

(19) **DANMARK**

(10) **DK/EP 0880536 T4**



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(12) **Oversættelse af ændret
europæisk patentskrift**

-
- (51) Int.Cl.: **C 07 H 1/08 (2006.01)** **A 61 K 48/00 (2006.01)** **C 12 N 15/10 (2006.01)**
- (45) Oversættelsen bekendtgjort den: **2015-09-07**
- (80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse om opretholdelse af patentet i ændret form: **2015-08-05**
- (86) Europæisk ansøgning nr.: **97901080.8**
- (86) Europæisk indleveringsdag: **1997-01-24**
- (87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: **1998-12-02**
- (86) International ansøgning nr.: **EP1997000321**
- (87) Internationalt publikationsnr.: **WO1997029113**
- (30) Prioritet: **1996-02-06 EP 96101628**
- (84) Designerede stater: **AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL**
- (73) Patenthaver: **Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Tyskland**
- (72) Opfinder: **KUHNE, Wolfgang, Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg, Tyskland**
- (74) Fuldmægtig i Danmark: **PLOUGMANN & VINGTOFT A/S, Rued Langgaards Vej 8, 2300 København S, Danmark**
- (54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af rensset nukleinsyre og anvendelse deraf**
- (56) Fremdragne publikationer:
EP-A- 0 268 946
WO-A-95/21177
WO-A-95/21179
WO-A-95/21250
N. A. HORN ET AL.: 'Cancer Gene Therapy Using Plasmid DNA: Purification of DNA for Human Clinical Trials' HUMAN GENE THERAPY Bd. 6, Mai 1995, Seiten 565 - 573
M. COTTEN ET AL.: 'Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus' GENE THERAPY Bd. 1, 1994, Seiten 239 - 246
T. R. JOHNSON ET AL.: 'Large-Scale Isolation of Plasmid DNA and Purification of Phage DNA Using Hydroxylapatite Chromatography' ANALYTICAL BIOCHEMISTRY Bd. 132, 1983, Seiten 20 - 25
P. M. MONTBRIAND ET AL.: 'Improved method for the removal of endotoxin from DNA' JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY Bd. 44, 1996, Seiten 43 - 46
M. MARQUET ET AL.: 'Process Development for the Manufacture of Plasmid DNA Vectors for Use in Gene Therapy' BIOPHARM September 1995, Seiten 26 - 37
European Pharmacopoeia 2004, 2.6.14 Bacterial Endotoxins
'The United States Pharmacopeia', 01 Januar 2004 Seiten 2169 - 2173
Versuchsbericht Philip Henwood
Stellungnahme Dr. Kuhne
'Qiagen Plasmid Purification Handbook', 1999 Seiten 64 - 66
'Qiagen Plasmid Purification Handbook', 2012 Seiten 36 - 39

Fortsættes ...

Opfindelsen angår fremstillingen af oprenset nukleinsyre og dens anvendelse, især i genterapien.

Fremstillingen af replikerbar nukleinsyre sker sædvanligvis ved formering af repli-
5 kationsegnet plasmid-DNA i gramnegative bakterier, som fx E. coli. Efter oplukning af biomassen (sædvanligvis ved alkalisk lyse med lysozym eller ultralyd) centrifugeres der, og overstanden udrystes med phenol. Derefter udføres ultracentrifugering på en caesiumchloridgradient (Birnboim & Doly, Nucleic Acid Res. 7 (1979) 1513-1523, Garger et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 117
10 (1983) 835-842.). Sådanne præparater indeholder dog endotoxiner, phenol, caesiumchlorid og /eller ethidiumbromid som farvningsmiddel.

