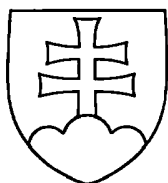


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 22. 4. 1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/082 628
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 22. 4. 1998
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: US
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 10. 5. 2001
Vestník ÚPV SR č.: 05/2001
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/US99/08843
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO99/54441

(21) Číslo dokumentu:

1568-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

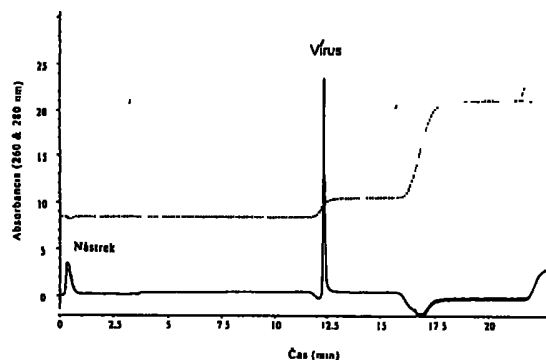
C12N 7/02
G01N 33/569

- (71) Prihlasovateľ: GENVEC, INC., Gaithersburg, MD, US;
(72) Pôvodca: Carrión Miguel E., Rockville, MD, US;
Menger Marilyn, Derwood, MD, US;
Kovesdi Imre, Rockville, MD, US;
(74) Zástupca: ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;

(54) Názov: Účinné čistenie adenovírusu

(57) Anotácia:

Spôsob obohacovania roztoku adenovírusom je založený na aplikácii zmesového roztoku obsahujúceho adenovírus a prinajmenšom jeden nežiaduci typ biomolekuly na aniónaktívnu chromatografickú živicu, ktorá obsahuje väzbovú skupinu zo súboru zahŕňajúceho dimetylaminopropyl, dimetylaminobutyl, dimetylaminoozobutyl a dimetylaminopentyl, a elúcií adenovírusu z tejto chromatografickej živice. Je opísaný tiež spôsob purifikácie adenovírusu z buniek infikovaných adenovírusom, zahŕňajúci lýzu takýchto buniek, aplikáciu lyzátu na jednú chromatografickú živicu, eluovanie adenovírusu z chromatografickej živice a zberanie frakcie obsahujúcej adenovírus, ktorý je v podstate taký čistý ako adenovírus purifikovaný trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl. Predkladaný spôsob ďalej ponúka spôsob presnej kvantifikácie počtu adenovírusových častíc v roztoku adenovírusu, zahŕňajúci aplikáciu roztoku vzorky adenovírusu na aniónaktívnu chromatografickú živicu a následnú elúciu z tejto kolóny, porovnanie absorbancie roztoku vzorky adenovírusu a absorbancie štandardného roztoku adenovírusu a kvantifikáciu počtu adenovírusových častíc v roztoku vzorky.



SK 1568-2000 A3

Účinné čistenie adenovírusu

Oblasť techniky

Vynález sa týka účinnej purifikácie adenovírusu.

Doterajší stav techniky

Častice adenovírusov boli obvykle izolované s využitím protokolov na purifikáciu v hustotnom gradiente, napríklad s využitím gradientu chloridu cézneho (CsCl). Purifikácia v hustotnom gradiente je vhodná na preparácie v malom množstve, ale je časovo náročná a ťažko použiteľná vo väčšom meradle. Komerčne je preto využitie tohto spôsobu často nežiaduce.

Alternatívnou metódou purifikácie adenovírusov je kolónová alebo vsádzková chromatografia. Prvé pokusy o izoláciu vírusových častíc pomocou chromatografických techník využívajúcich náplne na báze dietylaminoetylovaných (DEAE) chromatografických živíc sú uvedené v rokoch 1959 až 1961. Haruna a spol. (Virology 13: 246-267 (1961)) uvádzali využitie DEAE chromatografie na meničoch iónov na purifikáciu adenovírusov typov 1, 3 a 8, zatiaľ čo Klemperer a Pereira (Virology 9: 536-545 (1959)) a Philipson (Virology 10: 459-465 (1960)) uvádzali ťažkosti pri použití rovnakej metódy pre iné typy adenovírusov. Použitie týchto techník nebolo do obdobia asi po roku 1965 príliš rozšírené, predovšetkým kvôli tomu, že chromatografické matrice mali tendenciu sa pri separáciách rúcať. Vzhľadom na selektivitu vtedy dostupných chromatografických živíc boli chromatografické purifikácie vírusov menej účinné než purifikačné techniky v hustotnom gradiente. Bigwood a spol. (EP 0213719) opisuje chromatografické živice s funkčnými skupinami polyamínov s 2 až 4 aminoskupinami, oddelenými 2 až 4 metylénovými skupinami. Bigwood a spol. však neopisujú použitie takýchto živíc na čistenie vírusov alebo iného biologického materiálu.

V poslednej dobe sa obnovil záujem o purifikáciu vírusov pomocou chromatografie. Použitie chromatografických živíc na purifikáciu vírusov ukázali napríklad Guillaume a spol. (WO 98/00524), Shabram a spol. (WO 96/27677) a Huyghe a spol. (Human Gene Therapy 6: 1403-1416 (1995)). V posledných pätnástich rokoch boli tiež vyvinuté novšie chromatografické náplne. Tieto náplne môžu byť rozdelené do štyroch skupín: (i) homogénne prekrížené polysacharidy zahrnujúce mäkké gély (napríklad agarózu), ktoré majú dobrú kapacitu, ale zlé rozlíšenie a tendenciu stláčať sa, (ii) makroporézne polyméry na báze syntetických polymérov, ku ktorým sa radia živice pre perfúziu chromatografiu umožňujúce lepšiu difuzivitu a vyššiu účinnosť, rýchlosť a rozlíšenie, (iii) tykadlové (tentakulárne) sorbenty, majúce "tykadlá", ktoré boli navrhnuté na rýchlejšiu interakciu s proteínmi (napríklad fraktogél) a (iv) materiály, kde je mäkký gél uzavretý v rigidnej schránke a tak využívajú vysokú kapacitu mäkkých gélov aj rigiditu pevných materiálov (napríklad Ceramic Hyper DTMF) (viď Boschetti, J. Chromatogr. 658: 207 (1994), Rodriguez, J. Chromatogr. 699: 47-61 (1997)).

Je žiaduce zvýšiť rýchlosť, jednoduchosť a účinnosť purifikácií, a to predovšetkým v prípade komerčných purifikácií vykonávaných vo veľkom meradle pomocou týchto techník. Vynález poskytuje taký proces na purifikáciu adenovírusu. Tieto a iné výhody predkladaného vynálezu a tiež ďalšie nové prvky budú zrejmé z opisu vynálezu, ktorý je tu predložený.

Podstata vynálezu

Vynález poskytuje spôsob obohatenia roztoku adenovírusom. Tento spôsob zahrnuje: (i) získanie zmesového roztoku obsahujúceho adenovírus a prinajmenšom jeden nežiaduci typ biomolekuly, (ii) nanosenie takého zmesového roztoku na chromatografickú živicu schopnú meniť anióny (menič aniónov) obsahujúce väzobnú časť vybranú zo skupiny zahrnujúcej dimetylamínopropyl, dimetylamínobutyl, dimetylamínioizobutyl a dimetylamínopentyl, a (iii) eluovanie adenovírusu z purifikačnej chromatografickej živice pomocou elučného roztoku. Spôsob môže ďalej zahŕňať predseparáciu zmesového roztoku obsahujúceho

adenovírus a najmenej jeden typ nežiaducej biomolekuly na chromatografickej živici meniacej anióny pred nanesením adenovírusu na chromatografickú živicu meniacu anióny.

Vynález poskytuje tiež spôsob purifikácie adenovírusu z buniek, ktoré sú adenovírusom infikované. Táto metóda zahŕňa lýzu buniek infikovaných adenovírusom, nanosenie lyzátu na jeden typ chromatografickej živice, eluovanie adenovírusu z chromatografickej živice a zbieranie frakcií obsahujúcich adenovírus, kde adenovírus je preukázateľne tak čistý ako po trojnásobnej purifikácii adenovírusu pomocou hustotného gradientu CsCl.

Vynález tiež poskytuje spôsob presnej kvantifikácie množstva častíc adenovírusu v roztoku adenovírusu, ako je roztok získaný zo surového lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, zahrňujúci (i) nanosenie vzorky roztoku adenovírusu na chromatografickú živicu meniacu anióny a obsahujúcu väzobnú časť vybranú zo skupiny zahrňujúcej dimetylamínopropyl, dimetylamínobutyl, dimetylamínioizobutyl a dimetylamínopentyl a elúciu z tejto chromatografickej živice, (ii) stanovenie absorbancie roztoku vzorky adenovírusu eluovaného z chromatografickej živice a absorbancie štandardného roztoku adenovírusu, (iii) porovnanie absorbancie vzorkového roztoku adenovírusu eluovaného z chromatografickej živice s absorbanciou štandardného roztoku adenovírusu a kvantifikáciu počtu častíc adenovírusu v roztoku vzorky.

Vynález môže byť najlepšie pochopený s odkazom na pripojené výkresy a nasledujúci podrobný opis výhodných uskutočnení.

