

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 3829**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.04.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/082628**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**

**(Věstník č. 4/2001)**

(86) PCT číslo: **PCT/US99/08843**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/54441**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 12 N 7/02**

**G 01 N 33/569**

(71) Přihlašovatel:

GENVEC, INC., Gaithersburg, MD, US;

(72) Původce:

Carrión Miguel E., Rockville, MD, US;

Menger Marilyn, Derwood, MD, US;

Kovesdi Imre, Rockville, MD, US;

(74) Zástupce:

Jírotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Účinné čištění adenoviru**

(57) Anotace:

Způsob obohacování roztoku adenovirem, zahrnující aplikaci směsného roztoku, obsahujícího adenovirus a přinejmenším jeden nežádoucí typ biomolekuly, na chromatografickou pryskyřici měnící anionty, která obsahuje vazebnou skupinu ze souboru zahrnujícího dimethylaminopropyl, dimethylaminobutyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl, a eluci adenoviru z této chromatografické pryskyřice. Nabízí se také způsob purifikace adenoviru z adenovirem infikovaných buněk, zahrnující lyzi takových buněk, aplikaci lyzátu na jedinou chromatografickou pryskyřici, eluování adenoviru z chromatografické pryskyřice a jímání frakce obsahující adenovirus, který je v podstatě tak čistý, jako adenovirus purifikovaný trojnásobně v hustotním gradientu CsCl. Předkládaný způsob dále nabízí způsob přesné kvantifikace počtu adenovirálních částic v roztoku adenoviru, zahrnující aplikaci roztoku vzorku adenoviru na chromatografickou pryskyřici měnící anionty a následnou eluci z této kolony, srovnání absorpce roztoku vzorku adenoviru a absorbance standardního roztoku adenoviru a kvantifikaci počtu adenovirálních částic v roztoku vzorku.

**CZ 2000 - 3829 A3**

Účinné čištění adenoviru

Oblast techniky

Vynález se týká účinné purifikace adenoviru.

Dosavadní stav techniky

Částice adenovirů byly obvykle izolovány s využitím protokolů pro purifikaci v hustotním gradientu, například s využitím gradientu chloridu cesného (CsCl). Purifikace v hustotním gradientu je vhodná pro preparace v malém množství, ale je časově náročná a obtížně použitelná ve větším měřítku. Komerčně je proto využití tohoto způsobu často nežádoucí.

Alternativní metodou pro purifikaci adenovirů je kolonová nebo vsádková chromatografie. První pokusy o izolaci virových částic pomocí chromatografických technik využívajících náplně na bázi diethylaminoethylovaných (DEAE) chromatografických pryskyřic jsou zmíněny v letech 1959 až 1961. Haruna a spol. (Virology 13: 246-267 (1961)) uváděli využití DEAE chromatografie na měničích iontů pro purifikaci adenovirů typů 1, 3 a 8, zatímco Klemperer a Pereira (Virology 9: 536-545 (1959)) a Philipson (Virology 10: 459-465 (1960)) zmiňovali potíže při použití stejné metody pro jiné typy adenovirů. Použití těchto technik nebylo do doby asi po roce 1965 příliš rozšířeno, zejména kvůli tomu, že chromatografické matrice měly tendenci se při separacích hroutit. Vzhledem k selektivitě tehdy dostupných chromatografických pryskyřic byly chromatografické purifikace virů méně účinné než purifikační techniky v hustotním gradientu. Bigwood a spol. (EP 0213719) popisuje chromatografické pryskyřice s funkčními skupinami polyaminů se 2 až 4 aminoskupinami, oddělenými 2 až 4 methylenovými skupinami. Bigwood a spol. však nepopisují použití takovýchto

pryskyřic pro čištění virů nebo jiného biologického materiálu.

V poslední době se obnovil zájem o purifikaci virů pomocí chromatografie. Použití chromatografických pryskyřic pro purifikaci virů ukázali například Guillaume a spol. (WO 98/00524), Shabram a spol. (WO 96/27677) a Huyghe a spol. (Human Gene Therapy 6: 1403-1416 (1995)). V posledních patnácti letech byly rovněž vyvinuty novější chromatografické náplně. Tyto náplně mohou být rozděleny do čtyřech skupin: (i) homogenní prokřížené polysacharidy zahrnující měkké gely (například agarózu), které mají dobrou kapacitu, ale špatné rozlišení a tendenci stlačovat se, (ii) makroporézní polymery na bázi syntetických polymerů, ke kterým se řadí pryskyřice pro perfúzní chromatografii umožňující lepší difuzivitu a vyšší účinnost, rychlost a rozlišení, (iii) tykadlové (tentakulární) sorbenty, mající "tykadla", která byla navržena pro rychlejší interakci s proteiny (například fraktogel) a (iv) materiály, kde je měkký gel uzavřený v rigidní schránce a tak využívají vysokou kapacitu měkkých gelů i rigiditu pevných materiálů (například Ceramic Hyper D<sup>TM</sup>F) (viz Boschetti, J. Chromatogr. 658: 207 (1994), Rodriguez, J. Chromatogr. 699: 47-61 (1997)).

Je žádoucí zvýšit rychlost, snadnost a účinnost purifikací, a to zejména v případě komerčních purifikací prováděných ve velkém měřítku pomocí těchto technik. Vynález poskytuje takový proces pro purifikaci adenoviru. Tyto a jiné výhody předkládaného vynálezu a rovněž další nové prvky budou zřejmé z popisu vynálezu, který je zde předložen.

#### Podstata vynálezu

Vynález poskytuje způsob obohacení roztoku adenovirem. Tento způsob zahrnuje: (i) získání směsného roztoku obsahujícího adenovirus a přinejmenším jeden nežádoucí typ biomolekuly, (ii) nanesení takového směsného roztoku na

chromatografickou pryskyřici schopnou měnit anionty (měnič aniontů) obsahující vazebnou část vybranou ze skupiny zahrnující dimethylaminopropyl, dimethylaminobutyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl, a (iii) eluování adenoviru z purifikační chromatografické pryskyřice pomocí elučního roztoku. Způsob může dále zahrnovat předseparaci směsného roztoku obsahujícího adenovirus a nejméně jeden typ nežádoucí biomolekuly na chromatografické pryskyřici měnící anionty před nanesením adenoviru na chromatografickou pryskyřici měnící anionty.

Vynález poskytuje také způsob purifikace adenoviru z buněk, které jsou adenovirem infikovány. Tato metoda zahrnuje lyzi buněk infikovaných adenovirem, nanesení lyzátu na jeden typ chromatografické pryskyřice, eluování adenoviru z chromatografické pryskyřice a jímání frakcí obsahujících adenovirus, kde adenovirus je prokazatelně tak čistý jako po trojnásobné purifikaci adenoviru pomocí hustotního gradientu CsCl.

Vynález také poskytuje způsob přesné kvantifikace množství částic adenoviru v roztoku adenoviru, jako je roztok získaný ze surového lyzátu buněk infikovaných adenovirem, zahrnující (i) nanesení vzorku roztoku adenoviru na chromatografickou pryskyřici měnící anionty a obsahující vazebnou část vybranou ze skupiny zahrnující dimethylaminopropyl, dimethylaminobutyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl a eluci z této chromatografické pryskyřice, (ii) stanovení absorbance roztoku vzorku adenoviru eluovaného z chromatografické pryskyřice a absorbance standardního roztoku adenoviru, (iii) porovnání absorbance vzorkového roztoku adenoviru eluovaného z chromatografické pryskyřice s absorbančí standardního roztoku adenoviru a kvantifikaci počtu částic adenoviru v roztoku vzorku.

Vynález může být nejlépe pochopen s odkazem na připojené výkresy a následující podrobný popis výhodných provedení.

Vynález je zaměřený na způsob obohacení roztoku obsahujícího adenovirus. "Adenovirem" je míněn přirozeně se vyskytující adenovirus a rekombinantní adenovirus. Přitom rekombinantní adenovirus může být infekční i neinfekční. Metoda zahrnuje získávání směsného roztoku obsahujícího adenoviry a přinejmenším jednoho nežádoucího typu biomolekuly. "Biomolekulou" je míněna jakákoliv makromolekula, například jakýkoliv protein, uhlovodík, lipid nebo nukleová kyselina (například DNA a RNA) apod. a rovněž fragmenty takových molekul. Používané slovo "roztok" je zde ve významu, v jakém je v oboru běžně používáno a navíc je jím míněn i buněčný lyzát. Jakýkoliv roztok obsahující adenovirus může být obohacen metodou předloženou tímto vynálezem. Směsný roztok adenoviru se obvykle získá infikováním eukaryontních buněk adenovirem, jak je zde definován, udržováním buněk po dostatečně dlouhé časové období, aby mohlo dojít k amplifikaci počtu adenovirových částic, shromážděním infikovaných buněk a jejich lyzí (rozbitím) v pufovaném roztoku.

