

Inversmizellare Phasensysteme für die Nukleinsäureextraktion

Nadine Streitner und Erwin Flaschel
Universität Bielefeld, Technische Fakultät, 33594 Bielefeld

Einleitung

Die fortschreitende Entwicklung in der Gentherapie führt zu einem immer höheren Bedarf an therapeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA (pDNA). Zunächst war das Hauptziel der Gentherapie die Behandlung monogenetischer Erkrankungen und Infektionskrankheiten, bis Herz-Kreislauf-Erkrankungen und vor allem Krebs in den Fokus der Forschung rückten. Plasmid-DNA ist als nicht-viraler Vektor für den Transfer therapeutischer Gene geeignet und ist vor allem auch auf dem Gebiet der genetischen Impfung von besonderem Interesse. Gegenüber herkömmlichen Vakzinen bietet Plasmid-DNA den Vorteil, dass der Erreger nicht direkt in den Körper gelangt, sondern lediglich die genetische Information eines Antigens, deren Expression im Körper eine zelluläre oder humorale Immunantwort auslöst.

Um Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen herstellen zu können, sind effiziente und gut skalierbare Prozesse notwendig. Für den Einsatz im gentherapeutischen Bereich werden hohe Qualitätsanforderungen gestellt. Diesbezüglich müssen die Anforderungen regulatorischer Behörden (Food and Drug Administration, FDA/ European Medicines Agency, EMEA) eingehalten werden. Verfahren zur Herstellung von Plasmid-DNA bestehen gewöhnlich aus der Kultivierung plasmidreplizierender Bakterien, einem Zellaufschluss zur Freisetzung der Plasmide und weiteren geeigneten Aufarbeitungsprozessen der Separation und Reinigung. Die bioverfahrenstechnische Herausforderung besteht in der Abtrennung der superspiralisierten Plasmid-DNA von strukturell ähnlichen Verunreinigungen wie RNA, chromosomaler DNA (chrDNA) und Lipopolysacchariden (LPS). In der Regel werden zur Aufreinigung von Plasmid-DNA chromatographische bzw. adsorptive Verfahren eingesetzt. Die meisten dieser Methoden sind jedoch zeitaufwändig, mit hohen Produktverlusten verbunden oder es bestehen Schwierigkeiten in der Maßstabsvergrößerung. Eine Alternative stellen Extraktionsprozesse dar, da diese gut skalierbar sind und lediglich einfache und kostengünstige Chemikalien und Geräte benötigen. Es können sowohl wässrige als auch inversmizellare Zweiphasensysteme zur Aufarbeitung von Plasmid-DNA eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von Nukleinsäuren in einem inversmizellaren Zweiphasensystem untersucht. Es wurde der Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen sowie die Auswirkung unterschiedlicher Alkohole auf das Extraktionssystem betrachtet. Im Fokus der Untersuchungen stand die Trennleistung des Systems. Darüber hinaus wurde die Kapazität und die Möglichkeit zur Trennung verschiedener Plasmidformen geprüft. Die Ergebnisse konnten erfolgreich eingesetzt werden, um RNA, Proteine, chromosomale DNA und Endotoxine während der Extraktion der Plasmid-DNA aus einem konditionierten bakteriellen Klarlysat abzureichern.

Ergebnisse

Wahl der Prozessführung

RNA ist eine der Hauptverunreinigungen in bakteriellem Klarlysat. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Plasmid-DNA kann RNA schlecht aus dem Produktstrom entfernt werden. Bei der Verwendung eines inversmizellaren Zweiphasensystems ergeben sich mehrere Möglichkeiten für die Prozessführung, die in **Abbildung 1** dargestellt sind. Einerseits kann während der Extraktion die RNA abgetrennt werden, wobei sowohl die ccc- als auch die oc-Form der Plasmide in der wässrigen Raffinatphase verbleiben. Hierdurch kann eine Trennung von Plasmid-DNA und RNA erreicht werden. In diesem Fall ist jedoch keine Konzentrierung während des Aufarbeitungsprozesses möglich. Außerdem kann keine Abreicherung anderer Verunreinigungen wie Proteine, chrDNA oder Endotoxine erzielt werden. Die andere Möglichkeit besteht darin, während einer Hinextraktion RNA und die ccc-Form aus der wässrigen Zulaufphase zu extrahieren und somit die oc-Form abzutrennen. Bei der darauf folgenden Rückextraktion wird dann die ccc-Form in eine weitere wässrige Phase verbracht. In diesem Schritt kann sowohl die RNA abgetrennt als auch durch Veränderung der Phasenverhältnisse eine Konzentrierung erzielt werden.