Vynález je zameraný na spôsob obohatenia roztoku obsahujúceho adenovírus. "Adenovírusom" je myslený prirodzene sa vyskytujúci adenovírus a rekombinantný adenovírus. Pritom rekombinantný adenovírus môže byť infekčný i neinfekčný. Metóda zahŕňa získavanie zmesového roztoku obsahujúceho adenovírusy a prinajmenšom jeden nežiaduci typ biomolekuly "Biomolekulou" je myslená akákoľvek makromolekula, napríklad akýkoľvek proteín, uhľovodík, lipid alebo nukleová kyselina (napríklad DNA a RNA) apod. a tiež fragmenty takých molekúl. Používané slovo "roztok" je tu vo význame, v akom je v odbore bežne

používané a navyše je ním myslený i bunkový lyzát. Akýkoľvek roztok obsahujúci adenovírus môže byť obohatený metódou predloženou týmto vynálezom. Zmesový roztok adenovírusu sa obvykle získa infikovaním eukaryotických buniek adenovírusom, ako je tu definovaný, udržovaním buniek po dostatočne dlhé časové obdobie, aby mohlo dôjsť k amplifikácii počtu adenovírusových častíc, zhromaždením infikovaných buniek a ich lýz (rozbitím) v pufrovanom roztoku.

Výrazy "obohacovanie" a "purifikovanie" a tak isto "obohatený" a "purifikovaný" sú tu použité zameniteľne a znamenajú, že koncentrácia adenovírusu sa v danom objeme zvyšuje alebo zvýšila. Je žiaduce, aby obohatený alebo purifikovaný roztok adenovírusu bol tak čistý ako adenovírus purifikovaný trikrát v hustotnom gradiente (CsCl).

Pokiaľ sa purifikujú vírusy z infikovaných buniek (napríklad z eukaryotických buniek), je výhodné nenechať infekciu prebiehať až do štádia, kedy samotné vírusy spôsobia lýzu buniek, pretože za týchto podmienok prebieha lýza jednotlivých buniek v podstatne odlišných časoch a degradatívne enzýmy uvoľnené lýzovanými bunkami začnú napádať uvoľnené vírusy. Navyše tesne pred bunkovou lýzou spôsobenou adenovírusmi môžu dispozície bunkového metabolizmu zapríčiniť zníženie presnosti vírusovej replikácie. Preto sa odporúča lýzovať bunky predtým, než dôjde k ich lýze pôsobením adenovírusov

Na lýzu môže byť použitá akákoľvek vhodná metóda. Napríklad môžu byť bunky aj s živným médiom odstredené a médium nahradené roztokom silných detergentov a ďalších aditív (napríklad TritonTMX-100, Tween 20, Tween 80 alebo deoxycholát) a po vhodne dlhej inkubácii môže byť vzorka zhromaždená na ďalšie spracovanie. Alebo môžu byť bunky zhromaždené šetrnou centrifugáciou, tak aby sa sformovali do bunkovej pelety, a lýzované trojnásobným zmrazením a rozmrazením. Preferovanou alternatívnou technikou je použitie francúzskeho lisu alebo ešte lepšie mikrofluidizéru. Francúzske lisy a mikrofluidizéry účinne lýzujú eukaryotické bunky pomocou strižných síl, ktoré rozrušujú bunkové membrány. Postup využívajúci strižné sily je rýchlejší a reprodukovateľnejší než iné vhodné metódy na získanie roztoku obsahujúceho adenovírus z infekčnej bunkovej populácie (napríklad eukaryotických buniek). V súlade s tým môže byť zmesový

roztok obsahujúci adenovírus a prinajmenšom jeden nežiaduci typ biomolekuly na purifikáciu alebo obohatenie podľa metód opísaných v tomto vynáleze získaný mikrofluidizáciou bunkovej populácie infikovanej adenovírusmi.

Roztok, z ktorého má byť purifikovaný adenovírus, môže byť prípadne predčistený. Pokiaľ je požadované, môže byť také predčistenie uskutočnené stredne šetrnou centrifugáciou, aby boli odstránené veľké kusy zvyškov buniek a väčšie nerozrušené organely (pokiaľ sú prítomné). Bunkový lyzát môže byť tiež predčistený filtráciou. Predovšetkým môže byť použitá filtrácia s tangenciálnym tokom (TFF) v súlade so známymi metódami. Roztok môže byť prípadne inkubovaný s enzýmami schopnými rozkladať DNA a RNA (DNáza/RNáza), aby boli odstránené všetky DNA a RNA obsiahnuté v predčisťovaných bunkách, ktoré nie sú obsiahnuté v časticách adenovírusov.

Potom, ako je bunkový lyzát predčistený, môže byť prípadne predseparovaný na chromatografickej živici meniacej anióny pred vlastnou purifikáciou. Na predseparáciu môže byť použitá akákoľvek vhodná chromatografická živica meniacia anióny. Prednostne sa na predseparáciu používa chromatografická živica meniacia anióny, ktorá má povrchové skupiny derivatizované terciárnym alebo kvartérnym amínom (napríklad dietylaminoetyl, trimetylaminoetyl alebo trimetylaminoethyl). Povrchová skupina môže byť spojená s nosnou maticou (nosičom) pomocou akejkoľvek v odbore používanej spojovacej skupiny. Medzi vhodné spojovacie skupiny v kontexte tohto vynálezu patria tie, ktoré sú na báze akrylových polymérov. Nosná matica môže byť tvorená akýmkoľvek vhodným materiálom. Prednostne sa na nosné matrice používa materiál založený na koncepte "mäkký gél v rigidnej schránke". Táto "gélom plnená" chromatografická živica spojuje výhodu vysokej kapacity mäkkých gélov, napríklad agarózy, a rigidity pevných materiálov pri vysokých prietokových rýchlostiach a ich zvýšenej odolnosti proti stlačovaniu, zmršťovaniu a nadúvaniu sa, čo sú vlastnosti bežné u mäkkých gélov. Tieto "gélom plnené" chromatografické živice sú veľmi rozšírené a sú opísané napríklad v patentoch U. S. č. 5,268,097 a 5,672,276.

V kontexte tohto vynálezu je na predseparáciu žiaduca chromatografická živica meniacia anióny Q Ceramic HyperDTMF, ktorá je komerčne dostupná od

BioSeptra, Villeneuve-La-Garenne, Francie. Q Ceramic HyperDTMF je zložená z vysoko poréznych keramických guľiek naplnených flexibilným hydrofilným gélom s funkčnými skupinami. Priemerná veľkosť guľky je 50 μm (rozmedzie veľkosti častíc je 25 až 75 μm). Q Ceramic HyperDTMF má dynamickú kapacitu prinajmenšom 85 mg/ml hovädzieho sérového albumínu (BSA) pri 200 cm/h s 50% prierazom (breakthrough) a prinajmenšom 80 mg/ml hovädzieho sérového albumínu (BSA) pri 600 cm/h s 50% prierazom (prielomom). Kvôli gélom-plnenej povahe vykazuje náplň Q Ceramic HyperDTMF väčšiu povrchovú plochu dostupnú na viazanie v porovnaní s klasickými porézными médiami, v ktorých je obvykle najmenej 50% vonkajšku častice tvorených vstupmi do pórov, kde nedochádza k naviazaniu. V dôsledku toho 100 % celkovej vonkajšej plochy Q Ceramic HyperDTMF prispieva k viazaniu. Vďaka tomuto rysu je táto chromatografická živica na predčisťovanie uprednostňovaná.

Alternatívou je predčistenie bunkového lyzátu na expandovaných guľkách adsorpčného meniča aniónov. Napríklad môže byť použitá chromatografická živica meniaci anióny na expandovaných adsorpčných guľkách s väzbovými časťami derivatizovanými kvartérnym amínom (napríklad trimetylaminometyl alebo DEAE). Pre expandované chromatografické náplne s živicami meniacimi anióny je charakteristický väčší priemer guľiek, napríklad väčší než 30 μm , ale obvykle neprekračujúci 500 μm . Vďaka značnej veľkosti guľiek môžu veľké fragmenty bunkových zvyškov a celé (nelýzované) bunky pretekať voľne chromatografickou živicom (a fritou jej prispôsobenej veľkosti). Medzi vhodné adsorpčné chromatografické živice s expandovanou náplňou patrí Streamline QXL[®] (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) a DEAE Cellthru-Big BeadsTM (Sterogene, Carlsbad, CA, alebo ekvivalent od UpFront Chromatography, Kodaň, Dánsko).

Bunkový lyzát je eluovaný z chromatografickej živice meniacej anióny akýmkoľvek vhodným eluentom (napríklad 600 mM NaCl). Pokiaľ je to potrebné, je roztok vhodne zriedený na nižšiu koncentráciu elučného činidla, alebo iných činidiel v elučnom pufri. Potom môže byť poloprečistený a koncentrovaný bunkový lyzát nanosený na vhodnú chromatografickú živicu meniacu anióny a purifikovaný.

