PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:
C07H 1/08, C12N 15/10, C12P 19/34	A1	WO 95/21177
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 1995 (10.08.95)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/00389

(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1995 (03.02.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 03 692.2	7. Februar 1994 (07.02.94)	DE
P 44 22 291.2	25. Juni 1994 (25.06.94)	DE
P 44 31 125.7	1. September 1994 (01.09.94)	DE
P 44 32 654.8	14. September 1994 (14.09.94)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstrasse 5, D-45219 Essen (DE). SCHORR, Joachim [DE/DE]; An der Schützenwiese 43, D-40231 Düsseldorf (DE). MORITZ, Peter [DE/DE]; Platanenallee 7, D-50169 Kerpen (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ENDOTOXIN-FREE OR ENDOTOXIN-POOR NUCLEIC ACIDS AND/OR OLIGONUCLEOTIDES FOR GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG ENDOTOXINFREIER ODER AN ENDOTOXIN ABGEREICHERTER NUCLEINSÄUREN UND/ODER OLIGONUCLEOTIDE FÜR DIE GENTHERAPIE

(57) Abstract

A process is disclosed for isolating and purifying nucleic acids and/or oligonucleotides for gene therapy. The nucleic acids and/or oligonucleotides are isolated or purified from a substantially biological source. The process is characterised in that the substantially biological sources are disintegrated, if required the residues of biological source are removed or eliminated from the thus obtained fractions by a mechanical process known per se, such as centrifugation or filtering, the thus processed fractions are treated with affinity chromatography material or with inorganic chromatography material for removing endotoxins, the nucleic acids and/or oligonucleotides are isolated on an anion exchanger designed so that DNA starts to be desorbed from the anion exchanger only when the sodium chloride solution ionic strength is at least about 100 mM higher than the ionic strength at which the RNA of the anion exchange material starts to be desorbed from the anion exchanger.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotiden für den Einsatz in der Gentherapie, wobei die Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide aus einer im wesentlichen biologischen Quelle isoliert oder gereinigt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die im wesentlichen biologischen Quellen aufgeschlossen werden, die erhaltenen Fraktionen gegebenenfalls vom Rest der biologischen Quellen befreit oder abgereichert werden durch an sich bekannte mechanische Verfahren, wie Zentrifugieren, Filtrieren, danach die so behandelten Fraktionen mit affinitätschromatographischem Material oder mit anorganischem Chromatographie-Material zur Entfernung von Endotoxinen behandelt werden, wonach sich, eine Isolierung der Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide an einem Anionenaustauscher anschließt, der so beschaffen ist, daß DNA erst bei einer mindestens ca. 100 mM höheren Natriumchloridlösung entsprechenden Ionenstärke vom Anionenaustauscher zu desorbieren beginnt als derjenigen Ionenstärke entspricht, bei der RNA vom Anionenaustauschermaterial vom Anionenaustauscher zu desorbieren beginnt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AT	Österreich	**GA**	Gabon	**MR**	Mauretanien
AU	Australien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BJ	Benin	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BR	Brasilien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
CA	Kanada	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SI**	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kasachstan	**SK**	Slowakei
CM	Kamerun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
ES	Spanien	**MG**	Madagaskar	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**ML**	Mali	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MN**	Mongolei	**VN**	Vietnam

Verfahren zur Herstellung endotoxinfreier oder an Endotoxin abgereicherter Nucleinsäuren und/ oder Oligonucleotide für die Gentherapie

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotiden für den Einsatz in der Gentherapie, wobei die Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide aus einer im wesentlichen biologischen Quelle gereinigt werden, die Verwendung von Anionenaustauschermaterialien für die Trennung, Reinigung und Isolierung von Nucleinsäuren zur Herstellung eines nucleinsäurehaltigen Mittels für die Gentherapie sowie eine Zusammenstellung enthaltend Komponenten für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Eine neue Form der Therapie von genetisch bedingten Erkrankungen, wie cystische Fibrose oder Muskeldystrophie, basiert auf der Erkenntnis, daß diese Erkrankungen durch bestimmte Gendefekte verursacht werden. Wird dem erkrankten Organismus das gesunde Gen in ausreichendem Maße zur Verfügung gestellt, so scheint eine Therapie des Gendefektes möglich. Die Gentherapie ermöglicht nicht nur die Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen, sondern eignet sich auch zur Behandlung von Tumoren und ist als neue Form der Impfung gegen Infektionserkrankungen, wie Hepatitis, In-

fluenza und HIV, um nur einige Beispiele zu nennen, geeignet (TIBTECH, Special Issue: Gene Therapy Therapeutic Strategy and Commercial Prospects, May 1993, Vol. 11, Nr. 5 (112)).

Ein zentrales Problem der Gentherapie besteht darin, die therapeutische DNA so zu verabreichen, daß diese den Ort des Geschehens erreicht. Bisher wurde den Patienten ein Teil der zu behandelnden Zellen, in denen das defekte Gen exprimiert wird, wie beispielsweise Blutzellen, entnommen. Diese Zellen wurden in Kulturschalen gezüchtet (in vitro). Um die fremde, therapeutisch wirkende DNA in die Zellen einzuschleusen, verwendete man z. B. Gensegmente eines Retrovirus, die mit der einzuschleusenden DNA verbunden wurden. Die genetisch veränderten Zellen wurden wieder in den Organismus verbracht (Anderson W. F. (1992), Human gene therapy, Science 256: 808 - 813).

Gegenwärtig werden bereits einige klinische Studien mit diesem sogenannten ex vivo Ansatz durchgeführt. Dabei verwendet man neuerdings neben den oben beschriebenen Retro-Viren auch Plasmid-DNA, Oligonucleotide, mRNA, genomische DNA, YACS (Yeast Artificial Chromosomes) für die Transfektion von Zellkulturen. Das ex vivo-Verfahren ist aber sehr arbeitsaufwendig und nicht zur Behandlung aller Erkrankungen geeignet. Als Beispiele seien die Muskeldystrophie oder die cystische Fibrose genannt. Es ist mithin wünschenswert, über einfachere Verfahrensweisen zu verfügen, um einem Organismus therapeutisch einsetzbare DNA zu applizieren. Dabei wurde gefunden, daß es möglich ist, Plasmid-DNA direkt in das Gewebe eines Organs zu applizieren. Ein Teil der DNA wird bis zum Zellkern transportiert. Die über die DNA verabreichte genetische Information wird dort in das therapeutisch wirkende Protein translatiert. Die Behandlung im Organismus erfolgt direkt und wird als in vivo-Behandlung bezeichnet.

Für die in vivo Behandlung kann man die DNA oder RNA auch mit Liposomen oder anderen Substanzen vermischen, was zu

einer besseren Aufnahme der Nucleinsäuren in die Zelle führt. Die Nucleinsäure kann aber auch direkt in das zu behandelnde Organ, beispielsweise einen Muskel oder einen Tumor, injiziert werden (Plautz, G. E. et al. 1993, PNAS, Vol. 90, 4645 - 4649). Vorteilhaft dabei ist, daß die in den Organismus gelangende DNA keinerlei immunologische Reaktionen im Organismus hervorruft, sofern sie frei von immunogenen Begleitkontaminationen ist. Daher stellt die in vivo Gentherapie sehr hohe Anforderungen an die Qualität der zu applizierenden Nucleinsäuren. Die DNA muß frei von toxischen Substanzen sein, die zu pathogenen Effekten in den zu behandelnden Organismus führen können.

Klinische Phase-I-Studien am Menschen mit dieser Technologie haben zu sehr detaillierten und strengen Qualitätsanforderungen des für die hierbei verwendeten Nucleinsäuren geführt. Gemäß den Anforderungen des FDA in den USA müssen die für therapeutische Zwecke eingesetzten Nucleinsäuren die folgenden Qualitätskontrollen erfüllen:

Prüfung der Nucleinsäure auf:	**Anforderung/Grenzwert**
Endotoxine	< 300 E.U./mg DNA
E.coli Genomische DNA	< 50 µg/mg DNA
Protein	< 100 µg/mg DNA
Supercoiled DNA	> 90%
$A_{260/280}$	1,75 - 1,85
Salzrückstände	Scan von A_{220} - A_{320}
RNA	< 1%
Sterilität	keine Kolonien nach 14 Tagen Tryptose Kultur

Neben der Qualität der aufgereinigten Nucleinsäure, ist auch der Maßstab, in dem die Nucleinsäure aufgereinigt werden kann, von entscheidender Bedeutung. So muß es eine zukünftige Technologie ermöglichen, Nucleinsäuren im Maßstab von 1 mg

bis zu 100 kg aufzureinigen, was wiederum Kulturvolumina von 1 l bis zu 100 m^3 erfordert.

Ein generelles Problem beim Aufreinigen von Nucleinsäuren aus Bakterienkulturen ist zunächst die Lyse der Mikroorganismen. Hierzu kann neben der von Birnborn und Dohly (Nucl. Acids Res. 7, Seiten 1513 - 1522 (1979)) beschriebenen und hier bevorzugten alkalischen Lyse auch das Aufbrechen der Bakterienzellen mittels hohem Druck (French Press), die Lyse in Anwesenheit von Detergenzien oder die Verwendung von Hitze (Boiling Lyse) angewendet werden.

Anschließend kann die Nucleinsäure durch unterschiedliche Verfahren mehr oder weniger effektiv von den übrigen Bestandteilen der Bakterienzelle, wie Proteinen oder genomischer DNA sowie Metaboliten abgetrennt werden. Als einfachste aber auch nicht sehr effiziente Möglichkeit, bietet sich die Abtrennung über die Zugabe von Salzen, wie z. B. LiCl an, was die Präzipitation der zellulären Proteine bewirkt. Die Nucleinsäure kann anschließend mit Alkohol präzipitiert werden. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß Kontaminationen von RNA, ssDNA und Proteinen nicht quantitativ abgetrennt werden können. Als zusätzlicher Reinigungsschritt wird oft noch eine Phenolextraktion durchgeführt, um vorhandene Proteinkontaminationen zu entfernen. Der Nachteil dieser als "Aussalzen" beschriebenen Methode besteht darin, daß vorhandene Endotoxin-Kontaminationen sowie RNA und ssDNA nicht beseitigt werden können. Die Phenolextraktion birgt zusätzlich die Gefahr der Verunreinigung der Nucleinsäure mit Phenol. Weiterhin führt eine Phenolbehandlung von Nucleinsäuren regelmäßig zu einem erhöhten Anteil von sogenannter "nicked" Nucleinsäure, d. h. Bruch des Nucleinsäurestranges an vielen Stellen, was wiederum dessen Stabilität stark beeinflußt.

Die CsCl Gradienten-Zentrifugation ist seit fast 30 Jahren eine etablierte Methode zur Reinigung von Nucleinsäuren.

Hierbei wird das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von unterschiedlich großen Nucleinsäuremolekülen (RNA, Plasmid-DNA, genomische DNA) in einem CsCl Konzentrations-Gradienten in Anwesenheit von interkalierenden Agenzien, wie Ethidiumbromid, zur Separation von Nucleinsäuren genutzt. Diese Auftrennung kann nur bei großen Mengen eingesetzt werden. Dabei werden Ultrazentrifugen benötigt. Neben dem hohen materiellen Aufwand von ca. DM 60.000,-- pro Ultrazentrifuge wirkt sich der beträchtliche Zeitaufwand von mindestens 48 h für eine solche Aufreinigung als nachteilig aus. Dieses Verfahren ermöglicht nur eine Ausbeute von höchstens 5 mg Nucleinsäure pro Zentrifugenlauf.

An sich bekannt ist auch die Aufreinigung von Nucleinsäuren über chromatographische Verfahren. Hierbei sind generell zwei Verfahren zu unterscheiden.

Die Reinigung mit Hilfe der Anionenaustauscher-Chromatographie, wie sie in EP 0 268 946 B1 beschrieben ist. Hierbei werden die Bakterienzellen vorzugsweise über eine alkalische Lyse aufgeschlossen. Die zellulären Proteine und genomische DNA werden mit Hilfe von Detergenzien und anschließender Zentrifugation abgetrennt. Der so gewonnene, die Plasmid-DNA enthaltende Überstand, wird als Cleared Lysate bezeichnet. Das Cleared Lysate wird über eine Anionenaustauscher-Säule (Qiagen®) aufgereinigt, wobei eine quantitative Abtrennung von RNA und ssDNA erfolgt. Eine Entfernung von Endotoxinen findet hierbei nicht statt.

