(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3847779号
(P3847779)
(45)発行日　平成18年11月22日(2006.11.22)　(24)登録日　平成18年9月1日(2006.9.1)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 48/00	(2006.01)	A61K	48/00	
A61K 31/70	(2006.01)	A61K	31/70	
A61P 21/04	(2006.01)	A61P	21/04	
C07H 21/00	(2006.01)	C07H	21/00	
B01J 20/26	(2006.01)	B01J	20/26	H

請求項の数 22　(全 12 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-520389
(86)(22)出願日　平成7年2月3日(1995.2.3)
(65)公表番号　特表平9-508406
(43)公表日　平成9年8月26日(1997.8.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP1995/000389
(87)国際公開番号　WO1995/021177
(87)国際公開日　平成7年8月10日(1995.8.10)
審査請求日　平成12年3月10日(2000.3.10)
(31)優先権主張番号　P4403692.2
(32)優先日　平成6年2月7日(1994.2.7)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号　P4422291.2
(32)優先日　平成6年6月25日(1994.6.25)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者
クイアジェン・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国、ヒルデン　Ｄ－４０７２４、マックス－フォルマー－ストラッセ　４
(74)代理人
弁理士　塩澤　寿夫
(74)代理人
弁理士　今村　正純
(72)発明者　コルパン　メチン
ドイツ連邦共和国、エッセン　Ｄ－４５２１９、ウーラントストラッセ　５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子治療のためのエンドトキシンを含まないかエンドトキシンを減少させた核酸及び／またはオリゴヌクレオチドの製造方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
遺伝子治療において使用するための核酸及び／またはオリゴヌクレオチドの単離及び精製方法であって、前記核酸及び／またはオリゴヌクレオチドが本質的に生物学的な原料から単離及び精製され、
a)　前記の本質的に生物学的な原料を溶解してフラクションを得て、次いで、
b)　アニオン交換体材料からRNAが脱着し始めるイオン強度に対応する濃度よりも少なくとも100mM高い濃度の塩化ナトリウム溶液に対応するイオン強度においてのみアニオン交換体からDNAが脱着し始めるように設計されたアニオン交換体上で前記核酸及び／またはオリゴヌクレオチドを単離し、ステップb)の前又は後に、
c)　このように処理されたフラクションが、エンドトキシンの除去のために、非イオン洗浄剤若しくはアフィニティクロマトグラフィー支持体、または無機クロマトグラフィー材料で処理され、
前記アニオン交換体は、
シリカゲル、珪藻土、ガラス、酸化アルミニウム、酸化チタン、酸化ジルコニウム、およびヒドロキシアパタイトからなる群から選ばれる無機支持体材料、または、デキストラン、アガロース、アクリルアミド、ポリスチレン樹脂、および上記の材料のコポリマーからなる群から選ばれる有機支持体材料を、
第一の段階で一般式Ｉ
$R^1R^2R^3SiR^4$　(I)

（式中、R^1は１～１０の炭素原子のアルコキシ基、またはハロゲン原子、または１～６の炭素原子の同じであるか異なるアルキル基を有するジアルキルアミノ基であり；
R^2及びR^3は、独立に１～１０の炭素原子の炭化水素基、または１～１０の炭素原子のアルコキシ基、またはハロゲン原子、または少なくとも１つのオキサ若しくはアミノ基によって中断される４～２０の炭素原子のアルキル残基であって、前記残基は１以上のハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシまたはアリール基で置換されていてもよく；
R^4は１～２０の炭素原子の炭化水素鎖、または少なくとも１つのオキサ若しくはアミノ基によって中断されるアルキル残基であって、前記残基は１以上のハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、ヒドロキシ、アリール及び／またはエポキシにより置換されてもよい）のシラン化剤と反応させ、第２の段階で、第１の段階で修飾された支持体を一般式II

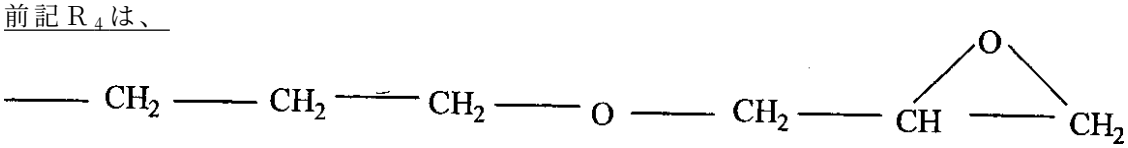
X-R-Y (II)

（式中、Xはアミノ、ヒドロキシ、エポキシ基またはハロゲン原子であり；
Rは２～２０の炭素原子の炭化水素鎖、または少なくとも１つのオキサ若しくはアミノ基によって中断されるアルキル残基であって、前記残基は１以上のハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、ヒドロキシ、アリール及び／またはエポキシにより置換されていてもよく；
Yはアニオン交換材料を形成する官能基を有し、１～１０の炭素原子を有する炭化水素基であって、１以上のアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、四級アルキルアミノにより置換されていてもよい）の試薬と反応させることにより得られたものであることを特徴とする前記方法。

【請求項２】
アニオン交換基で修飾された多孔性または非多孔性無機及び／または有機支持体材料を無機クロマトグラフィー材料の支持体材料として使用することを特徴とする請求項１に記載の方法。

【請求項３】
前記R_1は、$-OCH_3$、$-OC_2H_5$、$-OC_3H_7$、もしくは-Clであり、および／または、前記R_2及びR_3は、独立に$-CH_3$、$-C_3H_7$、$-OCH_3$、$-OC_2H_5$、もしくは$-OC_3H_7$である、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】
前記R_4は、



