



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118974245 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202380031092.7

(22) 申请日 2023.03.30

(30) 优先权数据

63/362,163 2022.03.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/053159 2023.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/187691 EN 2023.10.05

(71) 申请人 美国杰特贝林生物制品有限公司

地址 美国

(72) 发明人 T·布兰特 H·劳克斯

J·E·沃格尔

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 郑天松

(51) Int.Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

B01D 15/34 (2006.01)

B01D 61/14 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

权利要求书4页 说明书28页 附图6页

(54) 发明名称

纯化包膜病毒的方法

(57) 摘要

本公开内容总的涉及基因治疗产品的制造，具体涉及从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法，其包括核酸内切酶和/或阴离子交换色谱法。

1. 从细胞培养液或经过滤的细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括在纯化病毒之前使细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触。

2. 权利要求1的方法,其中所述细胞培养液是从稳定生产细胞中收获的。

3. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶是非特异性核酸内切酶,并且无需序列特异性而降解DNA和RNA。

4. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、鱼腥藻属的种(*Anabaena* sp.)、啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、家牛(*Bos taurus*)、总状共头霉(*Syncephalostrum racemosum*)和/或博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)。

5. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶是沙雷氏菌核酸酶、NucA、Nuc1、核酸内切酶G、DNase I或微球菌核酸酶。

6. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶以0.001~100单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

7. 权利要求6的方法,其中所述核酸内切酶以0.01~10单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

8. 权利要求7的方法,其中所述核酸内切酶以0.1~1单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

9. 权利要求8的方法,其中所述核酸内切酶以约0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

10. 权利要求1的方法,其中在下列时间进行纯化:

细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约30小时,
细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约22小时,
细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约6小时,
细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约4小时,
细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约2小时,
细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约1小时,或
细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约30分钟。

11. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶以约0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后约1~约2小时进行纯化。

12. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶以约0.01~0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后大于约2小时进行纯化。

13. 权利要求1的方法,其中所述核酸内切酶以约0.3~10单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后少于约1小时进行纯化。

14. 权利要求1的方法,其中紧接在纯化之前使所述核酸内切酶与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

15. 权利要求1的方法,其中所述方法包括对细胞培养液进行收获物过滤以产生经过滤

的细胞培养液,然后使经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触。

16.权利要求1的方法,其中所述方法包括在使细胞培养液与核酸内切酶接触之后,进行收获物过滤以产生经过滤的细胞培养液。

17.权利要求16的方法,其中收获物过滤是在细胞培养液与核酸内切酶接触后立即进行的。

18.权利要求1的方法,其中纯化包括使经过滤的细胞培养液经受阴离子交换色谱法。

19.权利要求18的方法,其中在收获物过滤后使经过滤的细胞培养液立即经受阴离子交换色谱法。

20.权利要求19的方法,其中在装载到阴离子交换色谱柱之前或期间,使经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

21.使用阴离子交换色谱法从经过滤的细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其中在装载到阴离子交换色谱柱之前或期间,使经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

22.权利要求21的方法,其中紧接在装载到阴离子交换色谱柱之前,使经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

23.权利要求22的方法,其中高浓度盐溶液和经过滤的细胞培养液排队混合。

24.权利要求21的方法,其中高浓度盐溶液包含一价盐和/或二价盐。

25.权利要求24的方法,其中一价盐是氯化钠。

26.权利要求21的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为至少约1M。

27.权利要求21的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约70~99% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约1~30% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

28.权利要求21的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为约1M。

29.权利要求28的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约70% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约30% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

30.权利要求21的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为2M。

31.权利要求30的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约85% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约15% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

32.权利要求21的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为5M。

33.权利要求32的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约94% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约6% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

34.权利要求21的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为10M。

35.权利要求34的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约97% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约3% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

36.权利要求21的方法,其中加盐的细胞培养液具有300~500mM的盐浓度。

37.权利要求36的方法,其中加盐的细胞培养液具有约400mM的盐浓度。

38.权利要求21的方法,其中加盐的细胞培养液在25℃下具有35~45mS/cm的目标电导率。

39.权利要求21的方法,其中加盐的细胞培养液在25℃下具有36~44mS/cm的目标电导率。

40. 权利要求38的方法,其中加盐的细胞培养液在25℃下具有40mS/cm的目标电导率。
41. 权利要求18的方法,其中所述方法还包括用一个或多个洗涤步骤洗涤阴离子交换色谱柱。
42. 权利要求41的方法,其中所述方法包括使用第一洗涤溶液的第一洗涤步骤,所述第一洗涤溶液包含:
- pH7.0~9.0的10~100mM Tris、150mM NaCl;
 - pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、150mM NaCl;或
 - pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、150mM NaCl。
43. 权利要求42的方法,其中第一洗涤溶液包含:
- pH8的50mM Tris、150mM NaCl;
 - pH7的10mM组氨酸、150mM NaCl;或
 - pH7.5的10mM HEPES、150mM NaCl。
44. 权利要求41的方法,其中所述方法包括使用第二洗涤溶液的第二洗涤步骤,所述第二洗涤溶液包含:
- pH7.0~9.0的10~100mM Tris、750mM NaCl;
 - pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、750mM NaCl;或
 - pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、750mM NaCl。
45. 权利要求44的方法,其中所述第二洗涤溶液包含:
- pH8的50mM Tris、750mM NaCl;
 - pH7的10mM Tris、750mM NaCl;或
 - pH7.5的10mM HEPES、750mM NaCl。
46. 权利要求18的方法,其中所述方法还包括用洗脱溶液从阴离子交换色谱柱洗脱结合的病毒。
47. 权利要求46的方法,其中所述洗脱溶液包含:
- pH7.0~9.0的10~100mM Tris、1M~2M NaCl;
 - pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、1M~2M NaCl;或
 - pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、1M~2M NaCl。
48. 权利要求47的方法,其中所述洗脱溶液包含:
- pH8的50mM Tris、1.2M或1.5M NaCl;
 - pH7的10mM组氨酸、1.2M或1.5M NaCl;或
 - pH7.5的10mM HEPES、1.2或1.5M NaCl。
49. 权利要求46的方法,其中所述方法还包括用组氨酸、Tris或HEPES稀释洗脱的病毒。
50. 权利要求46的方法,其中所述方法还包括对洗脱的病毒或经稀释的洗脱的病毒在室温下孵育长达15分钟或在2~8℃下孵育长达60分钟。
51. 权利要求46的方法,其中所述方法还包括浓缩和/或渗滤洗脱的病毒或经稀释的洗脱的病毒。
52. 权利要求18的方法,其中阴离子交换色谱柱是阴离子交换膜吸附剂。
53. 权利要求1的方法,其中所述方法使病毒感染滴度产率增加至少10%。
54. 权利要求1的方法,其中所述包膜病毒是逆转录病毒。

55. 权利要求54的方法,其中所述逆转录病毒是慢病毒。
56. 从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括:
- (i) 提供包含由稳定生产细胞系生产的病毒载体的细胞培养液;
 - (ii) 使细胞培养液与重组表达的沙雷氏菌核酸内切酶接触;
 - (iii) 使核酸内切酶处理的细胞培养液与过滤器接触以产生经过滤的细胞培养液;
 - (iv) 将经过滤的细胞培养液和包含5M氯化钠的高浓度盐溶液装载到阴离子交换色谱膜上,其中经过滤的细胞培养液和盐溶液以94% (v/v) 经过滤的细胞培养液和6% (v/v) 高浓度盐溶液的比例装载;
 - (v) 用一种或多种洗涤缓冲液洗涤膜;
 - (vi) 用包含1.2M或1.5M氯化钠的洗脱缓冲液从膜上洗脱结合的病毒;
 - (vii) 用缓冲液稀释洗脱的病毒;及
 - (viii) 浓缩和渗滤洗脱的病毒。
57. 权利要求1之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积大于约1L、约5L、约10L、约50L、约100L、约500L或约1000L。
58. 权利要求1的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约5L。
59. 权利要求1的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约20L。
60. 权利要求1的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约44L。
61. 权利要求1的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约60L。
62. 权利要求1的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约200L。
63. 权利要求18的方法,其中阴离子交换色谱膜的体积为每升细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液至少约1mL。
64. 权利要求1的方法,其还包括将包膜病毒配制成适合感染细胞的药物制剂或溶液。
65. 权利要求1的方法,其中所述方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液中的 Mg^{2+} 浓度调节至约1~2mM。
66. 权利要求65的方法,其中所述方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液中的 Mg^{2+} 浓度调节至约2mM。
67. 权利要求1的方法,其中所述方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液的pH调节至6.0~10.0。
68. 权利要求67的方法,其中所述方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液的pH调节至8.0~9.2。
69. 权利要求1的方法,其中细胞培养液或经过滤的细胞培养液在与核酸内切酶接触期间的温度为0°C~42°C。
70. 权利要求69的方法,其中细胞培养液或经过滤的细胞培养液在与核酸内切酶接触期间的温度为2°C~8°C。
71. 权利要求70的方法,其中细胞培养液或经过滤的细胞培养液在与核酸内切酶接触期间的温度为4°C。
72. 权利要求1的方法,其中细胞培养液是从在贴壁环境中培养的细胞收获的。
73. 权利要求1的方法,其中细胞培养液是从在悬浮环境中培养的细胞收获的。
74. 纯化的包膜病毒,其由权利要求1的方法产生。

纯化包膜病毒的方法

【0001】 【相关申请数据】

【0002】 本申请要求2022年3月30日提交的题为“纯化包膜病毒的方法”的美国临时申请No.63/362,163的优先权。其全部内容通过引用并入本文。

【技术领域】

【0003】 本公开内容总的涉及基因治疗产品的制造,具体涉及从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括核酸内切酶和/或阴离子交换色谱法。

【背景技术】

【0004】 逆转录病毒,例如慢病毒,是基因治疗研究最多的病毒载体之一。逆转录病毒通常是基于RNA的病毒,将其遗传信息永久整合到靶细胞染色体中。逆转录病毒的优点包括在靶细胞中的长期转基因表达、低免疫原性潜力以及转导到分裂和非分裂细胞的能力。

【0005】 慢病毒是经过基因工程改造的,并且通常基于人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)。为了提高安全性,现代载体仅包含感染和基因传递所必需的HIV基因,但复制和毒力因子所必需的基因已被去除。通常,HIV-1的包膜蛋白与另一种病毒的包膜蛋白(例如来自印第安纳州水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis Indiana virus,VSV)的VSV-G蛋白)交换以允许感染多种靶细胞。

【0006】 为了生产慢病毒,需要用3~4种质粒转染人胚胎肾细胞HEK 293T等细胞。这些包括具有感兴趣的基因的转移质粒和编码水泡性口炎G蛋白(VSV-G)和负责基因整合或自组装的必需病毒蛋白的几种包装质粒。这些质粒可瞬时转染到细胞中,或者使用具有可诱导启动子的质粒的稳定整合来创建可诱导慢病毒的产生生产细胞系。

【0007】 一旦诱导了病毒的产生,病毒就会在细胞内成功组装后通过出芽释放。

【0008】 慢病毒从生产细胞收获,随后在下游过程中进行纯化和浓缩。然而,商业规模的慢病毒纯化很困难。纯化这种病毒的限制障碍是大规模细胞培养产生的杂质和某些膜糖蛋白在暴露于一些纯化条件下的不稳定性。因此,本领域需要一种用于纯化例如用于基因治疗的慢病毒的有效方法。

【0009】 【发明概述】

【0010】 在导致本发明的工作中,发明人试图开发一种商业规模并适合监管要求的生产包膜病毒(例如用于基因治疗)的方法。发明人还试图开发一种可以排队或连续或半连续方式进行的方法。

【0011】 在一些实例中,发明人开发的用于纯化和浓缩病毒载体的下游工艺包括收获物过滤步骤以去除细胞碎片和成分,以及纯化步骤以减少总体积并将病毒载体与宿主细胞DNA、蛋白质和培养基成分分离。发明人开发的用于纯化和浓缩病毒载体的下游工艺还可包括超滤/渗滤步骤以将病毒载体浓缩到最终制剂缓冲液中。在一些实例中,下游步骤还包括无菌过滤步骤以从最终产品中去除微生物。

【0012】 在开发该方法时,发明人确定在其中产生病毒的细胞培养液(例如,来自稳定细胞

系的上清液)中的核酸导致下游工艺(例如,通过阴离子交换色谱的纯化和无菌过滤步骤)中使用的膜、树脂和过滤器的结垢。为了解决这个问题,发明人向细胞培养液添加了核酸内切酶。发明人发现他们可在纯化之前添加核酸内切酶,这将改善纯化以及其他下游步骤,例如无菌过滤。在一个实例中,发明人发现他们可紧接在收获物过滤之前添加核酸内切酶,然后进行纯化,而无需与核酸内切酶单独孵育。对于由贴壁细胞和悬浮细胞产生的病毒,核酸内切酶的添加有助于更久的收获和更高的载体产率,而不会堵塞色谱柱和/或无菌过滤过滤器。

[0013] 发明人还发现,期望的是在阴离子交换色谱法之前增加细胞培养液中的盐浓度以减少杂质结合,从而促进病毒与阴离子交换剂的结合和污染物的流过。然而,增加盐浓度由于几个因素而复杂化。首先,在阴离子交换之前,非期望的是使细胞培养液的体积显著增加,因此优选使用高浓度盐溶液。然而,高渗条件会使病毒颗粒不稳定。此外,商业规模的手动混合既麻烦又耗时,并且不适合排队处理。当在容器中进行混合时,如果盐无充分混合,密度较高的高盐溶液会沉降到容器底部,而较高的局部盐浓度可导致病毒在色谱单元的装载过程中洗脱。为了解决这些问题,发明人通过在紧接在色谱法之前将两个流体流流动在一起,将高浓度盐溶液添加到细胞培养液中。高浓度盐溶液和细胞培养液在被装载到阴离子交换剂上时、紧接在装载到阴离子交换剂上之前或在阴离子交换剂内流动在一起以使其混合。这有利于溶液的混合,而不会使体积显著增加,并且也不会使病毒不稳定。它还允许无论是在实验室规模还是商业规模均高效混合,而无需耗时的混合步骤。

[0014] 发明人的发现提供了用于纯化包膜病毒的方法。

[0015] 在一个实例中,本公开内容提供了从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括在收获物过滤之前使细胞培养液与核酸内切酶接触。

[0016] 本公开内容还提供了从细胞培养液或经过滤的细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括在纯化病毒之前使细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触。

[0017] 在本公开内容的示例性形式中,细胞培养液或收获的细胞培养液来自稳定生产细胞,即,其中稳定地掺入了产生慢病毒所需的遗传物质的细胞。此类细胞与其中暂时掺入了遗传元件的细胞不同。

[0018] 示例性包膜病毒是逆转录病毒。例如,逆转录病毒是慢病毒。例如,慢病毒是HIV或其衍生物。

[0019] 示例性核酸酶是非特异性核酸内切酶,并且无需序列特异性而降解DNA和RNA。在一个实例中,核酸内切酶是非特异性核酸内切酶,并且无需序列特异性而降解DNA。