En yderligere fremgangsmåde er beskrevet i QIAGEN® Plasmid Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) og EP-B 0 268 946. Derefter kromatograferes det cellely-
15 sat, der blev opnået efter sædvanlig oplukning, på QIAGEN®-TIP, som indeholder QIAGEN®-harpiks (et bæreremateriale på silicagelbasis). Ulempen ved denne fremgangsmåde er, at DNA-bindingsproteiner ikke løsnes fra DNA'et fuldstændigt, og derfor indeholder den oprensede plasmidfraktion proteiner og især endotoxiner (fra membranen af de gramnegative værtsceller) i et betydeligt omfang.

20

I en yderligere fremgangsmåde udføres, efter alkalyse af E. coli-biomassen, en kromatografi af centrifugeringsoverstanden ifølge Birnboim & Doly ved højsaltbet-
tingelser over anionbyttersøjler (fx Mono-Q, Source-Q fra Pharmacia, Macroprep-Q fra BioRad, Poros-Q fra Perseptive Biosystems eller HyperD-Q fra Biosepra, jvf.
25 Chandra et al., Analyt. Biochem. 203 (1992) 169-172; Dion et al., J. Chrom. 535 (1990) 127-147). Også i dette tilfælde indeholder den oprensede plasmidfraktion proteiner og især endotoxiner i et betydeligt omfang.

I en yderligere fremgangsmåde er det, efter alkalyse og efterfølgende
30 ekstrahering med phenol/chloroform, muligt at foretage kromatografi via gelfiltrering. (McClung & Gonzales, Analyt. Biochem. 177 (1989) 378-382; Raymond et al., Analyt. Biochem. 173 (1988) 125-133). Efter denne oprensning indeholder plasmidpræparatet stadig forureninger, især phenol.

I WO 95/21177 og WO 95/21179 beskrives en fremgangsmåde til isolering og oprensning af nukleinsyrer til anvendelse i genterapien, hvorved oprensningen i det væsentlige sker ved centrifugering, filtrering, affinitetskromatografi eller kromatografi på et uorganisk kromatografimateriale, med efterfølgende

5 kromatografi på en ionbytter. En yderligere depletering af endotoxiner kan ifølge WO 95/21177 opnås, når nukleinsyren i oprensningsprocessen behandles med en "endotoxin removal buffer", der indeholder 10% Triton® X 100 og 40 mmol/l MOPS-buffer (3-morpholino-1-propansulfonatbuffer) eller 50 mmol/l MOPS-buffer (WO 95/21179). En ulempe ved denne fremgangsmåde består i, at den

10 nukleinsyre, der oprenses på denne måde, indeholder forureninger af Triton® og MOPS-buffer. Selv om der ved denne fremgangsmåde kan opnås en depletering af endotoxiner til et indhold på ca. 100 EU/mg DNA (Qiagen News 1/96, 3-5) eller ifølge WO 95/21179 på 10-17 EU/mg DNA, er en videregående fjernelse af endotoxiner dog ikke mulig ved denne fremgangsmåde.

15

Til terapeutisk anvendelse, fx anvendelse beregnet til genterapien, kræves der dog et nukleinsyrepræparat, som så vidt muligt er fri for alle forureninger (især i videst muligt omfang fri for endotoxiner). Fremfor alt repræsenterer endotoxinindholdet i plasmidpræparater et til dato uløst problem, som fx blev

20 beskrevet af Cotten et al., Gene Therapy 1 (1994) 239-246. Et formindsket endotoxinindhold (ca. 100 EU/mg DNA) kan ifølge den kendte teknik, som fx ifølge WO 95/21177, kun opnås, når nukleinsyrene behandles med ikke-ioniske detergenter, som fx Triton (endotoxin removal buffer fra WO 95/21177). Triton® har dog en biologisk virkning, som fx forandringer i lungerne eller sænkning af

25 blodtrykket (Fiedler, Lexikon der Hilfs-stoffe für Pharmazie und Kosmetik und angrenzende Gebiete (bind 9, 3. oplag, 1989, Editio Cantor, DE)). Den ydermere nødvendige MOPS-buffer indeholder ligeledes et - ud fra et terapeutisk anvendelsessynspunkt - problematisk stof.