である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】
前記非イオン洗浄剤が、Triton▲R▼ X 114であり、および／または、前記アフィニティークロマトグラフィー支持体が、ニッケル／NTA、ニッケル／IDA、ポリミキシン（Polymyxin）、もしくはDNA ETOX▲R▼である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】
前記ステップa)において得られたフラクションは、機械的方法により前記生物学的な原料の残部を含まないか、または減少させられる、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】
前記機械的方法は、遠心分離および／または濾過である、請求項６に記載の方法。

【請求項８】
ジエチルアミノエチル（DEAE）基またはジメチルアミノエチル（DMAE）基が直接またはいわゆるスペーサーを介して支持体の表面に配置されている請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項９】
DNA、並びにその酵素的若しくは化学的に修飾された形態、及び／または任意の形態及び任意の起源のRNA、またはリボザイムを前記核酸として単離する請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記DNAは、プラズミド、コスミド、またはウィルスから単離されたDNAである、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
無機支持体材料で、核酸を含み、高い塩濃度を有するフラクションを処理することにより高イオン強度条件下に核酸を溶出するのに必要な塩を除去するものであって、核酸が無機支持体の表面に吸着し、水または低イオン強度のバッファー溶液で後に核酸を脱着する請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記無機支持体材料は、本質的にガラスからなるものである、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
フィルター及び／またはガラス、シリカゲル、アルミナ若しくはパックされた珪藻土、または繊維ガラス及びシリカゲル、並びにセルロースでできた絡み合わされているか接着されている不織物、紙、プレス紙、紙からできている不織物からなるフィルター層を有するフィルターを使用して、細胞溶解物の細胞断片を濾過により分離する請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記フィルターは、濾過する試料の流動方向に向かって孔径が減少している、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
核酸を含む細胞溶解物の試料の予備的な精製を非修飾珪藻土の層で行う請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
遺伝子治療用の核酸を含む薬剤の調製のための核酸の分離、精製及び単離のために使用される、請求項１～１５のいずれか１項に記載のアニオン交換材料。
【請求項１７】
生体内（in vivo）及び生体外（ex vivo）遺伝子治療のために使用される、請求項１６に記載のアニオン交換材料。
【請求項１８】
嚢胞性繊維症または筋ジストロフィーのような遺伝学的に引き起こされる疾患の治療のための薬剤の調製のために使用される、請求項１６または１７に記載のアニオン交換材料。
【請求項１９】
アンチセンス／センス戦略による生体内（in vivo）及び生体外（ex vivo）遺伝子治療のためのオリゴヌクレオチドの精製のために使用される、請求項１～１５のいずれか１項に記載のアニオン交換材料。
【請求項２０】
生体内（in vivo）及び生体外（ex vivo）遺伝子治療用の、そのままのウィルス粒子を含むウィルス粒子の精製のために使用される、請求項１～１５のいずれか１項に記載のアニオン交換材料。
【請求項２１】
イソプロパノールを含むバッファーが使用される、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
ユーザーによって最終的に混合される濃縮形態であってもよい試薬、核酸の分離のためのクロマトグラフィー材料、水溶液（バッファー、任意にユーザーによって最終的に調整されるための濃縮形態であってもよい）、その他の助剤、及びエンドトキシンの除去のため

の物質を含む、請求項１～１５及び２１のいずれか１項に記載の方法を実施するためのキット。

【発明の詳細な説明】

本発明は、遺伝子治療において使用するための核酸及び／またはオリゴヌクレオチドの単離及び精製方法であって、該核酸及び／またはオリゴヌクレオチドが本質的に生物学的な原料から精製される前記方法、遺伝子治療用の核酸を含む薬剤の調製のための核酸の分離、精製及び単離におけるアニオン交換材料の使用、及び本発明の方法を行うための成分を含むキットに関する。

嚢胞性繊維症あるいは筋ジストロフィーのような遺伝学的に引き起こされる疾患の治療の新しい形態は、そのような疾患が特別な遺伝子欠損に起因するという発見に基づくものである。健常な遺伝子が十分な量で罹患生物に供給されるならば、遺伝子欠損の治療が可能と考えられる。遺伝子治療は、遺伝学的に引き起こされた病気の治療を可能にするだけでく、腫瘍の治療にも適し、また肝炎、インフルエンザ及びHIV等のような感染症に対する接種物の新しい形態としても適している（TIBTECH, Special Issue: Gene Therapy Therapeutic Strategy and Commercial Prospects, May 1993, Vol. 11, No. 5 (112)）。

遺伝子治療の中心となる問題は、治療用DNAをその作用の場面に届くような方法で与えることである。これまでは、欠陥遺伝子が発現される、例えば血液細胞のような治療される細胞の一部を患者から取り出していた。そしてこれらの細胞を培養皿で培養し（in vitro）、その細胞に治療活性を有する外来DNAを導入するために、例えば導入されるDNAに結合されたレトロウィルスの遺伝子セグメントを使用していた。そして遺伝学的に変化させられた細胞を生物に再移入するものであった（Anderson, W.F. (1992), Human Gene Therapy, Science 256:808-813）。

