



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/10, C07H 1/08, B01D 21/26	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30686 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Juli 1998 (16.07.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00104 (22) Internationales Anmeldedatum: 9. Januar 1998 (09.01.98) (30) Prioritätsdaten: 97100330.6 10. Januar 1997 (10.01.97) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim-Waldhof (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang [DE/DE]; Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE). POPP, Friedrich [DE/DE]; Flohbühlweg 7, D-82377 Penzberg (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD OF PURIFYING DNA IN A CROSS-FLOW CENTRIFUGE (54) Bezeichnung: REINIGUNG VON DNA IN EINER DURCHFLUSSZENTRIFUGE (57) Abstract The invention concerns a method of purifying extrachromosomal DNA by passing an extrachromosomal DNA and fluid containing further cell components through a cross-flow centrifuge under given conditions, resulting in separation of the extrachromosomal DNA from the other cell components such that purified extrachromosomal DNA is obtained. The invention further concerns the use of the purified extrachromosomal DNA for cloning, transformation, transfection and microinjection into cells, for use in gene therapy processes, DNA vaccination and/or for polymerase chain reaction (PCR). The invention finally concerns the use of a cross-flow centrifuge for purifying extrachromosomal DNA. (57) Zusammenfassung In der Erfindung wird zur Aufreinigung von extrachromosomaler DNA eine extrachromosomale DNA und weitere Zellbestandteile enthaltende Flüssigkeit unter Bedingungen durch eine Durchflußzentrifuge geleitet, was zur Abtrennung der extrachromosomalen DNA von den übrigen Zellbestandteilen führt und man gewinnt die gereinigte extrachromosomale DNA. Im weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der gereinigten extrachromosomalen DNA zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), sowie die Verwendung einer Durchflußzentrifuge zur Aufreinigung von extrachromosomaler DNA.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Reinigung von DNA in einer Durchflußzentrifuge

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung von extrachromosomaler DNA unter Verwendung einer Durchflußzentrifuge.

10 Die Gewinnung von Nucleinsäuren insbesondere von Plasmid-DNA, hat in der Molekularbiologie und in der modernen Medizin eine große Bedeutung. Als Plasmid-DNA werden extrachromosomale DNA-Duplex-Moleküle bezeichnet, die üblicherweise eine Größe von 1 bis mehr als 200 kb aufweisen und in Wirtszellen in einer bis
15 mehreren Hundert von Kopien vorliegen. Plasmid-DNA wird im allgemeinen in Zellen, z. B. in gram-negativen Bakterien, insbesondere in E.coli amplifiziert. Anschließend werden die Zellen aufgeschlossen und die Plasmid-DNA daraus isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA kann dann für molekularbiologische oder
20 medizinische Anwendungen, z. B. zur Konstruktion von Klonierungsvektoren, zur Transformation von prokaryontischen und zur Transfektion von eukaryontischen Zellen, eingesetzt werden. Zum Aufschluß der Zellen und zur Gewinnung der Plasmid-DNA sind verschiedene Methoden bekannt (siehe J. Sambrook et al.,
25 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Bei einem von Birnboim & Doly entwickelten Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Zellen (Birnboim & Doly, Nucl.
30 Acid Res. 7 (1979) 1513-1523) wird die Biomasse mit einer NaOH/Detergenzlösung lysiert und anschließend der pH-Wert mit K-Acetat auf ca. 5,0 eingestellt. Dabei entsteht ein Niederschlag, der überwiegend genomische DNA und Zellwandfragmente enthält. Zur Abtrennung dieser Verunreinigungen wird die Sus-
35 pension in Zentrifugenbecher überführt. Der Niederschlag wird dann mittels einer Becherzentrifuge abzentrifugiert, um den Überstand mit der Plasmid-DNA zu erhalten.

Auch bei Fermentationsprozessen ist die Verwendung von Zentrifugen gebräuchlich, um beispielsweise Fermenterüberstände von Zellen und Zellfragmenten zu trennen. Hierzu werden üblicherweise Siebzentrifugen und Festwandzentrifugen verwendet
5 (siehe Gerhartz W., Enzymes in industry: production and applications, 1990, VCH, Weinheim, Deutschland, Kap. 3.2.1).