30 Ved opfindelsen tilvejebringes et præparat af et plasmid-DNA med en høj renhed, hvor endotoxinerne i udstrakt grad er depleteret, fortrinsvis uden ethidiumbromid, phenol, caesiumchlorid, polymyxin eller ikke-ioniske detergenter, samt en simpel og effektiv fremgangsmåde til oprensning af sådanne nukleinsyrer, især til depletering af endotoxiner.

35

Den foreliggende opfindelse angår et plasmid-DNA, som er replikerbart i gram-negative bakterier, med et proteinindhold på mindre end 0,1%, og et endotoxinindhold på 0,01-0,1 EU/mg DNA. Fortrinsvis er dette plasmid-DNA fri for ethidiumbromid, phenol og casiumchlorid, fri for detergenter på basis af
5 octylphenolpoly(ethylenglycolether)_n, som fx Triton®-detergenter, og ligeledes fri for MOPS-bufferstof og RNase.

Ved amplifikation forstås forøgelsen i en nukleinsyres kopiantal (især DNA og plasmid-DNA), baseret på replikationen af en vektor. Derved fremstilles et større
10 antal kopier af en skabelon. En vektor, som udgør nukleinsyren, eller som indeholder nukleinsyren i klonet form, repliceres.

Ved et plasmid-DNA forstås et ekstrakromosomalt DNA-duplexmolekyle. Et plasmid-DNAs størrelse udgør sædvanligvis fra 1 til mere end 200 kb, og det
15 foreligger i værtsceller i én til flere hundrede kopier. Plasmid-DNA amplificeres sædvanligvis i gramnegative bakterier, som fx E. Coli, og isoleres derefter. Plasmider anvendes ofte til konstruktion af kloningsvektorer og til transfektion af prokaryontiske og eukaryontiske celler. En terapeutisk anvendelse er især af betydning i forbindelse med in vivo- og ex vivo-genterapi. Plasmid-DNA til
20 terapeutisk anvendelse har fortrinsvis en længde på 5-20 kb, især foretrukket 5-10 kb, og er dobbeltstrengt. Plasmid-DNA'et kan være lineariseret eller cirkulært lukket. Fortrinsvis anvendes det i det væsentlige cirkulært lukkede DNA.

Således angår opfindelsen endvidere en farmaceutisk sammensætning, som indeholder et plasmid-DNA ifølge opfindelsen i en terapeutisk aktiv mængde og eventuelt yderligere farmaceutiske hjælpe-, fyld- eller tilsætningsstoffer.
25

Endotoxiner er lipopolysaccharider fra gramnegative bakterier. Endotoxiner kan virke som pyrogener hos pattedyr og kan inducere et endotoxinshock. De væsentlige
30 toksiske komponenter i endotoxiner er lipid A, hvorved polysacchariddelen formidler vandopløseligheden, og lipiddelen virker toksisk. Den biologiske virkning af endotoxiner i pattedyr er især en hypersensibilisering samt andre reaktioner, som ledsages af feber.

Plasmid-DNA amplificeres ifølge standardfremgangsmåden i *E. coli*, dvs. en gram-negativt bakterie. Efter fermenteringen oplukkes den biomasse, der blev opnået derved, og cellerne lyses. Herved frigøres endotoxinerne fra cellemembranen. Dette betyder, at det, efter amplifikation af nukleinsyrer, der er fremstillet

5 ifølge opfindelsen, især af plasmid-DNA, i gramnegative bakterier og især i *E. coli*, er nødvendigt med en depletering af endotoxiner, hvis plasmid-DNA'et skal anvendes terapeutisk.