現在、多くの臨床研究がこのいわゆる生体外（ex vivo）アプローチですでに実行されている。最近ではこの方法において、細胞培養物のトランスフェクションのために、上記のレトロウィルスに加えてプラズミドDNA、オリゴヌクレオチド、mRNA、ゲノムDNA、YAC（酵母人工クロモソーム）を使用している。しかし、生体外（ex vivo）法は操作に高い費用がかかり、すべての疾患の治療に適していない。例えば、筋ジストロフィーあるいは嚢胞性繊維症が挙げられる。従って、生物に治療用に有用なDNAを与えるためのより単純な手順を提供することが望ましい。この点で、直接器官の組織にプラズミドDNAを与えることが可能であることが見出されている。これでDNAの一部が核に輸送される。DNAにより与えられた遺伝情報はそこで治療的に活性なタンパク質に翻訳される。生物内での治療は直接的なものであり、生体内（in vivo）治療と呼ばれる。

生体内（in vivo）治療のためには、DNAまたはRNAをリポソームあるいはその他の物質と混合し、核酸の細胞への取り込みを改善することができる。しかし、核酸を例えば筋あるいは腫瘍のような治療される器官に直接注射することもできる（Plautz, G.E. et al., 1993, PNAS, Vol. 90, 4645-4649）。その利点は、そのDNAが免疫原性汚染を伴うことがないならば、生物に入るDNAがその生物において免疫反応を引き起こさないということである。従って、生体内（in vivo）遺伝子治療では投与される核酸の高い品質が要求される。DNAは、治療される生物において病原性効果を生じ得る有害物質を含まないものでなければならない。

この技術を使用したヒトのフェーズＩ臨床試験の結果、そこで使用される核酸のための詳細で厳しい要件が規定されることとなった。米国FDAの要件によれば、治療用途に使用される核酸は以下の品質管理項目に適合していななければならない。

核酸の検査項目	要件/限界
エンドトキシン	< 300 I.U./mgのDNA
大腸菌ゲノムDNA	< 50μg/mgのDNA
タンパク質	< 100μg/mgのDNA
スーパーコイルDNA	> 90%
$A_{260/280}$	1.75-1.85
残留塩	A_{220}からA_{320}までの走査

RNA < 1%
無菌度 14日のトリプトース培養後にコロニーゼロ

精製された核酸の品質に加えて、核酸を精製できるスケールも臨界的な重要性を有する。即ち、将来的には1mg～100kgのスケールで核酸を精製することを技術的に可能としなければならないが、これは1ｌ～100m^3の培養容量を必要とする。

細菌培養物からの核酸の精製における一般的な最初の問題は微生物の溶解である。これには、本発明において好ましいものであるBirnborn及びDohlyによって記述されたアルカリ溶解（Nucl. Acids Res. 7, pages 1513-1522 (1979)）に加えて、高圧での菌体の破壊（フレンチプレス）、界面活性剤の存在下での溶解、あるいは熱の適用（沸騰溶解）を使用することもできる。

その後核酸は、効率には差があるが、種々の方法によってタンパク質あるいはゲノムDNA及び代謝産物のような細胞の他の成分から分離することができる。最も単純であるが、また非常に効率的ではない手段は、細胞のタンパク質の沈殿を引き起こすLiClのような塩の添加による分離である。核酸はその後アルコールで沈殿させることができる。この方法の欠点は、RNA、ssDNA及びタンパク質の汚染物を定量的に分離することができないということである。追加の精製ステップとして、タンパク質汚染物を除去するためにフェノール抽出を行うことが多い。この「塩析」と称される方法の欠点は、RNA及びssDNAに加えて存在し得るエンドトキシンによる汚染を除去できないことである。そしてフェノール抽出はフェノールで核酸を汚染する危険を含む。さらに、核酸のフェノール処理はいわゆる「ニックされた」核酸の含有量の増加、即ち多くの部位での核酸ストランドの破壊を起こすのが通常であり、これはその安定性に大きな影響を及ぼす。

CsCl勾配遠心分離は、30年近くにわたって核酸精製の確立された方法であった。これは核酸の分離のために、エチジウムブロミドのような挿入剤の存在下のCsCl濃度勾配中でのサイズの異なる核酸分子（RNA、プラズミドDNA、ゲノムDNA）の異なる沈降挙動を利用するものである。このタイプの分離は、大きい量でしか使用できず、超遠心分離機を使用することを必要とする。超遠心分離機あたり約DM 60,000という高い財政的な費用に加えて、そのような精製のためには少なくとも48時間というかなりの時間を作業に要するという欠点を有する。この方法では、１回の遠心分離操作につき最大で５mgの核酸収率しか得られない。

また、クロマトグラフィー法による核酸の精製もそれ自体知られている。一般に、２種類の異なる方法がある。

アニオン交換クロマトグラフィーによる精製は、EP 0 268 946 B1に記載されている。細菌細胞は好ましくはアルカリ溶解によって溶解される。細胞タンパク質及びゲノムDNAは、界面活性剤と後の遠心分離によって分離される。このように得られたプラズミドDNAを含む上清は、「清澄化溶解物」と称される。この清澄化溶解物は、アニオン交換カラム（QIAGEN▲R▼）でさらに精製され、RNA及びssDNAは定量的に分離される。ただしエンドトキシンは除去されない。

