



19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 195 112**

51 Int. Cl.<sup>7</sup>: C07H 1/08

A61K 48/00

C12N 15/10

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97901080.8**

86 Fecha de presentación: **24.01.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 880 536**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.1998**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de ácido nucleico purificado y su utilización.**

30 Prioridad: **06.02.1996 EP 96101628**

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, DE**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2003**

72 Inventor/es: **Kuhne, Wolfgang**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**01.12.2003**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Procedimiento para la preparación de ácido nucleico purificado y su utilización.

La presente invención hace referencia a la preparación de ácido nucleico purificado y su utilización, especialmente en la genoterapia.

La preparación de ácido nucleico replicable se lleva a cabo habitualmente mediante la multiplicación del plásmido-DNA capaz de replicarse en bacterias gramnegativas, como por ejemplo la E. Coli. Tras la disgregación de la biomasa (generalmente lisis alcalina, con lisozima o ultrasonidos) se centrifuga y el sobrenadante se agita con fenol. A continuación, se realiza una ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio. (Birnboim & Doly, Nucleic Acid Res. 7(1979) 1513-1523, Garger y cols., Biochem. Biophys.Res.Comm.117(1983) 835-842). Este tipo de preparados contienen sin embargo endotoxinas, fenol, cloruro de cesio y/o bromuro de etidio como colorante.

Otro método se ha descrito en QIAGEN® Plasmid Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) y en EP-B 0 268 946. Según este, tras la disgregación habitual el celisato obtenido en QIAGEN® -TIP, que contiene una resina QIAGEN® (un material soporte a base de gel de sílice), es cromatografiado. El inconveniente de este método es que las proteínas enlazadas al DNA no se disuelven por completo y por lo tanto la fracción plasmídica purificada contiene proteínas y especialmente endotoxinas (de la membrana de células huésped gramnegativas) en un ámbito considerable.

En otro método, tras la lisis alcalina de la E.coli-biomasa según Birnboim & Doly se realiza una cromatografía del sobrenadante de la centrifugación en unas condiciones altamente salinas sobre columnas de intercambio aniónico (por ejemplo, mono-Q, fuente Q de Pharmacia, Macro-prep-Q de BioRad, Poros-Q de Perseptive Biosystems o bien HyperD-Q de Biosepra, comparados con Chandra y cols., Analyt. Biochem. 203(1992)169-172; Dion y cols., J. Chrom. 535(1990)127-147). Aquí también la fracción de plásmido purificada contiene proteínas y en particular endotoxinas en un umbral considerable.

En otro método es posible tras la lisis alcalina y la posterior extracción a base de fenol/cloroformo realizar una cromatografía sobre la filtración del gel (McClung&Gonzales, Analyt.Biochem.177(1989) 378-382; Raymond y cols., Analyt. Biochem. 173(1988) 125-133). Incluso tras esta limpieza, la preparación de plásmido contiene impurezas, especialmente fenol.

En la WO 95/21177 y WO/95/21179 se ha descrito un método para el aislamiento y limpieza de ácidos nucleicos para su aplicación a la genoterapia, donde la limpieza se lleva a cabo básicamente mediante el centrifugado, filtrado, una cromatografía de afinidad o bien una cromatografía en un material de cromatografía inorgánico. Otro empobrecimiento de endotoxinas puede conseguirse entonces según la WO 95/21177, cuando en un proceso de limpieza el ácido nucleico se trata con un "tampón de eliminación de endotoxinas" que contiene un 10% de Triton® X 100 y 40 mmol/l de tampón MOPS (tampón de 3-

morfolino-1-propanosulfonato) o bien 50 mmol/l de tampón MOPS (WO 95/21179). Un inconveniente de este método es que de esta forma el ácido nucleico purificado contiene impurezas de Triton® y tampón MOPS. Mediante este método puede ciertamente conseguirse un empobrecimiento de las endotoxinas del orden de unos 100 EU/mg de DNA (Qiagen News 1/96, 3-5) o bien según la WO 95/21179 de 10-17 EU/mg de DNA, no obstante no es posible otra nueva eliminación de endotoxinas.