Výrazy "obohacování" a "purifikování" a stejně tak "obohacený" a "purifikovaný" jsou zde použity zaměnitelně a znamenají, že koncentrace adenoviru se v daném objemu zvyšuje nebo zvýšila. Je žádoucí aby obohacený nebo purifikovaný roztok adenoviru byl tak čistý jako adenovirus purifikovaný třikrát v hustotním gradientu (CsCl).

Pokud se purifikují viry z infikovaných buněk (například z eukaryontních buněk), je výhodné nenechat infekci probíhat až do stadia, kdy samotné viry způsobí lyzi buněk, protože za těchto podmínek probíhá lyze jednotlivých buněk v podstatně odlišných časech a degradativní enzymy uvolněné lyzovanými buňkami začnou napadat uvolněné viry. Navíc těsně před buněčnou lyzí způsobenou adenoviry mohou dispozice buněčného metabolismu zapříčinit snížení přesnosti virové replikace.

Proto se doporučuje lyzovat buňky předtím, než dojde k jejich lyzi působením adenovirů.

K lyzi může být použita jakákoliv vhodná metoda. Například mohou být buňky i s živným médiem odstředěny a medium nahrazeno roztokem silných detergentů a dalších aditiv (například Triton<sup>TM</sup>X-100, Tween 20, Tween 80 nebo deoxycholát) a po vhodně dlouhé inkubaci může být vzorek shromážděn pro další zpracování. Nebo mohou být buňky shromážděny šetrnou centrifugací, tak aby se zformovaly do buněčné pelety, a lyzovány trojnásobným zmrazením a rozmrazením. Preferovanou alternativní technikou je použití francouzského lisu nebo ještě lépe mikrofluidizéru. Francouzské lisy a mikrofluidizéry účinně lyzují eukaryontní buňky pomocí střižných sil, které rozrušují buněčné membrány. Postup využívající střižných sil je rychlejší a reprodukovatelnější než jiné vhodné metody pro získání roztoku obsahujícího adenovirus z infekční buněčné populace (například eukaryontních buněk). V souladu s tím může být směsný roztok obsahující adenovirus a přinejmenším jeden nežádoucí typ biomolekuly pro purifikaci nebo obohacení podle metod popsanych v tomto vynálezu získán mikrofluidizací buněčné populace infikované adenoviry.

Roztok, ze kterého má být purifikován adenovirus, může být případně předčištěn. Pokud je požadováno, může být takové předčištění provedeno středně šetrnou centrifugací, aby byly odstraněny velké kusy zbytků buněk a větší nerozrušené organely (pokud jsou přítomné). Buněčný lyzát může být také předčištěn filtrací. Zejména může být použito filtrace s tangenciálním tokem (TFF) v souladu se známými metodami. Roztok může být případně inkubován s enzymy schopnými rozkládat DNA a RNA (DNáza/RNáza), aby byly odstraněny veškeré DNA a RNA obsažené v předčišťovaných buňkách, které nejsou obsaženy v částicích adenovirů.

Potom, co je buněčný lyzát předčištěn, může být případně předseparován na chromatografické pryskyřici měnící anionty

před vlastní purifikací. Pro předseparaci může být použita jakákoliv vhodná chromatografická pryskyřice měnící anionty. Přednostně se pro předseparaci používá chromatografická pryskyřice měnící anionty, která má povrchové skupiny derivatizovány terciárním nebo kvartétním aminem (například diethylaminoethyl, trimethylaminoethyl nebo trimethylaminopropyl). Povrchová skupina může být spojena s nosnou matricí (nosičem) pomocí jakékoliv v oboru používané spojovací skupiny. Mezi vhodné spojovací skupiny v kontextu tohoto vynálezu patří ty, které jsou na bázi akrylových polymerů. Nosná matrice může být tvořena jakýmkoliv vhodným materiálem. Přednostně se pro nosné matrice používá materiálu, založeném na konceptu "měkký gel v rigidní schránce." Tato "gelem plněná" chromatografická pryskyřice spojuje výhodu vysoké kapacity měkkých gelů, například agarózy, a rigidity pevných materiálů při vysokých průtokových rychlostech a jejich zvýšené odolnosti proti stlačování, smršťování se a bobtnání, což jsou vlastnosti běžné u měkkých gelů. Tyto "gelem plněné" chromatografické pryskyřice jsou velmi rozšířené a jsou popsány například v patentech U. S. č. 5,268,097 a 5,672,276.

V kontextu tohoto vynálezu je pro předseparaci žádoucí chromatografickou pryskyřicí měnící anionty Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F, která je komerčně dostupná od BioSeptra, Villeneuve-La-Garenne, Francie. Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F je složena z vysoce porézních keramických kuliček naplněných flexibilním hydrofilním gelem s funkčními skupinami. Průměrná velikost kuličky činí 50  $\mu\text{m}$  (rozmezí velikosti částic je 25 až 75  $\mu\text{m}$ ). Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F má dynamickou kapacitu přinejmenším 85 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) při 200 cm/h s 50% průrazem (breakthrough) a přinejmenším 80 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) při 600 cm/h s 50% průrazem. Kvůli gelem-plněné povaze vykazuje náplň Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F větší povrchovou plochu dostupnou pro vázání ve srovnání s klasickými porézními médii u kterých je obvykle

nejméně 50% vnějšku částice tvořeno vstupy do pórů, kde nedochází k navázání. V důsledku toho 100 % celkové vnější plochy Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F přispívá k vázání. Díky tomuto rysu je tato chromatografická pryskyřice pro předčišťování upřednostňována.

Alternativou je předčištění buněčného lyzátu na expandovaných kuličkách adsorpčního měniče aniontů. Například může být použita chromatografická pryskyřice měnící anionty na expandovaných adsorpčních kuličkách s vazebnými částmi derivatizovanými kvartérním aminem (například trimethylaminomethyl nebo DEAE). Pro expandované chromatografické náplně s pryskyřicemi měnícími anionty je charakteristický větší průměr kuliček, například větší než 30  $\mu\text{m}$ , ale obvykle nepřekračující 500  $\mu\text{m}$ . Díky značné velikosti kuliček mohou velké fragmenty buněčných zbytků a celé (nelyzované) buňky protékat volně chromatografickou pryskyřicí (a fritou jí přizpůsobené velikosti). Mezi vhodné adsorpční chromatografické pryskyřice s expandovanou náplní patří Streamline QXL<sup>®</sup> (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) a DEAE Cellthru-Big Beads<sup>TM</sup> (Sterogene, Carlsbad, CA, nebo ekvivalent od UpFront Chromatography, Kodaň, Dánsko).

Buněčný lyzát je eluován z chromatografické pryskyřice měnící anionty jakýmkoliv vhodným eluentem (například 600 mM NaCl). Pokud je to třeba, je roztok vhodně zředěn na nižší koncentraci elučního činidla, nebo jiných činidel v elučním pufru. Potom může být polopřečištěný a koncentrovaný buněčný lyzát nanesen na vhodnou chromatografickou pryskyřici měnící anionty a purifikován.

Jak vyplývá z výše zmíněného, nabízí tento vynález metodu umožňující zvýšit koncentraci adenoviru v roztoku. Metoda zahrnuje (i) získání směsného roztoku obsahujícího adenovirus a nejméně jeden nežádoucí typ biomolekuly; (ii) nanesení tohoto směsného roztoku na chromatografickou pryskyřici měnící anionty; a (iii) eluování adenoviru z chromatografické pryskyřice pomocí takového eluentu, aby byl

získán roztok obohacený o adenovirus. Navíc může být směsný roztok adenoviru případně klarifikován (vyčiřen) pomocí filtrace s tangenciálním tokem. Dále může být vyčiřený roztok případně předseparován pomocí chromatografie na měničích aniontů.

V tomto ohledu nabízí tento vynález také metodu umožňující purifikovat adenovirus z buněk adenovirem infikovaných. Tato metoda zahrnuje lyzi buněk infikovaných adenovirem, aplikaci lyzátu na jedinou chromatografickou pryskyřici, která naváže adenovirus, eluci adenoviru z chromatografické pryskyřice a jímání frakce obsahující adenovirus. Adenovirus ve frakci je v podstatě tak čistý, jako adenovirus po trojnásobné purifikaci v hustotním gradientu CsCl.

Jakákoliv vhodná chromatografická pryskyřice může být použita pro purifikaci adenoviru z buněčného lyzátu. Jakákoliv vhodná chromatografická pryskyřice měnící anionty a mající povrchové skupiny vybrané ze skupiny zahrnující dimethylaminopropyl, dimethylaminobutyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl může být použita k purifikaci adenoviru ze směsného roztoku obsahujícího adenovirus a nejméně jeden nežádoucí typ biomolekuly. Jako povrchová skupina bývá přednostně používán dimethylaminopropyl. Povrchová skupina může být připojena k nosiči pomocí jakékoliv používané vhodné spojovací skupiny. V kontextu tohoto vynálezu patří mezi vhodné sulfonamidové a akrylátové spojovací skupiny. Nosič matrice může být tvořen jakýmkoliv vhodným materiálem; je však výhodné pokud je tvořen takovou perfúzní chromatografickou pryskyřicí měnící anionty, aby byl optimalizován transport do vnitřku částic náplně.

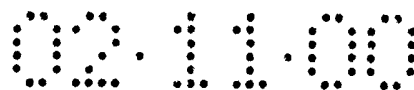
Typické perfúzní chromatografické pryskyřice mají na povrchu částic velké (například 6000 až 8000 Å) póry. Síť menších pórů, omezující délku difúzních drah, zvětšuje povrchovou plochu pórů s velkými průměry. Díky této bimodální

distribuci velikostí pórů využívá mobilní fáze s adenovirem, která vstupuje a protéká částicemi chromatografické pryskyřice, jak konvektivního, tak difúzního transportu. Takováto perfúzní chromatografická pryskyřice je dobře známa a podrobněji ji popisuje Afeyan a spol. (J. Chromatogr. 519: 1-29 (1990)) a U.S. patenty 5,384,042; 5,228,989; 5,605,623; a 5,019,270).

V kontextu tohoto vynálezu je vhodnou perfúzní chromatografickou pryskyřicí měnicí anionty POROS® 50D, která je komerčně dostupná od PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts. POROS® 50D je chromatografická pryskyřice na bázi kopolymeru styren-divinylbenzen, která má dynamickou kapacitu přinejmenším 100 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) při 100 cm/h s 50% průrazem (breakthrough) a přinejmenším 80mg/ml BSA při 1000 cm/h s 5% průrazem. POROS 50D vykazuje snížení tlaku méně než 3 bary při 1000 cm/h v 10 cm vrstvě chromatografické pryskyřice a při jmenovité velikosti částice chromatografické pryskyřice kolem 50  $\mu\text{m}$  (tj. průměrná velikost částice se pohybuje v rozmezí (25 až 100  $\mu\text{m}$ )).

Chromatografická pryskyřice měnicí anionty může být použita buď vsádkově (batch), nebo výhodněji v průtočném (flow-through) uspořádání, přednostně na koloně (kolona naplněná chromatografickou pryskyřicí), zejména pokud se je jedná o perfúzní chromatografické pryskyřice. Kromě toho nabízí předkládaný vynález v kontrastu k dříve používaným metodám jednoduchou a rychlou chromatografickou purifikaci adenoviru snadno převeditelnou do jiného měřítka.

Adenovirus purifikovaný podle vynalezené metody nemá nižší poměr částice vzhledem k pfu (pu/pfu) než adenovirus purifikovaný v hustotním gradientu (CsCl). Takže pu/pfu purifikovaného adenoviru je přinejmenším 50 % ve srovnání s adenovirem purifikovaným v hustotním gradientu CsCl, výhodně přinejmenším 85 % ve srovnání s adenovirem purifikovaným v hustotním gradientu CsCl a zejména přinejmenším 96 % ve



srovnání s adenovirem purifikovaným trojnásobně v hustotním gradientu CsCl. Kromě toho čistota adenoviru po chromatografii převyšuje čistotu stejného roztoku adenoviru, který je analyticky nerozlišitelný od adenoviru purifikovaného standartním způsobem v hustotním gradientu CsCl (to je v podstatě tak čistý jako adenovirus purifikovaný trojnásobně v hustotním gradientu CsCl, například přinejmenším z 90 % tak čistý, lépe přinejmenším z 97 % tak čistý a ještě lépe z 99 % tak čistý jako adenovirus purifikovaný trojnásobně v gradientu CsCl).

Podstatného a vhodného obohacení adenoviru v roztoku je dosaženo jeho eluováním pomocí vhodného eluentu z chromatografické pryskyřice měnící anionty. Typické vhodné eluenty jsou roztoky s velkou koncentrací iontů, takže ionty soutěží s adenovirem o vazbu na chromatografickou pryskyřici. Přednostně je na kolonu přiváděn gradient eluentu. Gradient eluentu je buď diskontinuální, tj. ve dvou nebo více krocích, nebo kontinuální. Takové gradienty mohou být lineární, konkávní nebo konvexní. Vhodným eluentem je chlorid sodný v pufrovaném roztoku. Například adenovirus je eluován z chromatografické pryskyřice Q Ceramic Hyper D®F v rozmezí koncentrací chloridu sodného kolem 360 mM až kolem 475 mM, přesněji při zhruba 415 mM NaCl a z chromatografické pryskyřice POROS® 50D v rozmezí koncentrací chloridu sodného kolem 360 mM až kolem 450 mM, přesněji při zhruba 410 mM NaCl.

Vzorky mohou být s výhodou dávkovány na chromatografickou pryskyřici měnící anionty při vysokých koncentracích elučních činidel (např. nejméně při 75 % koncentrace nezbytné k eluování adenoviru z chromatografické pryskyřice, výhodněji kolem 85 % až kolem 90 % koncentrace nezbytné k eluování adenoviru z chromatografické pryskyřice). Dávkováním vzorku při vysokých koncentracích elučního činidla na chromatografickou kolonu měnící anionty se docílí toho, že se určité nečistoty nenažívají na pryskyřici.

Eluce obohaceného adenoviru může být prováděna při jakémkoliv vhodném průtoku. Typické průtoky pro předseparace na chromatografické pryskyřici měnící anionty se pohybují od zhruba 100 cm/h až do zhruba 1000 cm/h, přednostně od asi 200 cm/h do asi 500 cm/h. Typické průtoky pro chromatografické pryskyřice měnící anionty s vazebnými skupinami jako je demethylaminopropyl, dimethylaminobutyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl činí zhruba 100 cm/h až zhruba 1500 cm/h, přednostně od zhruba 500 cm/h do zhruba 1250 cm/h.

Za účelem správné kvantifikace počtu adenovirových částic ve vzorku roztoku adenoviru, takovém jako je roztok získaný ze surového lyzátu buněk infikovaných adenovirem, může být roztok vzorku adenoviru připraven výše popsaným způsobem. Vzorek roztoku adenoviru může být potom obohacen a purifikován aplikací na chromatografickou pryskyřici měnící anionty a následnou elucí roztoku adenoviru z této pryskyřice výše popsaným způsobem. Potom je stanovena absorbance vzorku adenoviru eluovaného z chromatografické pryskyřice. Pro srovnání je určována absorbance standardního roztoku adenoviru, tj. roztoku o známé koncentraci. Ze srovnání absorbance roztoku vzorku a absorbance standardního roztoku se určí koncentrace adenovirových částic, tj. počet adenovirových částic v daném objemu v roztoku vzorku.

Standardní absorbancí může být jediná standardní absorbance nebo série či skupina standardních absorbancí určitého koncentračního rozsahu adenoviru. Absorbance vzorku a standardní absorbance mohou být presentovány v podobných, nebo různých (přednostně podobných) formátech, měřeních, nebo jednotkách, pokud však může být dosaženo užitečného srovnání. Například vhodná standardní absorbance může být absorbance, která byla stanovena ve standardním roztoku adenoviru, který byl získán stejným způsobem, jako vzorek roztoku adenoviru podle metod popsaných v tomto vynálezu.

Kvantifikace počtu adenovirových částic je prováděna srovnáváním absorbance vzorku se standardem jakýmkoliv vhodným způsobem. Například mohou být absorbance vzorku a absorbance standardu srovnávány vypočtením plochy píku odpovídajícího eluci viru z chromatografické pryskyřice; v chromatogramu je vynesena absorbance proti času. Absorbance různých známých koncentrací adenoviru může být zakreslena do grafu a tak vznikne standardní (kalibrační) křivka. Koncentrace vzorku může být pak určena pomocí lineární regrese.