[0020] 合适的核酸内切酶是本领域已知的,包括来自来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、鱼腥藻属的种(*Anabaena* sp.)、啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、家牛(*Bos taurus*)、总状共头霉(*Syncephalostrum racemosum*)和/或博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)的核酸内切酶。例如,核酸内切酶是沙雷氏菌核酸酶、NucA、Nuc1、核酸内切酶G、DNase I或微球菌核酸酶。

[0021] 核酸内切酶可以任何适合的浓度添加以防止在核酸内切酶处理后膜或阴离子交换剂的结垢。本文描述了合适的浓度。在一个实例中,核酸内切酶以0.001~100单位/mL细胞培养液的浓度添加至细胞培养液。在一个实例中,核酸内切酶以0.01~10单位/mL细胞培养液的浓度添加至细胞培养液。在一个实例中,核酸内切酶以0.1~1单位/mL细胞培养液的

浓度添加至细胞培养液。例如,核酸内切酶以0.3单位/mL细胞培养液的浓度添加至细胞培养液。

[0022] 在纯化之前,例如在阴离子交换之前,加入核酸内切酶。本公开内容包括在阴离子交换之前孵育核酸内切酶和细胞培养液。在一些实例中,在阴离子交换之前,将核酸内切酶和细胞培养液孵育少于约2小时或少于约1小时。

[0023] 发明人已显示,在某些实例中,无需对核酸内切酶和细胞培养液进行单独孵育。例如,可在收获物过滤之前将核酸内切酶添加至细胞培养液,然后细胞培养液可立即进行收获物过滤,因为收获物过滤过程本身在纯化(例如阴离子交换)之前的处理时间足以防止阴离子交换剂结垢。然而,本公开内容还包括在收获物过滤之前孵育核酸内切酶和细胞培养液。在一些实例中,在收获物过滤之前,将核酸内切酶和细胞培养液孵育少于约2小时或少于约1小时。

[0024] 在一些实例中,纯化在下列进行:在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约30小时,例如,在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约22小时,例如,在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约6小时,例如,在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约4小时,例如,在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约2小时,例如,在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约1小时,或者在细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约30分钟。

[0025] 在一个实例中,该方法还包括在细胞培养液与核酸内切酶接触后立即进行收获物过滤以产生经过滤的细胞培养液。

[0026] 在一些实例中,核酸内切酶以约0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后约1~约2小时进行纯化。

[0027] 在本公开内容的实例中,核酸内切酶以约0.01~0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后大于约2小时进行纯化。

[0028] 在本公开内容的其他实例中,核酸内切酶以约0.3~10单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后少于约1小时进行纯化。

[0029] 在本公开内容的另一个实例中,核酸内切酶以约0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并且在接触后少于约1小时进行纯化。

[0030] 在一个实例中,该方法还包括在纯化病毒之前使细胞培养液或经过滤的细胞培养液与镁盐接触。在一个实例中,以一定量添加镁盐以实现小于10mM Mg^{2+} 的目标镁浓度。例如,0.001mM~10mM,或0.1mM~10mM,或1mM~10mM。在一个实例中,以一定量添加镁盐以实现小于10mM的目标镁浓度,例如9mM,或8mM,或7mM或6mM。在一个实例中,以一定量添加镁盐以实现小于5mM的目标镁浓度。例如,5mM、或4mM、或3mM、或2mM、或1mM。在一个实例中,以一定量添加镁盐以实现约2mM的目标镁浓度。

[0031] 因此,为了达到目标镁浓度,经过滤的细胞培养液或细胞培养液与镁盐溶液的比例取决于镁盐溶液的浓度。在一个实例中,镁盐溶液的浓度小于500mM,例如50mM~500mM或

100mM ~ 400mM, 或150mM ~ 300mM。例如, 镁盐溶液的浓度为200mM。

[0032] 在一个实例中, 镁盐是氯化镁。适合用于本公开内容的其他合适形式的镁盐对于本领域技术人员来说是明显的和/或在本文中描述。

[0033] 在一个实例中, 该方法还包括使经过滤的细胞培养液经受阴离子交换色谱法。例如, 在收获物过滤后立即使经过滤的细胞培养液经受阴离子交换色谱法。

[0034] 如上所述, 发明人已证明, 在装载到阴离子交换色谱柱之前或期间, 将细胞培养液或经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液, 可改善通过阴离子交换进行的纯化, 例如, 通过防止杂质与阴离子交换剂结合, 从而增强病毒的结合并允许污染物流过。

[0035] 因此, 在一些实例中, 在装载到阴离子交换色谱柱之前或期间, 将经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。这种混合形式有利于排队处理。例如, 细胞培养液可与核酸内切酶接触, 然后过滤, 然后在直接装载到阴离子交换柱上时与高盐浓度溶液混合。

[0036] 本公开内容还提供了使用阴离子交换色谱法从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法, 其中在装载到阴离子交换色谱柱之前或期间, 将细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

[0037] 阴离子交换剂可为基于树脂的阴离子交换剂、阴离子交换膜吸附剂或具有用于捕获带负电粒子的带正电基质的任何其他形式的阴离子交换剂。在本公开内容的示例性形式中, 阴离子交换剂是阴离子交换膜吸附剂。

[0038] 在一个实例中, 在装载到阴离子交换色谱柱期间, 混合 (例如排队混合) 高浓度盐溶液和经过滤的细胞培养液或细胞培养液。例如, 在装载到阴离子交换柱期间, 将流体同时分别添加到柱中。在一些实例中, 流体可在进入阴离子交换柱之前、进入阴离子交换柱之后或在进入阴离子交换柱的同时相互接触。

[0039] 在一个实例中, 混合的经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液具有用于装载到阴离子交换色谱柱的约300mM ~ 500mM盐的目标盐浓度。例如, 目标盐浓度为400mM盐。

[0040] 因此, 为了实现目标盐浓度, 经过滤的细胞培养液或细胞培养液与高浓度盐溶液的比例取决于盐溶液的浓度。在一个实例中, 高浓度盐溶液的浓度为至少1M, 例如, 1M ~ 10M或2M ~ 9M或3M ~ 8M或4M ~ 6M。例如, 高浓度盐溶液的浓度为5M。

[0041] 在一个实例中, 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液以约70 ~ 99% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和约1 ~ 30% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0042] 在一个实例中, 所述高浓度盐溶液的浓度为5M, 并且所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和所述高浓度盐溶液以90 ~ 95% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和5 ~ 10% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。例如, 所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和所述高浓度盐溶液以95% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和5% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。例如, 所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和所述高浓度盐溶液以94% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和6% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。例如, 所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液以93% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和7% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0043] 在另一实例中,所述高浓度盐溶液的浓度为1M,并且所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液以约70% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和约30% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0044] 在另一实例中,所述高浓度盐溶液的浓度为2M,并且所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液以约85% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和约15% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0045] 在另一个实例中,所述高浓度盐溶液的浓度为10M,并且所述经过滤的细胞培养液或细胞培养液和所述高浓度盐溶液以约97% (v/v) 经过滤的细胞培养液或细胞培养液和约3% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0046] 在一个实例中,含有经过滤的细胞培养液或细胞培养液的流体流的流速高于含有高浓度盐溶液的流体流的流速。在另一个实例中,含有经过滤的细胞培养液或细胞培养液的流体流的流速低于含有高浓度盐溶液的流体流的流速。在另一个实例中,含有经过滤的细胞培养液或细胞培养液的流体流的流速与含有高浓度盐溶液的流体流的流速相同。

[0047] 在一个实例中,混合的经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液在25°C下具有35~45mS/cm的目标电导率。在一个实例中,混合的经过滤的细胞培养液或细胞培养液和高浓度盐溶液在25°C下具有36~44mS/cm的目标电导率。例如,在25°C下的目标电导率为约40±4mS/cm。

[0048] 在一个实例中,高浓度盐溶液包含一价盐和/或二价盐。例如,高浓度盐溶液包含一价盐,即,作为唯一的盐。在一个实例中,一价盐是氯化钠。

[0049] 在一个实例中,高浓度盐溶液是浓度为至少约1M的氯化钠,例如,浓度为约5M。

[0050] 在一个实例中,加盐的细胞培养液的盐浓度为300mM~500mM,例如,约400mM。

[0051] 在一个实例中,该方法还包括用一个或多个洗涤步骤洗涤阴离子交换色谱柱。例如,该方法包括使用包含90~95% (v/v) 缓冲液和5~10% (v/v) 高浓度盐溶液的溶液的第一洗涤步骤。例如,该溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、150mM NaCl。在一个实例中,该溶液包含pH8的50mM Tris、150mM NaCl。在另一个实例中,该溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、150mM NaCl。在另一个实例中,该溶液包含pH7的10mM组氨酸、150mM NaCl。在另一个实例中,该溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、150mM NaCl。在另一个实例中,该溶液包含pH7.5的10mM HEPES、150mM NaCl。

[0052] 在一个实例中,该方法包括使用第二溶液的第二洗涤步骤。例如,第二溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、750mM NaCl。在一个实例中,第二溶液包含pH8的50mM Tris、750mM NaCl。在另一个实例中,第二溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、750mM NaCl。在另一个实例中,第二溶液包含pH7的10mM组氨酸、750mM NaCl。在另一个实例中,第二溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、750mM NaCl。在另一个实例中,第二溶液包含pH7.5的10mM HEPES、750mM NaCl。

[0053] 在一个实例中,该方法还包括用洗脱溶液从阴离子交换色谱柱洗脱结合的病毒。例如,洗脱溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、1M~2M NaCl。在一个实例中,洗脱溶液包含pH8的50mM Tris、1.2M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH8的50mM Tris、1.5M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、1M~2M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH7的10mM组氨酸、1.2M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH7

的10mM组氨酸、1.5M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、1M~2M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH7.5的10mM HEPES、1.2M NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH7.5的10mM HEPES、1.5M NaCl。

[0054] 在一个实例中,该方法包括以1:5~1:20的稀释度稀释洗脱病毒。例如,该方法包括以1:10的稀释度稀释洗脱病毒。

[0055] 在一个实例中,该方法包括用组氨酸、Tris或HEPES稀释洗脱的病毒。例如,该方法包括用HEPES稀释洗脱的病毒。在一个实例中,该方法包括用pH7.5的10mM HEPES稀释洗脱的病毒。例如,在洗脱后立即稀释病毒。

[0056] 在一个实例中,该方法还包括对洗脱的病毒在室温下孵育长达15分钟或在2~8℃下孵育长达60分钟。

[0057] 在一个实例中,该方法包括浓缩和/或渗滤洗脱的病毒。

[0058] 在一个实例中,该方法使病毒感染滴度产率增加至少2%或3%或4%或5%或10%或15%或20%。在一个实例中,该方法使病毒感染滴度产率增加至少10%。

[0059] 本公开内容还提供了从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括:

[0060] (i) (任选地) 提供包含由稳定生产细胞系生产的病毒载体的细胞培养液;

[0061] (ii) 使细胞培养液与重组表达的沙雷氏菌核酸内切酶接触;

[0062] (iii) 使核酸内切酶处理的细胞培养液与过滤器接触以产生经过滤的细胞培养液;

[0063] (iv) 将经过滤的细胞培养液和包含5M氯化钠的高浓度盐溶液装载到阴离子交换色谱膜上,其中经过滤的细胞培养液和盐溶液以94% (v/v) 经过滤的细胞培养液和6% (v/v) 高浓度盐溶液的比例装载;

[0064] (v) 用一种或多种洗涤缓冲液洗涤膜;

[0065] (vi) 用包含1.2M或1.5M氯化钠的洗脱缓冲液从膜上洗脱结合的病毒;

[0066] (vii) (任选地) 用缓冲液稀释洗脱的病毒;和

[0067] (viii) 浓缩和渗滤洗脱的病毒或经稀释的洗脱的病毒。

[0068] 在一个实例中,该方法是排队或连续或半连续地进行的。

[0069] 在一个实例中,本公开内容的方法还包括进行无菌过滤。例如,在浓缩和渗滤洗脱的病毒之前进行无菌过滤。在替代实例中,在浓缩和渗滤洗脱的病毒之后进行无菌过滤。

[0070] 在一个实例中,本公开内容的方法还提供将包膜病毒配制成为适合感染细胞的药物制剂或溶液。

[0071] 本公开内容还提供了通过本文所述方法产生的纯化的包膜病毒。

[0072] 本公开内容还提供了用于防止阴离子交换剂结垢的方法。这种方法包括与本文所述相同的步骤。

[0073] 在一个实例中,本公开内容的色谱方法是使用在其上固定有带正电的配体的基质进行的。如本领域技术人员显而易见的,这种基质可为阴离子交换色谱柱。这种基质也可为包含带正电的配体的多模色谱柱。因此,本公开内容还包含执行本文所述的方法,其中使用包含带正电的配体的多模式色谱柱代替阴离子交换色谱柱。

[0074] **【附图简述】**

[0075] 图1是显示收获稳定性因高盐条件而受损的图形表示。

[0076] 图2是显示在有或无Benzonase处理(如所示)的情况下TFF洗脱液的无菌过滤器的RNA产率、感染性产率和过滤能力的图形表示。

[0077] 图3是显示当在有或无Benzonase处理(如所示)的情况下处理收获的细胞培养液时Mustang Q阴离子色谱柱中的压力的图形表示。

[0078] 图4是总结从扁平器皿和贴壁生物反应器收集的收获物的感染滴度和RNA含量的产率的图形表示。

[0079] 图5是显示从在有或无排队添加5M NaCl盐(如所示)的情况下进行的Mustang Q阴离子交换中回收病毒的图形表示。

[0080] 图6是显示在来自贴壁生物反应器的大规模收获物的纯化过程中感染滴度产率的图形表示。

[0081] 【发明详述】

[0082] 【一般性描述】

[0083] 在本说明书中,除非另有明确说明或上下文另有要求,对单个步骤、物质的组合物、步骤的组或物质的组合物的组的引用应被视为包含这些步骤、物质的组合物、步骤的组或物质的组合物的组的一个和多个(即一个以上)。因此,如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数方面。例如,提及“一个(a)”包括单个以及两个或更多个;提及“一种(an)”包括一种以及两种或更多种;提及“该(the)”包括单个以及两个或更多个等等。

[0084] 本领域技术人员将理解,本公开内容容易受到除具体描述之外的变化和修改的影响。应当理解,本公开内容包括所有此类变化和修改。本公开内容还包括本说明书中单独或集体提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征的任何和所有组合或任何两个或更多个。

[0085] 本公开内容的范围不限于本文所述的具体实例,这些实例仅用于举例说明。功能等效的产品、组合物和方法显然在本公开内容的范围内。

[0086] 除非另有明确说明,本文中本公开内容的任何实例均应视为适用于本公开内容的任何其他实例。换句话说,本公开内容的任何具体实例均可与本公开内容的任何其他具体实例相结合(除非相互排斥)。

