



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 29 195 T2** 2007.06.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 155 120 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 29 195.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR00/00430**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 906 444.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/050573**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.11.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.06.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 7/02** (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

B01J 8/18 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9902167 22.02.1999 FR

(73) Patentinhaber:

Transgene S.A., Straßburg/Strasbourg, FR

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 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:

**KOEHL, Michel, F-67000 Strasbourg, FR;
GAILLAC, David, 94320 Thiais, FR**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Gewinnung von purifizierter Virenzusammensetzung**

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 Erfindung hat ein neues Verfahren zur Reinigung einer Viruspräparation zum Gegenstand. Die Erfindung weist einen ganz besonderen Nutzen unter der Perspektive von Anwendungen auf dem Gebiet der Gentherapie, welche insbesondere beim Menschen angewendet wird, auf.

[0002] Die Gentherapie wird als Transfer von genetischer Information, welche einen therapeutischen oder im Rahmen einer Impfung bestehenden Nutzen aufweist, in eine Wirtszelle oder einen Wirtsorganismus in Hinblick darauf, in dieser Zelle oder in diesem Organismus eine therapeutische oder Impfwirkung zu erzielen, definiert. Das erste Protokoll, das auf den Menschen angewendet wurde, wurde in den Vereinigten Staaten im September 1990 an einem Patienten, der eine mit einer Mutation des Adenindesaminase (ADA) kodierenden Gens verbundene Immundefizienz aufwies, begonnen. In diesem besonderen Rahmen handelte es sich darum, das defekte Gen, dessen Dysfunktion die Ursache der genetisch bedingten Erkrankung war, durch ein funktionsfähiges Gen zu ersetzen. Der relative Erfolg dieses ersten Experiments hat die Weiterentwicklung dieser Technik ermutigt, deren Anwendung seit dem auf die Behandlung von anderen Krankheiten, sowohl genetisch bedingten wie erworbenen (Krebserkrankungen, Infektionskrankheiten, wie beispielsweise AIDS), ausgeht worden ist.

[0003] Die Ausführung der Gentherapieprotokolle beruht hauptsächlich auf der Verwendung von Vektoren, die den Transfer und gegebenenfalls die Expression der genetischen Information von Interesse oder des Gens in einer Zelle oder einem Wirtsorganismus erlauben. Es sind im Verlauf der letzten Jahre zahlreiche Vektoren viraler und nicht-viraler Herkunft entwickelt worden und haben den Gegenstand von zahlreichen Veröffentlichungen, die dem Fachmann auf diesem Gebiet zugänglich sind (beispielsweise siehe Robbins et al., 1998, Tibtech, 16, 35–40, und Rolland, 1998, Therapeutic Drug Carrier Systems, 15, 143–198), gebildet.

[0004] Der Nutzen der als Gentherapie-Vektoren eingesetzten Viren ist bereits im Stand der Technik erwähnt worden. Unter den Viren, die am häufigsten eingesetzt werden, bilden die Adenoviren Vektoren der Wahl, denn sie können im Falle von zahlreichen Zelltypen unabhängig davon, ob es sich hierbei um in Teilung befindliche oder ruhende Zellen handelt, eingesetzt werden, sie sind nicht-integrativ und wenig pathogen. Wie die Patentanmeldungen Nr. WO 94/28152 oder WO 94/12649 beschreiben, finden sie zahlreiche Anwendungen auf dem Gebiet der Gentherapie. Gleichwohl sind die Eigenschaften von zahlreichen anderen Viren ebenfalls für die Entwicklung von viralen Vektoren für die Gentherapie ausgenutzt worden. Als Beispiel kann man die pocken-viralen Vektoren und insbesondere die Vektoren, die von dem Vacciniavirus oder dem modifizierten Ankara-Virus (MVA; EP 324350) abgeleitet sind, die retroviralen Vektoren (Naldini et al., 1996, Science, 272, 263–267) u.s.w., aufführen.

[0005] Die Viren und insbesondere die Adenoviren, die gegenwärtig in Gentherapieprotokollen eingesetzt werden, sind Viren, deren Genom derart modifiziert worden ist (durch Deletion, Mutation ...), dass deren Replikationseigenschaft beeinflusst worden ist mit dem Ziel, deren Vermehrung in der Umwelt oder im Wirtsorganismus zu vermeiden, deren immunogene Eigenschaft zu verringern und die Einführung von heterologen Nukleinsäuresequenzen von Interessen zu erlauben. Insbesondere können, wie dies insbesondere die Patentanmeldung WO 94/28152 beschreibt, in dem Genom dieser Viren spezifisch Regionen, die für die Gewinnung von infektiösen Viruspartikeln essentiell sind, deletiert werden. Ebenso beschreiben die Patentanmeldungen EP 83286, EP 110385, US 5,185,146, WO 9702355 die Identifizierung von natürlich attenuierten viralen Formen, die für die Entwicklung von viralen Vektoren ausgenutzt werden können. Ein Virus, in dessen Genom wenigstens ein Gen von Interesse eingeführt worden ist, wird als „rekombiniertes Virus“ und im weiteren Sinne als „rekombinierter Vektor“ bezeichnet; solche rekombinierten Viren umfassen insbesondere gleichfalls die Elemente, die für die Expression dieser Gene in den Wirtszellen oder Wirtsorganismen geeignet sind.

[0006] Die Viren weisen die Charakteristik auf, sich im Wesentlichen auf intrazelluläre Weise zu vermehren. Außerdem ist es im Rahmen der Ausführung von Gentherapieprotokollen erforderlich, über Viruspartikel, insbesondere infektiöse Viruspartikel, zu verfügen, die einen insbesondere rekombinierten Vektor von Interesse, welcher mit spezifischen Polypeptiden assoziiert ist, umfassen und die als Produkt für die Gentherapie einsetzbar sind. Verfahren für die Produktion von Viruspartikeln, die im Rahmen von Gentherapieprotokollen einsetzbar sind, sind bekannt und umfassen die folgenden Schritte:

- (i) Gewinnung einer rohen Viruspräparation,
- (ii) Reinigung der rohen Viruspräparation.

[0007] Die rohe Viruspräparation wird gemäß den folgenden Schritten erhalten:

- (a) Infektion oder Transfektion einer geeigneten Zelllinie durch wenigstens einen viralen Vektor von Inter-

esse, welcher bevorzugt rekombiniert ist;

(b) Kultivierung der infizierten oder transfizierten Zelllinie unter Bedingungen, welche die Virusreplikation und die Produktion von Viruspartikeln erlauben;

(c) Sammeln der Zellen;

(d) einem fakultativen Schritt einer Behandlung der Zellen insbesondere gemäß einem Zellyseprotokoll derart, dass die produzierten intrazellulären Viruspartikel freigesetzt werden, insbesondere wenn die produzierten Viruspartikel nicht während des Kultivierungsschrittes in das Medium freigesetzt werden;

(e) und gegebenenfalls einer ergänzenden Behandlung der in Schritt (c) oder (d) erhaltenen Mischung durch eine DNase, welche dazu bestimmt ist, die zelluläre DNA-Menge zu begrenzen und die Viskosität der Mischung zu verringern.

[0008] Außer den in den Zellen produzierten Viruspartikeln umfasst die rohe Viruspräparation auch alle Arten von Bestandteilen, Zellrückständen, Toxinen u.s.w. ..., die man durch das Ausführen von einem oder mehreren Reinigungsschritten entfernen muss, was es erlaubt, eine Präparation zu erhalten, welche gereinigte Viruspartikel, welche im Rahmen einer Gentherapie einsetzbar sind, umfasst.

[0009] Gemäß den bekannten Verfahren des Standes der Technik erfolgt die Reinigung der rohen Viruspräparation entweder durch eine Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchloridgradienten (Huyghe, B., et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403–1416) oder durch Adsorption in einem gepackten Bett (Huyghe, B., et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403–1416).

[0010] Die Ultrazentrifugation auf einem Cäsiumchloridgradienten weist zahlreiche Nachteile auf. Tatsächlich ist das Cäsiumchlorid eine toxische Verbindung, welche sich mit einer therapeutischen Verwendung beim Menschen nicht verträgt, bezüglich welcher es sich empfiehlt, diese durch einen ergänzenden Reinigungsschritt zu entfernen. Außerdem ist diese Ultrazentrifugationstechnik auf einem Cäsiumchloridgradienten vor allem an die Behandlung von geringeren Volumen roher Viruspräparation angepasst. Tatsächlich erlauben die Ultrazentrifugationsgeräte nur die Behandlung von roher Viruspräparation in einer Größenordnung von 600 ml. Wenn auch solche Volumen für Produktionen, die für Forschungsarbeiten bestimmt sind, gut angepasst sind, erlauben sie nicht, auf zufrieden stellende Weise den Anforderungen einer industriellen Produktion zu entsprechen. Außerdem ist die Ultrazentrifugationstechnik nicht automatisierbar. Schließlich ist die Zeit, welche für die Ausführung dieser Reinigungstechnik durch Ultrazentrifugation erforderlich ist, ungefähr 40 h, unter Perspektiven einer industriellen Produktion gleichfalls ein sehr stark limitierender Faktor. Jeder dieser Nachteile weist darauf hin, dass diese Technik zur Reinigung einer rohen Viruspräparation mit den Anforderungen hinsichtlich Ausbeute und Kosten, die durch die Gewerbetreibenden gefordert werden, nicht verträglich ist.

