



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 13 317 T2 2005.09.08**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 230 648 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 13 317.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB00/02545**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 942 248.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/003149**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.09.2005**

(51) Int Cl.7: **H01F 1/11**
H01F 1/44, C12N 15/10

(30) Unionspriorität:
9915398 02.07.1999 GB

(73) Patentinhaber:
**DNA Research Innovations Ltd., Sittingbourne,
Kent, GB**

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**BAKER, John, Matthew, Maidstone, Kent ME16
8DN, GB**

(54) Bezeichnung: **MAGNETTEILCHEN-ZUSAMMENSTELLUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Magnet- und Paramagneteilchen, die beim Abtrennen von Biomolekülen oder Verbindungen aus Volumina im Labormaßstab oder Industriemaßstab verwendet werden können.

[0002] Zum Abtrennen von Biomolekülen, wie beispielsweise Nucleinsäuren, aus Gemischen, die sie enthalten, ist die Verwendung von Magneteilchen bekannt, die mit einer Beschichtung überzogen sind, die an dem abzutrennenden Biomolekül haftet. Die Teilchen werden dann zum Gemisch zugesetzt, und die an den Biomolekülen haftenden Teilchen können mithilfe eines Magnetfelds abgetrennt werden.

[0003] Die Magneteilchen oder -kügelchen müssen eine Größe aufweisen, die es ihnen ermöglicht, in den verwendeten Flüssigkeiten in Suspension zu bleiben. Wenn sie jedoch zu klein sind oder Feinstpartikel oder ähnliche Teilchen enthalten, können sie suspendiert bleiben und zum Abtrennen zu langsam sein.

[0004] Bekannte Verfahren zur Herstellung von Magnet- oder Paramagneteilchen umfassen:

- 1) Die Einführung von Magnetit (Eisenoxid, Fe_3O_4) in poröse Agarose oder Cellulose, gefolgt von Mahlen oder Sieben, um einen Teilchendurchmesserbereich von üblicherweise 1 bis 10 μm zu erhalten.
- 2) Die Einführung von Magnetit in Silica, gefolgt von Mahlen oder Sieben, um einen Teilchendurchmesserbereich von üblicherweise 1 bis 10 μm zu erhalten.
- 3) Die Herstellung von Magnetit (kleiner als 10 μm) durch Fällung von Eisensalzen, gefolgt von einer Beschichtung der Oberfläche mit einem Silan oder einer anderen funktionellen Gruppe.
- 4) Die Beschichtung von monodispersen Polystyrolkügelchen (kleiner als 10 μm) mit submikronischem Eisenoxid, gefolgt von einer weiteren Beschichtung aus Polystyrol mit oder ohne funktionelle(n) Gruppen.
- 5) Die interne Fällung von Eisenoxid in monodisperse Polystyrolkügelchen (kleiner als 10 μm), gefolgt von einer Oberflächenbeschichtung mit funktionellen Gruppen.

[0005] Typischerweise weisen Magnetkügelchen einen Durchmesser von weniger als 10 μm auf, weil sonst ihre Sedimentationsgeschwindigkeiten unter Schwerkraft zu hoch sind, um sie leicht zu handhaben, und die Oberfläche zu klein ist, um eine gewünschte Menge des Zielmoleküls zu binden. Einige größere Kügelchen, wie beispielsweise Agarose-Magnetit, können bis zu 100 μm groß sein, aber sie müssen sehr porös sein, um Zielmoleküle intern zu binden, und werden unter Schwerkraft äußerst rasch ab-

getrennt.

[0006] Die Patente US 4.695.392 und US 5.091.206, WO 96/18731 und EP 515484B1 offenbaren Verfahren zur Herstellung und Verwendung solcher Magneteilchen.

[0007] Die DE 19624426A offenbart geschichtete Magneteilchen zur Verabreichung an Patienten, um Tumoren zu diagnostizieren oder zu behandeln. Die Teilchen weisen Durchmesser zwischen 200 und 500 nm auf.

[0008] Der Erfinder hat verbesserte Magneteilchen und ein Verfahren zur deren Herstellung entwickelt.

[0009] Gemäß vorliegender Erfindung wird eine Magneteilchenzusammensetzung bereitgestellt, die ein magnetisches Material umfasst, das mit negativ geladenen Ionenaustauschern, wie in Anspruch 1 definiert ist, kombiniert ist.