[0087] 本公开内容的公开特定特征或特征的组或方法或方法步骤的任何实例将被视为提供放弃该特定特征或特征的组或方法或方法步骤的明确支持。

[0088] 除非另有明确定义,本文中使用的所有技术和科学术语均应视为具有与本领域例如,分子生物学、微生物学、病毒学)普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0089] 除非另有说明,本公开内容中使用的分子生物学、微生物学、病毒学、重组DNA技术、溶液中的肽合成、固相肽合成和免疫学的常规技术是本领域技术人员熟知的标准程序。此类技术在文献中描述和解释,文献来源包括例如J.Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984), J.Sambrook等人Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989), T.A.Brown(编辑), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press(1991), D.M.Glover and B.D.Hames(编辑), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press(1995和1996), 和F.M.Ausubel等人(编辑), Current Protocols

in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括迄今为止的所有更新), Ed Harlow and David Lane (编辑) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 和 J.E. Coligan 等人 (编辑) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (包括迄今为止的所有更新)。

[0090] 术语“和/或”, 例如“X和/或Y”, 应理解为“X和Y”或“X或Y”, 并应被视为明确支持两种含义或任一含义。

[0091] 除非另有说明, 术语“约”是指指定值的 $\pm 20\%$, 更多例如 $\pm 10\%$ 。为避免疑问, 后跟指定值的术语“约”应解释为也包含精确的指定值本身(例如, “约10”也包含精确的10)。

[0092] 如本文所用, 术语“来自”应理解为表示可从特定来源获得特定整体, 尽管不一定直接从该来源获得(即包括重组获得)。

[0093] 在本说明书中, 词语“包含”或变型例如“包括(comprises)”或“包含(comprising)”应理解为暗示包含所述的元素、整体或步骤, 或元素、整体或步骤的组, 但不排除任何其他元素、整体或步骤, 或元素、整体或步骤的组。

[0094] **【选定的定义】**

[0095] 术语“纯化(purify)”或“纯化(purifying)”或“纯化(purification)”应理解为意指完全或部分去除细胞培养液中存在的至少一种杂质, 从而提高溶液中包膜病毒的纯度水平。

[0096] 术语“杂质(impurity)”或“杂质(impurities)”应理解为包括细胞培养液中除包膜病毒以外的一种或多种成分。例如, 杂质可能包括与工艺相关的杂质, 例如宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白质和培养基成分(例如胎牛血清)。

[0097] 如本文所用, 术语“包膜病毒”是指具有病毒包膜的DNA和RNA病毒。包膜通常源自宿主细胞膜(例如磷脂和蛋白质), 但可能包括包膜表面上的病毒糖蛋白。包膜病毒还包含“衣壳”, 即包膜和病毒基因组之间的蛋白质层。在一个实例中, 包膜病毒是逆转录病毒。例如, 包膜病毒是慢病毒, 例如人类免疫缺陷病毒。

[0098] 如本文所用, 术语“细胞培养液”应理解为包含细胞在其中生长以产生包膜病毒的液体。该液体可包括细胞, 或者细胞可能已被去除, 例如通过离心和/或去除上清液。

[0099] 如本文所用, “收获”是指为下游处理而从生产细胞移出含有病毒颗粒的细胞培养基, 并且“收获物”是指已移出以用于下游处理的含有病毒颗粒的细胞培养基。收获过程可包括收集一个或多个收获物。“收获物过滤”是指已过滤的收获物或已过滤以除去生产细胞以用于下游处理的含有病毒颗粒的细胞培养基。

[0100] 如本文所用, “经过滤的细胞培养液”应理解为包含经过收获物过滤的细胞培养液。

[0101] 如本文所用, “加盐的细胞培养液”应理解为包含已与高浓度盐溶液混合的细胞培养液或经过滤的细胞培养液。

[0102] 本领域技术人员将理解, “核酸内切酶”是一种切割多核苷酸链内的磷酸二酯键的酶。核酸内切酶可切割DNA或RNA, 或DNA和RNA两者。核酸内切酶可以非序列特异性方式切割(也称为“非特异性核酸内切酶”), 或可在特定核苷酸序列处切割(也称为“限制性核酸内切酶”)。

[0103] 本文中提到的“来自”来源(例如来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*))的核

酸内切酶包含从该来源纯化或通过其他方式(例如通过重组技术)产生的核酸内切酶。

[0104] 术语“阴离子交换色谱法”具体包括但不限于在阴离子交换树脂、基质、吸收剂、过滤器等上进行的色谱法。例如,使用带正电的膜进行阴离子交换色谱法。本领域技术人员将理解,术语“阴离子交换色谱”和“阴离子交换纯化”在本文中可互换使用,并且每个术语都为另一个术语提供明确的支持。

[0105] “阴离子交换色谱柱”是用于通过阴离子交换色谱分离化合物的装置。“柱”是用于阴离子交换色谱的容器或器皿,其包含附有带电分子的树脂、基质、吸附剂、过滤器等。本领域技术人员将理解,术语“阴离子交换色谱柱”、“阴离子交换柱”和“阴离子交换剂”在本文中可互换使用,并且每个术语都为另一个术语提供明确的支持。

[0106] 如本文所用,在收获物过滤后进行阴离子交换色谱的上下文中的术语“紧接在…之后”意指收获物过滤和阴离子交换之间无中间纯化步骤。但是,该术语不排除额外的步骤,例如在收获物过滤和阴离子交换色谱之间调节pH值或向细胞培养液或经过滤的细胞培养液添加盐。

[0107] 如本文所用,术语“高浓度盐溶液”应理解为意指超过500mM,例如超过1M,例如介于1M和10M之间的盐浓度。

[0108] 如本文所用,在工艺步骤的上下文中术语“排队(in-line)”是指集成到一个或多个其他工艺步骤中或与一个或多个其他工艺步骤组合的工艺步骤,或直接从另一个工艺步骤流出或流向另一个工艺步骤而无需人工干预或处理的工艺步骤。

[0109] 如本文所用,在混合步骤的上下文使用时“排队混合”或“排队”具体是指使包含第一流体的第一流体流流动到与包含第二流体的第二流体流接触,使得第一流体和第二流体相互接触并混合在一起。在装载阴离子交换色谱柱的上下文中的排队混合包括两个流体流在进入阴离子交换色谱柱之前、进入阴离子交换色谱柱之后或与进入阴离子交换色谱柱同时相互接触。

[0110] 【包膜病毒的生产】

[0111] 用于生产包膜病毒的方法对于本领域技术人员来说是明显的和/或描述于例如 Ansorge等人,(2010) Biochem. Eng. J. 48:362-377; Schweizer and Merten (2010) Curr. Gene Ther. 10:474-486; 和Rodrigues等人,(2011) Viral Gene Therapy. Xu, InTech. Chapter 2:15-40。

[0112] 在一个实例中,病毒是逆转录病毒,例如慢病毒。示例性的逆转录病毒来自 α 逆转录病毒(例如禽白血病病毒(ALV))、来自 β 逆转录病毒(例如小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV))、来自 γ 逆转录病毒(例如鼠白血病病毒(MLV))、来自 δ 逆转录病毒(例如人类嗜T淋巴细胞病毒(HTLV))、来自 ϵ 逆转录病毒(例如大眼鲈真皮肉瘤病毒(WDSV))、来自泡沫病毒(例如人类泡沫病毒(HFV)或猿猴泡沫病毒(SFV))、来自灵长类动物慢病毒(例如不同类型的人类免疫缺陷病毒(HIV)、不同类型的猿猴免疫缺陷病毒(SIV))或来自非灵长类动物哺乳动物慢病毒(例如马传染性贫血病毒(EIAV))、来自猫免疫缺陷病毒(FIV)、山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)或绵羊梅迪-维斯纳病毒(VMV)。

[0113] 在一些实例中,包膜病毒例如逆转录病毒是假型的,即,它包含源自不同于其所来源于的病毒的病毒的包膜糖蛋白、修饰的包膜糖蛋白或嵌合包膜糖蛋白。

[0114] 在一些实例中,包膜病毒包含引入其基因组中的转基因。转基因将取决于包膜病

毒载体所预期的具体用途。示例性转基因包括编码治疗性RNA的转基因(例如,编码靶RNA或DNA序列的反义互补RNA)、编码在患有病理状况的受试者中缺乏或不存在的蛋白质的转基因、或用于使用DNA的疫苗接种的转基因,即编码蛋白质的转基因,其表达将诱导受体针对所述蛋白质的疫苗接种。在一些实例中,转基因编码可用于治疗血红蛋白病(例如镰状细胞病或地中海贫血)的蛋白质或核酸。在一些实例中,转基因编码可用于治疗原发性免疫缺陷的蛋白质或核酸。在一些实例中,转基因编码可用于治疗Wiskott-Aldrich综合征的蛋白质或核酸。在一些实例中,转基因编码可用于治疗X连锁无丙种球蛋白血症的蛋白质或核酸。

[0115] 在一些实例中,通过将以下四个元件引入宿主细胞来产生包膜病毒:包含慢病毒基因gagpol的表达盒、包含慢病毒基因rev的表达盒、转基因(均位于慢病毒LTR-5'和慢病毒LTR-3'之间)和编码包膜糖蛋白的表达盒。

[0116] 在一些实例中,包膜病毒由表达产生包膜病毒所需的一种或几种元件的稳定系产生(Miller(2001)Curr.Protoc.Hum.Genet.Chapter 12:Unit 12.5.;Rodrigues等人2011,同上)。在一个实例中,包膜病毒由瞬时转染了编码产生病毒所需元件的一种或几种质粒的哺乳动物宿主细胞产生。根据替代示例,元件通过多个质粒引入细胞:一个质粒带有包含慢病毒gagpol基因的表达盒,一个质粒带有包含慢病毒rev基因的表达盒,一个质粒带有编码包膜糖蛋白的表达盒,一个质粒带有包含四环素反式激活因子(tTA)基因的表达盒,和/或一个质粒带有包含慢病毒tat基因的表达盒。包含具有转基因(包含在慢病毒LTR-5'和LTR-3'之间)的表达盒的转移质粒可作为串联体与具有抗生素抗性盒的辅助质粒一起引入,以赋予生产细胞抗性。

[0117] 宿主细胞可从允许产生包膜病毒的任何细胞中选择。根据一个实例,所述细胞选自人类细胞(HEK293、HEK293T、HEK293FT、HEK293OX、Te671、HT1080、CEM)、鼯鼠细胞(NIH-3T3)、鼯鼠细胞(Mpf)、犬科细胞(D17)。根据一个实例,所述细胞选自CHO细胞、BHK细胞、MDCK细胞、C3H 10T1/2细胞、FLY I、Psi-2细胞、BOSC 23细胞、PA317细胞、WEHI细胞、COS细胞、BSC 1细胞、BSC 40细胞、BMT 10细胞、VERO细胞、W138细胞、MRC5细胞、A549细胞、HT1080细胞、B-50细胞、3T3细胞、NIH3T3细胞、HepG2细胞、Saos-2细胞、Huh7细胞、HeLa细胞、W163细胞、211细胞和211A细胞。

[0118] 根据一个实例,所述细胞选自GPR、GPRG、GPRT、GPRGT和GPRTG细胞系。在另一个实例中,所述细胞选自源自上述任何细胞系的细胞系。

[0119] 在一个实例中,包膜病毒由稳定生产细胞产生。稳定生产细胞可源自包装细胞系,包括本文公开的任何细胞系。在一些实施方案中,包装细胞系是GPRG或GPRTG细胞系(Throm等人(2009)Blood 113(21):5104-5110;和Bonner等人(2015)Molecular Therapy,Vol.23,Suppl.1,S35)。在一个实例中,稳定生产细胞系细胞通过以下方式生成:通过将一个或多个基因克隆到重组质粒中来合成载体;从自合成载体切除的表达盒以及自抗生素抗性盒质粒获得的表达盒形成串联阵列;用形成的串联阵列转染包装细胞系细胞;和分离稳定生产细胞系细胞。通过诱导稳定生产细胞系细胞的可诱导启动子来产生病毒。

[0120] 细胞在适合培养哺乳动物细胞和产生包膜病毒的培养基中培养。细胞可在贴壁环境中(例如附着在表面上)或在悬浮环境中(例如悬浮在培养基中)培养。此外,培养基还可补充有本领域已知的添加剂,例如以适当浓度添加的抗生素、血清(特别是胎牛血清等)。培养基可补充有GlutaMax™、Pluronic™ F-68(ThermoFisher)、LONG®R3IGF-I(Sigma-

Aldrich)、Cell BoostTM 5和/或抗凝剂。所用的培养基可特别包含血清或不含血清。用于哺乳动物细胞的培养基是已知的,并且包括例如DMEM(杜氏改良伊格尔培养基)培养基、RPMI 1640或各种培养基的混合物,包括例如DMEM/F12或无血清培养基如optiMEM[®]、optiPRO[®]、optiPRO-SFM[®]、CD293[®](ThermoFisher)、TransFxTM(Cytiva)、BalanCD[®](Irvine)、FreestyleF17[®](Life Technologies)或Ex-Cell[®]293(Sigma-Aldrich)。

[0121] 在使用瞬时转染细胞的工艺中,可使用允许质粒转染的任何试剂。示例性试剂包括磷酸钙或聚乙烯亚胺。本领域技术人员可根据所产生的病毒和/或引入转移质粒的转基因的特性来调整条件(例如,质粒的量、质粒之间的比例、质粒与转染剂之间的比例、培养基的类型等)和转染时间。

[0122] 根据一些实例,所用的培养基具有在现有技术中通常用于培养细胞和生产病毒的中性pH(例如,7~7.4的pH,特别是7、7.1、7.2、7.3或7.4)。在其他实例中,所用的生产工艺包括在中等酸性培养基中培养生产细胞。表述“中等酸性条件”表示包含在5~6.8,例如5.5~6.5,例如5.8~6.2的水溶液的pH。所选的pH还取决于所用培养基的缓冲能力,这可由本领域技术人员结合其常识轻松确定。本领域技术人员能够改变溶液的pH。

[0123] 在一个实例中,包膜病毒的生产包括:利用编码生产所述包膜载体所需元件的一个或多个质粒瞬时转染HEK293T细胞或其衍生物,或通过使用组成性地或在诱导后生产载体的稳定生产细胞,例如GPRG或GPRTG;在合适的培养基中培养细胞,其中pH为约6或约7;收获含有包膜病毒的细胞培养基。

[0124] 【纯化包膜病毒】

[0125] 本公开内容提供了用于提高来自细胞培养液或经过滤的细胞培养液的包膜病毒的纯度和/或回收率的方法。

[0126] 本公开内容的方法适用于从小规模和大规模生产中纯化包膜病毒。该方法特别有用,因为它们能够扩大规模以用于以商业规模制造药品。

[0127] 在一个实例中,细胞在贴壁或固定床环境中生长。在一个实例中,细胞在细胞培养室(例如CellSTACK[®](Corning))中生长。在一个实例中,细胞在贴壁生物反应器(例如iCELLis[®](Pall)、scale-XTM或NevoLineTM(Univercells Technologies))中生长。贴壁细胞培养室或生物反应器可具有大于约0.1m²、大于约1m²、大于约10m²、大于约30m²、大于约100m²、大于约200m²、大于约500m²或大于约600m²的可用生长表面。