Gillespie und Vogelstein, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, S. 615 - 619, wurde beschrieben, daß eine Aufreinigung von Nucleinsäuren durch die Bindung an Silicagel oder Diatomeenerde in Anwesenheit von chaotropen Salzen, wie GuHCL, NaI usw. erfolgen kann. Im Gegensatz zur Anionenaustauscher-Chromatographie erfolgt die Bindung der DNA in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen, wogegen die Elution bei niedrigen Salzkonzentrationen erfolgt. Der genaue Mechanismus

ist nicht verstanden, jedoch wird von einer Präzipitation der Nucleinsäure auf der Oberfläche der Silicapartikel durch Dehydration, ausgegangen. Da hierbei die Bindung und Elution nach einem "alles oder nichts"-Prinzip stattfindet, ist keine quantitative Separation von RNA, ssDNA und Proteinen möglich. Daher sind diese DNA-Präparationen leider durch RNA, Protein und ssDNA-Kontaminationen für die Nucleinsäuregewinnung zum Einsatz in der Gentherapie nicht geeignet. Weiterhin finden sich 1000-fach höhere Endotoxinwerte in solchen Präparationen.

Die erhältlichen Nucleinsäuren sollten auch für den Einsatz in der Gentherapie nach der "Anti-sense"- oder "Sense"-Strategie geeignet sein. Die "Anti-sense"-Strategie nutzt die Eigenschaft von zum Beispiel mRNA mit komplementären Nucleinsäuren Hybride zu formen. Die Hybride sind inaktiv. Die "Anti-sense"-Nucleinsäure inaktiviert also die mRNA. Die erfindungsgemäß erhaltene "Anti-sense"-RNA kann dabei von außen kontinuierlich dem zu therapierenden Individuum zugeführt werden, oder von entsprechend transformierten Zellen im Individuum selbst gebildet werden. Die "Sense"-Strategie führt zur Ergänzung oder Unterstützung von z.B. MRNA, die wichtige Funktionen erfüllt. Dabei wird die benötigte RNA dem zu therapierenden Individuum zugeführt. Die nach erhältliche Nucleinsäure sollte auch geeignet sein, in sogenannten genetischen Vakzinierungsverfahren eingesetzt zu werden.

Die oben angeführten Qualitätsanforderungen können durch die beschriebenen DNA-Präparationsmethoden mit Hilfe der Caesiumchloridgradienten-Zentrifugation oder durch die Isolierung von DNA in Anwesenheit chaotroper Salze allein nicht befriedigt werden, da bei dieser Methode die zu isolierende DNA mit verschiedenen toxischen oder cancerogenen Substanzen, wie Phenol, Chloroform, Guanidiniumhydrochlorid, oder Ethidiumbromid in Berührung kommt. So läßt sich durch elektronenmikroskopische Analyse zeigen, daß in die Doppel-

helix eingebautes Ethidiumbromid nicht mehr vollständig zu beseitigen ist (Schleef und Heinemann (Bio Techniques Vol. 14, Nr. 4, 1993). DNA-Moleküle, die während der Präparation, z. B. mit Ethidiumbromid kontaminiert werden, können im Körper aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids allergische Reaktionen induzieren, wodurch jeder therapeutische Ansatz mit solcherart hergestellter DNA nicht zu vertreten ist.

Hochreine DNA kann ohne Verwendung toxischer Substanzen mit der Anionenaustauscher-Chromatographie präpariert werden. Allerdings können auch bei Anwendung der Chromatographie Endotoxine in nicht unbedenklichem Maße in die Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotidfraktionen verschleppt werden.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht in der Bereitstellung eines einstufigen Verfahrens zur Reinigung, Isolierung und Herstellung von Nucleinsäuren, die die hohen Qualitätsanforderungen an Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide für die Gentherapie erfüllen können. Dabei sollte nach Möglichkeit bereits bei der Probenvorbereitung eine drastische Endotoxinmengen-Verringerung erfolgen.

Überraschenderweise wird das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem gelöst durch ein Verfahren, in dem das in Anspruch 1 genannte Anionenaustauscher-Chromatographiematerial wie folgt eingesetzt wird.

In der oben beschriebenen Weise kann durch unterschiedliche Methoden ein Cleared Lysate gewonnen werden. In einer bevorzugten Ausführung kann dabei auf den Zentrifugationsschritt nach der Lyse, zum Abtrennen der genomischen DNA und des SDS/Proteinkomplex durch die Verwendung einer in P 44 32 654.8 beschriebenen Filtrationseinrichtung verzichtet werden. Gleichzeitig ermöglicht diese Filtration eine erhebliche Reduktion der Endotoxin-Kontaminationen der Nucleinsäurelösung.

Die Nucleinsäure kann durch die Verwendung des in P 44 31 125.7 vorgeschlagenen Puffers in Verbindung mit der Anionenaustauscher-Chromatographie, Gelfiltration oder der Bindung an Silicagel, Diatomeenerde in Anwesenheit von chaotropen Salzen in einem einstufigen Prozeß so aufgereinigt werden, daß diese allen oben aufgeführten Qualitätsanforderungen genügt.

Das beim erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Anionenaustauscher-Material ermöglicht aufgrund der um mindestens 100 mM NaCl auseinanderliegenden Elutionspunkte eine saubere Trennung von RNA und DNA.

Das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbare Anionenaustauschermaterial ist auch für die Aufreinigung von Viruspartikeln, insbesondere auch intakten Viruspartikeln, für die in vivo/ex vivo Gentherapie geeignet.