Ako vyplýva z vyššie uvedeného, ponúka tento vynález metódu umožňujúcu zvýšiť koncentráciu adenovírusu v roztoku. Metóda zahrnuje (i) získanie zmesového roztoku obsahujúceho adenovírus a najmenej jeden nežiaduci typ biomolekuly; (ii) nanosenie tohto zmesového roztoku na chromatografickú živicu meniacu anióny; a (iii) eluovanie adenovírusu z chromatografickej živice pomocou takého eluentu, aby bol získaný roztok obohatený o adenovírus. Navyše môže byť zmesový roztok adenovírusu prípadne klarifikovaný (vyčírený) pomocou filtrácie s tangenciálnym tokom. Ďalej môže byť vyčírený roztok prípadne predseparovaný pomocou chromatografie na meničoch aniónov.

V tomto ohľade ponúka tento vynález tiež metódu umožňujúcu purifikovať adenovírus z buniek adenovírusom infikovaných. Táto metóda zahrnuje lýzu buniek infikovaných adenovírusom, aplikáciu lyzátu na jedinú chromatografickú živicu, ktorá naviaže adenovírus, elúciu adenovírusu z chromatografickej živice a zbieranie frakcie obsahujúcej adenovírus. Adenovírus vo frakcii je v podstate tak čistý, ako adenovírus po trojnásobnej purifikácii v hustotnom gradiente CsCl.

Akákoľvek vhodná chromatografická živica môže byť použitá na purifikáciu adenovírusu z bunkového lyzátu. Akákoľvek vhodná chromatografická živica meniaci anióny a majúca povrchové skupiny vybrané zo skupiny zahrnujúcej dimetylaminopropyl, dimetylaminobutyl, dimetylaminoizobutyl a dimetylaminopentyl môže byť použitá na purifikáciu adenovírusu zo zmesového roztoku obsahujúceho adenovírus a najmenej jeden nežiaduci typ biomolekuly. Ako povrchová skupina býva prednostne používaný dimetylaminopropyl. Povrchová skupina môže byť pripojená k nosiču pomocou akejkoľvek používanej vhodnej spojovacej skupiny. V kontexte tohto vynálezu patrí medzi vhodné sulfónamidové a akrylátové spojovacie skupiny. Nosič matrice môže byť tvorený akýmkoľvek vhodným materiálom; je však výhodné pokiaľ je tvorený takou perfúznou chromatografickou živcou meniacou anióny, aby bol optimalizovaný transport do vnútra častíc náplne.

Typické perfúzne chromatografické živice majú na povrchu častíc veľké (napríklad 6000 až 8000 Å) póry. Sieť menších pórov, obmedzujúca dĺžku difúz-

nych dráh, zväčšuje povrchovú plochu pórov s veľkými priermi. Vďaka tejto bimodálnej distribúcii veľkostí pórov využíva mobilnú fázu s adenovírusom, ktorá vstupuje a preteká časticami chromatografickej živice, ako konvektívneho, tak difúzneho transportu. Takáto perfúzna chromatografická živica je dobre známa a podrobnejšie ju opisuje 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 kontexte tohto vynálezu je vhodnou perfúznou chromatografickou živicom meniacou anióny POROS® 50D, ktorá je komerčne dostupná od PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts. POROS® 50D je chromatografická živica na báze kopolyméru styrén-divinylbenzén, ktorá má dynamickú kapacitu prinajmenšom 100 mg/ml hovädzieho sérového albumínu (BSA) pri 100 cm/h s 50% prierazom (breakthrough) a prinajmenšom 80mg/ml BSA pri 1000 cm/h s 5% prierazom. POROS 50D vykazuje zníženie tlaku menej než 3 bary pri 1000 cm/h v 10 cm vrstve chromatografickej živice a pri menovitej veľkosti častice chromatografickej živice okolo 50 μm (t. j. priemerná veľkosť častice sa pohybuje v rozmedzí (25 až 100 μm)).

Chromatografická živica meniacia anióny môže byť použitá buď vsádzkovo (batch), alebo výhodnejšie v prietokovom (flow-through) usporiadaní, prednostne na kolóne (kolóna naplnená chromatografickou živicom), predovšetkým pokiaľ ide o perfúzne chromatografické živice. Okrem toho ponúka predkladaný vynález v kontraste k skôr používaným metódam jednoduchú a rýchlu chromatografickú purifikáciu adenovírusu ľahko uskutočniteľnú do iného meradla

Adenovírus purifikovaný podľa vynájdenej metódy nemá nižší pomer častice vzhľadom na pfu (pu/pfu) než adenovírus purifikovaný v hustotnom gradiente (CsCl). Takže pu/pfu purifikovaného adenovírusu je prinajmenšom 50 % v porovnaní s adenovírusom purifikovaným v hustotnom gradiente CsCl, výhodne prinajmenšom 85 % v porovnaní s adenovírusom purifikovaným v hustotnom gradiente CsCl a predovšetkým prinajmenšom 96 % v porovnaní s adenovírusom purifikovaným trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl. Okrem toho čistota adenovírusu po chromatografii prevyšuje čistotu rovnakého roztoku adenovírusu, ktorý je analyticky nerozlišiteľný od adenovírusu purifikovaného štandardným

spôsobom v hustotnom gradiente CsCl (to je v podstate tak čistý ako adenovírus purifikovaný trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl, napríklad prinajmenšom z 90 % tak čistý, výhodne prinajmenšom z 97 % tak čistý a výhodnejšie z 99 % tak čistý ako adenovírus purifikovaný trojnásobne v gradiente CsCl).

Podstatné a vhodné obohatenie adenovírusu v roztoku je dosiahnuté jeho eluovaním pomocou vhodného eluentu z chromatografickej živice meniacej anióny. Typické vhodné eluenty sú roztoky s veľkou koncentráciou iónov, takže ióny súťažia s adenovírusom o väzbu na chromatografickú živicu. Prednostne je na kolónu privádzaný gradient eluentu. Gradient eluentu je buď diskontinuálny, t. j. vo dvoch alebo viac krokoch, alebo kontinuálny. Také gradienty môžu byť lineárne, konkávne alebo konvexné. Vhodným eluentom je chlorid sodný v pufrovanom roztoku. Napríklad adenovírus je eluovaný z chromatografickej živice Q Ceramic Hyper D®F v rozmedzí koncentrácií chloridu sodného okolo 360 mM až okolo 475 mM, presnejšie pri zhruba 415 mM NaCl a z chromatografickej živice POROS® 50D v rozmedzí koncentrácií chloridu sodného okolo 360 mM až okolo 450 mM, presnejšie pri zhruba 410 mM NaCl.

Vzorky môžu byť výhodne dávkované na chromatografickú živicu meniacu anióny pri vysokých koncentráciách elučných činidiel (napr. najmenej pri 75 % koncentrácii nevyhnutnej na eluovanie adenovírusu z chromatografickej živice, výhodnejšie okolo 85 % až okolo 90 % koncentracie nevyhnutnej na eluovanie adenovírusu z chromatografickej živice). Dávkovaním vzorky pri vysokých koncentráciách elučného činidla na chromatografickú živicu meniacu anióny sa dočielí to, že sa určité nečistoty nenaviažu na živicu.

Elúcia obohateného adenovírusu môže byť vykonávaná pri akomkoľvek vhodnom prietoku. Typické prietoky pre predseparácie na chromatografickej živici meniacej anióny sa pohybujú od zhruba 100 cm/h až do zhruba 1000 cm/h, prednostne od asi 200 cm/h do asi 500 cm/h. Typické prietoky pre chromatografické živice meniace anióny s väzbovými skupinami, ako je demetylamínopropyl, dimetylamínobutyl, dimetylamínioizobutyl a dimetylamínopentyl, sú zhruba 100 cm/h až zhruba 1500 cm/h, prednostne od zhruba 500 cm/h do zhruba 1250 cm/h

S cieľom správne kvantifikovať počet adenovírusových častíc vo vzorke roztoku adenovírusu, takom ako je roztok získaný zo surového lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, môže byť roztok vzorky adenovírusu pripravený vyššie opísaným spôsobom. Vzorka roztoku adenovírusu môže byť potom obohatená a purifikovaná aplikáciou na chromatografickú živicu meniacu anióny a následnou elúciou roztoku adenovírusu z tejto živice vyššie opísaným spôsobom. Potom je stanovená absorbanca vzorky adenovírusu eluovaného z chromatografickej živice. Na porovnanie je určovaná absorbanca štandardného roztoku adenovírusu, t. j. roztoku známej koncentrácie. Z porovnania absorbanca roztoku vzorky a absorbanca štandardného roztoku sa určí koncentrácia adenovírusových častíc, t. j. počet adenovírusových častíc v danom objeme v roztoku vzorky.

Štandardnou absorbancom môže byť jediná štandardná absorbanca alebo séria či skupina štandardných absorbancaí určitého koncentračného rozsahu adenovírusu. Absorbanca vzorky a štandardná absorbanca môžu byť prezentované v podobných, alebo rôznych (prednostne podobných) formátoch, meraniach, alebo jednotkách, pokiaľ však môže byť dosiahnuté užitočné porovnanie. Napríklad vhodná štandardná absorbanca môže byť absorbanca, ktorá bola stanovená v štandardnom roztoku adenovírusu, ktorý bol získaný rovnakým spôsobom, ako vzorka roztoku adenovírusu podľa metód opísaných v tomto vynáleze.