[0128] 在一个实例中,细胞在悬浮环境中生长。在一个实例中,细胞在搅拌槽生物反应器中生长。在实例中,细胞在Biostat[®]或Univessel[®]生物反应器(Sartorius)中生长。

[0129] 在实施方案中,细胞培养液的收获物的体积可为例如约0.01L~约0.1L,或约0.1L~约1L,或约1L~约5L。例如,细胞培养液的收获物的体积为约5L。在其他实施方案中,细胞培养液的收获物的体积可为约5L~约10L,约10L~约50L,约50L~约100L,约100L~约200L,约200L~约500L,约500L~约1000L,约1000L~约2000L,或约2000L~约5000L。在一个实例中,收获物的体积在约35~150L之间。在一个实例中,收获物的体积为约35~150L。例如,收获物的体积为约20L。在一个实例中,收获物的体积为约50~70L。例如,收获物的体积为约50L。

[0130] 用于从细胞培养液中纯化和浓缩病毒载体的下游工艺包括收获物过滤步骤(也称

为“澄清过滤”或“收获物澄清过滤”或“生物负荷减少”)以从收获物中去除细胞碎片和成分,纯化步骤例如阴离子交换色谱以减少总体积并将病毒载体与宿主细胞DNA、蛋白质和培养基成分分离,以及超滤/渗滤步骤以将病毒载体浓缩到最终制剂缓冲液中。在一些实例中,下游步骤还包括无菌过滤步骤,以从最终产品中去除微生物。

[0131] 【核酸内切酶处理】

[0132] 将细胞培养液或经过滤的细胞培养液的核酸内切酶处理添加到下游工艺中。核酸内切酶处理可在收获细胞培养液期间或之后但在阴离子交换色谱之前进行。例如,可将核酸内切酶直接添加到在其中收集收获的细胞培养液的袋子或其他容器中。在另一个实例中,在收集之后但在收获物过滤之前将核酸内切酶添加至细胞培养液。在另一个实例中,在收获物过滤之后但在阴离子交换色谱之前将核酸内切酶添加至细胞培养液。在另一个实例中,在装载阴离子交换色谱柱时将核酸内切酶与细胞培养液排队混合,使得核酸内切酶在进入色谱柱之前或进入色谱柱之后立即接触细胞培养液。

[0133] 在核酸内切酶在装载到阴离子交换色谱柱之前与细胞培养液接触的实施方案中,核酸内切酶可与细胞培养液一起孵育长达约30小时。例如,含有核酸内切酶的细胞培养液可储存约22小时、约6小时、约4小时、约2小时或约1小时。

[0134] 在收获期间或收获物过滤步骤之前将核酸内切酶与细胞培养液接触的实施方案中,任选地不需要额外的孵育步骤,因为孵育有效地发生在将细胞培养液装载到阴离子交换色谱柱之前的中间工艺步骤期间。

[0135] 在一个实例中,在产生包膜病毒后过滤收获的细胞培养液。在收获物过滤之前,将细胞培养液与核酸内切酶接触。发明人发现,在收获物过滤之前将细胞培养液与核酸内切酶接触减少过滤器和后续纯化过程(例如阴离子交换色谱)的堵塞。发明人还发现,将细胞培养液与核酸内切酶接触允许纯化的包膜病毒的无菌过滤,而不会堵塞过滤器。发明人还发现,用核酸内切酶处理细胞培养液不会显著降低纯化的包膜病毒的感染性或总RNA产率。

[0136] 在一个实例中,在收获物过滤(即过滤以去除细胞和细胞碎片)之前,使细胞培养液与内切酶接触。在一个实例中,收获物过滤使用膜过滤进行。例如,收获物过滤使用0.8 μ m过滤器和0.45 μ m过滤器进行,它们可包含在单个单元内。

[0137] 在一个实例中,细胞培养液与核酸内切酶接触约1~4小时。例如,细胞培养液与核酸内切酶接触约1~3小时。在一个实例中,细胞培养液与核酸内切酶接触约1小时。在一些实例中,将核酸内切酶添加到细胞培养基中,并在无任何额外孵育时间的情况下开始收获物过滤。

[0138] 基于本文的公开内容,本领域技术人员将清楚合适的核酸内切酶。在一个实例中,核酸内切酶以序列非特异性方式切割。例如,核酸内切酶将DNA(以及任选地RNA)切割成短寡核苷酸,例如2~10bp长,例如3~7bp长,例如3~5bp长。

[0139] 在一个实例中,核酸内切酶来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、鱼腥藻属的种(*Anabaena* sp.)、啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、家牛(*Bos taurus*)、总状共头霉(*Syncephalostrum racemosum*)和/或博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)。

[0140] 在一个实例中,核酸内切酶是沙雷氏菌核酸酶、NucA、Nuc1和/或核酸内切酶G。

[0141] 核酸内切酶可从所述的来源分离或纯化。或者,核酸内切酶可重组产生。

[0142] 核酸内切酶也可从合适的商业来源获得,这对于本领域技术人员来说是明显的

和/或如本文所述。例如,核酸内切酶可从New England Biolabs, Inc或c-LEcta GmbH获得。

[0143] 在一个实例中,核酸内切酶来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)。这种核酸内切酶也被称为Golden核酸酶。该核酸酶以商品名Benzonase®或Denarase®出售。

[0144] 在一个实例中,该方法涉及调节细胞培养液中的 Mg^{2+} 浓度,以实现高达10mM Mg^{2+} 的浓度。在一个实例中, Mg^{2+} 的浓度被调节至约1~2mM。在一个实例中, Mg^{2+} 的浓度被调节至2mM。在一个实例中,细胞培养液中的 Mg^{2+} 浓度为约0.8mM,并且不进行进一步的调节。

[0145] 在一个实例中,该方法涉及调节细胞培养液的pH为6.0~10.0。在一个实例中,该方法涉及调节细胞培养液的pH为8.0~9.2。

[0146] 在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为0°C~42°C。在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为2°C~8°C。在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为4°C。在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为35°C~40°C。在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为约37°C。在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为18°C~22°C。在一个实例中,在与核酸内切酶接触期间,细胞培养液的温度为20°C。

[0147] 在一个实例中,细胞培养液中二硫苏糖醇(DTT)的浓度为0~100mM。在一个实例中,细胞培养液中2-巯基乙醇的浓度为0~100mM。在一个实例中,细胞培养液中单价阳离子(例如 Na^+ 或 K^+)的浓度为0~150mM。在一个实例中,细胞培养液中单价阳离子(例如 Na^+ 或 K^+)的浓度为0~20mM。在一个实例中,细胞培养液中 PO_4^{3-} 的浓度为0~100mM。在一个实例中,细胞培养液中 PO_4^{3-} 的浓度为0~10mM。

[0148] 在一个实例中,将核酸内切酶以0.001U/mL细胞培养基至100U/mL细胞培养基的浓度加入到培养基中。例如,将核酸内切酶以0.01U/mL细胞培养基至10U/mL细胞培养基的浓度加入到细胞培养基中。例如,将核酸内切酶以0.1U/mL细胞培养基至1U/mL细胞培养基的浓度添加到细胞培养基中。例如,将核酸内切酶以小于0.5U/mL细胞培养基的浓度添加到细胞培养基中。在一个实例中,将核酸内切酶以0.3U/mL细胞培养基的浓度添加到细胞培养基中。

[0149] 在一些实例中,在用核酸内切酶处理之前不调节细胞培养液的pH。

[0150] 在一些实例中,在添加至细胞培养基之前,稀释核酸内切酶。例如,在细胞生长的培养基中稀释核酸内切酶。例如,在DMEM中稀释核酸内切酶。在一个实例中,在不含胎牛血清(FBS)的缓冲液或培养基中稀释核酸内切酶。例如,在包含HEPES的缓冲液中稀释核酸内切酶。

[0151] 在用核酸内切酶处理后,过滤细胞培养液。

[0152] 【阴离子交换纯化】

[0153] 在收获物过滤后,使用阴离子交换纯化包膜病毒。

[0154] 在一个实例中,阴离子交换以结合-洗脱模式进行。在这方面,包膜病毒与阴离子交换剂结合,而污染物流过。随后病毒从阴离子交换剂洗脱。以这种方式进行阴离子交换减少了有病毒悬浮在其中的液体的体积,并去除污染物,例如宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白质和培养基成分如胎牛血清。

[0155] 合适的阴离子交换剂对于本领域技术人员来说是明显的。示例性的阴离子交换剂是包含树脂的柱或膜或另一种合适的基质。

[0156] 在一个实例中,阴离子交换剂是膜阴离子交换剂。

[0157] 在一个实例中,阴离子交换剂是弱阴离子交换剂,例如,包含选自二乙氨基乙基(DEAE)或氨基乙基的离子交换基团。

[0158] 在另一个实例中,阴离子交换剂是强阴离子交换剂,例如,包含选自季铵(Q)、二乙基-2-羟丙基氨基乙基(QAE)、三乙氨基乙基(TEAE)或三甲基氨基乙基的离子交换基团。可用于本公开内容的方法的示例性阴离子交换剂包括 **MUSTANG® E**, **MUSTANG® Q**, **SARTOBIND® Q**, **CHROMASORB®**, **POSSIDYNE®**, **CAPTO® Q**, **QSF F**, **POROS® Q**, **FRACTOGEL® Q**, **NATRIX® Q**。

[0159] 如本文所示例,阴离子交换剂包含Q离子交换基团。

[0160] 如本文所示例,阴离子交换剂是包含Q离子交换基团的膜阴离子交换剂。例如,阴离子交换剂是**MUSTANG® Q**。

[0161] 如本文所讨论,发明人确定细胞培养基或经过滤的细胞培养基中的盐浓度太低而无法进行有效的阴离子交换色谱。例如,发明人鉴定的收获的细胞培养基的盐浓度为约150mM。发明人确定细胞培养基或经过滤的细胞培养基中的300~500mM例如约400mM的最终盐浓度对于装载到阴离子交换色谱柱是理想的。约400mM的盐浓度减少了与阴离子交换剂结合的杂质。为了增加所需的盐浓度,向细胞培养基或经过滤的细胞培养基中添加(或“添加”)盐溶液以产生加盐的细胞培养基。发明人希望避免向细胞培养基或经过滤的细胞培养基添加过大的体积,因此期望使用高浓度盐溶液。然而,他们也认识到向细胞培养基或经过滤的细胞培养基中添加盐导致病毒变得不稳定。图1显示,与低盐条件相比,高盐条件下的收获物稳定性降低。紧接在盐的添加后,滴度下降约20~30%。不受理论的束缚,发明人提示,这种最初的滴度损失可能是由于与高浓度盐溶液混合时局部高盐区域的形成所致。

[0162] 这个问题因难以将细胞培养基或经过滤的细胞培养基与高浓度盐溶液在无需使用更剧烈的混合技术(其会因暴露于高剪切力而使病毒不稳定)的情况下足够快速地混合以避免病毒与高盐浓度的长时间接触而加剧。不均匀或不充分的混合不仅会损害病毒,还会因导致病毒在装载过程中洗脱而阻碍阴离子交换过程本身。

[0163] 典型的混合方法涉及手动处理步骤,并且在商业规模上是耗时的。在商业规模上使用传统方法实现充分混合可能会增加几个小时的工艺时间。

[0164] 发明人针对这些问题的解决方案是在装载到阴离子交换色谱柱上的过程中,以排队工艺使细胞培养基或经过滤的细胞培养基与高浓度盐溶液接触。该方法实现了改进的混合,无需手动处理步骤或增加任何工艺时间,并且可以连续或半连续的方式排队进行,从而简化下游工艺。

[0165] 例如,在装载到阴离子交换色谱柱上的过程中,将高浓度盐溶液和经过滤的细胞培养液或细胞培养基混合以产生加盐的细胞培养基。

[0166] 例如,在将细胞培养基或经过滤的细胞培养基装载到柱上时,将高浓度盐溶液添加至阴离子交换色谱柱。

[0167] 在一个实例中,在装载过程中使细胞培养基或经过滤的细胞培养基与高浓度盐溶液接触涉及将两个流体流(一个包含细胞培养基或经过滤的细胞培养基,另一个包含高浓度盐溶液)一起流入一个流体流中。将流体流流动到一起导致它们混合以产生加盐的细胞培养基,无论是在它们被装载到阴离子交换剂上时,还是紧接在装载到阴离子交换剂上之

前,或者在阴离子交换剂内。无论是在实验室规模还是商业规模上进行,该方法都不会增加大量的工艺时间,因为它是在阴离子交换剂的装载期间排队进行的。

[0168] 在一个实例中,高浓度盐溶液中的盐是一价的或二价的。例如,高浓度盐溶液中的盐是一价的。

[0169] 在一个实例中,高浓度盐溶液中的盐是NaCl或KCl。在本公开内容的示例形式中,高浓度盐溶液中的盐是NaCl。

[0170] 在一个实例中,高浓度盐溶液中的盐的浓度为1M~10M。例如,高浓度盐溶液中的盐的浓度为2M~8M。例如,高浓度盐溶液中的浓度为3M~7M。例如,高浓度盐溶液中的盐的浓度为5M。

[0171] 在一个实例中,高浓度盐溶液为5M NaCl。

[0172] 在一个实例中,加入高浓度盐溶液以使用于装载到阴离子交换色谱柱上的加盐的细胞培养基中的盐的最终浓度达到300mM~500mM。例如,加入高浓度盐溶液以使加盐的细胞培养基达到400mM的盐的最终浓度。

[0173] 在一个实例中,装载后,用包含缓冲液和盐的洗涤溶液洗涤阴离子交换色谱柱。例如,缓冲液为组氨酸、HEPES或Tris。例如,盐为一价盐,例如NaCl。

[0174] 在一个实例中,洗涤溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、150mM NaCl,例如pH7的10mM组氨酸缓冲液、150mM NaCl。在另一个实例中,洗涤溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、150mM NaCl,例如pH8的50mM Tris、150mM NaCl。在另一个实例中,洗涤溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、150mM NaCl,例如pH7.5的10mM HEPES、150mM NaCl。

[0175] 在一个实例中,洗涤溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、750mM NaCl,例如pH7的10mM组氨酸缓冲液、750mM NaCl。在另一个实例中,洗涤溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、750mM NaCl,例如pH8的50mM Tris、750mM NaCl。在另一个实例中,洗涤溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、750mM NaCl,例如pH7.5的10mM HEPES、750mM NaCl。

[0176] 在一个实例中,洗涤溶液的电导率为10mS/cm~20mS/cm。

[0177] 在一个实例中,在装载之后,用包含缓冲液和盐的第一洗涤溶液和包含缓冲液和盐的第二洗涤溶液洗涤阴离子交换色谱柱。例如,缓冲液是组氨酸、HEPES或Tris。例如,盐是一价盐,例如NaCl。