Para una aplicación terapéutica, como por ejemplo la prevista para la genoterapia, se necesita sin embargo una preparación de ácido nucleico, que a ser posible esté libre de toda impureza (especialmente libre de endotoxinas). Sobre todo, el contenido en endotoxinas de las preparaciones de plásmido es actualmente un problema no resuelto, como ha descrito por ejemplo Cotten y cols., Gene Therapie 1(1994) 239-246. Un contenido reducido en endotoxinas (aprox. 100 EU/mg de DNA) puede conseguirse según la tecnología actual, como por ejemplo según la WO 95/21177, únicamente, cuando los ácidos nucleicos se tratan con detergentes no iónicos, como por ejemplo el Triton (Tampón eliminador de endotoxinas de WO 95/21177). El Triton® tiene sin embargo un efecto biológico, como por ejemplo, alteraciones pulmonares o descenso de la tensión arterial (Fiedler, Lexicon der Hilfsstoffe für Pharmazie und Kosmetik und angrenzende Gebiete (Tomo 9, 3ª edición, 1989, Editio Cantor, DE)). El tampón MOPS requerido además contiene asimismo una sustancia problemática desde el punto de vista de una aplicación terapéutica.

Mediante la invención se elabora una preparación, un plásmido-DNA de elevada pureza, en la cual se empobrecen las endotoxinas, preferiblemente sin bromuro de etidio, fenol, cloruro de cesio, polimixina o detergentes no iónicos, así como un método sencillo y eficaz para la purificación de dichos ácidos nucleicos, en particular para el empobrecimiento en endotoxinas.

El objeto de la invención es un plásmido-DNA replicable en bacterias gramnegativas, con un contenido inferior al 1% de proteínas, preferiblemente menor al 0,1% de proteínas y un contenido inferior a 1 EU/mg de DNA, preferiblemente de 0,01 a 0,1 BU/mg de DNA en endotoxinas. Este plásmido-DNA, preferiblemente, estará libre de bromuro de etidio, fenol y cloruro de cesio, de detergentes a base de octilfenolpoli(etilenglicol)ter<sub>n</sub>, como por ejemplo detergentes de Triton®, así como libre de sustancia tampón MOPS y de RNasa.

Por amplificación se entiende el aumento del número de copias de un ácido nucleico (especialmente de DNA y de plásmido-DNA) en base a la replicación de un vector. Por lo que a partir de un molde se fabrican una multitud de copias. Se replica un vector, que representa al ácido nucleico, o bien contiene el ácido nucleico clonado.

Por plásmido-DNA se entiende una molécula duplex de DNA extracromosomal que habitualmente posee 1 hasta más de 200 kb y se presenta en las células huésped en una hasta cientos de copias. Los plásmidos frecuentemente se utili-

zan para la construcción de vectores de clonación, para la transfección de células procarióticas y eucarióticas. Un aplicación terapéutica importante está relacionada con la genoterapia in vivo y ex vivo. La molécula plásmido-DNA puede cerrarse en forma lineal o circular. Se emplea preferiblemente un DNA de cierre circular.

Otro objetivo de la invención es una composición farmacéutica que contenga una molécula de plásmido-DNA conforme a la invención en una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico, y si es preciso aditivos o material de relleno farmacéuticos adicionales.

Las endotoxinas son lipopolisacáridos a base de bacterias gramnegativas. Las endotoxinas pueden actuar en chupadores como pirógenos e inducir un choque endotóxico. Los componentes básicamente tóxicos de las endotoxinas son los lípidos A, donde la parte de polisacárido interviene en la solubilidad del agua y la parte lipídica actúa tóxicamente. El efecto biológico de las endotoxinas en chupadores son especialmente una hipersensibilización así como otras reacciones, que van acompañadas de fiebre.

El plásmido-DNA se amplifica conforme al método estándar en *E. Coli*, una bacteria gramnegativa. Tras la fermentación, la biomasa obtenida se disgrega y se destruyen las células. Se liberan con ello las endotoxinas de la membrana celular. Esto significa que, tras la amplificación del ácido nucleico preparado conforme a la invención, especialmente del plásmido-DNA, en bacterias gramnegativas y especialmente en *E.coli*, se requiere un empobrecimiento de endotoxinas cuando esta molécula de plásmido-DNA debe emplearse terapéuticamente.

Para una aplicación terapéutica de los ácidos nucleicos replicables preparados conforme a la invención, especialmente el plásmido-DNA, se emplean dosis de 50  $\mu\text{g}$  hasta de 10 mg y superiores. La cantidad de la dosis depende de la enfermedad y del tipo de aplicación. En un aerosol, por ejemplo, para el tratamiento de la fibrosis quística, se emplearán dosis de 400  $\mu\text{g}$  y superiores. Lo mismo sirve para el plásmido-DNA encapsulado en un complejo lipídico (p.ej. en liposomas). Para poder disponer de cantidades de este tipo será preciso preparar el ácido nucleico replicable a gran escala. Para ello, se necesitan lotes de fermentación con 1-5kg de biomasa, donde puedan aislarse 1-5 g de ácido nucleico.