[0010] Die Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zur Herstellung einer Magneteilchenzusammensetzung bereit, wobei das Verfahren das Kontaktieren eines magnetischen Materials mit einem negativ geladenen Ionenaustauscher, wie in Anspruch 13 definiert ist, umfasst.

[0011] Das magnetische Material weist vorzugsweise einen Durchmesser von weniger als 10 μm und noch bevorzugter 5 μm oder weniger auf.

[0012] Das magnetische Material kann ein beliebiges der herkömmlicherweise verwendeten magnetischen Materialien sein, wie beispielsweise Magnetit, Eisenoxide, Übergangsmetalloxide oder jedes ferro- oder paramagnetische Material.

[0013] Der Ionenaustauscher kann porös oder nicht porös sein, und Ionenaustauscher, die verwendet werden können, umfassen Polymethacrylatcarboxy-Ionenaustauscher, mit einer negativen Ladung überzogene Silicateilchen, Cellulose oder Agarose mit Phosphat- oder Sulfatgruppen oder einer beliebigen negativ geladenen Spezies.

[0014] Der Ionenaustauscher kann direkt an das magnetische Material gebunden werden, beispielsweise durch Ladung alleine oder mithilfe eines Bindemittels, wie z.B. polymerisierter Acrylsäure, oder eines beliebigen Mittels, das eine Beschichtung oder einen Oberflächenüberzug zur Unterstützung der Kohäsion der Materialien bildet. Das Teilchen kann mit funktionellen Gruppen wie Carboxy, Amino, Imidazol usw. weiter derivatisiert werden.

[0015] Die Zusammensetzung kann leicht hergestellt werden, indem die Komponenten in Pulverform vermischt werden oder in wässrigen oder nichtwäss-

rigen Lösungen mit oder ohne das Bindemittel vorge-mischt werden.

[0016] Die Zusammensetzungen der Erfindung, d.h. das mit dem Ionenaustauscher kombinierte magnetische Material, weisen vorzugsweise einen Durchmesser zwischen 20 µm und 1 mm, noch bevorzugter 20 und 150 µm, auf.

[0017] Das Verhältnis zwischen magnetischem Material und Ionenaustauscher ist nicht entscheidend und kann gemäß der Anwendung variiert werden, wobei typische Verhältnisse von 5 bis 50 Gew.-% Eisenoxid betragen.

[0018] Eine Suspension der Teilchenzusammensetzung gemäß vorliegender Erfindung in einer Flüssigkeit, die das abzutrennende Material enthält, kann vorzugsweise durch herkömmliche Flüssigkeitshandhabung und Abgabesysteme leicht gehandhabt werden.

[0019] Ein Merkmal der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass die Teilchenzusammensetzungen eine raschere magnetische Abtrennung oder Sedimentation unter Schwerkraft in größeren Volumina ermöglichen, ohne dass restliche Feinstpartikel oder Teilchen suspendiert bleiben. Die größeren Teilchen, mit beispielsweise 20 bis 150 µm, verbleiben im Vergleich zu anderen Magnetkügelchen mit ähnlicher Größe, die aus anderen Materialien hergestellt wurden, länger suspendiert, wodurch eine effektive Misch- und Bindungskinetik erhalten wird.

[0020] Die Teilchen können für die Abgabe unter minimalem Rühren suspendiert gehalten werden und können vorzugsweise auch durch herkömmliche Pipettenspitzen fließen.

[0021] Die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um Biomoleküle aus Gemischen abzutrennen, die sie enthalten, beispielsweise können sie verwendet werden, um Nucleinsäuren abzutrennen und Lösungen oder Suspensionen zu reinigen, indem Verunreinigungen wie Zelltrümmer usw. entfernt werden.

[0022] Wenn die Zusammensetzungen zum Abtrennen von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit verwendet werden sollen, welche die Biomoleküle enthält, wird die Teilchenzusammensetzung mit einem Bindemittel für die Biomoleküle kontaktiert, beispielsweise können biotinylierte Biomoleküle unter Verwendung von mit Streptavidin beschichteten Magnetteilchen isoliert werden.

