationsschritt durchgeführt. Vorzugsweise ist dieser ein Calciumchlorid-Präzipitationsschritt, der entworfen wurde, um speziell RNA mit hohem Molekulargewicht zu entfernen.

[0027] Der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt kann von einem weiteren Ultrafiltrationsschritt und/oder einem Entsalzungsschritt und/oder einem Reverse-Phase-Chromatographieschritt gefolgt werden, die wiederum von einem Chromatographieschritt, wie z.B. Ionenaustausch- oder Hydroxylapatit-Chromatographieschritt, gefolgt werden können.

[0028] In noch einer weiteren Ausführungsform ([Fig. 1b](#), Weg C) folgt ein RNA-Entfernungsschritt, z.B. ein Calciumchlorid-Präzipitationsschritt, dem Ultrafiltrationsschritt. In dieser Ausführungsform kann der Ultrafiltrationsschritt, der dem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt vorausgeht, von einem Chromatographieschritt, wie z.B. einem Ionenaustausch- oder einem Hydroxylapatit-Schritt, gefolgt werden.

[0029] Die Verwendung eines anti-chaotrophen Salzes, wie z.B. Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Kaliumcitrat, Calciumchlorid, Ammoniumacetat oder Kaliumacetat, jedoch insbesondere Calciumchlorid, kann die Wahl der Membran für die Ultrafiltration beeinflussen.

[0030] Die Bedingungen, die zu einer substanziellen Entfernung der RNA führen, schließen die folgenden ein:

1. Das Auswählen eines Puffers, der eine niedrige Ionenstärke hat. Diese Auswahl hat sich als kritisch im Maximieren der RNA-Entfernung erwiesen. Je niedriger die Ionenstärke, desto größer das Entfernen der RNA. Unter niedriger Ionenstärke ist im Allgemeinen eine Leitfähigkeit von weniger als 10 mS, besonders bevorzugt weniger als 5 mS, darüber hinaus besonders bevorzugt sogar weniger als 2 mS und am meisten bevorzugt weniger als 1 mS gemeint. Der bevorzugte Puffer ist ein Tris-HCl-Puffer oder ein Natriumphosphatpuffer, wobei andere Puffer geeignet sein können, die im pH-Bereich 6 bis 10 funktionieren. Beispiele für weitere solche Puffer schließen folgende ein: Natriumcarbonat/CO₂; Imidazol; 2,4,6-Trimethylpyridin; MOPS; Natriumdiethylbarbiturat; N-Ethylmorpholin; HEPES; TRICIN; EPPS; 2-Amino-2-methyl-1,3-Propanediol; BICIN; Natriumborat und Glycin. Der bevorzugte pH ist zwischen ungefähr 7,5 und 8,5.
2. Die Verwendung einer ausreichenden Anzahl von Volumenaustauschungen während der Diafiltration, um sicherzustellen, dass die RNA durch die Membran gewaschen wird. Vorzugsweise gibt es mindestens 20 Volumenaustauschungen, besonders bevorzugt mindestens 30 Volumenaustauschungen, darüber hinaus besonders bevorzugt sogar mindestens 40 Volumenaustauschungen und am meisten bevorzugt 50 oder mehr Volumenaustauschungen, z.B. zwischen 50 und 100.
3. Die Auswahl einer geeigneten Membran. Vorzugsweise wird eine Polyethersulfonmembran mit einer Porengröße von 300 KDa bis 500 KDa ausgewählt, obwohl andere geeignete Membranen, einschließlich Celluloseacetat, Polysulfon, Polyvinyliden, Polypropylen, Polyamid, modifiziertes PES, Polyvinylidinyrrolidin, Polyvinylidinfuorid (PVDF), Cellulosenitrat und Cellulosetriacetat, verwendet werden können.

[0031] Die Auswahl der Porengröße ist wichtig, da Plasmid durch die Membran verloren gehen wird, wenn eine zu große Porengröße ausgewählt wird, und die RNA nicht in der Lage sein wird, durch die Membran zu passieren, wenn die Porengröße zu klein ausgewählt wird. Daher könnte in Wirklichkeit die Porengröße von 50 KDa bis 1.000 KDa, typischerweise von 100 KDa bis 1.000 KDa, reichen, abhängig davon, ob die extra-chromosomale DNA besonders groß oder klein war. Daher hängt die eigentliche Auswahl von der Plasmidgröße und den Betriebsbedingungen ab.

[0032] Überraschenderweise, wenn Calciumchlorid verwendet wird, wurde es für notwendig erachtet, eine Membran mit einer kleineren Porengröße zu verwenden als solch eine, die normalerweise für ein Plasmid der gegebenen Größe vorhergesagt werden würde.

[0033] Eine Membran mit einer Porengröße von 100 K hat bewiesen besonders effektiv für Plasmide von 5,9 kbp und 7,7 kbp zu sein.

4. Der anfängliche Transmembrandruck (TMP) wurde ebenfalls als signifikant in dem Erreichen von guten Plasmidausbeuten erachtet. Vorzugsweise ist der anfängliche TMP weniger als 10 psi, besonders bevorzugt sogar weniger als 8 psi, darüber hinaus besonders bevorzugt sogar weniger als 6 psi, und am meisten bevorzugt ungefähr 5 psi. Es wird bevorzugt, diesen bei oder unterhalb 15 psi zu belassen, besonders bevorzugt bei oder unterhalb von 10 psi.
5. Plasmidbeladungen wurden ebenfalls dahingehend erachtet, dass diese einen signifikanten Effekt auf die Ausbeute haben und es wird bevorzugt, dass die Beladungen an den unteren Enden der folgenden Bereiche liegen:
Für eine 300K-Membran reicht die Gesamt-Nukleinsäure-Beladung von 200 bis 1.000 mg/ft² (10 bis 50 mg Plasmid/ft²). Daher sind die bevorzugten Beladungen für eine 300K-Membran weniger als 30 mg Plasmid/ft², besonders bevorzugt weniger als 20 mg Plasmid/ft².

[0034] Für eine 500K-Membran reichen die Gesamt-Nukleinsäure-Beladungen von 1.000 bis 3.000 mg/ft² (50 bis 150 mg Plasmid/ft²). Daher sind die bevorzugten Beladungen für eine 500K-Membran weniger als 100 mg Plasmid/ft², vorzugsweise weniger als 75 mg Plasmid/ft².

[0035] Beladungsmengen schienen weniger signifikant auf die 100K-Membran in Gegenwart von Calciumchlorid zu sein.

[0036] In den Experimenten, die zu den obigen Beobachtungen 1 bis 3 führten, wurde ein TMP im Allgemeinen zwischen 10 und 20 psi gehalten und eine Kreuzflussrate wurde im allgemeinen zwischen 0,5 bis 1,0 1/min/ft² gehalten. Die Kombination ergab eine Permeat-Fluxrate von zwischen 16 und 26 1/h/m². Wie oben unter 4 angemerkt, wurden verbesserte Plasmidausbeuten für einen niedrigen TMP festgestellt.

[0037] Bisher hat man es als notwendig erachtet, die Membran zu polarisieren (durch Rezirkulieren der Permeatleitung für einen Zeitraum, der ausreichend ist, eine Gelschicht zu bilden), um die Plasmidausbeuten zu maximieren, jedoch wurde dies in einem RNase-freien Verfahren unerwarteterweise als unnötig befunden, insbesondere für einen ersten Arbeitsgang mit Ultrafiltrationsschritt UF1.

[0038] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird hier ein Verfahren zum Erzeugen extra-chromosomaler DNA in hoher Reinheit und in guten Ausbeuten in einem Tangentialfluss-Ultrafiltrationsverfahren bereitgestellt, wobei das Verfahren einen Screen umfasst, der entworfen wurde, um eine Turbulenz in einem Retentatkanal eines Ultrafiltrationsapparates zu erzeugen.

[0039] Während Calciumchlorid-Präzipitation ein einfacher und effektiver Weg ist, um RNA- und genomische DNA-Verunreinigungen von Plasmidlösungen zu entfernen, führt die Gegenwart von Calciumchlorid zu Verlusten von Plasmid, wenn die Plasmidlösung durch Tangentialfluss-Ultrafiltration aufkonzentriert oder diafiltriert wird.

[0040] Man geht davon aus, dass Calciumchlorid das Plasmid verdichtet, was zu Verlusten durch die Ultrafiltrationsmembran führt.

[0041] Durch Entfernen des Calciumchlorids (und ebenfalls der RNA) unter Verwendung einer geeigneten Matrix und eines Mittels zur Ionenpaarung, wurde ein nachfolgender Reverse-Phase-Chromatographieschritt befunden, eine besonders effektive Trennung (gute Reinheit und hohe Plasmidausbeuten) bereitzustellen.

[0042] Gemäß einem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird hier ein Verfahren zum Erzeugen extra-chromosomaler DNA in hoher Reinheit in guten Ausbeuten in einem Aufreinigungsverfahren bereitgestellt, das einen Calciumchlorid-Präzipitationsschritt umfasst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Reverse-Phase-Säulenchromatographieschritt dem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt folgt.

[0043] Durch Einsetzen eines Reverse-Phasen-Chromatographieschritts nach dem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt kann das Verfahren auf einen einzigen Nach-Calciumchloridschritt reduziert werden.

[0044] Gemäß einem vierten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Aufreinigen der DNA von anderen zellulären Bestandteilen bereitgestellt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die DNA unter Verwendung einer Hydroxylapatit-Chromatographie bei einem pH von 7,3 bis 8,3 getrennt wird.

[0045] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine aufgereinigte extra-chromosomale DNA; eine pharmazeutische Zusammensetzung, ein DNA-Impfstoff oder Gentherapieprodukt, die durch ein Verfahren einer jeden der beanspruchten Erfindungen erhältlich sind, bereitgestellt.

[0046] Gemäß noch einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine aufgereinigte extra-chromosomale DNA bereitgestellt, die folgendes umfasst:

weniger als 0,13 Gew.% Protein, wenn mit einem BCA-Kit getestet;
weniger als 0,11 Gew.% genomischer DNA, wenn mit einem Q-PCR-Verfahren getestet;
weniger als 5 EU/mg Endotoxin, wenn mit einem LAL-Test getestet; und
weniger als 1,0 Gew.% rückständige RNA, wenn mit einem HPLC-Test getestet.

[0047] Die Erfindungen werden nun beispielhaft durch Bezug auf die folgende detaillierte Beschreibung und Beispiele beschrieben:

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0048] [Fig. 1a](#) ist eine schematische Darstellung der Verfahrensschritte, die am Erhalt eines Lysats beteiligt sind;

[0049] [Fig. 1b](#) ist eine schematische Darstellung, die drei alternative Wege aufzeigt, wie extra-chromosomale DNA von pharmazeutischer Güte unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens erhältlich ist;

[0050] [Fig. 2a](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 1;

[0051] [Fig. 2b](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Diafiltrationspermeats aus Beispiel 1;

- [0052] [Fig. 2c](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung aus Beispiel 1;
- [0053] [Fig. 3a](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 2, das gegen den 500 mM Puffer, pH 7,5, diafiltriert werden soll;
- [0054] [Fig. 3b](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung aus Beispiel 2, die durch den 500 mM Puffer, pH 7,5, erhalten wird;
- [0055] [Fig. 3c](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 2, das gegen den 100 mM Puffer, pH 7,5, diafiltriert werden soll;
- [0056] [Fig. 3d](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung des 100 mM Puffers, pH 7,5, aus Beispiel 2;
- [0057] [Fig. 3e](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 2, das gegen den 10 mM Puffer, pH 7,5, diafiltriert werden soll;
- [0058] [Fig. 3f](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung des 10 mM Puffers, pH 7,5, aus Beispiel 2;
- [0059] [Fig. 4a](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur aus Beispiel 3, das gegen den 10 mM Puffer, pH 6,0 diafiltriert werden soll;
- [0060] [Fig. 4b](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung des 10 mM Puffers, pH 6,0, aus Beispiel 3;
- [0061] [Fig. 4c](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 3, das gegen den 10 mM Puffer, pH 9,0, diafiltriert werden soll;
- [0062] [Fig. 4d](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung des 10 mM Puffers, pH 9,0, aus Beispiel 3;
- [0063] [Fig. 5](#) ist ein Diagramm des Permeatrefluxes gegen Diafiltrationsvolumina für die Puffer aus Beispiel 4;
- [0064] [Fig. 6](#) ist ein Diagramm des TMP gegen Diafiltrationsvolumina der Puffer aus Beispiel 4;
- [0065] [Fig. 7a](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 5;
- [0066] [Fig. 7b](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung aus Beispiel 5;
- [0067] [Fig. 8a](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 6;
- [0068] [Fig. 8b](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Konzentrationspermeats aus Beispiel 6;
- [0069] [Fig. 8c](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Diafiltrationspermeats (10 Volumenäquivalente) aus Beispiel 6;
- [0070] [Fig. 8d](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Diafiltrationspermeats (20 Volumenäquivalente) aus Beispiel 6;
- [0071] [Fig. 8e](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Diafiltrationspermeats (30 Volumenäquivalente) aus Beispiel 6;
- [0072] [Fig. 8f](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Diafiltrationspermeats (40 Volumenäquivalente) aus Beispiel 6;
- [0073] [Fig. 8g](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Diafiltrationspermeats (50 Volumenäquivalente) aus Beispiel 6;
- [0074] [Fig. 8h](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung aus Beispiel 6;

- [0075] [Fig. 8i](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung aus Beispiel 6 bei zweifacher Beladung im Vergleich zu [Fig. 8h](#);
- [0076] [Fig. 9a](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Permeats aus Beispiel 8 nach 20minütiger Rezirkulierung;
- [0077] [Fig. 9b](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Lysats aus Beispiel 8;
- [0078] [Fig. 9c](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Retentats aus Beispiel 8 nach 20minütiger Rezirkulierung;
- [0079] [Fig. 9d](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Permeats aus Beispiel 8 während Konzentrierung;
- [0080] [Fig. 9e](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Permeats aus Beispiel 8 während Diafiltration, ersten 150 ml;
- [0081] [Fig. 9f](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Permeats aus Beispiel 8 während Diafiltration, zweiten 150 ml;
- [0082] [Fig. 9g](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Permeats aus Beispiel 8 während Diafiltration, dritten 150 ml;
- [0083] [Fig. 9h](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur des Permeats aus Beispiel 8 während Diafiltration, vierten 150 ml;
- [0084] [Fig. 9i](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Retentatvereinigung aus Beispiel 8 nach Konzentrierung und Diafiltration;
- [0085] [Fig. 9j](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Wäsche 1 aus Beispiel 8;
- [0086] [Fig. 9k](#) ist eine Ionenaustausch-HPLC-Spur der Wäsche 2 aus Beispiel 8;
- [0087] [Fig. 10a](#) ist ein Elutionsprofil, das die Plasmid-DNA-Trennung mit 10 bis 500 mM Na_2HPO_4 bei pH 6,8 zeigt;
- [0088] [Fig. 10b](#) ist ein Elutionsprofil, das die Plasmid-DNA-Trennung mit 10 bis 500 mM Na_2HPO_4 bei pH 7,6 zeigt;
- [0089] [Fig. 10c](#) ist ein Elutionsprofil, das die Plasmid-DNA-Trennung mit 10 bis 500 mM Na_2HPO_4 bei pH 7,8 zeigt; und
- [0090] [Fig. 10d](#) ist ein Elutionsprofil, das die Plasmid-DNA-Trennung mit 10 bis 500 mM Na_2HPO_4 bei pH 8,8 zeigt.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0091] Nachdem unerwarteterweise festgestellt wurde, dass RNA von DNA in einem Tangentialfluss-Ultrafiltrationsverfahren ohne vorherige Durchführung eines RNA-Verdaus getrennt werden kann, wurden ein Grundprotokoll entwickelt und ein oder mehrere Faktoren modifiziert, im Versuch zu bestimmen, welcher der Faktoren einen signifikanten Effekt auf das Entfernen von zellulären Bestandteilen, insbesondere RNA, hat.

[0092] Eine schematische Darstellung, die eine Anzahl an alternativen Trennungswegen (1A, 1B und 1C) illustriert, ist in [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) dargelegt, die weiterführende Verfahrensdetails werden in größerem Detail unten beschrieben:

Aufreinigungsprotokoll für RNase-freies Plasmid: 300 g Maßstab

1. Zellresuspension

[0093] 2,5 l des Resuspensionspuffers (25 mM Tris/10 mM EDTA/55 mM Dextrose, pH 8,0) wurde einer 300

g Zellpaste zugesetzt, um die Zellen zu resuspendieren.

2. Alkalische Lyse

[0094] Lysepuffer (4,17 l, 0,96 % NaOH, 830 ml 6 % SDS) wurde zur Zellsuspension zugegeben und bis zur Homogenität vermischt, um so ein Lysat zu bilden.

3. Kaliumacetat-Präzipitation

[0095] 2,5 l an 3 M Kaliumacetat wurden dem Lysat zugesetzt, für 25 bis 35 Minuten gerührt und bei 4.600 Upm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Doppelschicht an Miracloth abgegossen. Das Zellpellet wurde gewogen und verworfen. Der Überstand wurde durch 1 × 1,2 µm Sartopure PP- und 1 × 0,45/0,2 µm Sartobran P-Filter passiert. Das Filtrat ist das geklärte Lysat.

4. Ultrafiltration

Materialien:

Millipore-Vorrichtung mit 3 × 5 ft² 300K PES, Omega Centrasette, Open-Channel-Membranen.

[0096] Diese wird zwischen den Läufen in 0,1 M NaOH gelagert.

Millipore Masterflex peristaltische Pumpe.

Diafiltrationspuffer: 20 mM Tris, pH 7,5.

Herstellungssystem

[0097] Entleere die Inhalte des Reservoirs und der Membrankassetten durch die Permeatleitung.

[0098] Fülle das Reservoir mit 2 l des Diafiltrationspuffers und rezirkuliere diesen durch die Retentatleitung, mit der Permeatleitung geschlossen.

[0099] Entleere die Inhalte des Reservoirs und der Membrankassetten durch die Permeatleitung.

[0100] Fülle das Reservoir mit 2 l des Diafiltrationspuffers, verbinde die Pufferflasche mit dem Reservoir und spüle 5 l des Diafiltrationspuffers durch die Permeatleitung. Überprüfe den pH-Wert des Permeats.

Bildung der Gelschicht:

[0101] Entleere das System.

[0102] Fülle das Reservoir mit ungefähr 1,8 l geklärtem Lysat und Verbinde das große Fass, das das Lysat enthält, mit dem System.

[0103] Rezirkuliere bei einem anfänglichen Druck von 10 psi, wobei die Permeatleitung zurück in das Lysatgefäß führt, für 30 Minuten (um die Gelschicht aufzubauen).

[0104] Behalte ein Auge auf den Retentatdruck, da dieser schnell steigen kann. Dieser sollte 20 psi nicht übersteigen. Sollte dies passieren, dann adjustier ihn runter auf 20 psi.

Konzentrierung

[0105] Konzentriere das Lysat auf 500 ml. Sammle das Konzentrationspermeat.

Diafiltration

[0106] Diafiltriere bei 20 psi unter Verwendung von ungefähr 50 Volumina des Diafiltrationspuffers (25 l). Verwende den durchgehenden Diafiltrationsmodus, bei dem das Filtrat durch frischen Puffer bei gleicher Rate ersetzt wird. Sammle das Diafiltrationspermeat in 5 × 5 l Flaschen. Zeichne Volumen, pH und Leitfähigkeit auf.

Ernte

[0107] Rezirkuliere am Ende der Diafiltration die Inhalte des Reservoirs und der Kassetten für 30 Minuten, wobei das Retentatventil offen und die Permeatleitung geschlossen ist. Fülle den UF-Stand in eine 500 ml-Flasche (UF1-D-Permeat) ab.

[0108] Gebe 500 ml an frischem Diafiltrationspuffer zum Reservoir und rezirkuliere für 30 Minuten.

[0109] Fülle den Stand in eine 500 ml-Flasche (UF1-D-Permeatwäsche 1) ab.

[0110] Wiederhole obigen Schritt (UF1-D-Permeatwäsche 2).

[0111] Vereinige das UF1-D-Permeat, die Permeatwäsche 1 und die Permeatwäsche 2.

[0112] Filtriere die Retentatvereinigung durch einen 1 × Gelman Science 0,45 µm-Filter (und falls benötigt, 1 × N66 Ultipor 0,2 µm).

[0113] Der Effekt des Variierens einer oder mehrerer der Betriebsbedingungen in diesem Protokoll wird mit Bezug auf die folgenden Beispiele 1 bis 10 dargestellt, während Beispiele 11 bis 15 weitere Variationen zeigen:

Beispiel 1 (Effekt der Ionenstärke, Teil 1)

[0114] Eine sehr signifikante Feststellung trat ein, als ein 10 mM Tris + 0,45 M NaCl-Diafiltrationspuffer, pH 8,5 (Leitfähigkeit 41,3 mS) mit einem 0,1 M Tris-Diafiltrationspuffer, pH 8,5 (Leitfähigkeit 6,89 mS) ausgetauscht wurde.

[0115] Als dieser Puffer mit niedriger Ionenstärke verwendet wurde, wurde die Klärung einer signifikanten Menge an RNA beobachtet. Dies war ersichtlich durch Ionenaustausch-HPLC, bei der eine Diafiltrationspermeatprobe die Gegenwart von RNA, jedoch nicht von Plasmid ([Fig. 2b](#)) zeigte, während das Lysat die Gegenwart von sowohl RNA als auch von Plasmid ([Fig. 2a](#)) zeigte. Die Retentatvereinigung zeigte ebenfalls im Vergleich zum Lysat ein Entfernen der RNA ([Fig. 2c](#)).

[0116] Die obigen Resultate wurden durch Durchführen eines RNA-Tests durch Reverse-Phase-HPLC bestätigt und quantifiziert. Die Resultate zeigten folgendes auf:

32 % der RNA, die im Lysat gefunden wurde, lag im Diafiltrationspermeat vor;

43,7 % der RNA, die im Lysat gefunden wurde, lag in der Retentatvereinigung vor; und

0,9 % der RNA wurde im Konzentrationspermeat gefunden.

[0117] Während der Aasmelder nicht durch die Theorie gebunden sein möchte, deuten die Resultate darauf hin, dass RNA mit niedrigem Molekulargewicht ursprünglich an der Gelschicht beteiligt ist, dieser jedoch dann durch den Diafiltrationspuffer ermöglicht wird, sich aufzulösen und in der Lage ist, die Ultrafiltrationsmembran zu passieren.

Beispiel 2 (Effekt der Ionenstärke, Teil 2)

[0118] Ein weiteres Experiment wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Ionenstärke auf die RNA-Entfernung zu bestimmen. Drei Tris-Puffer mit unterschiedlicher Ionenstärke wurden verglichen. Alle Tris-Puffer hatten einen pH von 7,5, variierten jedoch, wie unten dargestellt, in ihren Konzentrationen:

500 mM (Leitfähigkeit 25,3), 100 mM (Leitfähigkeit 6,89), 10 mM (Leitfähigkeit 0,33).

[0119] Ein Vergleich der HPLC-Spuren (Lysat gegen Retentatvereinigung) zeigte, dass je niedriger die Ionenstärke, desto größer die RNA-Entfernung ([Fig. 3a](#) bis [Fig. 3f](#)).

Beispiel 3 (Effekt des pH)

[0120] Nach der Schlussfolgerung, dass die Ionenstärke die RNA-Entfernung beeinflusst, wurde der Effekt des pH-Werts auf die RNA-Entfernung untersucht. Die Untersuchung wurde gegen einen 10 mM Tris-Puffer bei einem pH von 6, 7,5 und 9 durchgeführt. Durch erneuten Vergleich der HPLC-Spuren (Lysat gegen Retentatvereinigung) wurde festgestellt, dass ein pH zwischen 7,5 und 9 eine bessere RNA-Entfernung ergab als ein pH von 6, obwohl die Resultate bei pH 9 nicht besser waren als bei pH 7,5 ([Fig. 4a](#) bis [Fig. 4d](#) und [Fig. 3e](#) und

[Fig. 3f.\)](#)

Beispiel 4 (Effekt der Ionenstärke auf Permeatflux und Transmembrandruck)

[0121] Wie der Einfluss auf die RNA-Beseitigung, so wurde bemerkt, dass der Permeatflux und der Transmembrandruck (TMP) durch die Ionenkonzentration des Diafiltrationspuffers beeinflusst wurde. Während der Permeatflux im Allgemeinen in der Größenordnung von 40 l/m²/h bei Beginn der Diafiltration war, so änderte sich dieser mit zunehmenden Volumenaustauschungen. Im Fall des 500 mM Puffers fiel der Permeatflux auf ungefähr 30 l/m²/h ab, während dieser im Fall des 100 mM Puffers auf ungefähr 70 l/m²/h und im Fall des 10 mM Puffers auf ungefähr 140 l/m²/h anstieg. Diese Feststellungen waren dahingehend signifikant, als dass sie zeigten, dass das Verarbeiten bei höheren Geschwindigkeiten für die Puffer mit niedriger Ionenstärke durchgeführt werden kann; um so viel wie Faktor 5. Die Resultate sind grafisch in [Fig. 5](#) gezeigt.

[0122] Ebenfalls fiel der TMP von einem Ausgangsdruck von ungefähr 20 bis auf ungefähr 17 im Fall des 100 mM Puffers und auf ungefähr 10 im Fall des 10 mM Puffers ab. Dies steht im Widerspruch zum 500 mM Puffer, bei dem der TMP konstant blieb. Die Resultate sind in [Fig. 6](#) illustriert.

Beispiel 5 (Effekt der Volumenaustauschungen)

[0123] Überraschenderweise wurde festgestellt, dass im Fall des 10 mM Puffers signifikante Mengen an RNA die Membran nach 32 Volumenaustauschungen passierte. Konsequenterweise wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um zu bestimmen, wann die RNA aufhört eluiert zu werden.

[0124] 500 ml an geklärtem Lysat wurde aus der Lagerung bei -20°C entfernt, aufgetaut und durch einen 0,22 µm-Filter filtriert. 150 ml des gefilterten Lysats wurden in das Reservoir einer TFF-Vorrichtung platziert und durch das System bei einer Querstromsrate von 550 ml/min/ft² gepumpt. Der TMP wurde auf 0,6 bar durch teilweises Schließen des Retentatventils der TFF-Vorrichtung eingestellt. Das Lysat wurde für 20 Minuten zur Polarisierung der Membran rezirkuliert. Die Inhalte des Reservoirs wurden auf ungefähr 25 ml aufkonzentriert und anschließend gegen 1.600 ml des Diafiltrationspuffers diafiltriert.