Adenovirus obohacený v roztoku nebo purifikovaný z buněk infikovaných adenovirem pomocí chromatografických pryskyřic měnících anionty může být získán v roztocích obsahujících vysoké koncentrace elučního činidla, například NaCl. Složení pufru může být snadno změněno jakoukoliv vhodnou technikou na jakýkoliv požadovaný pufr, například sterilní isotonický pufr pro injekce savcům (například Ringerův roztok) obsahující vhodné stabilizátory a kryoprezervanty pro dlouhodobé skladování purifikovaného adenoviru. Vhodné techniky pro změnu složení pufru zahrnují dialýzu, diafiltraci a chromatografii na molekulových sítích (někdy tzv. gelová permeační chromatografie) a další techniky. Mezi vhodné matrice pro chromatografii na molekulových sítích patří Toyopearl HW-40C a Toyopearl HW40F (TosoHaas, Montgomeryville, PA); Uniflow<sup>TM</sup>, Superflow<sup>TM</sup> a Ultraflow<sup>TM</sup> (Sterogene, Carlsbad, CA); Shodex<sup>TM</sup> (Thomson Instruments, Chantilly, VA); a Bio-Sil<sup>TM</sup> a Bio-Gel<sup>TM</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA). Každá z těchto chromatografických pryskyřic má dostatečně nízký potenciál vázat proteiny.

Předkládaný vynález je detailněji popsán na následujících příkladech. Tyto příklady slouží pouze k objasnění vynálezu, ale v žádném případě nemají omezovat rozsah vynálezu.

### Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 představuje chromatogram buněčného lyzátu infikovaného adenovirem, eluovaného z chromatografické pryskyřice se skupinou kvartérního aminu (Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F), kde osa y představuje absorbanci (při 260 a 280 nm), osa x znázorňuje eluční čas (min) a paralelní osa y (napravo) znázorňuje vodivost elučního činidla na koloně (čárkovaná čára, mS).

Obr. 2 představuje chromatogram lyzátu buněk infikovaných adenovirem, přečištěného pomocí filtrace s tangenciálním tokem a inkubací s DNAsou/RNAsou (Benzonase<sup>®</sup>) a eluovaného z chromatografické pryskyřice se skupinou kvartérního aminu (Q Ceramic HyperD<sup>TM</sup>F), kde osa y představuje absorbanci (při 260 a 280 nm), osa x znázorňuje eluční čas (min) a paralelní osa y (napravo) znázorňuje vodivost elučního činidla na koloně (čárkovaná čára, mS).

Obr. 3 představuje chromatogram lyzátu buněk infikovaných adenovirem, eluovaného z adsorbční chromatografické pryskyřice s expandovanými částicemi (Streamline QXL<sup>®</sup>), kde osa y představuje absorbanci (při 260 a 280 nm), osa x znázorňuje eluční čas (min) a paralelní osa y (napravo) znázorňuje vodivost elučního činidla na koloně (čárkovaná čára, mS).

Obr. 4 představuje chromatogram lyzátu buněk infikovaných adenovirem, purifikovaného trojnásobnou centrifugací v gradientu CsCl a kvantifikovaného na dimethylaminopropyl perfúzní (POROS<sup>®</sup>50D) analytické koloně, kde osa y představuje absorbanci (při 260 a 280 nm), osa x znázorňuje eluční čas (min).

Obr. 5 představuje chromatogram lyzátu buněk infikovaných adenovirem, eluovaného z adsorbční chromatografické pryskyřice s expandovanými částicemi (Streamline QXL<sup>®</sup>) a dvakrát z dimethylaminopropyl perfúzní (POROS<sup>R</sup>50D) chromatografické pryskyřice, kde osa y

představuje absorpenci (při 260 a 280 nm), osa x znázorňuje eluční čas (min).

Obr. 6 představuje chromatogram lyzátu buněk infikovaných adenovirem, eluovaného z dimethylaminopropyl perfúzní (POROS®50D) chromatografické pryskyřice, kde osa y představuje absorpenci (při 260 a 280 nm), osa x znázorňuje eluční čas (min).

### Příklady provedení vynálezu

#### **Příklad 1**

Tento příklad demonstruje purifikaci adenoviru ze surového buněčného lyzátu. Purifikace byla provedena předčištěním, tj. vyčiřením buněčného lyzátu, nanesením lyzátu na pryskyřici měnící anionty a následnou elucí a nakonec nanesením buněčného lyzátu na chromatografickou pryskyřici měnící anionty s vazebnými skupinami vybranými ze souboru zahrnujícího dimethylaminopropyl, dimethylaminopentyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl a následnou elucí.

AdSEAP a AdVEGF<sub>121</sub> jsou vektory adenoviru s delecí v E1 a E3 regionech adenovirálního genomu obsahujícího kazetu genové exprese, v tomto případě cytomegalovirální (CMV) promotor operabilně připojený k cizímu genu (transgenu), například sekretorní alkalické fosfatázy (AdSEAP) nebo vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 121 (AdVEGF<sub>121</sub>) v E1 regionu adenovirálního genomu. AdSEAP a AdVEGF<sub>121</sub> byly propagovány v odstředovacích baňkách, válcových láhvích, třepacích láhvích nebo bioreaktorech obsahujících kolem  $10^5$  až  $10^6$  293 buněk na ml v přítomnosti nebo v nepřítomnosti séra v růstovém médiu.

Před chromatografickou separací byly buňky a média zpracovávány jednou z následujících metod: (a) buňky byly zakoncentrovány centrifugací a resuspendovány ve vhodném pufru (25 mM Tris, pH 7.8, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) pro optimální aktivitu DNázy/RNázy, lyzovány v mikrofluidizéru

(Microfluidics, Newton, Massachusetts) podle pokynů výrobce a klarifikovány filtrací; nebo (b) buňky byly lyzovány přímo v mikrofluidizéru podle pokynů výrobce, klarifikovány filtrací, koncentrovány a diafiltrovány do vhodného výše popsaného pufru pomocí filtrace s tangenciálním tokem (TFF). Při použití obou metod byl klarifikovaný buněčný lyzát inkubován s DNázou/RNázou jako je Benzonase® (Nycomed Pharma A/S, Denmark) podle pokynů výrobce a rozpuštěn ve vhodném pufru pro chromatografickou předseparaci na měničích aniontů.

Buněčný lyzát byl potom nanesen na kolonu Q Ceramic HyperD™F a eluován krokovým gradientem 360 až 460 mM NaCl. Obr. 1, který je chromatografií buněčného lyzátu infikovaného adenovirem a eluovaného z chromatografické pryskyřice modifikované kvartérním aminem (kolona Q Ceramic HyperD™F), znázorňuje eluci adenoviru z předseparační kolony měnící anionty (Q Ceramic HyperD™F) v případě kdy nebyla provedena inkubace s DNázou/RNázou. Koncentrovaný a částečně purifikovaný virální pík, který se eluuje kolem 415 mM NaCl když je k eluci použit krokový gradient 360, 450 a 1000 mM NaCl, byl obsažen v jedné frakci kolem 51 minut. Obr. 2 který je chromatografií buněčného lyzátu infikovaného adenovirem, klarifikovaného pomocí filtrace s tangenciálním tokem a inkubovaného s DNázou/RNázou a eluovaného z chromatografické pryskyřice modifikované kvartérním aminem, znázorňuje eluci adenoviru při předseparaci z kolony měnící anionty, Q Ceramic HyperD™F, když byla použita DNáza/RNáza (Benzonase®). Bylo pozorováno významné snížení velikosti píku nukleové kyseliny eluující se po viru.

Eluent z předchromatografie na měničích aniontů byl pak zředěn asi o 30 %, což je nezbytné zředění elučního činidla, v tomto případě NaCl, na koncentraci menší, než je eluční koncentrace pro perfúzní chromatografickou kolonu se skupinami dimethylaminopropylu (POROS® 50D), která byla použita pro dokončení purifikace adenoviru ze surového buněčného lyzátu. Dávkování na kolonu POROS® 50D bylo

prováděno při koncentraci 300 mM NaCl. Eluce z kolony byla prováděna krokovým gradientem chloridu sodného (od 360 mM do 450 mM).

Chromatogram buněčného lyzátu infikovaného adenovirem klarifikovaného filtrací s tangenciálním tokem, inkubovaného s DNázou/RNázou a eluovaného z chromatografické kolony s kvartérním aminem a perfúzní chromatografické kolony s dimethylaminopropylem, znázorňuje eluci adenoviru z kolony POROS® 50D. V podstatě byl získán pouze jediný ostrý pík s retenčním časem zhruba 35 minut. Analytická charakterizace purifikovaného adenoviru ukázala, že čistota adenoviru byla v podstatě nerozlišitelná od adenoviru purifikovaného trojnásobně v hustotním gradientu CsCl.

Proto byl adenovirus purifikován ze surového buněčného lyzátu filtrací buněčného lyzátu, předseparací buněčného lyzátu na koloně s kvartérním aminem měnící anionty a nakonec nástřikem buněčného lyzátu na kolonu se skupinami dimethylaminopropylu měnící anionty a následnou elucí z této kolony.