El objetivo de la invención es asimismo un proceso para la preparación de ácido nucleico, preferiblemente de un plásmido-DNA, con un contenido inferior a 1 EU/mg DNA, preferiblemente 0,01-0,1 EU/mg DNA de endotoxinas, que se caracterice por que el plásmido-DNA se multiplique en bacterias gramnegativas como la *E.coli*, la biomasa se disgregue y los componentes solubles sean cromatografiados en hidroxilapatita y seguidamente se aisle el mencionado plásmido-DNA. Preferiblemente, antes de la cromatografía en hidroxilapatita se realiza una cromatografía de intercambio aniónico, con la cual básicamente se separan el RNA y las proteínas extrañas. Asimismo pueden eliminarse otras impurezas y se consigue un contenido en ácido nucleico inferior a un 1% de proteínas, preferiblemente menor a

un 0,1% de proteínas, libre de bromuro de etidio, fenol y cloruro de cesio. Dicha preparación está libre preferiblemente de detergentes a base de octilfenolpoli(etilenglicoleter)<sub>n</sub> y de sustancia tampón MOPS.

Mediante el proceso conforme a la invención se pueden evitar o eliminar una multitud de impurezas que contiene el plásmido-DNA. Lo que se consigue sorprendentemente y de una forma simple es reducir dramáticamente el contenido en endotoxinas.

En un proceso conforme a la invención se consigue un empobrecimiento importante de endotoxinas a través de la cromatografía con hidroxilapatita. Esto es tan sorprendente ya que la cromatografía en hidroxilapatita únicamente se emplea en la literatura para la separación de DNA y RNA (Johnson & Allan, *Analyt. Biochem.* 132(1983) 20-25).

La acción cromatográfica de la hidroxilapatita se basa esencialmente en la interacción entre los grupos de calcio 2+ y la carga negativa del ácido nucleico que se va a purificar y en un grado menor en la interacción del ácido nucleico que va a purificarse con los grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  en la superficie de la hidroxilapatita cristalina (vease por ejemplo, *Protein Purification Methods*, Ed. By Elv. Harries y S. Angal, Oxford University Press 1989, 238-244). Básicamente, la cromatografía en hidroxilapatita para ácidos nucleicos puede conceputarse como un paso de intercambio de aniones, donde la DNA enlazada puede ser eluida no por un aumento simple de la fuerza iónica (por ejemplo, NaCl) sino por un incremento de la concentración, preferiblemente de fosfato o de citrato, de iones metálicos bivalentes y/o de EDTA, de la matriz de hidroxilapatita.

En un proceso conforme a la invención, se enlazan en la cromatografía en hidroxilapatita (por ejemplo, HA-ceramic, bio-gel HPHT, bio gel HT/HTP de Biorad DE, HA-ultrogel de IBF ó HA esferoidal de BDH, Macrosorb C de Sterling Organics) inicialmente endotoxinas y el ácido nucleico que va a purificarse por las interacciones dipolo-dipolo en hidroxilapatita. El equilibrio se produce habitualmente a pH neutro en tampón fosfato. Preferiblemente se añade un medio desnaturante en el posterior lavado de la columna. Sorprendentemente, es posible desplazar con iones fosfato, citrato o calcio, el ácido nucleico de su enlace en hidroxilapatita, mientras las endotoxinas permanecen enlazadas. El desplazamiento del ácido nucleico de su enlace en hidroxilapatita, puede realizarse, en lugar de a través de iones de calcio, a través de otros iones metálicos bivalentes que pueden sustituir al calcio en la apatita, como por ejemplo, el Mg, Fe, Mn. Para la elución la concentración de iones es preferiblemente de 100 mmol/l o más. Se prefieren especialmente concentraciones de iones entre 100 y 500 mmol/l o bien 200 y 500 mmol/l. Se prefiere utilizar especialmente una solución que contenga iones fosfato (por ejemplo, tampón fosfato). Antes de la elución (sin medio desnaturante) se lava convenientemente (con un medio desnaturante). Se ha comprobado que resulta preferible si se emplea una solución de fosfato o de sulfato (100-200 mmol/l) el añadir un medio desnatura-

lizante (por ejemplo, urea o hidrocloreuro de guanidina) en una concentración desnaturizante de DNA (por ejemplo, 6 mol/l de urea).