[0178] 在一个实例中,第一和第二洗涤溶液包含相同的缓冲液和相同的盐,但是第二洗涤溶液包含比第一洗涤溶液更高的盐浓度。

[0179] 在一个实例中,所述第二洗涤溶液的电导率为60mS/cm~75mS/cm。

[0180] 在一个实例中,所述第一洗涤溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、150mM NaCl,例如pH7的10mM组氨酸缓冲液和150mM NaCl;所述第二洗涤溶液包含pH6.0~8.0的5~50mM组氨酸、750mM NaCl,例如pH7的10mM组氨酸缓冲液和750mM NaCl。

[0181] 在一个实例中,所述第一洗涤溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、150mM NaCl,例如50mM Tris和150mM NaCl,pH8;并且第二洗涤溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、750mM NaCl,例如50mM Tris和750mM NaCl,pH8。

[0182] 在一个实例中,第一洗涤溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、150mM NaCl,例如pH7.5的10mM HEPES、150mM NaCl;并且第二洗涤溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、750mM NaCl,例如pH7.5的10mM HEPES、750mM NaCl。

[0183] 洗涤之后,该方法可包括洗脱包膜病毒。在一个实例中,用包含缓冲液和盐的溶液洗脱病毒。例如,缓冲液是组氨酸、HEPES或Tris。例如,盐是一价盐,例如NaCl。

[0184] 在一个实例中,第一和第二个洗涤和洗脱溶液包含相同的缓冲液和相同的盐,但是洗脱溶液包含比第一和第二(如果使用)洗涤溶液更高的盐浓度。

[0185] 在一个实例中,洗脱溶液包含pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、1M~2M NaCl,例如10mM组氨酸缓冲液和1200或1500mM NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH7.0~9.0的10~100mM Tris、1M~2M NaCl,例如pH8的50mM Tris和1200或1500mM NaCl。在另一个实例中,洗脱溶液包含pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、1M~2M NaCl,例如pH7.5的10mM HEPES、1200或1500mM NaCl。

[0186] 在一个实例中,洗脱溶液的电导率为110~130mS/cm。

[0187] 在一个实例中,含组氨酸的溶液的pH为7。

[0188] 在一个实例中,含Tris的溶液的pH为8。

[0189] 在一个实例中,含HEPES的溶液的pH为7.5。

[0190] 在一个实例中,阴离子交换色谱包括:

[0191] (i) 用细胞培养液或经过滤的细胞培养液和5M NaCl装载;

[0192] (ii) 用10mM组氨酸和150mM NaCl洗涤;

[0193] (iii) 用10mM组氨酸和750mM NaCl洗涤;和

[0194] (iv) 用10mM组氨酸和1500mM NaCl洗脱。

[0195] 在另一个实例中,阴离子交换色谱包括:

[0196] (i) 用细胞培养液或经过滤的细胞培养液和5M NaCl装载;

[0197] (ii) 用50mM Tris和150mM NaCl洗涤;

[0198] (iii) 用50mM Tris和750mM NaCl洗涤;和

[0199] (iv) 用50mM Tris和1500mM NaCl洗脱。

[0200] 在另一个实例中,阴离子交换色谱包括:

[0201] (i) 用细胞培养液或经过滤的细胞培养液和5M NaCl装载;

[0202] (ii) 用10mM HEPES和150mM NaCl洗涤;

[0203] (iii) 用10mM HEPES和750mM NaCl洗涤;和

[0204] (iv) 用10mM HEPES和1500mM NaCl洗脱。

[0205] 在一个实例中,洗脱后,通过将洗脱液与稀释缓冲液排队混合,或通过直接洗脱到稀释缓冲液中,或通过单独的步骤中洗脱和稀释,稀释所得的洗脱液以降低盐浓度。例如,用包含组氨酸缓冲液(例如,包含10mM L-组氨酸)或Tris(例如,包含50mM Tris)或HEPES(例如,包含10mM HEPES)或由其组成的溶液稀释洗脱液。例如,用包含与用于洗脱病毒的缓冲液相同的缓冲液的溶液稀释洗脱液。例如,如果用1500mM NaCl进行洗脱,则用该溶液以1:10稀释洗脱液;如果用1200mM NaCl进行洗脱,则用该溶液以1:8稀释洗脱液。在一个实例中,用包含pH7.5的10mM HEPES的溶液以1:10稀释洗脱液。

[0206] 在整个说明书中,都提到了阴离子交换色谱法。应该理解的是,本文描述的方法也可应用于其他离子交换色谱法。例如,阳离子交换色谱法可用于在病毒载体流过时结合杂质。本领域的普通技术人员可根据需要容易地修改所公开的方法以适应其他离子交换剂。

[0207] **【附加步骤】**

[0208] 在一个实例中,从阴离子交换柱洗脱的包膜病毒根据其大小进一步纯化。在一个实例中,病毒从阴离子交换柱洗脱到其中的缓冲液几乎同时交换。在本公开内容的过程中,优选切向流过滤。该方法允许几乎同时进行杂质去除和缓冲液交换。

[0209] 切向流超滤/渗滤是一种可用于去除残留蛋白质和核酸以及将工作缓冲液交换为最终制剂缓冲液的方法。优选使用切向流的超滤,并且可使用不同的装置(例如Proflux和LABSCALE(超滤系统)TFF系统,其均为Millipore,或来自Repligen的KR2i系统)。所选的特定超滤膜的过滤孔径将足够小以保留包膜病毒,但足够大以允许杂质渗透。取决于制造商和膜类型,100~1000kDa的标称分子量截留值可能是合适的(例如UFP-750-E-5A,GE Healthcare;BIOMAX.(超滤装置)NMWC 1000,Millipore)。在一个实例中,分子量截留值为500kDa。膜成分可为但不限于再生纤维素、(改性)聚醚砜、聚砜。膜可为平板或中空纤维类型。必须优化的主要参数是流通率和跨膜压力。结合标称分子量截留值,这两个参数将实现高效纯化和缓冲液交换以及高病毒产率。

[0210] 作为附加步骤,可进行无菌过滤以消除生物负荷。因此,来自超滤步骤的稀释的洗脱液或最终截留物可通过过滤器(例如0.22 μ m过滤器)过滤。过滤器可由各种材料制成,这些材料包括但不限于聚丙烯、亲水性PVDF、纤维素、亲水性再生纤维素、纤维素酯、无润湿剂醋酸纤维素、醋酸纤维素、尼龙、亲水性尼龙膜、聚醚砜、亲水性聚醚砜、亲水性不对称PES或任何其他与低非特异性流感病毒结合一致的材料。过滤器可具有单个膜层或多于一个膜层,或者可包含相同或不同材料的预过滤器,例如0.45 μ m预过滤器。无菌过滤的病毒可冷冻保存以供后续操作。

[0211] 在一个实例中,无菌过滤器的过滤面积为至少15cm²。例如,无菌过滤器的过滤面积为约17.8cm²或约20cm²。在一个实例中,无菌过滤器的过滤面积为至少200cm²。例如,无菌过滤器的过滤面积为约210cm²或约220cm²。

[0212] 在一个实例中,无菌过滤器的过滤能力为至少2.5mL/cm²。例如,无菌过滤器的过滤能力为至少4.0mL/cm²。

[0213] 本发明在以下编号的段落中进一步公开:

[0214] 1.一种从细胞培养液或经过滤的细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括在纯化病毒之前使细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触。

[0215] 2.段落1的方法,其中细胞培养液从稳定生产细胞中收获。

[0216] 3.段落1或2的方法,其中核酸内切酶是非特异性核酸内切酶,并且无需序列特异性而降解DNA和RNA。

[0217] 4.段落1~3之任一项的方法,其中核酸内切酶来自粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、鱼腥藻属的种(*Anabaena* sp.)、啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、家牛(*Bos taurus*)、总状共头霉(*Syncephalostrum racemosum*)和/或博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)。

[0218] 5.段落1~4之任一项的方法,其中核酸内切酶是沙雷氏菌核酸酶、NucA、Nuc1、核酸内切酶G、DNase I或微球菌核酸酶。

[0219] 6.段落1~5之任一项的方法,其中核酸内切酶以0.001~100单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

[0220] 7.段落6的方法,其中核酸内切酶以0.01~10单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞

培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

[0221] 8.段落7的方法,其中核酸内切酶以0.1~1单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

[0222] 9.段落8的方法,其中核酸内切酶以约0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

[0223] 10.段落1~9之任一项的方法,其中在下列时间进行纯化:细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约30小时、细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约22小时、细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约6小时、细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约4小时、细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约2小时、细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约1小时、或细胞培养液或经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触后少于约30分钟。

[0224] 11.段落1~10之任一项的方法,其中核酸内切酶以约0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后约1~约2小时进行纯化。

[0225] 12.段落1~10之任一项的方法,其中核酸内切酶以约0.01~0.3单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后大于约2小时进行纯化。

[0226] 13.段落1~10之任一项的方法,其中核酸内切酶以约0.3~10单位/mL细胞培养液或经过滤的细胞培养液的浓度与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触,并在接触后少于约1小时进行纯化。

[0227] 14.段落1~10或13之任一项的方法,其中紧接在纯化之前将核酸内切酶与细胞培养液或经过滤的细胞培养液接触。

[0228] 15.段落1~14之任一项的方法,其中该方法包括对细胞培养液进行收获物过滤以产生经过滤的细胞培养液,然后将经过滤的细胞培养液与核酸内切酶接触。

[0229] 16.段落1~14之任一项的方法,其中该方法包括在将细胞培养液与核酸内切酶接触之后进行收获物过滤以产生经过滤的细胞培养液。

[0230] 17.段落16的方法,其中收获物过滤是在细胞培养液与核酸内切酶接触后立即进行的。

[0231] 18.段落1~17之任一项的方法,其中纯化包括使经过滤的细胞培养液经受阴离子交换色谱法。

[0232] 19.段落18的方法,其中在收获物过滤后使经过滤的细胞培养液立即经受阴离子交换色谱法。

[0233] 20.段落19的方法,其中在装载到阴离子交换色谱分析柱之前或期间,将经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

[0234] 21.一种使用阴离子交换色谱法从经过滤的细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其中在装载到阴离子交换色谱柱之前或期间,将经过滤的细胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

[0235] 22.段落20或21的方法,其中紧接在装载到阴离子交换色谱柱之前使经过滤的细

胞培养液与高浓度盐溶液接触以形成加盐的细胞培养液。

[0236] 23.段落20或22之任一项的方法,其中高浓度盐溶液和经过滤的细胞培养液排队混合。

[0237] 24.段落20~23之任一项的方法,其中高浓度盐溶液包含一价盐和/或二价盐。

[0238] 25.段落24的方法,其中一价盐是氯化钠。

[0239] 26.段落20~25之任一项的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为至少约1M。

[0240] 27.段落20~26之任一项的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约70~99% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约1~30% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0241] 28.段落20~27之任一项的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为约1M。

[0242] 29.段落28的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约70% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约30% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0243] 30.段落20~27之任一项的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为2M。

[0244] 31.段落30的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液的混合比例为约85% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约15% (v/v) 高浓度盐溶液。

[0245] 32.段落20~27之任一项的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为5M。

[0246] 33.段落32的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约94% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约6% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0247] 34.段落20~27之任一项的方法,其中所述高浓度盐溶液的浓度为10M。

[0248] 35.段落34的方法,其中经过滤的细胞培养液和高浓度盐溶液以约97% (v/v) 经过滤的细胞培养液和约3% (v/v) 高浓度盐溶液的比例混合。

[0249] 36.段落20~35之任一项的方法,其中加盐的细胞培养液的盐浓度为300~500mM。

[0250] 37.段落36的方法,其中加盐的细胞培养液的盐浓度为约400mM。

[0251] 38.段落20~37之任一项的方法,其中加盐的细胞培养液在25°C下的目标电导率为35~45mS/cm。

[0252] 39.段落20~38之任一项的方法,其中加盐的细胞培养液在25°C下的目标电导率为36~44mS/cm。

[0253] 40.段落38或39的方法,其中加盐的细胞培养液在25°C下的目标电导率为40mS/cm。

[0254] 41.段落18~40之任一项的方法,其中该方法还包括用一个或多个洗涤步骤洗涤阴离子交换色谱柱。

[0255] 42.段落41的方法,其中该方法包括使用第一洗涤溶液的第一洗涤步骤,所述第一洗涤溶液包含:pH7.0~9.0的10~100mM Tris、150mM NaCl;pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、150mM NaCl;或pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、150mM NaCl。

[0256] 43.段落42的方法,其中第一洗涤溶液包含:pH8的50mM Tris、150mM NaCl;pH7的10mM组氨酸、150mM NaCl;或pH7.5的10mM HEPES、150mM NaCl。

[0257] 44.段落41~43之任一项的方法,其中该包括使用第二洗涤溶液的第二洗涤步骤,所述第二洗涤溶液包含:pH7.0~9.0的10~100mM Tris、750mM NaCl;pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、750mM NaCl;或pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、750mM NaCl。

[0258] 45.段落44的方法,其中第二洗涤溶液包含:pH8的50mM Tris、750mM NaCl;pH7的

10mM Tris、750mM NaCl；或pH7.5的10mM HEPES、750mM NaCl。

[0259] 46.段落18~45之任一项的方法,其中该方法还包括用洗脱溶液从阴离子交换色谱柱洗脱结合的病毒。

[0260] 47.段落46的方法,其中洗脱溶液包含:pH7.0~9.0的10~100mM Tris、1M~2M NaCl;pH5.5~7.4的5~50mM组氨酸、1M~2M NaCl;或pH6.8~8.2的5~50mM HEPES、1M~2M NaCl。

[0261] 48.段落47的方法,其中洗脱溶液包含:pH8的50mM Tris、1.2M或1.5M NaCl;pH7的10mM组氨酸、1.2M或1.5M NaCl;或pH7.5的10mM HEPES、1.2或1.5M NaCl。

[0262] 49.段落46~48之任一项的方法,其中该方法还包括用组氨酸、Tris或HEPES稀释洗脱的病毒。

[0263] 50.段落46~49之任一项的方法,其中该方法还包括对洗脱的病毒或经稀释的洗脱的病毒在室温下孵育长达15分钟或在2~8°C下孵育长达60分钟。

[0264] 51.段落46~50之任一项的方法,其中该方法还包括浓缩和/或渗滤洗脱的病毒或经稀释的洗脱的病毒。

[0265] 52.段落18~51之任一项的方法,其中阴离子交换色谱柱是阴离子交换膜吸附剂。

[0266] 53.段落1~52之任一项的方法,其中该方法使病毒感染滴度产率增加至少10%。

[0267] 54.段落1~53之任一项的方法,其中包膜病毒是逆转录病毒。

[0268] 55.段落54的方法,其中逆转录病毒是慢病毒。

[0269] 56.一种从细胞培养液中纯化包膜病毒的方法,其包括:

[0270] (i) 提供包含由稳定生产细胞系生产的病毒载体的细胞培养液;

[0271] (ii) 使细胞培养液与重组表达的沙雷氏菌核酸内切酶接触;

[0272] (iii) 使核酸内切酶处理的细胞培养液与过滤器接触以产生经过滤的细胞培养液;