### **Příklad 2**

Tento příklad demonstruje purifikaci adenoviru ze surového buněčného lyzátu. Purifikace byla provedena klarifikací buněčného lyzátu, předseparací buněčného lyzátu na koloně s expandovanou adsorpční náplní měnící anionty a nakonec separací buněčného lyzátu na koloně měnící anionty s vazebnými skupinami vybranými ze souboru zahrnujícího demethylaminopropyl, dimethylaminopentyl a dimethylaminoisobutyl.

AdSEAP (adenovirální vektor popsáný v příkladu 1) byl propagován v odstředovacích baňkách obsahujících  $10^5$  -  $10^6$  293 buněk na ml. Buňky a médium byly lyzovány v mikrofluidizéru podle pokynů výrobce. Buněčný lyzát byl dávkován na předkolonu s expandovanou adsorpční náplní měniče aniontů Streamline QXL® (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) (aby byly

odstraněny velké zbytky buněk a nelyzované buňky). Kolona Streamline QXL® také sloužila k částečné purifikaci a zakoncentrování adenoviru. Obr. 3, který je chromatogramem buněčného lyzátu infikovaného adenovirem eluovaného z expandované adsorpční chromatografické náplně, ukazuje eluci adenoviru z kolony Streamline QXL®. Pík odpovídající viru byl obsažen ve frakci 14 (jedna frakce za minutu), která se eluovala při 600 mM NaCl. Eluent z kolony Streamline QXL® byl naředěn asi 1:2. Toto naředění bylo nezbytné, aby bylo zředěno eluční činidlo, v tomto případě NaCl, na koncentraci nižší než je eluční koncentrace z kolony POROS® 50 D, která byla následně použita.

Kolona POROS® 50 D byla použita k dokončení purifikace adenoviru. Dávkování na POROS® 50 D bylo prováděno při koncentraci 300 mM NaCl. Eluce z kolony byla pak prováděna lineárním gradientem chloridu sodného (od 360 mM do 450 mM), v němž se adenovirus eluje z kolony POROS® 50 D. Chromatogram buněčného lyzátu infikovaného adenovirem eluovaného z adsorpční chromatografické pryskyřice s expandovanou náplní a dimethylaminopropyl-perfúzní chromatografické pryskyřice ukazuje v podstatě jen jeden ostrý pík v přibližně 15 minutách, když se eluje lineárním gradientem NaCl od 360 do 450 mM tak, že virus je eluován při zhruba 400 mM NaCl. Analytická charakterizace purifikovaného adenoviru prokázala, že čistota adenoviru byla v podstatě nerozlišitelná od adenoviru purifikovaného trojnásobně v hustotním gradientu CsCl (viz obr. 4).

Z toho důvodu byl adenovirus purifikován ze surového buněčného lyzátu filtrací buněčného lyzátu, nástřikem buněčného lyzátu na předkolonu s expandovanou náplní měnící anionty a následnou elucí z této kolony a nakonec aplikací buněčného lyzátu na kolonu obsahující skupiny dimethylaminopropylu měnící anionty a následnou elucí z této kolony.

### Příklad 3

Tento příklad demonstruje - ve zřetelném protikladu k dosavadním metodám - purifikaci adenoviru na jediné chromatografické koloně ze surového buněčného lyzátu, při níž bylo purifikací dosaženo přinejmenším 95% čistoty adenoviru purifikovaného v trojnásobném hustotním gradientu CsCl. Navíc tato technika nabízí rychlou a přesnou metodu kvantifikace celkového počtu virových částic v surovém lyzátu.

Nárůst a lyze AdSEAP (adenovirální vektor z příkladu 1) byly prováděny jako v příkladu 1, metoda (a). Buněčný lyzát byl dávkován na POROS® 50 D v 360 mM NaCl. Eluce z kolony byla provedena tak, jak je uvedeno v příkladu 1 a byl získán chromatogram absorbance (260 nm a 280 nm) proti času (min), znázorněný na obr. 6. Analytická zkouška frakce odpovídající píku prokázala, že purifikace byla nerozlišitelná od adenoviru purifikovaném trojnásobně v hustotním gradientu CsCl (obr. 5 a 6), kde horní horizontální čára představuje měření vodivosti, které indikuje aktuální koncentraci NaCl. Podstatné překrytí absorbance píku při 260 nm (vyšší čára v chromatogramu) a při 280 nm (nižší čára v chromatogramu), což bylo 1,27 ( $1,25 \pm 0,08$  byl empiricky stanovený poměr čistého viru), ukazující, že virus byl v podstatě čistý.

Různé roztoky adenoviru známé koncentrace byly dávkovány na kolonu POROS® 50D v 360 mM NaCl. Eluce z kolony byla provedena tak, jak je uvedeno v příkladu 1 a na chromatogramu byla zaznamenána absorbance (260 a 280 nm) proti elučnímu (retenčnímu) času. Plocha píku (pod píkem) odpovídajícímu eluci adenoviru byla určena pro různé koncentrace a zakreslena (vynesena) do grafu jako plocha proti koncentraci adenoviru. Plocha pod křivkou AdSEAP v chromatogramu na obr. 5 odpovídající eluci adenoviru byla vypočítána a porovnána se standardní křivkou pomocí lineární regrese a bylo určeno, že surový lyzát obsahuje  $4,64 \times 10^{10}$  pu/ml.

Takto představuje předkládaný vynález jedнокrokovou metodu pro purifikaci adenoviru z lyzátu celých buněk. Proto

byl adenovirus, který byl přinejmenším z 95% tak čistý jako adenovirus po trojnásobné purifikaci v hustotním gradientu CsCl, purifikován ze surového buněčného lyzátu na jediné chromatografické koloně. Navíc byl rychle a přesně kvantifikován celkový počet adenovirů v surovém buněčném lyzátu.

#### **Příklad 4**

Tento příklad demonstruje, že složení pufru s adenovirem izolovaným z kolon měnicích anionty může být snadno změněno (například z vysoké koncentrace soli na nízkou koncentraci soli).

Zhruba 0,1 objemu kolony (0,01 až asi 0,25 objemu kolony) roztoku obsahujícího adenovirus z příkladu 1 bylo dávkováno na kolonu Toyopearl HW-40C, nebo na kolonu Uniflow 4 ekvilibrovanou vhodným sterilním izotonickým roztokem pro injekce savcům (např. Ringerův roztok) obsahujícím vhodné stabilizátory a kryoprezervanty pro dlouhodobé skladování purifikovaného adenoviru. Chromatografická frakce obsahující adenovirus byla identifikována spektroskopii (in-line) a jímána (sebrána). Purifikovaný virus byl obsažen v pufru obsahujícím asi 10 mM Tris, pH 7,8, 75 mM NaCl a různé stabilizátory.

Všechny odkazy, které jsou zde citovány, včetně přihlášek vynálezů a publikací jsou zahrnuty v celém jejich rozsahu odkazem.

Zatímco tento vynález byl popsán s důrazem na preferovaná provedení, bude těm kteří ovládají běžně používané dovednosti zřejmé, že mohou být použity varianty preferovaných provedení, a že je zamýšleno, aby vynález mohl být prováděn i jinak, než je zde specificky popsáno. Tudíž tento vynález zahrnuje všechny modifikace zahrnuté v duchu a

rámci tohoto vynálezu, tak jak je definováno následujícími patentovými nároky.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Způsob obohacování roztoku adenovirem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) získávání směsného roztoku obsahujícího adenovirus a nejméně jeden nežádoucí typ biomolekuly;

(ii) dávkování uvedené směsi na chromatografickou pryskyřici měnící anionty obsahující vazebnou skupinu vybranou ze souboru zahrnujícího dimethylaminopropyl, dimethylaminobutyl, dimethylaminoisobutyl a dimethylaminopentyl, tak, že se adenovirus na uvedenou chromatografickou pryskyřici váže;

a

(iii) eluování uvedeného adenoviru z uvedené chromatografické pryskyřice eluentem, tak, že je získán roztok obohacený adenovirem.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou vazebnou skupinou je dimethylaminopropyl.

3. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným eluentem je eluent s kontinuálním nebo diskontinuálním gradientem.

4. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným eluentem je gradientový eluent zahrnující gradient chloridu sodného.

5. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou chromatografickou pryskyřicí měnící anionty je perfúzní chromatografická pryskyřice měnící anionty.

6. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený směsný roztok zahrnující adenovirus a přinejmenším jeden nežádoucí typ biomolekuly je získán mikrofluidizací populace buněk infikovaných adenovirem.

7. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený způsob dále zahrnuje: (i) aplikaci uvedené směsi obsahující adenovirus a přinejmenším jeden nežádoucí typ biomolekuly na před-pryskyřici měnicí anionty a eluci uvedeného adenoviru z uvedené před-pryskyřice a potom v kroku (ii) namísto aplikace uvedeného směsného roztoku, aplikaci adenoviru eluovaného z uvedené před-pryskyřice na uvedenou chromatografickou pryskyřici měnicí anionty.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou před-pryskyřicí měnicí anionty je pryskyřice s kvartérním aminem.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou před-pryskyřicí měnicí anionty je adsorpční pryskyřice s plochou nebo expandovanou náplní.

10. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že krok (ii) se provádí v roztoku obsahujícím přinejmenším 75 % koncentrace elučního činidla požadovaného pro eluci uvedeného adenoviru z uvedené chromatografické pryskyřice měnicí anionty.

11. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený styk uvedeného směsného roztoku s chromatografickou pryskyřicí měnicí anionty se provádí v roztoku obsahujícím od asi 85 % do asi 90 % koncentrace elučního činidla požadovaného k eluci

uvedeného adenoviru z uvedené z chromatografické pryskyřice měnící anionty.

12. Způsob přesné kvantifikace počtu adenovirových částic v roztoku vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) obohacování roztoku vzorku adenovirem způsobem podle kteréhokoli z nároků 1 až 11;

(ii) určování absorbance roztoku vzorku, který byl obohacen způsobem podle kteréhokoli z nároků 1 až 11 a standardního roztoku adenoviru;

(iii) srovnávání absorbance roztoku vzorku a standardního roztoku; a

(iv) kvantifikaci počtu adenovirálních částic v uvedeném roztoku vzorku.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že roztok vzorku je připraven ze surového buněčného lyzátu adenovirem infikovaných buněk.

14. Způsob purifikace adenoviru z buněk infikovaných adenovirem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje lyzování uvedených buněk, aplikaci lyzátu na jedinou chromatografickou pryskyřici, tak, že se uvedený adenovirus váže na uvedenou chromatografickou pryskyřici, eluci uvedeného adenoviru z uvedené chromatografické pryskyřice a jímání frakce obsahující uvedený adenovirus, přičemž uvedený adenovirus je v podstatě tak čistý jako adenovirus purifikovaný trojnásobně v hustotním gradientu CsCl.

15. Způsob přesné kvantifikace počtu adenovirálních částic v roztoku vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) purifikaci roztoku vzorku adenoviru způsobem podle nároku 14;

(ii) určování absorbance roztoku vzorku, který byl purifikován způsobem podle nároku 14 a standardního roztoku adenoviru;

(iii) porovnávání absorbance roztoku vzorku a standardního roztoku a

(iv) kvantifikaci počtu adenovirálních částic v uvedeném roztoku vzorku.