En una forma de ejecución preferida se lleva a cabo además una ultrafiltración después de la cromatografía en hidroxilapatita.

Para la fabricación conforme a la invención de los ácidos nucleicos se amplifican los plásmidos, que contienen o presentan ácidos nucleicos, normalmente en cultivos de bacterias gramnegativas. Estos métodos son conocidos por el experto y por ejemplo, se han descrito por J. Sambrook y cols. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press y por F.M. Ausubel y cols. Eds (1991) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York. Para ello los cultivos de bacterias, que contienen plásmidos, son subcultivados inicialmente y seguidamente se cultivan en un medio adecuado, si se requiere añadiendo un medio de selección.

La disgregación de la biomasa se realiza asimismo según el método indicado por el experto (disgregación mecánica o enzimática, ver por ejemplo, Birnboim y Doly, *Nucleic Acids Research* 7(1979) 1513-1523), sin adición de RNasa. Agitando con fenol puede evitarse cuando la separación proteínica se realiza a través de la cromatografía de intercambio aniónico. Tras la disgregación y separación de componentes no solubles, preferiblemente a través de la centrifugación y filtración por medio de un cartucho de filtro (poros de 5  $\mu\text{m}$ ), se cromatografía el sobrenadante celular preferiblemente para la separación de proteínas en un intercambiador de aniones. Como intercambiador de aniones son apropiados los intercambiadores aniónicos a base de agarosa, como por ejemplo, la Q-sepharose. Otros intercambiadores de aniones apropiados se basan en el polimetacrilato (Macroprep/ Bio-Rad-Alemania), poliestirol/divinilbenzol (Poros/Perseptive, HyperD/Biosepra, Source/Pharmacia) o bien gel de sílice, en cuya superficie se enlazan grupos de dietilaminoetilo (DEAE) o dimetilaminoetilo (DMAE).

Para optimizar el efecto de purificación, se eluye el ácido nucleico por medio de un gradiente elevado salino, por ejemplo, gradiente de NaCl (preferiblemente 0,65 mol/l-0,85 mol/l) en tampón TE. Con ello es posible, sorprendentemente, separar en una sola etapa una multitud de impurezas (RNA, proteínas).

Asimismo, es preferible que tras la cromatografía en hidroxilapatita se realice una precipitación en isopropanol/etanol para minimizar la carga de gérmenes así como para desalinizar. A continuación, el ácido nucleico preparado conforme a la invención puede ser envasado en un proceso estéril.

Los ejemplos siguientes describen la invención: Ejemplo 1

*Obtención de ácido nucleico de la biomasa de E. coli*

La biomasa de E.coli que contiene el plásmido-DNA se disgrega mediante una lisis alcalina y el plásmido-DNA liberado es cromatografiado sobre Q-sepharose y HA-ceramic. La sustancia eluida sufre un proceso de desalinización y concentración

mediante una precipitación en isopropanol/etanol y el sedimento de plásmido-DNA se suspende en tampón TE.

Suspensión tampón: 50 mmol/l de Tris/HCl, 10 mmol/l de EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 8,0 $\pm$ 0,2

Tampón de acetato potásico: 3 mol/l de tampón de acetato potásico pH 5,5

60 g de biomasa (húmeda, E.coli) se colocan en una cubeta de centrifuga despirogenizada. Se añaden 750 ml de suspensión tampón y se centrifuga lentamente durante como mínimo 24 horas a 5 $\pm$ 4°C (aprox. 35 RPM), hasta que la biomasa está totalmente suspendida. Para ello se incrementa lentamente la temperatura de la suspensión hasta 25°C.

A la suspensión se añaden 750 ml de NaOH 0,2 ml/l /SDS al 1%, en agitación, con aprox. 80 RPM y se incuba durante 5 minutos a 25°C. Se añaden 750 ml de tampón de acetato potásico (ver antes) agitando y la temperatura de la biomasa se reduce rápidamente a ser posible a 4°C.

La biomasa se centrifuga durante 30 minutos a 26000 xg y 4°C. El sobrenadante que contiene plásmido-DNA se decanta y se filtra a través de un cartucho de filtro de 5  $\mu\text{m}$ .

*Cromatografía en Q-sepharose ff*

Tampón TE: 10 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH 8,0  $\pm$  0,2

Equilibrador/Tampón de lavado = Tampón gradiente A: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l de EDTA, 0,65 mol/l NaCl pH 8,0 $\pm$ 2

Tampón gradiente B: 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l de EDTA, 0,85 mol/l NaCl pH 8,0 $\pm$ 0,2

Al residuo de la centrifuga decantado se añaden unos 350 ml de tampón TE/l de sobrenadante de centrifugación a una conductividad de 49-50 mS/cm y se enfría a 5 $\pm$ 4°C. La cromatografía completa se lleva a cabo a esta temperatura. El sobrenadante de la centrifugación asciende en un volumen de 5-8 columnas (SV)/hora en la columna equilibrada. Seguidamente, se lava la columna a una velocidad de flujo de 5-8SV/hora con aproximadamente 8 SV 10 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol de EDTA, 0,65 mol/l de NaCl pH 8,0  $\pm$ 0,2.

*Elución*

En la columna se fija un gradiente (5 SV tampón A, 5 SV tampón B) y la sustancia eluida se fracciona a una velocidad de flujo de 5-8 SV/hora. La detección se realiza a 254 nm. El pico anterior (impurezas) se separa del pico principal (plásmido-DNA). El contenido en endotoxinas de la sustancia eluida se sitúa entre 1200 y 12000 EU/mg de plásmido/DNA.

*Cromatografía en hidroxilapatita (HA ceramic)*

La cromatografía se realiza a 5  $\pm$  4°C.

Tampón de equilibrio: 0,1 mol/l de fosfato potásico, 6 mol/l de urea pH 7,0  $\pm$  0,2

Tampón de lavado 1: 0,15 mol/l de fosfato potásico, 6 mol/l de urea pH 7,0 $\pm$  0,2

Tampón de lavado 2: 0,02 mol/l de tampón de fosfato potásico, 6 mol/l de urea pH 7,0 $\pm$  0,2

Tampón de elución: 0,5 mol/l de fosfato potásico pH 7,0 $\pm$  0,2

La detección se realiza a 254 nm con un detector UV/unidad de registro. Como solución patrón se emplea una solución del producto al 1% (plásmido-DNA), se mide con un fotómetro

calibrado.

El Q-Sepharose® -Pool se lleva a una concentración final de 1,1 mmol/l de cloruro de calcio y se coloca en la columna equilibrada a una velocidad de flujo de 5-8 SV/hora.

A continuación, la columna se lava a una velocidad de flujo de 5-8 SV/hora con:

- 1) 0,1 mol/l de fosfato potásico, 6 mol/l urea pH 7,0± 0,2 hasta que en el detector no se detecta ninguna absorción,
- 2) 2-4 SV, 0,15 mol/l de fosfato potásico, 6 mol/l urea pH 7,0± 0,2
- 3) 5 SV, 0,02 mol/l de fosfato potásico pH 7,0± 0,2

Seguidamente a la etapa de lavado, se eluye con 0,5 mol/l de tampón de fosfato potásico pH 7,0± 0,1 a una velocidad de flujo de 5-6 SV/hora.

El pico se concentra, se atempera a 25°C y se añade con un 10% de su volumen a una solución de KCl de 4 mol/l. Seguidamente, se mezcla con 0,7 partes en volumen (respecto al volumen de la sustancia eluida) de isopropanol, las soluciones se mezclan y se incuban a 25°C durante 5-10 minutos. Se centrifuga durante 30 minutos a >20000 xg, y el plásmido-DNA se queda en el sedimento.

El sedimento se mezcla con 20 ml de etanol al 70% y se centrifuga durante 10-15 minutos a >20000 xg a 4°C.

El sedimento, que contiene el plásmido-DNA se suspende en tampón TE (10 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol/l de EDTA pH 8,0± 0,2) y se ajusta una concentración de plásmido de 1 mg/ml. El contenido en endotoxinas es típicamente inferior a 0,06 EU/mg DNA y entre 0,01 y 0,06 EU/mg DNA.

La determinación del contenido en endotoxina se realiza mediante la adición de la solución a investigar a una solución de Limulus-Amebocitos-lisado (solución LAL). En esta mezcla las endotoxinas tienden a formar un gel.

En los preparados de control negativo no se produce la formación del gel, y en las pruebas de control positivo así como en las soluciones problema, junto con dos estándares de control λ de endotoxina, debe producirse la formación de gel.

La primera etapa de dilución de la solución de sustancia activa, para la cual se confirman estos criterios, y en la que no se produce formación de gel, se emplea la fórmula siguiente para el cálculo del contenido en endotoxina:

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

E: contenido en endotoxina

V: factor de dilución

λ: sensibilidad del lisado (EE/ml)

Ejemplo 2

*Preparación del plásmido según la técnica actual*

La preparación de plásmido se lleva a cabo según Birnboim y cols., Nucl. Acid. Res. 7 (1979) 1513-1523 y Meth. Enzymol. 100 (1983) 243-255. Después, se destruyen las células bacterianas en NaOH/SDS, en presencia de RNasa. Se centrifuga y el sobrenadante que contiene plásmido-DNA, se trata de nuevo. El sobrenadante se carga en una columna previamente equilibrada Qiagen®.

La masa bacteriana se suspende en 4 ml de solución tampón (100 μg/ml RNasa A, 50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA, pH 8,0). Se añaden 4 ml de tampón de lisis (200 mmol/l de NaOH 1%) y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añaden 4 ml de tampón de neutralización (3 mol/l de acetato potásico, pH 5,5) y se incuban a 4°C durante 15 minutos. A la misma temperatura se centrifuga durante 30 minutos a 30000xg y se trata el sobrenadante. Una columna Qiagen® se equilibra con 4 ml de tampón de equilibrio (750 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l MOPS, 15% de etanol, pH 7,0, 0,15% de Triton® X 100) y se añade el sobrenadante a la columna. Se lava con 1 mol/l de NaCl, 50 mmol/l de MOPS, 15% de etanol, pH 7,0 y se eluye con 5 ml de tampón de elución (1,25 mol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris-HCl, 15% de etanol, pH 8,5).

La sustancia eluida se precipita con isopropanol (0,7 Vol) y se centrifuga a 15000xg a 4°C durante 30 minutos. El sedimento de DNA se lava en un 70% de etanol y se centrifuga de nuevo. A continuación, se solubiliza el sedimento en 10 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol/l de EDTA, pH 8,0.

El contenido en endotoxina de dicha preparación de plásmido es habitualmente de 300-3000 EU/mg. Utilizando un "tampón de eliminación de endotoxina" según la WO 95/21177 y Qiagen News 1/96, pág 3-5, puede reducirse el contenido en endotoxinas hasta aproximadamente 100 EU/mg.

#### Listado de referencias

- Ausubel, F.M., et al. eds. (1991), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York
- Birnboim, H.C. und 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
- Europäisches Patent EP-B 0 268 946
- Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie und Kosmetik und angrenzende Gebiete (Band 9, 3. Auflage, 1989, Editio Cantor, DE)
- Garger et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 117 (1983) 835-842
- Johnson & Ilan, Analyt. Biochem. 132 (1983) 20-25
- 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)
- 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

### REIVINDICACIONES

1. Preparación de un plásmido DNA que es capaz de replicarse en bacterias gramnegativas que tiene un contenido en proteínas inferior al 0,1% y un contenido en endotoxinas inferior a 1 EU/mg DNA

2. Preparación conforme a la reivindicación 1 con un contenido de 0,01 hasta 0,1 EU/mg DNA en endotoxinas.

3. Preparación conforme a la reivindicación 1 ó 2, libre de bromuro de etidio, fenol, cloruro de cesio, sustancia tampón MOPS y detergentes a base de octilfenolpoli(etilenglicoléter)<sub>n</sub>.

4. Composición farmacéutica que contiene un plásmido DNA replicable con un contenido inferior al 0,1% en proteínas así como con un contenido inferior a 1 EU/mg DNA de endotoxinas en una cantidad eficaz terapéutica y opcionalmen-

te sustancias auxiliares farmacéuticas, aditivos o rellenos.

5. Composición farmacéutica conforme a la reivindicación 4, que se **caracteriza** por un contenido del 0,01 hasta 0,1 EU/mg DNA de endotoxinas.

6. Proceso para fabricar un ácido nucleico que tenga un contenido en endotoxinas inferior a 1 EU/mg, que se **caracterice** porque un plásmido que contiene el ácido nucleico se replica en bacterias gramnegativas, la biomasa se destruye y los componentes solubles son cromatografiados en hidroxilapatita y dicho ácido nucleico es aislado.

7. Uso de un plásmido DNA replicable que tiene un contenido en proteínas inferior al 0,1% y un contenido en endotoxinas inferior a 1 EU/mg para fabricar un fármaco para la genoterapia ex vivo e in vivo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---