Til terapeutisk anvendelse af replikerbare nukleinsyrer, der er fremstillet ifølge op-

10 findelsen, især plasmid-DNA, anvendes hhv. påtænkes, afhængigt af anvendelsen, doser på 50 µg-10 mg og mere. Doseringsmængden afhænger af sygdommen og applikationsmåden. I aerosoler, fx til behandling af cystisk fibrose, anvendes doser på 400 µg og mere. Analogt gælder det for i lipidkompleks (fx i liposomer) indkapslet plasmid-DNA. For at tilvejebringe sådanne mængder af replikerbar

15 nukleinsyre til terapeutisk anvendelse er det nødvendigt at fremstille den replikerbare nukleinsyre i stor målestok. Her er fermenteringsansatser med 1-5 kg biomasse, hvoraf 1-5 g nukleinsyre kan isoleres, hensigtsmæssige.

Opfindelsen angår ligeledes en fremgangsmåde til fremstilling af en nukleinsyre,

20 fortrinsvis af et plasmid-DNA, med et endotoxinindhold på mindre end 1 EU/mg DNA, fortrinsvis 0,01-0,1 EU/mg DNA, hvilken fremgangsmåde er kendetegnet ved, at plasmid-DNA formeres i gramnegative bakterier såsom *E. coli*, at biomassen oplukkes, og at de opløselige bestanddele kromatograferes på hydroxylapatit, og at det nævnte plasmid-DNA derefter isoleres. Anionbytnings-

25 kromatografi udføres før kromatografien på hydroxylapatit, hvorved i det væsentlige RNA og fremmede proteiner fjernes. Derved kan eventuelt yderligere forureninger fjernes, og et proteinindhold i nukleinsyren på mindre end 1%, fortrinsvis mindre end 0,1 %, fri for ethidiumbromid, phenol og caesiumchlorid, opnås. Et sådant præ-parat er fortrinsvis også fri for detergenter på basis af

30 octylphenolpoly(ethylen-glycolether)_n og MOPS-bufferstof.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen lykkes det at undgå eller fjerne et større antal forureninger, der indeholder plasmid-DNA, når plasmid-DNA'et fremstilles ifølge en fremgangsmåde, der er velkendt af fagmanden. Fremfor alt lykkes det

35 overraskende nok på simpel vis at formindske endotoxinindholdet drastisk.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnås en overraskende depletering af endotoxiner ved kromatografi med hydroxylapatit. Dette er desto mere overraskende, fordi kromatografi på hydroxylapatit i litteraturen kun anvendes til adskillelse af DNA og RNA (Johnson & Ilan, *Analyt. Biochem.* 132 (1983) 20-25).

5

Den kromatografiske virkning af hydroxylapatit beror i det væsentlige på vekselvirkningen mellem calcium²⁺-grupper og den negative ladning af den nukleinsyre, der skal oprenses, og i mindre grad på vekselvirkningen af den nukleinsyre, der skal oprenses, med PO₄³⁻-grupper på overfladen af krystallinsk hydroxylapatit (jvf. fx *Protein Purification Methods*, Ed. by Elv. Harries and S. Angal, Oxford University Press 1989, 238-244). I det væsentlige kan kromatografien på hydroxylapatit for nukleinsyrer betegnes som et anionbytningstrin, hvorved det bundne DNA ikke kan eluere ved simpel forøgelse af ionstyrken (fx NaCl), men ved forøgelse i koncentrationen, fortrinsvis af fosfat eller citrat, divalente metalioner og/eller EDTA, fra hydroxylapatitmatricen.