02.11.00

PV2070-3829

77349

WO 99/54441

PCT/US99/08843

1/6

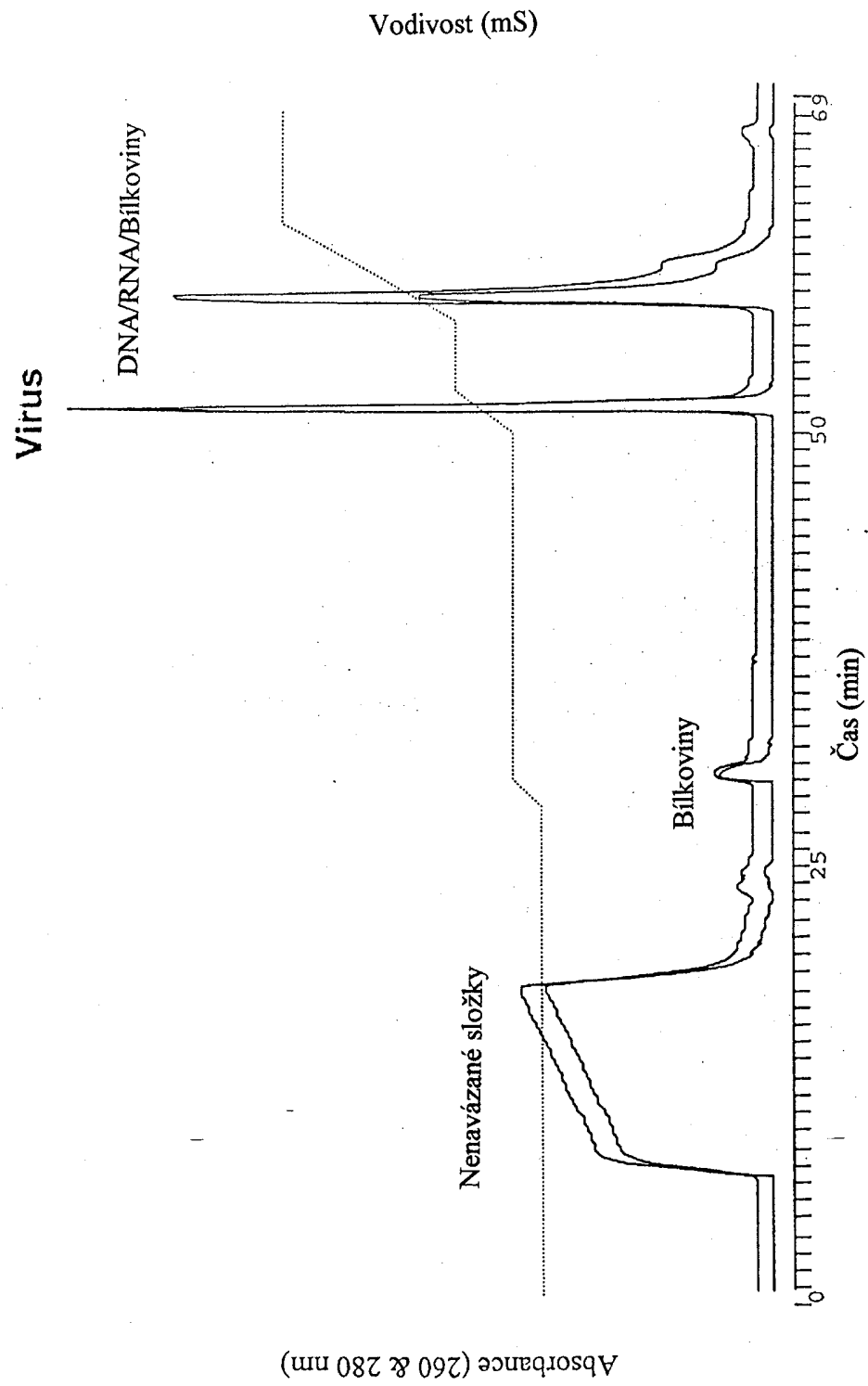


FIG. 1

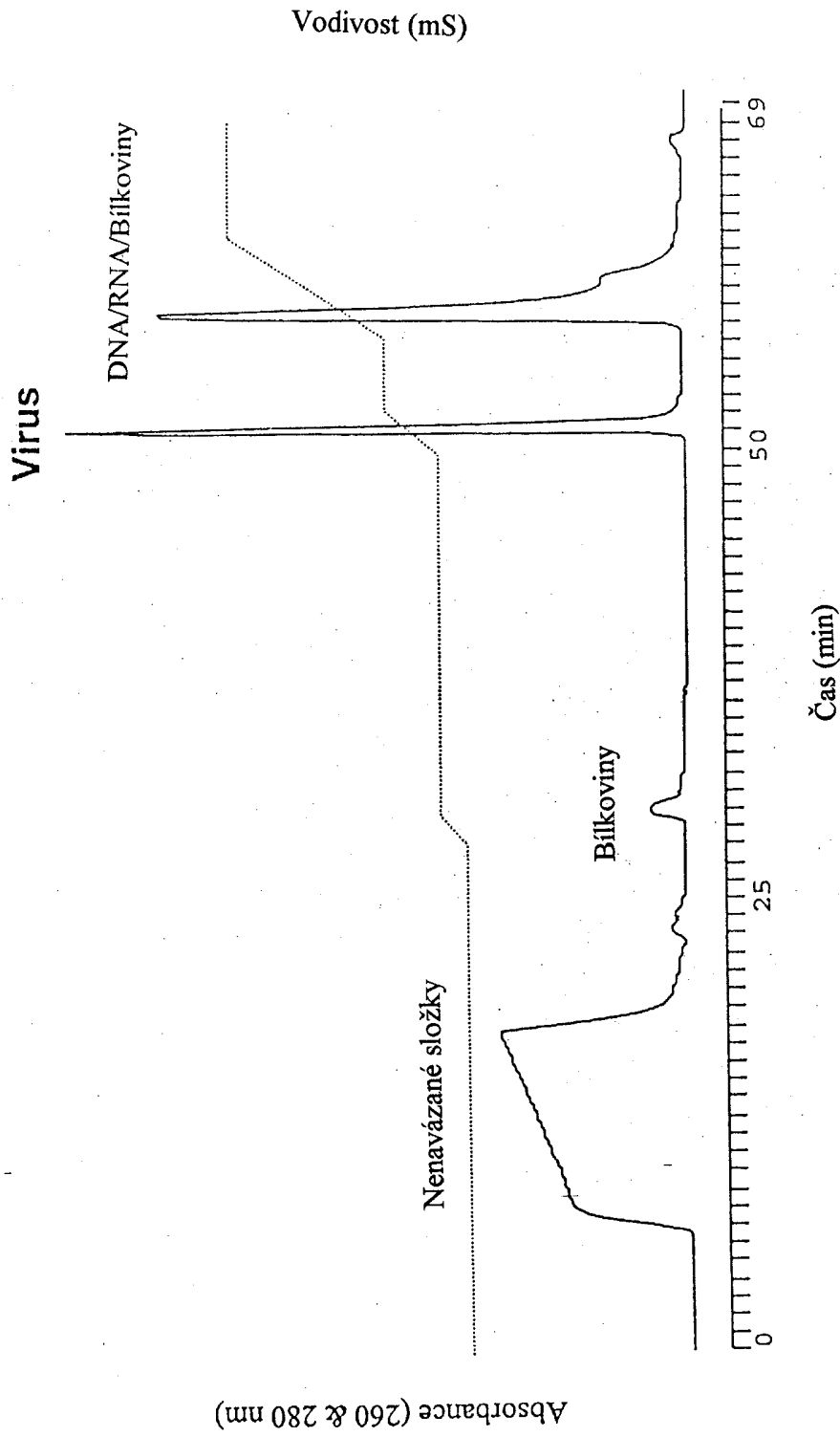


FIG. 2

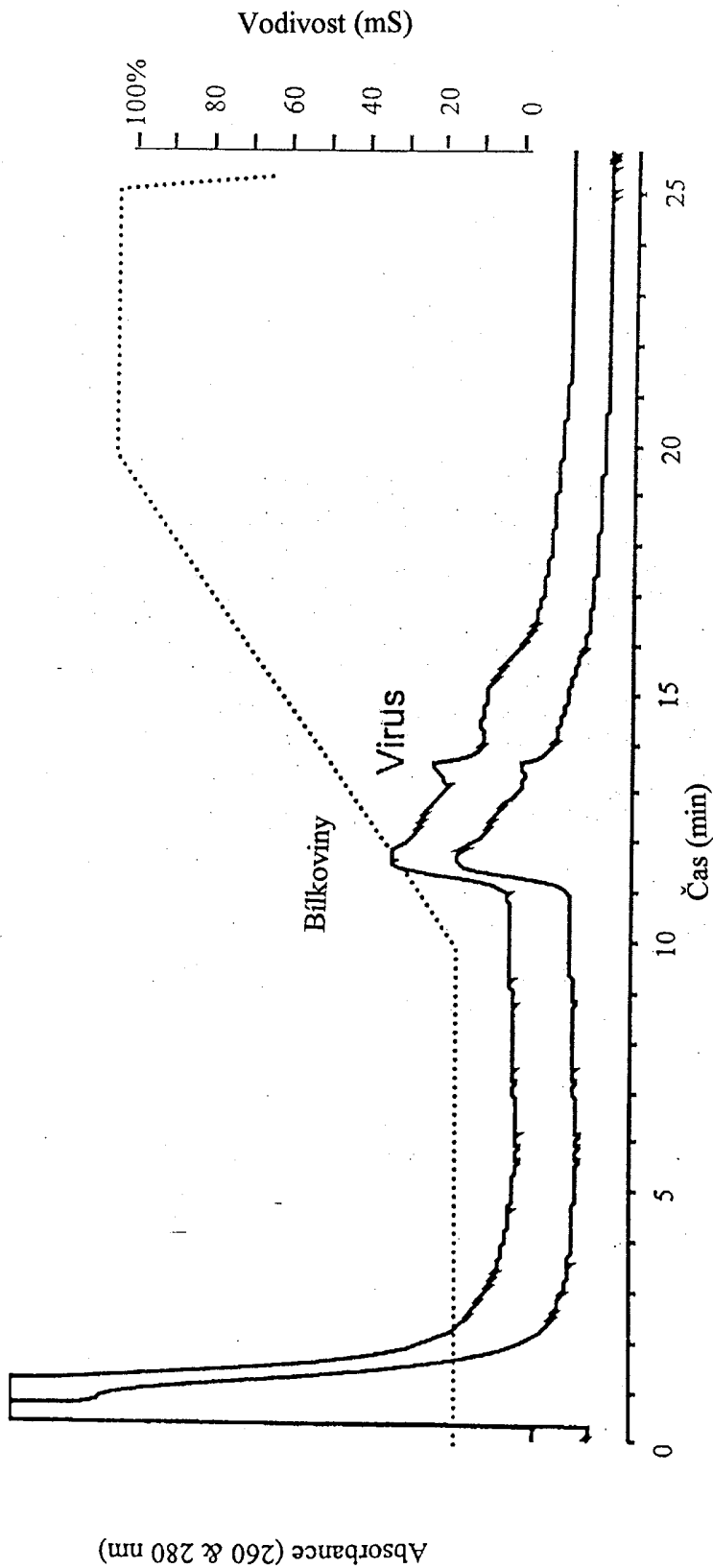


FIG. 3

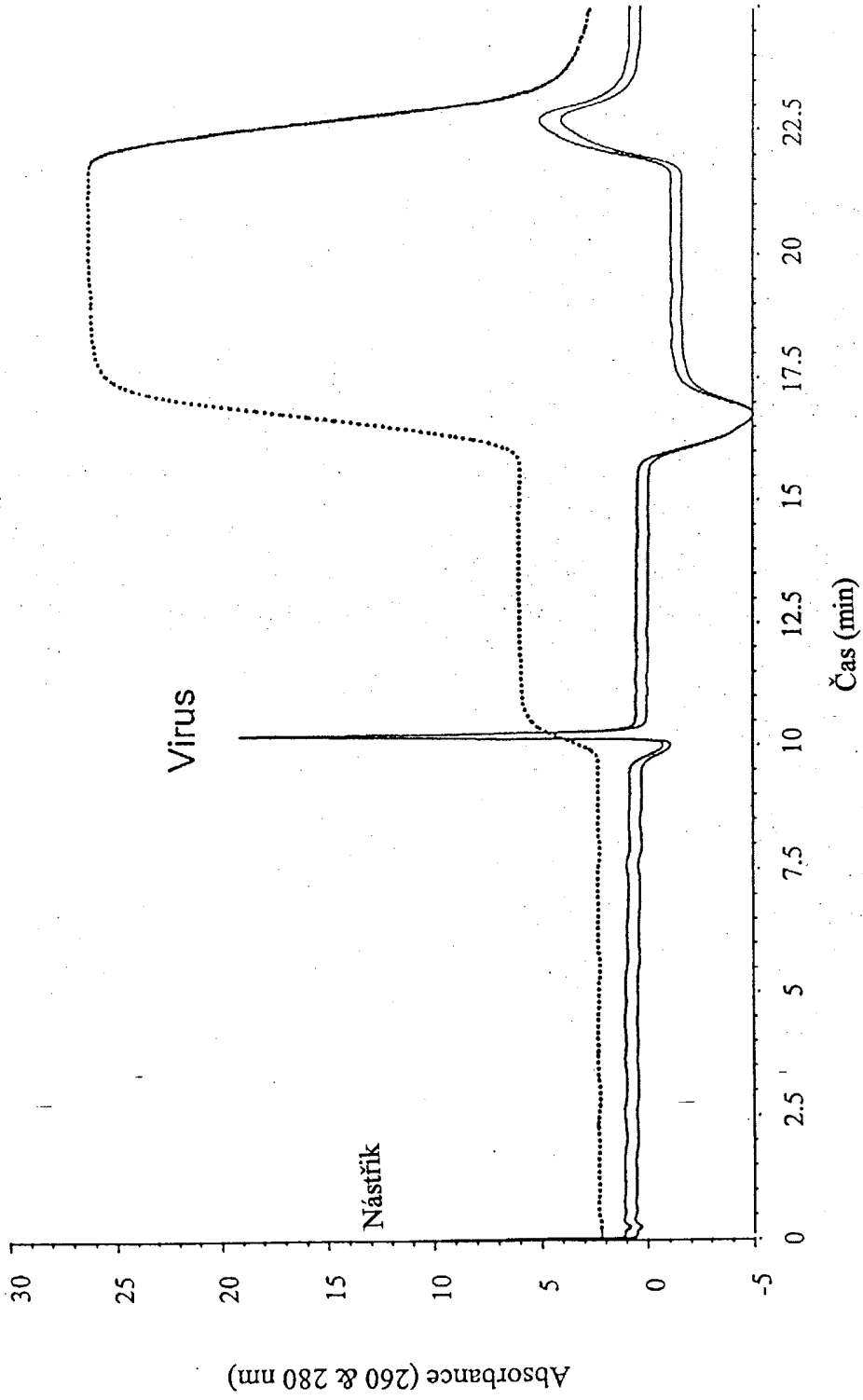


FIG. 4

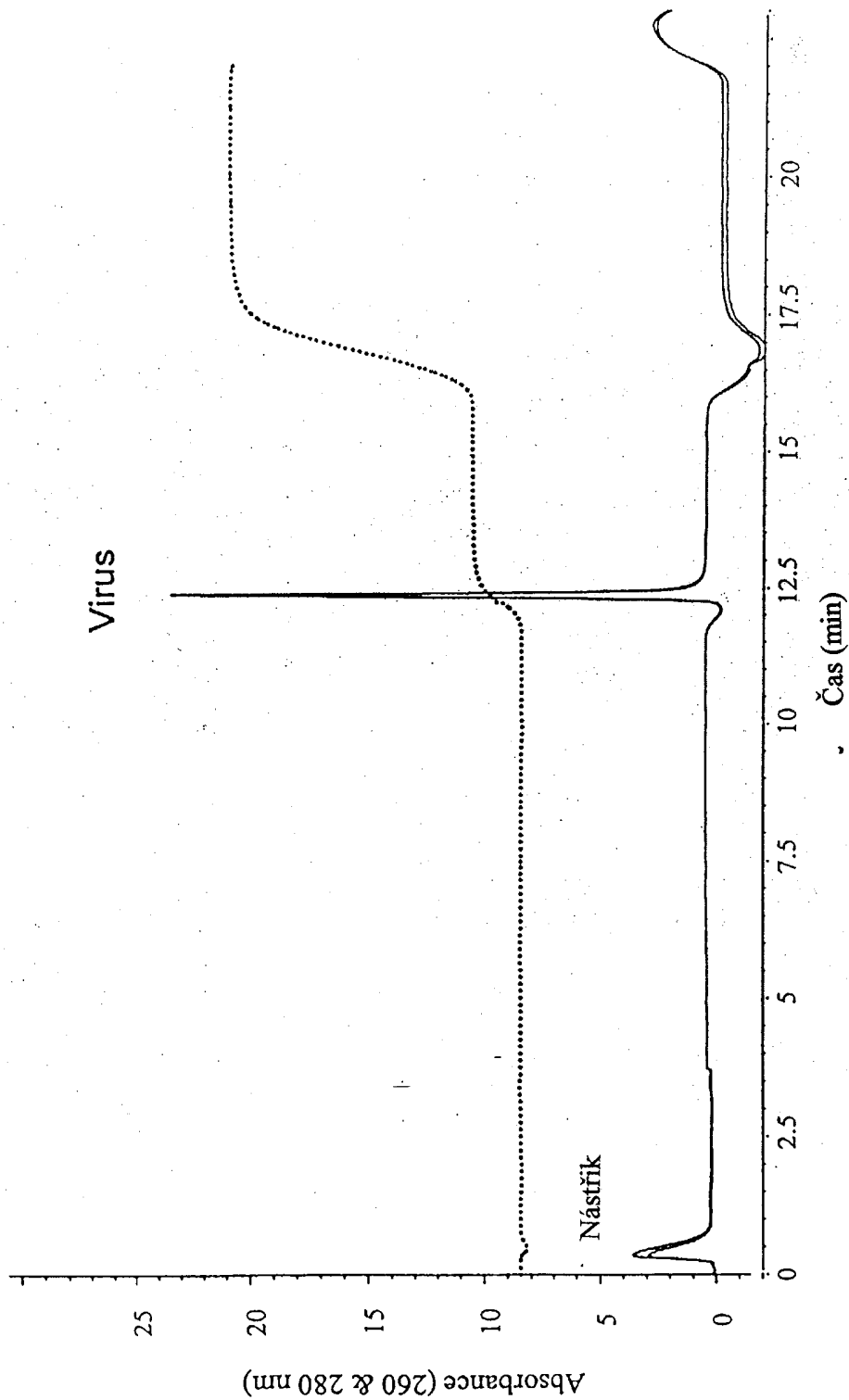


FIG. 5

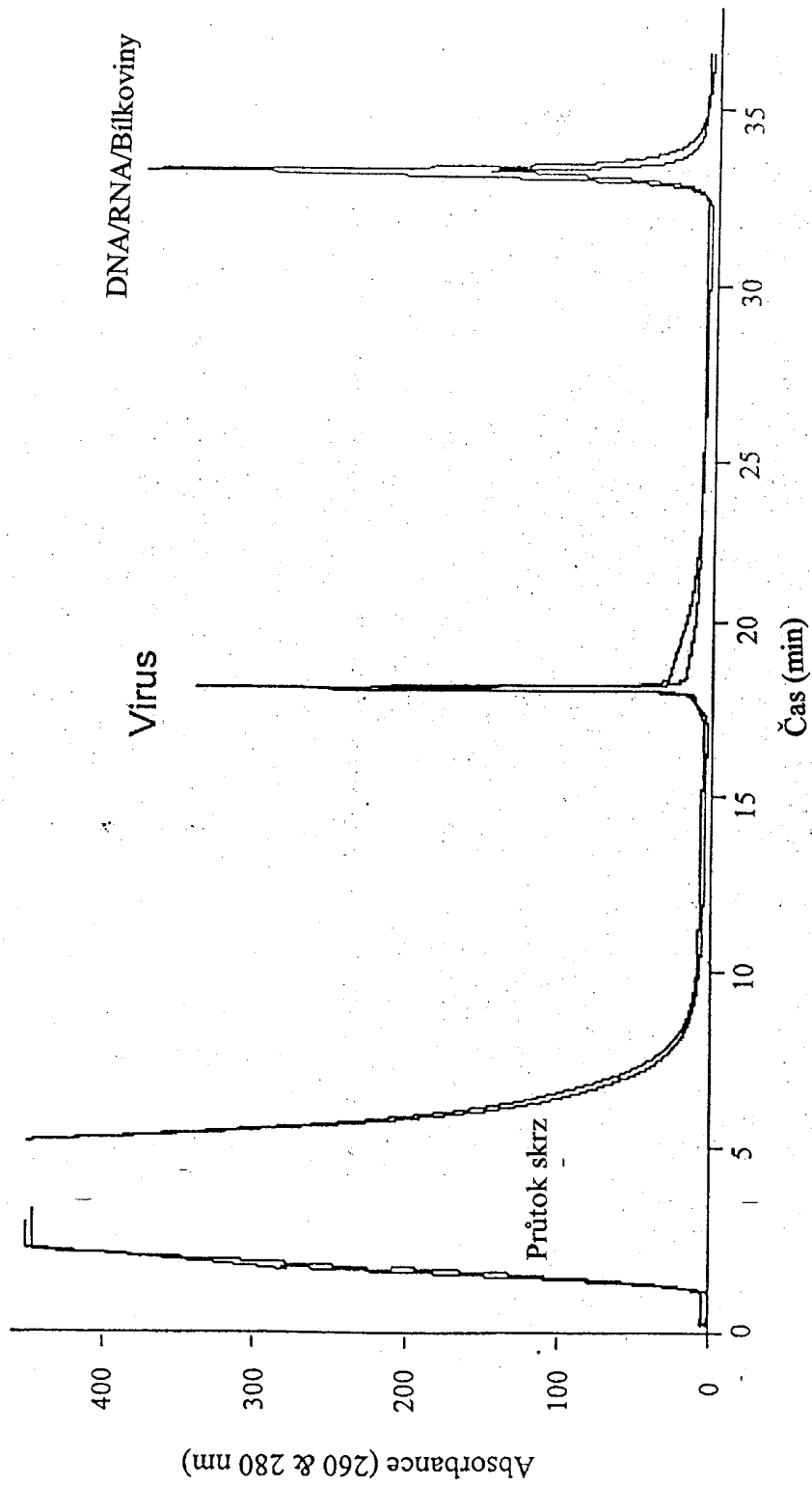


FIG. 6