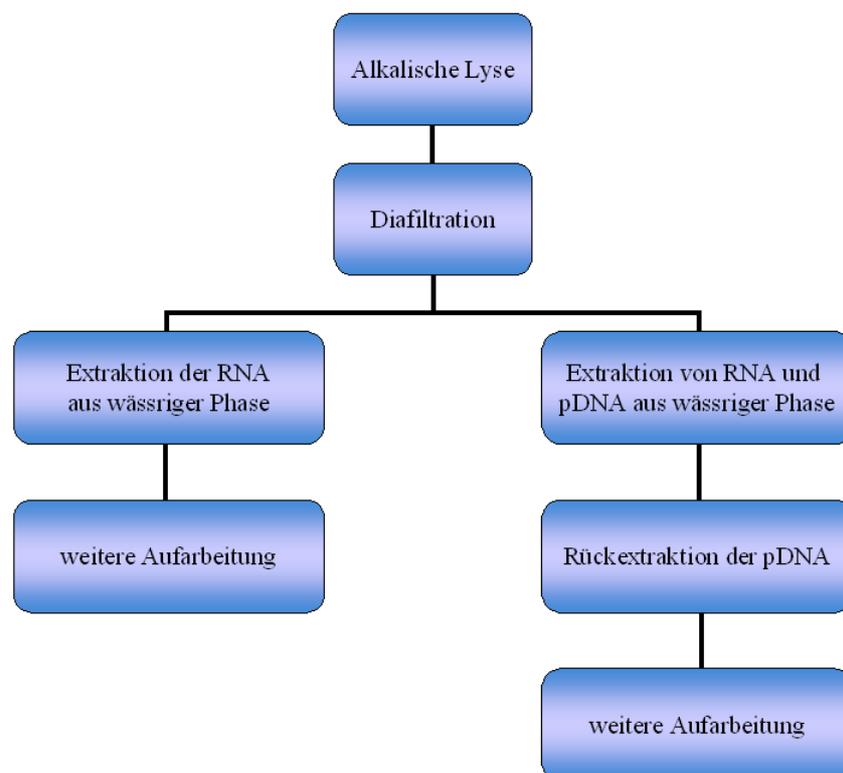


Abbildung 1 Alternativen der Prozessführung für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA mittels inversmizellarer Zweiphasensysteme

Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren im Extraktionssystem

Im Rahmen der Hinextraktion wurde der Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen auf das Extraktionsverhalten der Nukleinsäuren untersucht (Streitner *et al.* 2007). Die inversmizellare Phase bestand aus 40 mM Methyltrioctylammoniumchlorid (TOMAC), das durch die Zugabe von Alkohol als Cotensid in iso-Octan gelöst wurde. Als Zulaufphase wurde ein diafiltriertes bakterielles Klarlysat verwendet. Durch die Diafiltration wurde der störende Einfluss oberflächenaktiver Bestandteile wie Natriumdodecylsulfat und von Proteinen beseitigt. Bei geringen Salzkonzentrationen wurden die Nukleinsäuren vollständig in die inversmizellare Phase extrahiert, während bei einer Erhöhung der

Salzkonzentration diese in der wässrigen Phase verblieben. Beim Vergleich von RNA und Plasmid-DNA wurde ein Unterschied im Verteilungsverhalten festgestellt, was die Möglichkeit eröffnet, RNA von Plasmid-DNA zu trennen.