I fremgangsmåden ifølge opfindelsen bindes ved kromatografien på hydroxylapatit (fx HA-Ceramic, Bio-Gel HPHT, Bio-Gel HT/HTP fra Biorad DE, HA-Ultrogel fra IBF eller HA sferoidal fra BDH, Macrosorb C fra Sterling Organics) først endotoxiner og de nukleinsyrer, der skal oprenses, i det væsentlige via dipol-dipol vekselvirkninger til hydroxylapatit. Ækvilibreringen sker sædvanligvis ved neutral pH i en fosfatbuffer. Fortrinsvis tilsættes et denatureringsmiddel, som også tilsættes ved efterfølgende vask af søjlen. Overraskende lykkes det med fosfat-, citrat- eller calciumioner at fortrænge nukleinsyren fra dens binding til hydroxylapatit, mens endotoxinerne forbliver bundet. Fortrængningen af nukleinsyren fra dens binding til hydroxylapatit kan, i stedet for ved hjælp af calciumioner, også udføres ved hjælp af andre divalente metalioner, der i apatit kan erstatte calcium, som fx Mg, Fe og Mn. Til elueringen udgør ionkoncentrationen fortrinsvis 100 mmol/l eller mere. Især foretrukket er ionkoncentrationer mellem 100 og 500 mmol/l, hhv. 200 og 500 mmol/l. Især foretrukket anvendes en phosphationholdig opløsning (fx en fosfatbuffer). Før elueringen (uden denatureringsmiddel) vaskes der hensigtsmæssigt (med denatureringsmiddel). Det har vist sig at være fordelagtigt, hvis der fx anvendes en fosfat- eller sulfatopløsning (100-200 mmol/l), hvortil der tilsættes et denatureringsmiddel (fx urinstof eller guanidinhydrochlorid) i en DNA-denaturerende koncentration (fx 6 mol/l urinstof).

I en foretrukken udførelsesform udføres yderligere endnu en ultrafiltrering efter kromatografien på hydroxylapatit.

Til fremstillingen ifølge opfindelsen af nukleinsyre amplificeres de plasmider, der
5 udgør eller indeholder nukleinsyren, sædvanligvis i gramnegative bakteriekulturer. Sådanne fremgangsmåder er kendt af fagmanden og er eksempelvis beskrevet af J. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, og af F.M. Ausubel et al. red. (1991), *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York. Til dette
10 formål subkultiveres først de bakteriekulturer, der indeholder plasmiderne, og efterfølgende kultiveres de i et egnet medium, eventuelt under tilsætning af et selektionsmiddel.

Oplukningen af biomassen sker ligeledes ifølge fremgangsmåder, der er velkendt
15 af fagmanden (mekanisk eller enzymatisk oplukning, jvf. fx Birnboim og Doly, *Nucleic Acids Research* 7 (1979) 1513-1523) uden tilsætning af RNAse. Der kan gives afkald på en phenoludrystning, hvis proteinfraskillelsen sker ved kromatografi på en anionbytter. Efter oplukning og fraskillelse af de uopløselige bestanddele, hensigtsmæssigt ved centrifugering og filtrering over en filterkerte
20 (5 µm porer), kromatograferes celleoverstanden først på en anionbytter til fjernelse af proteiner. Egnede anionbyttere er anionbyttere på agarosebasis, som fx Q-Sepharose. Yderligere egnede anionbyttere er baseret på polymetacrylat (Macroprep/Bio-Rad, Tyskland), polystyren/divinylbenzen (Poros/Perseptive, HyperD/Biosepra, Source/Pharmacia) eller silicagel, til hvis overflade fx
25 diethylaminoethyl (DEAE) eller dimethylaminoethyl (DMAE)-grupper er bundet.

For at optimere oprensningens virkning elueres nukleinsyren ved hjælp af en højsaltgradient, fx en NaCl-gradient (fortrinsvis 0,65 mol/l-0,85 mol/l), i en TE-buffer. Derved bliver det overraskende nok muligt at fraskille et større antal for-
30 ureninger (RNA, protein) på én gang.

Ligeledes foretrækkes det, fortrinsvis efter kromatografien på hydroxylapatit, yderligere at udføre både en isopropanol-/ethanoludfældning til minimering af kimbeklastningen og en afsaltning. Efterfølgende kan den nukleinsyre, der er
35 fremstillet ifølge opfindelsen, påfyldes sterilt.