[0273] (iv) 将经过滤的细胞培养液和包含5M氯化钠的高浓度盐溶液装载到阴离子交换色谱膜上,其中经过滤的细胞培养液和盐溶液以94% (v/v) 经过滤的细胞培养液和6% (v/v) 高浓度盐溶液的比例装载;

[0274] (v) 用一种或多种洗涤缓冲液洗涤膜;

[0275] (vi) 用包含1.2M或1.5M氯化钠的洗脱缓冲液从膜上洗脱结合的病毒;

[0276] (vii) 用缓冲液稀释洗脱的病毒;以及

[0277] (viii) 浓缩和渗滤洗脱的病毒。

[0278] 57.段落1~56之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积大于约1L、约5L、约10L、约50L、约100L、约500L或约1000L。

[0279] 58.段落1~57之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约5L。

[0280] 59.段落1~57之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约20L。

[0281] 60.段落1~57之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约44L。

[0282] 61.段落1~57之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体

积为约60L。

[0283] 62.段落1~57之任一项的方法,其中细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液的体积为约200L。

[0284] 63.段落18~62之任一项的方法,其中阴离子交换色谱膜的体积为每升细胞培养液和/或经过滤的细胞培养液至少约1mL。

[0285] 64.段落1~63之任一项的方法,其还包括将包膜病毒配制成适合感染细胞的药物制剂或溶液。

[0286] 65.段落1~64之任一项的方法,其中该方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液中的 Mg^{2+} 浓度调节至约1~2mM。

[0287] 66.段落65的方法,其中该方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液中的 Mg^{2+} 浓度调节至约2mM。

[0288] 67.段落1~64之任一项的方法,其中该方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液的pH调节至6.0~10.0。

[0289] 68.段落67的方法,其中该方法还包括将细胞培养液或经过滤的细胞培养液的pH调节至8.0~9.2。

[0290] 69.段落1~64之任一项的方法,其中细胞培养液或经过滤的细胞培养液在与核酸内切酶接触期间的温度为0°C~42°C。

[0291] 70.段落69的方法,其中细胞培养液或经过滤的细胞培养液在与核酸内切酶接触期间的温度为2°C~8°C。

[0292] 71.段落70的方法,其中细胞培养液或经过滤的细胞培养液在与核酸内切酶接触期间的温度为4°C。

[0293] 72.段落1~71之任一项的方法,其中细胞培养液从在贴壁环境中培养的细胞中收获。

[0294] 73.段落1~71之任一项的方法,其中细胞培养液从在悬浮环境中培养的细胞中收获。

[0295] 74.一种通过段落1~73之任一项的方法产生的纯化的包膜病毒。

[0296] 本公开内容在以下非限制性实施例中进一步描述。

【实施例】

[0297] 【实施例1:方法】

[0298] 【细胞培养和慢病毒生产】

[0299] 细胞在“iCELLis Nano”生物反应器中生长。在细胞成功生长四天后,通过更换培养基开始诱导病毒生产。在舍弃第一个收获量后开始持续长达十天的每日收获。在4°C下收集收获物。

[0300] 【收获物澄清过滤】

[0301] 将收获物转移到下游部件后,使用包含两个分别为0.8和0.45 μ m的膜的Sartorius Sartopore 2过滤器进行澄清过滤。此步骤的主要目标是去除细胞和细胞成分/碎片,而不影响慢病毒的功能或损害其传染性。

[0302] 为了研究核酸内切酶处理对下游加工效率的影响,将Benzonase®添加到收获物

中。Benzonase将DNA切割成3~5个碱基对的小片段。在澄清过滤之前,以每升收获物1mL的量添加Benzonase。在此阶段添加核酸内切酶意味着澄清过滤步骤的处理时间用于孵育,而不必增加额外的处理时间。

[0303] Benzonase工作溶液通过将原液在含有10%胎牛血清(FBS)的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)中以1:1000稀释来制备。在澄清过滤步骤之前,对于每升收获物,加入1mL Benzonase工作溶液。

[0304] 收获袋和过滤单元使用内径为8~10mm的管道连接。在开始实际过滤过程之前,通过使用平衡缓冲液以0.5~0.7mL/cm²过滤面积的体积进行的洗涤步骤来平衡膜,然后排干。平衡以及随后进行的过滤均以约150mL/min的流速进行。然后将经过滤的收获物在+4℃下储存最多30小时,或直接处理并在室温下储存不到一小时。

[0305] 【使用Mustang Q阴离子交换膜的纯化步骤】

[0306] 过滤后,使用阴离子交换色谱法捕获病毒。此捕获步骤的作用是减少体积并去除与工艺相关的污染物,例如宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白质和培养基成分(如FBS)。色谱步骤使用ÄktaPure150系统使用Mustang Q阴离子交换膜进行。表1显示了阴离子交换纯化过程中使用的缓冲液。

[0307] 【表1:阴离子交换纯化参数】

步骤	缓冲液	流速 (MV/min)	MV
[0308]	预平衡	10 mM L-组氨酸或 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.0 或 pH 8.0	逐渐增加 (2/4/6/8/10)
	清理	1 M 氢氧化钠	2
	预调节	1 M NaCl, 25 mM HCl	2
	平衡	10 mM L-组氨酸, 150 mM NaCl, pH 7.0	10
[0309]		或 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0 或 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5	
	装载	添加了 7%加 5M NaCl 的溶液的收获物	10
	装载后洗涤	10 mM L-组氨酸 150 mM NaCl, pH 7.0 或 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0 或 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5	10
	洗涤	10 mM L-组氨酸或 10 mM HPES 或 50 mM Tris, 750 mM NaCl, pH 7.0 或 pH 8.0	10
	洗脱	10 mM L-组氨酸 1200 或 1500 mM NaCl, pH 7.0 或 50 mM Tris, 1200 或 1500 mM NaCl pH 8.0 或 10 mM HEPES, 1200 或 1500 mM NaCl, pH 7.5	2

[0310] 在产品应用之前,膜用5MV的平衡缓冲液以10MV/min的流速平衡。在Äkta色谱系统的帮助下,通过内置混合器在经过滤的收获物中添加(排队) 5M NaCl溶液,以达到40mS/

cm的目标电导率,其降低细胞培养基成分的非特异性结合。单独地,在不添加NaCl添加物的情况下进行阴离子交换色谱。然后以10MV/min的流速将收获物施加到膜上。用20MV洗涤缓冲液以10MV/min的流速进行膜洗涤,以去除杂质如宿主细胞DNA。用11MV的高浓度盐缓冲液以2MV/min的流速进行慢病毒洗脱。在一个MV后开始收集洗脱液,并在第6个MV后终止。丢弃剩余的洗脱体积。由于慢病毒在高度浓缩的盐缓冲液中不稳定,因此将洗脱液直接用冷却的(+4°C)稀释缓冲液(其是10mM L-组氨酸或50mM Tris)以1:10稀释。直接洗脱到稀释缓冲液中减少病毒处于高盐浓度的时间。

[0311] 收集的稀释的Mustang Q洗脱液的体积为500mL,并且如果紧接着执行TFF步骤作为第二步骤,则将其储存在冰上,最长保持时间为30分钟。

[0312] **【浓缩和渗滤步骤】**

[0313] 切向流过滤(TFF)允许将稀释的Mustang Q洗脱液浓缩并渗滤到最终配方缓冲液X-VIVO 10中。此步骤使用Repligen KR2i系统执行。

[0314] TFF还允许病毒溶液交换到X-VIVO 10细胞培养基中,以确保病毒可直接添加到目标细胞中而无需稀释生长培养基。

[0315] 使用具有390cm²的过滤面积和500kDa截止值的Repligen中空纤维PS膜。

[0316] 使用TFF平衡缓冲液以2mL/cm²对膜进行平衡。为了浓缩产品,将进料容器中的500mL的稀释的Mustang Q洗脱液连接到辅助泵。以20mL/min的流速启动辅助泵以将进料转移到容器中。调节流速,以使得容器中的体积在浓缩步骤期间保持恒定。为此,将KR2i泵的流速设置为50mL/min,将TMP设置为0.5bar(极限为0.7bar),并打开背压阀。

[0317] 浓缩目标是25~30倍,并且一旦达到16~20mL的截留物体积(包括滞留体积),超滤步骤就停止。

[0318] 为了从膜的截留物侧回收产品,打开背压阀以及渗透物管线。将主泵的流速设置为4mL/min的反向流量,以收集滞留循环量。连接背压阀和储存器的截留物管线在约一分钟后断开以供应空气。此步骤允许通过在膜上施加小的反向TMP来去除粘附在膜上的病毒。

[0319] TFF步骤的目的是使TFF截留物的浓度达到起始材料(收获物)浓度的300~1000倍。TFF截留物用于开发无菌过滤步骤。

[0320] **【无菌过滤研究】**

[0321] 使用Repligen KR2i系统进行无菌过滤步骤。

[0322] **【分析】**

[0323] **【感染滴度测定】**

[0324] 在此测定中,D1B和/或HEK293T细胞被含有载体的样品转导。经过几天的生长期后,用抗人 γ -珠蛋白的抗体对细胞进行染色,以确定以转导单位(TU)/mL测量的样品感染滴度。

[0325] **【ddPCR RNA含量】**

[0326] 该测定使用数字液滴PCR来量化样品中的RNA拷贝数。它测量RNA拷贝的总数。选择引物和探针以确保计数主要全长RNA拷贝。

[0327] **【p24 ELISA】**

[0328] 该ELISA测定测量病毒衣壳蛋白p24浓度。随着额外的下拉步骤的建立,仅检测到与病毒相关的和非游离的p24。从ng/mL的读取值,可计算病毒颗粒的估计值。该测定还检测

空衣壳或带有不完整货物RNA的衣壳。

[0329] **【总DNA】**

[0330] 这种基于荧光的测定检测样品中的所有DNA。

[0331] **【实施例2:结果】**

[0332] **【添加Benzonase改善慢病毒的纯化】**

[0333] 进行了初步可行性研究,以确定TFF截留物的过滤在理论上是否可行。通过Mini Kleenpak EKV过滤器过滤TFF截留物的两种溶液(未处理的和Benzonase处理的)。结果如图2所示。如图所示,Benzonase处理使过滤能力提高了约两倍半,而不影响感染率(101.6% vs. 95.0%)。此外,与未处理的截留物的69.1%相比,Benzonase处理的截留物的RNA产率明显更高,为89.5%。

[0334] Benzonase处理显然有利于成功过滤,并进行了进一步研究。

[0335] 根据其中用Benzonase处理TFF截留物的有希望的结果,进行了其中用Benzonase处理收获物的测试。用Benzonase处理收获物允许通过后续纯化步骤(例如阴离子交换)去除核酸内切酶。为了确定用Benzonase处理收获物的成功,和为了研究对无菌过滤步骤的影响,将此处理结果与可行性研究的结果进行了比较,并在表2中列出。

[0336] **【表2: Benzonase处理的收获物和Benzonase处理的TFF截留物的无菌过滤结果的比较】**

参数	Benzonase 处理的收获物的结果	Benzonase 处理的 TFF 截留物的结果
[0337] 感染滴度产率 [%]	99.6	101.6
RNA 产率 [%]	90.1	89.5
过滤能力 [mL/cm ²]	2.8	3.7

[0338] Benzonase处理的收获物的无菌过滤的感染性和RNA产率与Benzonase处理的TFF截留物的结果相当。但是,使用收获物的Benzonase处理的过滤能力降低了24%。尽管如此,所有后续实验都使用了收获物的Benzonase处理后产生的TFF截留物。

[0339] 如图3所示,向收获物添加Benzonase也对阴离子交换色谱产生积极影响。特别是,在不添加Benzonase的情况下,Mustang Q过滤器变脏或堵塞,从而导致压力增加。进而,这种压力增加导致流速降低并增加工艺时间(延长50% ~ 150%)。更高的压力还增加过滤器或连接器故障的风险,这可能导致需要重新处理或丢弃一批。

[0340] 因此,向收获物添加Benzonase提高Mustang Q过滤器和无菌过滤两者的性能。

[0341] **【提高从阴离子交换色谱的回收率】**

[0342] 图4是总结从扁平器皿(图表左侧)和贴壁生物反应器(图表右侧)收集的收获物的感染滴度(深灰色条)和RNA含量(浅灰色条)的产率的图表。第一行显示来自储存和过滤的产率,第二行显示来自阴离子交换纯化步骤的产率,第三行显示来自TFF步骤的产率。底行显示总产率。如图4所示,下游纯化过程中病毒的最大损失发生在阴离子交换纯化期间,其中观察到43% ~ 63%的回收率。因此,来自此步骤的回收率的任何改善都将大大增加病毒的回收率。

[0343] 测试了几种策略来确定如何提高从阴离子交换色谱法步骤的回收率。其中一种策略是增加收获物中的盐浓度。将盐浓度增加到约400mM会增加病毒与阴离子交换剂的结合,

同时减少污染物(例如宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白质和培养基成分如胎牛血清)的结合。然而,向收获物中添加大量盐是非期望的,因为它们难以混合,并且会增加工艺时间和成本。另一方面,将病毒暴露于高浓度的盐(如直接将盐添加到收获物中时可能发生的情况)会使病毒不稳定并导致回收率降低。为了解决这个问题,发明人将5M NaCl溶液直接添加到阴离子交换柱本身中,而不是与病毒预先混合。这将高盐浓度溶液与病毒的接触时间缩短到几秒钟而不是几分钟。

[0344] 如图5所示,与无NaCl添加的工艺相比,发明人开发的工艺带来约10%的改进。

[0345] 【实施例3:大规模无菌过滤】

[0346] 为了评估无菌过滤步骤的按比例扩大的规模,评估了几种不同的过滤器,包括Supor EKV(Pall,聚丙烯;20cm²)、Sartopore Pt(Sartorius;220cm²、220cm²)、OptiScale Durapore(Merck,亲水性PVDF;17.8cm²)和Sartopore Pt(Sartorius,mPES;210cm²)。

[0347] 如表3所示,Supor EKV 20cm²无菌过滤显示>80%的感染滴度产率,和~80%的RNA产量。相比之下,OptiScale Durapore和Sartopore PT显示约60%的感染滴度产率。进一步的研究表明,在过滤压力迅速增加的情况下20cm²过滤器太小。

[0348] 【表3:使用不同按比例扩大过滤器的无菌过滤结果】

参数	Optiscale Durapore	Sartopore Pt	Supor EKV	
尺寸	17.8cm ²	210cm ²	20cm ²	
[0349] 感染滴度产率 [%]	60.6	60.5	90.9	81.3
RNA 产率 [%]	54.8	74.3	59	79.3
过滤能力 [mL/cm ²]	2.6	(未达到)	4.5	4.5

[0350] 为了解决Supor EKV 20cm²过滤器的过滤压力问题,使用了更大的Sartopore Pt220cm²过滤器。装载量为0.46mL/cm²,未达到220cm²过滤器的过滤能力。使用220cm²过滤器进行无菌过滤在测试的4个子批次中得到了75.4%的平均感染滴度产率和70.0%的RNA产率。

[0351] 在多次运行中以约80%的稳健感染产率实现了无菌过滤步骤到220cm²过滤器的按比例扩大,其中所有子批次均通过了安全测试,未检测到可检测到的微生物生长。

[0352] 【实施例4:5L悬浮收获物的纯化】

[0353] 细胞培养和慢病毒生产按实施例1所述进行,但培养是在5L悬浮生物反应器中进行的。细胞在不含胎牛血清(FBS)的化学成分确定的培养基中生长。

[0354] 收获物澄清过滤按实施例1所述进行,但Benzonase工作溶液通过将原液在平衡缓冲液中1:1000稀释(即每1mL平衡缓冲液1μL Benzonase)来制备,而不是按实施例1所述在含FBS的培养基中稀释。对于每升收获物,在澄清过滤步骤之前,向每升收获物中加入1mL经稀释的Benzonase溶液,以达到0.3U/mL的目标浓度。此外,加入10mL 200mM MgCl₂,以达到2mM Mg²⁺的目标浓度。5L悬浮液运行所用的工艺参数详见表4。

[0355] 【表4:5L悬浮液运行的收获物澄清过滤的工艺参数】

参数	条件
Benzonase	1mL平衡缓冲液中的1μL Benzonase/L收获物
200mM MgCl ₂	10mL/1L收获物
过滤器	Sartorius Sartopore 2G8尺寸-1000cm ²

过滤期间的流速 (ml/min)	167mL/min (=113L/m ² /h)
------------------	-------------------------------------

[0357] 4个生物反应器并行运行,并在第5天和第12天收集和分析收获物。收获物的Benzonase处理不会影响感染滴度产率,其中在7个收获物中,Benzonase处理的经过滤的收获物中达到了86.1%的感染率。

[0358] 过滤后,使用阴离子交换色谱法利用HEPES缓冲液捕获病毒,方法类似于上述实施例1中描述的方法。加入Benzonase后,将收获物孵育50~55分钟,然后装载到阴离子交换色谱膜上。5L悬浮液运行的色谱纯化所用的工艺参数详见表5。所用的膜尺寸是基于每1mL膜体积最多1000mL收获物来确定的。因此,对于高达约860mL的收获物,使用0.86mL Mustang Q膜;对于约860mL~约1.72L的收获物,使用1.72mL Mustang Q膜(或2×0.86mL Mustang Q膜);对于约1.72L~约5L的收获物,使用5mL Mustang Q膜;对于约5L~约10L的收获物,使用10mL Mustang Q膜(或2×5mL Mustang Q膜);对于约10L~约20L的收获,使用2×10mL Mustang Q膜;对于约20L~约60L的收获,使用60mL Mustang Q膜;对于约60L~约120L的收获,使用140mL Mustang Q膜(或2×60mL Mustang Q膜);对于约120L~约140L的收获,使用140mL Mustang Q膜。

[0359] 【表5:阴离子交换色谱的工艺参数】

[0360]	参数	条件
	膜	并行的 2 x 5 mL Mustang Q 阴离子交换膜
	缓冲液	10 mM HEPES, pH7.5 (收获物排队添加 6% 5M NaCl)
	系统	Äkta Pure 150 系统
	稀释	洗脱液: 50 mL 稀释: 450mL 缓冲液

[0361] 将收集的经稀释的Mustang Q洗脱液应用于实施例1中所述的TFF步骤,以浓缩和渗滤经稀释的Mustang Q洗脱液到最终配方缓冲液X-VIVO 10中。TFF步骤所用的工艺参数如表6所述。

[0362] 【表6:TFF的工艺参数】

[0363]	参数	条件
	TFF中空纤维	500kDa, 390cm ² PS Repligen膜
	TFF储容器	50mL
	流速	50mL/min (=158L/m ² /h)
	渗滤介质	X-Vivo10
	浓缩步骤	20/25倍 (目标20mL)

[0364] 7个收获物中Benzonase处理的TF F截留物的感染滴度产率为46.4%。发明人在5L悬浮液运行中获得的结果与上述实施例1和2中获得的结果以及图5中的感染滴度产率相当。

[0365] 【实施例5:从贴壁生物反应器中纯化大规模收获物】

[0366] 细胞培养和慢病毒生产按实施例1所述进行,但培养是在scale-X™碳生物反应器(Univercells Technologies)中进行的。每天收集22L的收获物持续八天。使用表7中详述的工艺参数,按照实施例1中所述的工艺对44L子批次进行收获物澄清过滤(每两天一次)。

[0367] 【表7:大型生物反应器的收获物澄清过滤的工艺参数】

[0368]	参数	条件
	Benzonase	1mL平衡缓冲液中1 μ L Benzonase/L收获物
	200mM MgCl ₂	10mL/1L收获物
	过滤器	Sartorius Sartopore 2G0-4500cm ²
	过滤期间的流速 (ml/min)	750mL/min

[0369] 还按照实施例1中所述使用排队添加6% 5M NaCl的HEPES缓冲液进行阴离子交换色谱纯化,以达到40mS/cm的目标电导率。表8提供了色谱纯化步骤的工艺参数。所用的膜尺寸是基于每1mL膜体积最多1000mL收获物来确定的,如实施例4中所述,因此对于44L的子批次使用60mL Mustang Q膜。

[0370] 【表8:阴离子交换色谱的工艺参数】

[0371]	参数	条件
	膜	60 mL Mustang Q 阴离子交换膜
	结合能力	高达 1000mL 收获物/mL 膜体积
	最大入口压力	3.5 bar
	消毒	1 M 氢氧化钠 流速: 2MV/min
	预调节	1 M NaCl, 25 mM HCl 流速: 2MV/min
	平衡	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5 体积: 20 MV 流速: 5MV/min
	装载	添加了 6%加 5M NaCl 的溶液的收获物 流速 7.5 MV/min 目标电导率: 36~44 mS/cm (在 25℃)
	装载后洗涤	94%泵 A: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.5 6%泵 B: 5 M NaCl 体积 10 MV 流速: 7.5 MV/min
	洗涤	10 mM HEPES, 750 mM NaCl, pH7.5 体积: 25 MV 流速: 7.5 MV/min
	洗脱	10 mM HEPES, 1.5 M NaCl, pH7.5 体积: 20 MV 流速: 2 MV/min 洗脱液收集: 等待 4 MV, 收集 5 MV
[0372]	稀释	洗脱液: 300 mL 稀释液: 2700 mL 10 mM Hepes, pH 7.5
	系统	Äkta pilot 600 mL, 2~8℃

[0373] 将收集的经稀释的Mustang Q洗脱液应用于实施例1中所述的TFF步骤,以浓缩和渗滤经稀释的Mustang Q洗脱液到最终配方缓冲液X-VIVO 10中。TFF步骤使用的工艺参数如下表9所述。

[0374] 【表9:TFF的工艺参数】

[0375]

参数	条件
TFF中空纤维	500kDa, 1000cm ²
TFF储存器	250mL
流速	250mL/min
渗滤介质	X-vivo
浓缩步骤	30/37.5倍 (目标20mL)

[0376] 图6显示了经处理的44L子批次的每个工艺步骤中的感染滴度产率,其中经过滤的收获物中的感染滴度产率为96%,Mustang Q洗脱液中的感染滴度产率为50%,TFF截留物中的感染滴度产率为94%,无菌过滤的子批次中的感染滴度产率为103% (每个工艺步骤N=4个子批次)。

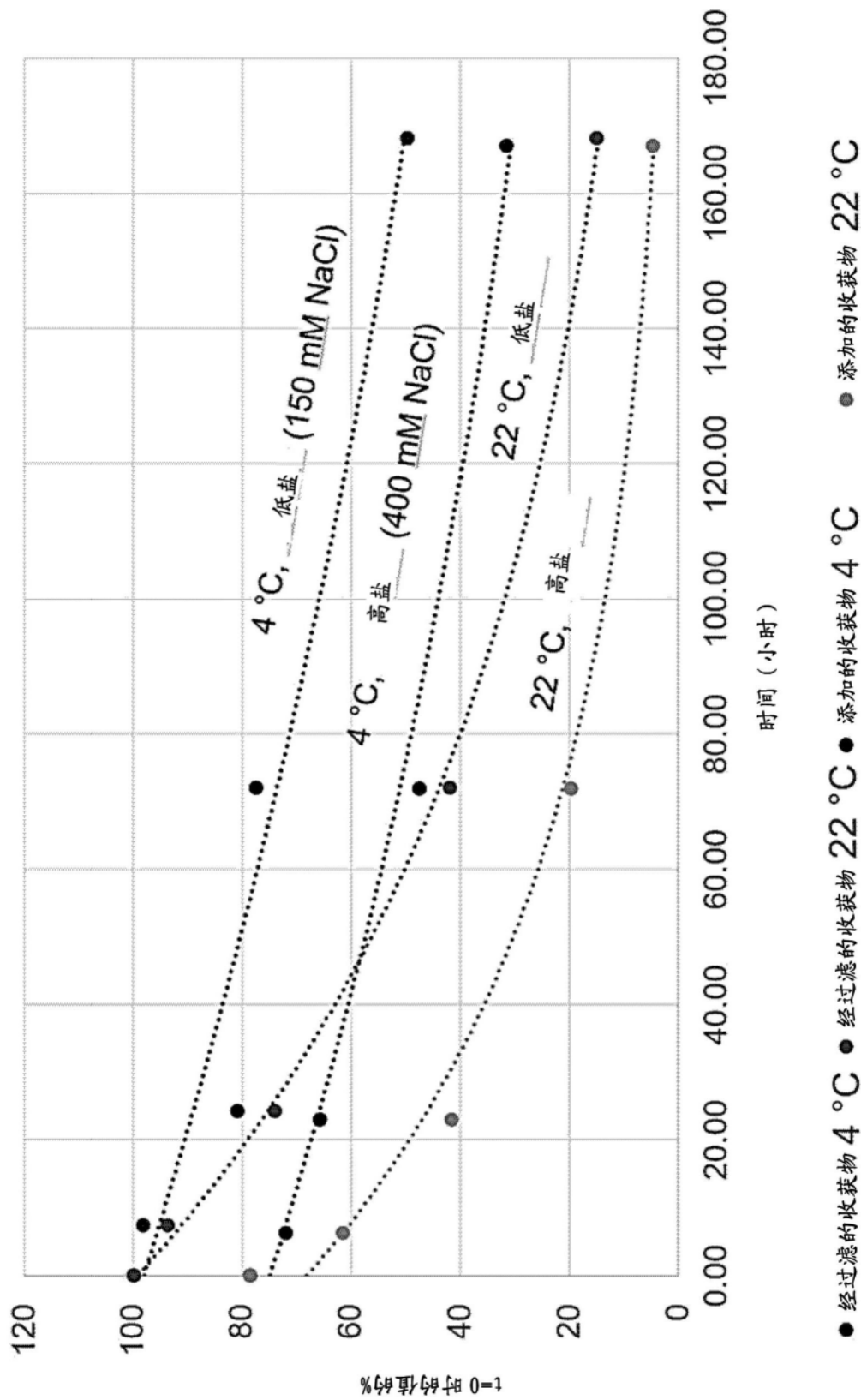


图1

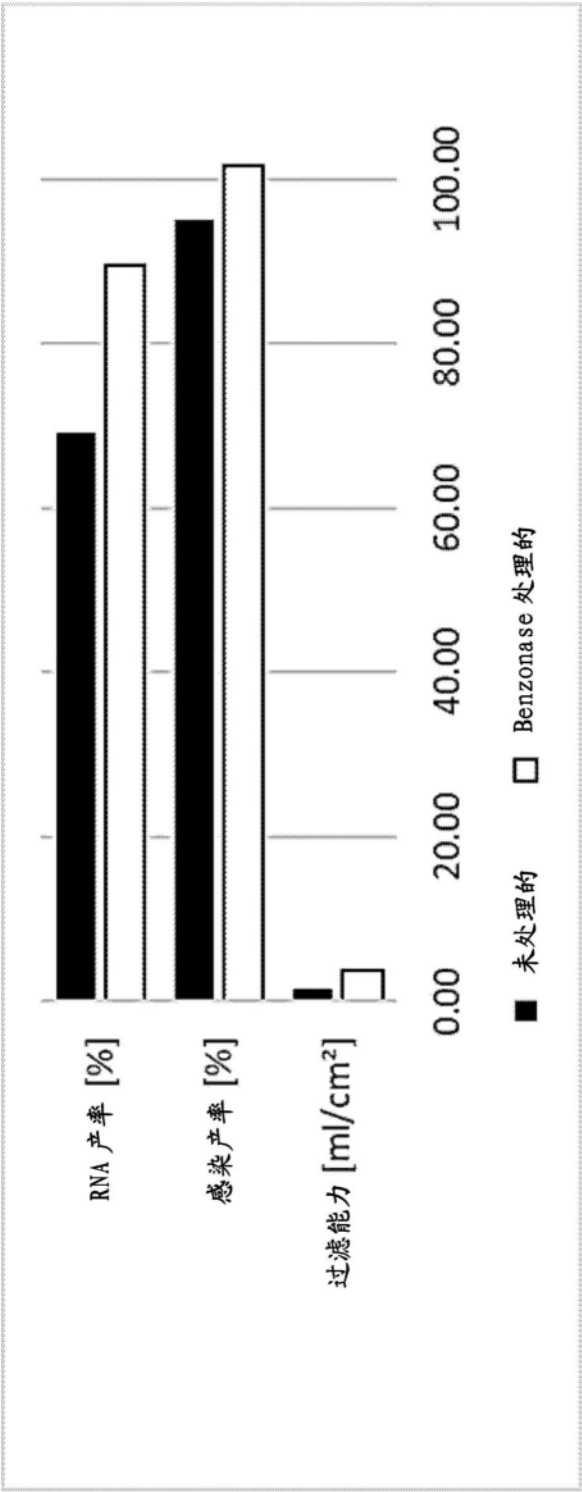


图2

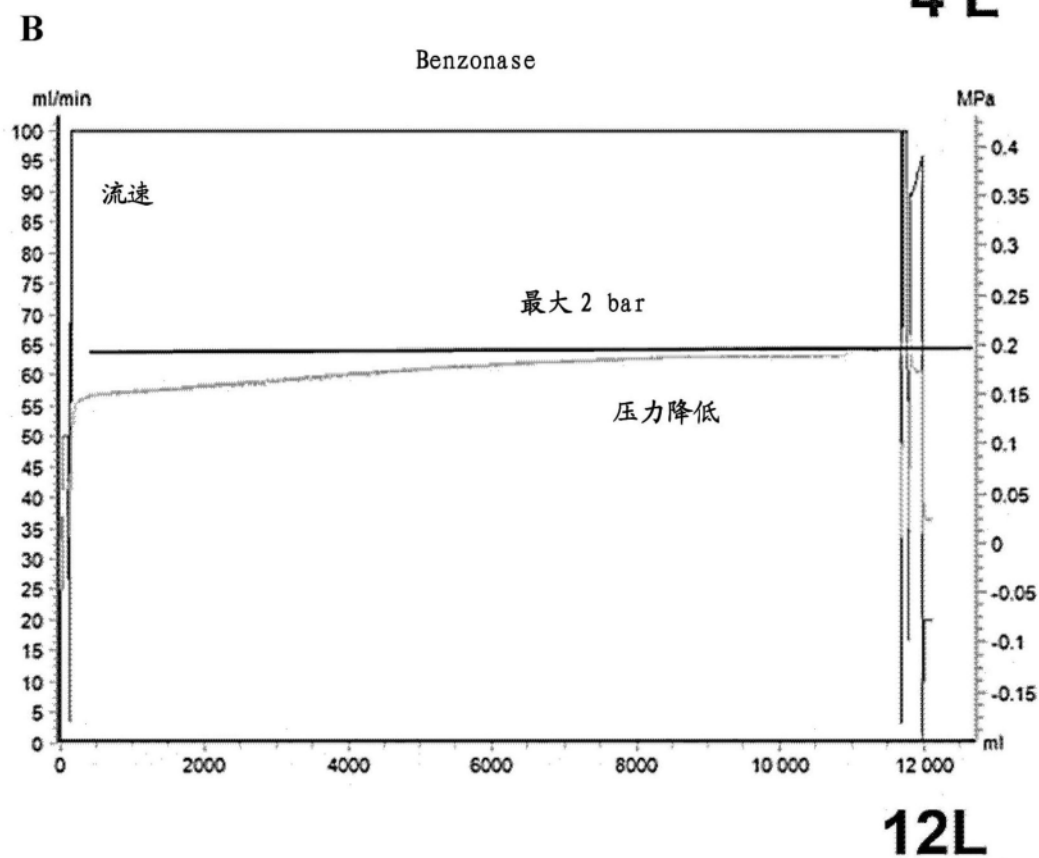
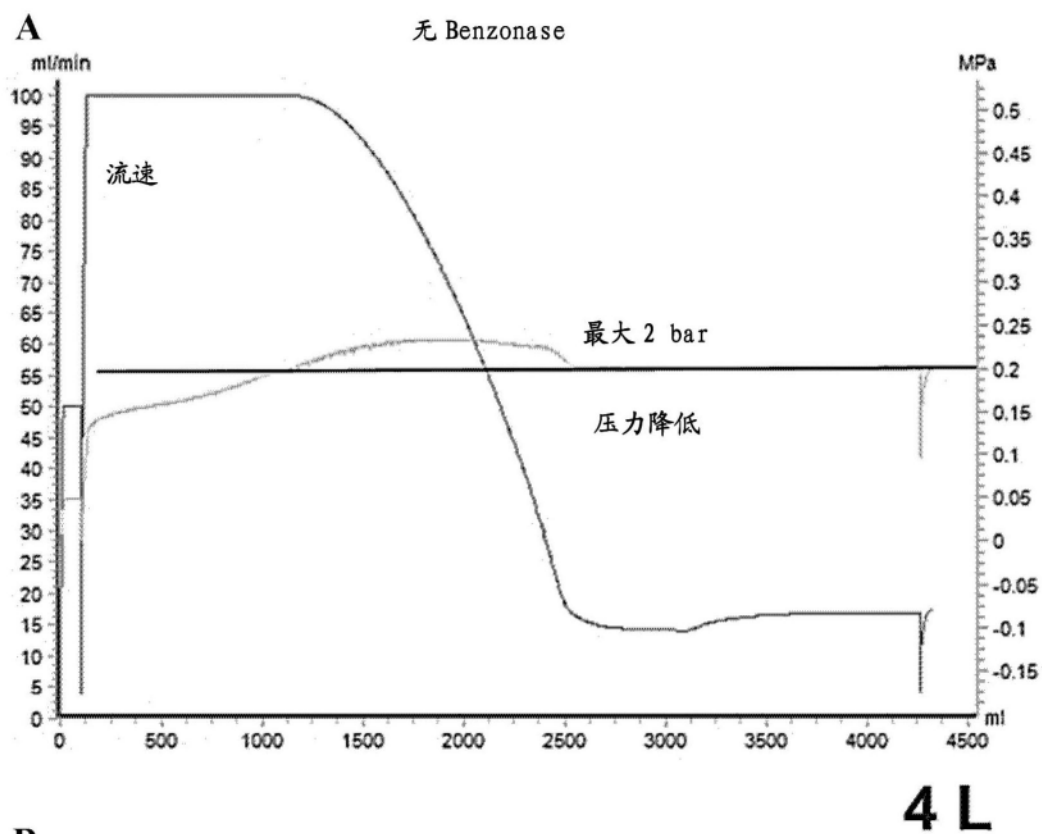


图3

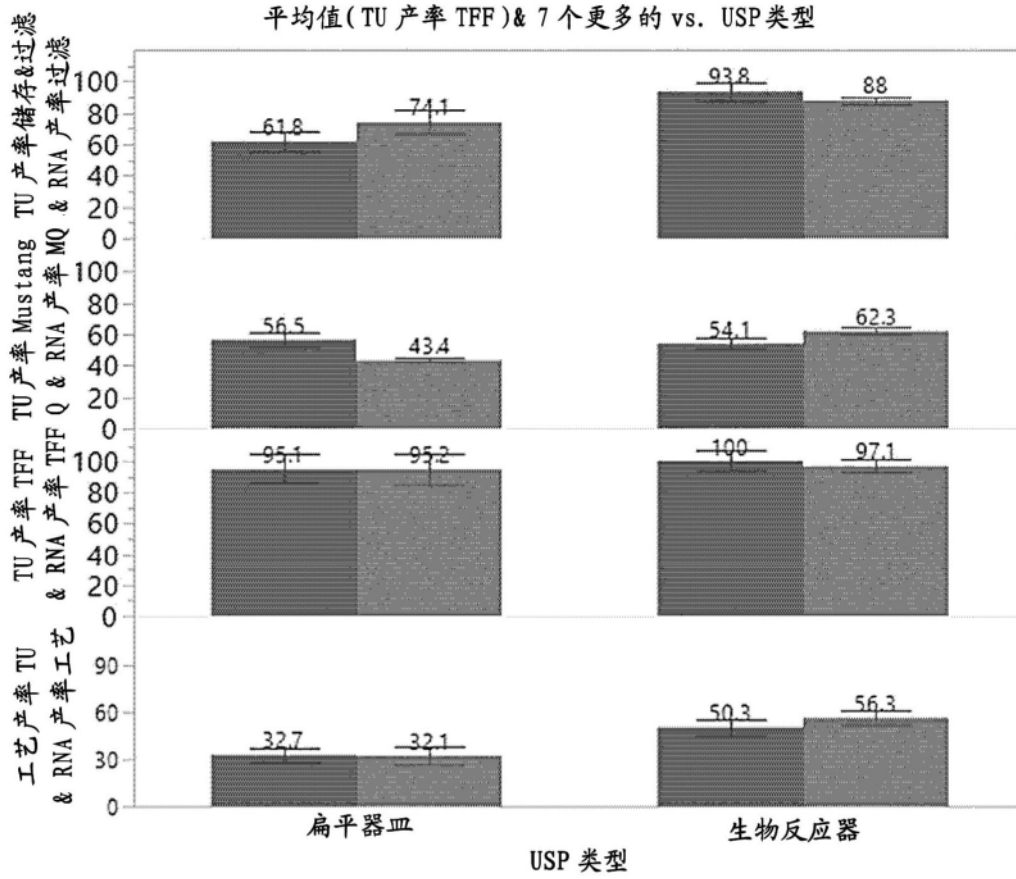


图4

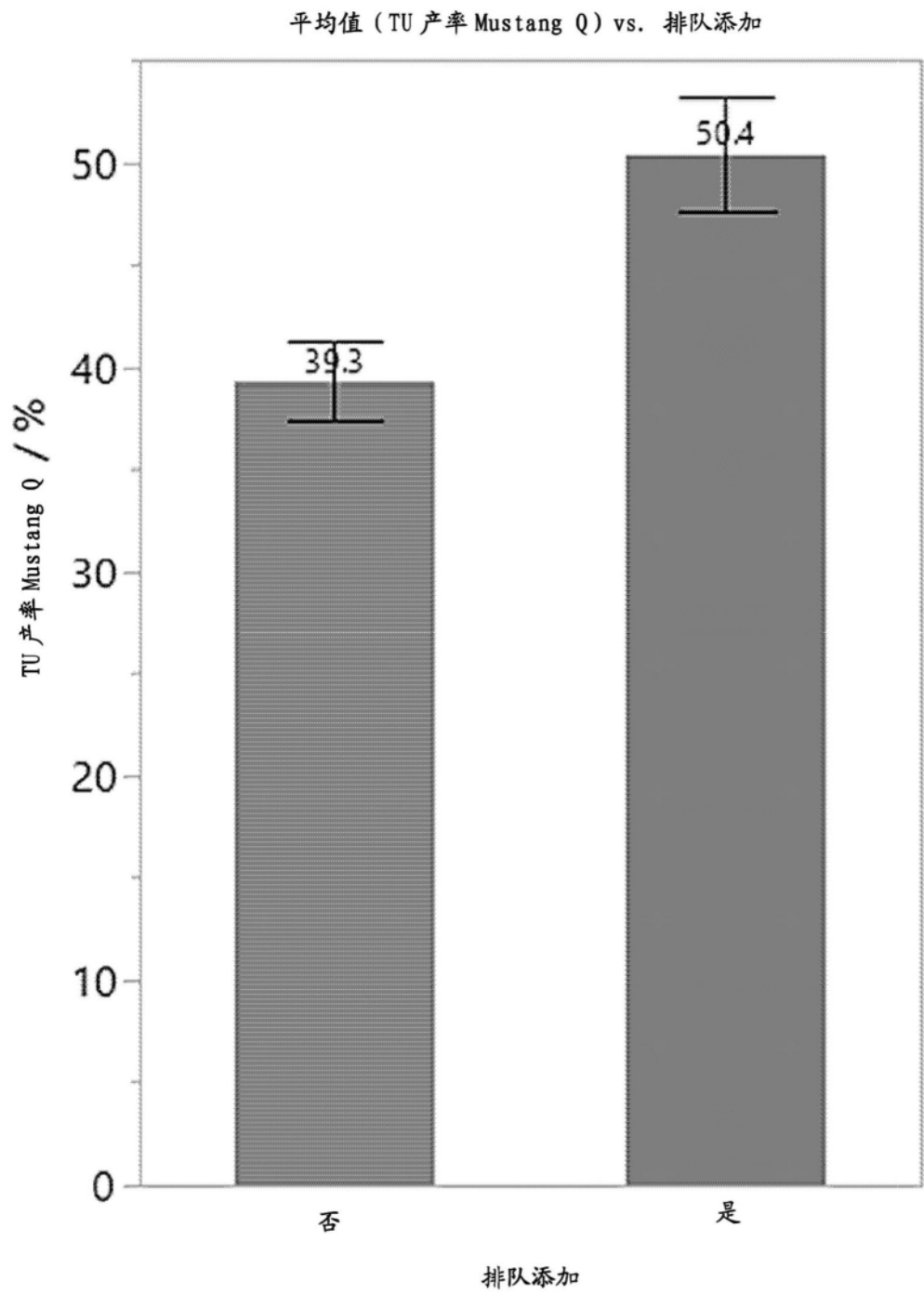


图5

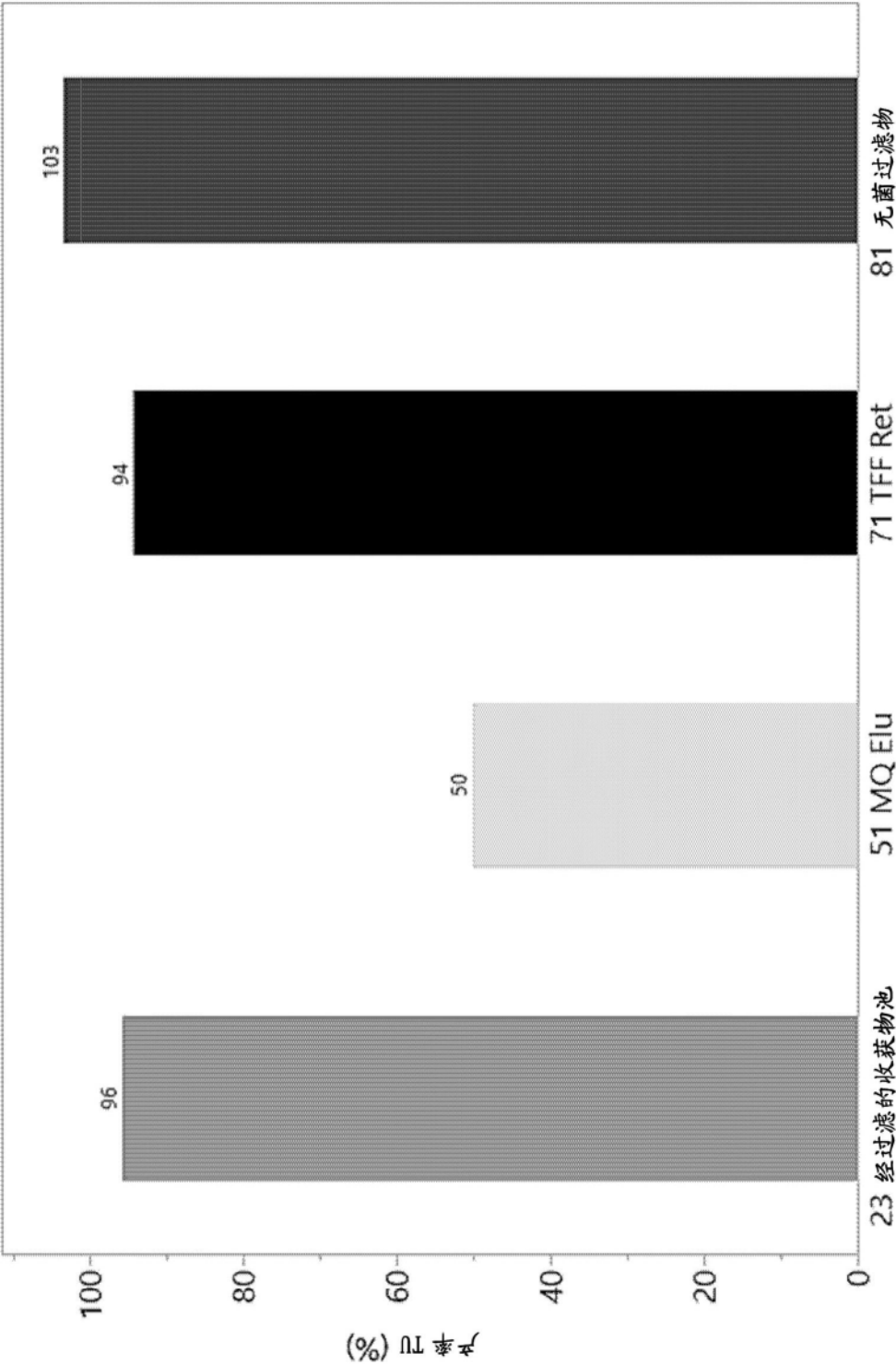


图6