Kvantifikácia počtu adenovírusových častíc je vykonávaná porovnávaním absorbanca vzorky so štandardom akýmkoľvek vhodným spôsobom. Napríklad môžu byť absorbanca vzorky a absorbanca štandardu porovnávané vypočítaním štandardnej krivky plochy pod vrcholom zodpovedajúcej elúcie vírusu z chromatografickej živice; v chromatograme je vynesená absorbanca proti času. Absorbanca rôznych známych koncentracií adenovírusu môže byť zakreslená do grafu a tak vznikne štandardná (kalibračná) krivka. Koncentrácia vzorky môže byť potom určená pomocou lineárnej regresie

Adenovírus obohatený v roztoku alebo purifikovaný z buniek infikovaných adenovírusom pomocou chromatografických živíc meniacich anióny môže byť získaný v roztokoch obsahujúcich vysoké koncentrácie elučného činidla, napri-

klad NaCl. Zloženie pufru môže byť ľahko zmenené akoukoľvek vhodnou technikou na akýkoľvek požadovaný pufer, napríklad sterilný izotonický pufer na injekcie cicavcom (napríklad Ringerov roztok) obsahujúci vhodné stabilizátory a kryto konzervačné látky na dlhodobé skladovanie purifikovaného adenovírusu. Vhodné techniky na zmenu zloženia pufru zahŕňujúce dialýzu, diafiltráciu a chromatografiu na molekulových sitách (niekedy tzv. gélová permeačná chromatografia) a ďalšie techniky. Medzi vhodné matrice pre chromatografiu na molekulových sitách patrí Toyopearl HW-40C a Toyopearl HW40F (TosoHaas, Montgomeryville, PA); Uniflow™, Superflow™ a Ultraflow™ (Sterogene, Carlsbad, CA); Shodex™ (Thomson Instruments, Chantilly, VA); a Bio-Sil™ a Bio-Gel™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Každá z týchto chromatografických živíc má dostatočne nízky potenciál viazať proteíny.

Predkladaný vynález je detailnejšie opísaný na nasledujúcich príkladoch. Tieto príklady slúžia len na objasnenie vynálezu, ale v žiadnom prípade nemajú obmedzovať rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 predstavuje chromatogram bunkového lyzátu infikovaného adenovírusom, eluovaného z chromatografickej živice so skupinou kvartérneho amínu (Q Ceramic HyperD™F), kde os y predstavuje absorbanciu (pri 260 a 280 nm), os x znázorňuje elučný čas (min) a paralelná os y (napravo) znázorňuje vodivosť elučného činidla na kolóne (čiarkovaná čiara, mS).

Obr. 2 predstavuje chromatogram lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, prečisteného pomocou filtrácie s tangenciálnym tokom a inkubáciou s DNázou/RNázou (Benzonase[®]) a eluovaného z chromatografickej živice so skupinou kvartérneho amínu (Q Ceramic HyperD™F), kde os y predstavuje absorbanciu (pri 260 a 280 nm), os x znázorňuje elučný čas (min) a paralelná os y (napravo) znázorňuje vodivosť elučného činidla na kolóne (čiarkovaná čiara, mS).

Obr. 3 predstavuje chromatogram lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, eluovaného z adsorpčnej chromatografickej živice s expandovanými časticami (Streamline QXL[®]), kde os y predstavuje absorbanciu (pri 260 a 280 nm), os x znázorňuje elučný čas (min) a paralelná os y (napravo) znázorňuje vodivosť elučného činidla na kolóne (čiarkovaná čiara, mS).

Obr. 4 predstavuje chromatogram lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, purifikovaného trojnásobnou centrifugáciou v gradiente CsCl a kvantifikovaného na dimetylaminopropyl perfúznej (POROS[®]50D) analytickej kolóne, kde os y predstavuje absorbanciu (pri 260 a 280 nm), os x znázorňuje elučný čas (min).

Obr. 5 predstavuje chromatogram lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, eluovaného z adsorpčnej chromatografickej živice s expandovanými časticami (Streamline QXL[®]) a dvakrát z dimetylaminopropyl perfúznej (POROS^R50D) chromatografickej živice, kde os y predstavuje absorbanciu (pri 260 a 280 nm), os x znázorňuje elučný čas (min).

Obr. 6 predstavuje chromatogram lyzátu buniek infikovaných adenovírusom, eluovaného z dimetylaminopropyl perfúznej (POROS[®]50D) chromatografickej živice, kde os y predstavuje absorbanciu (pri 260 a 280 nm), os x znázorňuje elučný čas (min).

Príklady uskutočnení vynálezu

Príklad 1

Tento príklad demonštruje purifikáciu adenovírusu zo surového bunkového lyzátu. Purifikácia bola uskutočnená predčistením, t.j. vyčistením bunkového lyzátu, nanosením lyzátu na živicu meniacu anióny a následnou elúciou a nakoniec nanosením bunkového lyzátu na chromatografickú živicu meniacu anióny s väzbovými skupinami vybranými zo súboru zahrnujúceho dimetylaminopropyl,

dimetylamínopentyl, dimetylamínioizobutyl a dimetylamínopentyl a následnou elúciou

AdSEAP a AdVEGF₁₂₁ sú vektory adenovírusu s deléciou v E1 a E3 regiónoch adenovírusového genómu obsahujúceho kazetu génovej expície, v tomto prípade cytomegalovírusový (CMV) promótor operabilne pripojený k cudziemu génu (transgénu), napríklad sekrečnej alkalickej fosfatázy (AdSEAP) alebo vasikulárneho endoteliálneho rastového faktoru 121 (AdVEGF₁₂₁), v E1 regióne adenovírusového genómu. AdSEAP a AdVEGF₁₂₁ boli propagované v odstred'ovacích bankách, valcových fľašiach, trepacích fľašiach alebo bioreaktoroch obsahujúcich okolo 10⁵ až 10⁶ 293 buniek na ml v prítomnosti alebo v neprítomnosti séra v rastovom médiu.

Pred chromatografickou separáciou boli bunky a média spracovávané jednou z nasledujúcich metód: (a) bunky boli zakoncentrované centrifugáciou a resuspendované vo vhodnom pufré (25 mM Tris, pH 7.8, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) pre optimálnu aktivitu DNázy/RNázy, lýzované v mikrofluidizére (Microfluidics, Newton, Massachusetts) podľa pokynov výrobcu a klarifikované filtráciou; alebo (b) bunky boli lýzované priamo v mikrofluidizére podľa pokynov výrobcu, klarifikované filtráciou, koncentrované a diafiltrované do vhodného vyššie opísaného pufru pomocou filtrácie s tangenciálnym tokom (TFF). Pri použití oboch metód bol klarifikovaný bunkový lyzát inkubovaný s DNázou/RNázou ako je Benzonase® (Nycomed Pharma A/S, Denmark) podľa pokynov výrobcu a rozpustený vo vhodnom pufré na chromatografickú predseparáciu na meničoch aniónov

Bunkový lyzát bol potom nanesený na kolónu Q Ceramic HyperDTMF a eluovaný krokovým gradientom 360 až 460 mM NaCl. Obr. 1, ktorý je chromatografiou bunkového lyzátu infikovaného adenovírusom a eluovaného z chromatografickej živice modifikovanej kvartérnym amínom (kolóna Q Ceramic HyperDTMF), znázorňuje elúciu adenovírusu z predseparačnej kolóny meniacej anióny (Q Ceramic HyperDTMF) v prípade, keď nebola uskutočnená inkubácia s DNázou/RNázou. Koncentrovaný a čiastočne purifikovaný vírusový pík, ktorý sa eluuje okolo 415 mM NaCl, keď je na elúciu použitý krokový gradient 360, 450 a

1000 mM NaCl, bol obsiahnutý v jednej frakcii okolo 51 minút. Obr. 2, ktorý je chromatografiou bunkového lyzátu infikovaného adenovírusom, klarifikovaného pomocou filtrácie s tangenciálnym tokom a inkubovaného s DNázou/RNázou a eluovaného z chromatografickej živice modifikovanej kvartérnym amínom, znázorňuje elúciu adenovírusu pri predseparácii z kolóny meniacej anióny, Q Ceramic HyperDTMF, keď bola použitá DNáza/RNáza (Benzonase®). Bolo pozorované významné zníženie veľkosti píku nukleovej kyseliny eluujúcej sa po víruse.

Eluent z predchromatografie na meničoch aniónov bol potom zriedený asi o 30 %, čo je nevyhnutné zriedenie elučného činidla, v tomto prípade NaCl, na koncentráciu menšiu, než je elučná koncentrácia na perfúziu chromatografickú kolónu so skupinami dimetylamínopropylu (POROS® 50D), ktorá bola použitá na dokončenie purifikácie adenovírusu zo surového bunkového lyzátu. Dávkovanie na kolónu POROS® 50D bolo vykonávané pri koncentrácii 300 mM NaCl. Elúcia z kolóny bola vykonávaná krokovým gradientom chloridu sodného (od 360 mM do 450 mM).

Chromatogram bunkového lyzátu infikovaného adenovírusom klarifikovaného filtráciou s tangenciálnym tokom, inkubovaného s DNázou/RNázou a eluovaného z chromatografickej kolóny s kvartérnym amínom a perfúznej chromatografickej kolóny s dimetylamínopropylom, znázorňuje elúciu adenovírusu z kolóny POROS® 50D. V podstate bol získaný len jediný ostrý pík s retenčným časom zhruba 35 minút. Analytická charakterizácia purifikovaného adenovírusu ukázala, že čistota adenovírusu bola v podstate nerozlišiteľná od adenovírusu purifikovaného trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl.

Preto bol adenovírus purifikovaný zo surového bunkového lyzátu filtráciou bunkového lyzátu, predseparáciou bunkového lyzátu na kolóne s kvartérnym amínom meniacej anióny a nakoniec nástrekom bunkového lyzátu na kolónu so skupinami dimetylamínopropylu meniacu anióny a následnou elúciou z tejto kolóny.

Príklad 2

Tento príklad demonštruje purifikáciu adenovírusu zo surového bunkového lyzátu. Purifikácia bola uskutočnená klarifikáciou bunkového lyzátu, predseparáciou bunkového lyzátu na kolóne s expandovanou adsorpčnou náplňou meniacej anióny a nakoniec separáciou bunkového lyzátu na kolóne meniacej anióny s väzbovými skupinami vybranými zo súboru zahrnujúceho demetylaminopropyl, dimetylaminopentyl a dimetylaminoizobutyl.

AdSEAP (adenovírusový vektor opísaný v príklade 1) bol propagovaný v odstreďovacích bankách obsahujúcich 10^5 - 10^6 293 buniek na ml. Bunky a médium boli lýzované v mikrofluidizére podľa pokynov výrobcu. Bunkový lyzáat bol dávkovaný na predkolónu s expandovanou adsorpčnou náplňou meniča aniónov Streamline QXL® (Pharmacia, Uppsala, Švédsko) (aby boli odstránené veľké zvyšky buniek a nelýzované bunky). Kolóna Streamline QXL® tiež slúžila na čiastočnú purifikáciu a zakoncentrovnie adenovírusu. Obr. 3, ktorý je chromatogramom bunkového lyzátu infikovaného adenovírusom, eluovaného z expandovanej adsorpčnej chromatografickej náplne, ukazuje elúciu adenovírusu z kolóny Streamline QXL®. Pík zodpovedajúci vírusu bol obsiahnutý vo frakcii 14 (jedna frakcia za minútu), ktorá sa eluovala pri 600 mM NaCl. Eluent z kolóny Streamline QXL® bol nariedený asi 1:2. Toto nariedenie bolo nevyhnutné, aby bolo zriedené elučné činidlo, v tomto prípade NaCl, na koncentráciu nižšiu než je elučná koncentrácia z kolóny POROS® 50 D, ktorá bola následne použitá.

Kolóna POROS® 50 D bola použitá na dokončenie purifikácie adenovírusu. Dávkovanie na POROS® 50 D bolo vykonávané pri koncentrácii 300 mM NaCl. Elúcia z kolóny bola potom vykonávaná lineárnym gradientom chloridu sodného (od 360 mM do 450 mM), v ktorom sa adenovírus eluje z kolóny POROS® 50 D. Chromatogram bunkového lyzátu infikovaného adenovírusom, eluovaného z adsorpčnej chromatografickej živice s expandovanou náplňou a dimetylaminopropyl-perfúznei chromatografickej živice ukazuje v podstate len jeden ostrý pík v približne 15 minútach, keď sa eluje lineárnym gradientom NaCl od 360 do 450 mM tak, že vírus je eluovaný pri zhruba 400 mM NaCl. Analytická charakterizácia purifikovaného adenovírusu preukázala, že čistota adenovírusu

su bola v podstate nerozlišiteľná od adenovírusu purifikovaného trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl (vid' obr. 4).

Z toho dôvodu bol adenovírus purifikovaný zo surového bunkového lyzátu filtráciou bunkového lyzátu, nástrekom bunkového lyzátu na predkolónu s expandovanou náplňou meniacu anióny a následnou elúciou z tejto kolóny a nakoniec aplikáciou bunkového lyzátu na kolónu obsahujúcu skupiny dimetylamínopropylu meniacu anióny a následnou elúciou z tejto kolóny.

Príklad 3

Tento príklad demonštruje - v zreteľnom protiklade k doterajším metódam - purifikáciu adenovírusu na jedinej chromatografickej kolóne zo surového bunkového lyzátu, pri ktorej bola purifikáciou dosiahnutá prinajmenšom 95% čistota adenovírusu purifikovaného v trojnásobnom hustotnom gradiente CsCl. Navyše táto technika ponúka rýchlu a presnú metódu kvantifikácie celkového počtu vírusových častíc v surovom lyzáte.

Nárast a lýza AdSEAP (adenovírusový vektor z príkladu 1) boli vykonávané ako v príklade 1, metóda (a). Bunkový lyzáat bol dávkovaný na POROS® 50 D v 360 mM NaCl. Elúcia z kolóny bola uskutočnená tak, ako je uvedené v príklade 1 a bol získaný chromatogram absorbancie (260 nm a 280 nm) proti času (min), znázornený na obr. 6. Analytická skúška frakcie zodpovedajúca píku preukázala, že purifikácia bola nerozlišiteľná od adenovírusu purifikovaného trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl (obr. 5 a 6), kde horná horizontálna čiara predstavuje meranie vodivosti, ktoré indikuje aktuálnu koncentráciu NaCl. Podstatné prekrytie absorbancie píku pri 260 nm (vyššia čiara v chromatograme) a pri 280 nm (nižšia čiara v chromatograme), čo bolo 1,27 ($1,25 \pm 0,08$ bol empiricky stanovený pomer čistého vírusu), ukazujúce, že vírus bol v podstate čistý.

Rôzne roztoky adenovírusu známej koncentrácie boli dávkované na kolónu POROS® 50D v 360 mM NaCl. Elúcia z kolóny bola uskutočnená tak, ako je uvedené v príklade 1 a na chromatograme bola zaznamenaná absorbancia (260 a

280 nm) proti elučnému (retenčnému) času. Plocha píku (pod píkom) zodpovedajúca elúcii adenovírusu bola určená pre rôzne koncentrácie a zakreslená (vynesená) do grafu ako plocha proti koncentrácii adenovírusu. Plocha pod krivkou AdSEAP v chromatograme na obr. 5 zodpovedajúca elúcii adenovírusu bola vypočítaná a porovnaná so štandardnou krivkou pomocou lineárnej regresie a bolo určené, že surový lyzát obsahuje $4,64 \times 10^{10}$ pu/ml.

Takto predstavuje predkladaný vynález jedнокrokovú metódu na purifikáciu adenovírusu z lyzátu celých buniek. Preto bol adenovírus, ktorý bol prinajmenšom z 95% tak čistý ako adenovírus po trojnásobnej purifikácii v hustotnom gradiente CsCl, purifikovaný zo surového bunkového lyzátu na jedinej chromatografickej kolóne. Navyše bol rýchlo a presne kvantifikovaný celkový počet adenovírusov v surovom bunkovom lyzáte.

Príklad 4

Tento príklad demonštruje, že zloženie pufru s adenovírusom izolovaným z kolón meniacich anióny môže byť ľahko zmenené (napríklad z vysokej koncentrácie soli na nízku koncentráciu soli).

Zhruba 0,1 objemu kolóny (0,01 až asi 0,25 objemu kolóny) roztoku obsahujúceho adenovírus z príkladu 1 bolo dávkované na kolónu Toyopearl HW-40C, alebo na kolónu Uniflow 4 ekvilibrovanú vhodným sterilným izotonickým roztokom na injekcie cicavcom (napr. Ringerov roztok) a obsahujúce vhodné stabilizátory a kryto konzervačné látky pre dlhodobé skladovanie purifikovaného adenovírusu. Chromatografická frakcia obsahujúca adenovírus bola identifikovaná spektroskopiou (in-line) a zbieraná. Purifikovaný vírus bol obsiahnutý v pufre obsahujúcom asi 10 mM Tris, pH 7,8, 75 mM NaCl a rôzne stabilizátory.

Všetky odkazy, ktoré sú tu citované, vrátane prihlášok vynálezov a publikácií sú zahrnuté v celom ich rozsahu odkazom.

Zatiaľ čo tento vynález bol opísaný s dôrazom na preferované uskutočnenia, bude kvalifikovaným v odbore zrejmé, že môžu byť použité varianty prefe-

rovaných uskutočnení, a že je zamýšľané, aby vynález mohol byť vykonávaný aj inak, než je tu špecificky opísané. Teda tento vynález zahrnuje všetky modifikácie zahrnuté v duchu a rámci tohto vynálezu, tak ako je definované nasledujúcimi patentovými nárokmi.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob obohacovania roztoku adenovírusom, **vyznačujúci sa tým, že zahŕňa:**
 - (i) získavanie zmesového roztoku obsahujúceho adenovírus a najmenej jeden nežiaduci typ biomolekuly,
 - (ii) dávkovanie uvedenej zmesi na chromatografickú živicu meniacu anióny obsahujúcu väzbovú skupinu vybranú zo súboru zahrnujúceho dimetylaminopropyl, dimetylaminobutyl, dimetylaminoizobutyl a dimetylaminopentyl, tak, že sa adenovírus na uvedenú chromatografickú živicu viaže; a
 - (iii) eluovanie uvedeného adenovírusu z uvedenej chromatografickej živice eluentom tak, že je získaný roztok obohatený adenovírusom.
2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že uvedenou väzbovou skupinou je dimetylaminopropyl**
3. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 alebo 2, **vyznačujúci sa tým, že uvedeným eluentom je eluent s kontinuálnym alebo diskontinuálnym gradientom**
4. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým, že uvedeným eluentom je gradientový eluent zahrnujúci gradient chloridu sodného.**

5. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, **vyznačujúci sa tým, že** uvedenou chromatografickou živcou meniacou anióny je perfúzna chromatografická živica meniaci anióny
6. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, **vyznačujúci sa tým, že** uvedený zmesový roztok zahrnujúci adenovírus a prinajmenšom jeden nežiaduci typ biomolekuly je získaný mikrofluidizáciou populácie buniek infikovaných adenovírusom.
7. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, **vyznačujúci sa tým, že** uvedený spôsob ďalej zahrnuje: (i) aplikáciu uvedenej zmesi obsahujúcej adenovírus a prinajmenšom jeden nežiaduci typ biomolekuly na pred-živicu meniacu anióny a elúciu uvedeného adenovírusu z uvedenej pred-živice a potom v kroku (ii) namiesto aplikácie uvedeného zmesového roztoku, aplikáciu adenovírusu eluovaného z uvedenej pred-živice na uvedenú chromatografickú živicu meniacu anióny.
8. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že** uvedenou pred-živcou meniacou anióny je živica s kvartérnym aminom.
9. Spôsob podľa nároku 8, **vyznačujúci sa tým, že** uvedenou pred-živcou meniacou anióny je adsorpčná živica s plochou alebo expandovanou náplňou.
10. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9, **vyznačujúci sa tým, že** krok (ii) sa uskutočňuje v roztoku obsahujúcom prinajmenšom 75 % kon-

centrácie elučného činidla požadovaného na elúciu uvedeného adenovírusu z uvedenej chromatografickej živice meniacej anióny.

11. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 10, **vyznačujúci sa tým, že** uvedený styk uvedeného zmesového roztoku s chromatografickou živicom meniacou anióny sa uskutočňuje v roztoku obsahujúcom od asi 85 % do asi 90 % koncentrácie elučného činidla požadovaného na elúciu uvedeného adenovírusu z uvedenej chromatografickej živice meniacej anióny.

12. Spôsob presnej kvantifikácie počtu adenovírusových častíc v roztoku vzorky, **vyznačujúci sa tým, že** zahrnuje:
 - (i) obohacovanie roztoku vzorky adenovírusom spôsobom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11;
 - (ii) určovanie absorpcie roztoku vzorky, ktorý bol obohatený spôsobom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 a štandardného roztoku adenovírusu;
 - (iii) porovnávanie absorpcie roztoku vzorky a štandardného roztoku; a
 - (iv) kvantifikáciu počtu adenovírusových častíc v uvedenom roztoku vzorky.

13. Spôsob podľa nároku 12, **vyznačujúci sa tým, že** roztok vzorky je pripravený zo surového bunkového lyzátu adenovírusom infikovaných buniek.

14. Spôsob purifikácie adenovírusu z buniek infikovaných adenovírusom, **vyznačujúci sa tým, že** zahrnuje lýzovanie uvedených buniek, aplikáciu lyzátu na jedinú chromatografickú živicu tak, že sa uvedený adenovírus via-

že na uvedenú chromatografickú živicu, elúciu uvedeného adenovírusu z uvedenej chromatografickej živice a zbieranie frakcie obsahujúcej uvedený adenovírus, pričom uvedený adenovírus je v podstate tak čistý, ako adenovírus purifikovaný trojnásobne v hustotnom gradiente CsCl.

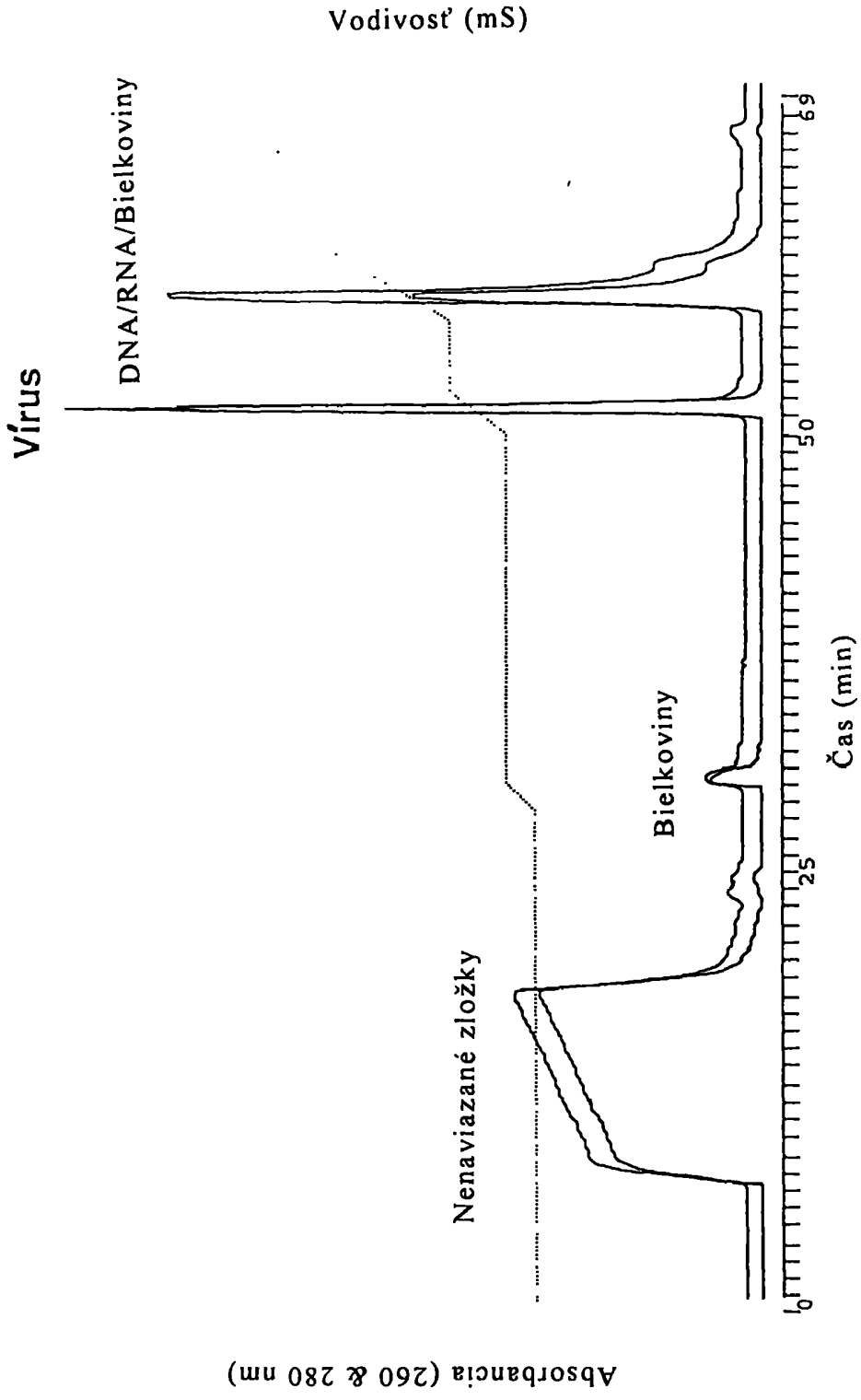
15. Spôsob presnej kvantifikácie počtu adenovírusových častíc v roztoku vzorky, vyznačujúci sa tým, že zahrnuje:

(i) purifikáciu roztoku vzorky adenovírusu spôsobom podľa nároku 14;

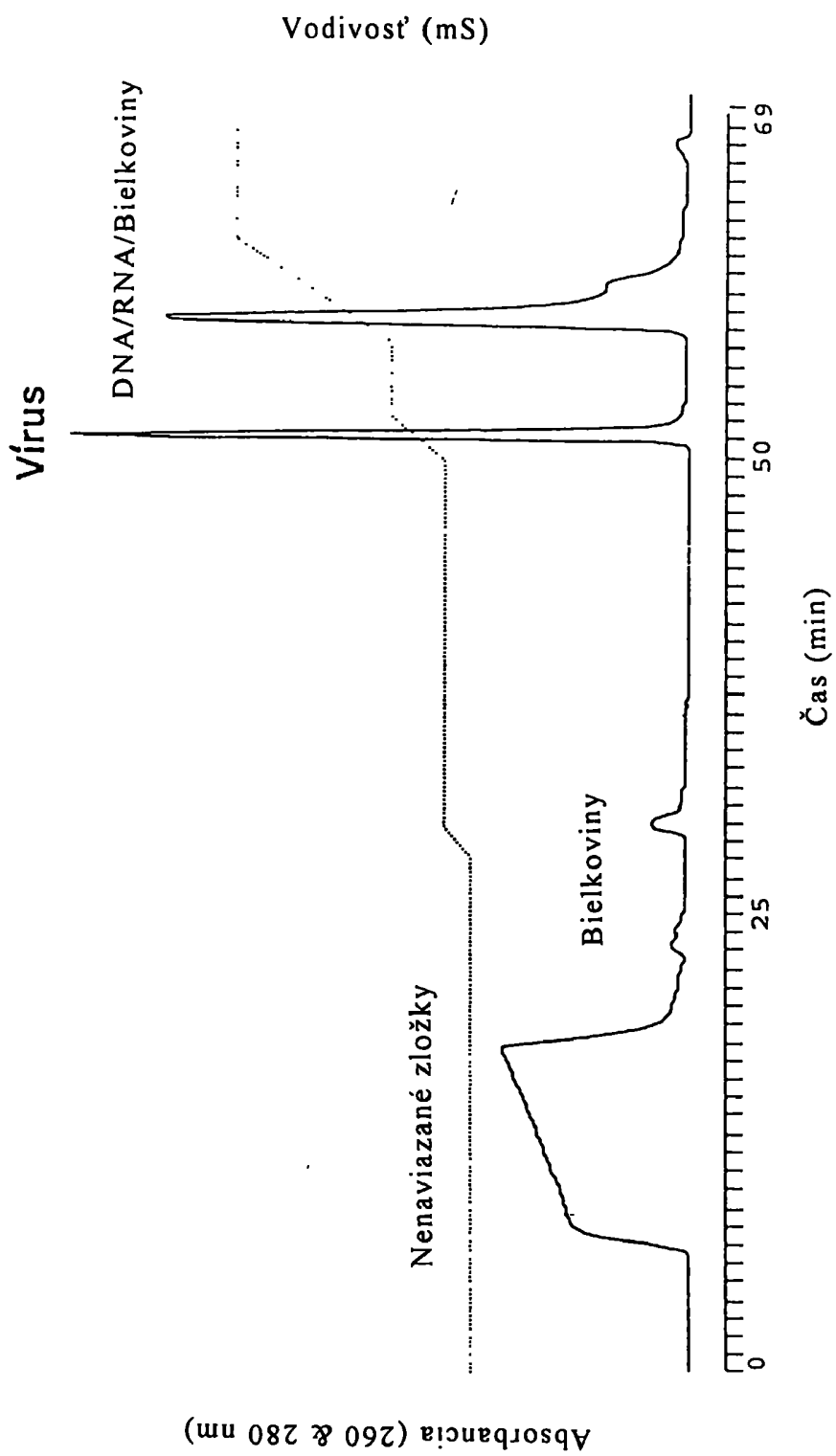
(ii) určovanie absorbancie roztoku vzorky, ktorý bol purifikovaný spôsobom podľa nároku 14 a štandardného roztoku adenovírusu;

(iii) porovnávanie absorbancie roztoku vzorky a štandardného roztoku a

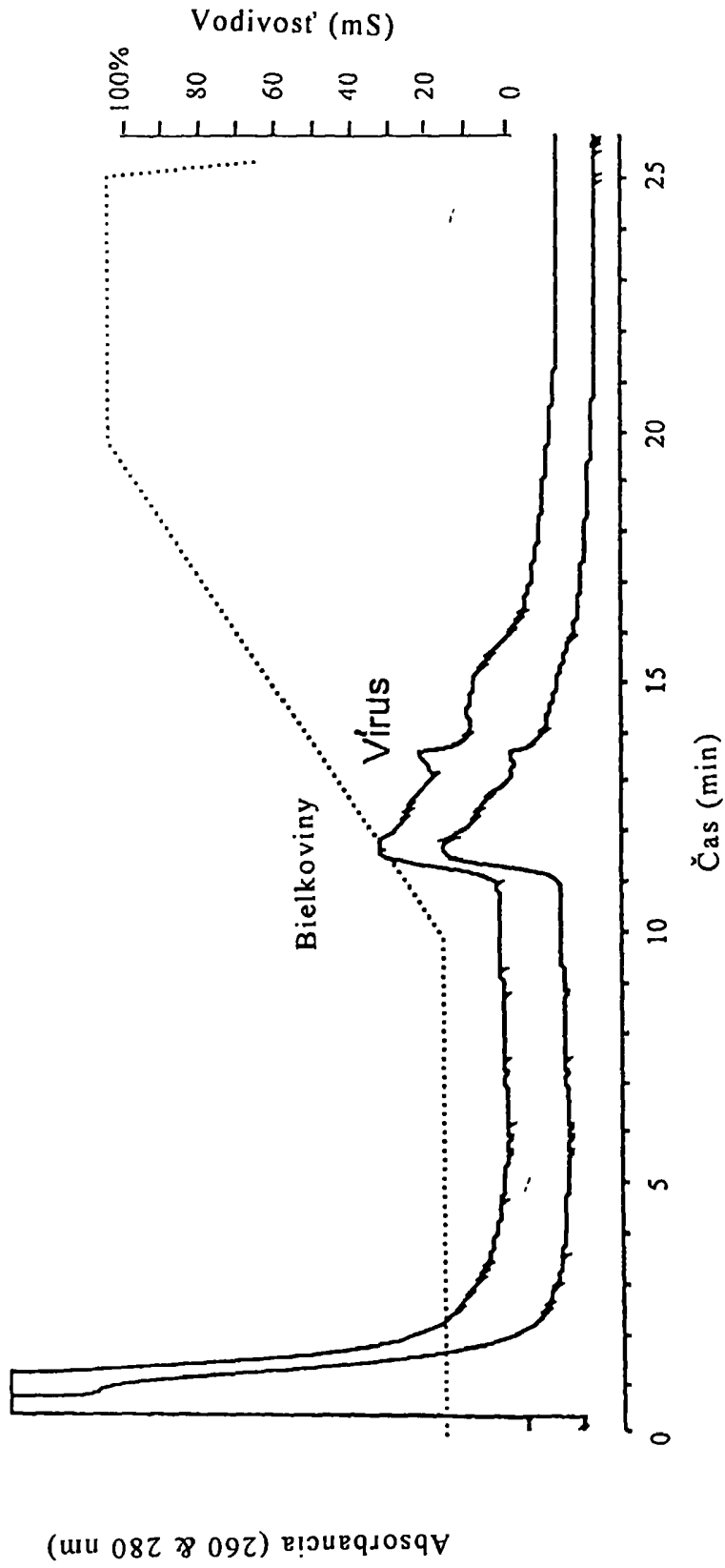
(iv) kvantifikáciu počtu adenovírusových častíc v uvedenom roztoku vzorky.



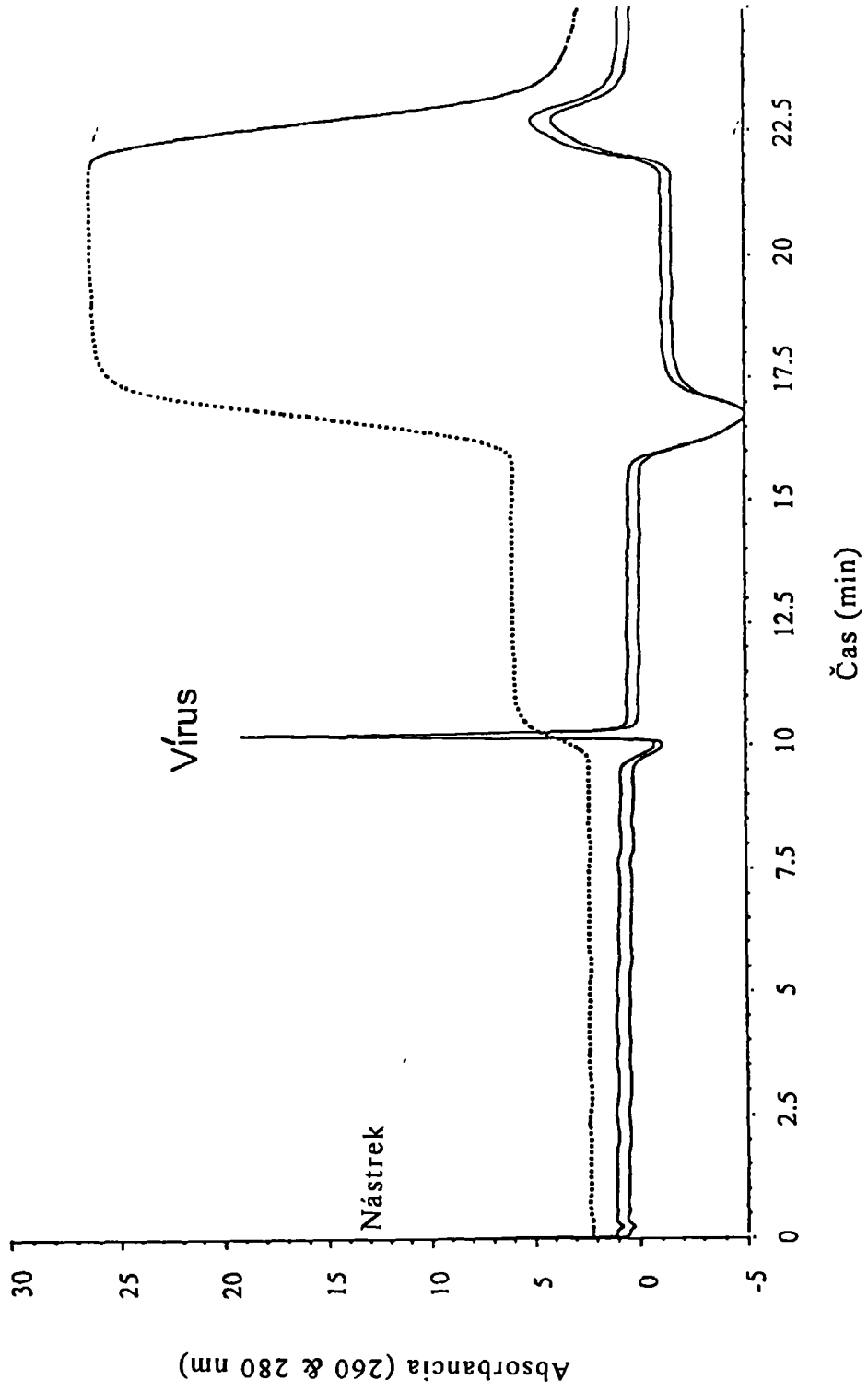
Obr. 1



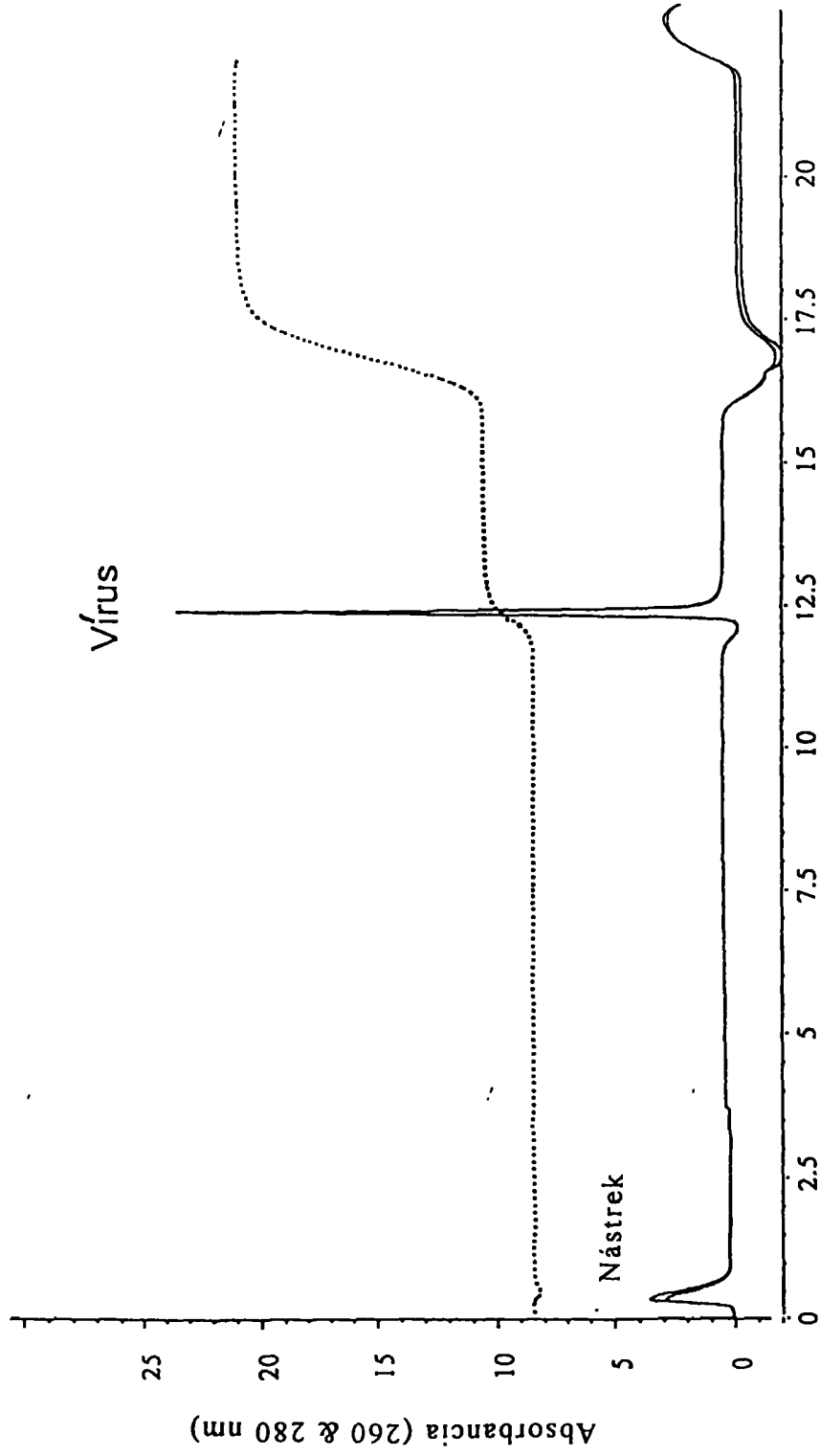
Obr. 2



Obr. 3

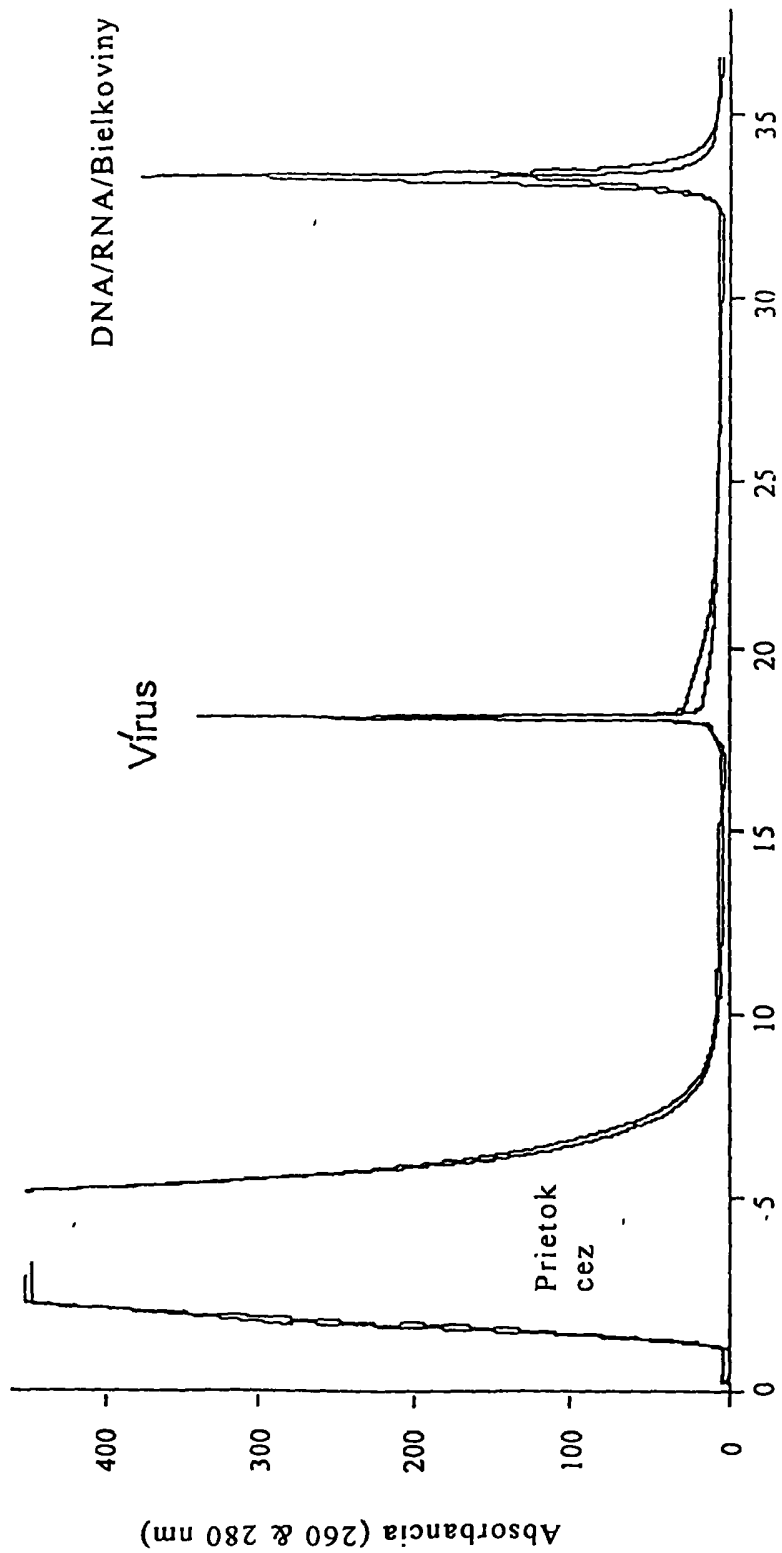


Obr. 4



Čas (min)

Obr. 5



Čas (min)
Obr. 6