[0125] Am Ende der Diafiltration wurde die Permeatleitung geschlossen und das Retentatventil geöffnet, um den TMP zu beseitigen. Das Retentat wurde dann für 10 Minuten rezirkuliert, um die Membran zu waschen und dann in eine saubere Nalgene-Flasche abgeerntet. Weitere 30 ml des Diafiltrationspuffers wurden durch das System für 10 Minuten gepumpt, um die Membran zu waschen, und dann abgeerntet. Insgesamt wurden zwei Wäschen durchgeführt.

[0126] TMP und Permeatflux wurden während des Verfahrens gemessen, und Proben für die Ionenaustausch-HPLC, als ein Hinweis auf die RNA-Klärung, genommen.

[0127] Es wurde festgestellt, dass mit einer ausgeweiteten Diafiltration bis auf 2 % der RNA, die in dem Lysat vorlag, alles entfernt werden konnte ([Fig. 7a](#) und [Fig. 7b](#)). Des Weiteren wird von [Fig. 7b](#) offensichtlich, dass der zurückgebliebene RNA-Peak genau unterhalb des Plasmid-Peaks liegt, was darauf schließen lässt, dass die gesamte zurückgebliebene RNA mit hohem Molekulargewicht ist. Diese Daten weisen darauf hin, dass Verfahren in Tandem mit einem Verfahren, dass effektiv beim Entfernen von RNA mit hohem Molekulargewicht ist, wie z.B. Calciumchlorid-Präzipitation, verwendet werden kann, um sicherzustellen, dass die gesamte RNA von einer Probe entfernt wird.

Beispiel 6 (Effekt der Plasmidbeladung)

[0128] Der Anmelder hat unerwarteterweise festgestellt, dass man durch Reduzieren der Menge der Plasmidbeladung auf eine Membran die Trennung der RNA von Plasmid-DNA weiter erhöhen kann. In der Tat waren sie in der Lage, durch Reduzieren der Plasmidbeladungen auf einer 300 KD-Membran von 22,2 mg an Plasmid/ft² auf 11,1 mg/ft², Plasmid-DNA mit signifikant niedrigeren Levels an vorliegender RNA zu erhalten.

[0129] Die Resultate sind in [Fig. 8a](#) bis [Fig. 8i](#) gezeigt.

[0130] Zur Klärung, wurde ein 7,6 Kbp-Plasmid gegen 50 Volumenäquivalente an 20 mM Tris, pH 7,5, auf eine 300K-Membran gemäß dem allgemeinen Protokoll diafiltriert. Die IA-HPLC-Chromatographien für die Proben, die bei 11,1 mg an Plasmid pro ft² der Membran beladen wurden, sind in [Fig. 8a](#) bis [Fig. 8h](#) gezeigt.

- [0131] [Fig. 8a](#) ist das Lysat;
- [0132] [Fig. 8b](#) ist das Konzentrationspermeat;
- [0133] [Fig. 8c](#) ist das vereinigte Diafiltrationspermeatvolumina 1–10;
- [0134] [Fig. 8d](#) ist das vereinigte Diafiltrationspermeatvolumina 11–20;
- [0135] [Fig. 8e](#) ist das vereinigte Diafiltrationspermeatvolumina 21–30;
- [0136] [Fig. 8f](#) ist das vereinigte Diafiltrationspermeatvolumina 31–40;
- [0137] [Fig. 8g](#) ist das vereinigte Diafiltrationspermeatvolumina 41–50; und
- [0138] [Fig. 8h](#) ist die Retentatvereinigung.
- [0139] Zum Vergleich, [Fig. 8i](#) ist die Retentatvereinigung der Probe mit 22,2 mg an Plasmid pro ft^2 der Membranprobe.
- [0140] Die Resultate zeigen, dass bei niedrigeren Beladungen das Plasmid frei an RNA ist. (Vergleiche [Fig. 8h](#) mit [Fig. 8i](#).)
- [0141] Die IA-HPLC-Chromatographien haben ebenfalls gezeigt, wie RNA mit zunehmenden Diafiltrations-Volumenäquivalenten beseitigt wird. (Vergleiche [Fig. 8c](#) bis [Fig. 8g](#) und ebenfalls [Fig. 8a](#) und [Fig. 8b](#)).
- [0142] Daher kann man im Lysat ([Fig. 8a](#)) einen ersten Peak auf der linken Seite (Protein), gefolgt von einem breiten RNA-Peak mit den Plasmid-Peaks 8,057 und 8,356, ebenfalls markiert, sehen. Die beiden Plasmid-Peaks sind die offene bzw. super coiled DNA-Peaks.
- [0143] Im Konzentrationspermeat ([Fig. 8b](#)) kann man im Protein-Peak jedoch wenig RNA sehen, was darauf hinweist, dass die RNA ursprünglich an der Gelschicht beteiligt ist. Mit steigender Zugabe an Volumina des Diafiltrationspuffers kann eine merkliche Änderung in der eluierten RNA-Menge beobachtet werden. Nach 10 Volumina ([Fig. 8c](#)) werden nur geringe Levels an RNA durch die Membran beseitigt, nach 20 Volumina, wenn der Diafiltrationspuffer erste Effekte aufweist, was durch einen Abfall im pH und Leitfähigkeit ersichtlich ist, wird ein Peak an RNA durch die Membran beseitigt ([Fig. 8d](#)). Von 30 bis 50 Volumina ist zu beobachten, dass die RNA-Level schwächer werden, bis zum Zeitpunkt, bei dem 50 Volumina die Membran durchlaufen haben, die Level nicht mehr signifikant sind und die Filtration beendet werden kann. Die Retentatvereinigung ([Fig. 8h](#)) zeigt reines Plasmid und keine RNA.
- [0144] Der Anmelder hat unerwartet festgestellt, dass wenn Membranen mit einer großen Porengröße verwendet werden, die Plasmidbeladung höher sein kann. Zum Beispiel können mit einer 500 KDa-Membran Beladungen so hoch wie 150 mg des Plasmids/ ft^2 sein. In der Tat kann die Gesamtfläche der Membran selbst signifikant sein, da frühe Anzeichen darauf hinweisen, dass je größer die Membranfläche, desto größer die zu verwendende Plasmidbeladung sein kann.

Beispiel 7 (Zusätzlicher Polierschritt)

- [0145] Während die Verwendung eines Puffers mit niedriger Ionenstärke in Kombination mit ausreichend Volumenaustauschungen des Puffers geeignet war 98,6 % der RNA, die sofort nach Lyse vorlag, zu entfernen (10 mM Tris, pH 7,5, und 60 Volumenaustauschungen), so versuchte der Anmelder zu bestimmen, ob eine zweite und andersartige Technik jedwede zurückgelassene RNA, insbesondere RNA mit hohem Molekulargewicht, auf Levels zu entfernen, bei denen die RNA sich als undetektierbar erwies.
- [0146] Sie unternahmen ein Verfahren auf Chromatographie-Basis, das dem Ultrafiltrationsschritt folgte. Der getestete Chromatographieschritt war ein Hydroxylapatitschritt. Daher wurde die Retentatvereinigung auf eine Hydroxylapatitsäule (Bin-Rad MacroPrep Keramik Typ II, 20 μm Perlengröße) unter Bedingungen beladen, die das Binden von RNA verhindern (0,3 M Na_2HPO_4 , pH 7,6), so dass die RNA mit dem Durchfluss beseitigt wird, während die Plasmidbindung maximiert wird. Das Plasmid wurde dann mit einer Rückgewinnung von 93,4 % eluiert. Keine RNA wurde durch Ionenaustausch-HPLC detektiert.

[0147] Interessanterweise hat der Anmelder ebenfalls festgestellt, dass der pH sich als kritisch für die effektive Verwendung von Hydroxylapatit beim Trennen der RNA von der Plasmid-DNA erwiesen. Die Ergebnisse, die den Effekt des pH-Werts auf die Trennung der RNA von Plasmid-DNA zeigen, sind in Beispiel 10 gezeigt, das ebenfalls den Vorteil der Verwendung eines Doppelpuffersystems im Trennungsverfahren zeigt.

Beispiel 8 (Effekt des Kanals)

[0148] Es ist allgemein akzeptiert, dass ein Open-Channel die Bildung einer Gelschicht leichter ermöglicht, die verhindert, dass Plasmid-DNA durch die Membran passiert und in das Permeat gelangt. In der Tat, es wurde sogar vorgeschlagen, dass die Verwendung einer Open-Channel-Kassette kritisch für die erfolgreiche Durchführung des Verfahrens sein kann.

[0149] Da der Anmelder Schwierigkeiten in der Rückgewinnung des Plasmids von der Membran am Ende des Ultrafiltrationsschritts hatte, jedoch feststellte, dass sehr schlechte Membranen mittels eines Nukleinsäureverdaus wieder hergestellt werden können, vermuteten sie, dass die Nukleinsäure, die mit der Gelschicht assoziiert war, in Wirklichkeit irreversibel an die Membran gebunden war. In der Bemühung zu bestimmen, ob sie diese Bindung möglicherweise stören können, haben sie einen Screen entworfen, um eine Verwirbelung im Retentatkanal zu verursachen. Das Protokoll war, wie auch unten beschrieben, und eine T-Screened-Channel-"Omega"-Membran wurde verwendet.

[0150] 180 ml des geklärten Lysats (RNase-behandelt) wurde in das Reservoir eines Minim-Systems gegeben. Die Pumpe wurde angeschaltet, um eine Querstromrate von 100 ml/min zu ergeben. Das Retentatventil wurde leicht geschlossen, um einen TMP von 0,8 bar zu ergeben (Einlassdruck 1,5 bar, Auslassdruck 0,1 bar). Das System lief im Gesamtzirkulationsmodus für 20 Minuten, um die Bildung einer Gelschicht zu ermöglichen. Proben des Permeats und Reservoirs wurden für HPLC-Analyse entnommen. Die Permeatleitung wurde in eine klare Flasche platziert, und das Lysat auf ein Endvolumen von 30 ml aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde dann gegen 20 Volumina (600 ml) 10 mM Tris/0,45 M NaCl, pH 8,5, diafiltriert. Vier 150 ml-Permeatproben wurden während der Diafiltration und eine während der Aufkonzentration gesammelt und durch HPLC analysiert. Das Retentatventil wurde geöffnet und die Permeatleitung abgeklemmt, um den TMP zu entfernen. Das System wurde für 10 Minuten belassen, um die Gelschicht aufzulösen und das Plasmid zu ernten. Nach 10 Minuten wurde das Retentat aus dem Reservoir geerntet und durch 30 ml Diafiltrationspuffer ersetzt. Dies wurde wie zuvor für 10 Minuten rezirkuliert, in einem separaten Behälter abgeerntet und mit "Wäsche 1" beschriftet. Der Waschschritt wurde wiederholt. Die Volumina der Retentaternte, Wäsche 1 und Wäsche 2 wurden gemessen und Proben für eine HPLC-Analyse genommen. Die Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde ebenfalls gemessen und das 260/280-Verhältnis berechnet.

[0151] Zwei Kriterien wurden verwendet, um den Effekt der Verwendung eines "screened" Channels zu messen. Diese waren die Rückgewinnung des Plasmids vom Verfahren und die Beseitigung von Verunreinigungen durch visuelle Inspektion der HPLC-Chromatogramme.

[0152] Von den Chromatogrammen wurden verschiedene Schlussfolgerungen gezogen. Nach 20 Minuten Rezirkulierung passierte nahezu kein Plasmid die Membran ([Fig. 9a](#)). Die Gesamtmenge an Plasmid im Reservoir war 12,78 mg im Vergleich zu 16,33 mg im Ausgangsmaterial ([Fig. 9b](#) und [Fig. 9c](#)). Es kann daher gefolgert werden, dass 3,55 mg Plasmid an der Gelschicht beteiligt sind.

[0153] Die visuelle Inspektion der Permeatproben ([Fig. 9d](#) bis [Fig. 9h](#)) zeigte, dass Verunreinigungen, jedoch kein Plasmid, durch die Membran passierten. Die Chromatogramme der Retentaternte und der Wäschen ([Fig. 9i](#) bis [Fig. 9k](#)) zeigten gute Beseitigung der Verunreinigungen.

[0154] 82 % an Gesamt-Plasmid wurde in der Retentaternte rückgewonnen, und 13,7 % wurde in der Wäsche zurückgewonnen. Dies war signifikant höher als die Rückgewinnungen, die mit einer Open-Channel-Kassette (typischerweise 70 bis 80 %) für die vereinigte Retentaternte und Wäsche zu beobachten waren.

[0155] Wenn das Verfahren in einem wie zuvor im allgemeinen Protokoll beschriebenen RNase-freien Verfahren angewendet wurde, so wurden ebenfalls verbesserte Plasmidausbeuten erhalten.

[0156] Offensichtlich hat die Verwendung von durchmusterten Kanälen ("screened channels") zur Verbesserung der Plasmidausbeute eine allgemeine Anwendung in jedem Ultrafiltrationsverfahren und ist ein unabhängiger Aspekt dieser Anmeldung.

Beispiel 9 (Effekt von zusätzlichen Chromatographieschritten)

[0157] Da das beschriebene RNase-freie Verfahren insbesondere beim Entfernen von RNA mit niedrigem Molekulargewicht effektiv ist, wünschte der Anmelder zu bestimmen, ob andere RNA-Entfernungsverfahren, insbesondere solche, für die bekannt war, dass sie RNA mit hohem Molekulargewicht entfernen, in Kombination mit ihrem RNase-freien Verfahren, entweder als ein Prä- oder Post-Ultrafiltrationsschritt, verwendet werden können (siehe [Fig. 1b](#)). Sie haben daher die folgenden Experimente durchgeführt, um den Effekt auf einen Calciumchlorid-Präzipitationsschritt nach Ultrafiltration zu bestimmen.

[0158] Das Beladungsmaterial wurde gemäß dem zuvor beschriebenen allgemeinen Protokoll hergestellt (100 mM Tris-Puffer, pH 7,5, wurde verwendet), um RNA mit niedrigem Molekulargewicht während der Ultrafiltration zu entfernen. Diese wurde von einem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt gefolgt (1,4 M, pH 7,5).

[0159] Auf ein Volumen der Retentatvereinigung wurde ein Volumen von 2,8 M Calciumchlorid in 100 mM Tris, pH 7,5, gegeben. Das Gemisch wurde gerührt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Das präzipitierte Material wurde durch Filtration durch einen 0,22 µm-Filter entfernt.

[0160] Für Calciumchloridsalze ist bekannt, dass sie sowohl die Tangentialfluss-Filtration als auch die Ionenaustauschchromatographie stören. Daher, falls sich ein kombiniertes Verfahren als zufriedenstellend erwies, würde es notwendig sein, das Calciumchlorid effektiv zu entfernen. Der Anmelder hat festgestellt, dass Reverse-Phase-Chromatographie nicht nur zur Trennung der Plasmid-DNA von Calciumchloridsalzen verwendet werden kann, sondern dass durch Auswahl eines geeigneten Mittels zur Ionenpaarung sowohl die RNA als auch die Calciumchloridsalze entfernt werden können.

[0161] Die Untersuchung von verschiedenen Faktoren, die die Chromatographie beeinflussen, identifizierten das Mittel zur Ionenpaarung und die Matrix als Schlüssel für die Trennung der Plasmid-DNA von RNA.

[0162] Falls nur Calciumchloridsalze entfernt werden sollen, kann jedoch ein simpleres System eingesetzt werden.

[0163] Zwei Reverse-Phase-Medien haben sich in Kombination mit Tetrabutylammoniumchlorid als geeignet erwiesen. Diese waren:

Polyflow, vertrieben durch Puresyn, Partikelgröße 55 µm, das nichtporös und ein gesetzlich geschütztes Polymer ist; und

Poros 50 R1, vertrieben durch Poros, Partikelgröße 50 µm, das porös und ein Polystyroldivinylbenzopolymer ist.

[0164] Die bevorzugte Konzentration des Tetrabutylammoniumchlorids (TBAC) war 2 mM.

[0165] Die bevorzugten Elutionsbedingungen für die beiden Matrices variierten:

für Polyflow war die RNA-Entfernung mit 10 % Ethanol und 2 mM TBAC, und die Plasmidelution war mit 30 % Ethanol;

für Poros 50 R1 erfolgte die RNA-Entfernung mit 25 % Ethanol und 2 mM TBAC, und die Plasmidelution erfolgte mit 40 % Ethanol.

[0166] In beiden Fällen war die Plasmid-Rückgewinnung hoch (ca. 80 %) und nur sehr niedrige Level an RNA konnten detektiert werden.

[0167] Die besten Resultate wurden bei niedriger Beladung erhalten.

[0168] Die Anwendung von Reverse-Phase-Chromatographie zeigt deutlich, dass es selbst das Potenzial in Verbindung mit einer Calciumchlorid-Präzipitation sowohl als eine RNA-Trennungstechnik, ungeachtet ob es in Kombination mit dem Tangentialfluss-Ultrafiltrationsverfahren der Erfindung verwendet wird, als auch ein Mittel zum Verbessern der Plasmidausbeute hat.

Beispiel 10 (Verwendung der Hydroxylapatit-Chromatographie)

[0169] Eine Anzahl an Hydroxylapatit-Medien wurde untersucht, um ihre Fähigkeit, RNA von extra-chromosomaler DNA zu trennen, zu bestimmen. Der Effekt von pH, Pufferart, Elutionsprotokoll, Säulenkapazität und Flussrate wurden alle untersucht. Die Methodologie war einfach und umfasste das Äquilibrieren einer Hydro-

xylapatitsäule mit Puffer bei einer vorgegebenen Flussrate, Beladung einer Retentatvereinigung (verdünnt im Puffer) auf die Säule, Waschen mit Puffer, Durchführen eines linearen Gradienten und Regenerierung der Säule.

[0170] Die signifikanten Ergebnisse dieser Experimente waren wie folgt:

Der pH wurde als kritisch in der erfolgreichen Trennung von extrachromosomaler DNA und RNA befunden. Für die Macro Prep-Keramik-Hydroxylapatit Typ II, 40 µm (Bio Rad) war das pH-Optimum 7,8 (siehe [Fig. 10c](#)), und ein Unterschied von so wenig wie 0,2 pH-Einheiten hatten einen signifikanten Effekt auf die Trennung. Daher war bei pH 6,8 ([Fig. 10a](#)) und 8,8 ([Fig. 10d](#)) keine Trennung, während bei 7,6 ([Fig. 10b](#)) die Auflösung signifikant reduziert war.

[0171] Ebenfalls erwies sich die Pufferart mit Dinatriumphosphat besser zu sein als mit dem löslicheren Dikaliumphosphatpuffer. In der Tat wurden die besten Resultate unter Verwendung eines Doppel-Elutionsschritts erzielt, wobei die Trennungseigenschaften von Dinatriumphosphat mit der hohen Löslichkeit des Dikaliumphosphats verbunden wurden. Die Hydroxylapatitsäule wurde äquilibriert und mit 10 mM Dinatriumphosphat bei pH 7,8 gewaschen, und die RNA wurde dann mit 0,35 M Dinatriumphosphat bei pH 7,8 eluiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 0,2 M Dikaliumphosphat bei pH 7,8 mit einer Rückgewinnung von 78,6 % eluiert (Tabelle I unten).

Tabelle I

Puffer (Elution 1)	Puffer (Elution 2)	Peak	Volumen	PlasmidRückgewinnung (%)
0,35 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,8	0,6 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,8	1 2	2,5 1,5	6,6 65,7
0,35 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,8	0,2 M K ₂ HPO ₄ pH 7,8	1 2	2,0 1,0	2,5 78,6
0,3 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,8	0,2 M K ₂ HPO ₄ pH 7,8	1 2	3,0 1,0	9,9 76,2

[0172] Das Ersetzen des RNA-Elutionspuffers mit 0,3 M Dinatriumphosphat bei pH 7,8 ergab gleiche Plasmid-Rückgewinnungen (76,2 %), jedoch war die RNA-Entfernung nicht so effektiv. Das Ersetzen des Plasmid-Elutionspuffers mit 0,6 mM Dinatriumphosphatpuffer bei pH 7,8 resultierte in einer niedrigeren Plasmid-Rückgewinnung (65,7 %).

[0173] Eine Beladung der Säule mit mehr als 0,5 mg Gesamt-Nukleinsäure pro ml der Säule unter Verwendung der Schritt-Elutionsbedingungen, angemerkt in Tabelle 1, resultiert in Plasmidverlusten im RNA-Elutionspeak von 56 bis 58 %.

[0174] Bei 0,5 mg/ml Gesamt-Nukleinsäure-Beladungskapazität führte eine Flussrate von 2 ml/min ebenfalls zu hohen Plasmidverlusten von 7,7 % in der RNA-Elutionsfraktion.

[0175] Die optimalen Bedingungen waren wie folgt:

1. Äquilibriere und wasche die Säule mit 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,8
2. Eluiere RNA mit 0,35 M Na₂HPO₄, pH 7,8
3. Eluiere Plasmid-DNA in 0,2 M K₂HPO₄, pH 7,8
4. Flussrate 0,5 ml/min.
5. Säulenkapazität: 0,5 mg Gesamt-Nukleinsäure pro ml der Säule oder 25,4 mg Plasmid pro ml der Säule.

[0176] Diese Bedingungen ergaben eine Plasmid-Rückgewinnung von 78,6 % und das Produkt erscheint frei von RNA zu sein (unter Verwendung einer Ionenaustausch-Chromatographie).

[0177] Ähnliche Resultate wurden unter Verwendung von Hydroxylapatit von Merck erhalten, mit der Ausnahme, dass das pH-Optimum 7,5 war, und der Na₂HPO₄-Puffer am besten bei 0,25 M ist. Das Ziel ist die Bindung des Plasmids zu maximieren, um die Säulenkapazität zu erhöhen. Da die RNA an die Säule bindet und in gro-

ßen Mengen vorliegt, nimmt sie viel der Bindungskapazität des Hydroxylapatit. Da die RNA jedoch eine niedrigere Affinität zur Säule hat als das Plasmid, werden Bedingungen von hohem Phosphat verwendet, um das RNA-Binden an die Säule zu verhindern, und als Resultat die Plasmidbindung zu maximieren. Diese Bedingungen sind 0,35 M Na_2HPO_4 , pH 7,8, für BioRad und 0,25 M Na_2HPO_4 , pH 7,5, für Merck. Unter diesen Bedingungen können Kapazitäten von 300 bis 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht werden.

[0178] Alternative Wege, die mit Bezug auf [Fig. 1b](#) illustriert sind, führten zu Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Reinheitsgraden und unterschiedlichen Ausbeuten.

[0179] Daher führte z.B. das Verfahren, das als Weg B veranschaulicht ist, zum Entfernen von bis zu 96 % der Endotoxine und bis zu 99,89 % der genomischen DNA, wobei das Verfahren, das als Weg C veranschaulicht ist, zum Entfernen von bis zu 99,97 % der genomischen DNA führte.

[0180] Die Auswahl eines bestimmten Verfahrens hängt daher von einer Anzahl an Faktoren ab.

[0181] Während in den vorangegangenen Beispielen der Ultrafiltrationsschritt gemäß dem RNase-freien Plasmid-Aufreinigungsprotokoll durchgeführt wurde (300 g Maßstab, wie zuvor umrissen) und die Ausbildung einer Gelschicht durch Rezirkulierung für 30 Minuten beinhaltet, hat der Anmelder festgestellt, dass die Rezirkulierung nicht notwendig ist. Dies wird nachfolgend in Beispiel 11 gezeigt.

Beispiel 11 (UF, ohne Rezirkulierung)

a) Kontrolle (mit RNase)

[0182] RNase wurde während der alkalischen Lyse hinzugegeben und das geklärte Lysat auf eine Ultrafiltrationsmembran ohne Rezirkulierung geladen.

Konstrukt = 7,8 kb Plasmid

Membran = 300 K

Plasmidbeladung = 183 mg/ft^2

TMP = 10 psi

Diafiltrationspuffer = 50 Vol, 10 mM Tris, pH 8

Resultate: Plasmidrückgewinnung = 52 %

Plasmidverlust während

Aufkonzentration/Diafiltration = 38 %

b) Vergleich (RNase-freies Verfahren)

[0183] Das Konstrukt, die Membran und der Diafiltrationspuffer waren wie in der Kontrolle. Die Plasmidbeladung variierte (wie gezeigt) und die Resultate wurden bei einem TMP von sowohl 5 als auch 10 psi erhalten. Siehe nachfolgende Tabelle 2.

Tabelle 2

	Plasmidbeladung	Plasmidrückgewinnung	Plasmidverlust	GA-HPLC
TMP = 5 psi	116 mg/ft^2	52 %	3 %	NA
TMP = 10 psi	144 mg/ft^2	90 %	0	83 % RNA

[0184] Der signifikante Unterschied in den Plasmidverlusten zwischen a) Kontrolle und b) dem Vergleich für ein RNase-freies Verfahren deutet darauf hin, dass die Rezirkulierung in einem RNase-freien Verfahren unnötig ist.

[0185] Ohne durch die Theorie gebunden zu sein, ist es möglich, dass das Vorkommen von hohem Level an RNA im RNase-freien Verfahren in der Ausbildung einer "Sofort"-Gelschicht resultiert, möglicherweise durch die hohen Level an RNA. In dieser Hinsicht sollte angemerkt werden, dass das Lysat im RNase-freien Verfahren ca. 98 Gew.% RNA zu ca. 2 Gew.% extrachromosomaler DNA enthält.

[0186] In der Tat wird die Hypothese durch die in Beispiel 12 nachfolgend erhaltenen Resultate unterstützt, worin der Effekt der Plasmid-Beladungskonzentration untersucht wurde.

Beispiel 12 (Effekt der Beladungskonzentration)

[0187] In diesem Beispiel wurde der Effekt der Reduzierung der Plasmidbeladung untersucht. Die Resultate sind nachfolgend in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3

	Plasmidbeladung	Plasmidrückgewinnung	Plasmidverlust	GA-HPLC
2 × Verdünnung	86 mg/ft ²	72 %	0,7 %	78 % RNA
4 × Verdünnung	42 mg/ft ²	86 %	1,3 %	65 % RNA
8 × Verdünnung	19 mg/ft ²	82 %	7 %	46 % RNA
16 × Verdünnung	6 mg/ft ²	141 %	5 %	34 % RNA

[0188] Was von den Resultaten offensichtlich wird, ist, dass durch Verdünnen sowohl des Plasmids als auch der RNA in der Lysatbeladung die Plasmidverluste zunehmen, obwohl die Plasmid-Rückgewinnung hoch bleibt.

[0189] In Anbetracht der Resultate, die in Beispielen 11 und 12 erhalten wurden, entschied sich der Anmelder zu untersuchen, ob eine Rezirkulierung in einem zweiten Ultrafiltrations-Arbeitsgang (UF₂) notwendig war, d.h. einer, in dem das meiste an RNA zuvor entfernt worden war. Dieses Protokoll und die Resultate sind nachfolgend in Beispiel 13 wiedergegeben.

Beispiel 13 (Rezirkulierung für 2. UF-Schritt)

[0190] In diesem Experiment wurde der Effekt

- i) der Konzentration des Plasmids im Ausgangsmaterial,
- ii) des TMP und
- iii) der Plasmidgröße

untersucht, um zu bestimmen, wie diese die Plasmid-Rückgewinnung beeinflussen.

[0191] Der UF₂ wurde eingesetzt, um das Volumen einer post-TMAE-Vereinigung zu reduzieren, d.h. eine, die einem Aufreinigungsschritt unter Verwendung von Chromatographie unterzogen wurde.

[0192] Die Materialien waren wie nachfolgend aufgelistet.

Materialien

[0193] Post-TMAE-Vereinigung, die das Plasmid (7,7 Kbp) in 50 mM Tris/0,74 M NaCl, pH 8,5, enthält, gelagert bei 2 bis 8°C.

[0194] Post-TMAE-Vereinigung, die das Plasmid (5,5 Kbp) in 50 mM Tris/0,74 M NaCl, pH 8,5, enthält, gelagert bei 2 bis 8°C.

[0195] Der Puffer, der als Verdünnungsmittel verwendet wurde, war 50 mM Tris/0,74 M NaCl, pH 8,5.

[0196] Die Ultrafiltrationskassette wurde unter Verwendung von 0,5 M NaOH gereinigt und in 0,1 M NaOH gemäß den Anleitungen des Herstellers gelagert.

Versuche

[0197] Das TMAE-Eluat wurde mit 50 mM Tris/0,74 M NaCl, pH 8,5, auf die benötigte Konzentration verdünnt. Proben wurden für eine HPLC-Analyse (Dionex) und einer A260-Messung genommen. 500 ml wurden in das Reservoir gegeben, wobei der Rest in eine Flasche, die mit dem 500 ml-Reservoir verbunden war, gegeben. Die Pumpe wurde angeschaltet, um eine Querflussrate (QR) von 900 ml/min zu ergeben. Das Retentatventil wurde leicht verschlossen, um den benötigten Transmembrandruck (TMP) zu ergeben. Die Permeatleitung wurde in eine saubere Flasche platziert und das Lysat auf ein Endvolumen von 250 ml aufkonzentriert. Infolge

samt wurden vier Fraktionen des Permeats gesammelt (Volumina hängen von der Plasmidkonzentration des Ausgangsmaterials ab). Proben wurden für eine HPLC-Analyse (Dionex) und einer A260-Messung genommen.

[0198] Das Retentatventil wurde geöffnet und die Permeatleitung abgeklemmt, um den TMP zu entfernen. Das System wurde stehen gelassen, um für 10 Minuten zu rezirkulieren, um jedes Plasmid, das mit der Membran assoziiert war, zu lösen und das Plasmid zu ernten. Nach 10 Minuten wurde das UF2-Retentat aus dem Reservoir geerntet und durch 100 ml 50 mM Tris/0,74 M NaCl, pH 8,5, ersetzt. Dieses wurde für 10 Minuten wie zuvor rezirkuliert, in einen separaten Behälter abgeerntet und mit "Wäsche 1" beschriftet. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt und die Ernten mit "Wäsche 2" und "Wäsche 3" beschriftet. Die Volumina des UF2-Retentats, Wäsche 1, Wäsche 2 und Wäsche 3 wurden gemessen und Proben für eine HPLC-Analyse (Dionex) und eine A260-Messung genommen.

[0199] Die Experimente wurden unter den Bedingungen wie nachfolgend in Tabelle 4 angemerkt durchgeführt.

Tabelle 4

Nr. des Experiments	Plasmidkonzentration (µg/ml)	TMP (psi)	Plasmidgröße
064	200	10	7,7 kbp
065	400	10	7,7 kbp
066	600	10	7,7 kbp
068	100	10	7,7 kbp
069	400	15	7,7 kbp
070	300	10	5,5 kbp
071	250	15	5,5 kbp
072	200	20	5,5 kbp

[0200] Die Resultate sind nachfolgend in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5

Experiment Nr.	Rückgewonnen (%)	Verlust (%)	Ungeklärt (%)
064	86,25	2,95	10,79
065	90,94	3,70	5,36
066	93,05	3,08	3,87
068	91,73	5,58	2,70
069	85,83	5,33	8,84
070	95,54	3,53	0,93
071	86,30	5,85	7,85
072	86,10	6,50	7,40

[0201] Die Resultate weisen darauf hin, dass eine Polarisierung der Ultrafiltrationsmembran unnötig ist.

[0202] Da die Level an RNA, die nach alkalischer Lyse zurückbleiben, in einem RNase-freien Aufreinigungsverfahren für extra-chromosomale DNA besonders hoch sind (ca. 20 mal die Gewichtsmenge der Plasmid-DNA), suchte der Anmelder nach Wegen zum Reduzieren der RNA-Level vor der Ultrafiltration.

[0203] Bezugnehmend auf [Fig. 1b "c"](#) wird ersichtlich, dass der Anmelder bereits die Verwendung von Calciumchlorid vor dem Ultrafiltrationsschritt vorgeschlagen hat. Dieser Schritt entfernte signifikante Mengen an RNA, und folgerichtig wurden weitere Untersuchungen mit dem Ziel der Optimierung des Ultrafiltrationsschritts in Gegenwart von Calciumchlorid durchgeführt. Diese Untersuchungen sind in Beispiel 14 wiedergegeben.

[0204] Da vorherige Experimente mit Calciumchlorid darauf hinwiesen, dass signifikante Mengen an Plasmid durch eine 300K-Membran verloren gingen, nahm der Anmelder an, dass das Calciumchlorid das Plasmid möglicherweise "kondensiert". Sie haben daher versucht, eine Membran mit einer kleineren Porengröße (100K) zu verwenden. Dies alleine ergab jedoch eine Plasmid-Rückgewinnung, die weniger war als angenommen. Dies wurde unter Verwendung eines niedrigeren TMP (5 psi gegen 10 psi) berichtigt.

[0205] Die Trennung der Zelltrümmer erfolgte:

- a) unter Verwendung von Zentrifugation und
- b) unter Verwendung eines Siebs.

[0206] Vergleichende Experimente mit und ohne Rezirkulierung sind nachfolgend gezeigt:

- a) UF1-Beladungslysats nach Calciumchlorid-Präzipitation mit Rezirkulierung

[0207] Geklärtes Lysat wurde durch alkalische Lyse in einer 50 g-Zubereitung hergestellt.

[0208] 1 Volumen einer 2 M Calciumchlorid-Stammlösung wurde zu 1 Volumen geklärten Lysats unter Rühren hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 5.000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,45/0,2 µm Sartobran-300-Filter durchpassiert.

[0209] Die Lagerungslösung wurde aus einem Ultratiltrationssystem, bestehend aus einer Pall-Filtron-Centramat-Vorrichtung, ausgestattet mit einer 1 ft² großen 100K-Omega-Centramat-Open-Channel-Membran, entleert und die Vorrichtung mit 10 mM Tris, pH 8,5 gewaschen.

[0210] Das Reservoir wurde mit ca. 400 ml geklärten Lysat aus einer 50 g-Zubereitung gefüllt und an eine Flasche angeschlossen, die den Rest des Lysats enthielt. Die Rezirkulierung wurde durch Anschluss der Permeatleitung an das Reservoir durchgeführt. Die Watson-Marlow-Pumpe wurde auf 158 Upm gestellt (Querrate von 1 l/min/ft²) und das Retentatventil adjustiert, um einen TMP von 5 psi zu erhalten. Die Rezirkulierung dauerte 20 Minuten, wobei während dieser Zeit dem TMP nicht erlaubt wurde, über 10 psi zu steigen.

[0211] Das geklärte Lysat wurde durch Anschluss der Permeatleitung an eine 2 l-Flasche auf 75 ml aufkonzentriert (Konzentrationspermeat).

[0212] Die Diafiltration wurde durch Anschluss des Reservoirs an eine Flasche mit 10 mM Tris, pH 8,5, gestartet, so dass verloren gegangenes Filtrat durch frischen Puffer mit gleicher Rate ersetzt wurde. Das Diafiltrationspermeat wurde in 5 × 1 l-Flaschen gesammelt. 30 Volumina (3 l) an 10 mM Tris, pH 8,5, wurden von 20 Volumina (2 l) an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefolgt.

[0213] Am Ende der Diafiltration wurde das Retentatventil geöffnet (kein Rückdruck), die Permeatleitung geschlossen und die Inhalte des UF-Systems für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentaternte).

[0214] Das Reservoir wurde mit 100 ml 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefüllt und für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentatwäsche 1). Dies wurde einmal wiederholt (Retentatwäsche 2).

[0215] Die UF1-Retentaternte und die beiden Wäschen wurden vereinigt und durch einen 0,45/0,2 µm Sartobran 300-Filter passiert.

[0216] Das UF1-System wurde dann durch Rezirkulierung von 300 ml an 0,5 M NaOH für 30 Minuten desinfiziert.

[0217] Das UF1-System wurde in 0,1 M NaOH gelagert.

[0218] Das Experiment wurde wiederholt, jedoch wurde das geklärte Lysat von 2 × 50 g-Zubereitungen vereinigt, Calciumchlorid-präzipitiert und durch die UF1 weiter verarbeitet, so dass die UF1-Beladung doppelt so groß war.

b) UF1-Beladungslysats nach Calciumchlorid-Präzipitation ohne Rezirkulierung

i) Unter Verwendung von Zentrifugation, um Zelltrümmer zu entfernen

[0219] Geklärtes Lysat wurde durch alkalische Lyse in einer 100 g-Zubereitung hergestellt.

[0220] 1 Volumen einer 2 M Calciumchlorid-Stammlösung wurde zu 1 Volumen des geklärten Lysats unter Rühren zugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 4.600 Upm für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 5 µm Sartopure PP2-Filter, gefolgt von einem 0,45/0,2 µm Sartobran P-Filter passiert.

[0221] Die Lagerungslösung wurde aus einem Ultrafiltrationssystem, bestehend aus einer Pall-Filtron-Centramat-Vorrichtung, ausgestattet mit einer 1 ft² großen 100K-Omega-Centramat-Open-Channel-Membran, entleert und das System mit 10 mM Tris, pH 8,5, gewaschen.

[0222] Das Reservoir wurde mit ca. 400 ml des geklärten Lysats aus einer 100 g-Zubereitung gefüllt und an eine Flasche angeschlossen, die den Rest des Lysats enthielt. Die Watson-Marlow-Pumpe wurde auf 158 Upm gestellt (Querflussrate von 1 l/min/ft²) und das Retentatventil wurde justiert, um einen TMP von 5 psi zu erhalten. Das geklärte Lysat wurde auf 75 ml aufkonzentriert und das Konzentrationspermeat in einer 2 l-Flasche gesammelt. Dem TMP wurde nicht erlaubt, über 10 psi zu steigen.

[0223] Die Diafiltration wurde durch Anschluss des Reservoirs an eine Flasche mit 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, gestartet, so dass verloren gegangenes Filtrat durch frischen Puffer bei gleicher Rate ersetzt wurde. Das Diafiltrationspermeat wurde in 5 × 1 l-Flaschen gesammelt. 30 Volumina (3 l) an 10 mM Tris, pH 8,0, wurde von 20 Volumina (2 l) an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefolgt.

[0224] Am Ende der Diafiltration wurde das Retentatventil geöffnet (kein Rückdruck), die Permeatleitung geschlossen und die Inhalte des UF-Systems für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnung der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentaternte).

[0225] Das Reservoir wurde mit 75 ml an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefüllt und für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentatwäsche 1). Dies wurde einmal wiederholt (Retentatwäsche 2).

[0226] Die UF1-Retentaternte und die beiden Wäschen wurde vereinigt und durch einen 0,45/0,2 µm Sartobran 300-Filter passiert.

[0227] Das UF1-System wurde anschließend durch Rezirkulierung von 300 ml an 0,5 M NaOH für 30 Minuten desinfiziert.

[0228] Das UF1-System wurde in 0,1 M NaOH gelagert.

ii) Unter Verwendung von Filtrierung, um Zelltrümmer zu entfernen

Plasmidkonstrukt: 5,9 kbp E. coli-Wirtszelllinie:

100 g einer bakteriellen Zellpaste, die bei -70°C gelagert wurde, wurde mit einem Hammer in kleine Teile zerbrochen. 500 ml eines Resuspensionspuffers wurde bei Raumtemperatur zu einem Bellco-Resuspensionsbehälter gegeben. Die zerbrochene Zellpaste wurde dem Behälter zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Verwendung eines magnetischen Rührers gerührt, der auf 8 eingestellt war.

[0229] Unverzüglich vor der Lyse wurden 834 ml einer kalten 0,96 % NaOH zu 166 ml an 6 % SDS im Kaltraum zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 4 l-Becherglas überführt, das einen Heidolph-Überkopfrührer hatte, und wurde in den Kaltraum gestellt. Das Lysegemisch wurde zur Zellresuspension gegeben und für 30 Minuten bei 40 Upm gerührt.

[0230] 500 ml an 3 M Kaliumacetat wurde zum Lysat gegeben und für 30 Minuten bei 60 Upm bei 4°C gerührt.

[0231] Eine 20 ml-Probe des Lysats wurde genommen und bei 2.500 Upm für 10 Minuten in einer MSE Mistral 2000 zentrifugiert. Der Überstand war das geklärte Lysat.

[0232] Zu 1 Volumen des Lysats wurde 0,66 Volumen einer 3 M Calciumchlorid-Stammlösung unter Rühren hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

[0233] Das Gemisch wurde erneut gerührt und in eine Plastok-Halterung, ausgestattet mit einem Maschenfilter, 350 mm Durchmesser, 200 µm Porengröße, geschüttet. Das Filtrat wurde unter Schwerkraft in einem 5 l-Becherglas zurückgewonnen.

[0234] Das Filtrat nach Maschenfiltrierung wurde durch eine Millipore-CE15-"Depth"-Filterkartusche gepumpt und das Filtrat in einem 5 l-Becherglas gesammelt.

[0235] Das Filtrat nach "Depth"-Filter wurde durch einen 0,45/0,2 µm Sartobran-P-Filter gepumpt. Dieses Material wurde als Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation bezeichnet.

[0236] Das Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation wurde wie zuvor durch das UF1 weiterverarbeitet, mit der Ausnahme, dass die Diafiltration gegen 35 Volumina an 10 mM Tris, pH 8,0, gefolgt von 15 Volumina an 10 mM Tris + 0,45 M NaCl, pH 8,5, war.

[0237] Das Experiment wurde wiederholt, jedoch war das Lysat 2fach mit UF1-Konzentrationspermeat vor der Zugabe der Calciumchloridlösung verdünnt.

Entsalzen

[0238] Jede Probe, die Calciumchloridsalz enthielt (einschließlich Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation, UF1-Konzentrationspermeat und UF1-Diafiltrationspermeat) wurden vor der HPLC-Analyse entsalzt.

[0239] 2 ml der Probe wurde in 2 × 5 ml HiTrap-Entsalzungssäulen, die in Reihe geschaltet und mit 50 mM Tris, pH 8,5, äquilibriert waren, bei einer Flussrate von 5 ml/min injiziert und ein 4,5 ml entsalzter Peak bei einer Absorption von 254 nm wurde gesammelt.

HPLC-Analyse

[0240] Die Plasmidkonzentration wurde durch Ionenaustausch-HPLC auf einer Dionex DNAPac-Säule bestimmt.

[0241] Der RNA-Peakbereich wurde durch Größenausschluss-HPLC auf einer Toso-Haas TSK-Gel G-DNA-PW, in Reihe geschaltet mit einer G3000 SWXL-Säule, bestimmt. Laufpuffer: 0,1 M Tris + 0,3 M NaCl + 1 mM EDTA, pH 7,5. Flussrate = 0,3 ml/min. Der RNA-Gehalt ist die Menge an RNA als Prozentanteil der Nukleinsäuren.

Resultate

a) UF1-Beladungslysate nach Calciumchlorid-Präzipitation mit Rezirkulierung

[0242] Die Resultate sind nachfolgend in Tabelle 6 gezeigt, die zeigt: Effekt einer zunehmenden Nukleinsäurebeladung auf die Leistungsfähigkeit des UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation.

Tabelle 6

UF1-Beladung (mg Plasmid/ft ²)	Plasmid-Rückgewinnung (IA-HPLC)	RNA-Gehalt (GA-HPLC)
60,0	109,9 %	2,61 %
108,0	121,5 %	4,51 %

[0243] Vorangegangene Experimente auf einem Millipore Labscale-TFF-System, ausgestattet mit einer Niedrigvolumen-Centramat-300K-Omega-Membran, 0,1 ft², deuteten daraufhin, dass in Gegenwart von Calciumchloridsalz signifikante Mengen an Plasmid durch die Membran verloren gingen. Daher wurde eine 100K-Membran anstelle verwendet, mit keinen signifikanten Plasmidverlusten. Jedoch war die Plasmid-Rückgewinnung niedriger als erwartet, wobei dies jedoch unter Verwendung eines niedrigeren Ausgangs-TMP von 5 psi, anstelle von 10 psi, berichtigt wurde. Die RNA-Beseitigung wurde, wie in UF1, ohne Calciumchlorid, unter

Verwendung eines Diafiltrationspuffers mit niedriger Ionenstärke maximiert.

[0244] Ein 1 ft²-Centramat-System wurde verwendet, um die Labscale-Resultate zu bestätigen, wobei 60,0 mg des Plasmids pro Quadratfuß der Membran in Gegenwart von 1 M Calciumchloridsalz beladen wurde.

[0245] Die Plasmid-Rückgewinnung war sehr hoch, bei über 100 %, und die RNA-Beseitigung war mit nur 2,61 % RNA-Gehalt im UF1-Retentat sehr effektiv (Tabelle 6). Im Gegensatz zum UF1 ohne Calciumchlorid wurde die RNA während der Aufkonzentration und den ersten 10 Diafiltrationsvolumina beseitigt.

[0246] Die Membranbeladung wurde dann auf 108 mg Plasmid/ft² erhöht, mit gleichen Resultaten in der Plasmid-Rückgewinnung (> 100 %) und RNA-Beseitigung (4,51 % Gehalt im UF1-Retentat).

[0247] Die Diafiltration wurde in zwei Schritten durchgeführt: Zum Ersten wurden 30 Volumina an 10 mM Tris, pH 8,5 verwendet, um die RNA-Beseitigung zu maximieren. Dies wurde von 20 Volumina an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefolgt, um den Puffer, der das Plasmid enthält, auszutauschen und es so für die direkte Beladung einer Fractogel TMAE-Säule vorzubereiten.

b) UF1-Beladungslysats nach Calciumchlorid-Präzipitation ohne Rezirkulierung

[0248] UF1, ohne Rezirkulierung, um eine Gelschicht aufzubauen, wurde mit Calciumchlorid-behandeltem Lysat durchgeführt. Nur sehr kleine Mengen an Plasmid wurden im Permeat detektiert (0,2 %) und die Plasmid-Rückgewinnung war sehr hoch (über 100 %). Der RNA-Gehalt im UF1-Retentat war 4,64 % (Tabelle 7). Tabelle 7: illustriert den Effekt der Nukleinsäurekonzentration in der Beladung auf die Leistungsfähigkeit des UF1 ohne Rezirkulierung in Gegenwart von Calciumchlorid.

Tabelle 7

UF1-Beladung (mg Plasmid/ft ²)	Plasmidkonzentration (µg/ml)	Plasmid-Rückgewinnung			RNA-Gehalt (GA-HPLC)
		Konzentrationspermeat	Diafiltrationspermeat	UF1-Retentat	
126,5*	69,9	0,2 %	0	108,8 %	4,64 %
109,3**	60,7	1,3 %	0	90,5 %	0
129,6**	36,0	5,9 %	7,2 %	82,7 %	1,93 %

Plasmidkonstrukt: *7,7 kbp, **5,9 kbp

[0249] Der Schritt zur Entfernung der Zelltrümmer nach Neutralisierung und der Calciumchlorid-Präzipitantentfernungsschritt wurden kombiniert. Eine Calciumchlorid-Stammlösung von 3 M wurde verwendet, um das Verfahrensvolumen zu minimieren. 0,66 Volumen der Stammlösung wurden direkt zu 1 Volumen des Lysats nach Neutralisierung gegeben. Das Gemisch wurde durch einen Maschenfilter passiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und dann durch einen "Depth"-Filter, um feinere Partikel zu entfernen. Dieses Verfahren war schneller als die Zentrifugation und ist ebenso einfacher zu kontrollieren. Der zweite Diafiltrationspuffer wurde ebenfalls verändert, wobei 0,54 M NaCl durch 0,45 M NaCl ersetzt wurde. Das Plasmidkonstrukt wurde auf eine kleinere Größe verändert, von (7,7 Kbp) auf (5,9 Kbp).

[0250] Die Plasmidverluste im Konzentrationspermeat waren um 1,3 % höher, was auf die kleinere Plasmidgröße zurückzuführen sein könnte. Die Plasmid-Rückgewinnung war 90,5 % und keine RNA wurde im UF1-Retentat detektiert (Tabelle 7).

[0251] Das Lysat wurde dann 2fach mit Konzentrationspermeat verdünnt, das aus einem vorherigen Lauf war, bevor Calciumchlorid zugegeben wurde, so dass die Plasmidkonzentration in der UF1-Beladung von 60,7 auf 36 µg/ml reduziert wurde. Die Plasmidverluste im Konzentrationspermeat nahmen auf 5,9 % signifikant zu, und die Plasmidrückgewinnung war mit 82,7 % niedriger. Dies könnte darauf hinweisen, dass kleinere Plasmide von einem wenig produzierenden Wirtstamm niedrigere Rückgewinnungen im UF1-Arbeitsgang ergeben könnten.

[0252] Eine Anzahl an Schlussfolgerungen kann von den Resultaten der Experimente, die in Beispiel 14 aufgeführt sind, gezogen werden.

1. RNA schien zu der Gelschicht während der Rezirkulierung beizutragen, so dass nur niedrigere Level durch die Membran während der Aufkonzentration beseitigt wurden.
2. Die Ionenstärke des Diafiltrationspuffers war der wichtigste Faktor beim Entfernen der RNA: eine niedrige Leitfähigkeit erhöhte signifikant das Passieren der RNA durch die Membran während der Diafiltration, obwohl der genaue Mechanismus nicht verstanden wird.
3. 50 Diafiltrationsvolumina sind empfehlenswert, um eine gründliche RNA-Beseitigung zu ergeben.
4. Eine Membran-Porengröße von 300 K ist empfehlenswert für Plasmidgrößen von 5 Kbp oder darüber.
5. Der andere wichtige Faktor in der Entfernung der RNA war die Nukleinsäurebelastung: eine niedrigere Belastung resultierte in einer höheren Entfernung.
6. Die Zugabe von Calciumchlorid zum Lysat, um RNA zu präzipitieren, benötigte die Modifizierung der für den UF1-Schritt verwendeten Bedingungen.
 - i) Eine kleinere Membran, z.B. 100 K, war notwendig, um Plasmidverluste zu verhindern.
 - ii) Ein niedrigerer TMP (5 psi) war ebenfalls wünschenswert, um die Plasmid-Rückgewinnung zu verbessern.

[0253] Nach der Präzipitierung mit Calciumchlorid war nur RNA mit niedrigem Molekulargewicht übrig, und diese wurde effizient durch den Ultrafiltrationsschritt entfernt.

7. Rezirkulierung zum Polarisieren der Membran wurde als unnötig in einem RNase-freien Verfahren in Gegenwart oder Abwesenheit von Calciumchlorid befunden. Dies kann aufgrund der Gegenwart von großen Mengen an RNA sein, die zu Beginn der Zentrifugation schnell polarisieren. Jedoch erzeugte das Reduzieren der Nukleinsäurebelastung keine Verluste des Plasmids im Vergleich, wenn RNase während der Lyse hinzugegeben und die Rezirkulierung nicht durchgeführt wurde. In Gegenwart von Calciumchlorid wurde ein kleineres Plasmidkonstrukt durch das UF1 mit der Hälfte der normalen Konzentration verarbeitet mit nur minimalen Verlusten des Plasmids durch die Membran. Dies zeigt die Robustheit des UF1-Schritts in Gegenwart von Calciumchlorid ohne Rezirkulierung.

[0254] In Anbetracht der oben aufgeführten Feststellungen machte der Anmelder weiter, um festzustellen, ob er ein Verfahren, das Calciumchlorid, als ein Beispiel für ein anti-chaotrophes Salz, verwendet, weiter optimieren kann. Er untersuchte drei alternative Schemata, und die Resultate dieser Untersuchungen sind nachfolgend in Beispiel 15 wiedergegeben:

Beispiel 15

[0255] Die drei untersuchten Schemata waren:

Option 2	Option 3	Option 4
Geklärtes Lysat	Geklärtes Lysat	Lysat
UF1	UF1	Calciumchlorid-präzipitation
Calciumchlorid-präzipitation	Calciumchlorid-präzipitation	Klärung
Fractogel TMAE	UF2	UF1
	Fractogel TMAE	Fractogel TMAE

Verfahren

Lyse

[0256] 100 g einer bakteriellen Zellpaste, die bei -70°C gelagert wurde, wurde durch einen Hammer in kleine Teile zerbrochen. 500 ml eines Resuspensionspuffers wurde bei Raumtemperatur zu einem Bellco-Resuspensionsbehälter gegeben. Die zerbrochene Zellpaste wurde zum Behälter gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Verwendung eines magnetischen Rührers gerührt, der auf 8 eingestellt war.

[0257] Umgehend vor der Lyse wurden 834 ml an kalter 0,96 % NaOH zu 166 ml an 6 % SDS im Kälteraum zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 3 l-Becherglas überführt, das einen Heidolph-Überkopfrührer hatte, und in den Kälteraum gestellt. Das Lysegemisch wurde zur Zellresuspension gegeben und für 30 Minuten bei 40 Upm gerührt.

[0258] 500 ml an 3 M Kaliumacetat wurde zum Lysat gegeben und für 30 Minuten bei 80 Upm bei 4°C gerührt.

[0259] Das Lysat wurde bei 8.000 g für 10 Minuten in einer Sorvall RC5C Plus-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Doppelschicht an Miracloth filtriert, dann durch einen 5 µm Sartopure PP2-Filter, gefolgt von einem 0,45/0,2 µm Sartobran P-Filter passiert. Dieses Material wurde als geklärtes Lysat bezeichnet.

UF1

[0260] Eine Lagerungslösung wurde aus einem Ultrafiltrationssystem, bestehend aus einer Pall-Filtron-Centramat-Vorrichtung, ausgestattet mit einer 1 ft² großen 300 K-Omega-Centramat-Open-Channel-Membran entleert und das System mit Diafiltrationspuffer (10 mM Tris, pH 8,0) gewaschen.

[0261] Das Reservoir wurde mit ca. 500 ml des geklärten Lysats gefüllt und an eine Flasche angeschlossen, die den Rest des Lysats enthielt. Die Rezirkulierung wurde durch Anschluss der Permeatleitung an das Reservoir durchgeführt. Die Watson-Marlow-Pumpe wurde auf 155 Upm eingestellt (Querflussrate von 1 l/min/ft²) und der TMP wurde auf 5 psi eingestellt. Die Rezirkulierung dauerte 20 Minuten, wobei während dieser Zeit dem TMP nicht gestattet wurde, über 10 psi zu steigen.

[0262] Das geklärte Lysat wurde durch Verbinden der Permeatleitung an eine 2 l-Flasche auf 75 ml aufkonzentriert (Konzentrationspermeat).

[0263] Die Diafiltration wurde durch Anschließen des Reservoirs an die Diafiltrationspufferflasche gestartet, so dass verloren gegangenes Filtrat durch frischen Puffer bei gleicher Rate ersetzt wurde. Das Diafiltrationspermeat wurde in 5 × 1 l-Flaschen gesammelt. 50 Volumina (5 l) des Diafiltrationspuffers wurde verwendet.

[0264] Am Ende der Diafiltration wurde das Retentatventil geöffnet (kein Rückdruck), die Permeatleitung geschlossen und die Inhalte des UF-Systems für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentaternte).

[0265] Das Reservoir wurde mit 75 ml an frischem Diafiltrationspuffer aufgefüllt und für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentatwäsche 1). Dies wurde einmal wiederholt (Retentatwäsche 2).

[0266] Die UF1-Retentaternte und die beiden Wäschen wurden vereinigt und durch einen Gelman Science 0,45 µm-Filter passiert.

[0267] Das UF1-System wurde dann durch Rezirkulieren von 500 ml an 0,5 M Na-OH für 1 Stunde desinfiziert.

[0268] Das UF1-System wurde in 0,1 M NaOH gelagert.

Calciumchloridpräzipitation

[0269] Zu 1 Volumen an UF1-Retentat wurde 0,12 Volumen an 2,8 M Calciumchlorid in 0,1 M Tris, pH 8,0, gegeben, so dass die Endkonzentration an Calciumchlorid 0,3 M war. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

[0270] Das Gemisch wurde dann zweifach mit 0,1 M Tris, pH 8,5, verdünnt, um eine Endkonzentration des Calciumchlorids von 0,15 M zu ergeben. Das Präzipitat wurde dann durch Passieren durch 3 × 25CE-Filter, gefolgt von 4 × 40 CE-Filtern und schließlich 2 × 0,45/0,2 µm Sartobran P-Filtern abfiltriert.

[0271] Dieses Material wurde als das UF1 nach Calciumchloridpräzipitation bezeichnet.

Fractogel-TMAE-Anionenaustausch-Chromatographie

[0272] Eine 20 ml Fractogel-TMAE-Säule (1,6 × 10 cm) wurde mit 10 Säulenvolumina an 50 mM Tris, pH 8,5, bei einer Flussrate von 5.1 ml/min (152 cm/h) äquilibriert.

[0273] Die Säule wurde mit ca. 2.5 mg Plasmid pro ml Säule mit verdünntem UF1 nach Calciumchloridpräzipitation beladen. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumina an 50 mM Tris, pH 8,5, gefolgt von 5 Säulenvolumina an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gewaschen.

[0274] Das Plasmid wurde mit einem 10 Säulenvolumen-Gradienten von 0,54 bis 3 M NaCl in 50 mM Tris, pH 8,5, eluiert.

[0275] Die Säule wurde mit 4 Säulenvolumina an 50 mM Tris + 3 M NaCl, pH 8,5 regeneriert.

[0276] Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina an 50 mM Tris, pH 8,5 reäquilibriert.

UF2

[0277] Die Lagerungslösung wurde aus einem Ultrafiltrationssystem, bestehend aus einem Millipore Labscale-System, ausgestattet mit einer 0,1 ft² großen 100 K-Omega-Centramat-Open-Channel-Membran, entleert und das System mit Diafiltrationspuffer (10 mM Tris, pH 8,0) gewaschen.

[0278] Das Reservoir wurde mit dem UF1-Material nach Calciumchloridpräzipitation gefüllt. Die Rezirkulierung wurde durch Verbinden der Permeatleitung an das Reservoir durchgeführt. Die Pumpe wurde auf 4 eingestellt (Querflussrate von 1 l/min/ft²), und der TMP wurde auf 5 psi eingestellt. Die Rezirkulierung dauerte 20 Minuten, wobei während dieser Zeit dem TMP nicht erlaubt wurde, über 10 psi zu steigen.

[0279] Das UF1 nach Calciumchloridpräzipitation wurde durch Verbinden der Permeatleitung an eine 500 ml-Flasche auf 35 ml aufkonzentriert (Konzentrationspermeat).

[0280] Die Diafiltration wurde durch Verbinden des Reservoirs an eine Flasche mit 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, gestartet, so dass verlorengegangenes Filtrat durch frischen Puffer bei gleicher Rate ersetzt wurde. Die Diafiltration erfolgte gegen 40 Volumina an 10 mM Tris, pH 8,0, gefolgt von 10 Volumina an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5. Das Diafiltrationspermeat wurde in 4 × 500 ml Flaschen gesammelt.

[0281] Am Ende der Diafiltration wurde das Retentatventil geöffnet (kein Rückdruck), die Permeatleitung geschlossen und die Inhalte des UF-Systems für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF2-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentaternte).

[0282] Das Reservoir wurde mit 50 ml an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefüllt und für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentatwäsche 1). Dies wurde einmal wiederholt (Retentatwäsche 2).

[0283] Die UF1-Retentaternte und die beiden Wäschen wurden vereinigt und durch einen Sterivex-GV-Filter passiert.

[0284] Das UF1-System wurde durch Rezirkulieren von 100 ml an 0,5 M NaOH für 1 Stunde desinfiziert.

[0285] Das UF1-System wurde in 0,1 M NaOH gelagert.

Verfahrensoption 2

[0286] Die alkalische Lyse wurde wie zuvor durchgeführt, gefolgt wie zuvor von UF1 und Calciumchloridpräzipitation. 237 ml des UF1 nach Calciumchloridpräzipitation wurden auf eine Fractogel-TMAE-Säule geladen. 240 ml Durchbruch und Wäsche (Peak 1) sowie 75 ml Eluat (Peak 2) wurden gesammelt.

[0287] 280 ml UF1-Retentat wurde hergestellt, jedoch wurden nur 210 ml nach Filtrierung zurückgewonnen. Einiges an Material war auf den Filtern und einiges war aufgrund eines Lecks verlorengegangen.

[0288] 482 ml des verdünnten UF1-Retentats nach Calciumchloridpräzipitation wurde hergestellt. Nur 400 ml wurden nach Filtrierung rückgewonnen.

Verfahrensoption 3

[0289] Diese Option ist mit 2 dahingehend gleich, als dass die alkalische Lyse durchgeführt wurde, gefolgt von UF1 und Calciumchloridpräzipitation, mit der Ausnahme, dass das UF1-Retentat nach Calciumchloridpräzipitation nicht verdünnt wurde.

[0290] Ein Ultrafiltrationsschritt (UF2) wurde eingeführt, um Calciumchloridsalze, die sonst die Chromatogra-

phiesäule beeinflussen, zu entfernen.

[0291] 90 ml des UF2-Retentats wurde auf eine 20 ml Fractogel TMAE-Säule wie zuvor beladen, mit der Ausnahme, dass der 10 Säulenvolumengradient 0,54 bis 1 M NaCl in 50 mM Tris, pH 8,5, war.

[0292] 315 ml des UF1-Retentats wurde hergestellt, jedoch wurden nur 295 ml nach Filtrierung zurückgewonnen.

[0293] 330 ml des UF1 nach Calciumchloridpräzipitation wurde hergestellt, jedoch wurden nur 320 ml nach Filtrierung zurückgewonnen.

Verfahrensoption 4

Lyse

[0294] Der Lyseschritt war wie zuvor beschrieben, mit der Ausnahme, dass nicht, wie zuvor beschrieben, zentrifugiert wurde. An dessen Stelle wurde das Lysat einer Calciumchloridpräzipitation unterzogen und Zelltrümmer, wie nachfolgend aufgeführt, entfernt:

Calciumchloridpräzipitation und Entfernen der Zelltrümmer

[0295] Eine 20 ml Probe des Lysats wurde in einer MSE Mistral 2000 bei 2.500 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als das geklärte Lysat bezeichnet.

[0296] Zu 2.100 ml des Lysats wurden 1.960 ml an 2 M CaCl_2 unter Rühren gegeben und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

[0297] Das Gemisch wurde auf eine Plastok-Halterung, ausgestattet mit einem Maschenfilter, 350 mm, 200 μm , geschüttet, um Zelltrümmer zu entfernen, und das Filtrat wurde unter Schwerkraft in einem 5 l-Becherglas gesammelt. Das Filtrat wurde dann durch eine Millistak 15CE-"Depth"-Filterkartusche, gefolgt von einem 0,45/0,2 μm Sartobran P-Filter passiert. Das Filtrat wurde als das Lysat nach Calciumchlorid bezeichnet (Volumen = 3.350 ml).

UF1

[0298] Lagerungslösung wurde aus einem Ultrafiltrationssystem, bestehend aus einer Pall-Filtron-Centramat-Vorrichtung, ausgestattet mit einer 1 ft^2 großen 100K-Omega-Centramat-Open-Channel-Membran, entleert und das System mit Diafiltrationspuffer (10 mM Tris, pH 8,0) gewaschen.

[0299] Das Reservoir wurde mit ca. 500 ml des Lysats nach Calciumchloridpräzipitation gefüllt und an eine Flasche angeschlossen, die den Rest des Lysats enthielt. Die Rezirkulierung wurde durch Anschließen der Permeatleitung an das Reservoir durchgeführt. Die Watson-Marlow-Pumpe wurde auf 155 Upm eingestellt (Querflussrate von 1 l/min/ ft^2), und der TMP wurde auf 5 psi eingestellt. Die Rezirkulierung dauerte 20 Minuten, wobei während dieser Zeit dem TMP nicht erlaubt wurde, über 10 psi zu steigen.

[0300] Das geklärte Lysat wurde durch anschließen der Permeatleitung an eine 2 l-Flasche auf 75 ml aufkonzentriert (Konzentrationspermeat).

[0301] Die Diafiltration wurde durch Anschließen des Reservoirs an eine Flasche mit 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, gestartet, so dass verlorengegangenes Filtrat durch frischen Puffer bei gleicher Rate ersetzt wurde. Die Diafiltration wurde mit 35 Volumina an 10 mM Tris, pH 8,0, gefolgt von 15 Volumina an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, durchgeführt. 5 × 1 l Proben des Diafiltrationspermeats wurden gesammelt.

[0302] Am Ende der Diafiltration wurde das Retentatventil geöffnet (kein Rückdruck), die Permeatleitung geschlossen und die Inhalte des UF-Systems für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch öffnen der Retentatleitung zurückgewonnen (Retentaternte).

[0303] Das Reservoir wurde mit 100 ml an 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, pH 8,5, gefüllt und für 30 Minuten rezirkuliert. Das UF1-diafiltrierte Konzentrat wurde durch Öffnen der Retentatleitung rückgewonnen (Retentatwäsche 1). Dies wurde einmal wiederholt (Retentatwäsche 2).

[0304] Die UF1-Retentaternte und die beiden Wäschen (Volumen = 290 ml) wurden vereinigt und durch einen Gelman Science 0,45 µm-Filter passiert (Endvolumen = 270 ml).

Fractogel-TMAE-Anionenaustausch-Chromatographie

[0305] Diese wurde wie zuvor durchgeführt, mit der Ausnahme, dass der 10 Säulenvolumengradient 0,54 bis 1 M NaCl in 50 mM Tris, pH 8,5, war.

[0306] 125 ml des UF1-Retentats wurde auf eine Säule geladen. 135 ml an Durchfluss und Wäsche (Peak 1) sowie 135 ml an Eluat (Peak 2) wurden gesammelt.

[0307] Die Proben wurden, wie nachfolgend ausgeführt, einer Analyse unterzogen:

Probenanalyse:

Ionenaustausch-HPLC

[0308] Die Plasmidkonzentration wurde durch Anionenaustausch-HPLC auf einer Dionex DNAPac PA-100-Säule (4 × 250 mm) gemäß dem Standardprotokoll bestimmt. Die Proben wurden mit RNase verdaut, um jegliche störende RNA zu entfernen: 2 µl bovine Penkreas-RNase wurde zu 100 µl Probe gegeben.

[0309] Die Plasmidstruktur wurde durch Anionenaustausch-HPLC auf einer TSK DNA-NPR-Säule (4,6 mm × 7,5 cm, 2,5 µm) gemäß dem Standardprotokoll bestimmt.

RNA-Test

[0310] Die RNA-Konzentration wurde durch BAD unter Verwendung eines auf reverse-Phase-HPLC-basierenden Tests bestimmt.

[0311] Das Plasmid/RNA-Verhältnis wurde durch Größenausschluss-HPLC auf einer TSK G-DNA-PW-Säule (7,8 mm × 30 cm, 10 µm), gekoppelt an eine TSK G3000 SWXL-Säule (7,8 mm × 30 cm, 5 µm) bestimmt. Die mobile Phase war 0,1 M Tris + 0,3 M NaCl + 1 mM EDTA, pH 7,5. Die Flussrate war 0,3 ml/min. Die Probeninjektion war 100 µl.

Proteintest

[0312] Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Micro-BCA-Proteintest-Reagenzkits von Pierce bestimmt. Eine Standardkurve wurde unter Verwendung einer BSA-Lösung im Bereich von 0,625 bis 20 µg/ml aufgetragen. Die Proben wurden geeigneterweise mit PBS verdünnt, um in den Bereich der BSA-Standards zu fallen.

Endotoxintest

[0313] Die Endotoxin-Konzentration wurde durch Pharmaceutical Microbiology unter Verwendung eines Standard-LAL-Tests bestimmt.

Test auf genomische DNA

[0314] Die Konzentration an genomischer DNA wurde durch BAD unter Verwendung eines quantitativen PCR-Tests bestimmt.

Entsalzen

[0315] Proben, die hohe Level an Calciumchloridsalz enthielten (Lysat nach Calciumchloridpräzipitation, UF1-Konzentrationspermeat, UF1-Diafiltrationspermeat) wurden vor der Analyse entsalzt. Die Proben der Verfahren 2 und 3, die Calciumchloridsalz enthielten, wurden nicht entsalzt, da die geringe Konzentration in den Tests nicht störend war.

[0316] 2 ml Probe wurde auf in Reihe geschalteten 2 × 5 ml HiTrap-Entsalzungssäulen, die mit 50 mM Tris, pH 8,5 äquilibriert waren, bei einer Flussrate von 5 ml/min geladen und ein 4,5 ml entsalzter Peak mit einer

Absorption bei 254 nm wurde gesammelt.

Resultate und Diskussion

[0317] Die Volumina, die für die ganzen Berechnungen verwendet wurden, wurden auf Verluste, die während dem Filtrieren auftraten, korrigiert. Dies erlaubte einen besseren Vergleich zwischen jeder Option.

Auswahl der Verfahrensoption: Option 2

[0318] Das geklärte Lysat wurde durch einen modifizierten UF1-Schritt aufbereitet, um das Entfernen der RNA zu maximieren. Dies schloss das Diafiltrieren mit 50 Volumina an Puffer mit geringer Ionenstärke und die Verwendung eines Ausgangs-TMP von 5 psi ein. Die Plasmidbeladung auf die 1 ft² große 300K-PES-Membran war 136,4 mg des Plasmids pro Quadratfuß. Die verbleibende RNA wurde dann mit 0,3 M Calciumchlorid für 10 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert. Das Gemisch wurde 1:1 auf eine Calciumchloridsalzkonzentration von 0,15 M verdünnt, und das Präzipitat durch Filtrieren entfernt. Das Filtrat wurde dann direkt auf eine Fractogel-TMAE-Anionenaustauschsäule geladen. Die Verdünnung war notwendig, um zu verhindern, dass das Calciumchloridsalz die Bindung des Plasmids an die Säule stört. Die Säule wurde mit 2,47 mg Plasmid pro ml Säule beladen, mit 50 mM Tris gewaschen, um frühes Eluieren des Plasmids zu verhindern, gefolgt von 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, um die verbleibende RNA zu eluieren. Das Plasmid wurde mit einem Salzgradienten eluiert.

[0319] Die gesamte Plasmid-Rückgewinnung war bei 89,2 % hoch (siehe nachfolgende Tabelle 8).

Tabelle 8

	Volumen (ml)	Plasmidkonzentration (µg/ml)	Schrittrückgewinnung	Gesamtrückgewinnung
Lysat	1.800	75,8	NA	NA
UF1-Konzentra	1.700	0	0	0
UF1-Diafiltration-spermeat	5.000	0	0	0
UF1-Retentat	280	381,8	78,3 %	78,3 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	480	208,7	124,9 %	97,9 %
TMAE Peak 1	240	0	0	0
TMAE Peak 2	75	601,1	91,1 %	89,2 %

[0320] Der UF1-Schritt ergab eine Rückgewinnung von 78,3 %, während die Rückgewinnung des Calciumchlorid-Präzipitationsschritts größer als 100 % war. Die Rückgewinnung über den Chromatographieschritt war 91,1 %.

[0321] Die Gesamt-Entfernung der RNA war 99,84 % (siehe nachfolgende Tabelle 9).

Tabelle 9

	Volumen (ml)	RNA-Konzentration (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	1.579,1	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.700	123,2	7,4 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	354,8	62,0 %	NA
UF1-Retentat	280	2.552,4	74,9 %	74,9 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	480	6,25	99,4 %	99,86 %
TMAE Peak 1	240	18,21	> 100 %	NA
TMAE Peak 2	75	21,95	0 %	99,84 %

[0322] Der verbesserte UF1-Schritt führte zu einer RNA-Beseitigung von 74,9 %. Die Tatsache, dass das meiste der RNA während der Diafiltration beseitigt wurde, und dass die verbleibende RNA im wesentlichen von hohem Molekulargewicht war, weist darauf hin, dass die RNA ursprünglich an der Gelschicht beteiligt war, jedoch dann durch den Diafiltrationspuffer mit niedriger Ionenstärke "wiedergelöst" wurde, und dieser ermöglichte aufgrund ihrer geringen Größe, durch die Membran zu passieren. 99,44 % der RNA, die im UF1-Retentat zurückgewonnen wurde, wurde dann durch Behandlung mit Calciumchlorid präzipitiert. Es ist wohl bekannt, dass Calciumchlorid ein besonders potenter Präzipitant von RNA mit hohem Molekulargewicht ist. Die Anionenaustauschsäule jedoch ermöglichte keine weitere Entfernung der RNA, obwohl RNA im Säulendurchfluss detektiert wurde: hier scheint ein Widerspruch in den RNA-Testresultaten.

[0323] Die Analyse durch Größenausschluss-HPLC zeigt den Effekt der Behandlung mit Calciumchlorid: das Plasmid/RNA-Verhältnis stieg von 16,11 % im UF1-Retentat auf 89,76 % nach Präzipitation mit Calciumchlorid (siehe nachfolgende Tabelle 10).

Tabelle 10

	% Plasmid	% RNA
UF1-Retentat	16,11 %	83,89 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	89,76 %	10,24 %
TMAE Peak 1	0 %	100,0 %
TMAE Peak 2	98,95 %	1,05 %

[0324] Am Ende des Verfahrens war der RNA-Gehalt nur 1,05 %.

[0325] Die Analyse der Plasmidstruktur durch Ionenaustausch-HPLC zeigt, dass das Verfahren die Level der Plasmid-Isoformen nicht beeinflusste: während des gesamten Verlaufs des Verfahrens waren 96 % der Plasmide supercoiled mit ca. 3,4 % multimerisch (siehe nachfolgende Tabelle 11).

Tabelle 11

	% Offener Ring	% Supercoiled	% Multimere
UF1-Retentat	0,77 %	95,76 %	3,47 %
UF1 nach Calciumchlorid-präzipitation	0 %	96,69 %	3,31 %
TMAE Peak 2	0 %	96,57 %	3,43 %

[0326] Der UF1-Schritt entfernte 99,87 % der Proteine (siehe nachfolgende Tabelle 12).

Tabelle 12

	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	5.768,6	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.700	5.565,5	91,1 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	277,8	13,3 %	NA
UF1-Retentat	280	52,6	99,87 %	99,87 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	480	ND*	ND	ND
TMAE Peak 1	240	ND	ND	ND
TMAE Peak 2	75	0	100,0 %	100,0 %

* Ein unklares Präzipitat bildete sich aufgrund der Gegenwart von Calciumchloridsalz

[0327] Proteine sind klein genug, um effektiv durch eine 300K-Membran beseitigt zu werden. Am Ende des Verfahrens konnte kein Protein im Fractogel-TMAE-Eluat detektiert werden.

[0328] Die Gesamtentfernung des Endotoxins war mit mehr als 99,94 % hoch (siehe nachfolgende Tabelle 13).

Tabelle 13

	Volumen (ml)	Endotoxinkonzentration (EU/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	102,0	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.700	< 5,0	< 4,6 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	44,0	119,8 %	NA
UF1-Retentat	280	540,5	17,6 %	17,6 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	480	< 25,0	> 89,4 %	> 91,3 %
TMAE Peak 1	240	0,65	NA	NA
TMAE Peak 2	75	< 0,50	NA	> 99,94 %

[0329] Der Calciumchloridschritt ergab eine hohe Entfernung des Endotoxins: mehr als 89,4 %. Der Anionenaustauschschritt besorgte ebenfalls eine Endotoxin-Beseitigung, obwohl der genaue Wert nicht berechnet werden konnte.

[0330] Der UF1-Schritt hatte keinen signifikanten Effekt auf die Endotoxinlevel: nur 17,6 % wurde in diesem Arbeitsgang beseitigt.

[0331] Level an genomischer DNA wurden durch eine Kombination an Schritten reduziert: 55 % Reduzierung für den UF1-Schritt, 77,6 % für den Calciumchloridschritt und 66,1 % für den Anionenaustauschschritt (siehe nachfolgende Tabelle 14, die den Effekt der Nukleinsäurekonzentration in der Beladung auf die Leistungsfähigkeit des UF1 ohne Rezirkulierung in Gegenwart von Calciumchlorid zeigt).

Tabelle 14

UF1-Beladung (mg Plasmid/ft ²)	Plasmidkonzentration (µg/ml)	Plasmid-Rückgewinnung			RNA-Gehalt (GA-HPLC)
		Konzentrationspermeat	Diafiltrationspermeat	UF1-Retentat	
126,5*	69,9	0,2 %	0	108,8 %	4,64 %
109,3**	60,7	1,3 %	0	90,5 %	0
129,6**	36,0	5,9 %	7,2 %	82,7 %	1,93 %

Plasmidkonstrukt: *7,7 kbp, **5,9 kbp

[0332] Die Gesamtbeseitigung war 96,6 %. Der Calciumchloridschritt hatte nicht die erwartete Auswirkung, wahrscheinlich aufgrund der verwendeten niedrigen Konzentration von 0,3 M.

Auswahlverfahrensoption: Option 3

[0333] Option 3 war sehr ähnlich zu 2, mit der Ausnahme, dass ein zweiter UF-Schritt eingeführt wurde, um Calciumchloridsalze vor der Beladung auf die Anionenaustauschsäule zu entfernen. Die Membran, die für den UF2-Schritt verwendet wurde, hatte einen niedrigeren Molekulargewichtsausschluss von 100K, um Verluste des Plasmids in Gegenwart des Calciumchloridsalzes zu verhindern. Ein Puffer mit niedriger Ionenstärke wurde zu Beginn der Diafiltration verwendet, um die Beseitigung der RNA zu fördern, gefolgt von 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, um den Puffer vor der Beladung auf die Chromatographiesäule auszutauschen. Ein niedriger Ausgangs-TMP von 5 psi wurde ausgewählt, um die Plasmid-Rückgewinnung zu verbessern. Die Membranbeladung war 909 mg des Plasmids pro Quadratfuß der Membran.

[0334] Das meiste der zurückgehaltenen RNA wurde durch Aufkonzentration und frühe Diafiltration beseitigt. Der Anionenaustauschschritt wurde wie für Option 2 durchgeführt.

[0335] Die Plasmid-Rückgewinnung über den UF1-Schritt war 74,5 %, dann über 100 % über den Calciumchlorid-Präzipitationsschritt und 71,1 % für den UF2-Schritt (siehe nachfolgende Tabelle 15).

Tabelle 15

	Volumen (ml)	Plasmid-Konzentration (µg/ml)	Schrittrückgewinnung	Gesamtrückgewinnung
Lysat	1.800	71,2	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.730	0	0	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	0	0	NA
UF1-Retentat	315	303,0	74,5 %	74,5 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	330	284,3	105,0 %	78,2 %
UF2-Konzentrationspermeat	260	2,0	0,6 %	NA
UF2-Diafiltrationspermeat	1.000	0,77	0,8 %	NA
UF2-Retentat	105	635,2	71,1 %	57,3 %
TMAE Peak 1	105	201,6	37,0 %	21,2 %
TMAE Peak 2	90	305,8	41,3 %	27,6 %

[0336] Ein Absorptionspeak wurde im Durchfluss der Fractogel-TMAE-Säule detektiert: 37 % des Plasmids war im Durchfluss verloren gegangen, mit 41,3 % Rückgewinnung im Eluat. Die Gesamtrückgewinnung der

vereinigten Fraktionen war 48,8 %. Obwohl die Säulenbeladung 2,86 mg des Plasmids pro ml Säule war, ist es zweifelhaft, dass dies für den beobachteten hohen Verlust an Plasmid verantwortlich ist. Der Beladungspuffer war ebenfalls anders: Die Säule wurde beladen in 0,15 M Calciumchlorid und 0,1 M Tris in Option 2 im Vergleich zu 50 mM Tris + 0,54 M NaCl für Option 3, so dass die Ionenstärke des Beladungspuffers zu hoch gewesen sein könnte.

[0337] Gesamtentfernung der RNA war bei 99,985 % hoch (siehe nachfolgende Tabelle 16).

Tabelle 16

	Volumen (ml)	RNA-Konzentration (µg/ml)	Schrittrückgewinnung	Gesamtrückgewinnung
Lysat	1.800	1.749,5	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.730	117,2	6,4 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	357,0	56,7 %	NA
UF1-Retentat	315	2.281,9	77,2 %	77,2 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	330	25,0	98,8 %	99,72 %
UF2-Konzentrationspermeat	260	185,4	> 100,0 %	NA
UF2-Diafiltrationspermeat	1.000	10,74	> 100,0 %	NA
UF2-Retentat	105	19,12	74,9 %	99,93 %
TMAE Peak 1	105	5,84	35,6 %	NA
TMAE Peak 2	90	4,20	78,0 %	99,985 %

[0338] Die RNA-Beseitigung war 77,2 % für den UF1-Schritt, 98,8 % für den Calciumchlorid-Präzipitations-schritt, 74,9 % für den UF2-Schritt und 78 % für die Chromatographiesäule. Diese Resultate sind denen aus Verfahren 2 erhaltenen sehr ähnlich, mit Ausnahme der zusätzlichen Beseitigung, die der UF2-Schritt lieferte.

[0339] Die Analyse durch Größenausschluß-HPLC zeigt eine Zunahme im Plasmid/RNA-Verhältnis im UF1-Retentat von 17,02 % auf 92,25 % nach Präzipitation mit Calciumchlorid, 95,24 % im UF2-Retentat und 98,91 % nach dem Anionenaustausch-Chromatographieschritt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17

	% Plasmid	% RNA
UF1-Retentat	17,02%	82,98 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	92,25 %	7,75 %
UF2-Konzentrationspermeat	22,67 %	77,33 %
UF2-Diafiltrationspermeat	4,93 %	95,07 %
UF2-Retentat	95,24 %	4,76 %
TMAE Peak 1	92,01 %	7,99 %
TMAE Peak 2	98,91 %	1,09 %

[0340] Die Analyse der Plasmidstruktur durch Ionenaustausch-HPLC zeigt, dass ca. 96 % der Plasmide supercoiled und 3,5 % multimerisch auf der Stufe des UF1-Retentats und nach Präzipitation mit Calciumchlorid sind (siehe nachfolgende Tabelle 18).

Tabelle 18

	% Offener Ring	% Supercoiled	% Multimere
UF1-Retentat	0 %	96,21 %	3,79 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	0 %	96,49 %	3,51 %
UF2-Retentat	22,73 %	75,70 %	1,57 %
TMAE Peak 2	20,93 %	78,54 %	0,53 %

[0341] Nach dem UF2-Schritt sind 22,73 % der Plasmide offen zirkulär mit nur 75,5 % supercoiled. Es ist möglich, dass die Pumpe im Labscale UF-System, das für den UF2-Schritt verwendet wurde, unbrauchbar ist und das Plasmid schert, was zu einem hohen Level an offenen Ringen führt. Von vorhergegangenen Experimenten auf dieser Stufe kann nicht davon ausgegangen werden, dass der UF2-Schritt selbst unbrauchbar ist. Diese Feststellung scheint jedoch die hohen Plasmid-Level im Durchfluss des Chromatographieschritts zu erklären: es ist durchaus möglich, dass der Waschpuffer von 50 mM Tris + 0,54 M NaCl so entworfen wurde, um offen zirkuläre Plasmide zu eluieren. In diesem Puffer würde dann das Binden des offenen zirkulären Plasmids, das auf die Säule geladen wurde, verhindert.

[0342] Die Protein-Beseitigung auf der UF1-Stufe war 99,86 %, was zu einer Gesamtbeseitigung von 99,997 % führte (siehe nachfolgende Tabelle 19).

Tabelle 19

	Volumen (ml)	Protein-Konzentration (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	5.881,5	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.730	5.373,6	87,8 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	277,8	13,1 %	NA
UF1-Retentat	315	45,9	99,86 %	99,86 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	330	ND*	ND	ND
UF2-Retentat	105	3,7	ND	99,996 %
TMAE Peak 2	90	2,94	20,5 %	99,997 %

* Ein unklares Präzipitat bildete sich aufgrund der Gegenwart von Calciumchloridsalz

[0343] Die Endotoxin-Entfernung war nur 27,9 % auf der UF1-Stufe, jedoch war sie 90 % über dem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt (siehe nachfolgende Tabelle 20).

Tabelle 20

	Volumen (ml)	Endotoxin-Konzentration (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	95,40	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.730	< 5,0	< 5,0 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	17,53	51,0 %	NA
UF1-Retentat	315	392,9	27,9 %	27,9 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	330	35,07	90,0 %	92,8 %
UF2-Konzentrationspermeat	260	< 5,0	< 11,2 %	NA
UF2-Diafiltrationspermeat	1.000	0,15	1,3 %	NA
UF2-Retentat	105	69,62	36,8 %	95,3 %
TMAE Peak 1	105	1,96	3,3 %	NA
TMAE Peak 2	90	< 0,5	> 99,3 %	> 99,967 %

[0344] Der UF2-Schritt ergab ebenfalls eine niedrige Beseitigung von 36,8 % was bestätigt, dass die Ultrafiltration kein signifikanter Entfernungsschritt für Endotoxin ist. Der Chromatographieschritt mit Fractogel-TMAE entfernte jedoch mehr als 99,3 % des zurückgebliebenen Endotoxins, was die Gesamtbeseitigung auf mehr als 99,97 % bringt.

[0345] Die Entfernung der genomischen DNA war im wesentlichen das Resultat des Calciumchlorid-Präzipitationsschritts: 94 % Beseitigung wurde beobachtet (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21

	Volumen (ml)	Konzentration genomischer DNA (µg/ml)	Schrittrückgewinnung	Gesamtrückgewinnung
Lysat	1.800	1,74	NA	NA
UF1-Konzentrationspermeat	1.730	0,01	0,6 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat	5.000	0,14	22,3 %	NA
UF1-Retentat	315	12,64	0 %	0 %
UF1 nach Calciumchlorid-Präzipitation	330	0,68	94,0 %	92,4 %
UF2-Konzentrationspermeat	260	0,01	1,2 %	NA
UF2-Diafiltrationspermeat	1.000	0,004	1,8 %	NA
UF2-Retentat	105	0,57	72,5 %	97,9 %
TMAE Peak 1	105	0,38	77,8 %	NA
TMAE Peak 2	90	0,23	59,6 %	99,2 %

[0346] Die anderen Entfernungsschrittwerte waren: 0 % für den UF1-Schritt, 72,5 % für den UF2-Schritt und

59,6 % für den Chromatographieschritt. Die gesamte entfernte genomische DNA war 99,2 %.

Auswahlverfahrensoption: Option 4

[0347] Der Schritt zur Entfernung der Zelltrümmer nach alkalischer Lyse wurde mit dem Schritt der Entfernung des Calciumchlorid-Präzipitats kombiniert. Eine Calciumchlorid-Stammlösung von 2 M wurde zum Lysat nach Neutralisierung mit Kaliumacetat hinzugegeben, so dass die Endkonzentration an Calciumchlorid 1 M war. Die Zelltrümmer wurden dann durch einen Siebfilter mit 200 µm Poren entfernt, gefolgt von der Abfiltrierung kleinerer Partikel durch einen "Depth"-Filter. Der UF1-Schritt wurde auf einer 1 ft² großen 100K-PES-Membran durchgeführt, um Plasmidverluste in Gegenwart des Calciumchloridsalzes zu verhindern. Ein Puffer mit niedriger Ionenstärke wurde zu Beginn der Diafiltration verwendet, um die RNA-Beseitigung zu maximieren, gefolgt von 50 mM Tris + 0,54 M NaCl, um den Puffer vor Beladung auf die Anionenaustauschsäule auszutauschen. Der Ausgangs-TMP wurde auf 5 psi reduziert, um die Plasmid-Rückgewinnung zu verbessern. Die Membranbeladung war 240 mg des Plasmids pro Quadratfuß der Membran. Die Anionenaustausch-Chromatographie mit Fractogel-TMAE wurde wie zuvor durchgeführt, mit einer Beladung von 2,83 mg des Plasmids pro ml Säule.

[0348] Plasmid-Rückgewinnung über den Calciumchloridschritt war mehr als 100 %, dann 50,8 % über dem UF1-Schritt (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22

	Volumen (ml)	Plasmid-Konzentration (µg/ml)	Schrittrückgewinnung	Gesamtrückgewinnung
Lysat	1.800	97,5	NA	NA
Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation*	3.350	71,8	137,0 %	137,0 %
UF1-Konzentrationspermeat*	3.350	0	0	NA
UF1-Diafiltrationspermeat*	5.000	0,16	0,3 %	NA
UF1-Retentat	290	452,4	50,8 %	74,8 %
TMAE Peak 1	135	66,8	15,9 %	11,9 %
TMAE Peak 2	135	341,4	81,5 %	60,9 %

* Entsalzte Probe

[0349] 15,9 % des beladenen Plasmids ist im Durchfluss verloren gegangen, während 81,5 % eluiert wurde: die Säule könnte bei 2,83 mg/ml überladen gewesen sein. Die Gesamt-Plasmid-Rückgewinnung der beiden vereinigten Fraktionen war 72,8 %.

[0350] Die gesamte RNA-Beseitigung war 99,9 % (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23

	Volumen (ml)	RNA-Konzentration (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	1.968,5	NA	NA
Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation*	3.350	162,6	84,6 %	84,6 %
UF1-Konzentrationspermeat*	3.350	126,7	77,9 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat*	5.000	84,5	77,6 %	NA
UF1-Retentat	290	42,7	97,7 %	99,65 %
TMAE Peak 1	135	8,60	21,8 %	NA
TMAE Peak 2	135	10,98	72,2 %	99,90 %

* Entsalzte Proben

[0351] Der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt machte 84,6 % der entfernten RNA aus, die im wesentlichen RNA mit hohem Molekulargewicht war. Die RNA mit niedrigem Molekulargewicht wurde dann einfach durch den UF1-Schritt beseitigt (97,7 % Entfernung). Die RNA-entfernung über die Chromatographiesäule war 72,2 %.

[0352] Die Analyse durch Größenausschluss-HPLC zeigte ein Plasmidlevel von 97,7 % im UF1-Retentat, die auf 98,62 % im Fractogel-TMAE-Eluat anstiegen (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24

	% Plasmid	% RNA
UF1-Retentat	97,70 %	2,30 %
TMAE Peak 1	97,07 %	2,93 %
TMAE Peak 2	98,62 %	1,38 %

[0353] Die Analyse der Plasmidstruktur durch Ionenaustausch-HPLC zeigte, dass das Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation aus 84,44 % supercoiled Plasmid und 14 % offen zirkulär bestand (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25

	% Offener Ring	% Supercoiled	% Multimere
Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation	14,0 %	84,44 %	1,56 %
UF1-Retentat	3,62 %	93,34 %	3,04 %
TMAE Peak 2	2,16 %	94,76 %	3,08 %

[0354] Das Verhältnis des supercoils stieg im Fractogel-TMAE-Eluat auf 94,76 % mit 2,16 % offener Ring und 3,08 % Multimere.

[0355] Proteine konnten im Fractogel-TMAE-Eluat nicht detektiert werden. Der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt entfernte 95,8 % der Proteine, während der UF1-Schritt 99,7 % der verbleibenden Proteine entfernte (siehe nachfolgende Tabelle 26).

Tabelle 26

	Volumen (ml)	Protein-Konzentration (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamt-Entfernung
Lysat	1.800	6.107,2	NA	NA
Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation*	3.350	138,6	95,8 %	95,8 %
UF1-Konzentrationspermeat*	3.350	117,4	84,7 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat*	5.000	0,52	0,6 %	NA
UF1-Retentat	290	5,2	99,7 %	99,99 %
TMAE Peak 2	135	0	100,0 %	100,0 %

* Entsalzte Proben

[0356] Die gesamte Entfernung des Endotoxins war mehr als 99,5 % (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27

	Volumen (ml)	Endotoxin-Konzentration (EU/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	18,84	NA	NA
Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation*	3.350	< 11,05	> 0 %	> 0 %
UF1-Konzentrationspermeat*	3.350	< 11,05	< 100,0 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat*	5.000	< 1,1	< 14,9 %	NA
UF1-Retentat	290	< 50,0	> 60,8 %	> 57,2 %
TMAE Peak 1	135	2,43	< 5,2 %	NA
TMAE Peak 2	135	< 0,5	> 98,9 %	> 99,5 %

* Entsalzte Probe

[0357] Es war nicht möglich, zu bestimmen, welche Schritte zur Entfernung in den Assay-Resultaten beitrugen, obwohl die Beseitigung auf der Fractogel-TMAE-Säule mehr als 98,9 % war.

[0358] Gesamtentfernung der genomischen DNA war 99,8 % (siehe nachfolgende Tabelle 28)

Tabelle 28

	Volumen (ml)	Konzentration genomischer DNA (µg/ml)	Schrittentfernung	Gesamtentfernung
Lysat	1.800	2,11	NA	NA
Lysat nach Calciumchlorid-Präzipitation*	3.350	0,02	98,0 %	98,0 %
UF1-Konzentrationspermeat*	3.350	0,002	0,2 %	NA
UF1-Diafiltrationspermeat*	5.000	0,005	0,7 %	NA
UF1-Retentat	290	0,006	74,0 %	99,5 %
TMAE Peak 1	135	0,02	16,7 %	NA
TMAE Peak 2	135	0,03	75,0 %	99,8 %

* Entsalzte Probe

[0359] 98 % der genomischen DNA wurde auf der Stufe der Calciumchlorid-Präzipitation entfernt, 74 % durch den UF1-Schritt und 75 % durch den Chromatographieschritt.

[0360] Die Vorteile der alternativen Verfahren können am einfachsten anhand der nachfolgenden Tabelle 29 verglichen werden.

Tabelle 29

	Option 2	Option 3	Option 4	Produktspezifizierung
Plasmid-Rückgewinnung	89,2 %	48,8 %*	72,8 %*	
RNA-Entfernung (RP-HPLC)	99,84 %	99,985 %	99,90 %	
RNA-Gewichtsverhältnis	3,65 %	1,37 %	3,13 %	< 5 %
% Plasmid (GA-HPLC)	98,95 %	98,91 %	98,62 %	
Plasmidstruktur (% Supercoiled)	96,57 %	78,54 %	94,76 %	
Protein-Entfernung	100,0 %	99,997 %	100,0 %	
Protein-Gewichtsverhältnis	0 %	0,96 %	0 %	< 1 %
Endotoxin-Entfernung	> 99,94 %	> 99,967 %	> 99,54 %	
Endotoxin EU/mg	< 0,83 EU/mg	< 1,63 EU/mg	< 1,54 EU/mg	< 100 EU/mg
Entfernung genomischer DNA	96,6 %	99,2 %	99,8 %	
Gewichtsverhältnis genomischer DNA	0,45 %	0,07 %	0,02 %	< 5 %

* Peak 1 + Peak 2

[0361] Die Gesamt-Plasmid-Rückgewinnung war höher mit Optionen 2 (89,2 %) und 4 (72,8 % für die vereinigten Peaks) als für Option 3 (48,8 % für die vereinigten Peaks). Kein einzelner Schritt ergab niedrige Plasmid-Rückgewinnungen. Die niedrige Gesamt-Plasmid-Rückgewinnung für Option 3 ist im wesentlichen auf die Einführung des zusätzlichen UF-Schritts zurückzuführen.

[0362] Die RNA-Entfernung war hoch mit allen drei Optionen (99,84 bis 99,985 %). Option 3 resultierte in einem RNA-Gehalt von 1,37 Gew.% pro Gewicht Plasmid. Jedoch ergaben Optionen 2 und 4 RNA-Gehalte von 3,65 bzw. 3,13 %. Sowohl die Ultrafiltrations- als auch die Calciumchloridschritte waren effizient, kombinierten in der Tat die Entfernung von RNA mit niedrigem Molekulargewicht durch den Ultrafiltrationsschritt und das Präzipitieren von RNA mit hohem Molekulargewicht durch Calciumchlorid gut. Die Optionen 3 und 4 ergaben geeignete Level an supercoiled Plasmid bei 96,6 bzw. 94,8 %. Option 3 erzeugte jedoch höhere Verhältnisse an offen zirkulärem Plasmid, was nur zu 78,5 % supercoiled Plasmid führte. Dies war aufgrund des Ultrafiltrationssystems, das für UF2 verwendet wurde, und sollte nicht die Option ausschließen.

[0363] Die Protein-Entfernung war für alle 3 Optionen hoch mit undetektierbaren Level für Optionen 3 und 4. Ein Proteinverhältnis von 0,96 Gew.% pro Gewicht für Option 3 könnte aufgrund der Tendenz des BCA-Tests falsche Resultate zu erzeugen, aufgrund von Verunreinigungen, als auf eine akkurate Darstellung der Proteinlevel zurückzuführen sein. Es gibt keinen Grund, höhere Proteinlevel in Option 3 zu erwarten, wo ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt im Vergleich zu Option 2 vorkommt. Sowohl der UF1-Schritt als auch der Calciumchloridschritt sind sehr effizient im Entfernen von Proteinverunreinigungen.

[0364] Die Endotoxin-Entfernung war sehr hoch mit Leveln im Endmaterial unter der Detektionsgrenze für den Assay für alle 3 Optionen.

[0365] Der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt sowie der Anionenaustauschschritt ergab eine hohe Endotoxin-Beseitigung.

[0366] Schließlich waren die Level an genomischer DNA sehr niedrig, im Speziellen für Optionen 3 und 4. Eine hohe Entfernung genomischer DNA erschien mit hohen Calciumchloridleveln verknüpft zu sein.

[0367] Nach vorsichtiger Evaluierung aller Daten schien es keinen Grund zu geben, irgendeine der 3 Optionen auf der Basis der Entfernung der Verunreinigung auszuschließen, da alle 3 Optionen eine gute Entfernung der Verunreinigungen hergaben. Option 3 ergab die niedrigste Plasmid-Rückgewinnung, jedoch auch die best RNA-Beseitigung. Option 4 wurde bevorzugt, da es weniger Reinigungsschritte enthält und würde die einfachste Option zum Scale-up sein.

Schlussfolgerung

[0368] Die drei Optionen unterscheiden sich nur darin, an welcher Stelle der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt eingeführt wurde (entweder nach der Lyse oder nach dem UF1-Schritt) und ob ein zweiter Ultrafiltrationsschritt benötigt wurde, um das Calciumchloridsalz vor der Chromatographie zu entfernen. Die Resultate zeigten, dass alle 3 Optionen praktikabel waren, um mehr als 50 % Plasmid-Rückgewinnung und gute Unreinheitsentfernung zu ergeben.

[0369] Die RNA-Entfernung wurde durch Beladen der Chromatographiesäule bei reduziertem Level von 1,2 mg Plasmid/ml und der Verwendung einer Gradientenelution verbessert. In der Tat wurden die Endlevel an RNA mit dem richtigen Elutionsgradienten und "Peak-Cutting" so niedrig, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze des Assays waren.

[0370] Das Calciumchlorid hatte einen sehr signifikanten Effekt auf das Reduzieren der Level an RNA, Protein, Endotoxin und genomischer DNA. Als ein Resultat sind die Endlevel an Endotoxin und genomischer DNA niedriger als im Verfahren, das RNase enthält.

[0371] Die Anmeldung, für die diese Beschreibung und Ansprüche einen Teil bilden, kann als eine Grundlage für die Priorität in Bezug auf jede nachfolgende Anmeldung verwendet werden. Die Ansprüche solch einer nachfolgenden Anmeldung können auf jedes Merkmal oder jede Kombination von Merkmalen, die hier beschrieben sind, gerichtet sein. Diese können die Form von Produkt-, Zusammensetzungs-, Verfahrens- oder Verwendungsansprüchen annehmen und können als Beispiel und ohne Limitierung einen oder mehrere der folgenden Ansprüche einschließen:

Patentansprüche

1. Verfahren zum Trennen extra-chromosomaler DNA von RNA, ohne die RNA zuerst zu verdauen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
 - i) Lysieren von Zellen, die extra-chromosomale DNA umfassen, um ein Lysat zu bilden; und
 - ii) Trennen einer substantiellen Menge der RNA, die in dem Lysat vorliegt, von der extra-chromosomalen DNA unter Verwendung einer Kombination aus Calciumchlorid-Präzipitation, Klärung und Tangentialfluß-Ultrafiltration.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin die erhaltene DNA weniger als 50 Gew.% der RNA, die in dem Lysat vorliegt, umfaßt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, worin die erhaltene DNA weniger als 10 Gew.% der RNA, die in dem Lysat vorliegt, umfaßt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, worin die erhaltene DNA weniger als 5 Gew.% der RNA, die in dem Lysat vorliegt, umfaßt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, worin die erhaltene DNA weniger als 2 Gew.% der RNA, die in dem Lysat vorliegt, umfaßt.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, worin die erhaltene DNA weniger als 1 Gew.% der RNA, die in dem Lysat vorliegt, umfaßt.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt dem Ultrafiltrationsschritt vorangeht.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin der Calciumchlorid-Präzipitationsschritt dem Ultrafiltrationsschritt folgt.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, worin ein oder mehrere zusätzliche Aufreinigungs- oder Polierschritte verwendet werden.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, worin der eine oder die mehreren zusätzlichen Aufreinigungs- oder Polierschritte verwendet werden, um eine oder mehrere der folgenden Einheiten zu entfernen: Endotoxine, Proteine, genomische DNA und RNA.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, worin der eine oder die mehreren zusätzlichen Aufreinigungs- oder Polierschritte dem Ultrafiltrationsschritt folgen.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, 10 oder 11, worin der eine oder die mehreren zusätzlichen Aufreinigungs- oder Polierschritte einen Chromatographieschritt umfassen.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, worin der Chromatographieschritt ein Ionenaustausch- oder Hydroxylapatit-Chromatographieschritt ist.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, worin der Chromatographieschritt ein Ionenaustausch-Chromatographieschritt ist.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, worin der Ionenaustausch-Chromatographieschritt Fractogel TMAE verwendet.
16. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, worin ein Präzipitat, das in dem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt gebildet wird, durch ein Netz oder Sieb entfernt wird.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, worin ein Präzipitat, das in dem Calciumchlorid-Präzipitationsschritt gebildet wird, zusammen mit Zelltrümmern durch ein Netz oder Sieb entfernt wird.
18. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der CaCl_2 -Präzipitationsschritt RNA mit hohem Molekulargewicht und genomische DNA entfernt.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, worin der Ultrafiltrationsschritt eine Membran mit einem Molekulargewichtsausschluß von unterhalb 500 KDa verwendet und die extra-chromosomale DNA von 2 Kb bis 200 Kb ist.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, worin die Membran einen Molekulargewichtsausschluß von unterhalb 300 KDa, besonders bevorzugt von ungefähr 100 KDa, hat.

21. Verfahren gemäß Anspruch 19, worin die Membran aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus folgendem besteht: Polyethersulfon, Celluloseacetat, Polysulfon, Polyvinyliden, Polypropylen, Polyamid, modifiziertes PES, Polyvinylidenpyrrolidin, Polyvinylidenfluorid (PVDF), Cellulosenitrat und Celluloseetriacetat.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, worin die Membran eine Polyethersulfonmembran ist.

23. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, das einen Diafiltrationspuffer verwendet, der einen pH-Bereich von 6 bis 10 hat.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, worin der Diafiltrationspuffer ein Tris-Puffer ist.

25. Verfahren gemäß Anspruch 23, worin der Diafiltrationspuffer mit mehr als 10 Volumenaustauschungen verwendet wird.

26. Verfahren gemäß Anspruch 25, worin der Diafiltrationspuffer mit mehr als 20 Volumenaustauschungen verwendet wird.

27. Verfahren gemäß Anspruch 26, worin der Diafiltrationspuffer mit mehr als 30 Volumenaustauschungen verwendet wird.

28. Verfahren gemäß Anspruch 27, worin der Diafiltrationspuffer mit mehr als 40 Volumenaustauschungen verwendet wird.

29. Verfahren gemäß Anspruch 28, worin der Diafiltrationspuffer mit 50 bis 100 Volumenaustauschungen verwendet wird.

30. Verfahren gemäß Anspruch 19, worin die Membran mit einem Screen Channel verwendet wird.

31. Verfahren gemäß Anspruch 30, worin der Screen Channel ein T-Screen ist.

32. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Verfahren bei einem Transmembrandruck von weniger als 10 psi durchgeführt wird.

33. Verfahren gemäß Anspruch 19, worin die extra-chromosomale DNA auf die Membran in einer Menge von weniger als 30 mg/ft² im Fall einer 300 K-Membran geladen wird.

34. Verfahren gemäß Anspruch 13, worin der Chromatographieschritt ein Hydroxylapatit-Chromatographieschritt ist.

35. Verfahren gemäß Anspruch 34, worin der Hydroxylapatit-Chromatographieschritt bei einem pH von 7,3 bis 8,3 durchgeführt wird.

36. Verfahren gemäß Anspruch 35, worin der Hydroxylapatit-Chromatographieschritt bei einem pH zwischen 7,6 und 8,0 durchgeführt wird.

37. Verfahren gemäß Anspruch 34, 35 oder 36, worin der Hydroxylapatit BioRad MacroPrep Ceramic ist.

38. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 34 bis 37, worin ein Doppelpuffersystem zum Trennen extra-chromosomaler DNA von RNA verwendet wird.

39. Verfahren gemäß Anspruch 38, worin das Doppelpuffersystem Na₂HPO₄, um die RNA zu eluieren, und K₂HPO₄, um die extra-chromosomale DNA zu eluieren, umfaßt.