[0023] Die Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus Gemischen, die sie enthalten, wie in Anspruch 25 definiert bereit, wobei das Verfahren das Kontaktieren einer flüssigen

Suspension der Biomoleküle mit der oben beschriebenen Magnetteilchenzusammensetzung, um eine Suspension der Magnetteilchenzusammensetzung herzustellen, in der die Teilchenzusammensetzung an die Biomoleküle bindet, sowie das Anlegen eines Magnetfeldes an die Suspension umfasst, um die Magnetteilchen mit den daran gebundenen Biomolekülen abzutrennen.

[0024] Die Biomoleküle können mithilfe herkömmlicher Mittel von den Magnetteilchen abgetrennt werden.

[0025] Das Verfahren kann verwendet werden, um Zelltrümmer oder unlösliches Material ohne Zentrifugation oder Filtration zu entfernen.

[0026] Beim Entfernen von Zelltrümmern aus einer Mikroben-, Plasmid- oder Pflanzen-DNA-Extraktion können die Teilchen beispielsweise verwendet werden, um rasch ungewünschte Verunreinigungssubstanzen zu entfernen, wobei die Ziel-DNA in Lösung verbleibt.

[0027] Nachstehend wird die Erfindung anhand von Beispielen weiter erläutert.

Beispiel 1

[0028] 6 g eines körnigen, porösen Polymethacrylatcarboxy-Ionenaustauschers (100 – 500 Mesh) wurden mit 2 g Magnetit (Fe_3O_4) mit einem Durchmesser von 5 µm oder weniger vermischt. Dieses Material wurde dann in 2% Tween 20 mit 1 M Natriumchlorid gewaschen und verwendet, um beispielsweise DNA wie folgt aus Blut zu extrahieren: 100 mg der oben beschriebenen Magnetkügelchen wurden mit 1 ml Vollblut vermischt, das vorher in 10 mM Ammoniumbicarbonat, 1% Tween 20, pH 9, verdünnt worden war. Die gebundene DNA wurde mit Wasser von Verunreinigungen befreit und unter Verwendung von 10 mM Tris pH 9 bei 80°C eluiert.

Beispiel 2

[0029] 6 g eines körnigen, porösen Polymethacrylatcarboxy-Ionenaustauschers (100 – 500 Mesh) wurden mit 2 g Magnetit (Fe_3O_4) mit einem Durchmesser von weniger als 5 µm vermischt. Dieses Material wurde dann mit 50 ml 2 Vol.-% Acrylsäure, 2% Ammoniumpersulfat vermischt und 30 min lang auf 70°C erhitzt. Dieses Material wurde dann in Reinigungsmitteln und Salzen gewaschen und verwendet, um DNA wie oben beschrieben aus Blut zu extrahieren.

Beispiel 3

[0030] 6 g eines körnigen, porösen Polymethacrylatcarboxy-Ionenaustauschers (100 – 500 Me-

sh) wurden mit 2 g Magnetit (Fe_3O_4 mit einem Durchmesser von weniger als 5 μm) vermischt. Dieses Material wurde dann mit 50 ml 2 Vol.-% Acrylsäure, 2% Ammoniumpersulfat plus 0,02% Divinylbenzol vermischt und 30 min lang auf 70°C erhitzt.

Beispiel 4

[0031] Eine Übernachtskultur von E. coli wurde hergestellt, die eine hohe Kopienanzahl von Plasmid enthielt. 1 ml dieser Kultur wurde mit 1% SDS auf 0,1 M NaOH eingestellt und 5 min lang leicht gerührt. Dann wurden die Magnetteilchen wie in Beispiel 1 beschrieben zugesetzt, und die Suspension wurde auf 1 M Kaliumacetat pH 5,5 eingestellt. Nach der magnetischen Abtrennung wurden alle unlöslichen Trümmer in weniger als 1 min entfernt, und ein geklärter Überstand blieb übrig, der für weitere Bearbeitung fertige Plasmid-DNA enthielt.

Patentansprüche

1. Magnetteilchenzusammensetzung, die aus magnetischem Material und einem negativ geladenen Ionenaustauscher besteht, worin die Teilchen einen Durchmesser zwischen 20 μm und 1 mm aufweisen und die Zusammensetzung durch Vermischen eines Pulvers eines magnetischen Materials mit einem Pulver aus einem negativ geladenen Ionenaustauscher hergestellt ist.