Mit gebräuchlichen Laborzentrifugen ist das bearbeitbare Volumen durch das Volumen des Rotors bzw. der Rotorbecher auf
10 unter zehn Liter begrenzt (z. B. Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 6 x 250 ml). Somit kann dieses Verfahren nur zur Gewinnung von Plasmid-DNA in geringen Mengen eingesetzt werden. Eine Übertragung des Verfahrens auf großtechnische Prozesse bereitet aufgrund des begrenzten Zentrifugenvolumens erheb-
15 liche Probleme.

Große Volumina können mittels Durchflussszentrifugen verarbeitet werden. WO92/12780 beschreibt eine technische Ausgestaltung einer Durchflußzentrifuge und ihre Verwendung zur Auf-
20 trennung von Makromolekülgemischen. Die Trennung von beispielsweise vier Standardproteinen erfolgt dabei in einem wässrigen 2-Phasensystem bei maximal 1000 Upm entsprechend den jeweiligen Verteilungskoeffizienten der Proteine. Aufgrund der zeitlich verschiedenen Elution werden die Bestandteile des Gemisches getrennt voneinander erhalten.
25

Durch die immer größere Verbreitung von molekularbiologischen Methoden steigt jedoch der Bedarf nach gereinigter Plasmid-DNA für analytische und therapeutische Anwendungen in der For-
30 schung und Medizin. Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war es deshalb, ein Verfahren bereitzustellen, das eine effiziente und schnelle Reinigung von Plasmid-DNA in großen Mengen ermöglicht.

35 In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Aufreinigung von extrachromosomaler DNA, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine extrachromosomale DNA und

weitere Zellbestandteile enthaltende Flüssigkeit unter Bedingungen durch eine Durchflußzentrifuge geleitet wird, die zur Abtrennung der extrachromosomalen DNA von unlöslichen Zellbestandteilen führen und die gereinigte extrachromosomale DNA
5 gewonnen wird.

Im Stand der Technik wurden Durchflußzentrifugen bisher ausschließlich zur Zellabtrennung verwendet. Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß Durchflußzentrifugen auch
10 dazu verwendet werden können, extrachromosomale DNA in großen Mengen aufzureinigen, ohne daß die extrachromosomale DNA durch die auftretenden Scherkräfte geschädigt wird. Überraschend war ebenfalls die Tatsache, daß die in der Suspension der aufgeschlossenen Zellen anwesende chromosomale DNA während der
15 Durchflußzentrifugation nicht fragmentiert wird und damit quantitativ von der extrachromosomalen DNA abgetrennt werden kann.

Die extrachromosomale DNA, die durch das erfindungsgemäße
20 Verfahren aufgereinigt wird, kann linear oder zirkulär, einzel- oder doppelsträngig sein. Vorzugsweise ist die DNA eine zirkuläre und doppelsträngige Plasmid-DNA. Die extrachromosomale DNA enthaltende Zelle kann eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle sein, vorzugsweise ist sie eine Bakterienzelle, insbesondere eine gram-negative Zelle, wie etwa
25 eine E.coli-Zelle. Gegebenenfalls können Zellen verwendet werden, in denen als extrachromosomale DNA sogenannte artifizielle Chromosomen enthalten sind. Artifizielle Chromosomen sind lineare doppelsträngige DNA-Moleküle, die im allgemeinen
30 als YAC (yeast artificial chromosome) bezeichnet werden und in Hefezellen amplifiziert werden.

Die in das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzte, extrachromosomale DNA enthaltende Flüssigkeit, ist vorzugsweise ein
35 Zell-Lysat. Besonders bevorzugt wird das Zell-Lysat durch alkalische Lyse von extrachromosomale DNA enthaltenden Zellen und anschließendes Ansäuern hergestellt. Es können aber auch

andere gebräuchliche Zellaufschlußmethoden verwendet werden, wie beispielsweise die Kombinationen von Enzym- (Lysozym) und Hitzebehandlung.

- 5 Es kann jede beliebige Menge an zellulärer Biomasse als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden. Vorzugsweise wird pro Ansatz eine Biomasse von 100 g bis 50 kg lysiert.
- 10 Die extrachromosomale DNA enthaltende Flüssigkeit wird im allgemeinen durch Gefälle oder/und Pumpen in die Durchflußzentrifuge eingeleitet. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Durchflußzentrifuge mit einem dem Lyse-Ansatz angepaßten Volumen eingesetzt. Vorzugsweise wird ein Volumen von minde-
- 15 stens 0,1 bis 50 l, besonders bevorzugt von 0,2 bis 4 l verwendet. Der Zentrifugenbehälter ist vorzugsweise zylinderförmig ausgebildet. Die Durchflußzentrifuge wird bei einer geeigneten g-Zahl, vorzugsweise bei 10.000 bis 40.000 x g betrieben. Beispiele für kommerziell erhältliche Durchflußzen-
- 20 trifugen sind "CEPA"-Schnellzentrifugen oder Hochleistungszentrifugen der Fa. Carr (USA), die momentan eine Kapazität von bis zu 9.000 l/h aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im allgemeinen kontinuier-

25 lich durchgeführt. Die Suspension der lysierten Biomasse wird von unten in die Durchflußzentrifuge eingeleitet. Durch die Rotation des Zentrifugengefäßes (10.000 - 40.000 x g) scheiden sich feste Bestandteile wie etwa Zellwandbestandteile und an ihr haftende genomische DNA an der Wand des Zentrifugengefäßes

30 ab. Die gereinigte extrachromosomale DNA enthaltende Lösung tritt im allgemeinen nach oben aus der Durchflußzentrifuge aus, wobei jedoch auch ein Austreten der extrachromosomale DNA enthaltenden Lösung seitlich, nach unten oder an anderer Stelle denkbar ist.

35

Die Durchflußzentrifuge kann mit unterschiedlichen Temperaturen betrieben werden, vorzugsweise wird das Verfahren bei 4° C

bis Raumtemperatur durchgeführt.

In dem vorliegenden Verfahren kann extrachromosomale DNA unterschiedlicher Größe aufgereinigt werden, vorzugsweise wird
5 extrachromosomale DNA mit einer Größe von 1 kbp bis 200 kbp aufgereinigt. Die extrachromosomale DNA ist vorzugsweise lineare, zirkuläre oder supercoiled Plasmid-DNA.

Nach dem Verlassen der Zentrifuge kann die extrachromosomale
10 DNA weiter aufgereinigt werden. So wird, um RNA aus der Lösung zu entfernen, gegebenenfalls eine RNase-Behandlung durchgeführt. Weiterhin können auch chromatographische Reinigungsschritte, wie beispielsweise Anionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder Hydroxylapatitchromatographie
15 durchgeführt werden. Beispiele geeigneter Materialien für die Anionenaustauschchromatographie sind organische oder anorganische Polymere und Copolymere, wie etwa Polymethacrylat (Makroprep-Biorad, Deutschland), Polystyrol-Divinylbenzol (Poros-Perseptive, HyperD-Biosepra, Source-Pharmacia) oder Silicagel,
20 an deren Oberfläche positiv geladene Gruppen z. B. Diethylaminoethyl (DEAE) oder Dimethylaminoethyl (DMAE) - Gruppen gebunden sind. Ein besonders bevorzugtes Material für die Anionenaustauschchromatographie ist Q-Sepharose. Ein besonders bevorzugtes Material für die Affinitätschromatographie ist Hydroxylapatit.
25

Darüber hinaus kann die erhaltene DNA-Lösung zur weiteren Reinigung, Konzentrierung oder/und Umpufferung einer Cross-Flow-Filtration ausgesetzt werden. Bei dieser Cross-Flow-Filtration
30 kann auch eine weitgehende Entfernung von Endotoxinen aus der DNA-Präparation erreicht werden. Dazu wird die DNA-Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet, deren Ausschlußgröße so gewählt wird, daß die DNA-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können, wobei eine endotoxinfreie DNA-Lösung erhalten wird.
35

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene extrachromosomale DNA ist im wesentlichen unbeschädigt und weist im wesentlichen keine Einzel- oder Doppel-Strangbrüche auf. Insbesondere zeigt eine erfindungsgemäß aufgereinigte Plasmid-DNA
5 nach gelelektrophoretischer Auftrennung nur eine dominante Bande, die der Konformation "Covalently Closed Circle" entspricht. Des weiteren sind neben den Konformationen "Open Circle" und "Linearized Circle" entsprechenden Banden keine weiteren Banden vorhanden.

10

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene DNA kann ohne weiteres für übliche molekularbiologische und medizinische Anwendungen, wie etwa zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur
15 Verwendung bei Verfahren der Genterapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung
20 die Verwendung einer Durchflußzentrifuge zur Aufreinigung von extrachromosomaler DNA.

Beispiel

25 In dem durchgeführten Versuch wird eine CEPA-Laborzentrifuge LE (offene Ausführung) mit einem Klärzylinder aus rostfreiem Stahl (1.4571, V4A) verwendet. Ca.2.000 g Biomasse werden nach der Alkali-Lysemethode (modifiziertes Verfahren nach Birnboim & Doly; Birnboim & Doly, Nucl. Acid Res. 7 (1979) 1513-1523)
30 aufgeschlossen.

1. Lyse der E.coli Biomasse

2.000 g feuchte E.coli Biomasse wird aus dem Fermenter in
35 entpyrogenisierte Becher abgefüllt. Es werden 22,5 l Resuspensionspuffer (50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA-Na₂, pH 8 ± 0,2) zugegeben und mindestens 24 Stunden bei 5 ± 4° C langsam

(ca. 35 RPM) gerührt, bis die Biomasse vollständig suspendiert ist. Dann wird die Temperatur der Suspension langsam auf 25° C erhöht. Zur Suspension werden 22,5 l 0,2 mol/l NaOH, 1 % SDS unter Rühren mit ca. 80 RPM zugegeben und bei 25° C 5 Minuten
5 inkubiert. Es werden 22,5 l Kaliumacetatpuffer (3 mol/l Kaliumacetatpuffer pH 5,5) unter Rühren zugefügt und die Temperatur der Biomasse möglichst schnell auf 4° C abgesenkt. Der erhaltene Aufschluß wird mit Hilfe der Durchflußzentrifuge im "continuous-flow-through-mode" klarfiltriert.

10

2. Durchflußzentrifugation

Die viskose Suspension wird durch die Einlaßöffnung in die Durchflußzentrifuge gepumpt. Die Zentrifuge wird dabei mit
15 einer g-Zahl von 10.000-18.000 x g betrieben. Sobald austretende Flüssigkeit trüb wird, ist der Niederschlag vom Zylinder zu entfernen und nach Einsetzen des gereinigten Zylinders die Zentrifugation fortzusetzen. Die klare von den zellulären Verunreinigungen befreite Plasmid-DNA-Lösung tritt nach oben
20 aus der Durchflußzentrifuge aus und wird in einem Gefäß gesammelt.

3. Weitere Aufreinigungsschritte:

25 Q-Sepharose-Chromatographie, Hydroxylapatit-Chromatographie und Cross-Flow-Filtration

In einem nächsten Schritt wird eine Chromatographie an Q-Sepharose und Hydroxylapatit durchgeführt. Der dekantierte Zentrifugenüberstand wird durch Zugabe von TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH 8,5 ± 0,2) auf 49 - 50 mS/cm Leitfähigkeit eingestellt und auf 5 ± 4° C abgekühlt. Die gesamte Chromatographie wird bei dieser Temperatur durchgeführt. Der Zentrifugationsüberstand wird auf die aquilibrierte Säule
35 aufgezogen. Anschließend wird die Säule mit ca. 8 SV 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl pH 8,5 ± 0,2 gewaschen.

Zur Elution wird an die Säule ein Gradient (5 SV Puffer A (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mmol/l NaCl pH 8,0 $\pm$ 2), 5 SV Puffer B (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,85 mol/l NaCl pH 8,0 $\pm$ 0,2)) angelegt und das Eluat fraktioniert, die
5 Detektion erfolgt bei 254 nm. Der Vorpeak (Verunreinigungen) wird vom Hauptpeak (Plasmid-DNA) abgetrennt, indem der Hauptpeak ab ansteigender Flanke in einem separatem Gefäß aufgefangen wird.

10 Im folgendem wird eine Chromatographie an Hydroxylapatit (HA Ceramic) bei 5 $\pm$ 4° C durchgeführt.

Äquilibrierungspuffer: 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH 7, 0 $\pm$ 0,2.

15

Waschpuffer 1: 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH 7,0 $\pm$ 0,2.

Waschpuffer 2: 0,02 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 $\pm$ 0,2.

20

Elutionspuffer: 0,5 mol/l Kaliumphosphat pH 7,0 $\pm$ 0,2.

Die Detektion erfolgt bei 254 nm mit einer UV-Detektor/Schreibereinheit. Als Eichlösung wird eine 1 % Produktlösung (Plasmid-DNA), vermessen mit einem kalibrierten Photometer, verwendet.
25

Der Q-Sepharose-Pool wird auf eine Endkonzentration von 1,1 mmol/l Calciumchlorid gebracht und auf die äquilibrierte Säule
30 aufgezogen.

Anschließend wird die Säule nacheinander gewaschen mit:

1. 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH 7,0 $\pm$ 0,2,
35 bis am Detektor keine Absorption mehr erkennbar ist.
2. 2-4 SV, 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH 7,0 $\pm$ 0,2.

3. 5 SV, 0,02 mol/l Kaliumphosphat pH 7,0 $\pm$ 0,2.

Im Anschluß an die Waschschritte wird mit 0,5 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 $\pm$ 0,1 bei einer Flußrate von 5-6 SV/h
5 eluiert.

Der Peak wird gesammelt und mit einer Cross-Flow-Filtration auf ca. 50 ml konzentriert. Die CFF wird mit einer Retentatdurchflußrate von 100-200 l/h•m², einem Transmembrandruck von
10 ca. 0,8 bar und einem Überströmdruck von ca. 1,2 bar durchgeführt. Anschließend wird das Retentat gegen TE-Puffer (10 mmol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) fließend diafiltriert, bis die Werte für pH und Leitfähigkeit von Retentat und TE-Puffer übereinstimmen. Nach Beendigung des Diafiltrationsvor-
15 ganges wird das Retentat durch Verdünnung mit Diafiltrationspuffer auf eine Plasmid-DNA-Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

4. Gelelektrophorese

Die Intaktheit der erhaltenen Plasmid-DNA wird mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

5
Dazu wird ein Aliquot der Plasmid-DNA in verschiedenen Konzentrationen auf ein Agarosegel aufgetragen. Das dargestellte Agarosegel zeigt in den Spuren 1 und 10 den DNA-Längenstandard Nr. II (Fragmentgrößen: 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 10 9416, 23130 bp) und in den Spuren 2 und 9 DNA-Längenstandard III (Fragmentgrößen: 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp). Als Vergleichplasmid ist in Spur 3 pBR322 (4162 bp) aufgetragen, das nach konventioneller Cäsiumchloridgradientenmethode aufgereinigt wurde.
15 Es ist bekannt, daß nach dieser Methode gereinigte Plasmid-DNA im wesentlichen Plasmid-DNA enthält, die der Konformation "Covalently Closed Circle" (dominante "Supercoiled-Bande") entspricht. In den Spuren 4, 5 und 6 ist die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigte Plasmid-DNA (pCMV-CAT) in
20 unterschiedlichen Mengen aufgetragen.

Diese Plasmid-DNA war im Anschluß an das erfindungsgemäße Verfahren über Q-Sepharose und Hydroxylapatit-Chromatographie, sowie Cross-Flow-Filtration weitergereinigt worden.