40. Verfahren gemäß Anspruch 8, worin der CaCl_2 -Präzipitationsschritt von einem weiteren Ultrafiltrationsschritt oder einem Entsalzungsschritt oder einem Umkehrphasen-Chromatographieschritt gefolgt wird.

41. Verfahren gemäß Anspruch 40, worin der weitere Ultrafiltrationsschritt oder ein Entsalzungsschritt oder ein Umkehrphasen-Chromatographieschritt vom Chromatographieschritt gefolgt wird.

42. Verfahren gemäß Anspruch 41, worin der Chromatographieschritt ein Ionenaustausch-Chromatographieschritt ist.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

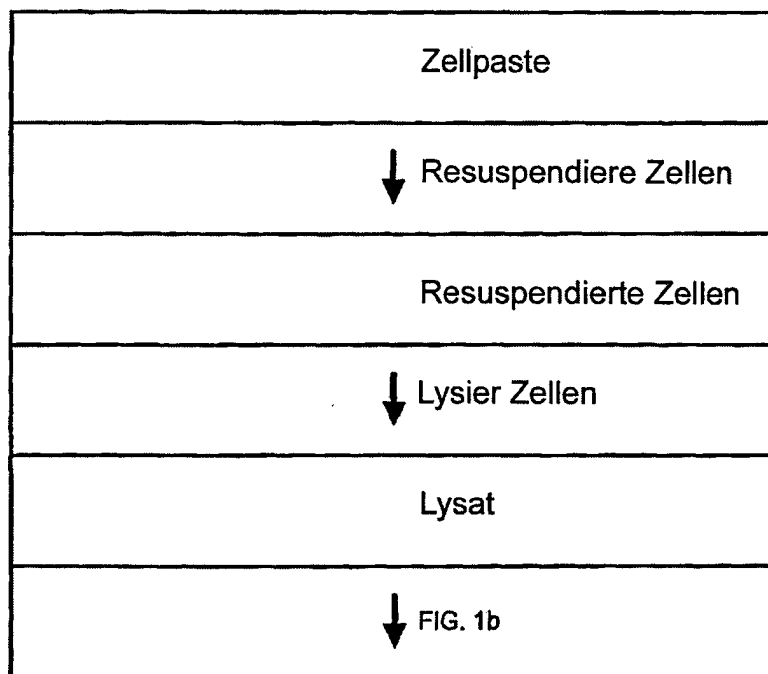


FIG. 1a

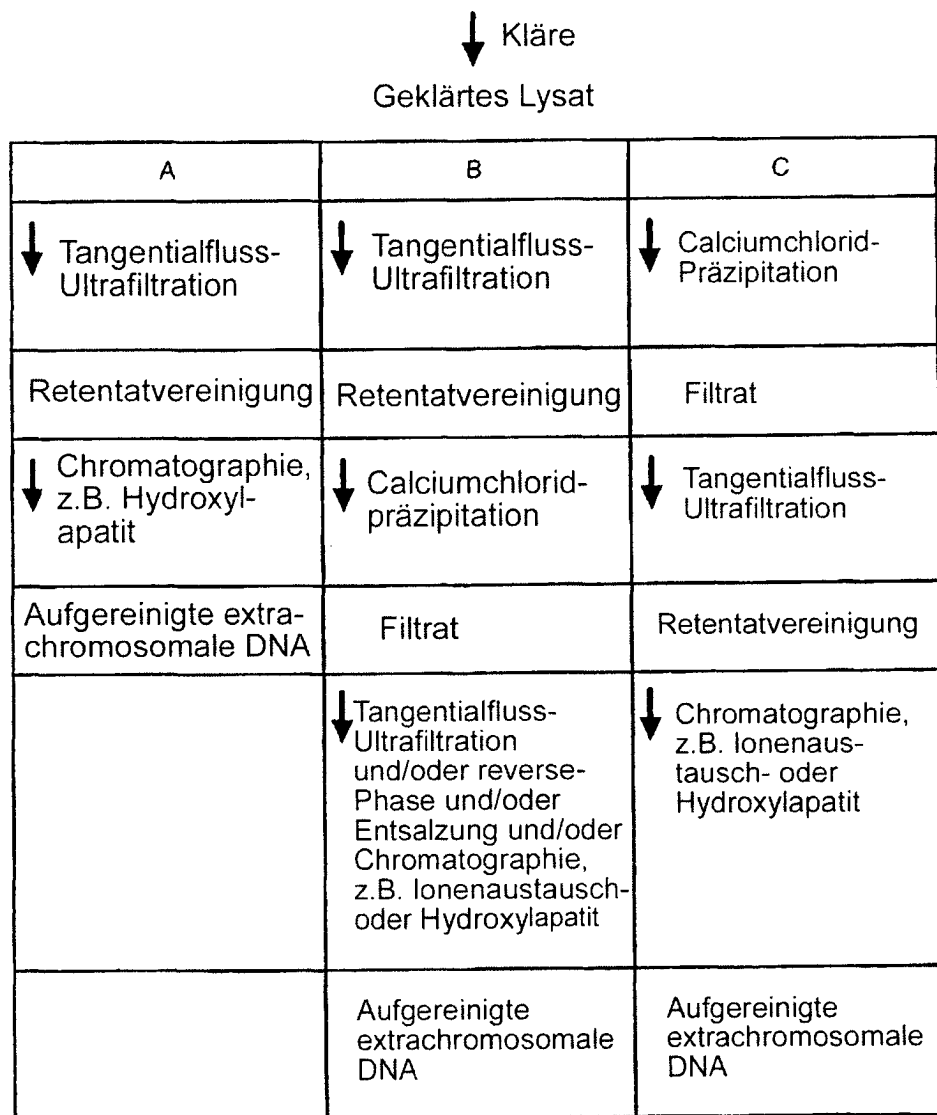


FIG. 1b

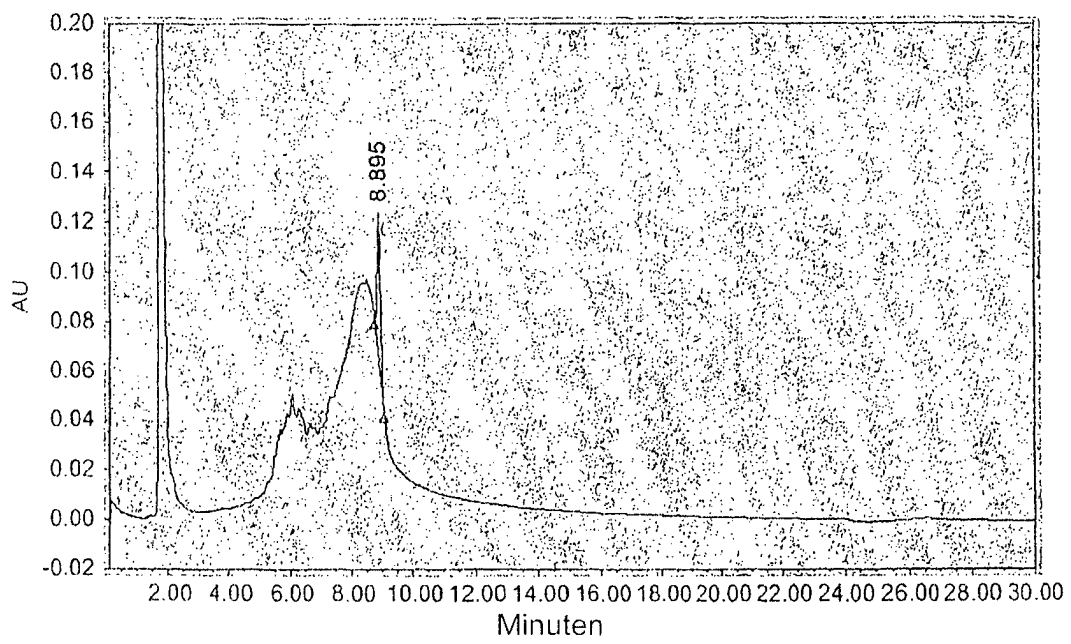


FIG. 2a

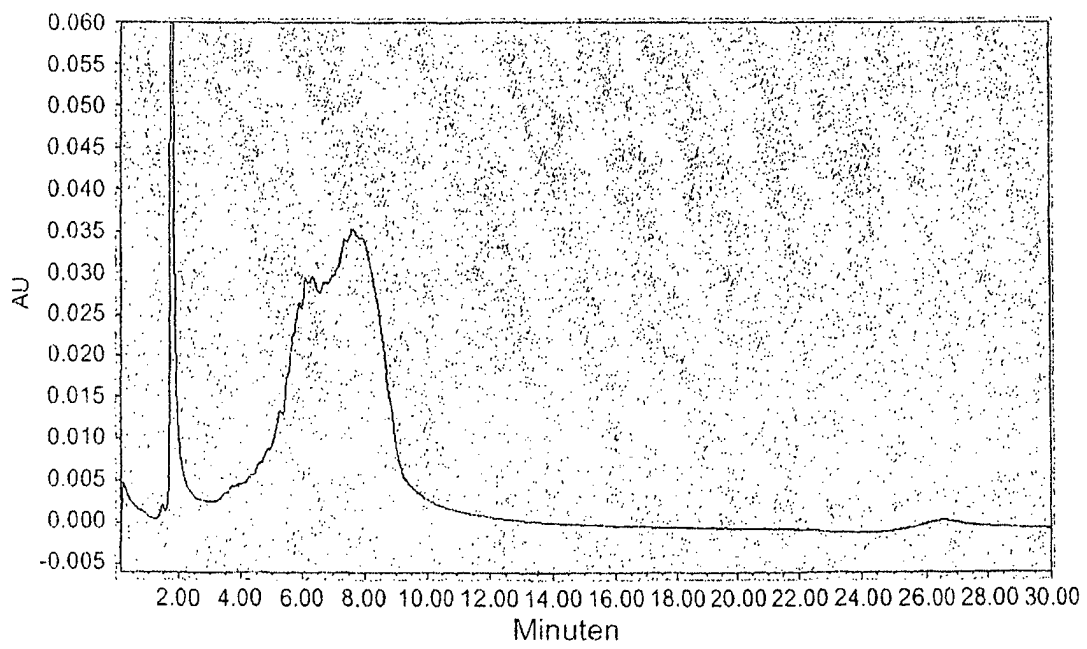


FIG. 2b

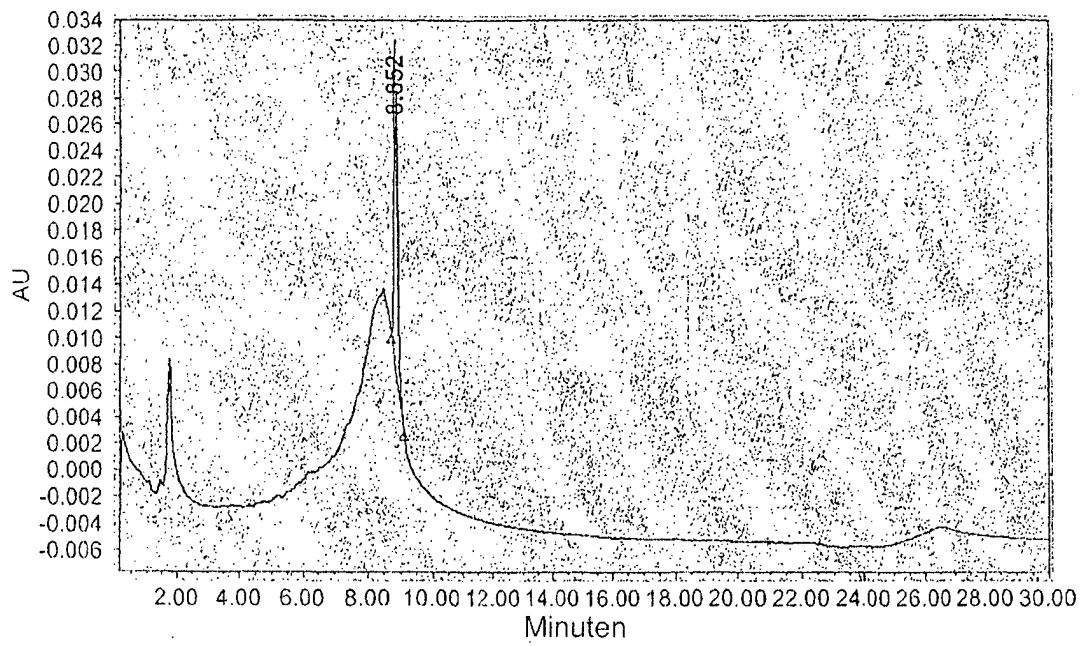


FIG. 2c

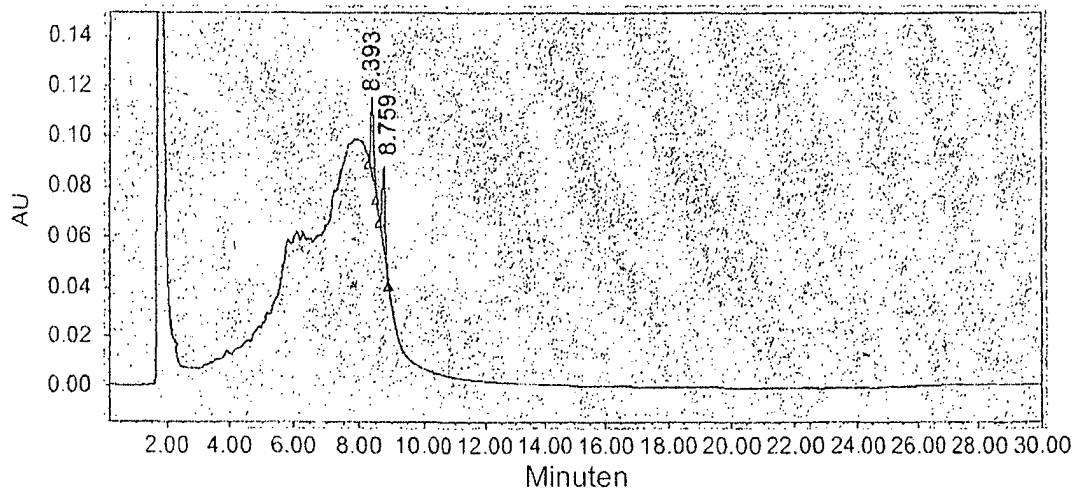


FIG. 3a

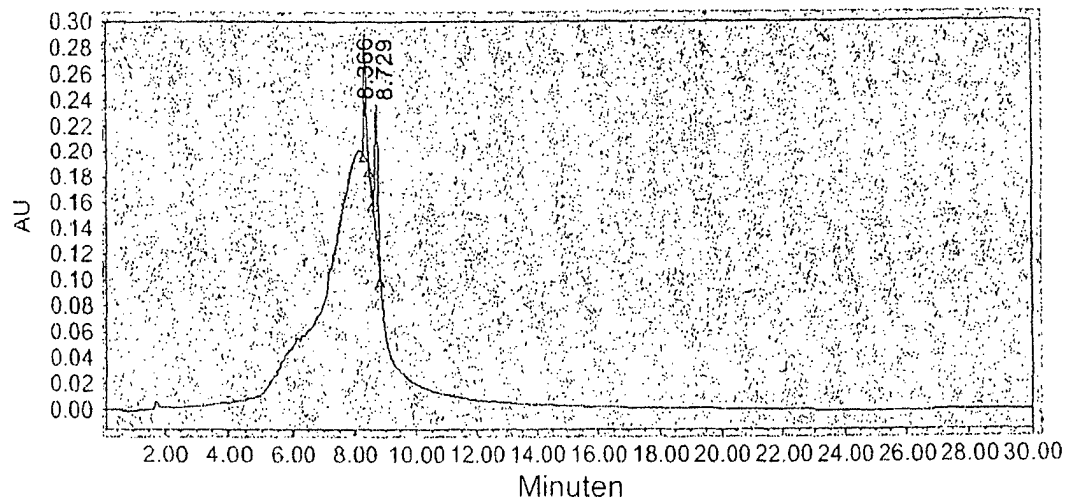


FIG. 3b

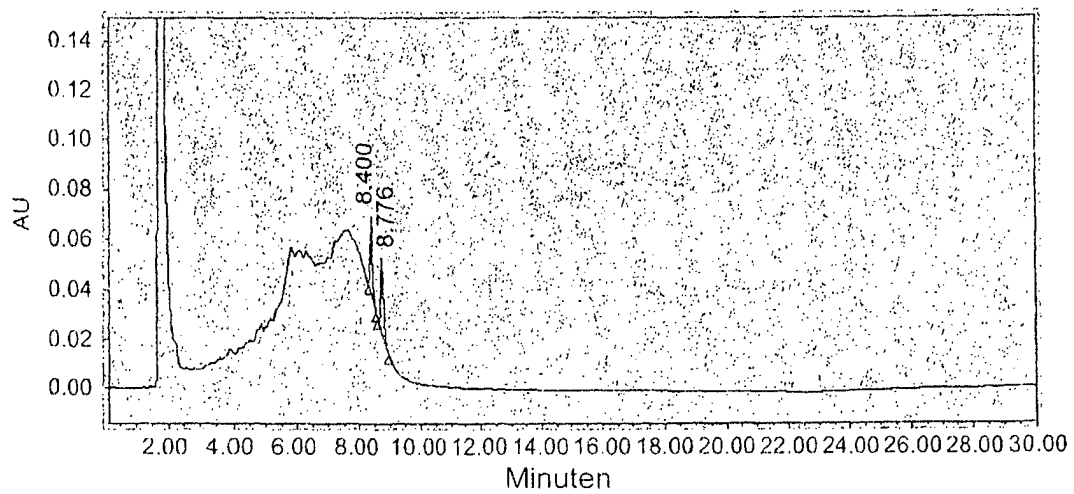


FIG. 3c

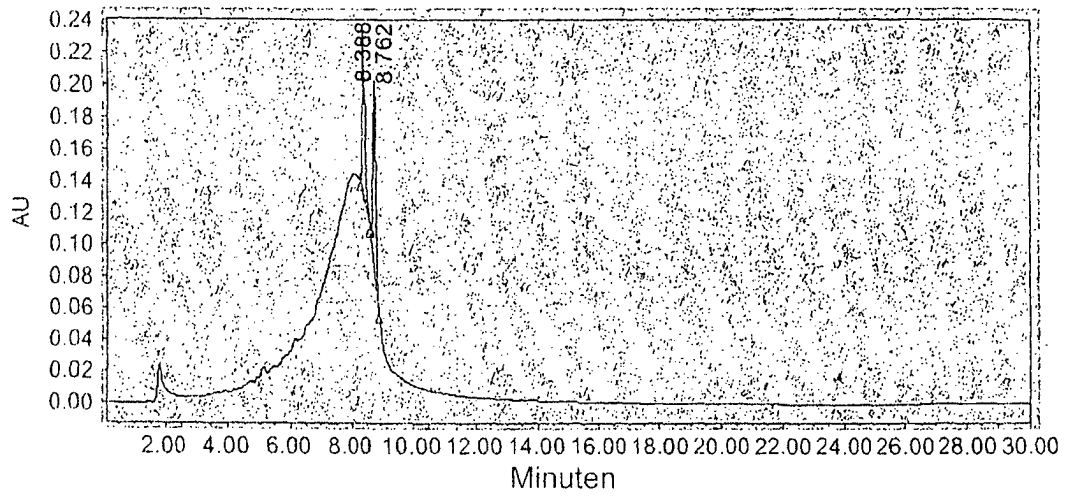


FIG. 3d

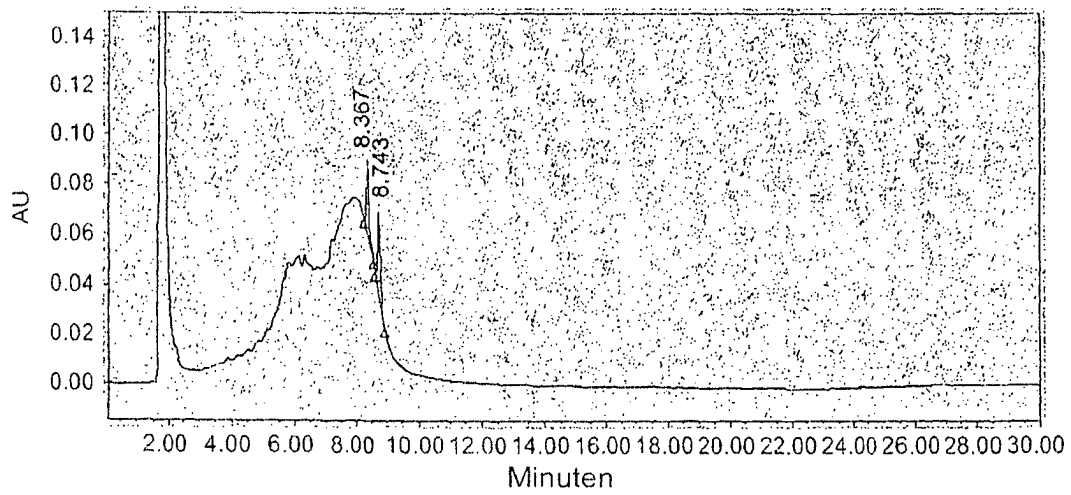


FIG. 3e

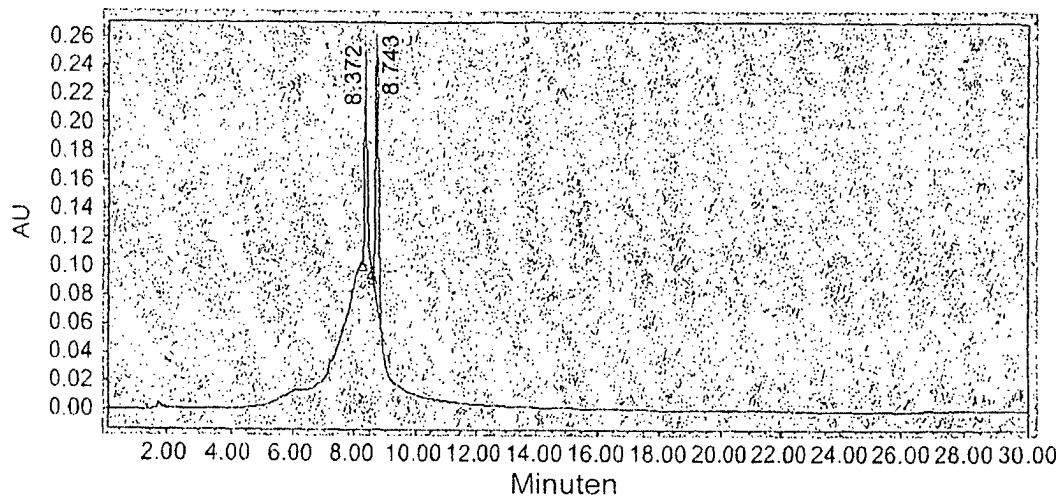


FIG. 3f

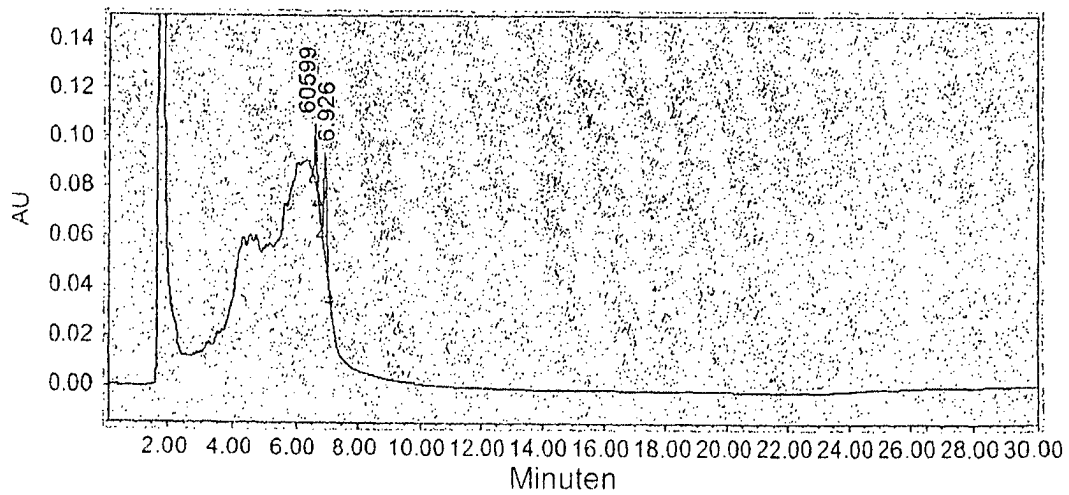


FIG. 4a

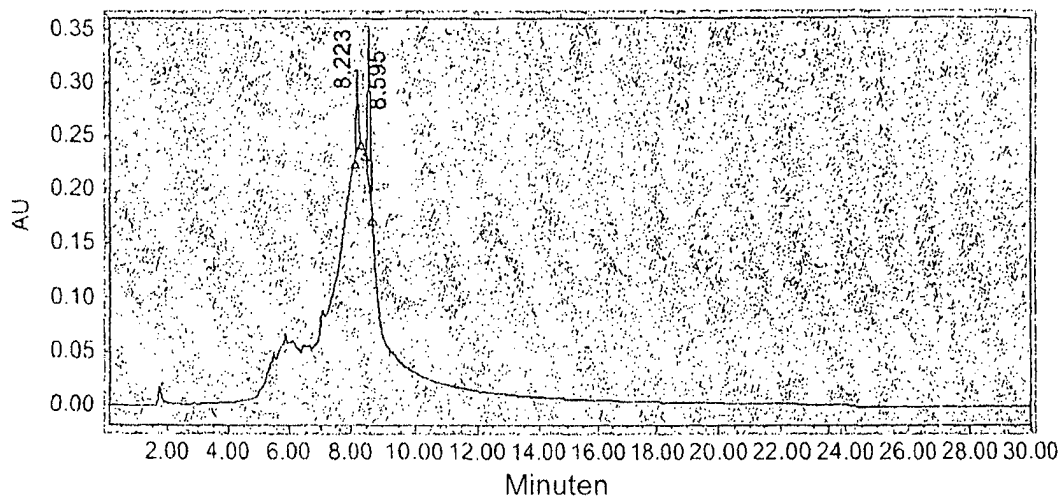


FIG. 4b

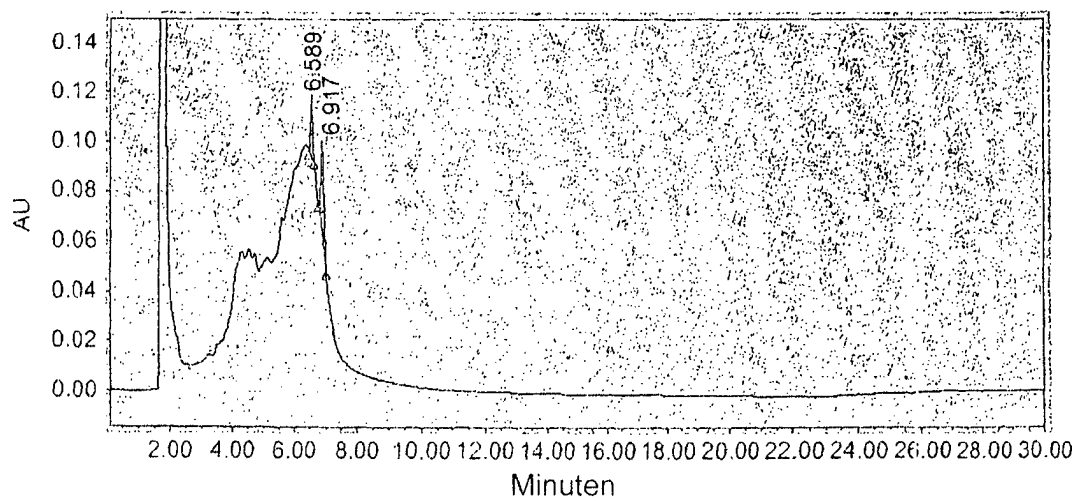


FIG. 4c

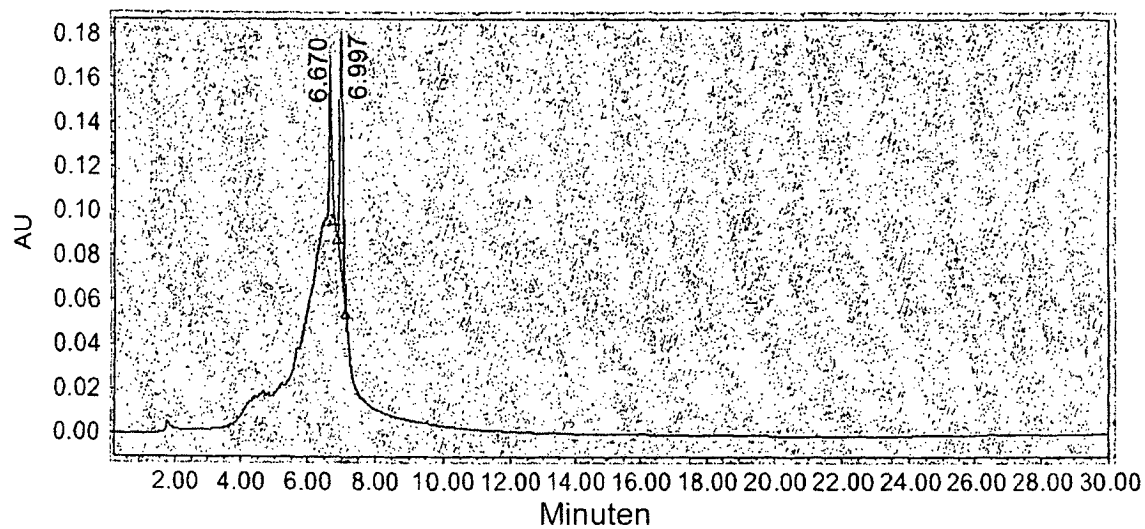


FIG. 4d

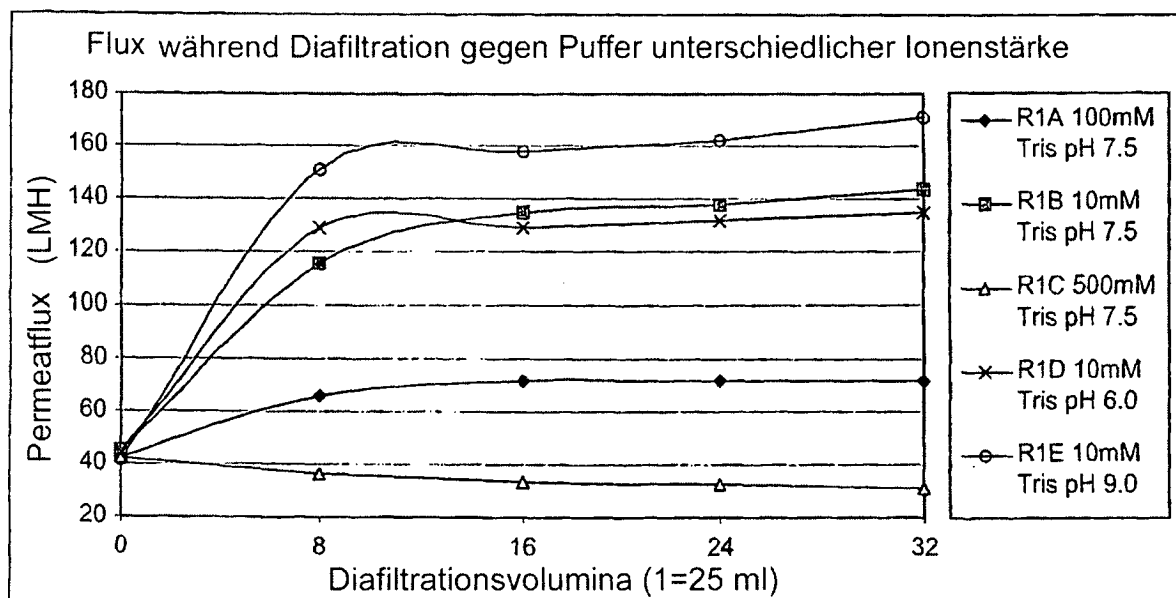


FIG. 5

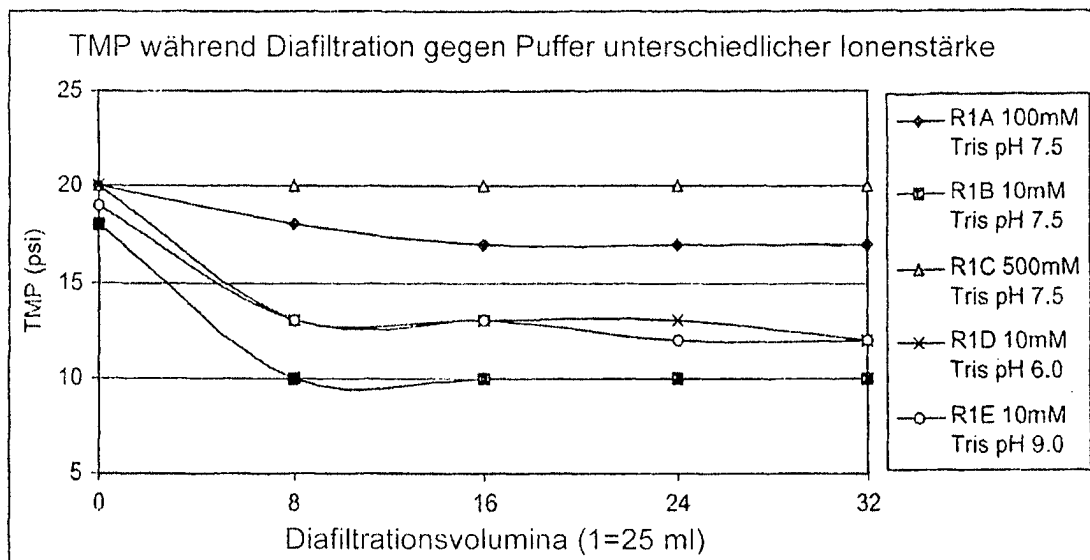


FIG. 6

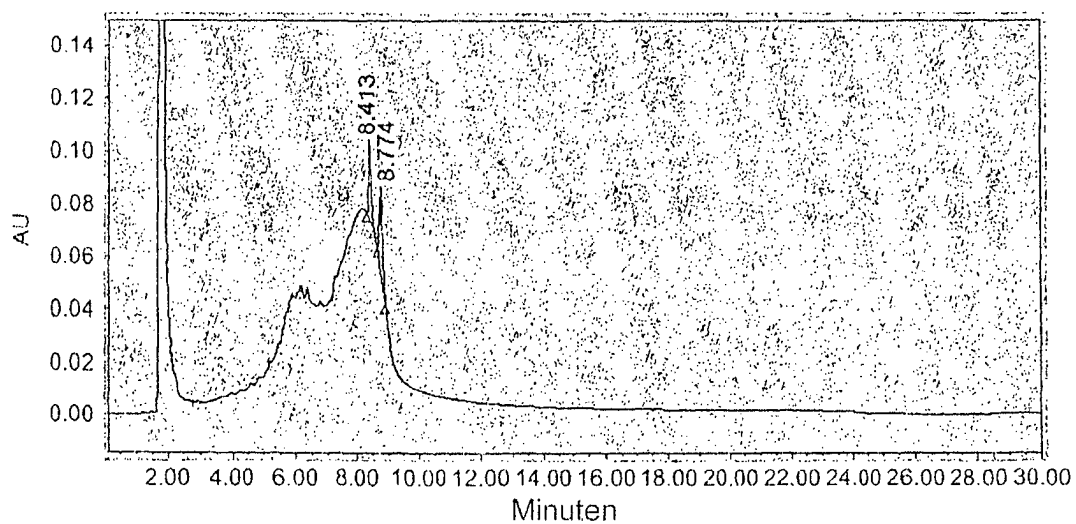


FIG. 7a

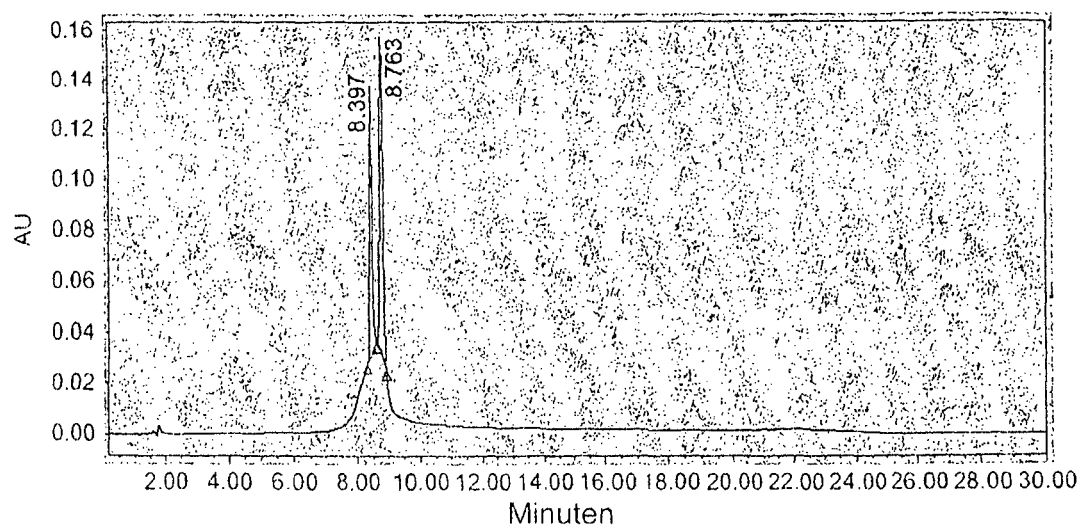


FIG. 7b

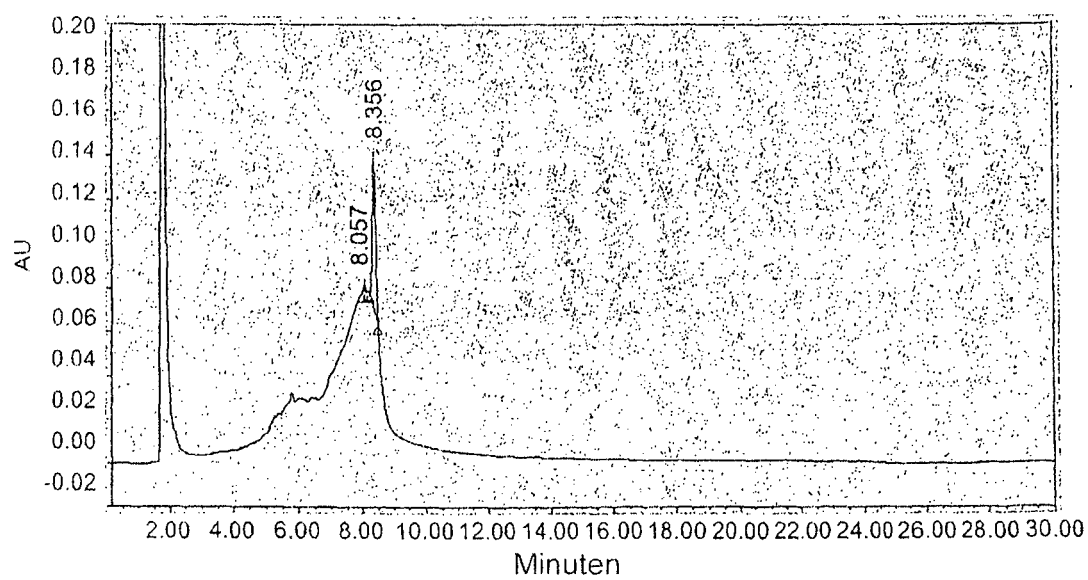


FIG. 8a

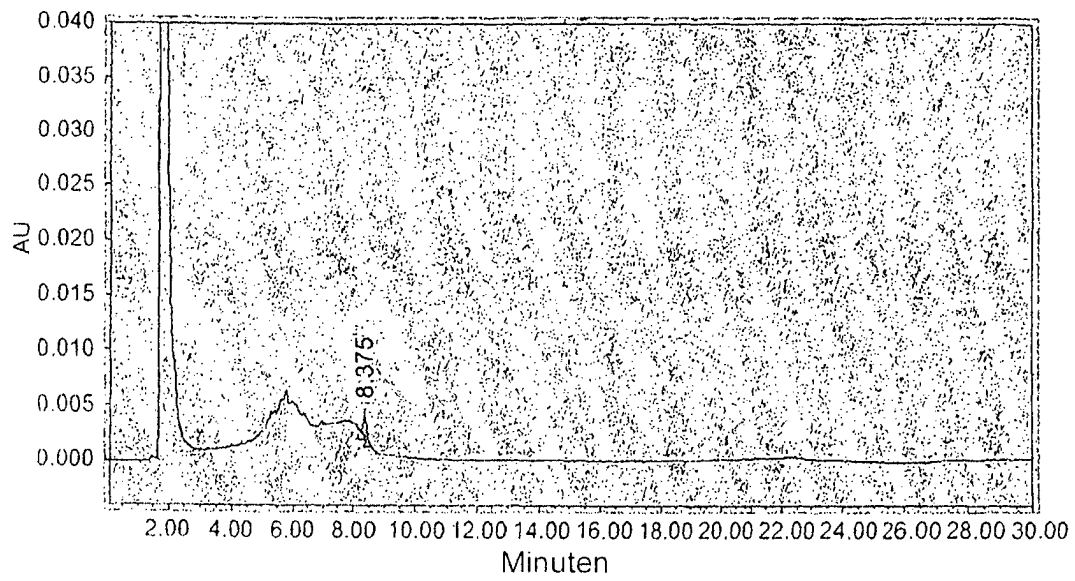


FIG. 8b

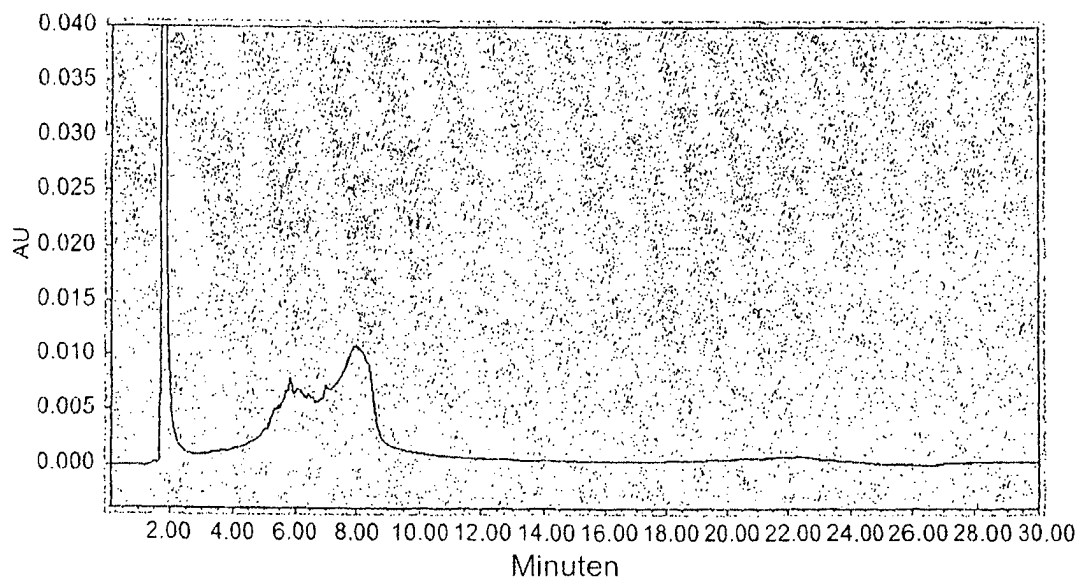


FIG. 8c

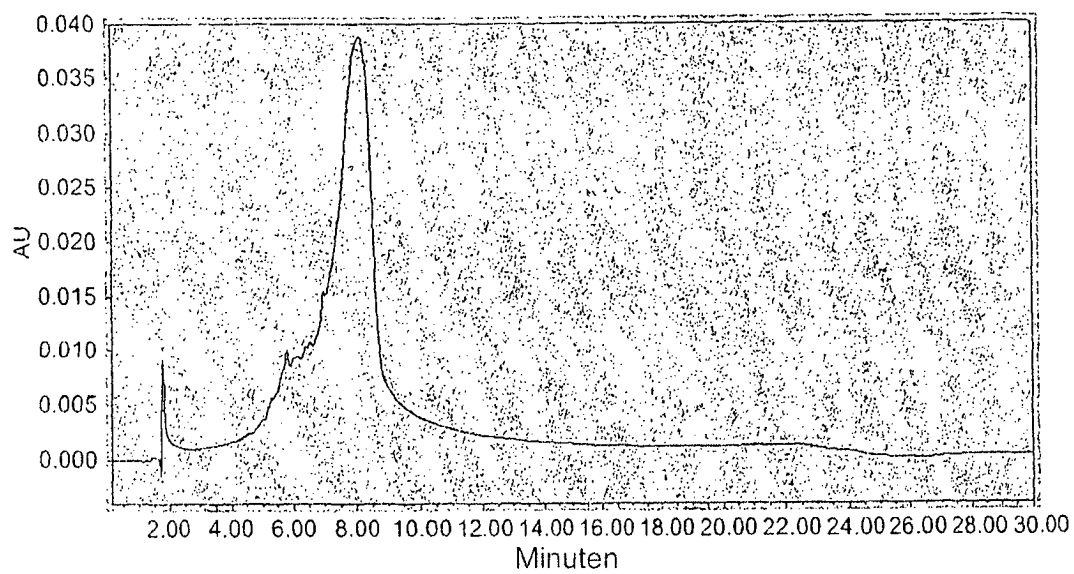


FIG. 8d

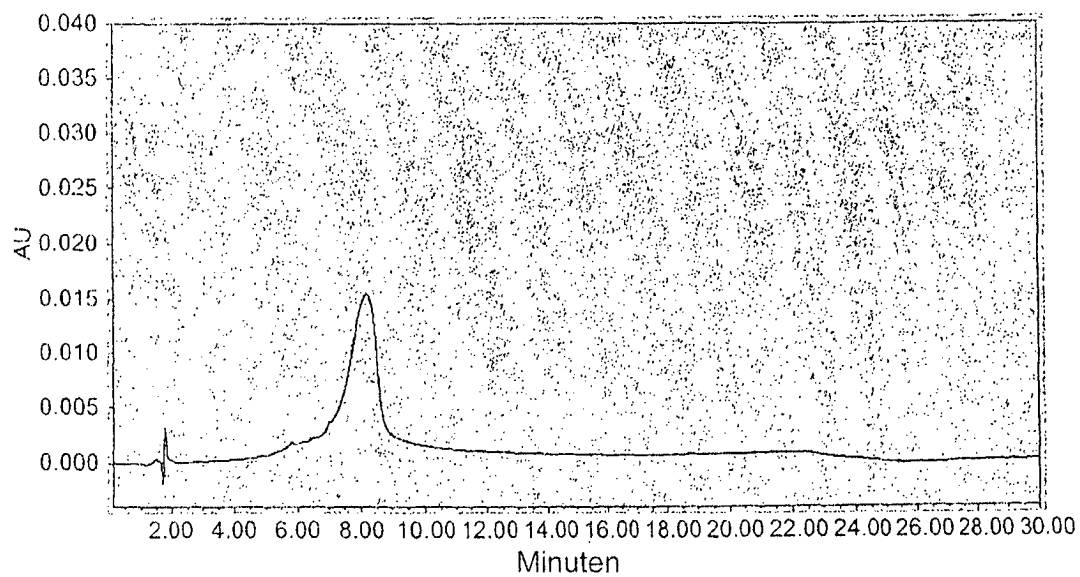


FIG. 8e

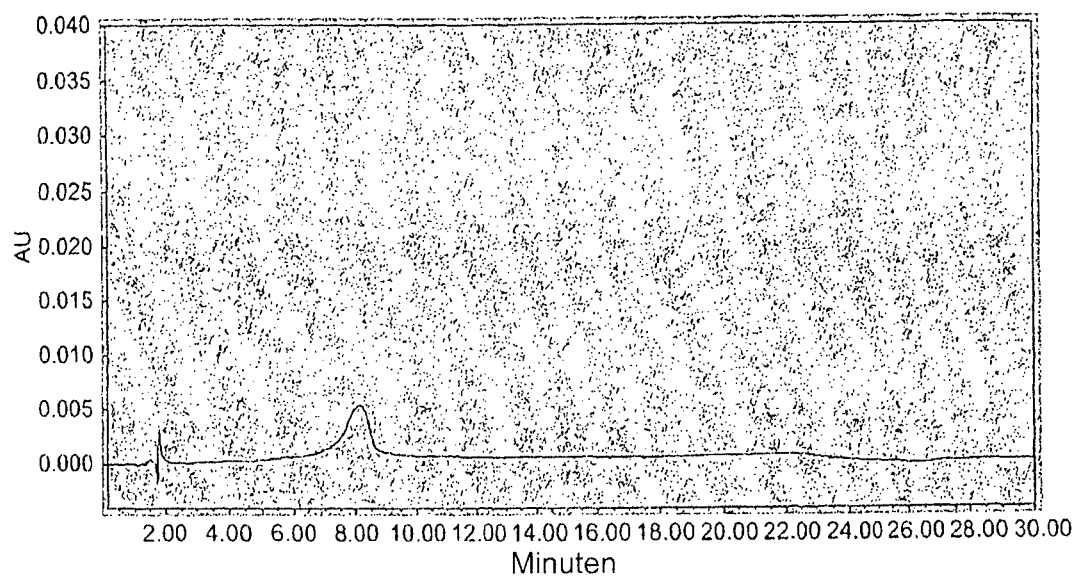


FIG. 8f