Für die Verfahrensoption, bei der sowohl RNA als auch Plasmid-DNA im Rahmen der Hinextraktion in die inversmizellare Phase extrahiert werden, sollte die Plasmid-DNA durch eine anschließende Rückextraktion in eine zweite wässrige Rezeptorphase transferiert und so von der RNA getrennt werden. Der Vorteil dieser Verfahrensweise liegt in der Möglichkeit, das Produkt in zwei Extraktionsschritten deutlich konzentrieren und auf diese Weise auch andere Verunreinigungen (Endotoxine, chrDNA, Proteine) stärker abzureichern zu können. Es wurde zunächst angenommen, dass Bedingungen, die eine Extraktion der Nukleinsäuren in die inversmizellare Phase während der Hinextraktion verhindern (hohe Salzkonzentrationen), bei der Rückextraktion für einen Transfer der Nukleinsäuren in die wässrige Rezeptorphase sorgen. Es zeigte sich jedoch, dass Plasmid-DNA bei Verwendung hoher Salzkonzentrationen nur unzureichend aus der inversmizellaren Phase zurück extrahiert werden konnte und eine Wiederfindung unter 40 % beobachtet wurde. Dieses Resultat ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht erklärbar, wurde aber bereits in der Literatur bei der inversmizellaren Extraktion von Proteinen beschrieben (Carlson and Nagarajan 1992; Jolivald *et al.* 1993). Auch ausreichend lange Kontaktzeiten (16 h für die Rückextraktion. Zum Vergleich: Für die Hinextraktion reichten Kontaktzeiten im Minutenbereich) führten zu keiner Verbesserung der Wiederfindung.

Neben der Salzkonzentration hat aber auch das Cotensid – in der Regel ein aliphatischer Alkohol, der die Löslichkeit des ionischen Tensids in der organischen Phase verbessert – einen Einfluss auf das Verteilungsverhalten im Extraktionssystem. Der Einfluss verschiedener aliphatischer Alkohole auf das Extraktionsverhalten von Plasmid-DNA im System TOMAC/iso-Octan wurde untersucht (Streitner *et al.* 2008). Durch Erhöhung der Alkoholkonzentration während der Rückextraktion konnte die Wiederfindung der Plasmid-DNA auf über 90 % erhöht werden. Die Ergebnisse haben weiterhin gezeigt, dass sowohl die Konzentration als auch die Struktur (Kettenlänge und Verzweigungsgrad) des Alkohols einen Einfluss auf das Extraktionsverhalten haben (Streitner *et al.* 2008). Diese Wirkung kann durch die veränderte Krümmung der Tensidschicht in der inversen Mizelle erklärt werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind jedoch strukturelle Untersuchungen durch physikalisch-chemische Methoden an dem verwendeten Extraktionssystem notwendig. Dadurch können Veränderungen in der Struktur durch Prozessvariablen erkannt werden und Rückschlüsse auf das Verteilungsverhalten gezogen werden.

Abreicherung weiterer Verunreinigungen

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte ein optimales Extraktionssystem zur Trennung von Plasmid-DNA und RNA aus diafiltriertem bakteriellen Klarlysat entwickelt werden. Ziel der weiteren Versuche war es, die Abreicherung anderer Verunreinigungen (chrDNA, Endotoxine, Proteine) durch dieses System zu analysieren und das Extraktionsverfahren in einen skalierbaren Aufarbeitungsprozess einzubinden.

Die Konzentration der chromosomalen DNA im Lysat hängt stark vom verwendeten Mischverfahren für die alkalische Lyse ab. Verschiedene Methoden (Überkopfschütteln, Rühren, kontinuierliche Lyse mit Flotation) wurden im Litermaßstab angewendet. Der Gehalt an chrDNA wurde im Lysat und im Extrakt nach inversmizellarer Extraktion bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass unterschiedliche Verfahren der alkalischen Lyse auch zu unterschiedlichen chrDNA-

Konzentrationen führen. Das verwendete Extraktionssystem war jedoch in allen Fällen in der Lage, diese Verunreinigungen unter den erforderlichen Grenzwert für pharmazeutisch einsetzbare Plasmid-DNA abzureichern.