Endotoxine können jedoch auch wie in der P 44 31 125.7 vorgeschlagenen Verfahrensweise abgereichert oder entfernt werden. Dabei werden Endotoxine durch Behandlung mit chromatographischem Material abgereichert oder entfernt. Nach dem Aufschluß der natürlichen Quellen, aus denen die Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide gewonnen werden sollen, werden die erhaltenen Fraktionen metallchelatchromatographischen Methoden behandelt. Diese Methode ist neben der oder in Kombination mit der Inkubation der erhaltenen Fraktionen mit wäßrigen Salzlösungen und Detergenzien einsetzbar, wobei nach der Detergenz-Behandlung eine Anionenaustauscher-Chromatographie erfolgt. Die metallchelatchromatographischen Materialien umfassen Chelatbildner, IDA (Iminodiacetat) oder NTA (Nitrilotetraacetat), welche an Trägern, wie Silicagel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxide, Titanoxide, Zirkonoxide, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrolharze oder Copolymere aus den monomeren Bausteinen der genannten Polymere gebunden sind. Als weitere Materialien können auch Polymyxin oder DNA ETOX verwendet

werden. Auf diesem Affinitätsträger können beispielsweise Nickelionen komplex gebunden werden, welche über weitere Koordinationsstellen mit in der Seitenkette stickstoffhaltigen Aminosäureresten in Proteinen in Wechselwirkung treten können. Die aufgeschlossenen, von Zelltrümmern befreiten biologischen Quellen können insbesondere mit Ni-NTA-Chromatographie-Material auf Kieselgelbasis inkubiert werden. Das Chromatographie-Material kann beispielsweise nach der erfolgten Inkubation abzentrifugiert werden, sofern im Batch-Verfahren gearbeitet wurde und der Überstand kann dann erfindungsgemäß weiter aufgearbeitet werden. Neben dem Batch-Verfahren kann aber auch die Affinitätschromatographie in Säulen durchgeführt werden, sofern die Beschaffenheit der Probe dies ermöglicht.

Die zu isolierende Nucleinsäure kann direkt aus Zellen, die lytisch aufgeschlossen werden, stammen. Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet die Abtrennung von Kontaminanten und führt zu Nucleinsäuren, die die für die Gentherapie geforderte Reinheit aufweisen. Überraschenderweise zeigt insbesondere das im Handel befindliche Material QIAGEN® der Firma Qiagen seine Eignung im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt zu werden.

Dieses Material ermöglicht eine sehr effiziente Abtrennung der DNA von RNA. Die DNA eluiert bei einer Salzkonzentration, die ca. 480 mM Natriumchlorid entspricht, wohingegen die doppelsträngige Plasmid-DNA erst bei ca. 1.260 mM Natriumchlorid eluiert. Die Differenz dieser beiden Elutionspunkte beträgt bei dem QIAGEN®-Material ca. 420 mM, wohingegen bei allen bekannten Anionenaustauscher-Materialien die Differenz zwischen den Elutionspunkten von RNA und Plasmid-DNA maximal ca. 80 mM Natriumchlorid-Konzentrationen beträgt. Eine derartig niedrige Differenz der Elutionspunkte beinhaltet eine hohe Gefahr der Coelution von DNA mit RNA, insbesondere einzelsträngiger DNA.

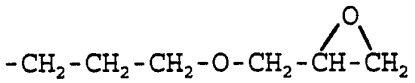
Das unter der Bezeichnung QIAGEN® im Handel erhältliche Material ist für die Reinigung von Plasmid-DNA für die Gentherapie besonders geeignet. Dieses chromatographische Trägermaterial ist ein modifiziertes poröses anorganisches Material. Als anorganische Trägermaterialien kommen Stoffe wie Silicagel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxide, Titanoxide, Zirkonoxide, Hydroxylapatit und als organische Trägermaterialien solche wie Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrolharze oder Copolymere aus den monomeren Bausteinen der genannten Polymere in Frage.

Der Anionenaustauscher, der vorzugsweise eingesetzt wird, ist beispielsweise durch die Umsetzung eines der oben genannten Trägermaterialien in einem ersten Schritt mit einem Silanisierungsreagenz der allgemeinen Formel I erhältlich,

$$R^1R^2R^3Si\ R^4 \qquad (I),$$

wobei R^1 ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-OCH_3$, $-OC_2H_5$, oder $-OC_3H_7$ oder ein Halogenatom, insbesondere -Cl oder eine Dialkylaminogruppe mit identischen oder unterschiedlichen Alkylresten mit 1 bis 6 C-Atomen;
R^2 und R^3 unabhängig voneinander ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-CH_3$, $-C_2H_5$, oder $-C_3H_7$, oder einen Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-OCH_3$, $-OC_2H_5$ oder $-OC_3H_7$, oder ein Halogenatom oder ein durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochener Alkylrest mit 4 bis 20 C-Atomen, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach durch Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Hydroxy oder Aryl substituiert sein kann;
R^4 eine Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindesten eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochener Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Mono-

alkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann, insbesondere



ist,

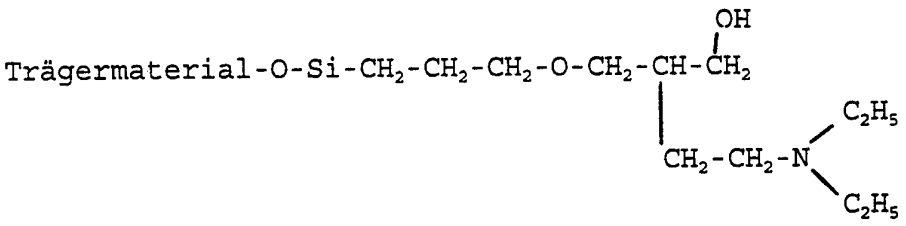
gefolgt von einem zweiten Schritt, wobei der im ersten Schritt modifizierte Träger umgesetzt wird mit einem Reagenz der allgemeinen Formel II:

X-R-Y (II),

wobei X eine Amino-, Hydroxy-, Epoxy-Gruppe oder ein Halogenatom,
R eine Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 20 C-Atomen oder eine durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochenen Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann,
Y ein Kohlenwasserstoffrest mit Anionenaustauscher bildenenden funktionellen Gruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, der ein- oder mehrfach mit Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Quartäralkylamino substituiert sein kann, ist.

Insbesondere kommen Trägermaterialien aus Silicagel in Betracht, auf deren Oberfläche Diethylaminoethyl (DEAE)-oder Diethylaminopropyl-Gruppen oder Dimethylaminoethyl (DMAE)- oder Dimethylaminopropyl-Gruppen entweder direkt oder über sogenannte Spacer angeordnet sind.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird insbesondere ein Anionenaustauscher der Formel



verwendet. Die Ethylgruppen des Amins können auch durch Methylgruppen ersetzt sein.

Die Nucleinsäuren können auch durch Anionenaustauscher-Materialien basierend auf Polystyrol/DvB, wie z. B. Poros 20 für Mitteldruckchromatographie, Poros 50 HQ, der Firma BioPerseptive Cambridge, USA oder über DEAE-Sepharose, Q-Sepharose, DEAE-Sephadex der Firma Pharmacia, Schweden; DEAE Spherodex LS, DEAE Spherosil der Firma Biosepra, Frankreich.

Auch Silica-Materialien, wie Kieselgur, Siloid, Diatomeenerde, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid, Titanoxid, Hydroxylapatit, in Anwesenheit von chaotropen Salzen, wie Natriumiodid, Guanidiniumhydrochlorid, und/oder Alkoholen sind zur Präparation der Nucleinsäuren erfindungsgemäß geeignet.

Bei der Präparation von Zellinhaltsstoffen, insbesondere von Nucleinsäuren, stellt sich oft das Problem, die aufgeschlossenen natürlichen Quellen, aus denen diese Inhaltsstoffe stammen von den gelösten Stoffen zu trennen. Die Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer erfolgt mittels Zentrifugation, wobei sich die größeren Zelltrümmer oder Zellen als Pellet im Zentrifugationsröhrchen abscheiden. Die Zellinhaltsstoffe finden sich dann im Überstand und können pipettiert werden. An sich einfachere Filtrationsverfahren konnten sich insbesondere bei der Präparation von Nucleinsäuren nicht durchsetzen, da die aufgeschlossenen Zellen oder deren Bruchstücke entweder durch die zu grobporige Filter

durchlaufen und somit für Trübungen und Verunreinigungen im Filtrat sorgen oder bei Verwendung von Filtern mit entsprechenden engen Poren es jedoch zwangsläufig zur Verstopfung der Filter kommt, so daß eine sinnvolle Präparation der Zellinhaltsstoffe nicht mehr möglich ist.

Üblicherweise werden zur Entfernung von Zelltrümmern die Proben in 50 - 500 ml Gefäßen 5 - 60 min bei ca. 20.000 rpm (ca 30.000 x g) zentrifugiert.

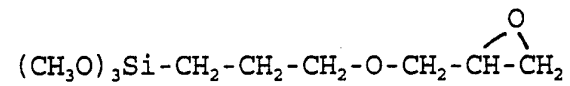
Diese Zentrifugation ist zeitaufwendig und ist für größere Zell-Lysat-Volumina von 2 l und mehr kaum wirtschaftlich zu handhaben. Zwar gibt es Durchlaufzentrifugen, doch sind diese nur für sehr große Volumina > 1.000 l sinnvoll. Weiterhin ist dies aufwendig und kapitalintensiv.

Erfindungsgemäß wird eine einfache Entfernung von Zelltrümmern aus Zell-Lysaten von 1 l bis 1.000 l ermöglicht. Dabei werden die in der WO 93/11218 beschriebenen Filtrationsverfahren eingesetzt.

Erfindungsgemäß wird ebenfalls in besonders einfacher Weise bereits bei der Abtrennung von Zelltrümmern eine Endotoxinabreicherung oder -entfernung durchgeführt. Dies geschieht durch Anwendung des in P 44 32 654.8 vorgeschlagenen Verfahrens. Dabei wird der Zelltrümmer enthaltende Aufschluß über Filterschichten aus Glas, Silicagel, Diatomeenerde, Aluminiumoxiden, Titanoxiden, Zirkonoxiden, Hydroxylapatit oder anderen anorganischen Mineralien, wie z. B. Perlite oder Filterschichten aus verwebten Vliesen, aus Glasfasern und Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, verwebten oder verklebten Vliesen aus Polymeren, insbesondere Polypropylen, Polyamiden oder Polyester gegeben. Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde oder verwebten oder verklebten Vliesen aus Glasfasern und Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier gegeben. Die

aus der Filterschicht austretende Fraktion wird aufgefangen und dann anschließend erfindungsgemäß weiterbehandelt.

Überraschenderweise zeigte sich, daß durch eine solche Filtration Endotoxine abgereichert werden. Es ist besonders bevorzugt, daß die Filterschicht bildenden Materialien Hydroxylgruppen tragen oder mit Hydroxylgruppen tragenden oder bildenden Orgnosilanen, wie z. B.



beschichtet bzw. modifiziert sind, insbesondere Diol-Silicagel, Diol-Diatomeenerde und/oder Diol-Perlite.

Insbesondere geschüttete Diatomeenerde hat sich zur Endotoxinabreicherung bzw. -entfernung bei der Probenvorbereitung bewährt.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche Nucleinsäure ist auch für den Einsatz in der Gentherapie nach der "Anti-sense"- oder "Sense"-Strategie geeignet. Die "Anti-sense"-Strategie nutzt die Eigenschaft von zum Beispiel mRNA mit komplementären Nucleinsäuren Hybride zu formen. Die Hybride sind inaktiv. Die "Anti-sense"-Nucleinsäure inaktiviert also die MRNA. Die erfindungsgemäß erhaltene "Anti-sense"-RNA kann dabei von außen kontinuierlich dem zu therapierenden Individuum zugeführt werden, oder von entsprechend transformierten Zellen im Individuum selbst gebildet werden. Die "Sense"-Strategie führt zur Ergänzung oder Unterstützung von z.B. MRNA, die wichtige Funktionen erfüllt. Dabei wird die benötigte RNA dem zu therapierenden Individuum zugeführt. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche Nucleinsäure ist aufgrund ihrer hohen Reinheit auch geeignet, in sogenannten genetischen Vakzinierungsverfahren eingesetzt zu werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft ausgestaltet werden, indem die Entfernung des durch eine Elution der Nucleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke notwendigen Salze durch Behandlung der hohen Salzkonzentrationen aufweisenden nucleinsäurehaltigen Fraktionen mit einem mineralischen Trägermaterial erfolgt. Diese Trägermaterialien bestehen im wesentlichen aus nicht modifizierten anorganischen Trägermaterialien z. B. Glas oder Glaspulver. An diese Oberflächen adsorbiert die Nucleinsäure in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Danach kann die adsorbierte Nucleinsäure mit Lösungen geringer Ionenstärke oder entmineralisiertem Wasser desorbiert werden.

Es hat sich herausgestellt, daß die Verwendung von isopropanolhaltigen Puffern anstelle von ethanolhaltigen Puffern vorteilhaft ist. Wie in P 44 03 693.0 vorgeschlagen, können durch die Verwendung von isopropanolhaltigen Puffern besonders gute Transfektionsraten der erfindungsgemäß hergestellten Nucleinsäuren erzielt werden.

Erfindungsgemäß beansprucht wird auch eine Zusammenstellung, die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens notwendigen Komponenten enthält. Dazu gehören insbesondere Reagenzien, auch in konzentrierter Form, zur fertigen Abmischung beim Anwender, Chromatographiematerial zur Trennung der Nucleinsäuren, wäßrige Lösungen (Puffer, gegebenenfalls auch in konzentrierter Form zu endgültigen Einstellung beim Anwender) sowie weitere Hilfsstoffe, wie Substanzen zur Entfernung von Endotoxinen, wie Diatomeenerde oder chromatographisches Material zur Entsalzung kochsalzeluierter Nucleinsäuren.

Das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbare Anionenaustauschermaterial ermöglicht DNA-Präparationen bis zum Kilogramm-Maßstab, insbesondere im Bereich von 10 mg bis 100 g DNA. Durch Untersuchung der DNA, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren isoliert wurde, mit Hilfe der HPLC-

Analyse und Elektronenmikroskopie, zeigt, daß diese Präparationen frei von Proteinen (Endotoxinen), genomischer DNA sowie RNA sind. Die Erfindung wird anhand der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Puffer P1: (Resuspension buffer)	100 µg/ml RNAase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
Puffer P2: (Lysis buffer)	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3: (Neutralisation buffer)	3,0 M KAc, pH 5,5
Puffer QBT: (Equilibration buffer)	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Alkohol*, pH 7,0, 0,15% Triton X-100
Puffer QC: (Wash buffer)	1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Alkohol, pH 7,0
Puffer QN: (Elution buffer)	1,6 M NaCl, 50 mM MOPS 15% Alkohol, pH 8,5
TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
STE:	100 mM NaCl, 10 mM Tris/Hcl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Endotoxin Removal Buffer:	750 mM NaCl, 10% Triton X 100, 50 mM MOPS, pH 7,0

* Als Alkohole werden bevorzugt Isopropanol oder Ethanol verwendet.

Beispiel 1

Isolation von 50 mg pSVCFTR aus 10 l E. coli Kultur für Aerosilation von CF-Patienten.

Das aus 10 l E.coli XL1 Blue Fermenterkultur resultierende Bakterienpellet wird in je 500 ml Puffer P1 und P2 resuspendiert. Mit 500 ml Puffer P3 wird das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird zur Klärung über einen Faltenfilter filtriert. Das filtrierte Lysat wird mit 1/10 Vol. Endotoxin Removal Buffer (750 mM NaCl; 10% Triton X 114; 40 mM MOPS, pH 7,0) vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Das Lysat wird nun mittels einer Schlauchpumpe auf eine Chromatographiesäule 26 mm x 100 mm gefüllt mit einen QIAGEN Anionenaustauscher (70 - 100 µm Partikelgröße, 2,5 µmol DEAE/g Chromatographiematerial) adsorbiert. Anschließend wird die Chromatographiesäule mit 2.000 ml Puffer QC mit einer Flußrate von 15 ml/min gewaschen. Die an die Säule gebundene Plasmid DNA wird mit 280 ml Puffer QN, mit einer Flußrate von 3 ml/min eluiert. Das gewonnene Eluat wird mit 200 ml Isopropanol vermischt und für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 40 ml TE Puffer resuspendiert. Die so gereinigte DNA wird mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (EM), HPLC-Analyse, photometrische Messung, Agarosegel-Elektrophorese und Endotoxin-Test auf ihre Reinheit analysiert. Dabei resultiert diese Aufreinigungsmethode in hochreiner DNA mit keinen nachweisbaren Kontaminationen von RNA, genomischer DNA und Endotoxinen. Die so isolierte DNA wird mit einer Liposomenlösung vermischt und in Mengen von 10 µg CF-Patienten über Aerosilation verabreicht.

Beispiel 2

Isolation von 10 mg pCMVlacZ mit Hilfe von QIAGEN tip-10.000 für Injektion von Plasmid-DNA in quergestreifte Muskel zur Behandlung von Muskeldystrophie.

5 l einer DH5alph/pCMVlacZ Übernachtkultur werden abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 125 ml P1 resuspendiert, mit 125 ml Puffer P2 vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wird 125 ml Puffer P 3 zugesetzt, gemischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Das Lysat wird über eine lose Schüttung von Diatomeenerde wie in P 44 32 654.8 beschriebene Filtrationssäule gegeben und anschließend wie in Beispiel 1 mit 1/10 Vol. Endotoxin Removal Puffer versetzt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird nun mit 270 ml Isopropanol versetzt und für 30 min bei 20.000 x g abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird für 10 min bei RT getrocknet und in 5 ml Wasser resuspendiert. Die resuspendierte DNA wird mit 25 ml QC Puffer versetzt. Dieses Gemisch wird auf eine mit 75 ml QBT Puffer äquilibrierte DEAE-Silicagel-Säule (26 mm x 50 mm, 70 - 100 µm, 2,0 µmol/g) gegeben. Anschließend wird die Säule mit 600 ml QC Puffer gewaschen und die DNA dann mit 75 ml QF Puffer eluiert. Das Eluat wird mit 52,5 ml Isopropanol vermischt und für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das DNA Pellet wird 10 min bei RT getrocknet und in 1 ml PBS resuspendiert. Die DNA-Lösung kann nur zur direkten Muskelinjektion verwendet werden.

Beispiel 3

Isolation von 100 mg pXYHBV aus einer 20 l E. coli Kultur für die Verwendung als "Genetische Hepatitis Vakzine".

Das aus einem 20 l Fermentationslauf resultierende Bakterienpellet wird in 1.000 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 1.000 Puffer P2 versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach dem

Zusatz von 1.000 ml Puffer P3 wird das Gemisch für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird über ein Glasfaserfilter gegeben und das klare Lysat wird mit 2.250 ml Isopropanol vermischt und für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 10 ml Wasser resuspendiert und mit 90 ml QC Puffer versetzt. Dieses Gemisch wird über eine Schlauchpumpe auf eine Chromatographiesäule nach Beispiel 1 mit einer Flußrate von 2 ml/min gepumpt. Die Säule wird mit einer Flußrate von 15 ml/min gewaschen und die DNA im Anschluß mit 350 ml QF Puffer mit einer Flußrate von 3 ml/min eluiert.

Beispiel 4

Entfernen von Endotoxin aus DNA Präparationen

Die präparierte DNA wird mit Triton X 114 auf eine Endkonzentration von 0,1 - 1% eingestellt. Anschließend wird die DNA/Triton Lösung für 30 min bei 4 - 7°C auf einem "Roller" inkubiert. Die Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt und für 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert oder filtriert. Der Überstand wird mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und gefällt. Das resultierende Pellet wird getrocknet und in TE resuspendiert. Die so behandelte DNA ist frei von Endotoxin.

Beispiel 5

Plasmidpräparation

Eine 150 ml HB 101 E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 20 ml 50 ml Tris-Hcl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNAse A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 20 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 20 ml 3 M K-

Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar Differenzdruck durch die erfindungsgemäße Filtervorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Das filtrierte Lysat wird mit 1/10 Vol. Endotoxin Removal Buffer (750 mM NaCl; 10% Triton X 114; 40 mM MOPS, pH 7,0) vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Das Filtrat wird vollständig durch die Anionenaustauschersäule gesaugt oder gedrückt, um eine Adsorption der DNA zu erreichen. Die Extraktionssäule wird anschließend zweimal mit 100 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 100 ml 1,6 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkoholpellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Alternativ kann das Alkoholpräzipitat der Nucleinsäure auch durch eine Filtration gewonnen werden. Dies bietet Vorteile, wenn großen Mengen an DNA präpariert werden müssen und die zu handhabenden Volumina größer als beispielsweise 1 l sind.

Beispiel 6

Ein DNA-Template wird über eine in vitro Reaktion in RNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz wird auf 750 mM NaCl eingestellt und über eine QIAGEN® Anionenaustauscher-Säule aufgereinigt. Die gereinigte RNA wird anschließend zur in vitro oder in vivo Gentherapie verwendet.

Beispiel 7

Aufreinigung von 40 mg pBR322 mit Hilfe von DEAE Q-Sepharose® (Firma Pharmacia)

Die Biomasse aus einer 40l Fermenter Kultur von pBR322 wurde mit jeweils 10l Puffern P1, P2 und P3 mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Abschließend wurde das Lysat über eine Filtervorrichtung, bestehend aus einer losen Schüttung versetzt und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert. Die DNA wird nun durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol präzipitiert und in 20 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA, 50mM NaCl resuspendiert. Die resuspendierte DNA-Lösung wird auf eine DEAE Q-Sepharose-Säule mit 200 ml Bettvolumen geladen. Die DNA wird mit einem Gradiente von 1 mM NaCl/ml eluiert, wobei die Puffer folgende Konzentrationen aufweisen:

Buffer A 10 mM Tris HCl, 1mM EDTA, 0,75 M NaCl, pH 8,0;
Buffer B 10 mM Tris HCl, 1mM EDTA, 0,85 M NaCl.

Die Flußrate beträgt dabei 0,5 ml/min. Die DNA wird anschließend mit Ethanol gefällt und in PBS Buffer in einer Konzentration von 1 μm/μl resuspendiert.

Ansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotiden für den Einsatz in der Gentherapie, wobei die Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide aus einer im wesentlichen biologischen Quelle isoliert oder gereinigt werden, dadurch gekennzeichnet, daß

   - die im wesentlichen biologischen Quellen aufgeschlossen werden, die erhaltenen Fraktionen gegebenenfalls vom Rest der biologischen Quellen befreit oder abgereichert werden durch an sich bekannte mechanische Verfahren, wie Zentrifugieren, Filtrieren,
   - danach die so behandelten Fraktionen mit affinitätschromatographischem Material oder mit anorganischem Chromatographie-Material zur Entfernung von Endotoxinen behandelt werden, wonach sich,
   - eine Isolierung der Nucleinsäuren und/oder Oligonucleotide an einem Anionenaustauscher anschließt, der so beschaffen ist, daß DNA erst bei einer mindestens ca. 100 mM höheren Natriumchloridlösung entsprechenden Ionenstärke vom Anionenaustauscher zu desorbieren beginnt als derjenigen Ionenstärke entspricht, bei der RNA vom Anionenaustauschermaterial vom Anionenaustauscher zu desorbieren beginnt.

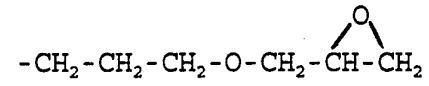
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Trägermaterial des anorganischen Chromatographie-Materials mit Anionenaustauschergruppen modifizierte poröse oder nicht poröse anorganische und/oder organische Trägermaterialien verwendet werden.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als anorganische Trägermaterialien Silicagel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxide, Titanoxide, Zirkonoxide, Hydroxylapatit und als organische Trägermaterialien Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrolharze oder Copolymere der genannten Materialien verwendet werden.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 3, wobei das modifizierte Trägermaterial erhältlich ist durch Umsetzung eines der in Anspruch 3 genannten Trägermaterialien in einem ersten Schritt mit einem Silanisierungsreagenz der allgemeinen Formel I

$$R^1R^2R^3Si\ R^4 \qquad (I),$$

wobei R^1 ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-OCH_3$, $-OC_2H_5$, oder $-OC_3H_7$ oder ein Halogenatom, insbesondere -Cl oder eine Dialkylaminogruppe mit identischen oder unterschiedlichen Alkylresten mit 1 bis 6 C-Atomen;
R^2 und R^3 unabhängig voneinander ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-CH_3$, $-C_2H_5$, oder $-C_3H_7$, oder ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-OCH_3$, $-OC_2H_5$ oder $-OC_3H_7$, oder ein Halogenatom oder ein durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochener Alkylrest mit 4 bis 20 C-Atomen, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach durch Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Hydroxy oder Aryl substituiert sein kann;
R^4 eine Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindesten eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochener Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann, insbesondere



ist,

gefolgt von einem zweiten Schritt, wobei der im ersten Schritt modifizierte Träger umgesetzt wird mit einem Reagenz der allgemeinen Formel II:

X-R-Y (II),

wobei X eine Amino-, Hydroxy-, Epoxy-Gruppe oder ein Halogenatom,
R eine Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 20 C-Atomen oder eine durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochenen Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann,
Y ein Kohlenwasserstoffrest mit Anionenaustauscher bildenenden funktionellen Gruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, der ein- oder mehrfach mit Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Quartäralkylamino substituiert sein kann, ist.

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei auf der Trägeroberfläche Diethylaminoethyl (DEAE)-Gruppen oder Dimethylaminoethyl (DMAE)-Gruppen entweder direkt oder über sogenannte Spacer angeordnet sind.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei als Nucleinsäuren DNA wie Plasmide, Cosmide, aus Viren isolierte DNA auch in enzymatisch oder chemisch modifizierter Form und/oder RNA jeglicher Form und Herkunft oder Ribozyme isoliert werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei zur Entfernung von Endotoxinen in den Nucleinsäurefraktionen eine Behandlung der nucleinsäurehaltigen Fraktionen mit nicht ionischen Detergenzien wie Triton X 100 oder eine Behandlung mit affinitätschromatographischen Trägern, wie Nickel-NTA, -IDA, Polymyxin, DNA ETOX, durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei eine Entfernung des durch eine Elution der Nucleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke notwendigen Salze durch Behandlung der hohe Salzkonzentrationen aufweisenden nucleinsäurehaltigen Fraktionen mit einem mineralischen Trägermaterial, wie im wesentlichen aus Glas bestehenden, unter Adsorption der Nucleinsäure an die Oberfläche dieser mineralischen Träger und anschließender Desorption der Nucleinsäuren mit Wasser oder Pufferlösungen geringer Ionenstärke.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei Zelltrümmer des Zell-Lysates durch Filtration abgetrennt werden, insbesondere unter Verwendung eines Filters dessen Porengröße in Fließrichtung der zu filtrierenden Probe abnimmt und/oder einem Filter, der eine Filterschicht aus Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde oder verwebte oder verklebte Vliese aus Glasfasern uns Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier besteht.

10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei eine Vorreinigung einer nucleinsäurehaltigen Probe eines Zell-Lysats an einer Schicht aus unmodifizierter Diatomeenerde erfolgt.

11. Verwendung der in den Ansprüchen 1 bis 6 genannten Anionenaustauschermaterialien für die Trennung,

Reinigung und Isolierung von Nucleinsäuren zur Herstellung eines nucleinsäurehaltigen Mittels für die Gentherapie.

12. Verwendung nach Anspruch 11 für die in vivo- und ex vivo-Gentherapie.

13. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12 zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen wie cystische Fibrose, Muskeldystrophie.

14. Verwendung des in den Ansprüchen 1 bis 6 genannten Anionenaustauschermaterials für die Reinigung von Oligonucleotiden für die in vivo-/ex vivo-Gentherapie über die Antisense-, Sense-Strategie.

15. Verwendung der in den Ansprüche 1 bis 6 genannten Anionenaustauschermaterials für die Aufreinigung von Viruspartikeln, auch intakten Viruspartikeln, für die in vivo/ex vivo Gentherapie.

16. Verwendung von Isopropanol als Reagenz zur Aufreinigung von Nucleinsäuren in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.

17. Zusammenstellung, enthaltend die für die Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10 notwendigen Komponenten, insbesondere Reagenzien auch in konzentrierter Form zur fertigen Abmischung beim Anwender, Chromatographie-Material zur Trennung der Nucleinsäuren, wäßrige Lösungen (Puffer, gegebenenfalls auch in konzentrierter Form zur endgültigen Einstellung beim Anwender), weitere Hilfsstoffe sowie Substanzen zur Entfernung von Endotoxinen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna al Application No
PCT/EP 95/00389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07H1/08 C12N15/10 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07H C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US-A-4 997 932 (REARDON M.A. AND KLEIN L.S.) 5 March 1991 see claims; examples ---	1,11,14, 15,17
A	WO-A-93 11221 (DIAGEN INSTITUT FUR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GBMH) 10 June 1993 see claims; figures; examples ---	1,11,14, 15,17
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8310 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 83-23220 & JP-A-58 013 519 (SEIKAGAKU KOGYO KK) , 26 January 1983 see abstract -----	1,11,14, 15,17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search
4 July 1995

Date of mailing of the international search report
11. 07. 95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Day, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interna al Application No
PCT/EP 95/00389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-4997932	05-03-91	EP-A-	0508985	21-10-92
		WO-A-	9107422	30-05-91
WO-A-9311221	10-06-93	DE-A-	4139664	03-06-93
		WO-A-	9311218	10-06-93
		EP-A-	0616638	28-09-94
		EP-A-	0616639	28-09-94
		JP-T-	7501222	09-02-95
		JP-T-	7501223	09-02-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne ales Aktenzeichen
PCT/EP 95/00389

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H1/08 C12N15/10 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07H C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US-A-4 997 932 (REARDON M.A. AND KLEIN L.S.) 5.März 1991 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,11,14, 15,17
A	WO-A-93 11221 (DIAGEN INSTITUT FUR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GBMH) 10.Juni 1993 siehe Ansprüche; Abbildungen; Beispiele ---	1,11,14, 15,17
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8310 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 83-23220 & JP-A-58 013 519 (SEIKAGAKU KOGYO KK) , 26.Januar 1983 siehe Zusammenfassung -----	1,11,14, 15,17

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4.Juli 1995	11. 07. 95
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Day, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interne Aktenzeichen
PCT/EP 95/00389

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US-A-4997932	05-03-91	EP-A-	0508985	21-10-92
		WO-A-	9107422	30-05-91
WO-A-9311221	10-06-93	DE-A-	4139664	03-06-93
		WO-A-	9311218	10-06-93
		EP-A-	0616638	28-09-94
		EP-A-	0616639	28-09-94
		JP-T-	7501222	09-02-95
		JP-T-	7501223	09-02-95