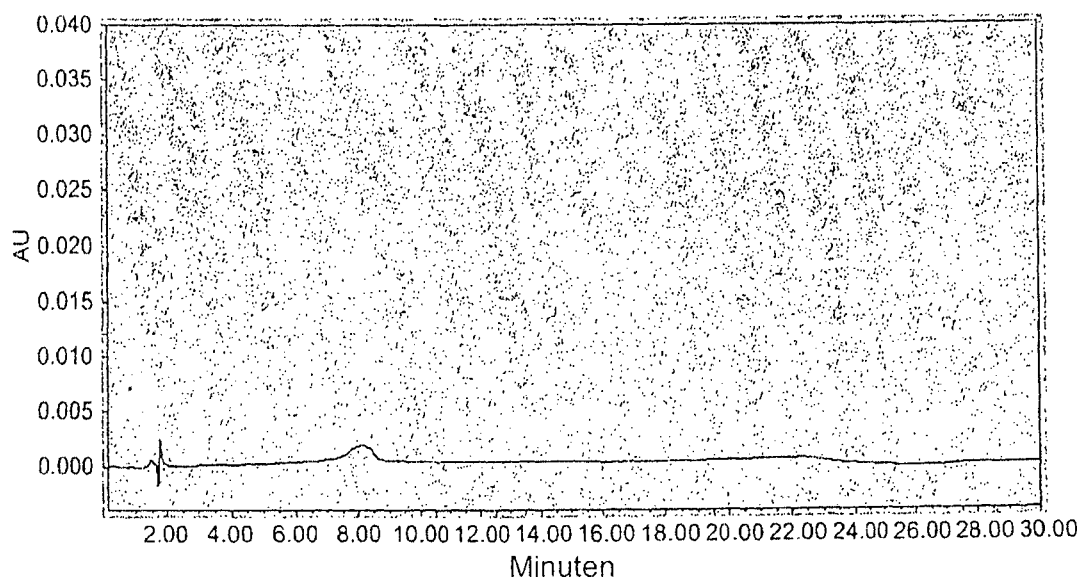


FIG. 8g

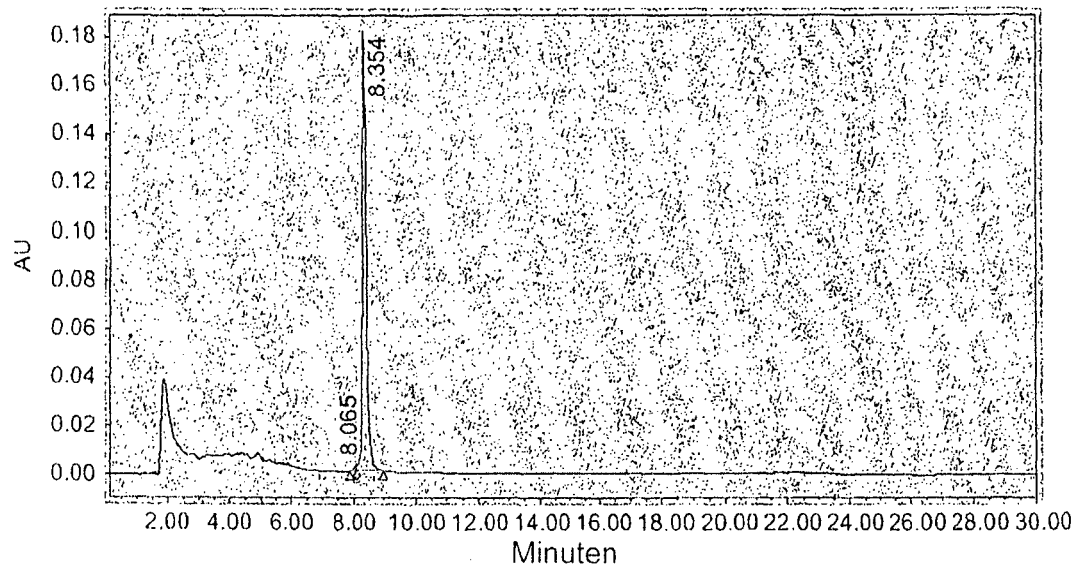


FIG. 8h

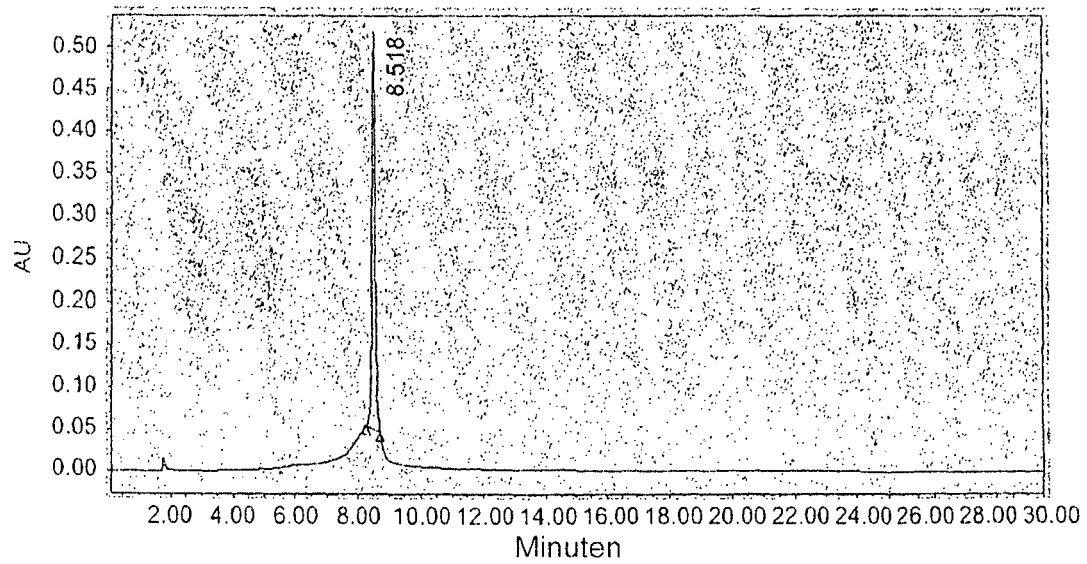


FIG. 8i

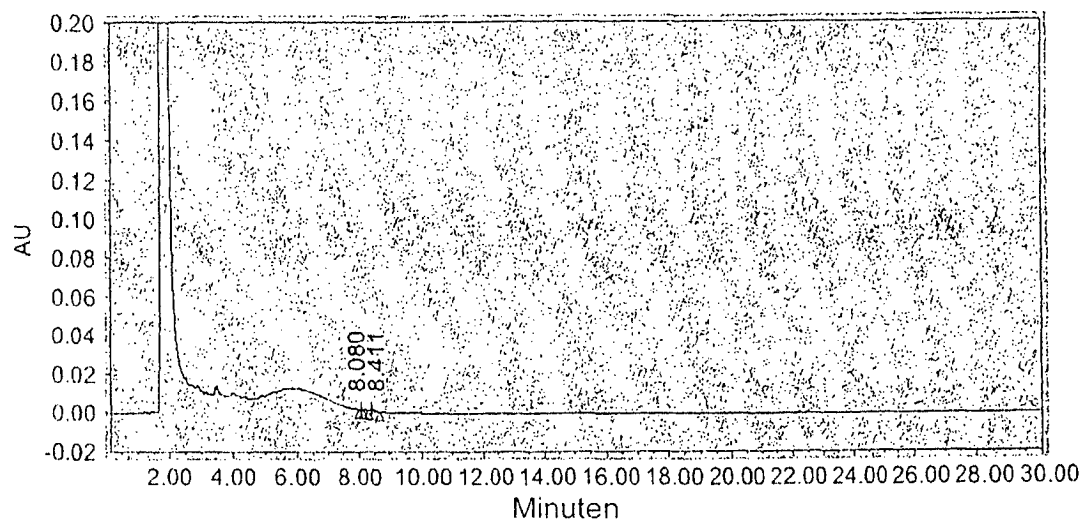


FIG. 9a

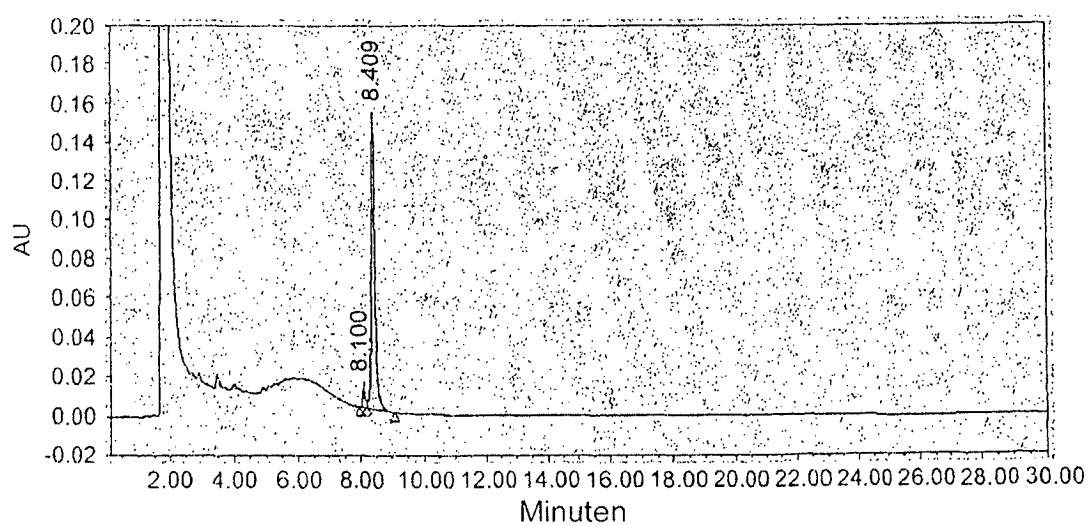


FIG. 9b

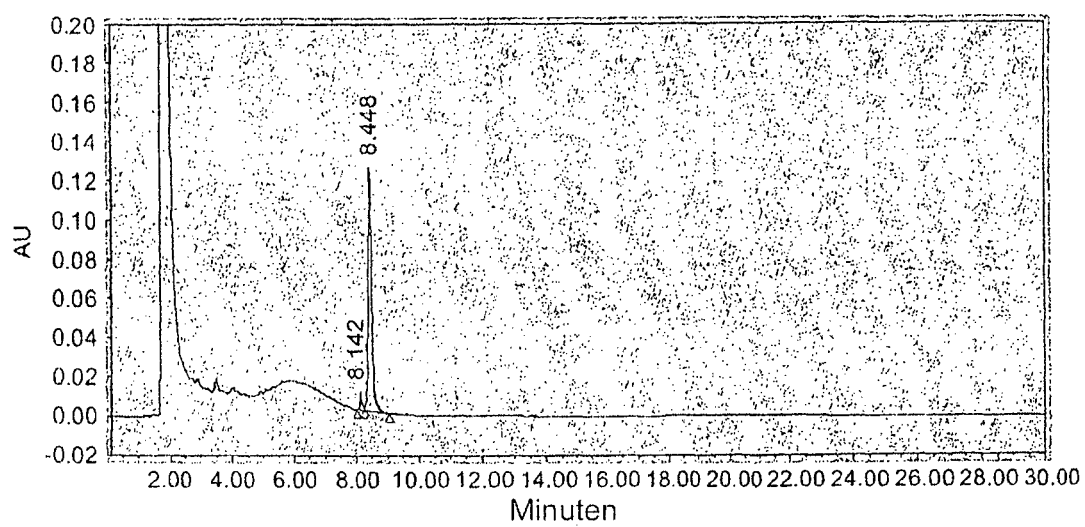


FIG. 9c

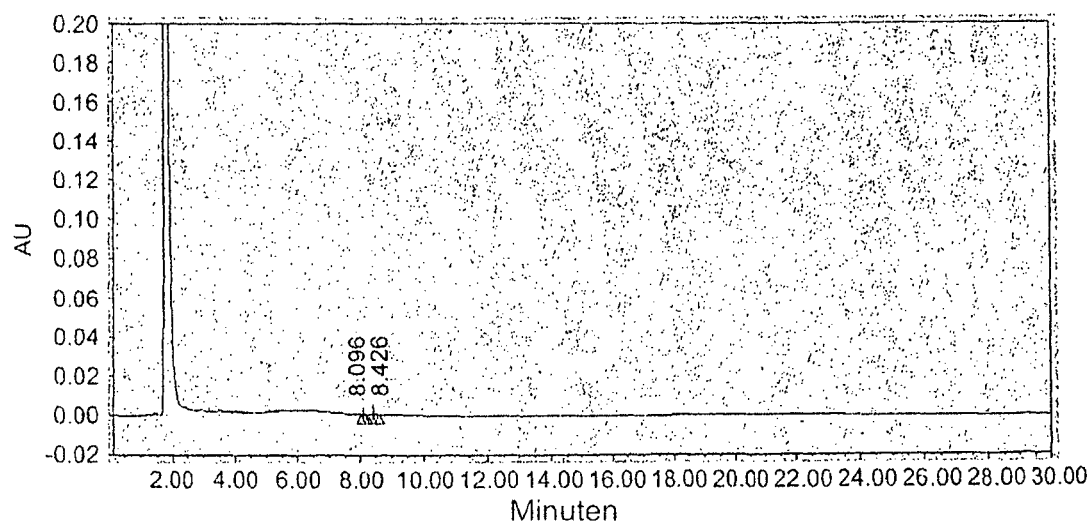


FIG. 9d

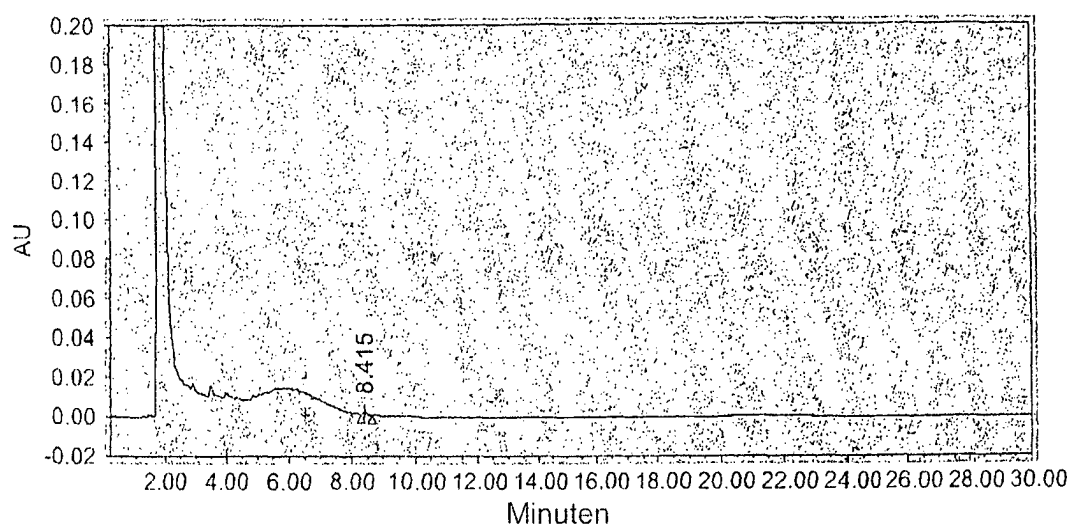


FIG. 9e

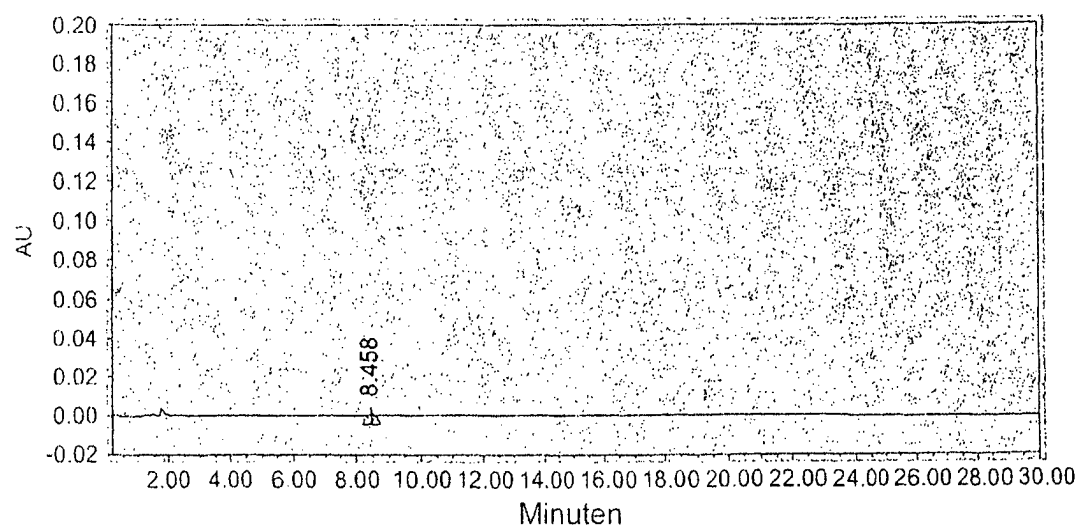


FIG. 9f

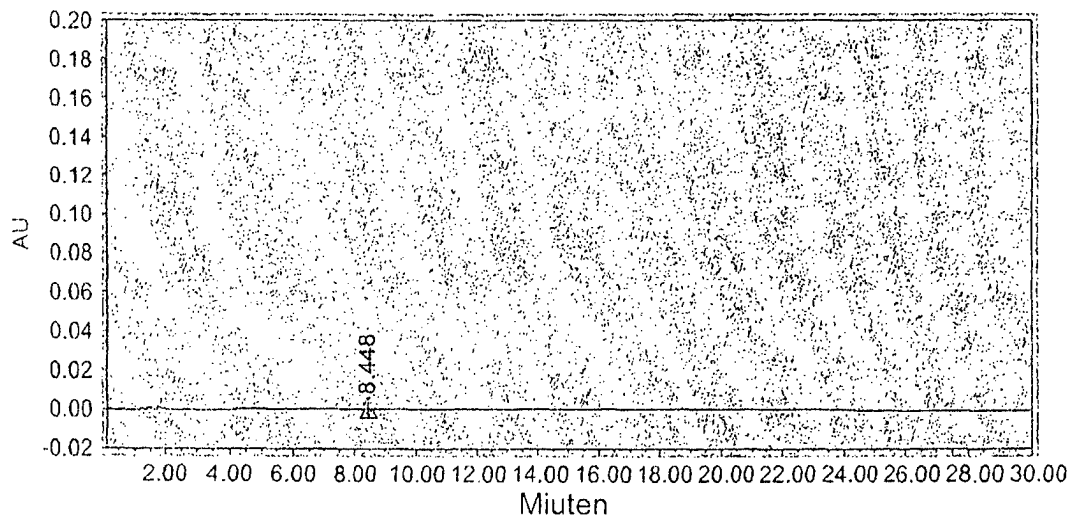


FIG. 9g

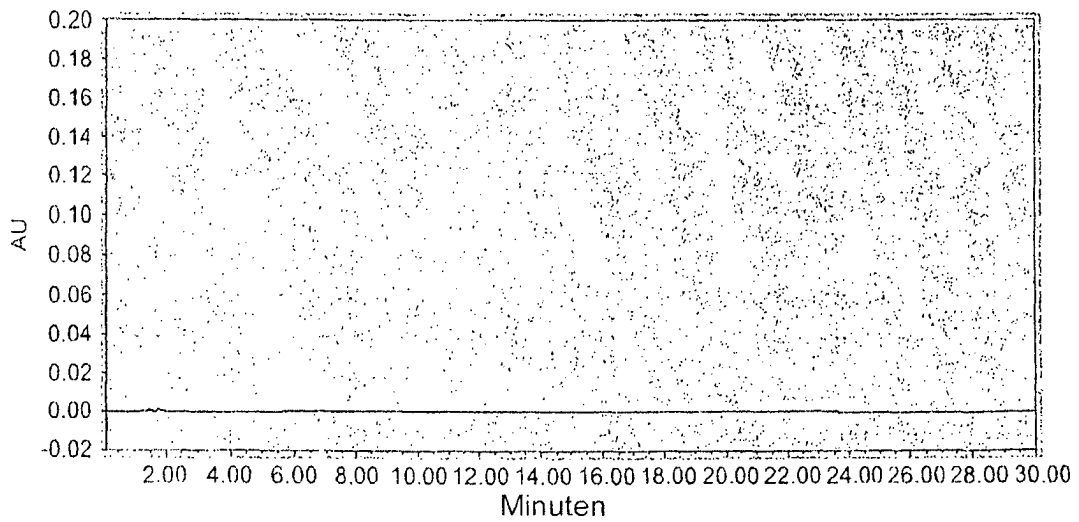


FIG. 9h

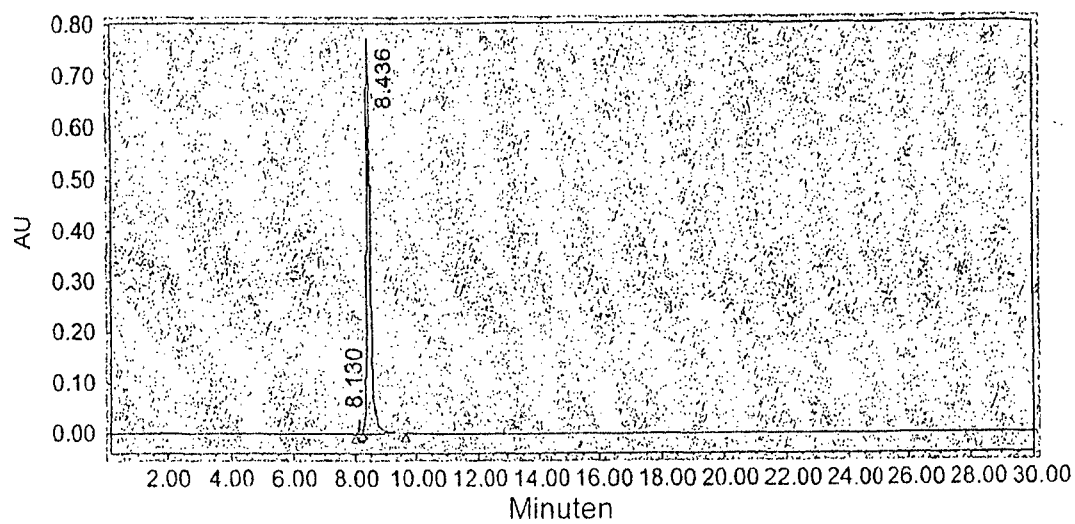


FIG. 9i

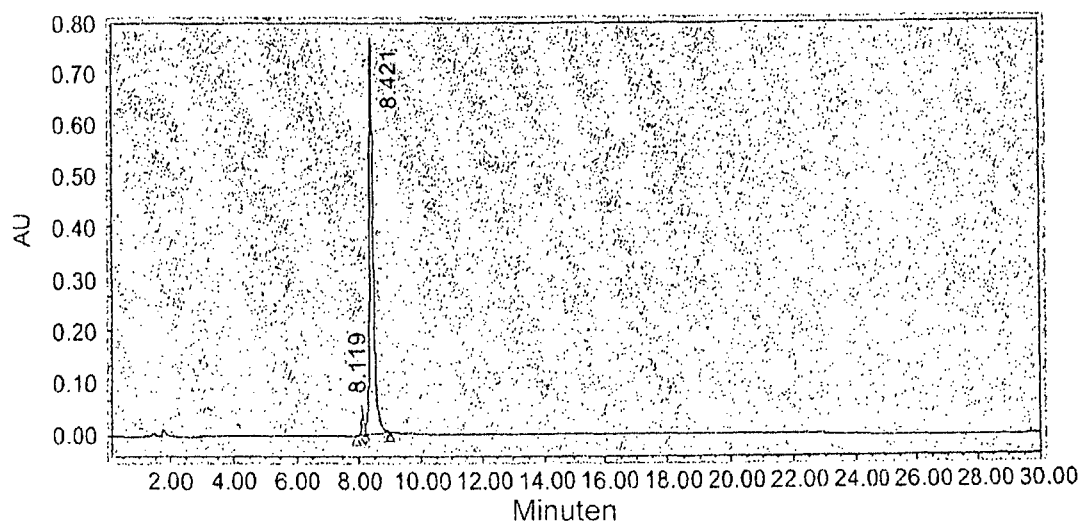


FIG. 9j

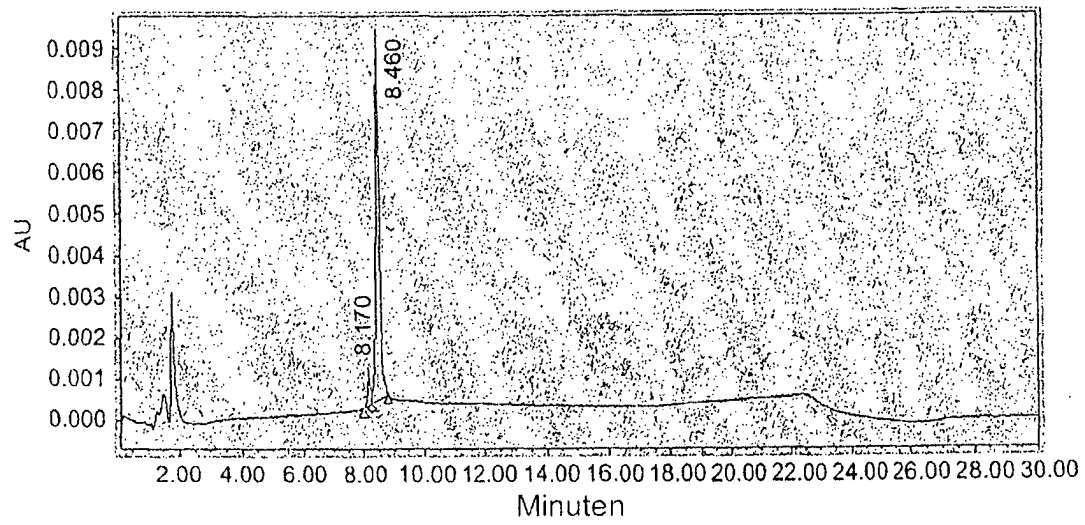


FIG. 9k

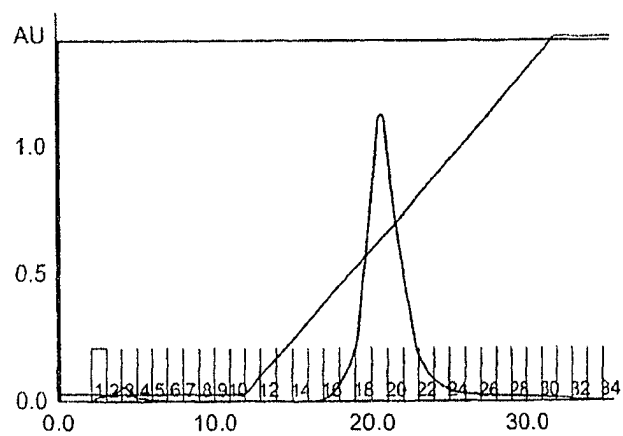


FIG. 10a

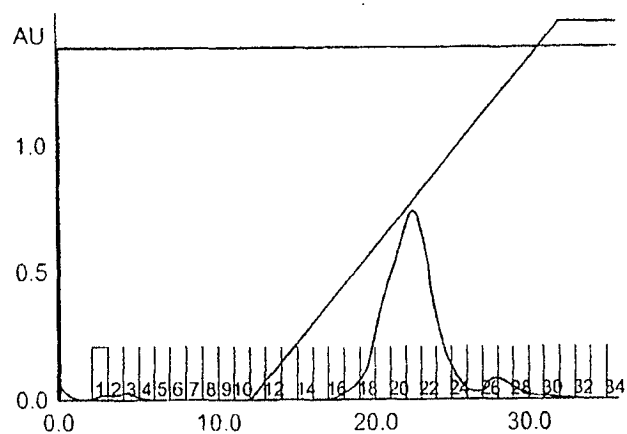


FIG. 10b

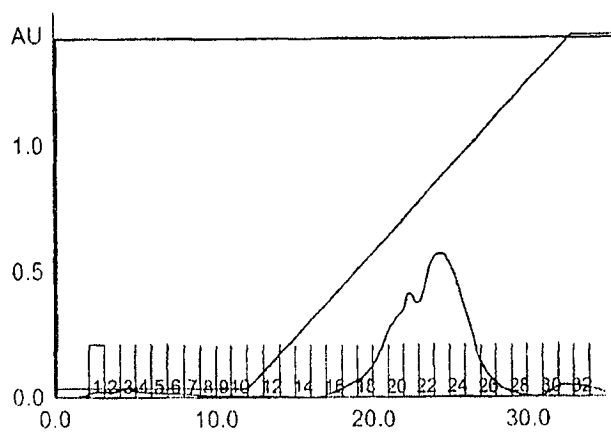


FIG. 10c

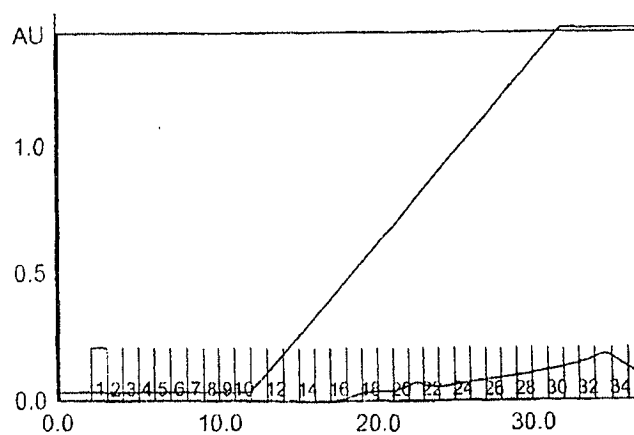


FIG. 10d