Endotoxine konnten durch kombinierte Hin- und Rückextraktion deutlich (>99 %) abgereichert werden, jedoch lag die erzielte Konzentration mit 3400 E.U./mg Plasmid über dem erforderlichen Grenzwert von 10 E.U./mg. Durch Integration in ein skalierbares Aufarbeitungsschema (siehe Abschnitt Prozessintegration) konnte dieser Grenzwert jedoch unterschritten werden.

Die Abreicherung der Proteine wurde ebenfalls für den bestehenden Aufarbeitungsprozess untersucht. Hierzu konnte festgestellt werden, dass ein erheblicher Anteil der im Lysat vorhandenen Proteine bereits durch den Diafiltrationsschritt abgetrennt wurde. Der nachfolgende Extraktionsschritt reduzierte die Proteinverunreinigung unter die Detektionsgrenze.

Als zusätzliche Kontamination ist das durch die Extraktion eingebrachte kationische Tensid zu berücksichtigen. Die TOMAC-Konzentration in der wässrigen Extraktphase kann durch Zweiphasentitration nach Wickbold (1976) bestimmt werden. Hierbei wurde eine Konzentration von 1 mM TOMAC ermittelt. Durch einen anschließenden Diafiltrationsschritt konnte diese minimale Menge entfernt werden, und im erhaltenen Retentat konnte kein TOMAC mehr nachgewiesen werden.

Prozessintegration

Durch die Kombination von Diafiltration und inversmizellarer Extraktion konnte ein hochskalierbares Aufbereitungsverfahren etabliert werden, bei dem auf chromatographische Prozessschritte verzichtet werden konnte. Insbesondere für die Abreicherung von Endotoxinen standen verschiedene Verfahrensoptionen zur Verfügung (**Abbildung 2**), um den gewünschten Reinheitsgrad zu erzielen.

Neben diesen Verfahrensoptionen wurden auch noch Möglichkeiten untersucht, chromatographische Trennverfahren in den Aufarbeitungsprozess zu integrieren (Streitner *et al.* 2008). Zunächst konnte festgestellt werden, dass zur Vereinfachung des Prozesses auf eine Diafiltration verzichtet werden kann, wenn das Klarlysat auf das zweifache Volumen verdünnt wird. Hierdurch konnte offensichtlich die Konzentration oberflächenaktiver Substanzen ausreichend reduziert werden. Nach inversmizellarer Extraktion war jedoch eine minimale Verunreinigung durch RNA zu beobachten, die durch einen weiteren Aufarbeitungsschritt, wie beispielsweise Anionenaustauschchromatographie, entfernt werden konnte.

Desweiteren war es auch möglich, die hydrophobe Interaktionschromatographie – z.B. PlasmidSelect, das zur Anreicherung der ccc-Form eingesetzt werden kann – dem Extraktionsschritt anzuschließen. Hierbei musste lediglich die Plasmid-DNA in eine wässrige Phase mit hoher Ammoniumsulfatkonzentration (2-2,5 M) zurückextrahiert werden, so dass die erhaltene wässrige Extraktphase direkt auf das HIC-Material aufgetragen werden konnte. Durch Verwendung von PlasmidSelect konnte eine weitere Abreicherung der oc-Form erreicht werden.