Legende:

1%iges Agarosegel

- Spur 1: DNA-Längenstandard II (Boehringer Mannheim GmbH,
5 Kat.-Nr. 236250)
- Spur 2: DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim GmbH,
Kat.-Nr. 528552)
- Spur 3: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 481238)
(0,4 µg)
- 10 Spur 4: pCMV-CAT nach CFF, 0,19 µg (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 5: pCMV-CAT nach CFF, 0,45 µg (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 6: pCMV-CAT nach CFF, 0,71 µg (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 7: TE-Puffer
- Spur 8: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 481238)
15 (0,4 µg)
- Spur 9: DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim GmbH,
Kat.-Nr. 528552)
- Spur 10: DNA-Längenstandard II (Boehringer Mannheim GmbH,
Kat.-Nr. 236250)

20

Die erfindungsgemäß gereinigte Plasmid-DNA zeigt wie auch die Vergleichsplasmid-DNA (Spur 3) im wesentlichen eine dominante Bande. Dies zeigt, daß die erfindungsgemäß gewonnene Plasmid-DNA nicht geschädigt wird und in ihrer ursprünglichen Konfor-
25 mation erhalten bleibt. Außerdem zeigt das Fehlen von zusätzlichen Banden in dem Agarosegel, daß die in der aufgeschlossenen Zellsuspension enthaltene chromosomale DNA während der Durchlaufzentrifugation nicht fragmentiert wird, sondern als präzipitiertes Makromolekül vollständig von der Plasmid-DNA
30 abgetrennt werden kann.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufreinigung von extrachromosomaler DNA,
5 **dadurch gekennzeichnet,**
daß eine extrachromosomale DNA und weitere Zellbestandteile enthaltende Flüssigkeit unter Bedingungen durch eine Durchflußzentrifuge geleitet wird, die zur Abtrennung der extrachromosomalen DNA von unlöslichen Zellbestandteilen führen und die gereinigte extrachromosomale
10 DNA gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß die extrachromosomale DNA enthaltende Flüssigkeit durch Lyse von extrachromosomale DNA enthaltenden Zellen gewonnen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die Lyse eine alkalische Lyse ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die extrachromosomale DNA enthaltende Zelle eine Bakterienzelle, vorzugsweise eine E.coli-Zelle ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß die in die Zentrifuge eingeleitete Flüssigkeit durch Lyse von 100 g - 50 kg Biomasse erhalten wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die extrachromosomale DNA enthaltende Flüssigkeit
durch Gefälle oder/und Pumpen in die Durchflußzentrifuge
5 eingeleitet wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Durchflußzentrifuge mit einem Volumen des Zen-
trifugenbehälters von mindestens 0,1 - 50 l verwendet
10 wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß eine Durchflußzentrifuge mit einem Volumen des Zen-
trifugenbehälters von 0,2 - 4 l verwendet wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß die Durchflußzentrifuge mit einer Beschleunigung von
10.000 - 40.000 x g betrieben wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß das Verfahren kontinuierlich durchgeführt wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Größe der extrachromosomalen DNA 1 kbp - 200 kbp
30 ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die extrachromosomale DNA lineare, zirkuläre oder
supercoiled Plasmid-DNA ist.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die gereinigte extrachromosomale DNA enthaltende
Lösung weiter aufgereinigt werden kann.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein weiteres Aufreinigen eine Anionenaustauschchroma-
tographie, eine Affinitätschromatographie, eine Hydroxyl-
15 apatitchromatographie, eine RNase-Behandlung oder/und
eine Cross-Flow-Filtration umfaßt.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß man eine extrachromosomale DNA gewinnt, die im we-
sentlichen keine Strangbrüche aufweist.
16. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche
gereinigten extrachromosomalen DNA zum Klonieren, zur
25 Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in
Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der
DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion
(PCR).
- 30 17. Verwendung einer Durchflußzentrifuge zur Aufreinigung von
extrachromosomaler DNA.

Abbildung 1