Nedenstående eksempler beskriver opfindelsen yderligere:

Eksempel 1

5 Fremstilling af nukleinsyre fra E. coli-biomasse

E. coli-biomasse, der indeholder plasmid-DNA, oplukkes ved hjælp af en alkalyse, og det frigjorte plasmid-DNA kromatograferes over Q-Sepharose og HA-Ceramic. Eluatet afsaltes og koncentrerer ved isopropanol/ethanol-udfældning, og plasmid-DNA-bundfaldet resuspenderes i en TE-buffer.

Resuspensionsbuffer: 50 mmol/l Tris/HCl, 10 mmol/EDTA-Na₂, pH 8,0 ± 0,2

Kaliumacetatbuffer: 3 mol/l kaliumacetatbuffer, pH 5,5

15 60 g biomasse (fugtig, E. coli) hældes ud af fermenteringsbeholderen og fyldes i depyrogeniserede centrifugebægre. Der tilsættes 750 ml resuspensionsbuffer og omrøres langsomt (ca. 35 rpm) i mindst 24 timer ved 5 ± 4°C, indtil biomassen er fuldstændigt suspenderet. Derved øges suspensionens temperatur langsomt til 25°C.

20 Der tilsættes 750 ml 0,2 mol/l NaOH/1% SDS til suspensionen under omrøring ved ca. 80 rpm, og der inkuberes ved 25°C i 5 minutter. Der tilsættes 750 ml kaliumacetatbuffer (jvf. ovenfor) under omrøring, og biomassens temperatur sænkes så hurtigt som muligt til 4°C.

25 Biomassen centrifugeres i 30 minutter ved 26000 x g ved 4°C. Overstanden, som indeholder plasmid-DNA'et, dekanteres og klarfiltreres over en 5µm-filterkerte.

Kromatografi på Q-Sepharose ff:

30 TE-buffer: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0 ± 0,2

Ækvilibrerings-/vaskebuffer = gradientbuffer A: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl, pH 8,0 ± 2.

35 Gradientbuffer B: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,85 mol/l NaCl, pH 8,0 ± 0,2.

Den dekanterede centrifugeringsoverstand indstilles til en ledningsevne på 49-50 mS/cm ved tilsætning af ca. 350 ml TE-buffer/l centrifugeringsoverstand og afkøles til $5^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$. Den samlede kromatografi udføres ved denne temperatur. Centrifugeringsoverstanden sættes på den ækvilibrerede søjle med et 5-8 (sv) 5 søjlevolumen/time. Efterfølgende vaskes søjlen med ca. 8 sv 10 mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl, pH $8,0 \pm 0,2$ ved en strømningshastighed på 5-8 sv/time.

Eluering

10

En gradient (5 sv buffer A, 5 sv buffer B) lægges på søjlen, og eluatet fraktioneres ved en strømningshastighed på 5-8 sv/time. Detektion foretages ved 254 nm. Forspidsen (forureninger) skilles fra hovedspidsen (plasmid-DNA), idet hovedspidsen fra stigende flanke opfanges i en separat beholder. Eluatets 15 endotoxinindhold ligger på mellem 1200 og 12000 EU/mg plasmid-DNA.

Kromatografi på hydroxylapatit (HA Ceramic)

20

Kromatografien udføres ved $5 \pm 4^{\circ}\text{C}$.

Ækvilibreringsbuffer: 0,1 mol/l kaliumphosphat, 6 mol/l urinstof, pH $7,0 \pm 0,2$

Vaskebuffer 1: 0,15 mol/l kaliumphosphat, 6 mol/l urinstof, pH $7,0 \pm 0,2$

Vaskebuffer 2: 0,02 mol/l kaliumphosphatbuffer, pH $7,0 \pm 0,2$

Elueringsbuffer: 0,5 mol/l kaliumphosphat, pH $7,0 \pm 0,2$

25

Detektionen foretages ved 254 nm med en UV-detektor/skriveenhed. Som justér-opløsning anvendes en produktopløsning (plasmid-DNA) på 1%, målt ved hjælp af et kalibreret fotometer.

30 Q-Sepharose®-poolen bringes på en slutkoncentration på 1,1 mmol/l calciumchlorid og sættes på den ækvilibrerede søjle med en strømningshastighed på 5-8 sv/time.

Efterfølgende vaskes søjlen med en strømningshastighed på 5-8 sv/time
35 med successivt:

1. 0,1 mol/l kaliumphosphat, 6 mol/l urinstof, pH $7,0 \pm 0,2$, indtil der ikke længere på detektoren kan ses nogen absorption.

2. 2-4 sv, 0,15 mol/l kaliumphosphat, 6 mol/l urinstof, pH $7,0 \pm 0,2$

3. 5 sv, 0,02 mol/l kaliumphosphat, pH $7,0 \pm 0,2$

5

I tilslutning til vasketrinnene elueres der med 0,5 mol/l kaliumphosphatbuffer, pH $7,0 \pm 0,1$ med en strømningshastighed på 5-6 sv/time.

Spidsen opsamles, tempereres til 25°C , og der tilsættes 10% af dens volumen til en 4 mol/l KCl-opløsning. Efterfølgende tilsættes der 0,7 vol. (beregnet på eluatets volumen) isopropanol, og opløsningerne blandes og inkuberes i 5-10 minutter ved 25°C . Der centrifugeres i 30 minutter ved $\geq 20000 \times g$, hvorved plasmid-DNA'et forekommer i bundfaldet.

15 Til bundfaldet tilsættes 20 ml 70%'s ethanol, og der centrifugeres på ny i 10-15 minutter ved $\geq 20000 \times g$ ved 4°C .

Bundfaldet, der indeholder plasmid-DNA'et, resuspenderes i en TE-buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH $8,0 \pm 0,2$), og der indstilles til en plasmidkoncentration på 1 mg/ml. Endotoxinindholdet ligger typisk på mindre end 0,06 EU/mg DNA og mellem 0,01 og 0,06 EU/mg DNA.

Bestemmelsen af endotoxinindholdet sker ved tilsætning af den opløsning, der skal undersøges, til en Limulus-Amobozysten-Lysat-opløsning (LAL-opløsning).

25 Endotoxiner fører til geldannelse i denne blanding.

I negativkontrolansatserne må der ikke forekomme geldannelse, men i både positivkontrolansatserne og i testopløsningerne, som er tilsat to λ -kontrolstandardendotoxiner, skal der forekomme geldannelse.

30

Det første fortyndingstrin i opløsningen af det aktive stof, som opfylder disse kriterier, og hvor der ikke forekommer geldannelse, indsættes i nedenstående formel til beregning af endotoxinindholdet i opløsningen af det aktive stof:

35

$$E = V \times \lambda \text{ (EE/ml)}$$

E: Endotoxinindhold

V: Fortyndingsfaktor

λ : Lysatfølsomhed (EE/ml)

5 Eksempel 2

Plasmidfremstilling ifølge den kendte teknik

Plasmidfremstillingen sker analogt med Birnboim et al., Nucl. Acids Res. 7 (1979) 1513-1523 og Meth. Enzymol. 100 (1983) 243-255. Derefter lyses bakteriecellerne i NaOH/SDS i nærværelse af RNase. Der centrifugeres, og overstanden, som indeholder plasmid-DNA'et, videreforarbejdes. Overstanden sættes på en forækvilibreret Qiagen®-søjle.