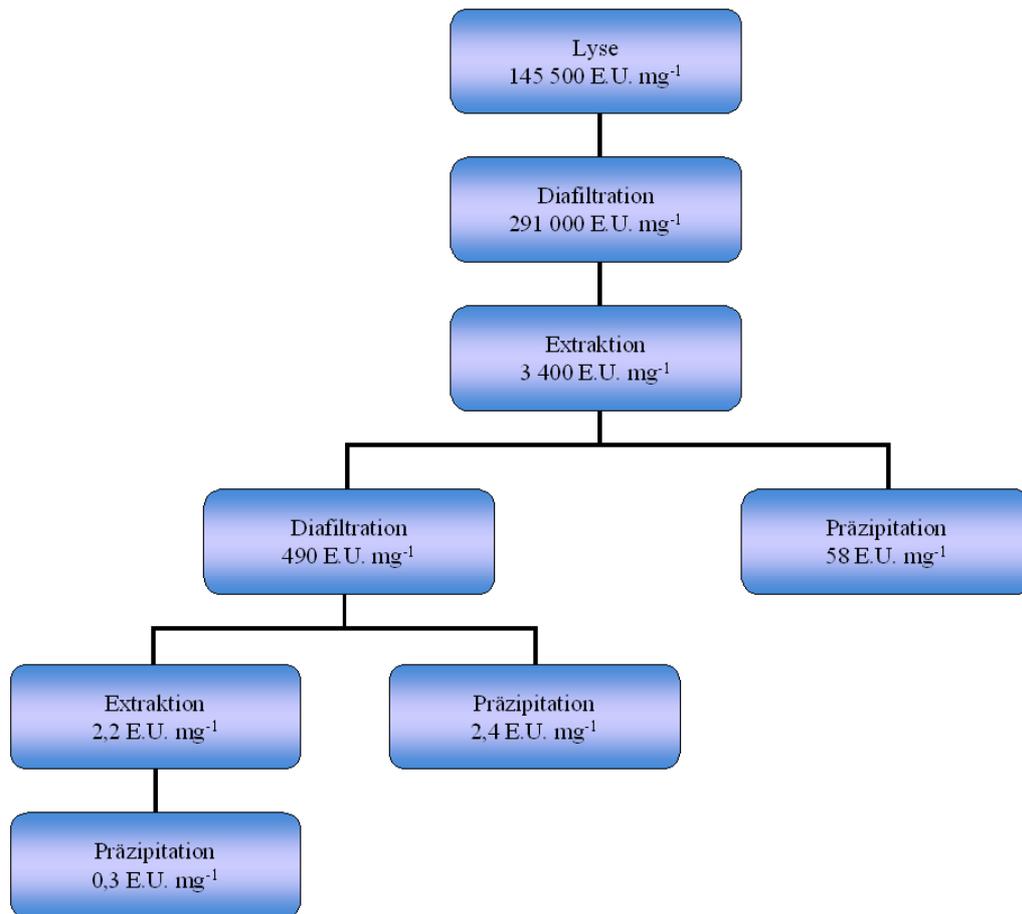


Abbildung 2 Verfahrensoptionen für die Abreicherung von Endotoxinen.

Vergleich mit publizierten Extraktionsverfahren

Im Vergleich zu anderen Extraktionsverfahren für Plasmid-DNA zeichnet sich das hier entwickelte Verfahren durch eine komplette Wiederfindung des Produkts bei gleichzeitiger Abreicherung der Hauptverunreinigungen aus, was in **Tabelle 1** zusammengefasst wird.

Tabelle 1 Vergleich von Extraktionsprozessen

Extraktions-system	Wiederfindung der Plasmid-DNA / %	RNA-Abreicherung / %	x(Protein/pDNA) / mg g ⁻¹	x(chrDNA/pDNA) / mg g ⁻¹	x(LPS/pDNA) / E.U. mg ⁻¹	Referenz
PEG-600/Phosphat	42	100	n.d.	5 ^a	n.a.	(Ribeiro <i>et al.</i> 2002)
PEG-600/(NH ₄) ₂ SO ₄	75	100	395	n.a.	3 646 (n.d. ^b)	(Trindade <i>et al.</i> 2005)
PEG-800/Phosphat	60 – 75	89	n.a.	n.a.	n.a.	(Frerix <i>et al.</i> 2005)
EO ₅₀ PO ₅₀ /Dextran	n.a.	80	6 522	n.a.	n.a.	(Kepka <i>et al.</i> 2004)
TOMAC/iso-Octan/H ₂ O	100	100	n.d.	4,0	3 400 (2,4 ^c)	diese Studie