Gillespie and Vogelstein, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, p.615-619は、GuHCl、NaCl等のようなカオトロピック塩の存在下で、シリカゲルあるいは珪藻土に結合させることによって核酸をさらに精製できると記載している。アニオン交換クロマトグラフィーと異なり、ここではDNAの結合は高い塩濃度の存在下で実行され、溶出は低い塩濃度で行われる。そのメカニズムについてはすべての詳細においてよく理解されている訳ではないが、核酸が脱水によりシリカゲル粒子の表面に沈殿するものと考えられる。これは「全か無か」の原則による結合と溶出を使用するので、RNA、ssDNA及びタンパク質の定量的な分離は可能でない。従って残念ながらそのようなDNAの調製は、RNA、タンパク質及びssDNA汚染のために遺伝子治療において使用するための核酸を得るには不適当である。さらに、そのような調製物中には1000倍高いエンドトキシン値が見られる。

また、得られる核酸は、「アンチセンス」あるいは「センス」戦略による遺伝子治療での使用に適していなければならない。「アンチセンス」戦略は、例えばmRNAが相補的な核酸とハイブリッドを形成する傾向を使用する。そのハイブリッドは不活性である。即ち「ア

ンチセンス」核酸がmRNAを不活性化するのである。本発明により得られる「アンチセンス」RNAは、治療される患者に連続的に外部から与えるか、対応して形質転換された細胞によってその患者自身の内部で生成させることができる。「センス」戦略は、例えば重要な機能を果たすmRNAの補充あるいはアシストを使用する。必要とされるRNAを治療される患者に与える。また、得られる核酸はいわゆる遺伝子予防接種法での使用に適していなければならない。

上記の品質条件は、塩化セシウム勾配遠心分離を使用したこれまでに記述されたDNA調製方法、あるいはカオトロピック塩単独の存在下でのDNAの単離によっては満足させられない。これはこの方法で単離されるDNAが、フェノール、クロロホルム、塩化グアニジニウムあるいは臭化エチジウムのような種々の有毒あるいは発癌性物質と接種するからである。即ち、二重螺旋に取り込まれたエチジウムブロミドは完全に除去することがどうしてもできないことは電子顕微鏡分析によって示すことができる（Schleef and Heinemann (Bio Techniques Vol. 14, No.4, 1993）。調製の間に例えばエチジウムブロミドで汚染されたDNA分子は、挿入されたエチジウムブロミドのために体内でアレルギー反応を誘導することがあり得、従ってそのように製造されたDNAを使用する治療方法は適当なものとはいえない。

高純度DNAはアニオン交換クロマトグラフィーで有毒物質を使用することなく製造することができる。しかし、クロマトグラフィーを使用する場合でも、エンドトキシンが核酸及び／またはオリゴヌクレオチドフラクションに危険のない程度ではない量で混入し得る。

本発明の目的は、遺伝子治療用の核酸及び／またはオリゴヌクレオチドについての高品質要件に適合可能な核酸の精製、単離及び調製のためのワンステップ方法を提供することである。エンドトキシンレベルの大きな減少は、できれば試料調製において既に達成されているべきである。

驚くべきことに、本発明の目的は、請求項１に記載したアニオン交換クロマトグラフィー材料を以下のように使用する方法によって達成される。

上記したように、清澄化溶解物は種々の方法によって得られる。好ましい態様においては、PCT/EP 95/00392において記述されるような濾過器具を使用することによって、ゲノムDNA及びSDS/タンパク質複合体の分離のための溶解の後に遠心分離ステップを行うことができる。同時に、そのような濾過は、核酸溶液のエンドトキシン汚染のかなりの減少を可能にする。

ワンステップ法で、WO95/21179に提案されるバッファーをカオトロピック塩の存在下にアニオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過またはシリカゲルもしくは珪藻土に対する結合とともに使用することにより、上で述べたすべての品質要件に合うように核酸を精製することができる。

本発明の方法において使用されるアニオン交換材料は、少なくとも100mM NaClだけ異なる溶出点により、RNAとDNAとの明確な分離を可能にする。

また、本発明の方法において使用することができるアニオン交換材料は、ウィルス粒子、特に生体内（in vivo）/生体外（ex vivo）遺伝子治療のためのそのままのウィルス粒子の精製にも適している。

また、エンドトキシンもWO95/21179に提案された方法により減少させまたは除去することができる。その場合エンドトキシンは、クロマトグラフィー材料での処理により減少させられるか除去される。そこから核酸及び／またはオリゴヌクレオチドを得る天然の原料の溶解の後、得られたフラクションを金属キレート化クロマトグラフィー法で処理する。この方法は、得られたフラクションの塩水溶液及び界面活性剤とのインキュベーションに加えて、あるいはそれと組み合わせて行うことができ、その場合界面活性剤処理の後にアニオン交換クロマトグラフィーが行われる。金属キレート化クロマトグラフィー材料としては、キレート化試薬、IDA（イミノジ酢酸）、あるいはNTA（ニトリロトリ酢酸）が挙げられ、これらは支持体、例えばシリカゲル、珪藻土、ガラス、酸化アルミニウム、酸化チタン、酸化ジルコニウム、ヒドロキシアパタイト、デキストラン、アガロース、アクリルアミド、ポリスチレン樹脂、あるいは上記のポリマーのモノマー構築ブロックのコポリマー

に結合される。使用することができる他の材料は、ポリミキシンあるいはDNA ETOX▲R▼を含む。このアフィニティ支持体の上に、追加の配位部位によりタンパク質の側鎖窒素含有アミノ酸残基と相互作用し得る、例えばニッケルイオンを錯化することができる。細胞断片を含まない溶解された生物学的原料を、特にシリカゲルをベースとするNi/NTAクロマトグラフィー材料とインキュベートすることができる。バッチ型式を使用する場合は、例えばインキュベーションが完了した後、クロマトグラフィー材料を遠心分離により除去し得、そして上清を本発明によりさらに処理することができる。試料条件により可能ならば、バッチ型式に加えて、カラムにおいてアフィニティークロマトグラフィーを行うこともできる。

単離される核酸は、溶解された細胞に直接由来してもよい。本発明の方法は、確実に汚染物を分離し、遺伝子治療のために必要な純度を有する核酸を生成する。驚くべきことに、Qiagen社の市販の材料QIAGEN▲R▼が特に本発明の方法に適していることが判る。

この材料は、RNAからのDNAの非常に効率的な分離を可能にする。DNAは約480mMの塩化ナトリウムに対応する塩濃度で溶出し、二本鎖プラズミドDNAは約1260mMの塩化ナトリウムでのみ溶出する。これらの２つの溶出点の違いはQIAGEN▲R▼材料では約420mMであるのに対し、すべての既知のアニオン交換材料ではRNAプラズミドDNAの溶出点の違いは最大で塩化ナトリウム濃度の約80mMである。溶出点のそのような小さな違いにより、DNA及びRNA、特に一重鎖DNAとの同時の溶出の高い危険を伴う。

QIAGEN▲R▼の名称で市販されている材料は、特に遺伝子治療のためのプラズミドDNAの精製に適している。このクロマトグラフィー支持体材料は、修飾された多孔性の無機材料である。無機支持体材料としては、シリカゲル、珪藻土、ガラス、酸化アルミニウム、酸化チタン、酸化ジルコニウム、ヒドロキシアパタイトのような材料を使用でき、有機支持体材料としては、デキストラン、アガロース、アクリルアミド、ポリスチレン樹脂、あるいは上記のポリマーのモノマー構築ブロックのコポリマーのような材料が使用できる。

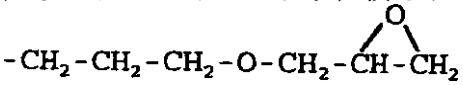
好ましく使用されるアニオン交換体は、例えば、第１の段階で上記の支持体の１種と一般式Ｉ

$R^1R^2R^3SiR^4$ (I)

（式中、R^1は１～10の炭素原子のアルコキシ基、特に$-OCH_3$、$-OC_2H_5$あるいは$-OC_3H_7$、またはハロゲン原子、特にCl、または１～６の炭素原子の同じであるか異なるアルキル基を有するジアルキルアミノ基であり；

R^2及びR^3は、独立に１～10の炭素原子の炭化水素基、特に$-CH_3$、$-C_2H_5$あるいは$-C_3H_7$、または１～10の炭素原子のアルコキシ基、特に$-OCH_3$、$-OC_2H_5$あるいは$-OC_3H_7$、またはハロゲン原子、または少なくとも１つのオキサもしくはアミノ基によって中断される４～20の炭素原子のアルキル基であって、前記基は１以上のハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシまたはアリール基で置換されていてもよく；

R^4は１～20の炭素原子の炭化水素鎖、または少なくとも１つのオキサもしくはアミノ基によって中断されるアルキル基であって、前記基は１以上のハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、ヒドロキシ、アリール及び／またはエポキシにより置換されてもよく、特に



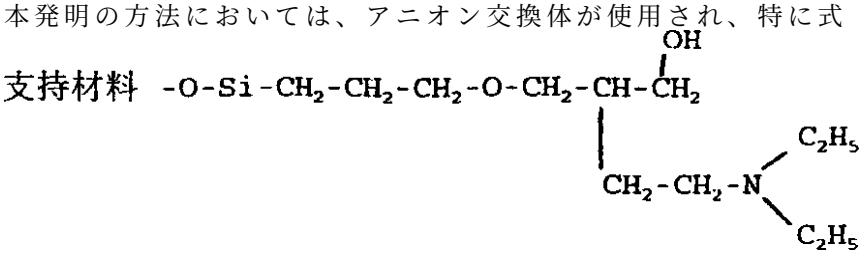
である）のシラン化剤とを反応させ、第２の段階で、第１の段階で修飾された支持体を一般式II

X-R-Y (II)

（式中、Xはアミノ、ヒドロキシ、エポキシ基またはハロゲン原子であり；

Rは２～20の炭素原子の炭化水素鎖、または少くとも１のオキサもしくはアミノ基によって中断されるアルキル基であって、前記基は１以上のハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、ヒドロキシ、アリール及び／またはエポキシにより置換されていてもよく；

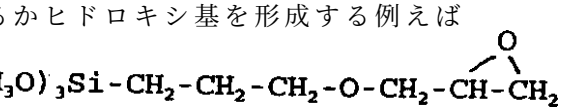
Yはアニオン交換材料を形成する官能基を有し、１～10の炭素原子を有する炭化水素基であって、１以上のアミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、四級アルキルアミノにより置換されていてもよい）の試薬と反応させることにより得られる。
特に支持体は、シリカゲルからなり、直接もしくはいわゆるスペーサーを介してその表面に配置されたジエチルアミノエチル（DEAE）またはジエチルアミノプロピル基またはジメチルアミノエチル（DMAE）またはジメチルアミノプロピル基を有するものを使用することができる。
本発明の方法においては、アニオン交換体が使用され、特に式



を有するものが使用される。
上記アミンのエチル基は、メチル基に取り替えてもよい。
また、核酸はポリスチレン／DVBをベースとするアニオン交換材料、例えばBioPerseptive社、米国、ケンブリッジの中圧クロマトグラフィー用のPoros 20、Poros▲R▼50 HQ、あるいはPharmacia社、スウェーデンのDEAE sepharose▲R▼、Q sepharose▲R▼、DEAE Sephadex▲R▼、Biosepra社、フライスのDEAE Spherodex▲R▼ LS、DEAE Spherosil▲R▼によって精製することもできる。
また、カオトロピック塩、例えばヨウ化ナトリウム、塩化グアニジニウム及び／またはアルコールの存在下のシリカ材料、例えば珪藻土（kieselguhr）、サイロイド（siloid）▲R▼、珪藻土（diatomaceous earth）、ガラス、シリカゲル、アルミナ、チタニア、ヒドロキシアパタイトは、本発明による核酸の調製のために有用である。
細胞含有物、特に核酸の調製において、これらの含有物を溶解した物質から取り出す溶解天然原料を分離するために問題がしばしば起こる。遠心分離により細胞または細胞断片の分離を行うと、より大きい細胞または細胞断片はペレットとして遠心管に沈殿する。そのとき細胞含有物は上清中にあり、ピペットで取ることができる。本質的により単純な濾過は、特に核酸の調製においては上首尾なものではなく、これは濾紙の孔が大きすぎると溶解細胞あるいはそのフラグメントが孔を通過して濾液に濁りや汚染を起こし、あるいは適当に小さい孔を有する濾紙を使用すると濾紙の閉塞が必ず起こり、細胞内容物の許容できる分離が不可能になってしまうからである。
通常、試料は50～500mlの容器において約20,000rpm（約30,000x g）で5～60分遠心分離し、細胞断片を除去する。
そのような遠心分離は時間がかかり、2l以上のより大きい細胞溶解物容量では経済的な方法で実行することはほとんど不可能である。フロースルー遠心分離機があるが、これは1000lを越える非常に大きい容量についてのみしか有用でない。それに加えて、これは複雑で高価である。
本発明によれば、1l～1000lの細胞溶解物からの細胞断片のより単純な除去が可能となる。これはWO93/11218において記述された濾過法を使用する。
また、エンドトキシンの減少あるいは除去は、本発明により特に単純な方法での細胞断片の分離においてすでに達成される。これは、PCT/EP 95/00392において提案された方法を使用することによって達成される。細胞断片を含んでいる溶解物を、ガラス、シリカゲル、珪藻土、酸化アルミニウム、酸化チタン、酸化ジルコニウム、ヒドロキシアパタイト、あるいはパーライトのようなその他の無機鉱物のフィルター層、あるいは繊維ガラス及びシリカゲル、並びにセルロースでできたからみ合わされた不織物、紙、プレス紙、ポリマー、特にポリプロピレン、ポリアミドあるいはポリエステルでできているからみ合わされているか接着されている不織物のフィルター層を通過させる。あるいは、アルミナもしくはパックされた珪藻土、あるいは繊維ガラス及びシリカゲル、並びにセルロースでできた

からみ合わされているか接着されている不織物、紙、プレス紙、紙からできている不織物を通過させる。フィルター層から得られるフラクションを回収し、その後さらに本発明により処理する。

驚くべきことに、そのような濾過によってエンドトキシンが減少させられることが示された。フィルター層を形成する材料がヒドロキシ基を有するか、あるいはヒドロキシ基を有するかヒドロキシ基を形成する例えば



のようなオルガノシラン、特にジオールシリカゲル、ジオール珪藻土及び／またはジオールパーライトで被覆されるか、修飾されることが特に好ましい。

特に、パックされた珪藻土がエンドトキシン減少あるいは除去のための試料調製において有用であることが判明した。

また、本発明の方法により得た核酸は、「アンチセンス」または「センス」戦略の遺伝子治療において使用するのに適している。「アンチセンス」戦略は、例えばmRNAが相補的な核酸とハイブリッドを形成する傾向を使用する。そのハイブリッドは不活性である。即ち、「アンチセンス」核酸はそのmRNAを不活性化するのである。本発明により得られた「アンチセンス」RNAは、治療される患者に連続的に外部から与えるか、対応して形質転換された細胞によってその患者自身の内部で生成させることができる。「センス」戦略は、例えば重要な機能を果たすmRNAの補充あるいはアシストを使用する。必要とされるRNAを治療される患者に与える。本発明の方法により得られる核酸は、その高い純度により、いわゆる遺伝子予防接種法での使用にも適している。

本発明の方法の好ましい態様においては、高イオン強度条件下に核酸を溶出するのに必要な塩は、核酸を含み、高い塩濃度を有するフラクションを無機支持体材料で処理することにより除去される。これらの支持体材料は、本質的には非修飾無機支持体材料、例えばガラスあるいは粉末にされたガラスからなる。核酸はそのような表面に高い塩濃度で吸着する。その後、吸着された核酸は、低イオン強度の溶液、あるいは脱塩水で脱着することができる。

エタノールを含むバッファーの代わりにイソプロパノールを含むバッファーを使用すると有利であることが判明した。WO95/21177において提案されるように、本発明により製造された核酸の特に良好なトランスフェクション率は、イソプロパノールを含むバッファーを使用することにより得られる。

本発明によれば、本発明の方法を実施するのに必要な成分を含むキットも特許請求されるものである。これは特に、ユーザーによって最終的に混合される濃縮形態であってもよい試薬、核酸の分離のためのクロマトグラフィー材料、水溶液（バッファー、任意にユーザーによって最終的に調整されるための濃縮形態にあってもよい）、珪藻土のようなエンドトキシンの除去のための物質等のその他の助剤、あるいは塩化ナトリウムで溶出した核酸の塩分除去のためのクロマトグラフィー材料を含む。

本発明の方法において使用することができるアニオン交換材料は、キログラムスケールまで、特に10mg～100gのDNAの範囲のDNA調製を可能にする。本発明の方法により単離されたDNAをHPLC分析と電子顕微鏡法によって検査すると、それらの調製物がタンパク質（エンドトキシン）、ゲノムDNA及びRNAを含まないことが示される。本発明を以下の実施例においてさらに詳細に説明する。

バッファーP1（再懸濁物バッファー）：100μg/ml RN アーゼA, 50mMトリス/HCl, 10mM EDTA, pH8.0

バッファーP2（溶解バッファー）：200mM NaOH, 1% SDS

バッファーP3（中和バッファー）：3.0M KAc, pH5.5

バッファーQBT（平衡化バッファー）：750mM NaCl, 50mM MOPS, 15%アルコール*, pH7.0, 0.15% Triton▲R▼ X 100

バッファーQC（洗浄バッファー）：1.0M NaCl, 50mM MOPS, 15% アルコール, pH7.0

バッファーQN（溶出バッファー）：1.6M NaCl, 50mM MOPS, 15% アルコール, pH8.5

TE：10mM トリス/HCl、1mM EDTA, pH8.0
STE：100mM NaCl, 10mM トリス/HCl, 1mM EDTA, pH8.0
エンドトキシン除去バッファー：750mM NaCl, 10% Triton▲R▼ X 100, 50mM MOPS, pH7.0
*アルコールとしては、イソプロパノールかエタノールが好ましく使用される。

実施例１

CF患者のエーロゾル適用のための10ｌの大腸菌培養物からの50mgのpSVCFTRの単離
10ｌの大腸菌XL1 Blueの発酵槽培養物から得た細菌ペレットを、バッファーP1及びP2のそれぞれ500ml中に再懸濁する。混合物を500mlのバッファーP3と30分間氷上でインキュベートし、その後20,000x gで15分遠心分離する。上清を折りたたんだ濾紙で濾過し、清澄化する。濾過された溶解物を、その1/10の容量のエンドトキシン除去バッファー（750mM NaCl; 10% Triton▲R▼ X 114; 40mM MOPS, pH7.0）と混合し、氷上で30分インキュベートした。次にその溶解物を膨動ポンプによって、QIAGENアニオン交換体（70-100μm粒径、2.5μmol DEAE/クロマトグラフィー材料g）で満たした26mm x 100mmのクロマトグラフィーカラムの上へ揚げ、吸着させる。その後クロマトグラフィーカラムを2000mlのバッファーQCにより15ml/分の流速で洗浄する。カラムに結合したプラズミドDNAを280mlのバッファーQNにより3ml/分の流速で溶出する。得られた溶出液を200mlのイソプロパノールと混合し、20,000x gで30分間遠心分離する。得られるペレットを40mlのTEバッファー中に再懸濁する。このように精製されたDNAを、純度について電子顕微鏡法（EM）、HPLC分析、測光分析、アガロースゲル電気泳動及びエンドトキシンテストによって分析する。この精製法により、RNA、ゲノムDNA及びエンドトキシンの検出可能な汚染のない高純度DNAが得られる。このように単離されたDNAをリポソーム溶液と混合し、エーロジル適用により10μgの量でCF患者に投与する。

実施例２

筋ジストロフィーの治療のための横紋筋へのプラズミドDNAの注射のためのQIAGENチップ10,000を使用した10mgのpCMVlacZの単離
DH5alph/pCMVlacZの一晩培養物の５リットルを遠心分離し、得られるペレットを125mlのP1中に再懸濁し、125mlのバッファーP2と混合し、室温で５分インキュベートする。その後、125mlのバッファーP3を加え、混合し、次いで４℃で30分間インキュベートする。その溶解物を、PCT/EP 95/00392に記載されたように濾過カラム中の緩くパックされた珪藻土中を通し、その後実施例１のようにその容量の1/10のエンドトキシン除去バッファーでスパイクし、氷上で30分インキュベートする。混合物を今度はイソプロパノールの270mlでスパイクし、20,000x gで30分間遠心分離する。得られるペレットを室温で10分間乾燥させ、5mlの水中に再懸濁する。再懸濁されたDNAを、25mlのQCバッファーでスパイクする。この混合物を、75mlのQBTバッファーで平衡化されたDEAEシリカゲルカラム（26mm x 50mm, 70-100μm, 2.0μmol/g）上に入れる。そしてカラムを600mlのQCバッファーで洗浄し、その後DNAを75mlのQFバッファーで溶出する。溶出液を、52.5mlのイソプロパノールと混合し、20,000x gで30分間遠心分離する。DNAペレットを室温で10分間乾燥させ、1mlのPBS中に再懸濁する。DNA溶液は、直接の筋注射のためにのみ使用できる。

実施例３

「遺伝子肝炎ワクチン」としての使用のための20ｌの大腸菌培養物からの100mgのpXYHBVの単離
20ｌの１回の発酵から得た細菌のペレットを1000mlのバッファーP1中に再懸濁し、1000mlのバッファーP2でスパイクし、室温で５分間インキュベートする。1000mlのバッファーP3を添加した後、混合物を４℃で30分間インキュベートし、その後20,000x gで遠心分離する。上清を繊維ガラスフィルターに通し、清澄な溶解物を2250mlのイソプロパノールと混合し、20,000x gで30分間遠心分離する。得られるペレットを10mlの水中に再懸濁し、90mlのQCバッファーでスパイクする。この混合物を、実施例１のクロマトグラフィーカラムに蠕動ポンプにより2ml/分の流速で入れる。カラムを15ml/分の流速で洗浄し、そしてDNAを350mlのQFバッファーにより3ml/分の流速で溶出する。

実施例４

DNA調製物からのエンドトキシンの除去

調製されたDNAを、Triton▲R▼ X 114により0.1～1%の最終濃度に調節する。その後、DNA/トリトン溶液を「ローラー」上において4～7℃で30分間インキュベートする。溶液を室温に加熱し、20,000x gで30分間遠心分離するか、濾過する。上清を0.7容量のイソプロパノールでスパイクし、沈殿させる。得られるペレットを乾燥させ、TE中に再懸濁する。このように処理されたDNAはエンドトキシンを含まない。

実施例５

プラズミド調製物

LB培地中のpUC 18のプラズミドDNAを有するHB 101大腸菌の150mlの培養物を3000x gで5分間遠心分離して細胞をペレット化する。細胞ペレットを、50mlトリス/HCl, 10mM EDTA, pH8.0, 100μg/ml RNアーゼAの20ml中に再懸濁する。溶菌のために20mlの2.0M NaOH, 1% SDSを細胞懸濁物に加え、注意深く混合し、5分間室温に置く。次に20mlの3M酢酸カリウム、2M酢酸を加えて中和し、混合し、氷上で15分間インキュベートし、細胞溶解物を本発明の濾過装置により2000pa～80,000pa（20mbar～800mbar）の圧力差で吸引する。あるいは、ピストンで、または圧力を増加することによって試料をフィルター層を通してプレスしてもよい。濾過の後、濾過器具を除去し、細胞フラグメント、変性タンパク質及び沈澱SDSを含む濾過ケーキを捨てる。濾過された溶解物に、その1/10の容量のエンドトキシン除去バッファー（750mM NaCl; 10% Triton▲R▼ X 114; 40mM MOPS, pH7.0）を混合し、氷上で30分間インキュベートする。濾液を完全に吸引するかアニオン交換カラムを通してプレスし、DNAを吸着させる。抽出カラムを次いで100mlの1M NaCl; 15%エタノール, 50mM MOPS, pH7.0で2回洗浄し、RNAとタンパク質を除去する。DNAを、100mlの1.6M NaCl; 15%エタノール, 50mM MOPS, pH7.0で溶出する。溶出されたDNAを塩分除去及び濃縮のためにアルコールで沈澱させ、アルコール性のペレットを遠心分離によってペレット化する。

あるいは、その核酸のアルコール性の沈殿を濾過によって得てもよい。DNAの大きい量を製造しなければならず、扱う容量が例えば1ｌより大きい場合、これが有利である。

実施例６

DNA鋳造をインビトロ反応によりRNAに転写する。反応溶液を750mM NaClに調整し、QIAGEN▲R▼アニオン交換カラムで精製する。精製されたRNAをその後in vitroまたは生体内（in vivo）遺伝子治療に使用する。

実施例７

DEAE Q Sepharose▲R▼（Pharmacia社）を使用する40mgのpBR322の精製

pBR322の40ｌの発酵槽培養物からのバイオマスをそれぞれ10ｌのバッファーP1、P2及びP3でアルカリ溶解によって溶解した。その後、溶解物を緩いパック物を含む濾過器具を通し、そして4℃で30分間インキュベートした。今度はDNAを0.7容量のイソプロパノールを添加することにより沈殿させ、20mlの10mM トリス/HCl, pH8.5, 1mM EDTA, 50mM NaCl中に再懸濁する。再懸濁されたDNA溶液を、200mlのカラム床体積のDEAE Q Sepharoseカラムに入れる。DNAを1mM NaCl/mlの勾配、以下の濃度を有するバッファーで溶出する。

バッファーA：10mM トリス/HCl, 1mM EDTA, 0.75M NaCl, pH8.0

バッファーA：10mM トリス/HCl, 1mM EDTA, 0.85M NaCl

流速は0.5ml/分とする。次にDNAをエタノールで沈殿させ、PBSバッファー中に1μm/μlの濃度で再懸濁する。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
C07H 1/08	***(2006.01)***	C07H	1/08	
C07H 21/02	***(2006.01)***	C07H	21/02	
C07H 21/04	***(2006.01)***	C07H	21/04	B
		C07H	21/04	Z

(31)優先権主張番号 P4431125.7
(32)優先日 平成6年9月1日(1994.9.1)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)
(31)優先権主張番号 P4432654.8
(32)優先日 平成6年9月14日(1994.9.14)
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(72)発明者 ショール ヨアヒム
ドイツ連邦共和国、デュッセルドルフ Ｄ－４０２３１、アン デア シュッツェンビーザ ４３
(72)発明者 モーリツ ペーター
ドイツ連邦共和国、ケルペン Ｄ－５０１６９、プラタネナリー ７

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 国際公開第９３／０１１２１８（WO，Ａ１）
国際公開第９３／０１１２２１（WO，Ａ１）
特開昭６３－１５４６９６（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０４９９７９３２（ＵＳ，Ａ）
特開昭５８－０１３５１９（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－２９５４８４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 48/00
A61K 31/70
A61P 21/04
B01J 20/26
C07H 1/08
C07H 21/00
C07H 21/02
C07H 21/04