15 Bakteriemassen resuspenderes i 4 ml buffer (100 μ g/ml RNase A, 50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA, pH 8,0). Der tilsættes 4 ml lysebuffer (200 mmol/l NaOH, 1% SDS), og der inkuberes ved stuetemperatur i 5 minutter. Efterfølgende tilsættes 4 ml neutralisationsbuffer (3 mol/l kaliumacetat, pH 5,5), og der inkuberes ved 4°C i 15 minutter. Ved samme temperatur centrifugeres der i 30 minutter ved
20 30000 x g, og overstanden videreforarbejdes. En Qiagen®-søjle ækvilibreres med 4 ml ækvilibreringsbuffer (750 mmol/l NaCl, 50 mmol/l MOPS, 15% ethanol, pH 7,0, 0,15% Triton® X 100), og overstanden sættes på søjlen. Der vaskes med 1 mol/l NaCl, 50 mmol/l MOPS, 15% ethanol, pH 7,0, og elueres med 5 ml elueringsbuffer (1,25 mol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-HCl, 15% ethanol, pH 8,5).

25

Eluatet fældes med isopropanol (0,7 vol.) og centrifugeres ved 15000 x g ved 4°C i 30 minutter. DNA-pelletten vaskes i 70% ethanol og centrifugeres endnu en gang. Efterfølgende resolubileres pelletten i 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0.

30

Endotoxinindholdet i et sådant plasmidpræparat udgør typisk 300-3000 EU/mg. Under anvendelse af en "endotoxin removal buffer" ifølge WO 95/21177 og Qiagen News 1/96, s. 3-5 kan endotoxinindholdet sænkes yderligere til ca. 100 EU/mg.

35

Referenceliste

- Ausubel, F.M., et al. red. (1991), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York
- 5 Birnboim, H.C. og Doly, J., Nucleic Acids Research 7 (1979) 1513-1523
Birnboim, H.C., et al., Meth. Enzymol. 100 (1983) 243-255
Chandra et al., Analyt. Biochem. 203 (1992) 169-172
Cotten et al., Gene Therapy 1 (1994) 239-246
Dion et al., J. Chrom. 535 (1990) 127-147
- 10 Europæisk patent EP-B 0 268 946
Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie und Kosmetik und angrenzende Gebiete (bind 9, 3. oplag, 1989, Editio Cantor, DE)
Garger et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 117 (1983) 835-842
Johnson & Ilan, Analyt. Biochem. 132 (1983) 20-25
- 15 McClung & Gonzales, Analyt. Biochem. 177 (1989) 378-382
Protein Purification Methods, Ed. by Elv. Harries and S. Angal, Oxford University Press 1989, 238-244.
QIAGEN NEWS 1/96, 3-5
QIAGEN Plasmid Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA)
- 20 Raymond et al., Analyt. Biochem. 173 (1988) 125-133
Sambrook, J., et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
WO 95/21177

PATENTKRAV

1. Præparat af et plasmid-DNA, der er replikerbart i gramnegative bakterier, med et proteinindhold på mindre end 0,1% og et endotoxinindhold på på 0,01 til 0,1 EU/mg DNA.
2. Præparat ifølge krav 1 fri for ethidiumbromid, phenol, cæciumchlorid, MOPS-buffersubstans og detergenter på basis af octylphenylpoly(ethylenglycolether)_n.
- 10 3. Farmaceutisk sammensætning indeholdende et replikerbart plasmid-DNA med et proteinindhold på mindre end 0,1% og et endotoxinindhold på 0,01 til 0,1 EU/mg DNA i en terapeutisk virksom mængde og eventuelt farmaceutiske hjælpe-, fyld- eller tilsætningsstoffer.
- 15 4. Fremgangsmåde til fremstilling af en nukleinsyre med et endotoxinindhold på mindre end 1 EU/mg, **kendetegnet ved, at** et plasmid, der indeholder nukleinsyren, replikeres i gramnegative bakterier, biomassen oplukkes, anionbytningskromatografi udføres, de opløselige bestanddele kromatograferes på hydroxylapatit, og den nævnte nukleinsyre isoleres.
- 20 5. Anvendelse af et replikerbart plasmid-DNA med et proteinindhold på mindre end 0,1% og et endotoxinindhold på 0,01 til 0,1 EU/mg til fremstilling af et lægemiddel til ex vivo- og/eller in vivo-genterapi.