^a Wert durch Southern Blot ermittelt

^b Nach Aufarbeitung durch HIC

^c Nach Diafiltration und Fällung mit 2-Propanol

Wiederverwendung des organischen Lösungsmittels

Die Extraktion in einem größeren Maßstab erfordert große Mengen iso-Octan. Um das beschriebene Verfahren ökonomisch und auch ökologisch interessant zu gestalten, ist eine Wiederverwertung des Lösungsmittels nötig. Durch Destillation kann iso-Octan ($K_p = 99 \text{ °C}$) einfach abgetrennt werden. Problematisch könnte der als Lösungsvermittler verwendete Alkohol sein. Während 1-Propanol mit $K_p = 97 \text{ °C}$ nur schwer destillativ abtrennbar ist, entstanden mit dem bevorzugt verwendeten 2-Propanol ($K_p = 82 \text{ °C}$) keine Schwierigkeiten und eine ausreichende Wiederverwertung des organischen Lösungsmittels war somit möglich.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen auf das Extraktionssystem bestehend aus TOMAC, iso-Octan und Wasser untersucht. Neben dem Salz hat die Verwendung unterschiedlicher Alkohole und Alkoholkonzentrationen im Extraktionssystem einen wesentlichen Einfluss. Mit steigender Alkoholkonzentration verschiebt sich der Extraktionspunkt bei der Hinextraktion zu geringeren Salzkonzentrationen. Dies deutet auf eine Verringerung der Mizellgröße mit steigender Alkoholkonzentration hin.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte RNA mittels eines zweistufigen Extraktionsprozesses - bestehend aus einer Hinextraktion in die inversmizellare Phase und Rückextraktion in eine neue wässrige Phase - aus einem diafiltrierten bakteriellen Klarlysat entfernt werden, während eine vollständige Wiederfindung der Plasmid-DNA erzielt werden konnte. Ferner wurde die Abreicherung anderer Verunreinigungen durch die inversmizellare Extraktion betrachtet. Proteine und chrDNA konnten effektiv entfernt werden, während Endotoxine durch geschickte Prozessintegration ausreichend abgereichert werden konnten.

Die inversmizellare Extraktion mit einem TOMAC/iso-Octan-System ermöglicht somit eine effiziente und sehr gut skalierbare Aufarbeitung von Plasmid-DNA aus bakteriellem Klarlysat. Im Vergleich zu anderen Extraktionssystemen ist das inversmizellare Zweiphasensystem im Hinblick auf die Einhaltung der Qualitätskriterien mindestens gleich effizient oder überlegen. Ein weiterer Vorteil beispielsweise gegenüber chromatographischen Verfahren liegt in der kurzen Prozesszeit. Für eine vollständige Verteilung der Biomoleküle im Extraktionssystem sind nur kurze Kontaktzeiten erforderlich. Zusätzlich bietet der Prozess die Möglichkeit einer starken Konzentrierung des Produkts.

Literatur

- Carlson A, Nagarajan R. 1992. Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition. *Biotechnol Prog* 8(1):85-90.
- Frerix A, Muller M, Kula MR, Hubbuch J. 2005. Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42:57-66.
- Jolivalt C, Minier M, Renon H. 1993. Extraction of cytochrome c in sodium dodecylbenzenesulfonate microemulsions. *Biotechnol Prog* 9(5):456-61.
- Kepka C, Rhodin J, Lemmens R, Tjerneld F, Gustavsson PE. 2004. Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system. *J Chromatogr A* 1024(1-2):95-104.
- Ribeiro SC, Monteiro GA, Cabral JM, Prazeres DM. 2002. Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems. *Biotechnol Bioeng* 78(4):376-84.
- Streitner N, Voß C, Flaschel E. 2008. Isolierung von Plasmid-DNA durch inversmizellare Zweiphasensysteme - Optimierung der Rückextraktion. *Chem Ing Tech* 80(6):831-837.

- Streitner N, Voss C, Flaschel E. 2007. Reverse micellar extraction systems for the purification of pharmaceutical grade plasmid DNA. *J Biotechnol* 131(2):188-196.
- Trindade IP, Diogo MM, Prazeres DM, Marcos JC. 2005. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1082(2):176-84.
- Wickbold R. 1976. *Die Analytik der Tenside*. Marl: Chemie Werke Huels AG.