[0011] Die Reinigungsmethode durch Adsorption in einem gepackten Bett beruht auf der Verwendung von sedimentierten oder gegenseitig verdichteten Adsorptionsmittel-Teilchen, die in einer Chromatographiesäule angeordnet sind. Gemäß diesem Reinigungsverfahren wird die zu reinigende rohe Viruspräparation auf die Säule aufgetragen und die Viruspartikel werden durch aufeinanderfolgende differenzielle Elutionen gereinigt. Angesichts der komplexen Zusammensetzung der rohen Viruspräparation, welche insbesondere Zellrückstände umfasst, verstopft gleichwohl die Chromatographiesäule häufig, was die Reinigung arbeitsaufwändig und ineffizient macht. Um diese Verstopfung zu vermeiden, ist es möglich, vor dem Auftragen der Präparation auf die Chromatographiesäule einen Klärungsschritt der rohen Viruspräparation vorzunehmen, um die Zellrückstände zu entfernen. Es wird gleichfalls vorgeschlagen, Schritte einer Aufkonzentrierung, einer Einstellung des pHs oder der Leitfähigkeit der rohen Viruspräparation vor deren Hindurchleiten durch die Säule auszuführen. Diese ergänzenden und unerlässlichen Schritte haben eine Verringerung der Gesamtausbeute des Reinigungsverfahrens zur Folge, was es nicht erlaubt, Produktionsausbeuten zu erhalten, die mit einer zufrieden stellenden industriellen Nutzung verträglich sind.

[0012] In diesem Kontext wird es vorteilhaft sein, über ein neues Verfahren für die Herstellung von Viruspartikeln, welche ausreichend gereinigt sind, um deren Verwendung im Rahmen einer Gentherapie zu erlauben, ausgehend von Zellkulturen, verfügen zu können. Insbesondere sind die bis hierhin beschriebenen Verfahren nicht zufrieden stellend, indem sie limitierende Schritte auf der Ebene des zu reinigenden Volumens von roher Viruspräparation umfassen (Ultrazentrifugation), und/oder durch deren zu bedeutende Anzahl, was in einer Verringerung der Gesamtausbeute in der Größenordnung von 5 bis 20% zum Ausdruck kommt, was es nicht erlaubt, eine Nutzung in industriellem Maßstab zufriedenzustellen.

[0013] Es wurde jetzt ein neues Verfahren zur Reinigung einer rohen Viruspräparation, welche Partikel von Adenoviren umfasst, entwickelt, welches perfekt an die industrielle Produktion von Viruspartikeln, welche für Gentherapie-Anwendungen bestimmt sind, angepasst ist.

[0014] Die Erfindung betrifft an erster Stelle ein Verfahren zur Reinigung einer rohen Viruspräparation, welche Adenovirus-Partikel umfasst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es wenigstens umfasst:

- (1) einen Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht unter Verwendung von Adsorptionsmittel-Teilchen, welche aus einer Agarose-Matrix gebildet werden und einen zentralen Quarz-Kern und auf kovalente Weise mit der Agarose-Matrix gekoppelte Dextran-Ketten, an welche eine positiv geladene Gruppe gebunden ist, umfassen, und
- (2) einen Schritt einer Gelfiltrationschromatographie unter Verwendung eines Trägers, welcher eine Matrix auf der Basis von Alkyldextran-Methylenbisacrylamid oder eine Matrix auf der Basis von Ethylenglycolmethacrylat umfasst.

[0015] Das Prinzip der Adsorption oder Chromatographie in einer Wirbelschicht wird nachfolgend kurz erläutert. Die detaillierteren Erläuterungen sind verfügbar in „Expanded Bed Adsorption, Principles and Methods“ – Pharmacia Biotech – Edition AA wie auch in dem US-Patent 5,522,993, deren Inhalte einen Teil der vorliegenden Beschreibung bilden.

[0016] Im Gegensatz zu der Adsorption in einem gepackten Bett, für welche feste Adsorptionsmittel-Teilchen sedimentiert oder gegeneinander verdichtet werden, beruht die Adsorption in einer Wirbelschicht auf dem Prinzip, gemäß welchem feste Adsorptionsmittel-Teilchen, die in der Wirbelschicht enthalten sind, in einem Fluid (gasförmig oder flüssig) in Suspension gehalten werden, wodurch zwischen diesen Freiräume erzeugt werden. Diese Suspension der Adsorptionsmittel-Teilchen wird durch die Wirkung von einer oder mehreren Kräften (mechanisch, elektromagnetisch, magnetisch, Gravitations-, elektrisch ...) erhalten. Die Suspension der Adsorptionsmittel-Teilchen in einem flüssigen oder gasförmigen Fluid kann beispielsweise erhalten werden durch Kombination eines Stroms des Fluids, welcher zu dem Gravitationsfeld, dem die Adsorptionsmittel-Teilchen normalerweise ausgesetzt sind, entgegengesetzt dirigiert wird. Die Richtung und die Intensität der zwei Kräfte werden durch den Fachmann auf diesem Gebiet leicht ausgewählt, um die Adsorptionsmittel-Teilchen in Suspension zu halten. Es ist ebenso möglich, Adsorptionsmittel-Teilchen einzusetzen, die eine besondere Zusammensetzung aufweisen, die diese gegenüber einer magnetischen und/oder elektrischen Kraft empfindlich macht und so erlaubt, eine Suspension von Adsorptionsmittel-Teilchen, wie zuvor beschrieben, zu erhalten. Schließlich ist es gleichfalls möglich, über Adsorptionsmittel-Teilchen zu verfügen, die ihrerseits eine magnetische oder elektrische Ladung, die ausreicht, um deren Suspendierung unter geeigneten Bedingungen zu erlauben, aufweisen. Der Fachmann auf diesem Gebiet verfügt über die notwendigen Kenntnisse für die Realisierung dieser Varianten der Erfindung.

[0017] Die Expansion oder Suspendierung der Adsorptionsmittel-Teilchen bewirkt das Auftreten von Räumen zwischen den Teilchen, die das Hindurchtreten der Zellen, Zellrückstände oder von anderen unerwünschten Teilchen, die man aus der rohen Viruspräparation zu entfernen wünscht, erlauben.

[0018] Ein zentraler Quarz-Kern (Hansson et al., 1994, *Biotechnology*, 12, 285–288; Hjorth et al., 1995, *Bio-separation*, 5, 217–223) erlaubt es den Adsorptionsmittel-Teilchen, die diesen enthalten, in dem Fluid durch das Anwenden eines magnetischen, elektrischen oder elektromagnetischen Felds in Suspension gehalten zu werden (siehe beispielsweise „Continuous cell suspension processing using magnetically stabilized fluidized beds“, *Biotechnology and Bioengineering*, Band 37, S. 110–120 (1991) von B. E. Terranova und M. A. Burns).

[0019] Gemäß der Erfindung tragen die Adsorptionsmittel-Teilchen direkt wenigstens einen Liganden, der in der Lage ist, sich spezifisch und reversibel an einen Anti-Liganden zu binden. Gemäß der Erfindung besteht ein solcher Anti-Ligand aus der Gesamtheit oder einem Teil eines Viruspartikels von Interesse, den man ausgehend von einer rohen Viruspräparation zu reinigen wünscht.

[0020] Mit „Ligand“ soll eine positiv geladene Gruppe, insbesondere eine basische Gruppe, welche beispielsweise ein insbesondere durch Alkylgruppen substituiertes Amin trägt, bezeichnet werden; man wird bevorzugt eine basische geladene Gruppe auswählen, die unter den Dimethylaminoethyl-(DMAE), Diethylaminoethyl-(DEAE), Trimethylaminoethyl-(TMAE)-Gruppen, der Gruppe $-R-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (welche gleichfalls als Gruppe Q bezeichnet wird; siehe die Streamline®-Harze von Pharmacia), der Guanidiniumgruppe oder ferner den Imingruppen, wie Polyethylenimin (PEI), ausgewählt wird.

[0021] Solche positiv geladene Liganden sind in der Lage, sich spezifisch an Anti-Liganden mit entgegengesetzter Ladung zu binden.

[0022] Ganz und gar bevorzugt sind die Adsorptionsmittel-Teilchen die eamline®-Harze vom Typ XL, die von Pharmacia vertrieben werden, und insbesondere das Harz Streamline® Q XL, welches aus einer Agarosema-

trix (6%) gebildet wird und einen zentralen Quarz-Kern und Dextransketten, welche kovalent mit der Agarosematrix verknüpft sind und an welche Q-Gruppen gebunden sind, umfassen.

[0023] Es ist gleichfalls möglich, den pH, bei welchem das Verfahren der Erfindung ausgeführt wird, derart auszuwählen, dass die spezifische Ligand/Anti-Ligand-Bindung optimiert wird. So wird in dem Falle, wo man wählen wird, Adsorptionsmittel-Teilchen einzusetzen, die basische Gruppen tragen, insbesondere für die Reinigung von adenoviralen Partikeln, deren Oberflächenproteine in der Mehrzahl isoelektrische Punkte (pI) zwischen 5,3 und 6,0 eingeschlossen aufweisen, der pH zwischen ungefähr 6 und ungefähr 10, vorteilhafterweise zwischen ungefähr 7,5 und ungefähr 9,5 liegen und wird bevorzugt ungefähr 8,5 betragen derart, dass die Hauptmenge der viralen Proteine negativ geladen sein und mit den basischen Gruppen der Adsorptionsmittel-Teilchen wechselwirken wird. Der Fachmann ist in der Lage, den pH durch die Verwendung von gepufferten Lösungen oder durch die Zugabe von Basen oder Säuren anzupassen, um den pH je nach Bedarf zu erhöhen bzw. zu verringern.

[0024] Für die Ausführung des Verfahrens der Erfindung ist es erforderlich, dass der Ligand in der Lage ist, sich reversibel an den Anti-Liganden von Interesse zu binden. Der Fachmann auf diesem Gebiet ist in der Lage, die optimalen Bedingungen abhängig von dem Liganden, dem Anti-Liganden und den Adsorptionsmittel-Teilchen, die eingesetzt werden, zu ermitteln. Zur Unterrichtung ist ein auf eine NaCl-Endkonzentration von 400 mM äquilibrierter Puffer für die Ausführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung des Harzes Streamline® Q XL für die Reinigung von rekombinierten Adenoviren besonders angepasst. Die Ligand/Anti-Ligand-Dissoziation kann durch ein jegliches geeignetes Mittel erfolgen und insbesondere, indem der Salzgehalt oder der pH des Reaktionsmediums modifiziert wird. Die Dissoziation erfolgt bevorzugt, indem der Salzgehalt erhöht wird.

[0025] Außerdem ist es gemäß der Erfindung möglich, das Reinigungsverfahren insbesondere kontinuierlich an den gemäß dem Verfahren der Erfindung gesammelten und behandelten Proben zu verfolgen durch jegliche Mittel bzw. Maßnahmen, die dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt sind. Es ist insbesondere möglich, spektrophotometrische Messungen der Absorption bei 260 nm und 280 nm auszuführen und das OD260/OD280-Verhältnis in jeder Probe zu berechnen, wissend, dass jede gereinigte Viruspräparation ein charakteristisches OD260/OD280-Verhältnis besitzt. Zur Unterrichtung beträgt das OD260/OD280-Verhältnis einer gereinigten adenoviralen Präparation ungefähr 1,25 (1,22 bis 1,28). Es ist gleichfalls möglich, das Reinigungsverfahren durch die Ausführung von üblichen Detektionstechniken, wie beispielsweise Elektrophorese-, PCR-, Immunfluoreszenztechniken oder Bestimmungstechniken des Virustiters, zu verfolgen.

[0026] Die Temperatur, bei welcher das erfindungsgemäße Verfahren ausgeführt wird, liegt vorzugsweise zwischen -5 und +50°C eingeschlossen. Um die infektiösen Eigenschaften der Viruspartikel, die man zu reinigen wünscht, zu bewahren, wird man indessen eine Temperatur zwischen ungefähr +4°C und +37°C eingeschlossen, insbesondere zwischen ungefähr +15°C und +25°C eingeschlossen bevorzugen.

[0027] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren ausgeführt unter Leitfähigkeitsbedingungen zwischen ungefähr 25 und ungefähr 70 mS/cm eingeschlossen, vorteilhafterweise zwischen ungefähr 30 und ungefähr 40 mS/cm und vorzugsweise zwischen ungefähr 30 und ungefähr 35 mS/cm. Indessen liegt es im Vermögen des Fachmanns auf diesem Gebiet, die Leitfähigkeit je nach der Art der Verunreinigungen und der Zusammensetzung des Kulturmediums der Viruspartikel variieren zu lassen. Die Viruspartikel von Interesse und die Adsorptionsmittel-Teilchen werden vorteilhafterweise bei den gleichen Leitfähigkeitsbedingungen äquilibriert.

[0028] Wenn die Wirbelschicht sich gebildet hat, d.h. die Adsorptionsmittel-Teilchen sich in Suspension befinden, ist es möglich, dass jene zu einer permanenten zirkulären Bewegung animiert werden, welche unter der Bezeichnung „rouleaux de recirculation" (Rezirkulationswalzen; „rollers of recirculation") bekannt ist. Dieses Phänomen verringert das Adsorptionsvermögen der Teilchen und muss folglich so weit wie möglich begrenzt werden. Eine mögliche Lösung besteht darin, Adsorptionsmittel-Teilchen von heterogener Größe einzusetzen. Tatsächlich erlaubt die heterogene Verteilung der Größen es den Adsorptionsmittel-Teilchen mit kleinerem Volumen, sich in dem oberen Teil der Vorrichtung, beispielsweise einer Säule, die diese enthält, aufzuhalten. Im Gegensatz dazu befinden sich die größten Teilchen in dem unteren Abschnitt der Vorrichtung, was es erlaubt, die Mobilität der Teilchen bedeutend zu verringern.

[0029] Folglich werden die Adsorptionsmittel-Teilchen gemäß der Erfindung bevorzugt derart ausgewählt, dass sie heterogene Größen aufweisen.

[0030] Eine andere Lösung, welche erlaubt, die Bildung von Rezirkulationswalzen zu vermeiden, besteht darin, die Vorrichtung in Kompartimente aufzuteilen, um die Bewegungsmöglichkeiten der Adsorptionsmittel-Teilchen zu begrenzen (A. Buijs und J. A. Wesselingh, 1980, Journal of Chromatography, Band 201, S. 319–327).

[0031] Wie oben erwähnt, werden die Adsorptionsmittel-Teilchen für das Ausführen des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer Vorrichtung in Suspension gehalten. Die Vorrichtung ist vorteilhafterweise von zylindrischer Form und es handelt sich bevorzugt um eine Chromatographiesäule. Bei einer bevorzugten Ausführungsweise des erfindungsgemäßen Verfahrens wird man eine Chromatographiesäule auswählen, wie sie in dem U.S.-Patent 5,522,993 beschrieben worden ist. Diese Säule weist an jedem ihrer Enden wenigstens einen Einlass oder einen Auslass auf, durch welche die austretenden und Elutionsmittellösungen, die in die Säule eintreten und aus dieser austreten, zirkulieren. Gemäß diesem besonderen Fall werden die Adsorptionsmittel-Teilchen zunächst einer Expansionsphase unterworfen, insbesondere durch Anwendung eines aufsteigenden Pufferstroms in der Chromatographiesäule, welcher erhalten wird, indem der Puffer durch den am unteren Ende der Säule lokalisierten Einlass eingespeist wird und indem er durch den am oberen Ende gelegenen Auslass abgezogen wird. Diese Expansionsphase wird beibehalten bis zur Erzielung einer „Wirbelschicht“, d.h. eines Gleichgewichts zwischen der terrestrischen Schwerkraft, die die Adsorptionsmittel-Teilchen in Richtung des unteren Endes der Säule zieht, und den Schleppkräften des aufsteigenden Stroms des Puffers, die in Richtung des oberen Endes der Säule gerichtet sind.

[0032] Gemäß der Erfindung wird die rohe Viruspräparation, die adenovirale Partikel umfasst, einem Reinigungsverfahren unterworfen, welches wenigstens einen Schritt einer Adsorption in einer Wirbelschicht und einen Gelfiltrations-Chromatographieschritt umfasst. Wenn die Vorrichtung eine Säule ist, wird nach der Erzielung der „Wirbelschicht“ die zu reinigende rohe Viruspräparation insbesondere auf die Säule aufgetragen. In dem bevorzugten Falle der Erfindung, bei welchem die Säule so ist, wie in dem U.S.-Patent 5,522,993 beschrieben, wird die rohe Viruspräparation in den unteren Teil dieser Säule eingespeist. Schließlich wird die rohe Viruspräparation durch Hindurchleiten von Puffer gewaschen. In dem bevorzugten Fall erfolgt das Hindurchleiten von Puffer gemäß einem aufwärts fließenden oder aufsteigenden Strom. Nach der Waschphase wird der Pufferfluss gestoppt, um es den Adsorptionsmittel-Teilchen zu erlauben, sich abzusetzen. Gemäß einem bevorzugten Fall wird diese Sedimentationsphase durch einen abwärts fließenden Pufferfluss unterstützt. Dann wird ein Elutionsschritt ausgeführt durch Anwendung eines insbesondere abwärts fließenden Pufferflusses unter Konzentrations-, pH- und/oder Leitfähigkeitsbedingungen, die der Fachmann auf diesem Gebiet anpassen kann, um das Aussalzen/die Elution der an den Adsorptionsmittel-Teilchen adsorbierten viralen Partikel zu ermöglichen. Es liegt ebenso im Vermögen des Fachmanns auf diesem Gebiet, die Chromatographiebedingungen abhängig von verschiedenen Parametern, insbesondere vom Volumen der Säule, den gewählten Adsorptionsmittel-Teilchen, der Höhe der Adsorptionsmittel-Teilchen in der Säule (im Allgemeinen 10 bis 50 cm, vorteilhafterweise 10 bis 40 cm und bevorzugt ungefähr 30 cm), der Fördermenge (50 bis 600 cm/h, vorteilhafterweise 100 bis 400 cm/h und bevorzugt ungefähr 300 cm/h, insbesondere für eine Säule mit Streamline® Q XL-Harz mit einer Höhe von ungefähr 30 cm), der Viruskonzentration, der Ladung und/oder der Natur der Verunreinigungen, anzupassen. Die Elution der Viruspräparation kann beispielsweise ausgeführt werden, indem der Salzgehalt oder der pH des Elutionsmittels modifiziert wird.

[0033] Das erfindungsgemäße Verfahren kann außerdem ergänzende Schritte umfassen, die der Chromatographie in der Wirbelschicht vorausgehen oder folgen. Gemäß einer optionalen Ausführungsweise können die nach dem Chromatographieschritt in der Wirbelschicht erhaltenen eluierten Virusfraktionen vereinigt und gegebenenfalls vor dem Gelfiltrationschromatographieschritt gemäß den Techniken dieses Fachgebiets aufkonzentriert werden. Man kann insbesondere die tangentielle Ultrafiltration und die Diafiltration aufführen. Die Kassetten BioMax PES (Millipore, Referenz PXB300050) und PLCKM (Millipore, Referenz PXC300050) sind ganz besonders geeignet. Dieser Aufkonzentrierungsschritt ist ganz besonders angezeigt, wenn ins Auge gefasst wird, die Reinheit der Präparation von Viruspartikeln durch einen ergänzenden Schritt einer Chromatographie, welche nicht in einer Wirbelschicht erfolgt, zu vervollkommen. Dieser Aufkonzentrierungsschritt erlaubt, die Viruspartikel in ein Medium, welches für das Ausführen dieser zweiten Chromatographie angepasst ist, zu überführen.

[0034] Die zwei Schritte (Adsorptionsschritt in der Wirbelschicht und Gelfiltrationschromatographie) können in einer beliebigen Reihenfolge ausgeführt werden, gleichwohl wird man bevorzugt an erster Stelle den Adsorptionsschritt in der Wirbelschicht und an zweiter Stelle die Gelfiltrationschromatographie ausführen.

[0035] Gemäß dem Gelfiltrationschromatographieschritt wird die Probe auf einem festen Träger behandelt, welcher Kügelchen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 80 µm eingeschlossen umfasst. Dieser Träger weist vorzugsweise eine Porosität nahe der Größe des Virus auf, damit dieses nicht in die Kügelchen eindringt.

Im Gegensatz dazu dringen die Moleküle von geringerer Größe in die Kügelchen ein und ihre Wanderung wird verlangsamt. Die Arten von Trägern, die eingesetzt werden, sind die Matrices auf der Grundlage von Acrylamid (Sephacryl- und Trisacrylgele), Ethylenglycol-Methacrylat-Copolymeren (Biosec-, Toyopearl HW-, TSK- und PW-Gele). Die erwähnten Träger werden vorzugsweise ohne Funktionalisierungsgruppe eingesetzt. Die Gel-filtrationschromatographie-Träger, die für das Ausführen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens geeignet sind, sind die folgenden:

- Alkyldextran-Methylenbisacrylamid-Matrices (Sephacryl S300 HR mit einem Kügelchendurchmesser zwischen 25 und 75 µm eingeschlossen, Sephacryl S400 HR mit einem Kügelchendurchmesser zwischen 25 und 75 µm eingeschlossen, Sephacryl S500 HR mit einem Kügelchendurchmesser zwischen 25 und 75 µm eingeschlossen und Sephacryl S1000 SF mit einem Kügelchendurchmesser zwischen 40 und 105 µm eingeschlossen; Pharmacia).
- Ethylenglycol-Methacrylat-Matrices (Toyopearl HW55, Toyopearl HW65 und Toyopearl HW75 mit einem Kügelchendurchmesser, der von 20 bis 60 µm eingeschlossen variiert; Tosohaas).

[0036] Zur Unterrichtung wird angemerkt, dass ein Träger vom Typ Toyopearl HW65F, S (Porosität 1000 Å) oder Sephacryl S400HR bevorzugt ist. Eine solche Säule wird in einem Puffer äquilibriert, der Salzgehaltsbedingungen und einen pH aufweist, welche die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Träger und den Viruspartikeln limitieren. Man wird vorteilhafterweise einen 25 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 2% Saccharose-Puffer mit einem pH von 8,5 oder einen 10 mM Tris-HCl, 10 mM Natriumaspargat, 54 mg/ml Tween 80 und 2% Saccharose-Puffer mit einem pH von 8,5 einsetzen. Die Viruspartikel von Interesse werden eluiert, ohne zurückgehalten zu werden, und treten aus der Säule vor den Verunreinigungen mit geringerem Molekulargewicht oder geringerer Größe aus. Gemäß einer optionalen Ausführungsweise können die nach dem Reinigungsschritt erhaltenen Virusfraktionen vereinigt und gegebenenfalls gemäß den üblichen Techniken aufkonzentriert werden. Man kann die tangentielle Ultrafiltration und die Diafiltration durchführen. Die Kassetten BioMax PES (Millipore, Referenz PBX300050) und PLCMK (Millipore, Referenz PXC300052) sind ganz besonders geeignet.

[0037] Die Erfindung betrifft gleichfalls ein Protokoll für die Produktion von Adenovirus-Partikeln, die für die Gentherapie einsetzbar sind, welches die folgenden Schritte (i) und (ii) umfasst:

- (i) Gewinnung einer rohen Viruspräparation, umfassend die Schritte:
 - (a) Infektion oder Transfektion einer geeigneten Zelllinie durch wenigstens einen Adenovirus-Vektor, welcher bevorzugt rekombiniert ist;
 - (b) Kultivierung der infizierten oder transfizierten Zelllinie unter Bedingungen, welche die Virusreplikation und die Produktion von Adenovirus-Partikeln erlauben;
 - (c) Sammeln der Zellen und/oder des Überstands,
- (ii) Reinigung der rohen Viruspräparation gemäß einem erfindungsgemäßen Verfahren, wie zuvor beschrieben.

[0038] Gemäß einem besonderen bevorzugten Fall nimmt man nach dem Schritt (c) des Sammelns der Zellen einen Schritt eines Aufbrechens oder einer Lyse der Zellen, im Allgemeinen nach Resuspendierung der gesammelten zellulären Biomasse, vor, um die Freisetzung der intrazellulär produzierten Viruspartikel zu erlauben. Es können alle klassischen Mittel oder Maßnahmen eingesetzt werden, insbesondere die chemischen und/oder mechanischen Mittel. Man kann beispielsweise Einfrier-Auftau-Zyklen, die die Zellmembranen schwächen, eine enzymatische Lyse (Einsatz von Enzymen, die die Zellmembranen abbauen) oder chemische Lyse (Einsatz von Tensid, pH-Schock ...) ausführen. Die mechanischen Mittel können aus Ultraschall (Beschallung), aus einem Zerreiben (DynoMill-Glaskügelchen, BeadMill), aus Druck- und Scherkräften (Hochdruck-Homogenisator French Press), Mikrofluiden (Microfluidics, Newton, MA) oder ferner aus der mechanischen Wirkung von zwei Zylindern, die hydraulische und mechanische Scherkräfte erzeugen, (Silverson-Homogenisator) resultieren.

[0039] Gleichwohl ist dieser Schritt eines Aufbrechens/einer Lyse der Zellen in dem besonderen Falle, wo die Viruspartikel in das Kulturmedium freigesetzt werden, nicht obligatorisch, obgleich dieser nicht ausgeschlossen wird. In diesem Falle kann der Schritt (ii) direkt an der Probe, welche zugleich die Zellen und das Medium umfasst, oder ausschließlich an dem Überstand der Kultur, der die zu reinigenden Viruspartikel umfasst, angewandt werden.

[0040] Das erfindungsgemäße Protokoll kann außerdem einen Klärungsschritt umfassen, welcher zum Ziel hat, die unlöslichen Materialien (Zellrückstände, ausgeflockte Niederschläge von Makromolekülen ... u.s.w.), die gegebenenfalls während des Schritts des Aufbrechens oder der Lyse der Zellen erzeugt worden sind, zu entfernen. Er kann durch eine jegliche herkömmliche Filtrations-(Tiefenfiltration, tangentielle Mikrofiltration ...) oder Zentrifugationstechnik (kontinuierlich ...) ausgeführt werden. Es können zahlreiche Filter eingesetzt wer-

den mit der Maßgabe, dass sie eine Porosität aufweisen, die es erlaubt, die Viruspartikel von Interesse passieren zu lassen und die unlöslichen Materialien zurückzuhalten. Es wird angegeben, dass die adenoviralen Partikel eine Größe von ungefähr 0,07 bis 0,1 µm aufweisen, die die Verwendung von Filtern von höherer Porosität erforderlich machen. Außerdem können die Filter aus synthetischem Material (Nylon), organischem Material (Cellulose) oder nicht-organischem Material (Zirconium) bestehen. Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsweise nimmt man aufeinanderfolgende Filtrationen auf Filtern von abnehmender Porosität vor, beispielsweise an erster Stelle auf einem Filter mit einer Porosität von 8 µm (Sartorius 5591301P5-00), dann auf einem Filter mit einer Porosität von 5 µm (Sartorius 5591342P5-00), dann auf einem Filter mit einer Porosität von 3–0,8 µm (Sartorius, Sartoclean CA-Kapsel 5621304E9-00-A), dann gegebenenfalls auf einem Filter mit einer Porosität zwischen 0,8 und 0,65 µm eingeschlossen (Sartorius, Sartoclean CA-Kapsel 5621305G9-00-A). Gemäß einer anderen Variante kann die Filtration durch tangentielle Mikrofiltration auf ebenen oder Hohlfaser-Membranen mit einer Porosität über der Größe der Adenoviren ausgeführt werden. In dieser Hinsicht können die Durapore-(Millipore) und Omega (Pall)-Membranen eingesetzt werden.

[0041] Außerdem kann das Protokoll für die Produktion von Viruspartikeln, die im Rahmen von Gentherapieprotokollen gemäß der Erfindung einsetzbar sind, wenigstens einen Schritt eines Abbaus der Nukleinsäuren, die nach dem Aufbrechen der Zellen in bedeutenden Mengen vorhanden sind, umfassen. Zu diesem Zweck können die nicht-spezifischen Restriktionsenzyme vom Endo- oder Exonuklease-Typ eingesetzt werden. Gemäß einer bevorzugten Weise ist das gewählte Enzym die Benzonase, gegebenenfalls in Gegenwart von β-Cyclodextrin, welches die Ausfällung der Lipide vereinfacht (empfohlene Endkonzentrationen von 5 bis 50 E/ml Benzonase und von 0,1 bis 10% und insbesondere 1,5% β-Cyclodextrin).

[0042] Das Protokoll der Erfindung kann gleichfalls einen fakultativen Schritt einer Inaktivierung der eine Hüllmembran aufweisenden Viren umfassen. Dieser Schritt erlaubt, die Sicherheit des Endprodukts zu verbessern und die Qualität der gereinigten adenoviralen Präparation zu erhöhen. Ein Beispiel für den Inaktivierungsschritt von eine Hüllmembran aufweisenden Viren wird in der französischen Patentanmeldung Nr. 98/16147 gegeben. Es ist möglich, den Inaktivierungsschritt und den Schritt des Abbaus der Nukleinsäuren gleichzeitig vorzunehmen.

[0043] Das Protokoll für die Produktion von Viruspartikeln gemäß der Erfindung kann gleichfalls einen Schritt einer sterilisierenden Filtration umfassen, wobei der Schritt einer sterilisierenden Filtration vorzugsweise nach dem Schritt (c) oder (ii) des Herstellungsverfahrens ausgeführt wird. Man wird vorteilhafterweise auf Filter von 0,22 µm zurückgreifen. Man kann beispielsweise die Filtrationseinheiten vom Typ Minisart (Sartorius, Referenz SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, Referenz 18053D), Millex GF (Millipore, Referenz SLGS025BS), Millex GV (Millipore, Referenz SLGV025BS), Millex GP (Millipore, Referenz SLGPR25LS) oder ferner Spirale Cap (Version Super CQS 92 HS oder HP; Gelman Sciences), Criticap 50 (12995, Gelman Sciences) oder Millipak (Millipore, Ref. MPGL04SK2 oder MPGL02SH2) aufführen.

[0044] Das Verfahren zur Reinigung einer rohen Viruspräparation und das Protokoll für die Produktion von Viruspartikeln gemäß der Erfindung betreffen insbesondere Viruspräparationen, welche Viruspartikel von Interesse für Anwendungen im Rahmen einer Gentherapie und insbesondere für die Herstellung von Impfpräparaten umfassen, wie beispielsweise adenovirale, pockenvirale, iridovirale, papovavirale, rotavirale, parvovirale, hepadnavirale, Herpes-, reovirale, coronavirale, flavivirale, togavirale, mononegavirale, arenavirale, bunyavirale, orthomyxovirale, calcivirale, picornavirale Partikel umfassen. Diese Viruspartikel umfassen vorzugsweise ein rekombiniertes Virus. Gemäß der Erfindung kann die rohe Viruspräparation, die man zu reinigen wünscht, ein oder mehrere Viruspartikel von unterschiedlicher viraler Herkunft enthalten.

[0045] Das Ausführen der Verfahren und Protokolle der Erfindung ist ganz besonders angepasst an die Gewinnung von gereinigten adenoviralen Partikeln, welche replikationsdefekte rekombinante Adenoviren umfassen. „Rekombinant“ bezieht sich auf das Vorhandensein von wenigstens einem Gen von Interesse, welches unter die Kontrolle der für dessen Expression in einer Wirtszelle geeigneten Elemente gestellt ist. „Replikationsdefekt“ bezeichnet, dass die verfügbaren genetischen Informationen keine autonome Replikation des betreffenden Virus in einer Wirtszelle erlauben. In diesem Falle erfordert die Produktion von Viruspartikeln die durch ein jegliches geeignetes Mittel erfolgende Infektion oder Transfektion von angepassten Zellen, welche als Komplementationszellen bezeichnet werden, mit dem im Allgemeinen rekombinanten, defekten Virus. Diese Komplementationszellen stellen in trans die Informationen bereit, die für die Replikation und den Zusammenbau der defekten Viren in Form von Viruspartikeln erforderlich sind. Solche Linien wie auch deren Verwendung werden in der Literatur umfassend beschrieben (siehe beispielsweise die Anmeldungen WO 94/28152 oder WO 97/00326; die Linie 293, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59–72; Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022–2032). Andere Viren erfordern ihrerseits speziellere Zellkulturbedingungen, die aber perfekt beherrscht

werden (siehe beispielsweise VV, MVA, Retroviren ...). Die infizierten oder transfizierten Komplementationszellen werden unter Bedingungen, die umfassend beschrieben worden sind, während einer Zeitspanne, welche ausreicht, um es den Viren zu erlauben, sich zu replizieren, und den Viruspartikeln zu erlauben, sich zusammenzubauen, kultiviert.

[0046] Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden beim Lesen der nachfolgenden Beispiele ersichtlich werden. Gleichwohl soll die Erfindung sich nicht auf den Inhalt der Beispiele beschränken.

BEISPIELE

[0047] Die in den folgenden Beispielen eingesetzten rekombinanten Adenoviren wurden durch die Technik der homologen Rekombination, die in Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805–4810) beschrieben worden ist, konstruiert. Die ausgeführten Konstruktionen wurden gemäß den allgemeinen Techniken der Gentechnologie und der molekularen Klonierung, die detailliert in Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, oder eine neuere Auflage) erläutert worden sind, oder gemäß den Empfehlungen des Herstellers, wenn man einen kommerziellen Kit einsetzt, ausgeführt. Die Klonierungsschritte setzen den Stamm E. coli 5K (hsdR, mcrA), DH5a [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] oder NM522 (supE, thi, D(lac-proAB), Dhds5 (r-m-), (F' proAB, lacI^q, ZDM15) und jene der homologen Rekombination den Stamm E. coli BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557–580) ein. Handelt sich um die Reparatur der Restriktionsstellen besteht die eingesetzte Technik in einem Auffüllen der 5'-überhängenden Enden mit Hilfe des großen Fragments der DNA-Polymerase I von E. coli (Klenow, Boehringer Mannheim). Die DNA-Fragmente werden mit Hilfe des DNA-Reinigungskits GeneCleanII® (Bio101 Inc.) gereinigt. Außerdem sind die Fragmente des adenoviralen Genoms, die bei den unterschiedlichen Konstruktionen eingesetzt wurden, genau gemäß ihrer Lage in der Nukleotidsequenz des Genoms von Ad5, wie sie in der Datenbank Genbank unter der Referenz M73260 offenbart wird, angegeben.

[0048] Was die Zellbiologie betrifft, werden die Zellen transfiziert oder transduziert und kultiviert gemäß den Standardtechniken, die dem Fachmann auf diesem Gebiet wohlbekannt sind. Man greift zurück auf die Zelllinien 293 (ATCC CRL-1573), A549 E1+ (WO 94/28152) und 293-E40RF6 + 7 (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022–2032). Es versteht sich, dass andere Zelllinien eingesetzt werden können. Die Zellen werden bei 37°C in einer mit 5% CO₂ angereicherten feuchten Atmosphäre in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL), ergänzt mit 1 mM Glutamin, 1% Aminosäuren (Gibco BRL), 40 mg/l Gentamycin und 10% fötalem Kälberserum (SVF, Gibco BRL) in Kultur gehalten. Die Zellen werden gemäß den Techniken dieses Fachgebiets (Calciumphosphat-Präzipitation ...) transfiziert.

[0049] Die folgenden Beispiele wurden mit Hilfe von rekombinanten Adenoviren, welche ein Markergen oder ein therapeutisches Gen exprimieren, ausgeführt. Sie leiten sich von dem Serotyp Ad5 ab und haben die folgende Struktur:

- AdTG6297 ist ein adenoviraler Vektor, der hinsichtlich der Funktionen E1 (Deletion der nt 459 bis 3328) und E3 (Deletion des XbaI-Fragments, welches sich von nt 28592 bis 30470 erstreckt) defekt ist, in dessen Genom unter Ersatz der Region E1 eine Expressionskassette des Markergens, welches das Protein GFP (für „green fluorescent protein“) kodiert, inseriert ist. Jenes reagiert bei Anregung durch Licht (485 nm) mit der Emission eines fluoreszierenden Lichts, dessen Intensität man mittels eines Filters (535 nm) misst. Genauer besteht die Kassette aus dem CMV-Promotor, gefolgt von einem chimären Intron, der das GFP-Protein kodierende Sequenz und dem polyA des SV40-Virus. Die Intronsequenzen sind aus dem Plasmid pCI (Promega Corp., pCI mammalian expression vector E1731) isoliert und umfassen die Spleiß-Donorstelle des Introns 1 des humanen β -Globin-Gens wie auch den Verzweigungspunkt und die Spleiß-Akzeptorstelle des Gens eines Immunglobulins aus der Maus. Die Viruspartikel werden durch Transfektion einer Komplementationslinie von E1 (293 oder A549 E1+) mit dem Vektor AdTG6297 produziert und durch mehrfaches aufeinanderfolgendes Passagieren mittels einer permissiven Linie (welche E1 komplementiert) amplifiziert.
- Der Vektor AdTG5643 ist ein Vektor, bei welchem die Regionen E1 (nt 459 bis 3328), E3 (nt 38592 bis 30470) und E3 (nt 32994 bis 34998) deletiert sind und welches das therapeutische humane CFTR-Gen exprimiert. Die Expressionskassette besteht aus dem frühen CMV-Promotor, der CFTR-cDNA und dem polyA des β -Globin-Gens vom Kaninchen und ist anstelle der deletierten E1-Sequenzen inseriert. Die Viruspartikel werden durch Transfektion einer Komplementationslinie von E1 und E4 (293-E40RF6 + 7) mit dem Vektor AdTG5643 produziert und eine Virus-Stammlösung durch mehrfaches aufeinanderfolgendes Passagieren mittels einer permissiven Linie (welche E1 und E4 komplementiert) gebildet.
- Der Vektor AdTG13383 ist ein Vektor, bei dem die Regionen E1 (nt 459 bis 3511) und E3 (nt 28539 bis 30470) deletiert sind und welcher das therapeutische humane IL-2-Gen exprimiert. Die Expressionskassette besteht aus dem frühen CMV-Promotor, dem aus pCI (oben beschrieben) isolierten synthetischen Intron

der cDNA, welche das humane IL-2 kodiert, und dem poly A SV40 und ist anstelle der deletierten E1-Sequenzen inseriert. Die Viruspartikel werden produziert durch Transfektion einer Komplementationslinie von E1 mit dem Vektor pTG13383. Eine Virus-Stammlösung wird durch mehrfaches aufeinanderfolgendes Passagieren mittels einer permissiven Linie (welche E1 komplementiert) gebildet.

BEISPIEL 1: Herstellung von Viren ausgehend von Komplementationszellen.

[0050] Die A549-E1+-Zellen werden in Kulturschalen kultiviert, bis eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml erreicht wird, und werden dann mit einer Vorstammlösung von AdTG6297 mit einer MOI (Infektionsmultiplizität) von ungefähr 3 infiziert. Die infizierten Zellen werden 72 h nach der Infektion geerntet und bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Bodensatz wird in ungefähr 600 ml Kulturmedium ohne Serum wieder aufgenommen. Die so erhaltene Präparation entspricht einem Volumen von ungefähr 20 l Kultur.

[0051] Die intrazellulären Viruspartikel werden nach Aufbrechen der Zellen, die der mechanischen Wirkung eines Silverson-Homogenisators (L4R – Silverson), eingestellt auf eine Rotationsgeschwindigkeit von 4200 Umdrehungen/min, während 7 bis 10 min unterworfen worden sind, freigesetzt.

[0052] In diesem Stadium ist die Präparation sehr viskos aufgrund der Freisetzung der genomischen DNA infolge des Aufbrechens der Zellen. Man setzt zu der Viruspräparation ein Volumen eines Puffers zu, welcher eine optimale Wirkung der Benzonase erlaubt und aus 100 mM Tris, 4 mM $MgCl_2$, 4% Saccharose, pH 8,5, zu welchem das Solubilisierungsmittel Tween 80 (Merck, Referenz 8-22187-1000) in einer Konzentration von 2% hinzugesetzt worden ist, besteht. Die Mischung wird bei Umgebungstemperatur bewegt, bevor die Benzonase in einer Menge von 50 E/ml (Merck, Referenz 101697) hinzugesetzt wird, und man lässt die Reaktion 1 bis 2 h bei Umgebungstemperatur und unter Bewegung ablaufen.

BEISPIEL 2: Herstellung von Viren ausgehend von der Zellkultur

[0053] Das Beispiel 1 wird wiederholt mit dem Unterschied, dass man 72 h nach der Infektion die Zellen und den Kulturüberstand (Volumen von ungefähr 20 l) sammelt und das Ganze direkt dem Aufbrechschritt unterworfen wird, um die zu reinigende rohe Viruspräparation zu erhalten.

BEISPIEL 3: Reinigung der rohen Viruspräparation mit Hilfe eines Schritts einer Chromatographie in einer Wirbelschicht.

[0054] Das Beispiel 3 hat zum Ziel, eine Ausführungsweise des erfindungsgemäßen Verfahrens für die Gewinnung von gereinigten Viruspartikeln zu veranschaulichen.

[0055] Zunächst wird irgendeine der in den Beispielen 1 und 2 erhaltenen rohen Viruspräparationen einem Schritt einer Inaktivierung der eine Hüllmembran aufweisenden Viren unterworfen. Dieser Inaktivierungsschritt erfolgt durch Wirkung von TNBP/Tween 80 (Tributylphosphat, Ref. 24 0494, Aldrich) in einer Endkonzentration von 0,3% bzw. 1%. Dafür wird die in Beispiel 1 oder 2 erhaltene rohe Viruspräparation mit einem gleichen Volumen einer Pufferlösung aus 50 mM Tris, 2 mM $MgCl_2$, 2% Saccharose, 450 mM NaCl und 0,6% TNBP (Aldrich 24-049-40), pH 8,5, verdünnt. Es ist gleichfalls möglich, zu der Viruspräparation 1/10 Volumen eines konzentrierteren Puffers aus 50 mM Tris, 2 mM $MgCl_2$, 2% Saccharose, 2 M NaCl und 3% TNBP (Aldrich 24-049-40), pH 8,5, zuzusetzen. Man muss anmerken, dass die eingesetzten Salzgehaltsbedingungen (NaCl-Endkonzentration 400 mM) den Äquilibrierungsbedingungen der Chromatographie entsprechen. Die Einwirkung von TNBP/Tween 80 erfolgt unter Bewegung (500 Upm) während 3 h bei Umgebungstemperatur oder während 4 h bei 4°C.

[0056] Die inaktivierte rohe Viruspräparation wird dann einer Ionenaustauschchromatographie in einer Wirbelschicht unterworfen. Dafür wird die Viruspräparation auf eine Säule aufgetragen, welche ein Harz vom Typ Streamline® Q XL (Pharmacia, Ref. 17-5075-01), welches vorab mit Hilfe eines 50 mM Tris, 2 mM $MgCl_2$, 2% Saccharose, 400 mM NaCl-Puffers, pH 8,5, äquilibriert worden ist, enthält. Die Einspeisung des Puffers erfolgt an der Grundfläche der Chromatographiesäule und sein Austritt erfolgt an der Spitze der Säule derart, dass ein aufsteigender Pufferstrom in der Säule erzeugt wird. Es wird eine Fördermenge von 100 bis 300 cm/h und vorzugsweise 150 cm/h eingesetzt, um die Säule zu äquilibrieren und mit der zu reinigenden rohen Viruspräparation zu beladen. Die auf die Säule aufgetragene Viruspräparation wird dann durch mehrfaches unterschiedliches Hindurchleiten von Pufferlösung in aufsteigender und abfallender Richtung gespült. Dieser Vorgang hat zum Ziel, ein erstes Spektrum von durch nicht-Ionen-spezifische Wechselwirkungen adsorbierten oder mechanisch anhaftenden Verunreinigungen zu entfernen. Die unterschiedlichen Zellbestandteile, die

durch Ionen-spezifische Wechselwirkungen auf dem Chromatographieträger adsorbiert sind, werden dann nach und nach durch die Anwendung eines Äquilierungspuffers, welcher steigende Salzkonzentrationen (425 mM, 450 mM, 500 mM NaCl) enthält, eluiert. Es wird eine Fördermenge von 50 bis 150 cm/h und vorzugsweise von 100 cm/h angewendet ab dem Zeitpunkt, wo der Pufferfluss abfallend ist. Das Eluat wird in Fraktionen gesammelt. Jede Fraktion wird durch Messen der Absorption bei 260 und 280 nm analysiert. Im Allgemeinen werden die Proteine, die einzig bei 280 nm detektiert werden, durch den Puffer, welcher eine NaCl-Konzentration von 425 mM enthält, eluiert. Ein zweiter Elutionspeak wird bei 280 und 260 nm detektiert. Er enthält die adenoviralen Partikel von Interesse und wird durch den Puffer mit einer Salzkonzentration von 450 mM eluiert. Die Fraktionen, die diesem zweiten Elutionspeak entsprechen, werden vereinigt und gegebenenfalls einer Gelfiltrationschromatographie unterworfen.

[0057] Die Säule für eine Chromatographie in einer Wirbelschicht kann durch die Abfolge von Schritten, die in der Tabelle 1 gezeigt ist, regeneriert, gewaschen und behandelt werden:

Tabelle 1

| Lösung | Konzentration | Säulenvolumen (Vc) | Fördermenge (cm/h) | Richtung |
|----------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|-------------|
| NaCl | 1,5 M | 4 | 100 | Abfallend |
| HCl | 0,05 N | 9 | 30 | Aufsteigend |
| H ₂ O | - | 6 | 100 | Aufsteigend |
| NaOH | 1 N | 12 | 30 | Aufsteigend |
| NaCl | 3 M | 9 | 30 | Aufsteigend |
| Tris-HCl EDTA pH 8,0 | 10 mM 1 mM | 9 | 30 | Aufsteigend |

[0058] Das Gel kann dann in 0,01 M NaOH während mehreren Wochen aufbewahrt werden.

[0059] Die Ausbeute eines Verfahrens zur Gewinnung der Viruspartikel kann auf die folgende Weise berechnet werden:

| Schritte | IE gesamt x 10 ¹³ | Ausbeute - % (Gesamt) | Ausbeute - % (Schritt) |
|------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Ausgangsmaterial | 2,69 | 100 | - |
| Benzonase | 2,74 | 102 | 102 |
| Inaktivierung | 2,58 | 96 | 94 |
| SQXL | 2,11 | 78 | 82 |

IE steht für die Anzahl von infektiösen Einheiten.

[0060] Das Verfahren der Erfindung erlaubt, ein Volumen in der Größenordnung von 20 l rohe Viruspräparation zu reinigen, wobei eine Gesamtausbeute von ungefähr 80% nach dem Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht erzielt wird, wohingegen die Verfahren des Standes der Technik es bestenfalls erlauben, Ausbeute in der Größenordnung von 60% nach dem Chromatographieschritt in einem gepackten Bett zu erzielen.

BEISPIEL 4: Herstellung einer klinischen Charge von infektiösen adenoviralen Partikeln mit Antikrebs-Zielrichtung (Transfer des Gens IL-2).

[0061] Die E1-Komplementationszellen werden in einem Bioreaktor in Excell 525-Medium (JRH Biosciences) bis zur Erzielung einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml kultiviert und werden dann mit einem Aliquot einer Vorstammlösung von AdTG13383 mit einer MOI von ungefähr 10 infiziert. Die infizierten Zellen und der Kultur-

überstand (Volumen von ungefähr 20 l) werden 72 h nach der Infektion gesammelt. Die intrazellulären Viruspartikel werden nach Aufbrechen der Zellen, die 7 bis 10 min der mechanischen Wirkung eines Silverson-Homogenisators (275 UHLS), eingestellt auf eine Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz (Geschwindigkeit von 8, 1), unterworfen worden sind, freigesetzt.

[0062] Die so erhaltene rohe Viruspräparation wird einem Klärungsschritt unterworfen, um die unlöslichen Materialien (Zellrückstände, ausgeflockte Niederschläge von Makromolekülen ... u.s.w.) zu entfernen. Man nimmt aufeinanderfolgende Filtrationen an Filtern abnehmender Porosität vor, zuallererst an einem Filter mit einer Porosität von 8 µm (Sartopure 300PP2 5592501), dann an einem Filter mit einer Porosität von 5 µm (Sartopure 300 PP3 5592542) und schließlich an einem Filter mit einer Porosität zwischen 3 und 0,8 µm eingeschlossen (Sartorius, Sartoclean CA-Kapsel 5621304E9-00-A).

[0063] Die geklärte Viruspräparation wird einem Schritt eines Abbaus der DNA (Wirkung von Benzonase) und gleichzeitig einem Schritt einer Inaktivierung der eine Hüllmembran aufweisenden Viren (Wirkung von 0,3% TNBP/1% Tween 80) unterworfen. Dafür setzt man zu der geklärten Viruspräparation ein Volumen eines 100 mM Tris, 4 mM MgCl₂, 4% Saccharose-Puffers, pH 8,5, umfassend Tween 80 (Merck, Referenz 8-22187-1000) in einer Konzentration von 2%, zu. Die Mischung wird bei Umgebungstemperatur unter Bewegung gesetzt, bevor die Benzonase in einer Konzentration von 10 E/ml (Merck, Referenz 101697) und das TNBP (Aldrich 24-049-40) in einer Endkonzentration von 0,3% zugesetzt wird. Man lässt die Reaktion 2 h bei Umgebungstemperatur und unter Bewegung (500 U/min) ablaufen.

[0064] Die so erhaltene Viruspräparation wird mit einem Volumen 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 2% Saccharose, 2 M NaCl derart verdünnt, dass eine Leitfähigkeit von 35 mS/cm, die für das Ausführen der Ionenaustauschchromatographie in einer Wirbelschicht optimal ist, erhalten wird.

[0065] Die hinsichtlich der Leitfähigkeit eingestellte Viruspräparation wird auf eine Säule, welche ein Harz vom Typ Streamline® Q XL (Pharmacia, Ref. 17-5075-01), welches vorab mit Hilfe eines 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 2% Saccharose, 360 mM NaCl-Puffers, pH 8,5, äquilibriert worden ist, enthält, aufgeladen. Die Einspeisung des Puffers erfolgt an der Grundfläche der Chromatographiesäule und sein Austritt erfolgt an der Spitze der Säule derart, dass ein aufsteigender Pufferstrom in der Säule erzeugt wird. Es wird eine Fördermenge von 300 cm/h während der Äquilibrierung und des Beladens der Säule mit der Viruspräparation angewandt. Ist das Beladen einmal erfolgt, wird die Säule dann durch mehrmaliges unterschiedliches Hindurchleiten von Pufferlösung in aufsteigender und abfallender Richtung gespült mit dem Ziel, die durch nicht-Ionen-spezifische Wechselwirkungen adsorbierten oder mechanisch blockierten Verunreinigungen zu entfernen. Die unterschiedlichen Zellbestandteile, die durch Ionen-spezifische Wechselwirkungen auf dem Chromatographieträger adsorbiert sind, werden dann allmählich durch Anwendung eines Äquilibrierungspuffers, welcher steigende Salzkonzentrationen (NaCl 650 mM, 2 M) enthält, eluiert. Es wird eine Fördermenge von 150 cm/h angewendet ab dem Zeitpunkt, wo der Pufferfluss abfallend ist. Die eluierten Fraktionen werden durch Messung der Adsorption bei 260 und 280 nm analysiert. Die Viruspartikel absorbieren bei den beiden Wellenlängen mit einem OD260/OD280-Verhältnis von ungefähr 1,25 (1,22 bis 1,28) und im Allgemeinen befindet sich der Elutionspeak in einem Salzkonzentrationsbereich von 650 mM.

[0066] Die Säule für die Chromatographie in einer Wirbelschicht kann gemäß dem zuvor angegebenen Protokoll regeneriert und gewaschen werden.

[0067] Die nach der Chromatographie in einer Wirbelschicht erhaltenen und die adenoviralen Partikel enthaltenden Fraktionen werden durch Diafiltration an Labscale (Millipore) unter Verwendung der Kassetten BioMax PES (Millipore, Referenz PXB01MC50) oder von Cellulosemembranen, die eine Ausschlussgrenze von 300 kDa und 1000 kDa aufweisen, aufkonzentriert.

[0068] Die aufkonzentrierte Viruspräparation wird dann einer Gelfiltrationschromatographie unterworfen. Dafür wird die Viruspräparation auf eine Säule aufgetragen, die ein Harz vom Typ Toyopearl HW65F (Ref. Tosohaas 07465), welches vorab mit Hilfe eines 54 mg/l Tween 80, 2% Saccharose, 10 mM Tris, 10 mM Na-Aspartat-Puffers, pH 8,5, äquilibriert worden ist, enthält. Die Einspeisung des Puffers erfolgt über die Spitze der Chromatographiesäule und sein Austritt erfolgt unten. Es wird eine Fördermenge von 30 cm/h eingesetzt, um die Säule zu äquilibrieren und mit der aufkonzentrierten Viruspräparation zu beladen. Die auf die Säule aufgetragene Viruspräparation (ungefähr 20% des Säulenvolumens) wird dann durch den Puffer, der erlaubt hat, die Säule zu äquilibrieren (54 mg/l Tween 80, 2% Saccharose, 10 mM Tris, 10 mM Na-Asp, pH 8,5) in abfallender Richtung gespült. Dieser Vorgang hat zum Ziel, die Verunreinigungen mit geringem Molekulargewicht, die durch das Hindurchwandern durch die Poren des Gels verzögert werden, zu entfernen im Gegensatz zu dem

Virus, das aus den Gelkugeln ausgeschlossen ist. Die unterschiedlichen Zellbestandteile, die auf dem Chromatographieträger verzögert werden, werden dann nach und nach immer durch den gleichen Puffer eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen gesammelt. Jede Fraktion wird durch Messen der Absorption bei 260 und 280 nm analysiert. Im Allgemeinen enthält der bei 280 und 260 nm detektierte Peak die adenoviralen Partikel von Interesse, wohingegen die proteinartigen Verunreinigungen, die einzig bei 280 nm detektiert werden, an zweiter Stelle eluiert werden. Die Fraktionen, die dem ersten Peak entsprechen, werden gesammelt, gegebenenfalls durch Diafiltration aufkonzentriert, in einen geeigneten Formulierungspuffer (beispielsweise in eine Kochsalzlösung oder isotonische Lösung) eingebracht, dann durch 0,22 µm Sartolab P20 (Sartorius, Referenz 18053D) filtriert und bis zur Verwendung aufbewahrt.

[0069] Die Ausbeute eines Verfahrens zur Gewinnung von Viruspartikeln kann auf die folgende Weise berechnet werden:

| Schritte | Ausbeute IE - % (gesamt) | Ausbeute IE - % (Schritt) | Ausbeute PT - % (gesamt) | Ausbeute PT - % (Schritt) |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Ausgangsmaterial | 100 | - | 100 | - |
| Klärung | 96 | 96 | 78 | 78 |
| DNase/ Inaktivierung | 130 | 135 | 112 | 144 |
| SQXL | 107 | 82 | 88 | 78 |
| Aufkonzentrierung/ Diafiltration | 107 | 100 | 86 | 98 |
| Gelfiltration | 86 | 80 | 77 | 90 |

IE steht für die Anzahl von infektiösen Einheiten, bestimmt durch eine quantitative Messung der Immunfluoreszenz mit einem anti-DBP-Antikörper, wie in Lusky et al. (1998, J. Virol. 72, 2022–2032) beschrieben. PT steht für die Anzahl von gesamten viralen Partikeln, bestimmt durch die Messung der Adsorption bei 260 und 280 nm.

[0070] Das Verfahren der Erfindung erlaubt, ein Volumen in der Größenordnung von 20 l roher Viruspräparation zu reinigen, wobei eine Gesamtausbeute von ungefähr 90% nach dem Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht erzielt wird, wohingegen die Verfahren des Standes der Technik bestenfalls erlauben, nach dem Schritt einer Chromatographie in einem gepackten Bett Ausbeuten in der Größenordnung von 60% zu erhalten. Und eine Gesamtausbeute von 77% bis 86% nach dem Gelfiltrationsschritt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung einer rohen Viruspräparation, welche Adenovirus-Partikel umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass es wenigstens umfasst:

(1) einen Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht unter Verwendung von Adsorptionsmittel-Teilchen, welche aus einer Agarose-Matrix gebildet werden und einen zentralen Quarz-Kern und auf kovalente Weise mit der Agarose-Matrix gekoppelte Dextran-Ketten, an welche eine positiv geladene Gruppe gebunden ist, umfassen, und

(2) einen Schritt einer Gelfiltrationschromatographie unter Verwendung eines Trägers, welcher eine Matrix auf der Basis von Alkyldextran-Methylenbisacrylamid oder eine Matrix auf der Basis von Ethylenglycolmethacrylat umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirbelschicht, welche Adsorptionsmittel-Teilchen umfasst, erhalten wird durch das Suspendieren der Teilchen in einem Fluid unter der Wirkung von einer oder mehreren Kräften, welche unter den mechanischen, elektromagnetischen, magnetischen, Gravitations- und elektrischen Kräften ausgewählt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht (1) umfasst:

a) eine Expansionsphase der Adsorptionsmittel-Teilchen in einer Chromatographiesäule, insbesondere durch Anwendung eines aufwärts fließenden Pufferstroms, wobei die Expansionsphase bis zur Erzielung einer Wir-

belschicht andauert,

- b) eine Phase eines Abscheidens der rohen Viruspräparation, insbesondere in dem unteren Abschnitt der Säule,
- c) eine Phase eines Waschens durch Hindurchleiten eines Puffers, insbesondere entsprechend einem aufwärts fließenden Strom,
- d) eine Sedimentationsphase, welche gegebenenfalls durch einen abwärts fließenden Pufferfluss unterstützt wird,
- e) einen Elutionsschritt durch Anwendung eines insbesondere abwärts fließenden Pufferflusses, um das Auswaschen der an den Adsorptionsmittel-Teilchen adsorbierten Viruspartikel zu ermöglichen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die positiv geladene Gruppe vorteilhafterweise eine basische Gruppe ist und insbesondere eine Gruppe, welche unter den Dimethylaminoethyl-(DMAE), Diethylaminoethyl-(DEAE), Trimethylaminoethylgruppen (TMAE), der Gruppe $-R-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (Gruppe Q), den Guanidinium- oder Imingruppen, wie Polyethylenimin (PEI), ausgewählt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die positiv geladene Gruppe die Gruppe Q ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht (1) unter Leitfähigkeitsbedingungen zwischen ungefähr 25 und ungefähr 70 mS/cm eingeschlossen, vorteilhafterweise zwischen ungefähr 30 und ungefähr 40 mS/cm und vorzugsweise zwischen ungefähr 30 und ungefähr 35 mS/cm ausgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Adsorptionsmittel-Teilchen die Streamline[®]-Harze vom Typ XL sind.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht (1) unter pH-Bedingungen zwischen ungefähr 7,5 und ungefähr 9,5 eingeschlossen und bevorzugt bei einem pH von ungefähr 8,5 ausgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht (1) in einem auf eine NaCl-Endkonzentration von 400 mM äquilibrierten Puffer ausgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Elutionsschritt des Schritts einer Chromatographie in einer Wirbelschicht (1) ausgeführt wird, indem die Salzgehalt- oder pH-Bedingungen modifiziert werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Elutionsschritt ausgeführt wird, indem der Salzgehalt erhöht wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Adsorptionsmittel-Teilchen von heterogener Größe sind.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt einer Adsorptionschromatographie in einer Wirbelschicht (1) an erster Stelle ausgeführt wird und der Schritt einer Gelfiltrationschromatographie (2) an zweiter Stelle ausgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt einer Gelfiltrationschromatographie (2) an einem Träger, welcher Kügelchen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 80 µm eingeschlossen umfasst, ausgeführt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger aus der aus Toyopearl HW65F, Toyopearl S und Sephacryl S400HR bestehenden Gruppe ausgewählt wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die adenoviralen Partikel, die nach dem Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht erhalten werden, gesammelt und aufkonzentriert werden, insbesondere durch tangentielle Ultrafiltration oder Diafiltration vor dem Schritt einer Gelfiltrationschromatographie.

17. Protokoll für die Herstellung von Adenovirus-Partikeln, welche für die Gentherapie einsetzbar sind, welches die folgenden Schritte (i) und (ii) umfasst:

(i) Gewinnung einer rohen Viruspräparation, umfassend die Schritte:

(a) Infektion oder Transfektion einer geeigneten Zelllinie durch wenigstens einen Adenovirus-Vektor, welcher bevorzugt rekombiniert ist;

(b) Kultivierung der infizierten oder transfizierten Zelllinie unter Bedingungen, welche die Virusreplikation und die Produktion von Adenovirus-Partikeln erlauben;

(c) Sammeln von Zellen und/oder des Überstands,

(ii) Reinigung der rohen Viruspräparation gemäß einem der Verfahren der Ansprüche 1 bis 16.

18. Protokoll nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es außerdem umfasst:

(i) einen Schritt eines Aufbrechens oder einer Lyse der Zellen nach dem Schritt (c), gegebenenfalls gefolgt von einem Schritt eines Abbaus der Nukleinsäuren, und/oder

(ii) einen Schritt einer Inaktivierung der eine Hüllmembran aufweisenden Viren.

19. Protokoll nach einem der Ansprüche 17 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der adenovirale Vektor rekombinant ist.

20. Protokoll nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der adenovirale Vektor replikationsdefekt ist.

21. Protokoll nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

(i) Gewinnung einer rohen Viruspräparation, umfassend:

(a) Infektion oder Transfektion einer geeigneten Zelllinie durch wenigstens einen rekombinanten adenoviralen Vektor;

(b) Kultivierung der infizierten oder transfizierten Zelllinie unter Bedingungen, welche die Virusreplikation und die Produktion von Viruspartikeln erlauben;

(c) Sammeln der Zellen und/oder des Überstands,

(ii) einen Schritt eines Aufbrechens oder einer Lyse der Zellen und/oder des Überstands, die in Schritt (i) (c) gesammelt worden sind, durch mechanische Mittel,

(iii) einen Schritt einer Klärung des in Schritt (ii) erhaltenen Lysats durch Filtration, um die unlöslichen Anteile zu entfernen,

(iv) einen Schritt eines Abbaus der in dem in Schritt (iii) erhaltenen geklärten Lysat vorhandenen Nukleinsäuren durch Wirkung von Benzonase und begleitend einen Schritt einer Inaktivierung von eine Hüllmembran aufweisenden Viren durch Wirkung von TNBP und Tween 80,

(v) einen Schritt einer Reinigung der adenoviralen Partikel der in Schritt (iv) erhaltenen Viruspräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 16, umfassend einen Schritt einer Chromatographie in einer Wirbelschicht, einen Schritt einer Aufkonzentrierung der aus der Chromatographie in einer Wirbelschicht eluierten adenoviralen Partikel durch Diafiltration und einen Schritt einer Gelfiltrationschromatographie, und

(vi) einen Schritt einer sterilisierenden Filtration der nach dem Gelfiltrationschromatographie-Schritt (v) gesammelten adenoviralen Partikel.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen