



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102946727 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201180022567. 3

(22) 申请日 2011. 05. 06

(30) 优先权数据

61/395, 117 2010. 05. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 11. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2011/001394 2011. 05. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/138682 EN 2011. 11. 10

(73) 专利权人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·P·格雷格森 T·格鲁恩戴曼

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A01N 35/02(2006. 01)

A01N 43/24(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101203205 A, 2008. 06. 18, 权利要求书、
实施例.

US 5489434 A, 1996. 02. 06, 权利要求、第 8
栏、第 10 栏表 1.

EP 0461700 A1, 1991. 12. 18, 权利要求、第 2
页第 2 段、实施例 1-5.

EP 0985349 A2, 2000. 03. 15, 权利要求 1、表
1、第 6 页第 31 节.

EP 0228137 A2, 1987. 07. 08, 权利要求
1-10、表 1.

DE 19817743 A1, 1999. 10. 28, 权利要求.

US 2002107288 A1, 2002. 08. 08, 权利要求、
第 1 页第 10 节.

US 2003012804 A1, 2003. 01. 16, 权利要求.

US 2005118940 A1, 2005. 06. 02, 权利要求、
第 3 页第 32 节.

CN 1436787 A, 2003. 08. 20, 说明书第 1-2
页、第 3 页倒数第 1 段、第 4 页第 1 段.

US 3560395 A, 1971. 02. 02, 第 2 栏第 21-30
行.

GB 998686 A, 1965. 07. 21, 第 3 页第 1 栏第
41-55 行.

审查员 王燕燕

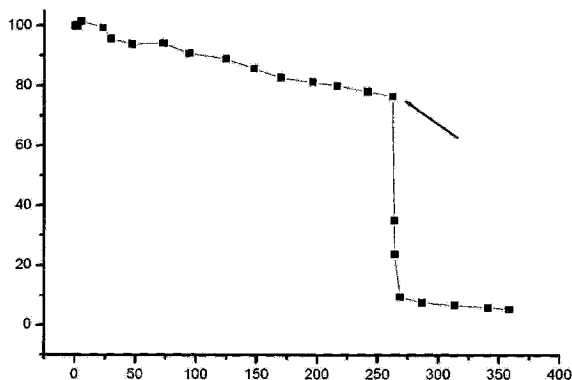
权利要求书5页 说明书35页 附图4页

(54) 发明名称

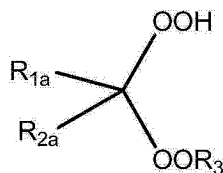
微生物灭活的有机过氧化物化合物

(57) 摘要

多官能有机过氧化物用作微生物学灭活剂和 / 或用于降解核酸。这包含至少一个碳原子和至少两个有机过氧化物基团。所述灭活剂理想地是氢过氧化物。本发明在病毒疫苗制备中特别有用。



1. 一种制备疫苗的方法,所述方法包含以下步骤:(i) 将包含微生物的样品接触不含 $-C(=O)-OOH$ 基团的多官能有机过氧化物以灭活其中的微生物;(ii) 从步骤(i)的产物制备疫苗,所述多官能有机过氧化物如式 I 所示:



其中:

R_{1a} 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ 烷基、 $C(O)OC_{1-6}$ 烷基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基羰基、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ 烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;

R_{2a} 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ 烷基、 $C(O)OC_{1-6}$ 烷基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基羰基、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ 烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基、 $-(CR_4R_5)_nCR_6(OOH)_2$, 或 R_{2a} 通过 L 连接 R_{2b} ;

R_3 是 H 或 $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$,

R_{1b} 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ 烷基、 $C(O)OC_{1-6}$ 烷基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基羰基、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ 烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,

R_{2b} 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ 烷基、 $C(O)OC_{1-6}$ 烷基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基羰基、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ 烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基或 R_{2b} 通过 L 连接 R_{2a} ;

在每次出现时, R_4 选自 H 或 C_{1-3} 烷基、羟基、氰基、硝基、 C_{2-4} 烯基、 C_{1-3} 烷氧基、 C_{2-4} 烯氧基、 C_{1-3} 烷基羰基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基,可选 N-单 C_{1-3} 烷基化或 N-二 C_{1-3} 烷基化氨基羰基、 C_{1-3} 硫代烷基、 C_{1-3} 烷基亚磺酰基、 C_{1-3} 烷基磺酰基、 C_{1-3} 烷基氨基磺酰基和二 $-C_{1-3}$ 烷基氨基磺酰基;

在每次出现时, R_5 选自 H 或 C_{1-3} 烷基、羟基、氰基、硝基、 C_{2-4} 烯基、 C_{1-3} 烷氧基、 C_{2-4} 烯氧基、 C_{1-3} 烷基羰基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基,可选 N-单 C_{1-3} 烷基化或 N-二 C_{1-3} 烷基化氨基羰基、 C_{1-3} 硫代烷基、 C_{1-3} 烷基亚磺酰基、 C_{1-3} 烷基磺酰基、 C_{1-3} 烷基氨基磺酰基和二 $-C_{1-3}$ 烷基氨基磺酰基;

L 是 C_{1-8} 亚烷基;

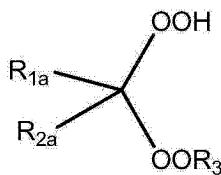
R_6 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ 烷基、 $C(O)OC_{1-6}$ 烷基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基,可选 N-单 C_{1-6} 烷基化或 N-二 C_{1-6} 烷基化氨基羰基、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ 烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;

n 是 1 至 8。

2. 如权利要求 1 所述的方法,所述疫苗是兽医用疫苗。

3. 一种制备诊断产品的方法,所述方法包含以下步骤:(i) 将包含微生物的样品接触不含 $-C(=O)-OOH$ 基团的多官能有机过氧化物以灭活其中的微生物;(ii) 从步骤(i)的产物制备诊断产品;所述样品是制备诊断剂的材料或中间物;所述多官能有机过氧化物如

式 I 所示,



R^{1a} 、 R^{2a} 和 R^3 如权利要求 1 中所述。

4. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,还包括在步骤 (i) 中使用烷化剂。

5. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,所述样品包含核酸。

6. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,所述样品包含溶液中的核酸。

7. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,所述样品包含核酸,将所述样品与所述多官能有机过氧化物接触致所述核酸降解。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述样品获自细胞培养物且所述核酸是来自所述细胞培养物的细胞 DNA。

9. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,所述微生物作为污染物存在。

10. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述样品包含病毒。

11. 如权利要求 10 所述的方法是,所述样品包含在原代细胞培养物中增殖的病毒。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的方法,其特征在于,所述样品包含无包膜 DNA 病毒。

13. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,所述样品含有甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒或狂犬病病毒。

14. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物是成对二氢过氧化物。

15. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物是同双官能有机过氧化物。

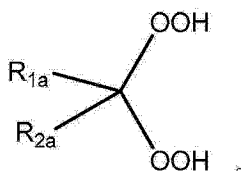
16. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物可溶于水。

17. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物不含卤素。

18. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物仅由碳、氢和氧组成。

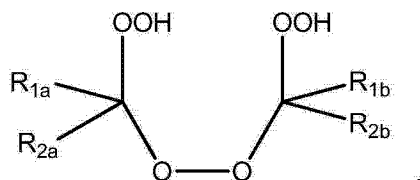
19. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物的分子量低于 300。

20. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物如式 II 所示:



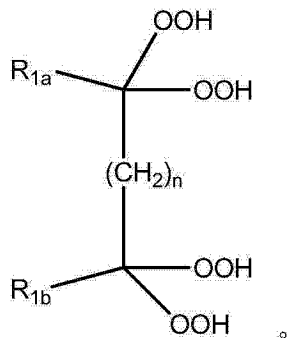
21. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于: R_{1a} 是 H 或 CH_3 ;和 R_{2a} 是 CH_3 、Et 或 n-Pr。

22. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物如式 III 所示:



23. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于: R_{1a} 是 H 或 CH_3 ; R_{2a} 是 CH_3 、Et 或 n-Pr 或 R_{2a} 通过 L 连接 R_{2b} ; R_{1b} 是 H 或 CH_3 ; R_{2b} 是 CH_3 、Et、n-Pr 或 R_{2b} 通过 L 连接 R_{2a} ;和 L 是 $-(CH_2)_3-$ 。

24. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物如式 IV 所示:



25. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于: R_{1a} 是 H; R_{1b} 是 H;和 n 是 3。

26. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于:

R_{1a} 和 R_{2a} 相同;和 / 或

R_{1a} 和 R_{2b} 相同;和 / 或

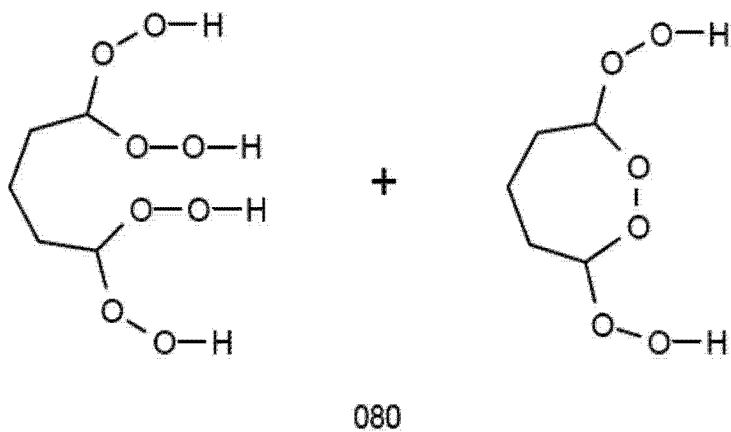
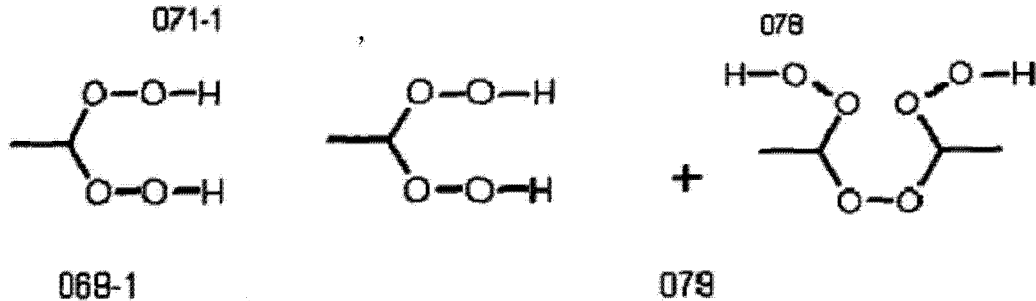
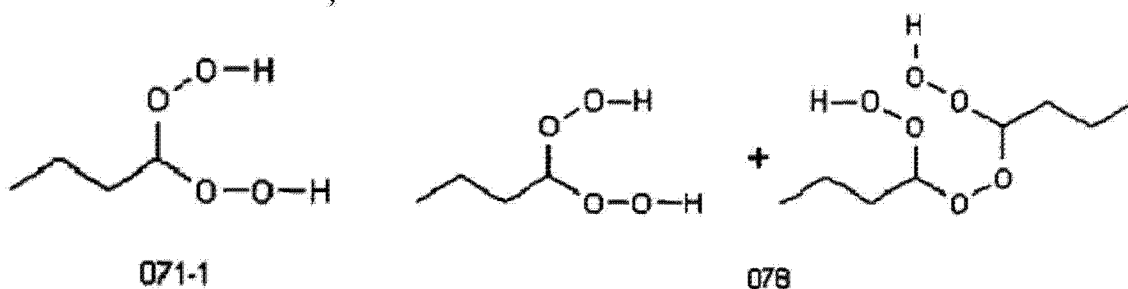
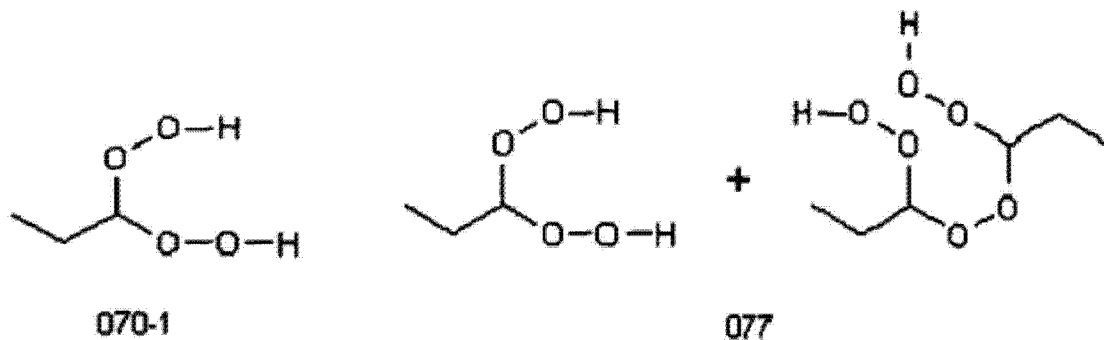
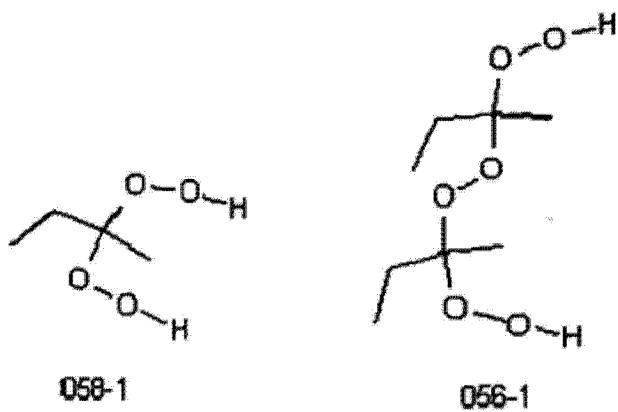
R_{2a} 和 R_{2b} 相同。

27. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于:

- R_{1a} 是 H 或 C_{1-4} 烷基;和 / 或
- R_{2a} 是 H 或 C_{1-4} 烷基或 $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$ 或通过 L 连接 R_{2b} ;和 / 或
- R_{1b} 是 H 或 C_{1-4} 烷基;和 / 或
- R_{2b} 是 C_{1-4} 烷基或通过 L 连接 R_{2a} ,因此 R_{2b} 能是 CH_3 、Et 或 n-Pr;和 / 或
- 各个 R_4 是 H 或 CH_3 ;和 / 或
- 各个 R_5 是 H 或 CH_3 ;和 / 或
- L 是 C_{2-5} 亚烷基;和 / 或
- R_6 是 H 或 C_{1-4} 烷基;和 / 或
- n 是 2 至 6。

28. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物如式 I 所示,并且: R_{1a} 是 H 或 CH_3 ; R_{2a} 是 CH_3 、Et、n-Pr 或 $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$ 或 R_{2a} 通过 L 连接 R_{2b} ; R_3 是 H 或 $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$; R_{1b} 是 H 或 CH_3 ; R_{2b} 是 CH_3 、Et 或 n-Pr 或 R_{2b} 通过 L 连接 R_{2a} ;L 是 $-(CH_2)_3-$;和 n 是 3。

29. 如权利要求 1 或 3 所述的方法,其特征在于,所述多官能有机过氧化物具有结构式 058-1、056-1、070-1、077、071-1 或 069-1 所示结构,或者是 077、078、079 或 080 所示化合物混合物:



30. 如权利要求 29 所述的方法是,所述多官能有机过氧化物是结构式 069-1 所示的

1, 1- 二氢过氧乙烷。

31. 如权利要求 1 或 3 所述的方法, 其特征在于, 所述多官能有机过氧化物选自下组: 1, 1- 二氢过氧甲烷; 1, 1' - 二氢过氧 -1, 1' - 二丙基过氧化物; 1, 1' - 二氢过氧 -1, 1' - 二丁基过氧化物; 1, 1' - 二氢过氧 -1, 1' - 二乙基过氧化物; 1, 1, 5, 5- 四氢过氧戊烷; 和 3, 7- 二 - 氢过氧 -1, 2- 二氧杂环庚烷。

32. 如权利要求 1 或 3 所述的方法, 其特征在于, 所述多官能有机过氧化物以 0. 01-0. 25% 的浓度使用。

33. 如权利要求 1 或 3 所述的方法, 其特征在于, 所述多官能有机过氧化物在 0-50℃ 的温度使用。

34. 如权利要求 1 或 3 所述的方法, 其特征在于, 使用所述多官能有机过氧化物 0. 25-72 小时进行灭活。

35. 如权利要求 1 或 3 所述的方法, 其特征在于, 在处理所述样品后除去残留或过量的过氧化物。

36. 如权利要求 35 所述的方法, 其特征在于, 除去残留或过量的过氧化物的步骤使用还原剂。

37. 如权利要求 36 所述的方法, 其特征在于, 所述还原剂是抗坏血酸或还原糖。

微生物灭活的有机过氧化物化合物

[0001] 本申请要求 2010 年 5 月 6 日提交的美国临时申请 61/395,117 的优先权,其全部内容通过引用纳入本文以用于所有目的。

技术领域

[0002] 本发明用于灭活微生物和 / 或降解核酸(并且特别是降解 DNA)的化合物领域。

技术背景

[0003] 处理病毒和细菌使其灭活在多个领域重要,包含废水或污水的卫生处理,和胃肠外药物领域例如疫苗。例如,很多疫苗基于灭活的微生物,以确保最终疫苗中不含活体感染材料。灭活失败能引起严重的安全危险,如 20 世纪 50 年代脊髓灰质炎病毒灭活失败的“Cutter 事件(Cutter incident)”所知。

[0004] 灭活处理通常是基于化学方法。化学处理包含使用洗涤剂、甲醛(通常作为福尔马林)、 β 丙内酯(BPL)、戊二醛、乙烯亚胺、苯酚等。这些灭活剂已经使用了很多年,如见参考文献 1。

[0005] 一些所述灭活剂也用于降解核酸。所述降解不仅在灭活所述病毒或细菌本身中起作用,而且也用于在生长中使用的任何细胞底物中除去残余核酸。例如,病毒能在细胞培养基中生长以提供制备疫苗的材料,并且生产中经常包含从细胞培养底物中降解任何残余核酸的步骤,从而除去潜在的致癌材料。参考文献 2 描述了使用 BPL 灭活病毒和降解宿主细胞 DNA。

[0006] 所述最佳灭活剂根据所述特定微生物而改变。例如,病毒形态(大小、衣壳化、包膜等)的差异导致灭活灵敏度的差异,如见参考文献 3 的附录 2。尽管一些处理能广泛灭活微生物(如非常严酷的热、消毒剂、强 UV 光或辐射),这些也破坏免疫原性,因此不适合制备有效疫苗。改为选择灭活处理,从而对所研究的微生物有效而保持疫苗免疫原性。不幸的是,所述处理因此可以留下活性形式的污染剂,很可能通过强感染剂产生疫苗污染。因此需要广泛范围灭活剂,所述灭活剂会使靶标微生物和潜在污染物灭活。所述灭活剂也用于处理产品,例如牛血清或胰蛋白酶,其中推荐病毒灭活 [4]。

[0007] 一些灭活剂的另一个难点是其稳定性。甲醛是有效灭活剂,特别在高温时有效,但是其非常稳定并且因此灭活后留有残余。这些残余能干扰下游残余活性微生物的测试。因此在这些测试中使用高度稀释,但是这降低其灵敏度。另外,所述残余能在最终疫苗中干扰免疫反应,如参考文献 5 指示福尔马林灭活疫苗对产生超敏反应有高风险。

[0008] 最后,甲醛灭活在一些情况下能是可逆的 [6, 7]。

[0009] 因此,需要新且改善的微生物灭活剂。这些应该对多种微生物(包含耐寒微生物)有用,而不除去所需免疫原性。其也应该留下很少或没有干扰或有害残余,并且所述灭活应该不可逆。其理想上也应适于降解核酸并且应甚至在液体培养基存在下显示活性。

发明内容

[0010] 本发明使用多官能有机过氧化物作为微生物灭活剂和 / 或用于降解核酸。这些灭活剂包含 (i) 至少一个碳原子或骨架和 (ii) 至少两个过氧化物基团, 即至少两个基团包含两个氧原子之间的单键 $-O-O-$ 。所述灭活剂理想地是氢过氧化物, 即包含基团 $-O-O-H$ 。所述化合物为本领域已知, 但是其现在显示是微生物的潜在灭活剂, 所述微生物包含能实现灭活而不负面影响免疫原性的极其稳定病毒如呼肠孤病毒。另外, 其能为高度水溶性, 生成没有毒性的降解产物 (如只生成简单羧酸如乙酸、丙酸或丁酸等), 并且在广泛 pH 和温度下有活性。另外, 其能在液体条件下显示令人惊奇的稳定性, 并且对降解细胞 DNA 有效。

[0011] 因此, 本发明提供处理含微生物样品 (如液体样品) 的工艺, 包含将样品接触多官能有机过氧化物。此工艺能造成样品中微生物的灭活。

[0012] 本发明也提供处理包含核酸 (例如 DNA, 如细胞 DNA) 的样品 (例如液体样品) 的工艺, 包含将样品接触多官能有机过氧化物。此工艺能造成样品中核酸的降解。

[0013] 本发明还提供制备药物组合物的方法, 其包括以下步骤: (i) 将包含微生物的样品接触多官能有机过氧化物以灭活其中的微生物; (ii) 从步骤 (i) 的产物制备药物组合物。所述药物组合物是可用的疫苗, 例如病毒疫苗。

[0014] 本发明也提供药物组合物, 包含 (i) 活性剂, 例如病毒免疫原, 和 (ii) 多官能有机过氧化物和还原剂的反应产物。所述还原剂和所述反应产物应该没有毒性, 例如都可以是糖。

[0015] 本发明也提供多官能有机过氧化物的水溶液, 其中所述多官能有机过氧化物存在的浓度是 (a) 小于 1% 重量或 (b) 5-70% 重量。所述溶液特别是选择 (a) 中, 也可以包含微生物。选择 (a) 中, 所述浓度范围通常为 0.001-0.5%, 例如 0.01-0.25%、0.01-0.1 或约 0.05%。选择 (b) 中, 所述浓度范围能是 6-60%、7-50%、8-40%、9-35% 或 10-30%。

[0016] 本发明也提供液体组合物, 包含 (i) 灭活的微生物, 和 (ii) 小于 1% 重量 (例如, 在范围 0.001-0.5% 中, 如 0.01-0.25%、0.01-0.1 或约 0.05%) 的多官能有机过氧化物。

[0017] 本发明也提供包含微生物和多官能有机过氧化物的反应产物的液体组合物。

[0018] 本发明也提供包含多官能有机过氧化物的消毒剂组合物。所述溶液包含上面讨论的水溶液, 但没有微生物。

[0019] 本发明也提供任何上述组合物, 以用于药物生产, 如用于疫苗的生产。类似地, 本发明提供生产药物的工艺, 其中所述工艺使用任何上述组合物。

[0020] 本发明也提供使用多官能有机过氧化物作为微生物灭活剂。本发明也提供多官能有机过氧化物用作微生物灭活剂。本发明也提供使用本发明水溶液作为微生物灭活剂。本发明也提供本发明水溶液用作微生物灭活剂。

[0021] 样品

[0022] 本发明用于处理包含微生物的样品。这些样品优选液体样品, 但是也能是固体, 如容器或工作场所的表面。所述样品包括但不限于: 微生物培养液体; 血液制品、血清、血浆、或血液衍生制剂 (如抗凝药); 源自动物的原料和产品; 其他可能被微生物污染的原料; 疫苗和诊断生成中的重组蛋白、材料和中间物 (如 ELISA); 来自使用微生物试剂工艺的废材料; 废水, 污水; 食品 (如牛奶) 等。

[0023] 本发明还用于样品的消毒或灭菌, 并且特别是表面消毒以破坏生活在其上的微生物。例如, 本发明能用于使用前的工作表面消毒, 使用前的手术设备或植入物消毒, 或需要

消毒或灭菌的任何其他目的。

[0024] 本发明用于灭活多种微生物,包含病毒和细菌。其能用于包膜病毒和无包膜病毒。其能用于有 RNA 基因组(单或双链)或 DNA 基因组(单或双链)的病毒,并且单链基因组可以是 + 或 - 义。其能用于分区段基因组或非区段基因组的病毒。其能用于有衣壳(单个或多个)的病毒或没有衣壳的病毒。其能用于革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌。

[0025] 因此,所述样品也可含有以下一种或多种:

[0026] • 正粘病毒:本发明可用于灭活正粘病毒,例如甲型、乙型、丙型流感病毒。甲型或乙型流感病毒可以是流行(每年/季节)毒株,或来自可能引起爆发流行的毒株(即,与目前流行毒株的血凝素相比具有新型血凝素的流感毒株,或对禽类对象有致病性并可能水平传播给人群的流感毒株,或对人具有致病性的流感毒株)。根据特定季节和病毒株特性,甲型流感病毒可以衍生自下列一种或多种血凝素亚型:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16。

[0027] • 副粘病毒科病毒:本发明可用于灭活副粘病毒科病毒,如肺炎病毒(RSV)、副粘病毒(PIV)和麻疹病毒(麻疹)。

[0028] • 肺炎病毒:本发明可用于灭活肺炎病毒或偏肺病毒,例如呼吸道合胞病毒(RSV)、牛呼吸道合胞病毒、小鼠肺炎病毒和火鸡鼻气管炎病毒。优选所述肺炎病毒是 RSV 或偏肺病毒(HMPV)。

[0029] • 副粘病毒:本发明可用于灭活副粘病毒,如 1、2、3 或 4 型副流感病毒(PIV)、流行性腮腺炎病毒(Mumps)、仙台病毒、猴病毒 5、牛副流感病毒和新城疫病毒。优选所述副粘病毒是 PIV 或流行性腮腺炎病毒。

[0030] • 麻疹病毒:本发明可用于灭活麻疹病毒,例如麻疹。

[0031] • 小核糖核酸病毒:本发明可用于灭活小核糖核酸病毒,如肠道病毒、鼻病毒、嗜肝 RNA 病毒、心脏病毒和口蹄疫病毒。

[0032] • 肠道病毒:本发明可用于灭活肠道病毒,如 1、2 或 3 型脊髓灰质炎病毒,柯萨奇(Coxsackie)病毒 A 组 1-22 型和 24 型,柯萨奇病毒 B 组 1-6 型,艾柯(ECHO)病毒 1-9、11-27 和 29-34 型和肠道病毒 68-71。优选所述肠道病毒是脊髓灰质炎病毒,例如 1 型毒株如 Mahoney 或 Brunenders,2 型毒株如 MEF-I 或 3 型毒株如 Saukett。

[0033] • 嗜肝 RNA 病毒:本发明可用于灭活嗜肝 RNA 病毒(也称为肝病毒),例如甲型肝炎病毒。

[0034] • 披膜病毒:本发明可用于灭活披膜病毒,例如风疹病毒、α 病毒或动脉炎病毒。优选风疹病毒属,例如风疹病毒。用于灭活的有用 α 病毒包含水生 α 病毒,例如鲑鱼胰腺病病毒(salmon pancreas disease virus)和昏睡病病毒。

[0035] • 黄病毒:本发明可用于灭活黄病毒,如蜱媒脑炎(TBE)、登革热(1、2、3 或 4 型)、黄热病、日本脑炎、西尼罗河脑炎、圣路易斯脑炎、俄国春夏脑炎、波瓦生脑炎。

[0036] • 丙肝病毒:本发明可用于灭活丙肝病毒(HCV)。

[0037] • 瘟病毒:本发明可用于灭活瘟病毒,如牛病毒性腹泻(BVDV)、猪瘟(CSFV)或边界病(BDV)病毒。

[0038] • 嗜肝 DNA 病毒:本发明可用于灭活嗜肝 DNA 病毒,例如乙肝病毒。

[0039] • 杆状病毒:本发明可用于灭活杆状病毒,例如恐水病病毒(如狂犬病病毒)和水

泡病毒 (VSV)。

[0040] • 杯状病毒：本发明可用于灭活杯状病毒例如沃克病毒，和诺沃克样病毒例如夏威夷病毒和雪山病毒，和水泡病毒例如猪小疱疹病毒。

[0041] • 冠状病毒：本发明可用于灭活冠状病毒，例如 SARS、人呼吸道冠状病毒、禽传染性支气管炎 (IBV)、小鼠肝炎病毒 (MHV) 和猪传染性肠胃炎病毒 (TGEV)。

[0042] • 逆转录病毒：本发明可用于灭活逆转录病毒，如肿瘤病毒、慢病毒或泡沫病毒。肿瘤病毒可以是 HTLV-1、HTLV-2 或 HTLV-3。慢病毒抗原可以是 SIV、HIV-1 或 HIV-2。

[0043] • 呼肠孤病毒：本发明可用于灭活呼肠孤病毒，如正呼肠孤病毒、轮状病毒、环状病毒或科罗拉多壁虱热病毒 (Coltivirus)。

[0044] • 细小病毒：本发明可用于灭活细小病毒，例如细小病毒 B19 或博卡病毒。

[0045] • 其他肝炎病毒：本发明可用于灭活丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒或庚型肝炎病毒。

[0046] • 人疱疹病毒：本发明可用于灭活人疱疹病毒，如单纯疱疹病毒 (HSV)，水痘 - 带状疱疹病毒 (VZV)，EB 病毒 (EBV)，巨细胞病毒 (CMV)，人疱疹病毒 6 (HHV6)，人疱疹病毒 7 (HHV7) 和人疱疹病毒 8 (HHV8)。

[0047] • 乳头状多瘤空泡病毒：本发明可用于灭活乳头状多瘤空泡病毒，例如乳头瘤病毒和多瘤病毒。乳头瘤病毒包括 HPV 血清型 1、2、4、5、6、8、11、13、16、18、31、33、35、39、41、42、47、51、57、58、63 和 65。

[0048] • 腺病毒：本发明可用于灭活腺病毒，包含任何人腺病毒 A、B、C、D、E、F 或 G。

[0049] • 包特氏菌属 (*Bordetella*)：本发明可用于灭活包特氏菌 (*Bordetella*)，例如百日咳博德特菌 (*B. pertussis*)。

[0050] • 梭菌科 (*Clostridiaceae*)：本发明可用于灭活梭菌，例如破伤风梭菌 (*C. tetani*) 和肉毒梭菌 (*C. botulinum*)。

[0051] • 棒状杆菌科 (*Corynebacteriaceae*)：本发明可用于灭活棒状杆菌 (*Corynebacteria*)，例如白喉棒杆菌 (*C. diphtheriae*)。

[0052] • 巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*)：本发明可用于灭活巴斯德菌种，例如流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)。

[0053] • 分支杆菌科 (*Mycobacteriaceae*)：本发明可用于灭活分枝杆菌 (*Mycobacteria*)，例如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*M. bovis*) 和减毒卡介苗 (*Bacillus Calmette Guerin*)。

[0054] • 奈瑟球菌科 (*Neisseriaceae*)：本发明可用于灭活奈瑟球菌种 (*Neisseria*)，例如脑膜炎奈瑟球菌 (*N. meningitidis*) 和淋病奈瑟球菌 (*N. gonorrhoeae*)。

[0055] • 沙门氏菌科 (*Salmonellaceae*)：本发明可用于灭活沙门氏菌种 (*Salmonella*)，例如伤寒沙门菌 (*S. typhi*)、甲型副伤寒沙门菌 (*S. paratyphi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)。

[0056] • 链球菌科 (*Streptococcaceae*)：本发明可用于灭活链球菌 (*Streptococci*)，例如肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) (肺炎球菌)、无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 和化脓链球菌 (*S. pyogenes*)。

[0057] • 支原体科 (*Mycoplasmataceae*)：本发明可用于灭活支原体 (*Mycoplasmas*)，例如

肺炎支原体(*M. pneumonia*)、猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)、牛支原体(*M. bovis*)、无乳支原体(*M. agalactiae*)、鸡毒支原体(*M. gallisepticum*),包含任何可以在污染的细胞培养物或细胞培养物衍生材料中发现的支原体种。

[0058] 除了微生物之外,样品也能包含溶液中的核酸,如残余的细胞 DNA。例如,当裂解病毒在细胞培养基上生长和制备无细胞的收集物时,能出现这些情况。在所述示例中,所述多官能有机过氧化物能灭活所述微生物和降解溶液中的核酸,因此在疫苗(并且特别是病毒疫苗)生产中提供双重优势。因此,本发明处理的样品可以包含微生物和细胞 DNA(例如细胞系如 MDCK 的基因组 DNA)。

[0059] 当样品包含核酸(也包含或不包含微生物)时,所述核酸通常包含 DNA,如细胞 DNA。核酸不是在微生物内(例如,在细菌内,或病毒颗粒内),通常溶液中没有所述核酸,如溶液中的细胞 DNA,而不是细胞内的细胞 DNA(即是细胞来源的 DNA,但不再出现在细胞内)。

[0060] 所述微生物可以特意存在(如在病毒生长后以制备疫苗后)或作为污染物(如在污水中,或来自重组蛋白表达后的受污染细胞培养基成分、细胞或培养物)。同样,在一些实施方式中,样品可以特意包含微生物,但也可以包含污染微生物。

[0061] 本发明特定用于灭活病毒,并且因此处理包含微生物样品的工艺优选是在包含病毒的样品中灭活病毒的工艺。

[0062] 在一些实施方式中,本发明能用于处理不必需包含微生物的样品,但是所述样品怀疑包含微生物或有包含微生物的风险。在这些实施方式中,所述处理不是必需的,但是用于确保微生物灭活以避免风险(如消毒中)。通常,所述样品能支持微生物生长或持续性。

[0063] 除了包含微生物以外,样品可以包含其他材料,如细胞底物或其残留物、细胞核酸(如 DNA)、鸡蛋蛋白等。除了灭活微生物以外,有机过氧化物可以与这些其他材料反应。尽管理想上所述样品不包含大量的、与所述感染材料竞争以和灭活剂反应的非感染材料。这些反应浪费所述灭活剂。能经历这些无效反应的材料包含,例如还原剂(见下)。因此,例如,能避免保持高水平残留葡萄糖的培养。

[0064] 在根据本发明处理所述样品后,能除去和/或破坏残留的或多余的过氧化物。这能以多种方式实现,例如通过加入还原剂。合适的还原剂包括但不限于,硫代硫酸钠、抗坏血酸、糖(例如葡萄糖或蔗糖;优选还原糖)、多糖、多酚等。还原糖通常以摩尔过量加入(每个还原基团计算)到所述过氧化物中,例如以还原基团与化学灭活剂 2:1-4:1 的摩尔过量。还原剂可以足够量加入以阻滞所述过氧化物的起始浓度。然而,对已知最终浓度范围的标准化良好的工艺而言,使用者优选加入更低浓度,如浓度足够阻止会在灭活后残余的过氧化物量。

[0065] 根据所述化学灭活剂和根据使用的所述还原剂,所灭活的灭活剂能留在所述反应溶液中(例如,如果其无害,如单糖),或可以稀释,或可以除去。移除步骤可作为所述感兴趣试剂的下游工艺的一部分(如在从所述灭活材料中纯化蛋白或病毒成分期间)。因此,移除可以涉及超滤/渗滤、透析、色谱纯化等。

[0066] 多官能有机过氧化物

[0067] 本发明使用多官能有机过氧化物。所述化合物包含至少一个碳原子或骨架,即是有机物,而不像 H_2O_2 。其也包含至少两个组,即包含多个官能性过氧化物基团,而不像过氧乙酸。

[0068] 所述过氧化物化合物理想地是氢过氧化物,即包含基团 $-O-O-H$ 。其可以包含多个氢过氧化物基团。其他多官能有机过氧化物能是过氧基缩酮,如 $CR^1R^2(OOR^3)(OOR^4)$ 或四恶烷(tetraoxane),但是优选包含连接到碳原子上的至少一个 $-O-O-H$ 基团的化合物。

[0069] 至少一个过氧化物基团连接到碳原子上以生成有机过氧化物,并且在一些实施方式中,各个过氧化物基团中至少一个氧原子连接到碳原子上。

[0070] 所述过氧化物化合物理想地是成对过氧化物(或氢过氧化物),其中两个过氧化物(或氢过氧化物)基团连接到相同碳原子上。

[0071] 所述化合物理想地有 2、3 或 4 个过氧化物基团,尽管不排除有更高过氧化物基团数目的化合物。

[0072] 所述化合物能是同双官能,即包含两个相同的过氧化物(或氢过氧化物)官能基团,因此灭活剂可以是成对的二氢过氧化物(bishydroperoxide)。或者,灭活剂可以是异双官能,即包含两个不同的过氧化物官能基团,如,可以包含氢过氧化物($-OOH$)和不同的过氧化物($-OOR$,其中 $R \neq H$)。

[0073] 优选的化合物是水溶性的。这促进其在疫苗生产中的应用。

[0074] 优选化合物不含卤素,因为所述化合物通常视作不太有害。因此,灭活剂可以只由碳、氢、氧和氮原子组成。特别优选化合物只由碳、氢和氧原子组成。

[0075] 优选化合物有低于 500 的分子量,如 <300 、 <250 、 <200 、 <150 、 <100 。

[0076] 优选化合物不含 $-C(=O)OOH$ 基团,并且因此在灭活中没有产生非常酸性的 pH(如不像过氧乙酸)。这些条件能破坏 pH 敏感性免疫原,并且也能造成用于所述灭活工艺的设备 and 机器的腐蚀。

[0077] 优选化合物是非爆炸性的,例如不优选三过氧化三丙酮。

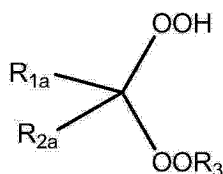
[0078] 灭活中,所述化合物理想地不形成对动物(包括人)毒性高于比所述起始产物的反应或降解产物。

[0079] 优选化合物能灭活 (i) $a \geq 5$ 的人甲型流感病毒,优选 $\geq 7\log_{10}$ 的感染效价(titre)下降,和 / 或 (ii) $a \geq 3$ 的 3 型呼肠病毒,优选 ≥ 5 ,并且特别优选 $\geq 7\log_{10}$ 的感染效价下降。

[0080] 优选化合物能灭活微生物而不降低其免疫原性。特别优选的化合物能灭活甲型流感病毒而不降低其血凝素的免疫原性。

[0081] 可用的化合物如式 I 所示:

[0082]



[0083] 其中:

[0084] R_{1a} 是 H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(=O)H$ 、 $C(=O)C_{1-6}$ 烷基、 $C(=O)OC_{1-6}$ 烷基,可选 N -单 C_{1-6} 烷基化或 N -二 C_{1-6} 烷基化氨基,可选 N -单 C_{1-6} 烷基化或 N -二 C_{1-6} 烷基化氨基羰基、 $S(=O)_{0-2}C_{1-6}$ 烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;

[0085] R_{2a} 是 H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{1-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯氧基、 $C(=O)H$ 、 $C(=O)C_{1-6}$ 烷

基、C(0)OC₁₋₆烷基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基羰基、S(0)₀₋₂C₁₋₆烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基、-(CR₄R₅)_nCR₆(OOH)₂或 R_{2a}通过 L 连接 R_{2b};

[0086] R₃是 H 或 C(OOH)R_{1b}R_{2b},

[0087] R_{1b}是 H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆炔基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C(0)H、C(0)C₁₋₆烷基、C(0)OC₁₋₆烷基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基羰基、S(0)₀₋₂C₁₋₆烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,

[0088] R_{2b}是 H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆炔基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C(0)H、C(0)C₁₋₆烷基、C(0)OC₁₋₆烷基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基羰基、S(0)₀₋₂C₁₋₆烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基或 R_{2b}通过 L 连接 R_{2a};

[0089] 在每次出现时, R₄选自 H 或 C₁₋₃烷基、羟基、氰基、硝基、C₂₋₄烯基、C₁₋₃烷氧基、C₂₋₄烯氧基、C₁₋₃烷基羰基、羧基、C1-6-烷氧基羰基,可选 N-单 C₁₋₃烷基化或 N-二 C₁₋₃烷基化氨基羰基、C₁₋₃硫代烷基、C₁₋₃烷基亚磺酰基、C₁₋₃烷基磺酰基、C₁₋₃烷基氨基磺酰基和二-C₁₋₃烷基氨基磺酰基;

[0090] 在每次出现时, R₅选自 H 或 C₁₋₃烷基、羟基、氰基、硝基、C₂₋₄烯基、C₁₋₃烷氧基、C₂₋₄烯氧基、C₁₋₃烷基羰基、羧基、C1-6-烷氧基羰基,可选 N-单 C₁₋₃烷基化或 N-二 C₁₋₃烷基化氨基羰基、C₁₋₃硫代烷基、C₁₋₃烷基亚磺酰基、C₁₋₃烷基磺酰基、C₁₋₃烷基氨基磺酰基和二-C₁₋₃烷基氨基磺酰基;

[0091] L 是 C₁₋₈亚烷基;

[0092] R₆是 H、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆炔基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C(0)H、C(0)C₁₋₆烷基、C(0)OC₁₋₆烷基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基羰基、S(0)₀₋₂C₁₋₆烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;和

[0093] n 是 1 至 8。

[0094] 烷基、烷氧基基团的烷基部分、烯基、烯基基团的烯基部分、炔基或亚烷基可以是分枝或不分枝的,和 / 或可以是取代或未取代的。当取代时,各个取代基可以选自:羟基、氰基、硝基、C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、苄基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯氧基、C₁₋₆烷基羰基、羧基、C₁₋₆烷氧基羰基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基羰基,可选 N-单 C₁₋₆烷基化或 N-二 C₁₋₆烷基化氨基亚磺酰基、C₁₋₆硫代烷基、C₁₋₆烷基亚磺酰基、C₁₋₆烷基磺酰基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基磺酰基和二-C₁₋₆烷基氨基磺酰基。

[0095] 其中 R₃不是 -H,并且 R_{1a}不同于 R_{2a},这些化合物能以不同的对映体形式存在。本发明能使用特定的对映体或外消旋混合物。

[0096] 在一些实施方式中, R_{1a}和 R_{2a}相同。在另一些实施方式中, R_{1a}和 R_{2a}不同。

[0097] 在一些实施方式中, R_{1a}和 R_{1b}相同。在另一些实施方式中, R_{1a}和 R_{1b}不同。

[0098] 在一些实施方式中, R_{2a}和 R_{2b}相同。在另一些实施方式中, R_{2a}和 R_{2b}不同。

[0099] R_{1a}优选是 H 或 C₁₋₆烷基或 C₁₋₄烷基。因此 R_{1a}能是 H 或 CH₃。

[0100] R_{2a}优选是 H 或 C₁₋₆烷基或 C₁₋₄烷基或 -(CH₂)_nCH(OOH)₂或通过 L 连接 R_{2b}。因此 R_{2a}能是 CH₃、Et、n-Pr 或 -(CH₂)₂₋₄CH(OOH)₂

[0101] R_{1b}优选是 H 或 C₁₋₆烷基或 C₁₋₄烷基。因此 R_{1b}能是 H 或 CH₃。

[0102] R_{2b} 优选是 C_{1-4} 烷基或通过 L 连接 R_{2a} 。因此 R_{2b} 能是 CH_3 、Et 或 n-Pr。

[0103] 各个 R_4 (可以相同或不同) 优选是 H 或 $-CH_3$ 或羟基。

[0104] 各个 R_5 (可以相同或不同) 优选是 H 或 $-CH_3$ 或羟基。

[0105] L 优选是 C_{2-5} 亚烷基, 例如 $-(CH_2)_3-$ 。

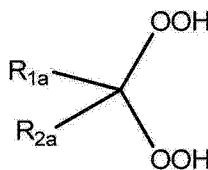
[0106] R_6 优选是 H 或 C_{1-6} 烷基或 C_{1-4} 烷基。

[0107] n 优选是 2 至 6, 或是 2 至 4, 或是 3。

[0108] 在一个实施方式中: R_{1a} 是 H 或 CH_3 ; R_{2a} 是 CH_3 、Et、n-Pr 或 $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$ 或 R_{2a} 通过 L 连接 R_{2b} ; R_3 是 H 或 $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$; R_{1b} 是 H 或 CH_3 ; R_{2b} 是 CH_3 、Et 或 n-Pr 或 R_{2b} 通过 L 连接 R_{2a} ; L 是 $-(CH_2)_3-$; 和 n 是 3。

[0109] 所述混合物可以如式 II 所示:

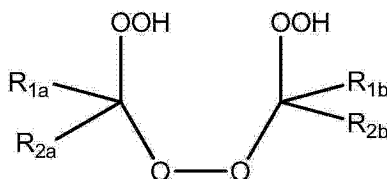
[0110]



[0111] 其中, 在优选实施方式中: R_{1a} 是 H 或 CH_3 ; 和 R_{2a} 是 CH_3 、Et 或 n-Pr。

[0112] 所述混合物可以如式 III 所示:

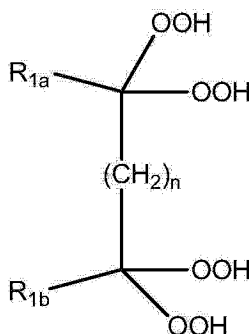
[0113]



[0114] 其中, 在优选实施方式中: R_{1a} 是 H 或 CH_3 ; R_{2a} 是 CH_3 、Et 或 n-Pr 或 R_{2a} 通过 L 连接 R_{2b} ; R_{1b} 是 H 或 CH_3 ; R_{2b} 是 CH_3 、Et、n-Pr 或 R_{2b} 通过 L 连接 R_{2a} ; 和 L 是 $-(CH_2)_3-$ 。

[0115] 所述混合物可以如式 IV 所示:

[0116]



[0117] 其中, 在优选实施方式中: R_{1a} 是 H; R_{1b} 是 H; 和 n 是 3。

[0118] 合适的化合物包括但不限于: 2, 2' - 二氢过氧-2, 2' - 二叔丁基过氧化物; 2, 2- 二氢过氧丁烷(Dihydroperoxybutane); 1, 1- 二氢过氧乙烷; 1, 1- 二氢过氧丙烷; 1, 1- 二氢过氧丁烷; 1, 1' - 二氢过氧-1, 1' - 二丙基过氧化物; 1, 1' - 二氢过氧-1, 1' - 二丁基过氧化物; 1, 1' - 二氢过氧-1, 1' - 二乙基过氧化物; 1, 1, 5, 5- 四氢过氧戊烷; 3, 7- 二- 氢过氧-1, 2- 二氧杂环庚烷; 和 1, 1- 二氢过氧甲烷。优选 1, 1- 二氢

过氧乙烷。这些化合物中的至少一些为本领域已知(如见参考文献 8-10)和 / 或从供应商市售可得,如来自 Ferak 公司(Ferak AG)(德国柏林)或阿科玛公司(Arkema Inc.)(美国费城)。本发明能使用参考文献 8-10 或从这些供应商可得的化合物,并且特别是其水溶性化合物。

[0119] 本发明可以使用单个灭活剂化合物或化合物的混合物,例如包含多于一种不同的式 I 化合物。当混合物包含两个不同的有机过氧化物时,其可以多种摩尔比率出现,如 10:1-1:10、5:1-1:5、2:1-1:2 或基本等摩尔比率。混合物中的化合物可以显示氢键以形成环结构,例如分子 056-1 和 058-1 之间。一些化合物可以二聚体存在,并且也可以单体和低聚体的混合物存在。

[0120] 因此,本发明能使用包含式 II 化合物和式 III 化合物的混合物。在所述混合物中: R_{1a} 和 R_{1b} 在式 II 和式 III 中能是相同的;和 / 或 R_{2a} 和 R_{2b} 在式 II 和式 III 中能是相同的。

[0121] 发明人使用足够灭活感兴趣样品中微生物的浓度,理想地是不降低所需微生物(或其组分)的免疫原性。这通常与液体样品混合以生成小于 1% 重量的终浓度,并且通常范围为 0.001-0.5%,如 0.01-0.25%、0.01-0.1%。例如,加入的多官能有机过氧化物总量可以是总液体样品(重量)的 0.75%、0.5%、0.25%、0.2%、0.1%、0.075%、0.05%、0.025%、0.01% 或 0.005%。通常量是约 0.05%。

[0122] 灭活剂能在广泛 pH 范围内使用,如 pH5 - 10、pH6 - 9 或在 pH7 $\pm$ 0.5。灭活能在缓冲液存在下发生(可以在与灭活剂一起的组合物中出现),但这通常不是必需的。

[0123] 灭活剂可以与温度 / 时间组合方案联用以在任何特定情况下获得所需结果,并且当实现基本相同的结果时,这两个因子能改变。灭活在升高的温度下更迅速,并且因此所述灭活时间段缩短。根据所述条件,例如,灭活温度能保持低至 0 $^{\circ}$ C 而灭活时间长(例如几个小时或几天),或高达 60 $^{\circ}$ C 而时间短(例如仅仅数分钟)。然而,更高的温度下很多官能蛋白或抗原会受损或破坏,并且因此优选处理通常使用更低温度(如 <30 $^{\circ}$ C)持续更长时间。任何特定情况下能很容易测试这些参数的效果。

[0124] 灭活剂以某一温度使用,所述温度能使所述化合物在所需的处理时期内,灭活感兴趣样品中的所需微生物。因此灭活可以在任何合适温度下发生,如 0-60 $^{\circ}$ C、10-50 $^{\circ}$ C、15-40 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C -25 $^{\circ}$ C、19-23 $^{\circ}$ C 等。灭活通常在基本恒定的温度下发生,如 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, $\pm$ 1 $^{\circ}$ C。然而,在一些实施方式中,灭活使用不同温度的阶段,例如第一阶段处于低温(如 2-8 $^{\circ}$ C,例如约 4 $^{\circ}$ C)和第二阶段在更高温度,通常高于第一阶段至少 10 $^{\circ}$ C(如 25-50 $^{\circ}$ C,例如约 37 $^{\circ}$ C),或第一阶段处于更高温度,如约 25-50 $^{\circ}$ C,例如约 37 $^{\circ}$ C),然后第二阶段在更低温度,如约 2-8 $^{\circ}$ C,例如约 4 $^{\circ}$ C)。

[0125] 两阶段工艺在所述多官能过氧化物用于灭活和核酸降解中特别有用。在典型方案中,所述更低温度阶段能利于病毒灭活,而所述更高温度能利于核酸降解。

[0126] 灭活剂使用足够时间以在所需温度灭活感兴趣样品中的微生物,理想地不降低所需微生物的免疫原性。灭活处理通常持续 15 分钟 -72 小时,例如 6-48 小时、12-36 小时、18-26 小时或约 16 或约 24 小时。

[0127] 根据要灭活的微生物的特性和工业设置,技术人员能选择 (i) 灭活时间、(ii) 灭活剂浓度、和 (iii) 灭活温度的合适组合。实践中,疫苗抗原的灭活处理通常持续多至 72 小时,但是由于实践原因,优选处理时间至多 24 小时或更短。然而,也能使用长许多的、多

至数周的灭活时间,例如使细菌抗原脱毒。对于强抗原,或者对废料中的微生物灭活而言,可以选择更高灭活剂浓度和仅仅数分钟或几个小时的更短灭活时间。

[0128] 灭活或降解核酸的工艺能操作一次或多次(即,多官能有机过氧化物加入到样品中,使其作用于样品,然后进一步加入多官能有机过氧化物等),重复使用以实现或确保比一轮单独处理更高水平的降解。例如,操作所述工艺两次。包括每轮时间、温度、和浓度在内的所述条件可以相同或不同。条件可以变化,从而不同轮可以有不同的焦点,例如一轮利于灭活,另一轮利于核酸降解等。任何两轮优选使用相同的多官能有机过氧化物,但是作为替代,能使用不同的多官能有机过氧化物。在使用多官能有机过氧化物的两轮之间,工艺能涉及去除和/或降解残余多官能有机过氧化物的步骤,但是在一些实施方式中,第二轮能在没有所述去除情况下进行。

[0129] 联合处理

[0130] 本发明的灭活剂可以与烷化剂(即引入烷基基团到化合物的物质)联用。合适的烷化剂包含单烷化剂,例如 β -丙内酯(BPL)。BPL是在很多疫苗制备中用于灭活病毒的单烷化剂[2]。BPL与包括核酸在内的多种生物分子反应,其通过烷基化和脱嘌呤作用产生结构修饰。

[0131] 因此,本发明的工艺涉及使用多官能有机过氧化物的步骤,所述工艺也能涉及使用烷化剂的步骤。官能优选分开进行所述两个步骤,即使用多官能有机过氧化物然后使用烷化剂,或者已经使用烷化剂后使用多官能有机过氧化物,而不是同时使用多官能有机过氧化物和烷化剂。

[0132] 因此,例如,本发明提供处理包含微生物样品的工艺,包含将样品以任何顺序接触(i)多官能有机过氧化物和(ii)烷化剂例如BPL。

[0133] 相似地,本发明提供制备药物组合物的方法,其包括以下步骤:(i)将包含微生物的样品以任何顺序接触多官能有机过氧化物和烷化剂;(ii)从步骤(i)的产物制备药物组合物。两个处理的步骤(i)实现非常好的微生物灭活。

[0134] 本发明也提供液体组合物,包含下列两个或多个(i)微生物和多官能有机过氧化物的反应产物(ii)微生物和烷化剂的反应产物,和/或(iii)微生物、多官能有机过氧化物和烷化剂的反应产物。所述组合物可以包含 β 羟基丙酸。

[0135] 本发明提供处理样品的工艺,包含将样品接触多官能有机过氧化物,其中所述样品是包含微生物的样品和烷化剂如BPL的反应产物。相反地,本发明也提供处理样品的工艺,包含将样品接触烷化剂如BPL,其中所述样品是包含微生物的样品和多官能有机过氧化物的反应产物。本发明也提供制备药物组合物的方法,包含使用从所述两个工艺之一获得的经处理样品的步骤。

[0136] 如上所述,当与烷化剂联用时,至少一轮处理是通过烷化剂,并且至少一轮处理是通过多官能有机过氧化物。所述样品可以在灭活的第一轮用烷化剂处理和在灭活的第二轮用多官能有机过氧化物处理,或者替代地,在灭活的第一轮用多官能有机过氧化物处理和和在灭活的第二轮用烷化剂处理。灭活的其他轮可以用烷化剂或多官能有机过氧化物(或用其他灭活剂)。

[0137] 包括每轮处理时间、温度、和浓度在内的所述条件可以相同或不同。BPL处理的有用条件如下描述:

[0138] BPL 通常加入到终浓度小于 1% 体积（如小于 1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.2%、0.1%、0.075%、0.05%、0.025%、0.01% 或 0.005%）。优选地，BPL 以 0.1%-0.01% 使用。

[0139] 优选烷化剂加入到缓冲水性样品中，并且溶液的 pH 优选维持在 5 - 10。更优选溶液的 pH 维持在 6-9。甚至更优选溶液的 pH 维持在 7-8。

[0140] 烷化剂的连续处理之间，可以有除去烷基化剂步骤，但可加入所述烷化剂用于第二处理，而不除去任何从第一处理残余的烷化剂。相似地，如果已经使用多官能有机过氧化物，则可以在烷化剂处理前去除。

[0141] 用烷化剂特别是 BPL 处理，可以涉及不同温度的阶段。例如，可以有低温下的第一阶段（例如 2-8℃，如约 4℃）和更高温度下的第二阶段，所述第二阶段通常高于第一阶段至少 10℃（例如 25-50℃，如约 37℃）。所述两阶段工艺在所述烷化剂用于灭活和 DNA 降解中特别有用。在某一典型方案中，病毒灭活在更低温度阶段发生，而 DNA 降解在更高温度阶段发生。如下面更加详细所述，增加的温度也能促进除去热敏感性烷化剂。

[0142] 所述烷化剂和任何残余的副产物优选在最终药物制剂前除去。因此最终组合物能包含少于 0.1% 的游离丙酸和组合的 BPL（如少于 0.1%、0.05%、0.025%、0.01%、0.005%、0.001% 或 0.01%）。优选地，最终药物组合物包含少于 0.01%BPL。

[0143] BPL 能通过加热方便地除去，以水解生成非毒性的 β 羟基丙酸。水解需要的时间长度取决于 BPL 总量和温度。更高的温度产生更快的水解，但是所述温度不应升高至损坏所述活性蛋白质成分。加热到约 37℃ 持续 2-2.5 小时适于除去 BPL。DNA 片段化主要在 37℃ 的 BPL 水解步骤中发生，而不是在 2-8℃ 的病毒灭活中发生。

[0144] 药物组合物和产物

[0145] 本发明提供制备药物组合物的方法，包含将含微生物的样品（通常是液体样品）接触多官能有机过氧化物以灭活其中微生物的第一步骤，然后是从所述灭活材料中制备药物组合物的步骤。所述灭活材料可以直接用于制备所述药物，或可以用于进一步加工，例如稀释、纯化、与其他活性成分组合、与活性药物成分组合等。

[0146] 例如，本发明提供制备疫苗的方法，包含将含病毒的样品（例如通常是液体样品，如培养液）接触多官能有机过氧化物以灭活所述病毒的第一步骤，然后是从所述灭活病毒中制备药物组合物的步骤。所述灭活病毒可以直接用于制备所述疫苗，或可以用于进一步加工，例如稀释、病毒成分的进一步纯化、与其他疫苗抗原（病毒和 / 或细菌）组合、与缓冲液组合、与佐剂组合等。

[0147] 所述工艺可以包含制备含有微生物样品的起始步骤，如病毒或细菌培养的步骤。

[0148] 病毒生长后，灭活剂浓度可以用于纯化病毒颗粒，如在澄清细胞培养物中出现的病毒颗粒，或从所述澄清细胞培养物中纯化的病毒颗粒。方法涉及通过澄清除去细胞材料，并且然后从澄清细胞培养物中纯化病毒颗粒，如通过色谱。所述灭活剂可用于以此方式纯化的病毒颗粒或在进一步可选的超滤 / 渗滤步骤后用于纯化的病毒颗粒。如上所述，除了灭活所述病毒外，所述多官能有机过氧化物能降解来自病毒生长的细胞底物中的任何残余的 DNA。

[0149] 所述灭活剂可以在内毒素除去步骤发生前或后使用。

[0150] 疫苗组合物可以通过纯化免疫原蛋白从灭活病毒中制备，如在来自经灭活流感病毒的裂解或表面抗原疫苗的制备中。

[0151] 灭活病毒可以在任何合适底物上增殖,如在细胞系培养中、在原代细胞培养中、在鸡蛋中等。细胞培养经常使用哺乳动物细胞,例如仓鼠、牛、灵长类动物(包含人和猴)和狗细胞。可使用各种细胞类型,例如肾细胞、成纤维细胞、视网膜细胞、肺细胞等。合适仓鼠细胞的例子是名为 BHK21 或 HKCC 的细胞系。合适的猴细胞是例如非洲绿猴细胞,如 Vero 细胞系中的肾细胞 [11-13]。合适的犬细胞是(例如)肾细胞,例如 CLDK 和 MDCK 细胞系中。因此,合适的细胞系包括但不限于:MDCK、CHO、293T、BHK、Vero、MRC5、PER. C6、WI-38 等。用于培养流感病毒的优选哺乳动物细胞系包括:MDCK 细胞 [14-17],衍生自马达二氏(Madin Darby)犬肾;Vero 细胞 [18-20],衍生自非洲绿猴(*Cercopithecus aethiops*)肾;或 PER. C6 细胞 [21],衍生自人胚视网膜母细胞。这些细胞系可广泛获得,例如来自美国典型培养物保藏中心(ATCC) [22]、Coriell 细胞库 [23] 或欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)。例如,ATCC 提供各种不同 Vero 细胞,目录号为 CCL81、CCL81.2、CRL1586 和 CRL-1587;并提供 MDCK 细胞,目录号为 CCL34。PER. C6 可获自 ECACC,保藏号为 96022940。也使用哺乳动物细胞,病毒可以在禽细胞或细胞系上生长[例如参见参考文献 24-26],所述细胞系包括衍生自鸭(如鸭视网膜)或母鸡如鸡胚胎成纤维细胞(CEF)等的细胞系。示例包含禽胚胎干细胞 [24, 27],包括衍生自鸡胚胎干细胞的 Ebx 细胞系、EB45、EB14 和 EB14-074 [28]。

[0152] 一个有用的细胞系是马达二氏(Madin Darby)犬肾衍生的 MDCK 细胞 [29-31]。原始 MDCK 细胞系是获自 ATCC 的 CCL34。也可以使用 MDCK 细胞的衍生物。例如,参考文献 14 公开了适合悬浮培养生长的 MDCK 细胞系('MDCK33016',保藏号 DSM ACC2219)。类似的,参考文献 32 公开了在无血清培养基中悬浮培养的 MDCK 衍生细胞系('B-702',保藏号 FERM BP-7449)。参考文献 33 公开了非致瘤性 MDCK 细胞,包括'MDCK-S'(ATCC PTA-6500)、'MDCK-SF101'(ATCC PTA-6501)、'MDCK-SF102'(ATCC PTA-6502)和'MDCK-SF103'(PTA-6503)。参考文献 34 公开了非常容易感染的 MDCK 细胞系,包括'MDCK. 5F1'细胞(ATCC CRL12042)。可使用任何这些 MDCK 细胞系。

[0153] 病毒可以悬浮培养(如见参考文献 14, 35 和 36)或贴壁培养生长。一种适合悬浮培养的 MDCK 细胞系是 MDCK33016(保藏号为 DSM ACC2219)。或者,可采用微载体培养。

[0154] 病毒可在无血清培养基和/或无蛋白培养基中生长。在本发明中,如果培养基中不包含人或动物来源血清的添加剂,则称为无血清培养基。无蛋白应理解为在不含蛋白质、生长因子、其它蛋白添加剂和非血清蛋白质的情况下发生细胞增殖的培养物,但可任选包含诸如胰蛋白酶或其它蛋白酶等可能是病毒生长所必需的外源蛋白质。

[0155] 本发明也能用于制备其本身不是药物组合物但是在制备药物组合物中使用的材料。例如,本发明提供通过使用多官能有机过氧化物来灭活现有或潜在污染病毒来生产安全药物产品的方法,例如来自发酵培养工艺的重组蛋白分子。可以在所述工艺中出现或引入的病毒是,例如在很多永久细胞系中出现的逆转录病毒,所述细胞系特定是啮齿动物细胞如 CHO(中华仓鼠卵巢)细胞或小鼠骨髓瘤细胞。其他污染物可以是源自动物衍生原材料的动物病毒,例如猪胰蛋白酶、牛来源的培养基补充物、或动物来源的蛋白水解产物。所述灭活剂能在几乎任何步骤中引入所述生产工艺:其可以用于原材料、缓冲液、培养基和其他起始材料的预处理,可以在收集大量原材料(如发酵罐收集)中或之后应用,或者在随后的浓缩和纯化步骤中或之后。然而,出于实践原因,可以优选在所述工艺早期进行所述灭活以避免整个工艺中载有微生物。

[0156] 药物组合物通常还包含其抗原以外的组分,例如它们一般包含一种或多种药物载体和/或赋形剂。对这类组分的充分讨论参见参考文献 37。疫苗组合物也可以包含佐剂,例如公开于参考文献 38 和 39 中(例如包含一种或多种铝盐、或包含亚微米水包油乳液的佐剂)。

[0157] 药物组合物优选采用水性形式,特别是在给药点时,但是也能以非水性液体形式或干燥形式呈现,如作为明胶胶囊或冻干等。

[0158] 药物组合物可以包含一种或多种防腐剂,例如硫柳汞或 2- 苯氧乙醇。优选不含汞的组合物,并且优选不含防腐剂的疫苗。

[0159] 药物组合物能包含生理盐,例如钠盐,如用于控制张力。通常是氯化钠 (NaCl),其可以是 1-20mg/ml。可以存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。

[0160] 药物组合物能有 200mOsm/kg-400mOsm/kg 的渗透压,如 240-360mOsm/kg 或 290-310mOsm/kg。

[0161] 药物组合物可含有一种或多种缓冲液。常用缓冲液包括:磷酸盐缓冲液;Tris 缓冲液;硼酸盐缓冲液;琥珀酸盐缓冲液;组氨酸缓冲液(具体是有氢氧化铝佐剂);或柠檬酸盐缓冲液。包含的缓冲液一般是 5-20mM。

[0162] 药物组合物通常有 5.0-9.5 的 pH,如 6.0-8.0。

[0163] 优选无菌的药物组合物。

[0164] 药物组合物优选无热原,如每剂量含有 <1EU(内毒素单位,标准量度),优选每剂量 <0.1EU。

[0165] 优选不含谷蛋白的药物组合物。

[0166] 药物组合物可包含去污剂,如聚氧乙烯去水山梨糖醇酯表面活性剂(称为‘吐温’)、辛苯聚醇(如辛苯聚醇-9(曲通 X100)或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)、溴化十六烷基三甲铵(‘CTAB’)或脱氧胆酸钠。去污剂可仅以痕量存在。

[0167] 组合物可含有一次给药的物质,或者可含有多次免疫的物质(即‘多剂量’药盒)。纳入防腐剂对多剂量配置有用。作为多剂量组合物中包含防腐剂的替代方案(或补充方案),所述组合物可包含在装有无菌接头以取出物质的容器中。

[0168] 药物组合物,并且特别是疫苗的给药剂量体积通常为约 0.5ml,尽管可将一半剂量(即约 0.25ml)给予儿童。

[0169] 可以各种方式给予药物组合物。最优选的途径是肌肉内注射(如注射到上肢或下肢),但其它可用的途径包括皮下注射、鼻内、口服、皮内、经皮、透皮等。

[0170] 药物组合物适于给予动物患者(且特别是人),并且因此包含人和兽医学应用。其可用于在患者中引起免疫应答的方法,包含给予患者所述组合物的步骤。

[0171] 这些方法引起的免疫应答通常包括抗体应答,优选保护性抗体应答。评价接种病毒疫苗后抗体应答、中和能力和保护性的方法为本领域熟知。例如,对流感病毒而言,人体研究显示抗体针对 HA 的效价与保护相关。

[0172] 如上所述,疫苗组合物可包含一种或多种佐剂,其可发挥作用以增强在接受所述组合物的患者中引发的免疫应答(体液免疫和/或细胞免疫)。有用的佐剂能包含一种或多种铝盐。另一种有用的佐剂能包含水包油乳液。其他有用的佐剂为本领域已知。

[0173] 称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂可单独使用或联用。这些名称是常规名称,但仅为使用方便,因为其均不是出现的实际化合物的准确描述(例如参见参考文献 40 的第 9 章)。本发明可采用通常用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”佐剂。给予患者的组合物中 Al^{+++} 的浓度优选小于 5mg/ml,例如 $\leq 4\text{mg/ml}$ 、 $\leq 3\text{mg/ml}$ 、 $\leq 2\text{mg/ml}$ 、 $\leq 1\text{mg/ml}$ 等。优选范围是 0.3–1mg/ml。优选 0.85mg/剂的最大值。

[0174] 已知各种有用的水包油乳剂,它们通常包括至少一种油和至少一种表面活性剂,所述油和表面活性剂是可生物降解(可代谢)和生物相容的。所述乳液中的油滴直径通常小于 $5\mu\text{m}$,通过微流化床实现这种小尺寸以提供稳定乳液。优选平均直径小于 220nm 的液滴,因为其可进行过滤灭菌。有用的佐剂能包含鲨烯和 / 或聚山梨酯 80。能使用的合适的佐剂包含称为 MF59 和 AS03 的那些。

[0175] 免疫原性药物组合物能通过单剂量方案或多剂量方案进行给药。多剂量可用于初免方案和 / 或加强免疫方案。在多剂量方案中,可通过相同或不同途径给予各剂量,例如采用胃肠外初次免疫和粘膜加强免疫、粘膜初次免疫和胃肠外加强免疫等。对于首次免疫患者,给予一个以上的剂量(一般是两个剂量)特别有效。一般以至少 1 周(例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 10 周、约 12 周、约 16 周等)的间隔给予多个剂量。

[0176] 宿主细胞 DNA

[0177] 如上所述,多官能有机过氧化物能根据本发明使用以降解核酸。这对于降解 DNA 特别有用,如在细胞培养物中病毒生长后残余的宿主细胞 DNA。

[0178] 对降解核酸而言,多官能有机过氧化物的处理理想上持续直到所述核酸包含每 10^8 个碱基对多于 10 个脱碱基核苷酸残基,例如直到其每 10^7 个碱基对包含多于 10 个脱碱基核苷酸残基,每 10^6 个碱基对包含多于 10 个脱碱基核苷酸残基或每 10^5 个碱基对包含多于 10 个脱碱基核苷酸残基。脱碱基残基的出现(并且特别在脱嘌呤作用后)能造成所述核酸骨架的切割,并且因此片段化。

[0179] 对降解核酸而言,多官能有机过氧化物的处理理想上持续直到剩余 DNA 链的所述平均长度少于 1000 个碱基对(例如少于 900、800、700、600、500、400、300、200、150、100、75 或 50 个碱基对)。优选,剩余 DNA 的长度少于 500 个碱基对,并且更优选少于 200 个碱基对。任何剩余 DNA 的大小可以通过标准技术测量,包含毛细管凝胶电泳或核酸扩增技术。所述剩余的短片段足够小,从而其不太可能或不能编码功能蛋白、转座进入人受体的染色体或被受体 DNA 复制机制识别。通常,能翻译成功能蛋白的核苷酸序列需要启动子区域、起始密码子、终止密码子和功能蛋白的内部编码序列。当 DNA 损伤通过如多官能有机过氧化物处理而发生,很多所述区域被改变或破坏,从而不再发生转录和 / 或翻译。

[0180] 药物组合物优选每剂量含有小于 10ng(优选小于 1ng,更优选小于 100pg) 剩余 DNA,尽管可能存在痕量的宿主细胞 DNA。通常,最需要从本发明组合物中排除的宿主细胞 DNA 是长于 200 个碱基对的 DNA。

[0181] 剩余宿主细胞 DNA 的测定目前是生物制品的常规管理要求,它在技术人员的普通能力范围内。用于测定 DNA 的实验一般是已验证的实验 [41, 42]。可通过数学和可量化的条件来描述经验证实验的性能特征,并鉴定其可能的误差来源。通常测试该实验的某些特征,如精确性、准确性、特异性。一旦校正(例如相对已知标准量的宿主细胞 DNA 校正)并检测了某个实验,则可按常规进行定量 DNA 测定。可采用三种 DNA 定量的主要技术:杂交

方法,如 Southern 印迹或狭线印迹 [43];免疫测定方法,如 Threshold™系统 [44];和定量 PCR[45]。本领域技术人员熟悉这些方法,尽管各方法的准确特征,例如杂交探针的选择、引物的选择和 / 或用于扩增的引物等可能取决于所研究的宿主细胞。来自分子设备公司 (Molecular Devices) 的 Threshold™系统是皮克水平总 DNA 的定量实验,已用于监测生物药品中污染 DNA 的水平 [44]。典型实验包括生物素化 ssDNA 结合蛋白、脲酶偶联的抗 ssDNA 抗体和 DNA 之间以非序列特异性方式形成反应复合物。购自生产商的总 DNA 测定试剂盒 (Total DNA Assay Kit) 中包含所有实验组分。多个商业生产商均提供用以检测残留宿主细胞 DNA 的定量 PCR 实验,例如 AppTec™实验室服务公司 (AppTec™ Laboratory Services)、BioReliance™公司、奥西科技公司 (Althea Technologies) 等。对测定人病毒疫苗的宿主细胞 DNA 污染的化学发光杂交实验和总 DNA Threshold™系统的比较参见参考文献 46。

[0182] 特别涉及犬的细胞,例如 MDCK 细胞,所述基因组的分析揭示 13 个编码序列长度 <500bp, 3 个序列 <200bp 和 1 个序列 <100bp。因此,至 <200bp 的 DNA 片段化基本除去所有编码序列,并且相当不可能的是任何片段会实际响应约为所述长度的 3 个基因之一 (即:81bp 的促胰液素;108bp 的 PYY;和 135bp 的骨钙蛋白)。

[0183] 短的降解 DNA 能比长的 DNA 从组合物中更容易地除去,并且因此本发明对降低药物组合物中的残余 DNA 量有用。在处理包含微生物的组合物以降解游离 DNA 后,可选除去所述 DNA 降解产物。因此,对包含病毒的样品而言,所述 DNA 降解产物能与病毒分离。小的可溶性降解 DNA 片段能从病毒中容易分离,例如通过阴离子交换色谱、通过根据大小的方法等。

[0184] 流感疫苗

[0185] 本发明在疫苗生产中对灭活流感疫苗有用。流感病毒疫苗可基于完整的病毒颗粒、裂解病毒颗粒或纯化的表面抗原 (包括血凝素,通常也包括神经氨酸酶)。在任意这些类型的疫苗制造中可使用本发明。

[0186] 可通过各种方法由含病毒液体如尿囊液或细胞培养物上清收集流感病毒颗粒。例如,纯化方法可包括用含有去污剂以破坏病毒颗粒的线性蔗糖梯度溶液进行区带离心。任选稀释后,可通过渗滤纯化抗原。

[0187] 用去污剂 (如乙醚、聚山梨醇酯 80、脱氧胆酸盐、三-N-丁基磷酸盐、曲通 (Triton)X100、曲通 N101、溴化十六烷基三甲铵、特吉托 (Tergitol)NP9 等) 处理纯化的病毒颗粒来获得裂解病毒颗粒,从而产生亚病毒颗粒制剂,包括 ‘吐温-醚’ 裂解方法。例如,裂解流感病毒的方法为本领域熟知,如参见参考文献 47-52 等。一般使用破坏浓度的裂解剂破坏或片段化完整病毒来裂解病毒,无论该病毒有无感染性。这种破坏导致病毒蛋白的完全或部分溶解,改变病毒的完整性。优选的裂解剂是非离子型和离子型 (例如阳离子) 表面活性剂,如烷基糖苷、烷基硫苷、酰基糖、磺基甜菜碱、甜菜碱、聚氧乙烯烷基醚、N,N-二烷基-葡萄糖酰胺、6-O-(N-庚甲酰)-甲基- α -D-葡萄糖苷 (Hecameg)、烷基苯氧基-聚乙氧基乙醇、NP9、季铵化合物、肌氨酰、CTAB (溴化十六烷基三甲铵)、三正丁基磷酸酯、塞太弗伦 (Cetavlon)、十四烷基三甲铵盐、脂质体 (lipofectin)、脂质体转染试剂 (lipofectamine) 和 DOT-MA、辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇 (如曲通表面活性剂,如曲通 X100 或曲通 N101)、聚氧乙烯去水山梨糖醇酯 (吐温表面活性剂)、聚氧乙烯醚、聚氧乙烯酯等。一种有用的裂

解方法利用脱氧胆酸钠和甲醛的连续作用,并且裂解可在病毒颗粒初始纯化期间(例如在蔗糖密度梯度溶液中)进行。因此,裂解工艺可包含:澄清含病毒颗粒的物质(以去除非病毒颗粒物质),浓缩收获的病毒颗粒(例如使用吸附方法,如 CaHPO_4 吸附),从非病毒颗粒物质分离全病毒颗粒,用裂解剂在密度梯度离心步骤中裂解病毒颗粒(例如,用含有裂解剂如脱氧胆酸钠的蔗糖梯度),然后过滤(例如超滤)以去除不需要的物质。可将裂解病毒颗粒重悬于磷酸钠缓冲的等渗氯化钠溶液中。裂解流感疫苗的示例有 BEGRIVAC™、FLUARIX™、FLUZONE™和 FLUSHIELD™产品。

[0188] 纯化的流感病毒表面抗原疫苗包含表面抗原血凝素,一般还包含神经氨酸酶。制备这些蛋白质纯化形式的方法是本领域熟知的。FLUVIRIN™、AGRIPPAL™和 INFLUVAC™产品是流感亚基疫苗。

[0189] HA 是现有灭活流感疫苗中的主要免疫原,且参照一般由 SRID 测定的 HA 水平来标准化疫苗剂量。现有的疫苗一般含有约 $15 \mu\text{g}$ HA/毒株,但也可使用更低的剂量,例如用于儿童或大流行情况下,或者是使用佐剂时。分数剂量如 $\frac{1}{2}$ (即 $7.5 \mu\text{g}$ HA/毒株)、 $\frac{1}{4}$ 和 $\frac{1}{8}$ 以及较高剂量(如 3x 或 9x 剂量 [53, 54]) 已有应用。因此,疫苗可包含 $0.1\text{--}150 \mu\text{g}$ HA/流感毒株,优选 $0.1\text{--}50 \mu\text{g}$,例如 $0.1\text{--}20 \mu\text{g}$ 、 $0.1\text{--}15 \mu\text{g}$ 、 $0.1\text{--}10 \mu\text{g}$ 、 $0.1\text{--}7.5 \mu\text{g}$ 、 $0.5\text{--}5 \mu\text{g}$ 等。具体剂量包括例如,每毒株约 45、约 30、约 15、约 10、约 7.5、约 5、约 3.8、约 3.75、约 1.9、约 1.5 等。

[0190] 本发明所用的流感毒株可以具有野生型病毒中发现的天然 HA,或具有修饰 HA。例如,已知修饰 HA 以去除决定簇(如 HA1/HA2 切割位点周围的超碱性区域(hyper-basic region)),所述决定簇使得病毒在禽类物种中具有高度致病性。采用反向遗传学促进这类修饰。

[0191] 用于疫苗的流感病毒株随季节而变。在大流行间期,疫苗一般包括两种甲型流感毒株(H1N1 和 H3N2)和一种乙型流感毒株,且一般为三价疫苗。本发明也可采用大流行病毒株(即疫苗接受者和普通人群没有与其发生过免疫接触的毒株,特别是甲型流感病毒),如 H2、H5、H7 或 H9 亚型毒株,且大流行毒株的流感疫苗可以是单价疫苗或者可以基于补充有大流行毒株的正常三价疫苗。然而,根据季节和疫苗中所含抗原的特性,本发明可保护抵御 HA 亚型 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 中的一种或多种。本发明可保护抵御甲型流感病毒 NA 亚型 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8 或 N9 中的一种或多种。

[0192] 本发明组合物可包含一种或多种(如 1、2、3、4 或更多种)流感病毒株的抗原,所述流感病毒株包括甲型流感病毒和/或乙型流感病毒。疫苗包含一种以上流感毒株时,一般单独培养不同毒株,收获病毒并制备抗原后将它们混合在一起。因此,本发明方法可包括混合一种以上流感毒株的抗原的步骤。通常为三价疫苗,其包含来自两种甲型流感病毒株和一种乙型流感病毒株的抗原。也可用四价疫苗 [55],其包含来自 2 种甲型流感病毒株和 2 种乙型流感病毒株、或者 3 种甲型流感病毒株和一种乙型流感病毒株的抗原。

[0193] 一旦流感病毒对特定毒株纯化,可以与其他毒株病毒联合,例如生成如上所述的三价疫苗。优选分别处理每个毒株和混合单价批次以生成最终多价混合物,而不是混合病毒和从多价混合物中降解 DNA。

[0194] 概述

[0195] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”，例如，“包含”X 的组合物可以仅由 X 组成或可以包括其它物质，例如 X+Y。

[0196] 词语“基本上”不排除“完全”，如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。需要时，词语“基本上”可从本发明的定义中略去。

[0197] 与数值 x 相关的术语“约”是可选的并表示例如 $x \pm 10\%$ 。

[0198] 除非另有明确说明，包括混合两种或多种组分的步骤的工艺不要求任何特定的混合顺序。因此，组分可以任何顺序混合。有三种组分时，可将两种组分相互合并，然后可将合并物再与第三种组分混合等。

[0199] 将动物（且特别是牛）材料用于培养细胞时，其应获自未患传染性海绵状脑病（TSE），特别是未患牛海绵状脑病（BSE）的来源。总之，优选在完全不含动物来源材料的情况下培养细胞。

[0200] 将化合物作为组合物的一部分给予机体时，该化合物可另外由合适的前药替代。

[0201] 当使用细胞底物（如用于重组或反向遗传学）时，优选批准用于人类疫苗生产的细胞底物，例如 Ph Eur（《欧洲药典》）总纲 5.2.3 所述的细胞底物。

[0202] 附图简要说明

[0203] 图 1 显示本发明的多种灭活剂结构。

[0204] 图 2-4 显示 DMEM 中随时间的试剂 069-1 (%) 含量（图 2 和 3 中是小时；图 4 中是天数）。箭头指示加入灭活剂（抗坏血酸或葡萄糖）。

具体实施方式

[0205] 已知灭活剂

[0206] 对 4 种病毒测试已知的灭活剂（ β 丙内酯、乙烯亚胺、N-乙酰基乙烯亚胺、福尔马林）：(i) 3 型呼肠孤病毒，无包膜，有 dsRNA 基因组；(ii) HSV-1 疱疹病毒，包膜，有 dsDNA 基因组；(iii) 5 型腺病毒，无包膜，有 dsRNA 基因组；和 (iv) C 型禽逆转录病毒，包膜，有 ssRNA 基因组。所述呼肠孤病毒是有双衣壳层的无包膜小病毒，并且所述病毒对灭活有高度抗性（只被结核杆菌（tubercle bacilli）和细菌孢子超越 [56]）。

[0207] 表 1 中的结果表示为处理后病毒效价的 $\log_{10}$ 下降因数：

[0208]

病毒	灭活	下降
(i)	BPL, 0.05%, 16 小时, 2-8°C (然后 37°C 3 小时以除去 BPL)	2.3 – 3.8
	乙烯亚胺, 0.05%, 16 小时, 2-8°C (然后 37°C 3 小时)	0.65
	N-乙酰基乙烯亚胺, 0.05%, 16 小时, 2-8°C (然后 37°C 3 小时)	1.15
	37%甲醛 0.05%, 16 小时, 2-8°C	~0

[0209]

	37%甲醛 0.05%, 3 天, 2-8°C	0.9
	37%甲醛 0.05%, 6 天, 2-8°C	1.55
	37%甲醛 0.05%, 17 小时, 19-23°C	1.7
	37%甲醛 0.05%, 24 小时, 19-23°C	2.1
(ii)	BPL, 0.05%, 16 小时, 2-8°C (然后 37°C 3 小时以除去 BPL)	4.5
	37%甲醛 0.05%, 3 天, 2-8°C	2.8
	37%甲醛 0.05%, 6 天, 2-8°C	2.95
	37%甲醛 0.05%, 17 小时, 19-23°C	2.95
	37%甲醛 0.05%, 24 小时, 19-23°C	3.25
(iii)	BPL, 0.05%, 16 小时, 2-8°C (然后 37°C 3 小时以除去 BPL)	2.7
	37%甲醛 0.05%, 3 天, 2-8°C	$\geq 3.4, \leq 6.65$
	37%甲醛 0.05%, 6 天, 2-8°C	$\geq 3.4, \leq 6.65$
	37%甲醛 0.05%, 17 小时, 19-23°C	≥ 6.65
	37%甲醛 0.05%, 24 小时, 19-23°C	≥ 6.65
(iv)	BPL, 0.05%, 16 小时, 2-8°C (然后 37°C 3 小时以除去 BPL)	$\geq 5.15, \leq 7.15$
	37%甲醛 0.05%, 16-24 小时, 15°C	0.6 – 1.0
	37%甲醛 0.05%, 16-24 小时, 20°C	1.3 – 1.8
	37%甲醛 0.05%, 16-24 小时, 24°C	1.5 – 2.2

[0210] 这些数据显示在人疫苗中使用的两个主要的灭活剂(BPL 和甲醛)不能满足所有需要。甚至稳定病毒的低水平感染性表示材料对下游应用不安全(如作为诊断剂,或作为疫苗或其他医药产品)。

[0211] 新的灭活剂

[0212] 由于其稳定性,建立呼肠孤病毒模型以评价新灭活剂的活性。哺乳动物正呼肠病毒 3 型(Dearing 毒株, ATCC VR-824) 在 L929 小鼠结缔组织细胞(ATCC C1-1) 中生长。病毒储液由受感染培养物的无细胞培养物上清制成,并且等分,然后低于 -60°C 存储。对灭活研究而言,解冻所述病毒,然后加入 0.05% 灭活剂(1:2000 体积),并且所述混合物在冷的条件(2-8°C)、室温(测量为 19-23°C)或在 37°C 孵育固定时间。为与 BPL 比较,(i) 所述灭活反应暂时升高到 37°C,并且(ii) 在灭活结束时加入硫代硫酸钠(每 ml 灭活溶液 20 μ l 11.4M 储液)。然后通过标准效价测试样品的剩余感染病毒。所述病毒制品的 10 倍系列稀释接种在微量滴定板的 L929 培养基中。病毒生长 5-6 天后产生细胞病变效应,用显微镜观察。效价通过所述 Spearman-Kärber 方法 [57] 计算并且表示为 $\log_{10}TCID_{50}/ml$ 。剩余效价低于检测极限($1.5 \log_{10}TCID_{50}/ml$)时,表示为对照样品效价和 ≤ 1.5 之间的差异。所述下降显示为“ $\geq$ ”符号。

[0213] 流感病毒用于第二个测试。其不如呼肠孤病毒稳定。病毒效价基本按照呼肠孤病毒所述完成,但是用 MDCK 细胞,而不是 L929。另外,评价其包膜血凝素糖蛋白的稳定性(重要的疫苗免疫原)。其能用血凝素测试进行官能性分析。对定量 HA 试验而言,在 PBS 中系列稀释($\log_2$ 稀释)所述病毒制品,并且用 PBS 中的 0.5% 鸡红细胞孵育。环境温度孵育后,评价所述 HA 反应。活性表示为仍然引起清楚血凝的最高病毒稀释的倒数,并且结果作为灭

活前和后的效价显示。

[0214] 用图 1 和 / 或表 18 的编号测试多种灭活剂。所有都在 0.05% 的浓度, 并且当使用混合物时, 这是所述总灭活剂浓度。

[0215] 呼肠孤病毒的结果如下(表 2):

[0216]

灭活剂	条件	下降
BPL	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	2.5
054	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥3.8 *
069-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥6.9
069-1	24 小时, 19-23°C	≥7.0
079	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	3.5
079	24 小时, 19-23°C	4.5
070-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	5.0
070-1	24 小时, 19-23°C	5.8
070-1	48 小时, 19-23°C	5.5
070-1	16 小时, 37°C	7.65
070-1	24 小时, 37°C	≥7.9
077	24 小时, 19-23°C	≥7.7
071-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	4.0
078	24 小时, 19-23°C	3.3 – 5.4
078	16 小时, 37°C	≥7.75
058-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	3.5
056-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	3.3
080	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥6.9

[0217] 对比(单个过氧化物化合物)

[0218] H₂O₂ 16 小时, 2-8°C ; 然后 37°C 3 小时 0.45

[0219] 072 16 小时, 2-8°C ; 然后 37°C 3 小时 0.9

[0220] * 剩余细胞毒性干扰病毒效价, 并且不能评价所述全部灭活能力

[0221] 所述 BPL 图证明如前面结果所示, 呼肠孤病毒灭活困难。有多个过氧化物的所有灭活剂优于 BPL 灭活(并且优于前面实验的甲醛)。有单个过氧化物(072)的化合物表现不佳。链长度更短的化合物(低于 C4)产生最好的结果。更高温度产生更好的结果, 尽管 37°C 下的长培养对抗原不理想, 所述抗原可能没有良好热稳定性。最佳可以是更高温度、更短时间。

[0222] 流感病毒的结果如下(表 3):

[0223]

灭活剂	条件	下降	HA 前/后
BPL	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥ 7.15	1024 / 1024
069-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥ 7.1	1024 / 1024
079	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥ 7.1	1024 / 1024
079	24 小时, 19-23°C	≥ 6.9	1024 / 1024
070-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥ 7.0	1024 / 1024
077	24 小时, 19-23°C	≥ 7.1	1024 / 1024
071-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	5.0	1024 / 1024
078	24 小时, 19-23°C	5.75	1024 / 1024
058-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥ 7.15	1024 / 1024
056-1	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	≥ 7.15	1024 / 1024
080	16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	7.0	1024 / 1024

[0224] 因此,通常实现低于检测限定的流感病毒灭活。再次,链长度更短的化合物产生最好的结果,具有更长链长度如 071-1、078 和 080 的分子有更低的灭活能力。另外,在所有示例中并且不管灭活温度如何,所述血凝效价没有受灭活影响,指示所述表面糖蛋白的抗原性保持完整。

[0225] 所述用温度、无包膜病毒细菌的结果表示也能预期细菌的成功灭活。1968 年,Spaulding 定义对化学灭活和消毒的抗性水平 [56]。根据这个分级,细菌(除了一些分枝杆菌和孢子)对化学灭活的抗性小于裸露(非脂质)病毒。尽管这个分级在几十年前建立,其仍然有效并且可用 [58]。因此,针对稳定、无包膜病毒的功效表示细菌也能被这些化合物灭活。

[0226] 针对其他病毒测试灭活剂 069-1 的所述灭活能力。这些研究中,改变浓度、时间和温度以进一步评价灭活的合适条件。观察到低于所述效价方法检测极限的完全灭活($\leq 10^{1.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)时,部分完成有更低检测极限的残余病毒测试。如果对病毒为阴性,通过指示每 mL 灭活样品的各自检测极限来给出所述“残余病毒测试”的结果。这些检测极限依赖于接种到测试培养物上的样品体积。对于 10mL 样品体积,所述检测极限作为 $10^{-1.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 给出,例如 1ml 样品体积的各自检测极限是 $10^{-0.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$,并且对于 0.1ml 样品体积为 $10^{0.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0227] 当测试培养物中的残余细胞毒性(通过测试培养中的细胞脱离或死亡的早期信号指示)削弱可靠的效价读数时,不评价那些效价稀释。在阴性效价中,所述应用检测极限因而更高,例如 $\leq 10^{2.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 。在最低效价稀释下部分观察到细胞毒性反应,其中有灭活剂和抗坏血酸残余的所述接种物留在测试培养物上。在有更高样品体积的残余病毒测试中,因为使用更大培养物,没有观察到细胞毒性效果,在 37°C 吸附病毒 1 小时后移除所述接种物,并且用中性缓冲液或培养基冲洗所述培养物以除去残余的化学物。

[0228] 然后计算 Log_{10} 下降值作为所述起始效价(用暴露于相同条件但没有加入灭活剂的缓冲液的“保留样品”测试)和灭活后所述残余效价的差异。有 “ $\geq$ ” 符号的灭活率指示低于所应用方法检测极限的完全灭活。没有该符号的灭活率指示出现残余病毒。

[0229] 下表显示使用的病毒和对病毒效价及使用更大样品体积的可选残余病毒测试应

用的细胞培养物。也提供关于细胞和病毒起源的信息,并且提及细胞培养接种和病毒效价测定之间的孵育期(天)。所述细胞培养物在补充有 3-5% 牛胚胎血清的 DMEM (Dulbecco 改良的 Eagle 培养基) 中生长。测试培养物在包含 5%CO₂和 90% 湿度的空气中 37℃ 孵育。

[0230]

细胞类型	病毒	孵育 (天)
------	----	-----------

[0231]

MDCK 33016 (DSM ACC2219)	流感病毒不同流感毒株的部分纯化病毒制品： A/布里斯贝恩/59/2007 [H1N1] A/加利福尼亚//7/2009 [H1N1], 重组 X-179A A/乌拉圭/716/2007 [H3N2], 重组 NYMC X-175 C B/布里斯贝恩/3/2007	4 - 5
L929 (ATCC CCL-1)	呼肠孤病毒 3: Dearing 毒株, ATCC VR-824	5 - 7
	MVM (小鼠微小病毒, 细小病毒): Crawford 毒株, ATCC VR-663	9 - 10
MRC-5 (ATCC CCL-171)	BK-病毒 (多瘤病毒); ATCC VR-837	10 - 12
RD-A (WHO 肠道病毒的欧洲 研究中心)	ECHO-病毒 6 (小核糖核酸病毒):D'Amori 毒株, 获自德国柏林的罗伯特科赫学院 (Robert-Koch-Institute) 的小儿麻痹症和肠道病毒研究中心	3 - 5
	柯萨奇 A16 (小核糖核酸病毒):G-10 毒株, 获自德国柏林的罗伯特科赫学院 (Robert-Koch-Institute) 的小儿麻痹症和肠道病毒研究中心	3 - 5
Vero WHO (由 ECACC 分送的 Vero 的 WHO 株)	腺病毒 6:分离物 524/90: 临床分离物, 获自德国柏林的罗伯特科赫学院 (Robert-Koch-Institute) 的临床病毒学 (Clinical Virology) 血清学上和 PCR 证明一致性。	8 - 10
	狂犬病病毒 Flury LEP:诺华疫苗 (Novartis Vaccine) 毒株。(用荧光标记的特异抗体通过免疫染色检测病毒)	4 - 5
	HSV-1 (单纯疱疹病毒-1):ET 毒株, 自身分离物。通过独立 PCR 证明一致性。	7 - 8
	3 型副流感病毒: ATCC VR-93	5 - 6

[0232] 以 0.025、0.05 浓度或 0.1% (vol/vol) 终浓度加入灭活剂 069-1, 并且孵育指定的时间段。为在确定的时间点终止所述灭活, 加入 L+ 抗坏血酸以产生终浓度 0.2%。所述终止剂制备为在 100mL 蒸馏无菌水中包含 20g L+ 抗坏血酸的 20% 储液。然后通过 0.2 μ m 滤膜过滤除菌所述溶液。

[0233] 表 4-13 显示通过改变试剂 069-1 的浓度和不同条件下的不同模型病毒的灭活。大部分这些病毒为无包膜, 并且代表不容易被化学灭活剂灭活和在用于保持所述病毒抗原性的条件下不易灭活的稳定病毒。选择双链病毒 (疱疹病毒、呼肠孤病毒、多瘤病毒、腺病毒

和多瘤病毒), 因为其更耐受化学灭活和其他加工条件。大部分所述病毒用作模型病毒以验证生物制药工艺方法的灭活工艺 [59]。

[0234] 不同病毒通过 BPL 灭活的数据示于表 14。表 4-13 的数据显示 069-1 产生优越灭活的大部分示例。

[0235] 灭活诱导的细胞 DNA 损伤的分析

[0236] 通过将细胞培养收集物或感染流感的无细胞 MDCK 培养收集物(包含残余的细胞 DNA) 暴露于所述灭活剂和然后使用市售“DNA 损伤定量试剂盒”(百信公司(Biovision)) 分析从脱碱基位点 (APS) 提取的 DNA, 检测试剂 069-1 对细胞 DNA 的效果。所述试剂盒包含与核酸脱碱基位点的醛基特异反应的醛活性探针 (ARP)。除去未结合的 ARP 后, 所述 DNA 结合微量滴定板孔, 并且所标记位点通过过氧化物酶反应和底物显影颜色反应来染色。所述测试试剂盒也包含用于生成校准曲线的标准物。

[0237] DNA 提取使用 QIAasympyphony® 病毒/细菌小试剂盒按照 Complex800_V4 方案(凯杰公司(Qiagen)) 在 QIAasympyphony SP 提取自动操作中完成。所洗脱样品的 DNA 浓度用 NanoPhotometer™ 基于 260nm 和 280nm 吸附值测定。对所述 DNA 损伤定量试剂盒而言, 所有测试样品然后在 Tris/EDTA (TE) 缓冲液中稀释/调节到终浓度 0.1 µg/mL DNA。TE 缓冲液用作阴性对照。

[0238] 测量 DNA 损伤和 APS 根据所述测试试剂盒的说明书完成。由于远远超过所述标准曲线定量测试范围的强反应, 尝试通过相同速率稀释某一测试运行的所有经标记和洗涤样品来补偿。然而, 超过可靠定量测试范围的极端颜色反应是不可避免的。因此, 每 10⁵ 个碱基对 40APS 的所述上标准曲线范围之上的 AP 点值可靠性大于该范围之下的那些。并且, 也观察到不归因于操作者误差或固有测试不一致的高测试变异性。

[0239] 然而, 当不同病毒株用于感染时, 来自流感病毒感染细胞的 DNA 显示特别高的变异性。这表明凋亡降解 DNA 可能反应不同于正常细胞 DNA。因此, 以半定量、比较的方式并且通过包含 BPL 灭活样品作为参照和比较来应用测试。因此, 定量检测结果和绝对值(每 10⁵ 个碱基对的 APS) 不应该在不同测试之间作比较, 但是应该用于比较一个和相同测试运行中测试的不同条件。

[0240] 下面显示的数据组提供由单独表格中某一比较测试运行获得的结果, 但不是来自相同表格中不同测试运行的混合结果。除了需要直接比较, 不考虑在吸附到所述测试试剂盒微量滴定板前的样品稀释。因此, 在不同测试运行中测试的相似条件可以显示不同的 APS 值。给出高于 1 的 APS 值作为没有小数点的圆形图。

[0241] 来自 BPL 灭活的可比较结果通过使用普遍应用的 0.05% 终浓度 BPL 灭活样品获得。灭活总是通过加入 BPL 到冷的病毒制品和 2-8℃ 孵育 16 小时来应用。然后通过提高温度到 37℃ 和进一步孵育 2 小时来终止灭活。在 37℃, 所述灭活起初以增加的速度持续, 而同时 BPL 快速降解。因此, 预期所述提高的温度也影响 DNA 损伤和/或引起部分损伤 DNA 的次级反应。

[0242] 用 069-1 灭活使用 16 小时的标准灭活时间在下表所示的浓度和温度下进行。灭活通过加入抗坏血酸来终止。仅就特定研究和直接比较而言, 用 069-1 灭活也接受 BPL 所用孵育条件, 即 2-8℃ 16 小时加上 37℃ 2 小时。

[0243] 表 15 显示相对 APS 值(1 是未处理样品)。使用感染有 3 种不同流感毒株(A/克赖

斯特彻奇 /16/10NIB-74、A/ 布里斯贝恩 /10/2010 和 A/ 加利福尼亚 /7/09X-179A) 的细胞上清 DNA。除了 A/ 加利福尼亚,使用 069-1 的 DNA 损伤高于 BPL,并且是浓度依赖性的。

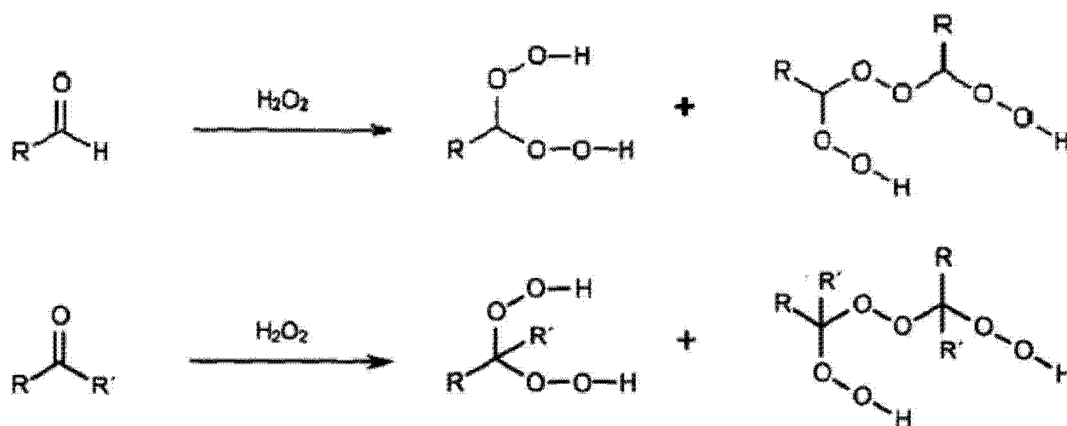
[0244] 表 16 显示当流感感染细胞 DNA(毒株 B/ 威斯康星 /1/2010) 使用不同 069-1 浓度作为单个灭活或两个连续灭活轮处理时的相对 APS 值。甚至当使用更低 069-1 浓度时,用 069-1 观察到的 DNA 损伤高于 BPL,并且所述效果是浓度依赖性的。所述 2 倍灭活清楚地造成比单个灭活更强的 DNA 损伤。

[0245] 表 17 显示当流感感染的细胞 DNA(毒株 B/ 威斯康星 /1/2010) 先用 BPL 处理(2-8℃ 16 小时、然后 37℃ 2 小时)并且用不同浓度 069-1 连续灭活时的相对 APS 值。在这个系列中,069-1 也在与标准 BPL 灭活相同条件下使用。所述灭活也通过抗坏血酸终止。应谨慎(双灭活样品全都高于所述测试的测量范围并且因此必需在吸附到所述测试板之前稀释 10 倍),BPL 和 069-1 的双处理清楚地增加 DNA 损伤。在起始冷的阶段后到 37℃ 2 小时增加 069-1 的灭活温度也大幅提高所述 DNA 损伤。显然由 BPL 造成的 DNA 损伤不仅能通过 2 倍 BPL 处理增强,甚至也通过使用 BPL 以外的过氧化物灭活剂例如 069-1 来增强。

[0246] 合成和稳定性

[0247] 成对二氢过氧化物的通用合成能如下进行,理想地是在合适的催化剂出现时:

[0248]



[0249] 所述合成受稳定性的限制,并且视结构而定。尽管有非常高的氧含量(如化合物 069-1 有 68% 氧),所述化合物中的一些非常稳定,但是如果处理不正确,易于自爆或降解。所述效果通过缩短所述烷基侧链来增加。由于安全考虑,所述化合物最好以冷冻水溶液或冷冻固体提供。

[0250] 发现 057 的灭活能力在 -20℃ 存储 6 个月后丧失,所以最好使用新鲜的。对其他化合物和 / 或混合物可能同样如此。

[0251] 所述化合物的稳定性通过 NMR 评价。结果如下:

[0252]

灭活剂	条件	降解
057	PBS: 16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	无
057	PBS: 16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 10 小时	无
057	PBS: 6 小时, 25°C; 然后 37°C 3 小时	无
057	PBS: 加入硫代硫酸钠	立即
070	PBS: 16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	40%

[0253]

070	MEM: 24 小时, 5°C	<5%
070	MEM: 24 小时, 25°C	15%
070	MEM: 24 小时, 37°C	43%
071	PBS: 16 小时, 2-8°C; 然后 37°C 3 小时	无
071	MEM: 24 小时, 5°C	11%
071	MEM: 24 小时, 25°C	15%
071	MEM: 24 小时, 37°C	30%

[0254] PBS = 磷酸盐缓冲盐水

[0255] MEM=Eagle 极限必需培养基

[0256] NMR 也用于研究水性条件特别是培养基中, 069-1 的稳定性。这些研究使用高分辨 500MHz NMR 与含 0.1%069-1 的 DMEM。

[0257] 图 2 显示 25°C 的稳定性, 有非常慢的降解。240 小时 (10 天) 后, 只有 25% 降解。240 小时后加入抗坏血酸造成立即降解, 当抗坏血酸完全用完并且对降解工艺不再可用时, 降解停止 (线趋平)。如果多于 2 摩尔抗坏血酸加入到 1 摩尔 069-1 中, 能观察到 069-1 的完全降解。

[0258] 图 3 显示 37°C 下的稳定性。降解在 25°C 更快, 并且 55 小时后, 50% 降解。145 小时后加入抗坏血酸造成能清楚观察到的立即降解。

[0259] 图 4 显示不同温度和加入葡萄糖后的稳定性。5°C 下 DMEM 中, 多于 30 天没有降解。加入葡萄糖 (8 倍摩尔过量) 后, 并且在 5°C 进一步存储 5 天, 仍然没有观察到降解。在温度增加到 25°C 时, 所述降解工艺开始缓慢, 但是仍然需要多于 40 天以下降到 ~10% 浓度。

[0260] 因为很多病毒生长培养基包含额外的葡萄糖 (或相似糖) 并且重要地是没有看到其是否会降解所述灭活剂, 测试葡萄糖的加入。至少对更低的温度, 这些糖的出现似乎不是问题。

[0261] 由于过氧化基团高度不稳定, 众所周知过氧化物通常 (并且特别是只有 1-5 个碳原子的短链过氧化物) 易于快速降解或甚至爆炸, 所以 069-1 在水性条件下的高稳定性令人惊讶。在不同温度下的溶液中, 甚至在复合环境如 DMEM 中, 试剂 069-1 显示出出乎意料地高稳定性。因为分子包含 68% 氧, 其对只包含两个碳原子的成对二氢过氧化物有最显著和出乎意料的稳定水平。所预期的溶液中降解时间量程为大约数分钟到数小时级别, 但是图 2-4 显示 25°C 多于 250 小时的高稳定性。

[0262] 应理解, 仅以举例的方式描述了本发明, 在本发明的范围和构思内可对之进行修改。

[0263] LRV 表

[0264] 表 4 :069-1 灭活腺病毒

[0265]

t_{IA}	T_{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.025%								
16	RT	6.60	± 0.21	≤ 2.50	± 0.25	n. d.	≥ 4.10	± 0.32
0.05%								
6	RT	6.45	± 0.31	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 3.95	± 0.31
16	RT	6.30	± 0.27	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.80	± 0.27
16	RT	6.35	± 0.35	≤ 1.50	± 0.00	≤ 0.5	≥ 5.85	± 0.35
16	37	6.25	± 0.26	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.75	± 0.26
0.10%								
16	RT	6.25	± 0.31	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.75	± 0.31
16	37	6.30	± 0.25	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.80	± 0.25

[0266] 表 5 :069-1 灭活 BK 多瘤病毒

[0267]

t_{IA}	T_{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.025%								
16	RT	6.05	± 0.26	≤ 2.40	± 0.24	n. d.	≥ 3.65	± 0.36
16	37	5.85	± 0.24	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.35	± 0.24
0.05%								
16	RT	5.95	± 0.24	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.45	± 0.24
16	RT	6.20	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	≤ -1.5	≥ 7.70	± 0.28
16	37	5.70	± 0.21	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.20	± 0.21
16	37	6.05	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.55	± 0.28
0.10%								
16	RT	6.05	± 0.26	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 3.55	± 0.26
16	37	5.75	± 0.22	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 3.25	± 0.22

[0268] 表 6 :069-1 灭活柯萨奇病毒 A16

[0269]

t_{IA}	T_{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.05%								
16	RT	7.45	± 0.33	7.55	± 0.28	n. d.	-0.10	± 0.43

[0270]

24	37	7.40	± 0.28	≤ 2.40	± 0.27	n. d.	≥ 5.00	± 0.39
48	37	7.10	± 0.29	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.60	± 0.29
0.10%								
16	RT	7.40	± 0.32	2.15	± 0.30	n. d.	5.25	± 0.44
16	37	7.20	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.70	± 0.28
16	37	7.40	± 0.33	3.75	± 0.24	n. d.	3.65	± 0.41

[0271] 表 7 :069-1 灭活艾柯病毒

[0272]

t _{IA}	T _{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.05%								
6	37	8.95	± 0.26	8.00	± 0.33	n.d.	0.95	± 0.42
16	6	8.90	± 0.25	9.15	± 0.25	n.d.	-0.25	± 0.35
16	RT	9.10	± 0.24	8.55	± 0.31	n.d.	0.55	± 0.39
24	RT	8.45	± 0.30	8.30	± 0.27	n.d.	0.15	± 0.40
24	37	8.55	± 0.34	6.55	± 0.28	n.d.	2.00	± 0.44
48	RT	8.60	± 0.28	7.20	± 0.35	n.d.	1.40	± 0.45
48	37	8.30	± 0.27	3.45	± 0.30	n.d.	4.85	± 0.40
0.10%								
6	RT	8.80	± 0.27	8.05	± 0.30	n.d.	0.75	± 0.40
6	37	8.90	± 0.25	5.50	± 0.29	n.d.	3.40	± 0.38
6	37	8.55	± 0.32	5.70	± 0.21	n.d.	2.85	± 0.38
16	RT	8.70	± 0.18	7.05	± 0.23	n.d.	1.65	± 0.29
16	RT	8.30	± 0.25	7.10	± 0.29	n.d.	1.20	± 0.39
16	37	8.50	± 0.18	3.20	± 0.30	n.d.	5.30	± 0.35
16	37	8.40	± 0.28	3.10	± 0.25	n.d.	5.30	± 0.38

[0273] 表 8 :069-1 灭活单纯疱疹病毒 1

[0274]

t _{IA}	T _{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.05%								
6	37	8.55	± 0.23	5.75	± 0.33	n. d.	2.80	± 0.40
16	RT	8.55	± 0.29	3.70	± 0.28	n. d.	4.85	± 0.41
24	RT	8.60	± 0.18	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 7.10	± 0.18
24	RT	8.35	± 0.26	≤ 1.50	± 0.00	≤ -1.5	≥ 9.85	± 0.26
48	RT	8.45	± 0.26	3.05*	± 0.30	n. d.	5.40*	± 0.39
48	RT	8.15	± 0.31	3.05*	± 0.27	n. d.	5.10*	± 0.42
0.10%								
6	RT	8.60	± 0.25	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 7.10	± 0.25
6	RT	8.50	± 0.00	≤ 1.50	± 0.00	≤ -1.5	≥ 10.00	± 0.00
6	37	8.35	± 0.26	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 6.85	± 0.26
16	RT	8.50	± 0.25	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 7.00	± 0.25
16	37	7.80	± 0.23	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 6.30	± 0.23

[0275] * 来自 2 个单独测试运行的结果。

[0276] 表 9 :069-1 灭活 3 型副流感病毒

[0277]

t _{IA} 小时	T _{IA} °C	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
		保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.025%								
16	RT	7.55	± 0.28	2.90	± 0.24	n. d.	4.65	± 0.37
16	37	6.90	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.40	± 0.28
0.05%								
16	RT	7.55	± 0.31	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 6.05	± 0.31
16	RT	7.35	± 0.21	≤ 1.50	± 0.00	≤ -0.5	≥ 7.85	± 0.21
16	37	7.55	± 0.35	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 6.05	± 0.35
16	37	7.00	± 0.29	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.50	± 0.29
0.10%								
16	RT	7.55	± 0.31	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.05	± 0.31
16	37	6.60	± 0.35	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.10	± 0.35

[0278] 表 10 :069-1 灭活小鼠细小病毒的微小病毒

[0279]

t _{IA} 小时	T _{IA} ℃	TCID ₅₀ /ml 保持样品		灭活后 TCID ₅₀ /ml 效价			残余病毒测试	LRV	
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI	
0.05%									
6	37	7.70	± 0.21	4.40	± 0.25	n.d.	3.30	± 0.32	
16	6	7.20	± 0.32	4.70	± 0.18	n.d.	2.50	± 0.37	
16	RT	7.45	± 0.31	4.50	± 0.29	n.d.	2.95	± 0.43	
24	RT	7.00	± 0.28	5.15	± 0.31	n.d.	1.85	± 0.42	
24	37	7.00	± 0.29	4.35	± 0.26	n.d.	2.65	± 0.39	
48	RT	6.95	± 0.26	5.10	± 0.34	n.d.	1.85	± 0.43	
	37	7.45	± 0.28	3.65	± 0.31	n.d.	3.80	± 0.41	
0.10%									
6	RT	7.55	± 0.31	4.90	± 0.25	n.d.	2.65	± 0.40	
6	37	7.50	± 0.18	3.95	± 0.26	n.d.	3.55	± 0.32	
16	RT	7.60	± 0.24	3.50	± 0.18	n.d.	4.10	± 0.30	
16	RT	7.05	± 0.28	4.90	± 0.25	n.d.	2.15	± 0.38	
16	37	6.75	± 0.25	3.90	± 0.25	n.d.	2.85	± 0.35	
16	37	7.65	± 0.24	4.95	± 0.26	n.d.	2.70	± 0.36	
24	37	7.60	± 0.30	3.20	± 0.28	n.d.	4.40	± 0.42	
48	37	7.35	± 0.36	≤ 2.50	± 0.00	n.d.	≥ 4.85	± 0.36	

[0280] 表 11 :069-1 灭活呼肠孤病毒 3

[0281]

t _{IA}	T _{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.025%								
16	RT	9.45	± 0.13	3.50	± 0.00	n. d.	5.95	± 0.13
16	37	9.10	± 0.25	2.65	± 0.16	n. d.	6.45	± 0.30
0.05%								

[0282]

6	RT	9.30	± 0.23	3.50	± 0.00	n. d.	5.80	± 0.23
6	37	9.40	± 0.16	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 7.90	± 0.16
16	RT	9.30	± 0.23	≤ 1.50	± 0.00	≤ 0.5	≥ 8.80	± 0.23

[0283] 表 12 :069-1 灭活狂犬病病毒

[0284]

t _{IA}	T _{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV		
小时	℃	保持样品		效价		残余病毒测试			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI	
0.0125%									
18	2-8/37 ^{#)}	8.3	± 0.31	4.8	± 0.31	n.d.	3.5	± 0.31	
		8.4	± 0.41	3.5	± 0.00	n.d.	4.9	± 0.41	
0.025%									
18	2-8/37 ^{#)}	8.3	± 0.31	≤ 2.8	± 0.00	≤ 0.5	≥ 5.5	± 0.31	
		8.4	± 0.41	n.d.		≤ 0.5	≥ 7.9	± 0.41	
0.05									
18	2-8/37 ^{#)}	8.3	± 0.31	n.d.	± 0.31	≤ 0.5	≥ 7.8	± 0.31	
		8.4	± 0.41	n.d.	± 0.31	≤ 0.5	≥ 7.9	± 0.41	

[0285] #): 所有灭活在 2-8°C 下 16 小时完成, 然后所述灭活温度提高到 37°C 2 小时。其后, 所述灭活通过加入抗坏血酸来终止。

[0286] 表 13 :069-1 灭活流感病毒

[0287]

t _{IA}	T _{IA}	TCID ₅₀ /ml		灭活后 TCID ₅₀ /ml			LRV	
小时	°C	保持样品		效价		残余病毒测试		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.05%								
8	RT	3.55	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.05	n.d.
8	RT	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
8	RT	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
16	2 - 8	6.6	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 8.1	n.d.
16	2 - 8	4.7	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.2	n.d.
16	2 - 8	6.55	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ 1.5	≥ 5.05	n.d.
16	2 - 8	6.5	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 8.0	n.d.
16	2 - 8	6.4	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.9	n.d.
16	2 - 8	3.55	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.05	n.d.
16	2 - 8	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
16	2 - 8	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
0.1%								
3	RT	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
3	RT	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
3	RT	3.7	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.2	n.d.
6	RT	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
6	RT	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.

[0288]

6	RT	3.7	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.3	n.d.
---	----	-----	------	-------	------	--------	-------	------

[0289] 没有观察到菌株的区别,因此这个表没有指出所述单个菌株(见上面3)。

[0290] 表 14 :BPL 灭活的可比较数据

[0291]

DNA/RNA 类型	ENV	病毒类型	灭活试剂/条件	LRV
双链DNA	-	BK多瘤病毒	BPL 0.05%; 16小时, +2-8°C (然后对BPL水解, 37°C 2小时)	2.1
单链RNA	-	肠道病毒 (柯萨奇病毒, 埃可病毒)		4-5
单链RNA	+	副粘病毒, 副流感病毒3		≥ 9.5 (完全灭活)

[0292] 所述表中使用的缩写:

[0293] t_{IA} : 灭活时间 / 以小时计的持续时间[0294] T_{IA} : 灭活温度[0295] $TCID_{50}/ml$: 50% 组织培养感染单位 / mL

[0296] LRV: Log10 下降值

[0297] 残余病毒测试使用更大样品体积的残余病毒测试(也见上面文本)

[0298] 95%CI: 95% 置信区间

[0299] RT: 环境温度(室温), 在 17-26°C 范围

[0300] n. d. : 没有完成或没有测定

[0301] % 值指示所述灭活剂的终浓度。

[0302] DNA 损伤表

[0303] 表 15 : 灭活诱导的脱碱基位点

[0304]

灭活剂	浓度(%)	温度(°C)	APS 的相对数目
甲型流感/克赖斯特彻奇//16/10 感染的细胞 DNA			
无		2-8	1
BPL	0.05	2-8/37	0.6
069-1	0.025	2-8	15

[0305]

069-1	0.025	37	26
069-1	0.05	2-8	6
069-1	0.05	37	46
069-1	0.1	2-8	50
069-1	0.1	37	66
甲型流感/布里斯贝恩//10/2010 感染的细胞 DNA			
无		2-8	1
BPL	0.05	2-8/37	29
069-1	0.025	2-8	42
069-1	0.025	37	67
069-1	0.05	2-8	48
069-1	0.05	37	119
069-1	0.1	2-8	109
069-1	0.1	37	146
甲型流感/加利福尼亚//7/09 感染的细胞 DNA			
无		2-8	1
BPL	0.05	4/37	63
069-1	0.025	2-8	25
069-1	0.025	37	50
069-1	0.05	2-8	16
069-1	0.05	37	23
069-1	0.1	2-8	63
069-1	0.1	37	89

[0306] 表 16 :用不同浓度 069-1 通过单 / 双灭活诱导的脱碱基位点

[0307]

灭活剂	浓度(%)	温度(°C)	APS 的相对数目
乙型流感/威斯康星//1/2010 感染的细胞 DNA			
单灭活处理	无	2-8	1
	BPL	2-8/37	30
	069-1	2-8	39
	069-1	37	43
	069-1	2-8	39
	069-1	37	58

[0308]

	069-1	0.1	2-8	56
	069-1	0.1	37	53
2 倍灭 活处理	069-1	0.025	2-8	69
	069-1	0.025	37	88
	069-1	0.05	2-8	57
	069-1	0.05	37	94
	069-1	0.1	2-8	85
	069-1	0.1	37	73

[0309] 表 17 :用 BPL 和 069-1 的双灭活诱导的脱碱基位点

[0310]

灭活剂	浓度(%)	温度(°C)	APS 的相对数目	
乙型流感/威斯康星//1/2010 感染的细胞 DNA				
单灭活处理	无	2-8	1	
	BPL	0.05	2-8/37	2
	069-1	0.05	2-8/37	10
	069-1	0.025	2-8	5
	069-1	0.025	37	3
	069-1	0.05	2-8	8
	069-1	0.05	37	8
	069-1	0.1	2-8	15
	069-1	0.1	37	15
2 倍灭活处理： BPL 加 BPL 或 069-1	BPL	0.05	2-8/37	20
	069-1	0.05	2-8/37	93
	069-1	0.025	2-8	79
	069-1	0.025	37	141
	069-1	0.05	2-8	150
	069-1	0.5	37	172
	069-1	0.1	2-8	205
	069-1	0.1	37	110

[0311] 由于没有稀释的所有值远高于所述测试范围,所以稀释所述 2 倍灭活样品。为了对比,所述稀释因子用于计算这个表中给出的所述相对 APS 数字。

[0312] 本发明有用的灭活剂(也见图 1)

[0313] 表 18

[0314]

代码	详细说明
054	1,1-二氢过氧甲烷
056-1	(二聚体) C ₈ H ₁₈ O ₆ 2,2'-二氢过氧-2,2'-二丁基过氧化物
058-1	C ₄ H ₁₀ O ₄ 2,2-二氢过氧丁烷

[0315]

057-1	056-1 和 058-1 (1:1 比率)混合物
069-1	C ₂ H ₆ O ₄ 1,1-二氢过氧丁烷 过氧化氢-1,1'-亚乙基二 (ethylenedibis) 也称为乙烷-1,1-二过氧化物 [8] 或 1,1-二氢过氧乙烷
070-1	C ₃ H ₈ O ₄ 1,1-二氢过氧丙烷
071-1	C ₄ H ₁₀ O ₄ 1,1-二氢过氧丁烷
077	(二聚体) C ₆ H ₁₄ O ₆ 1,1-二氢过氧丙烷 + 1,1'-二氢过氧-1,1'-二丙基过氧化物
078	(二聚体) C ₈ H ₁₈ O ₆ 1,1-二氢过氧丁烷 + 1,1'-二氢过氧-1,1'-二丁基过氧化物
079	C ₄ H ₈ O ₄ 1,1-二氢过氧丁烷 + 1,1'-二氢过氧-1,1'-二乙基过氧化物
080	C ₅ H ₄ O ₈ 和/或有封闭环 C ₅ H ₂ O ₆ 1,1,5,5-四氢过氧戊烷 + 3,7-二-氢过氧-1,2-二氧杂环庚烷

[0316] 为了对比,也检测下列单官能有机过氧化物:

[0317]

072	甲基过氧化氢, CH ₃ -OOH
-----	------------------------------

[0318] 参考文献:

[0319] [1]Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin (兽医学接种手册)(Mayr 等编).Verlad Paul Barey 公司,1984

[0320] [2]W02007/052163.

[0321] [3]European guidelines on Viral Safety Evaluations of Biotechnology Products (欧洲生物技术产品病毒安全性评价指南);ICH Q5A (CPMP/ICH/295/95)

[0322] [4]Note for Guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products (人生物医药产品生产中牛血清应用指南注解), CPMP/BWP/1793/02

[0323] [5]Moghaddam 等 (2006)Nature Medicine12:905-7

[0324] [6]Haas 等.(1959)Arch Gesamte Virusforsch. 9:470-83

[0325] [7]Rheinbaben 和 Wolff;Handbuch der viruswirksamen Desinfektionen (病毒有效的消毒手册);施普林格公司(Springer)2002;第 163 页

[0326] [8]Hamann 等 (2008)Chem Eur J14:6849-51

[0327] [9]Bunge 等 (2009)Tetrahedron letters50:524-6

[0328] [10] Žimitek 等 (2007)Org Biomol Chem5:3895-908.

[0329] [50]Kistner 等 (1998)Vaccine16:960-8.

[0330] [12]Kistner 等, (1999)Dev Biol Stand98:101-10.

[0331] [13]Bruhl 等 (2000)Vaccine19:1149-58.

[0332] [14]W097/37000.

[0333] [15]Brands 等, (1999)Dev Biol Stand98:93-100.

[0334] [16]Halperin 等 (2002)Vaccine20:1240-7.

- [0335] [17]Tree 等 (2001)Vaccine19:3444-50.
- [0336] [18]Kistner 等 (1998)Vaccine16:960-8.
- [0337] [19]Kistner 等, (1999)Dev Biol Stand98:101-110.
- [0338] [20]Bruhl 等 (2000)Vaccine19:1149-58.
- [0339] [21]Pau 等 (2001)Vaccine19:3444-21.
- [0340] [22]<http://www.atcc.org/>
- [0341] [23]<http://locus.umdj.edu/>
- [0342] [24]W003/076601.
- [0343] [25]W02005/042728.
- [0344] [26]W003/043415.
- [0345] [27]W001/85938.
- [0346] [28]W02006/108846.
- [0347] [29]W097/37000.
- [0348] [30]Brands 等, (1999)Dev Biol Stand98:93-100.
- [0349] [31]Halperin 等 (2002)Vaccine20:1240-7.
- [0350] [32]EP-A-1260581 (W001/64846).
- [0351] [33]W02006/071563.
- [0352] [34]W02005/113758.
- [0353] [35]W003/023021
- [0354] [36]W003/023025
- [0355] [37]Remington:The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿:药物科学和实践》), (Gennaro, 2000; 第二十版, ISBN:0683306472)。
- [0356] [38]Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(《疫苗设计:亚基和佐剂方法》)(Powell 和 Newman 编) 普莱南出版社(Plenum Press) 1995 (ISBN0-306-44867-X)。
- [0357] [39]Vaccine Adjuvants;Preparation Methods and Research Protocols(《疫苗佐剂:制备方法和研究方案》)(Methods in Molecular Medicine series(《分子医学方法》)丛书的第 42 卷)。ISBN:1-59259-083-7. 0' Hagan 编
- [0358] [40]Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(《疫苗设计:亚基和佐剂方法》)(Powell 和 Newman 编) 普莱南出版社(Plenum Press) 1995 (ISBN0-306-44867-X)。
- [0359] [41]Lundblad(2001)Biotechnology and Applied Biochemistry34:195-197.
- [0360] [42]Guidance for Industry:Bioanalytical Method Validation (工业指南:生物统计学方法验证)。美国健康与人类服务部食品和药物管理局,药物评估和研究中心(CDER) 兽药中心 (CVM), 2001 年 5 月
- [0361] [43]Ji 等, (2002)Biotechniques. 32:1162-7
- [0362] [44]Briggs(1991)J Parenter Sci Technol45:7-12.
- [0363] [45]Lahijani 等, (1998)Hum Gene Ther. 9:1173-80.
- [0364] [46]Loksteff 等, (2001)Biologicals. 29:123-32.

- [0365] [47]W002/28422
- [0366] [48]W002/067983
- [0367] [49]W002/074336
- [0368] [50]W001/21151
- [0369] [51]W002/097072
- [0370] [52]W02005/113756
- [0371] [53]Treanor 等 (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- [0372] [54]Keitel 等, (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10
- [0373] [55]W02008/068631
- [0374] [56]Spaulding. Chemical disinfection of medical and surgical materials (医用和手术材料的化学消毒). 收录于 Block(编者): Disinfection, Sterilization, and Preservation (《消毒, 灭菌和保存》). 第 32 章, 517-31 页. Lippincott Williams 和 Wilkins 公司, 1968
- [0375] [57]Darling 等, (1998) Biologicals. 26:105-10.
- [0376] [58]Favero 和 Bond. Chemical disinfection of medical and surgical materials (医用和手术材料的化学消毒). 收录于 Block(编者): Disinfection, Sterilization, and Preservation (《消毒, 灭菌和保存》). 第 35 章, 617-41 页. Lea 和 Febinger 公司, 1991
- [0377] [59]ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (人或动物来源细胞系衍生的生物技术产品的病毒安全性评估). 1999

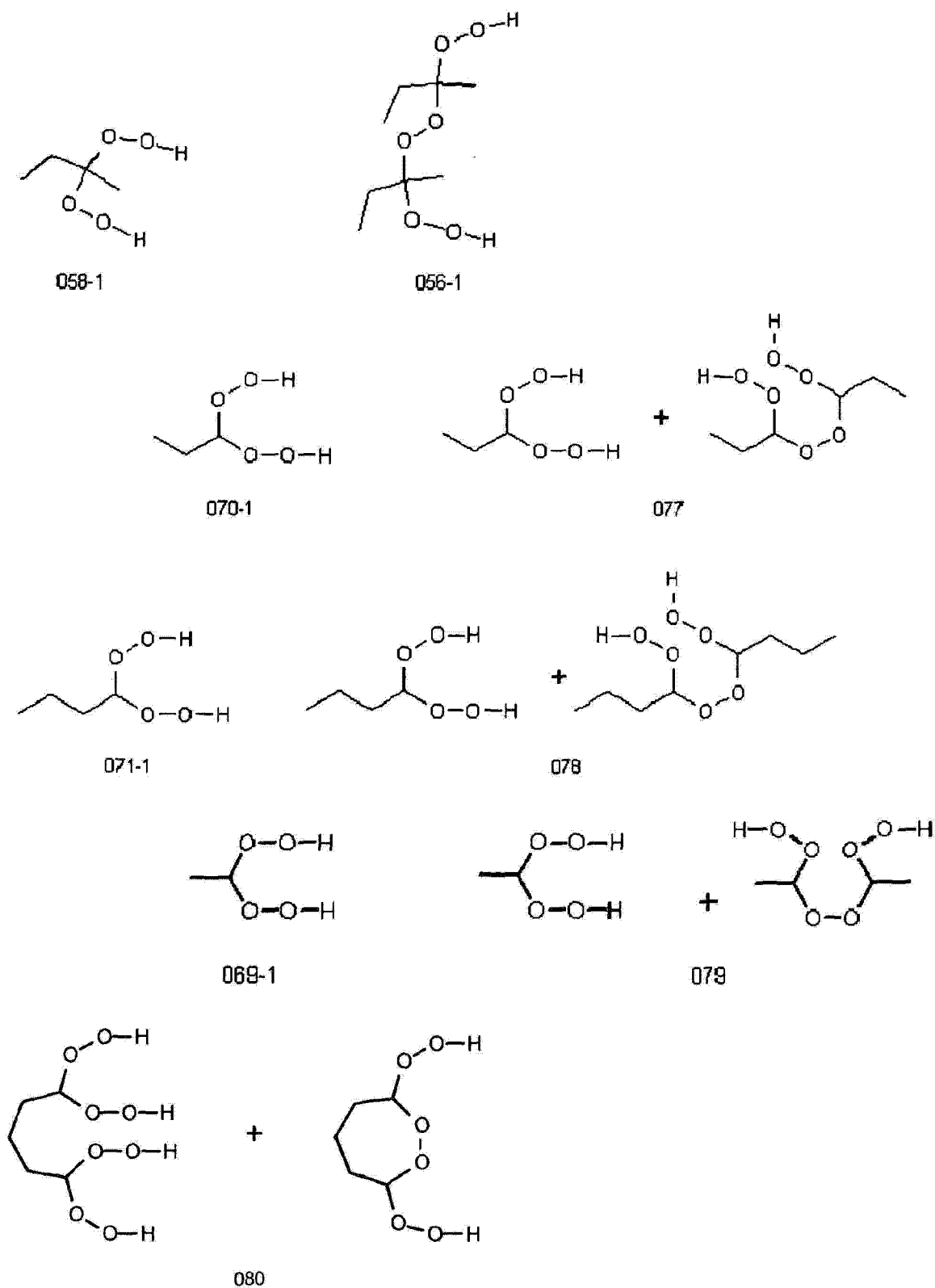


图 1

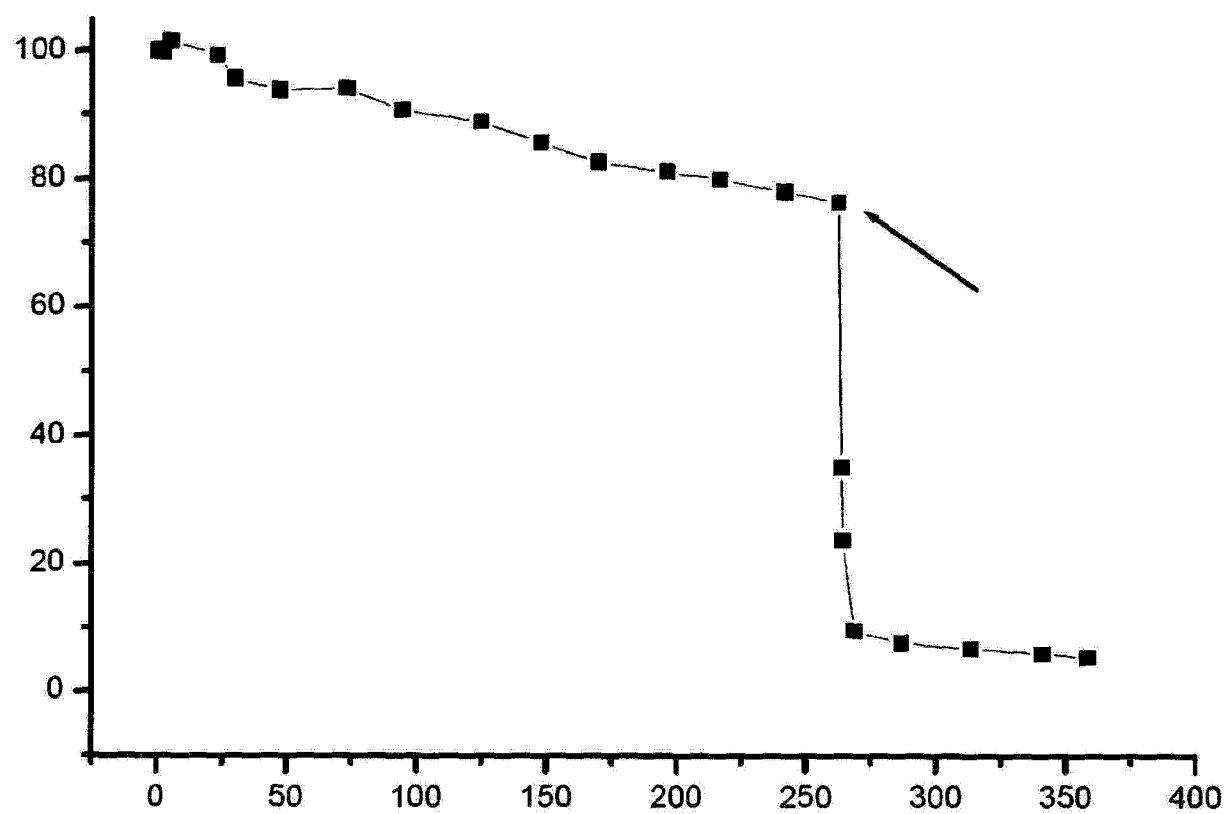


图 2

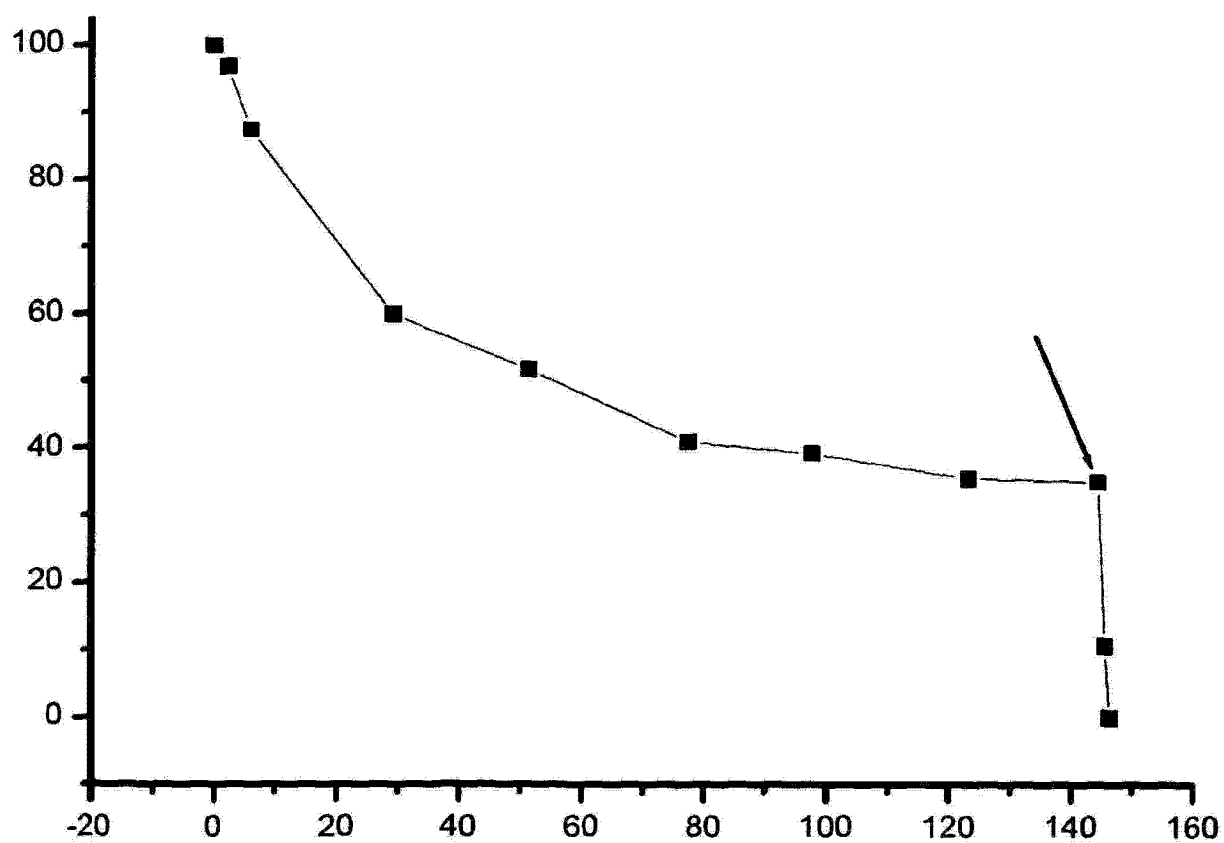


图 3

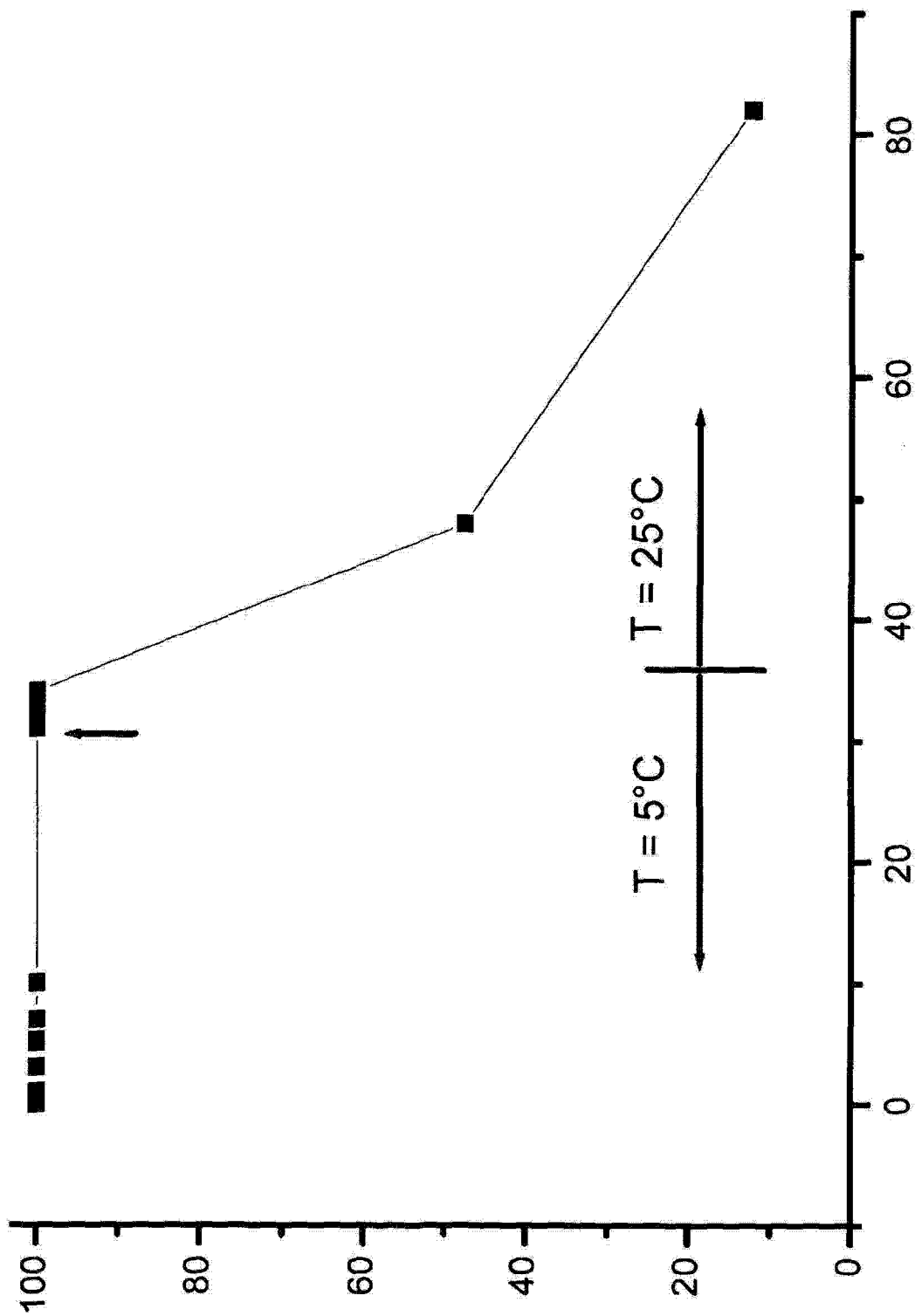


图 4