2. Magnetteilchenzusammensetzung nach Anspruch 1, worin die Teilchen einen Durchmesser zwischen 20 und 150 μm aufweisen.

3. Magnetteilchenzusammensetzung nach Anspruch 1, worin das Vermischen in Gegenwart eines Bindemittels erfolgt.

4. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das magnetische Material ein Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 10 μm ist.

5. Magnetteilchenzusammensetzung nach Anspruch 4, worin das magnetische Material ein Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 5 μm ist.

6. Magnetteilchenzusammensetzung nach Anspruch 5, worin das magnetische Material ein Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 1 μm ist.

7. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Ionenaustauscher nicht porös ist.

8. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Ionenaustauscher ein Polymethacrylatcarboxy-Ionenaustauscher ist.

9. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der Ionenaustauscher direkt an das magnetische Material gebunden ist.

10. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Teilchen in Gegenwart eines Bindemittels gebildet werden.

11. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Bindemittel ein Monomer oder ein Polymer von Acrylsäure, ein Acrolein, ein Amin, ein Amid, ein Alkohol, ein Aldehyd, eine organische Säure, ein Imidazol, ein Phosphat oder ein sekundäres, tertiäres oder quaternäres Amin oder Sulfat ist.

12. Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Verhältnis zwischen magnetischem Material und Ionenaustauscher 0,05 bis 0,2 beträgt.

13. Verfahren zur Herstellung einer Magnetteilchenzusammensetzung, die aus magnetischem Material und einem negativ geladenen Ionenaustauscher besteht, worin die Teilchen einen Durchmesser zwischen 20 μm und 1 mm aufweisen, wobei das Verfahren das Vermischen eines Pulvers eines magnetischen Materials mit einem Pulver aus einem negativ geladenen Ionenaustauscher umfasst, um so die Magnetteilchenzusammensetzung herzustellen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Teilchen einen Durchmesser zwischen 20 und 150 μm aufweisen.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, worin das Vermischen in Gegenwart eines Bindemittels erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, worin das magnetische Material ein Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 10 μm ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, worin das magnetische Material ein Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 5 μm ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, worin das magnetische Material ein Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 1 μm ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, worin der Ionenaustauscher nicht porös ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, worin der Ionenaustauscher ein Polymethacrylatcarboxy-Ionenaustauscher ist.

19, worin der Ionenaustauscher ein Polymethacrylat-carboxy-Ionenaustauscher ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, worin der Ionenaustauscher direkt an das magnetische Material gebunden wird.

22. Verfahren nach Anspruch 15, worin das Bindemittel ein Monomer oder ein Polymer von Acrylsäure, ein Acrolein, ein Amin, ein Amid, ein Alkohol, ein Aldehyd, eine organische Säure, ein Imidazol, ein Phosphat oder ein sekundäres, tertiäres oder quaternäres Amin oder Sulfat ist.

23. Verfahren nach Anspruch 13, worin das Verhältnis zwischen magnetischem Material und Ionenaustauscher 0,05 bis 0,2 beträgt.

24. Verfahren zum Abtrennen von Biomolekülen aus Gemischen, die selbige enthalten, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
das Kontaktieren einer flüssigen Suspension der Biomoleküle mit einer Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12;
das Herstellen einer Suspension aus dieser Magnetteilchenzusammensetzung und der Suspension von Biomolekülen, worin die Magnetteilchenzusammensetzung an die Biomoleküle bindet; und
das Anlegen eines Magnetfeldes an die Suspension, um die Magnetteilchen mit den daran gebundenen Biomolekülen abzutrennen.

25. Verfahren nach Anspruch 24, worin die Magnetteilchen Nucleinsäure binden, die in einem Gemisch mit Verunreinigungen vorhanden sind.

26. Verfahren nach Anspruch 25, worin die Nucleinsäure aus der aus mikrobieller DNA, pflanzlicher DNA und Plasmid-DNA bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin die Verunreinigungen Zelltrümmer oder unlösliches Material sind.

28. Verwendung einer Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zum Entfernen von Zelltrümmern oder unlöslichem Material aus einer Lösung oder Suspension, die Nucleinsäure enthält, um eine die Nucleinsäure enthaltende Lösung bereitzustellen.

29. Verwendung einer Magnetteilchenzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Bindung an Nucleinsäure in einer flüssigen Probe, die Nucleinsäure und Verunreinigungen enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen