



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102215865 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 200980146845. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 09. 24

A61K 39/155 (2006. 01)

C12N 7/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/099, 749 2008. 09. 24 US

61/104, 933 2008. 10. 13 US

61/122, 456 2008. 12. 15 US

61/187, 721 2009. 06. 17 US

61/222, 131 2009. 07. 01 US

(56) 对比文件

CN 101426905 A, 2009. 05. 06,

US 2006171955 A1, 2006. 08. 03,

CN 101189326 A, 2008. 05. 28,

Lou Ann Downing, Jack M. Bernstein,

Anne Walter. Active respiratory syncytial

virus purified by ion-exchange

chromatography: characterization of binding

and elution requirements. 《Journal of

Virological Methods》. 1992,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/058174 2009. 09. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02010/036774 EN 2010. 04. 01

审查员 李康琦

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 M·汤普森 J·威 A·纳格帕尔

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

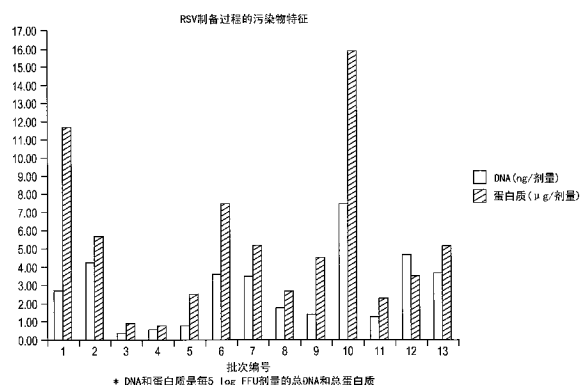
权利要求书1页 说明书91页 附图19页

(54) 发明名称

病毒纯化方法

(57) 摘要

本发明提供从贴壁细胞（例如，MDCK 细胞或非洲绿猴肾细胞株系细胞）纯化细胞相关病毒的方法。具体而言，本发明提供用于包含减毒活细胞相关病毒（例如，减毒的呼吸道合胞病毒（RSV）或冷适应和 / 或温度敏感性流感病毒）的免疫原性组合物生产的纯化方法，其引起宿主细胞 DNA (HCD)、宿主细胞蛋白质 (HCP) 和非特异性内切核酸酶（例如 Benzonase）的水平低于管理机构要求的规格。所述免疫原性组合物可用于主动免疫接种对象或产生用于各种应用包括被动免疫接种和诊断免疫鉴定的抗体。



1. 一种从病毒感染细胞纯化呼吸道合胞病毒的方法,其特征在于,所述方法包括:
 - a) 澄清病毒收获物以形成澄清的病毒收获物,其中澄清包括:
 - i. 采用孔径在约 3 微米到约 10 微米之间的至少一个澄清过滤器通过直流过滤(DF)过滤病毒收获物;
 - ii. 用非特异性内切核酸酶处理病毒收获物;和
 - iii. 采用孔径在约 0.45 微米到约 3 微米之间的至少一个澄清过滤器通过 DFF 过滤病毒收获物;
 - b) 用包含蔗糖、磷酸盐或含盐(NaCl 或 KCl) Tris 的稳定缓冲液稳定澄清的病毒收获物,以形成稳定的病毒收获物;
 - c. 采用分子量截留值(MWC0)为 500kDa 的中空纤维筒通过切向流过滤(TFF)浓缩稳定的病毒收获物并通过渗滤(DF)进行缓冲液交换,以形成浓缩的病毒收获物;
 - d) 采用孔径在约 0.8 微米到约 0.45 微米之间的至少一个澄清过滤器通过 DFF 过滤浓缩的病毒收获物;其中呼吸道合胞病毒从病毒感染细胞纯化,其最终病毒感染性效价为至少 $5.7 \log_{10}$ FFU/mL。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:步骤 c) 后,通过离子交换色谱进行纯化的步骤。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,步骤 (c) 的交换缓冲液包含约 (10-25%w/v) 蔗糖、约 150mM-10mM 磷酸钾和约 175mM-50mM KCl, pH7.0-7.4。
4. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其特征在于,所述呼吸道合胞病毒是 (rA2cp248/404/1030 Δ SH)。
5. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其特征在于,用包含约 150mM-50mM 磷酸钾、约 250mM-175mM 蔗糖和约 175mM-125mM NaCl 或 KCl, pH7.0-7.4 的缓冲液稳定所述病毒收获物。
6. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其特征在于,步骤 (c) 产生 5X 浓缩,且交换至少 5 体积倍数的缓冲液。
7. 如权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其特征在于,所述非特异性核酸酶与病毒收获物接触约 120 分钟到 210 分钟。

病毒纯化方法

[0001] 1. 引言

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求以下美国专利临时申请序列号的优先权：2008 年 9 月 24 日提交的 61/099,749、2008 年 10 月 13 日提交的 61/104,933、2008 年 12 月 15 日提交的 61/122,456、2009 年 6 月 17 日提交的 61/187,721 和 2009 年 7 月 1 日提交的 61/222,131，其内容通过引用全文纳入本文。

[0004] 2. 对在联邦资助研究与开发下作出的发明的权利声明

[0005] 本发明在与作为卫生与公众服务部 (Department of Health and Human Services) 的一个机构的国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 的合作研究和开发协议 (Cooperative Research and Development Agreement) 的实施中形成。美国政府享有本发明的某些权利。

3. 发明领域

[0006] 本发明提供从生物反应器中培养的贴壁细胞纯化细胞相关病毒用于疫苗开发的方法。

[0007] 4. 发明背景

[0008] 接种疫苗是预防由病毒感染引起的疾病的最重要的公共卫生措施。疫苗的有效应用依赖于能够从稳定和易于培养的来源快速产生大量疫苗材料（例如病毒）。疫苗的迅速开发和有丰富的疫苗可用对于抵御多种人类和动物疾病至关重要。疫苗生产的延迟及其产量不足可产生疾病爆发方面的问题。例如，近期的研究显示对产生针对大流行流感的疫苗所需的交付时间长的担忧是有原因的。参见例如，Wood, J. M., 2001, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356 :1953。因此，近期生产疫苗的努力集中于在细胞培养物中培养用于疫苗的病毒。

[0009] 3.1 流感疫苗

[0010] 具体而言，采用马丁-达比狗肾 (MDCK) 细胞已受到多个研究组的推行。参见例如，U. S. 6,455,298、U. S. 2005/0118140、U. S. 2005/0118698、U. S. 6,825,306、W02005/113758 和 Radaeva, I. F. 等 *Vopr. Virusol.* (2005) 50 :43-6。然而，多个现存 MDCK 细胞系具有一种或多种缺陷，包括致瘤性、细胞培养物中需要动物血清以及适用于疫苗的流感病毒产率低。此外，已开发的用于从这些细胞系生产疫苗材料的多种细胞培养方法常需要大量操作，包括培养基交换步骤和使用大量病毒接种。此外，由于不断出现（或重现）不同流感毒株，各季节根据流行的流感毒株产生新的流感疫苗。不幸的是，一些流感疫苗毒株更难以生长达到高产率。各批次细胞培养物衍生材料的产率不仅决定生产能力，还影响制备产物的成本，因此希望提高病毒产率（即峰病毒效价）。

[0011] 近期已开发了可培养疫苗毒株达到非常高效价的新的无血清培养基和非致瘤性细胞系和在一次性生物反应器中生产病毒材料的方法（参见 U. S. 2006/0188977 和 2007 年 9 月 14 日提交的 U. S. S. N. 11/855,769）。本发明拓展了该研究并提供了新的细胞培养基和

在生物反应器中从 MDCK 细胞,具体为非致瘤性细胞系生产大量疫苗材料而不需进行培养基交换的高再现性有效可升级方法,以及高度纯化减毒活疫苗生产的可靠下游纯化方法。本发明提供的方法可靠,需要最小量的操作,并可节约成本。

[0012] 3.2 呼吸道合胞病毒 (RSV)

[0013] 人呼吸道合胞病毒 (RSV) 是造成婴儿和儿童中严重下呼吸道感染 (LRTI) 的主要原因,引起相当大的发病率和死亡率。七个主要市场 (美国、日本、法国、德国、意大利、西班牙、英国) 中每年总共有 1800 万人感染,包括 300 万成人和约 400,000 早产婴儿。仅在美国,每年估计有 70,000-125,000 个住院治疗病例由 RSV LRTI 造成。人群中存在两种抗原性不同的 RSV 亚群 A 和 B。RSV 还被视作免疫应答受损成人和老年人中的重要感染因子。由于天然感染诱导的对 RSV 再感染的抗性不完整,RSV 可在儿童时期和生命期中进行多次感染。RSV 免疫预防的目的是诱导足够的抗性以预防可能与 RSV 感染相关的严重疾病。目前开发 RSV 疫苗的策略主要围绕给予纯化的病毒抗原或开发鼻内给予的减毒活 RSV。然而,迄今为止尚未出现获批准的 RSV 疫苗。

[0014] 病毒基因组 RNA 采用裸 RNA 形式时不具有感染性。RSV 的 RNA 基因组由主要核壳体 (N) 蛋白紧密包壳,与磷蛋白 (P) 和大 (L) 聚合酶亚基相关联。这些蛋白质形成核蛋白核心,被视作感染性的最小单位 (Brown 等,1967, J. Virol. 1 :368-373)。

[0015] 尽管经过数十年的研究,但尚未开发出市售的安全有效的 RSV 疫苗以供预防与 RSV 感染相关的严重发病率和致死率。福尔马林灭活病毒疫苗无法提供针对 RSV 感染的保护作用,并实际上导致婴儿在随后感染野生型病毒期间症状加剧 (Kapikian 等,1969, Am. J. Epidemiol. 89 :405-21 ;Chin 等,1969, Am. J. Epidemiol. 89 :449-63)。自那以后的努力集中在通过重组方法、化学诱变和将野生型 RSV 冷传代为温度敏感性突变体来开发活的减毒突变体 (Gharpure 等,1969, J. Virol. 3 :414-21 ;Crowe 等,1994, Vaccine 12 :691-9)。然而,目前仍难以从病毒的细胞相关蛋白质纯化符合管理指南的减毒活病毒以便用于 RSV 感染的有效预防性治疗。

[0016] 与流感病毒类似,RSV 在稳定细胞系中培养,其中所述病毒与宿主细胞紧密相关联,使得难以在保持感染性最小单位的同时从细胞相关联蛋白质纯化所述病毒。RSV 脆弱 (例如具有剪切敏感性) 更增加了复杂性。所述病毒主要跟宿主细胞相关联和脆弱等因素使得难以从宿主细胞提取物 (例如, DNA 和蛋白质) 纯化所述病毒而产生临床上可接受的包含减毒活病毒的免疫原性组合物。正是部分由于这些原因造成尚未出现市售 RSV 疫苗。因此,需要可用于纯化 RSV 和其它细胞相关病毒的纯化方法以供制备和配制免疫原性组合物。

5. 发明内容

[0017] 本发明提供从在细胞培养物 (例如, Vero 细胞培养物) 中培养的贴壁细胞纯化细胞相关活病毒 (例如 RSV) 产生至少 5% 的病毒总回收率的方法,其中所述纯化病毒在每 $4-6 \log_{10}$ FFU 的病毒中包含少于 100ng 宿主细胞 DNA (HCD)、少于 40 μ g 宿主细胞蛋白质 (HCP) 和少于 0.1ng 非特异性核酸酶。

[0018] 6. 附图简要说明

[0019] 图 1 是培养第 0 天到第 4 天的 4x 2L 生物反应器中活细胞密度 (VCD) 和细胞活力

(V%) 的曲线图。采用表 6 详示的种子反应器 (Seed Reactor) (SR) 工艺条件培养所述生物反应器。未提供 SR 4 的 2dps 数据。

[0020] 图 2 显示对 3x 2L 种子反应器实验 1、3 和 4 在 B2B 胰蛋白酶消化期间在 0-40 分钟之间的中间取样时间所摄的照片 (10X 放大所摄)。生物反应器中的胰蛋白酶消化根据珠粒对珠粒转移方案进行。

[0021] 图 3 是 12x 2L 最终生产反应器 (FPR) 中活细胞密度 (VCD) 和细胞活力 (V%) 的曲线图。在 5dps (约 120hps) 感染实验 3 的生物反应器 (FPR3. X. X), 在 4dps 感染其它实验的生物反应器。未提供实验 4 的感染后 VCD 和细胞活力数据。

[0022] 图 4 显示对所有实验的 12x 2L 最终生产反应器在 4dps 所摄的照片 (放大 100x 所摄)。

[0023] 图 5 显示对所有实验的 9x 2L 最终生产反应器 (FPR) 在 3dps 所摄的照片 (放大 100x 所摄)。

[0024] 图 6 显示对所有实验中起初在 4x2L 种子反应器中培养、然后于感染后在 12x 2L 最终生产反应器 (FPR) 中培养的细胞, 冷适应 (ca) A/Uruguay (A/U)、ca A/South Dakota (A/S) 和 ca B/Florida (B/F) 病毒效价随时间变化的曲线图。注: 各数据点表示三次重复试验的平均值。未记录检测界限以下的病毒效价 ($< 6.4 \log_{10} \text{FFU/mL}$ 或如果稀释, $< 2.4 \log_{10} \text{FFU/mL}$)。

[0025] 图 7 显示采用 67% 培养基交换过程 (67% MX) 相对无培养基交换过程 (0% MX) 产生的毒株的随时间变化的病毒产生曲线。毒株 ca A/Wisconsin/67/05 和 ca A/Uruguay 的曲线图见图 7A 所示, ca A/South Dakota 和 ca B/Florida 的曲线图见图 7B 所示。

[0026] 图 8 显示利用两个洗涤步骤的珠粒对珠粒转移过程的流程图, 所述两个洗涤步骤各采用包含螯合剂 (EDTA) 和终浓度刚达到 0.05X 以便在约 30 分钟内实现细胞脱离的蛋白酶 (TrypLE™) 的缓冲盐溶液 (DPBS)。

[0027] 图 9 显示用于直流过滤 (DFF1) 过滤器器材 (图 A, 上部)、GE 医疗保健公司的 Uniflux 滑道 (skid) 管道器材 (图 A, 下部)、GE 医疗保健公司的 AKTA 过程滑道管道器材 (图 B, 上部) 和直流过滤 2 (DIFF2) 过滤器器材 (图 B, 下部) 的过滤器和管道器材的图。

[0028] 图 10 在图 A 中显示初始纯化方法 1a 连同改进的纯化方法 1b 的示意图。其它改动在图 B 所示的示意图中详示。各方法的细节见实施例 3 和 4 提供。

[0029] 图 11 显示 TFF1 轮次 #8 的流量痕迹曲线。

[0030] 图 12 显示 BPG 100 和 BPG 200 CS 柱压力流特征。

[0031] 图 13 显示轮次 #9 的 CS 柱洗脱色谱。

[0032] 图 14 显示 TFF2 8XDF 方法轮次 #8 的流量痕迹曲线。

[0033] 图 15 显示 10 和 30L 规模的不同生产批次 RSV 的过程步骤效价回收率小结。

[0034] 图 16 显示不同生产批次 RSV 中每 5Log FFU RSV 剂量 (最终纯化药物产物) 的总 DNA 和总蛋白质小结。

[0035] 7. 发明详述

[0036] 本发明提供在生物反应器中从贴壁细胞 (例如, MDCK 细胞, 具体为非致瘤性细胞系或 Vero 细胞) 生产大量病毒 (例如, 流感病毒或 RSV) 或病毒抗原以供预防、诊断、免疫治疗或治疗应用的高再现性有效可升级方法。具体而言, 本发明提供生产达到高效价的冷

适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒流感或呼吸道合胞病毒而不需任何培养基交换的可靠方法。

[0037] 此外,本发明提供支持 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)培养和支持包括但不限于流感病毒(例如,冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒流感病毒)的病毒复制达到高效价而不需任何培养基交换的培养基。

[0038] 此外,本发明还提供从 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)制备疫苗材料(例如流感病毒)的方法,以及利用 MDCK 细胞中产生的疫苗材料预防流感感染的方法。任何细胞相关病毒(例如流感病毒和 RSV)均可通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合中。本文所用的“细胞相关病毒”指根据本领域技术人员已知的任何技术测定发现约 60% 或更多的病毒效价与病毒感染贴壁细胞相关的病毒。本发明的方法特别可用于生产冷适应 / 温度敏感性 / 减毒 (ca/ts/att) 流感毒株(例如 FluMist® 中的毒株)和 RSV(例如, rA2cp248/404/1030 Δ SH)。

[0039] 可在非致瘤性 MDCK 细胞和 / 或 Vero 细胞中生长的病毒包括但不限于负链 RNA 病毒,其包括但不限于:流感病毒、RSV、副流感病毒 1、2 和 3 以及人肺炎后病毒 (metapneumovirus); 以及其它病毒,包括 DNA 病毒,逆转录病毒,正链 RNA 病毒,负链 RNA 病毒,双链 RNA 病毒,包括但不限于:乳多孔病毒、水泡性口炎病毒、牛痘病毒、柯萨奇病毒、呼肠孤病毒、微小病毒、腺病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、狂犬病毒和疱疹病毒。

[0040] 7.1 定义

[0041] 本文所用的致瘤性具有本领域技术人员赋予该术语的一般含义。在一个实施方式中,致瘤性由成年裸鼠模型确定(例如,Stiles 等,1976, Cancer Res, 36 :1353 和以下实施例 5)。致瘤性也可通过其它试验,例如通过向鸡胚注射和 / 或向尿囊绒膜局部施用进行测试 (Leighton 等,1970, Cancer, 26 :1024)。

[0042] 术语“重组”表示通过人为干涉人工或合成(非天然)地改变所述材料(例如,核酸或蛋白质)。所述改变可在其天然环境或状态中或从其天然环境或状态取出的材料上进行。具体而言,在提到病毒例如流感病毒时,在所述病毒通过重组核酸表达产生时,其即为重组的。重组病毒还可将一个或多个突变引入基因组。在重组病毒包含来自多于一种的亲本病毒毒株的组分时,其也可以是重配病毒。

[0043] 指病毒时,术语“重配株”表示所述病毒包括来自多于一种亲本病毒毒株或来源的遗传和 / 或多肽组分。例如,7 : 1 重配株包括 7 个来自第一亲本病毒的病毒基因组区段(或基因区段)和 1 个来自第二亲本病毒的,例如编码血凝素或神经氨酸酶的互补病毒基因组区段。6 : 2 重配株包括 6 个来自第一亲本病毒的基因组区段,通常为 6 个内部基因,以及 2 个来自不同亲本病毒的互补区段,例如血凝素和神经氨酸酶。

[0044] 除非另外说明,本文所用的术语“约”指不超过该术语修饰数值上下 10% 的数值。例如,术语“约 5 μ g/kg”指 4.5 μ g/kg 到 5.5 μ g/kg 的范围。再例如,“约 1 小时”指 54 分钟到 66 分钟的范围。

[0045] 术语“温度敏感性”、“冷适应”和“减毒”为本领域熟知。例如,术语“温度敏感性”(“ts”)表示,就流感毒株 A 而言,所述病毒在较高温度例如 39℃ 下,相对较低温度例如 33℃ 显示效价降低 100 倍或更多,就流感毒株 B 而言,所述病毒在较高温度例如 37℃ 下相对较低温度例如 33℃ 显示效价降低 100 倍或更多。例如,术语“冷适应”(“ca”)表示

所述病毒在较低温度例如 25℃ 的生长速率比其在较高温度例如 33℃ 的生长速率高 100 倍以内。例如,术语“减毒”(“att”)表示所述病毒在白鼯的上呼吸道复制但在肺组织中却检测不到,且并不在动物中引起流感样疾病。应理解,具有中间表型的病毒,即显示效价在 39℃ (A 株病毒)或 37℃ (B 株病毒)降低小于 100 倍、显示在 25℃ 的生长比其在 33℃ 的生长高 100 倍以上(例如,200 倍以内、500 倍、1000 倍、小于 10,000 倍)和/或肺部生长相对在白鼯上呼吸道的生长降低(即部分减毒)和/或动物中流感样疾病减少的病毒,也是本发明所包括的可用病毒。生长表示由效价、蚀斑大小或形态学特征、颗粒密度或本领域技术人员已知的其它度量表示的病毒量。

[0046] 7.2 细胞

[0047] 本文所述的细胞相关病毒可在能使所述病毒生长到允许收获、回收和使用病毒的效价的任何贴壁细胞中增殖。在一个实施方式中,所述贴壁细胞能使细胞相关病毒生长达到与从相应野生型病毒测定的相当的效价。在一个具体实施方式中,本文所述细胞相关病毒在易受所述病毒感染的细胞中增殖。

[0048] 在一个实施方式中,本文所述细胞相关病毒在哺乳动物细胞中增殖。本文所述细胞相关病毒可于其中增殖的代表性哺乳动物细胞包括但不限于 Vero 细胞、CHO 细胞、Hep-2 细胞、MBCK 细胞、MDCK 细胞、MRC-5 细胞、HeLa 细胞和 LLC-MK2 细胞。在一个具体实施方式中,包括呼吸道合胞病毒的本文所述细胞相关病毒在 Vero 细胞中增殖。在另一个具体实施方式中,包括流感病毒的细胞相关病毒在 MDCK 细胞中增殖。

[0049] 6.2.1 MDCK 细胞

[0050] 已知 MDCK 细胞支持包括但不限于各种病毒的大量病毒的分离和复制,所述各种病毒包括但不限于正粘病毒、副粘病毒、弹状病毒和黄病毒(flavovirus)。具体而言,MDCK 细胞广泛用于生产流感病毒。然而,如上所述,一些 MDCK 细胞系具有致瘤性。如果致瘤性是管理当局关心的问题,本发明提供增殖非致瘤性 MDCK 细胞的方法和将其用于生产流感病毒的应用。因此,在一个实施方式中,本发明的方法利用非致瘤性 MDCK 细胞。在另一个实施方式中,本发明的方法利用 MDCK 细胞,而不考虑致瘤性。

[0051] 可用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞系包括但不限于 2005 年 1 月 5 日保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道 10801(10801 University Boulevard, Manassas, Va.), 20110-2209), ATCC 保藏号为 PTA-6500 和 PTA-6503(分别表示 MDCK-S 和 MDCK-SF 103)的细胞系,以及 2006 年 10 月 5 日保藏的 ATCC 保藏号为 PTA-7909 和 PTA-7910(分别表示亚克隆 1-A 和 1-B)的细胞系。

[0052] 可利用的其它 MDCK 细胞包括但不限于保藏于美国典型培养物保藏中心的 ATCC 保藏号为 PTA-6501 和 PTA-6502(分别表示 MDCK-SF101 和 MDCK-SF102)的细胞, ATCC 保藏号为 CRL-12042(表示 MDCK. 5F1)的细胞和 ATCC 保藏号为 ATCC CCL34、CRL-2286 和 CRL-2285 的细胞。

[0053] 在一个具体实施方式中,用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞在成年裸鼠模型中具有非致瘤性(参见 Stiles 等)。在另一个具体实施方式中,用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞在注射到鸡胚和/或局部施用于尿囊绒膜时具有非致瘤性(参见 Leighton 等)。在另一个实施方式中,用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞在成年裸鼠模型中具有非致瘤性但在注射到鸡胚和/或局部施用于尿囊绒膜时则并非如此。在另一个实施方式

中,用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞在成年裸鼠模型中以及在注射到鸡胚和 / 或局部施用于尿囊绒膜时具有非致瘤性。在另一个实施方式中,用于本发明的非致瘤性 MDCK 细胞在至少 20 次传代后、至少 30 次传代后、至少 40 次传代后、至少 50 次传代后、至少 60 次传代后、至少 70 次传代后、至少 80 次传代后、至少 90 次传代后或至少 100 次传代后具有非致瘤性。在其它实施方式中,用于本发明的非致瘤性 MDCK 细胞在本发明的无血清培养基(例如, MediV SFM 105+TE、MediV SFM 109 和 MediV SFM 110) 中进行至少 20 次传代后、至少 30 次传代后、至少 40 次传代后、至少 50 次传代后、至少 60 次传代后、至少 70 次传代后、至少 80 次传代后、至少 90 次传代后或至少 100 次传代后具有非致瘤性。

[0054] 致瘤性可通过本领域技术人员已知的大量方法定量分析。常用的一种方法是测定“TD₅₀”值,其定义为在 50% 测试动物中诱导肿瘤所需的细胞数量(参见例如, Hill R. “用于肿瘤细胞的 TD₅₀ 鉴定 (The TD₅₀ assay for tumor cells)” 刊于《细胞克隆 (Cell clones)》, Potten C, Hendry J, 编, 伦敦: 丘吉尔 - 列温斯顿出版社 (London: Churchill Livingstone), 1985. 第 223 页)。在一个实施方式中,用于本发明的非致瘤性 MDCK 细胞的 TD₅₀ 值在约 10¹⁰ 到约 10¹ 之间,或在约 10⁸ 到约 10³ 之间,或在约 10⁷ 到约 10⁴ 之间。在一个具体实施方式中,用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞的 TD₅₀ 值大于约 10¹⁰、大于约 10⁹、大于约 10⁸、大于约 10⁷、大于约 10⁶、大于约 10⁵、大于约 10⁴、大于约 10³、大于约 10² 或大于约 10¹。在一个具体实施方式中,用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞的 TD₅₀ 值为 10⁷ 或更大。

[0055] 还考虑到用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞也具有非致癌性。确定细胞是否具有致癌性的方法通常包括将细胞裂解物和 / 或 DNA 接种到新生啮齿类动物中并评价随时时间进行的任何肿瘤形成(参见例如, Nowinski 和 Hays, 1978, J. Virol., 27:13-8; Peeper 等, 2002, Nat Cell Biol., 4:148-53; 联邦法规条文 (Code of Federal Regulation) (CFR), “致癌性”, 第 40 项, 第 8 卷, 第 1 章, 第 798.330 部分, 第 160-164 页)。例如,将来自至少 10⁷ 个细胞等效物的细胞裂解物和 / 或 DNA 注射到通常小于 4 天龄的新生啮齿动物(例如, 仓鼠、裸小鼠、大鼠) 中,然后对其监测最长达 5 个月或更长。致癌性试验通过商业测试公司(例如, B-R 公司 (BioReliance), 参见方案 #001031 和 #001030) 以常规方式进行。在一个实施方式中,来自至少 10⁵、至少 10⁶ 或至少 10⁷ 个用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞的细胞裂解物和 / 或 DNA 在注射到新生啮齿动物中时在 2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月或更长时间内不诱导肿瘤形成。在另一个实施方式中,来自用于本发明方法的非致瘤性 MDCK 细胞的 0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.10mg 或更多 DNA 在注射到新生啮齿动物中时在 2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月或更长时间内不诱导肿瘤形成。

[0056] 考虑到用于本发明方法的 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞) 支持包括但不限于正粘病毒(包括甲型和 / 或乙型流感毒株)、副粘病毒(包括 RSV A 和 / 或 B、人肺炎后病毒和副流感病毒 1、2 和 / 或 3)、弹状病毒和黄病毒的病毒复制。

[0057] 在一个具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞) 支持冷适应、温度敏感性、减毒流感病毒如 FluMist® (Belshe 等, 1998, N Engl J Med 338: 1405; Nichol 等, 1999, JAMA 282:137; Jackson 等, 1999, Vaccine, 17:1905) 中发现的病毒和 / 或包含这些病毒骨架(例如, 其余基因区段) 或包含具有冷适应、减毒和温度敏感性特

征中一种或多种的流感病毒的骨架（例如一种或多种 vRNA 区段）的重配病毒的复制。

[0058] 细胞支持病毒复制的能力的一个指示是获自感染细胞培养物的感染病毒的产率。病毒产率可通过设计用来测定病毒感染和 / 或生长的大量试验来确定。例如,病毒产率可通过根据测定感染病毒体的中值组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 试验和检测细胞培养物单层中感染细胞内病毒抗原的荧光聚焦试验 (FFA) 方法确定样品中存在的病毒浓度来定量分析。TCID₅₀ 值常以 log₁₀ TCID₅₀/mL 形式报道, FFA 值常以 log₁₀ FFU/mL (荧光聚焦单位 / mL) 形式报道。可用于生产流感病毒的方法包括但不限于专利公开 WO 08/105931 中公开的方法 (具体参见实施例 12)。

[0059] 在一个具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞 (例如非致瘤性 MDCK 细胞) 支持流感病毒 (例如 ca/ts 毒株) 复制达到的 log₁₀ TCID₅₀/mL 和 / 或 log₁₀ FFU/mL 为至少约 7.6、至少约 7.8、至少约 8.0、至少约 8.2、至少约 8.4、至少约 8.6、至少约 8.8、至少约 9.0、至少约 9.2、至少约 9.4、至少约 9.6、至少约 9.8、至少约 10.0。在另一个具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞支持流感病毒 (例如 ca/ts 毒株) 复制达到的 log₁₀TCID₅₀/mL 和 / 或 log₁₀ FFU/mL 为至少约 7.6、至少 7.8、至少 8.0、至少 8.2、至少 8.4、至少 8.6、至少 8.8、至少 9.0、至少 9.2、至少 9.4、至少 9.6、至少 9.8、至少 10.0。在某些具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞具有非致瘤性。

[0060] 疫苗和相关生物产品顾问委员会 (Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee) 每年向生物制品评估和研究中心 (Centers for Biologics Evaluation and Research) (CBER) 或世界卫生组织 (WHO) 和欧洲药品评估机构 (European Medicines Evaluation Agency) (EMA) 推荐用于制备用于年度疫苗接种以抵御流行性流感的疫苗毒株的野生型流感病毒,并由 FDA 或疾病控制和预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) 将其提供给制造商。然后可将这些毒株用于生产重配疫苗毒株,其通常将野生型病毒的 NA 和 / 或 HA 基因与来自具有某些所需特征的供体病毒 (常称为主供体病毒或 MDV) 的其余基因区段结合。例如,MDV 毒株可为冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒毒株,和 / 或具有高生长速率。以下紧接着的实施方式涉及冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒形式的不同流感毒株 (例如,由一个或多个卫生组织推荐的野生型毒株)。这样的冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒流感毒株可通过获得包含来自感兴趣毒株的 HA 和 NA 基因区段以及来自合适的冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒流感毒株如在 FluMist® 中发现的冷适应、温度敏感性、减毒流感病毒 (ca A/Ann Arbor/6/60 and ca B/Ann Arbor/1/66) 的其余基因区段 (本文也称为“冷适应温度敏感性减毒骨架”) 的重组和 / 或重配流感病毒来制备。本文所用的重组和 / 或重配病毒包含来自野生型流感病毒毒株的 HA 和 NA 基因区段和来自冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒流感病毒的其余基因区段。也通过野生型毒株名称前的一个或多个标识“ca”、“att”、“ts”指代重配和 / 或重组病毒,例如,包含来自 A/New Caledonia/20/99 的 HA 和 NA 基因区段和来自冷适应温度敏感性减毒流感病毒 (例如 /Ann Arbor/6/60) 的其余区段的重组和 / 或重配病毒可简单称为“ca A/New Caledonia/20/99”。

[0061] 在某些实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞 (例如非致瘤性 MDCK 细胞) 支持每年由包括但不限于 CBER、WHO、EMA、FDA 和 CDC 的一个或多个卫生组织推荐和 / 或提供的冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒形式 (例如重配) 的至少一种流感毒株 (例如,

甲型流感毒株、乙型流感毒株)复制达到的 $\log_{10}$ TCID₅₀/mL 和 / 或 $\log_{10}$ FFU/mL 为至少约 7.6、至少约 7.8、至少约 8.0、至少约 8.2、至少约 8.4、至少约 8.6、至少约 8.8、至少约 9.0、至少约 9.2、至少约 9.4、至少约 9.6、至少约 9.8、至少约 10.0。在另一个具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)支持每年由包括但不限于 CBER、WHO、EMEA、FDA 和 CDC 的一个或多个卫生组织推荐和 / 或提供的冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒形式(例如重配)的至少一种流感毒株(例如,甲型流感毒株、乙型流感毒株)复制达到的 $\log_{10}$ TCID₅₀/mL 和 / 或 $\log_{10}$ FFU/mL 为至少约 7.6、至少约 7.8、至少约 8.0、至少约 8.2、至少约 8.4、至少约 8.6、至少约 8.8、至少约 9.0、至少约 9.2、至少约 9.4、至少约 9.6、至少约 9.8、至少约 10.0。在某些具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞具有非致瘤性。

[0062] 在某些其它实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)支持冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒形式的至少一种甲型流感毒株的复制。考虑到所述甲型流感毒株可属于任何亚型(例如, H₁N₁、H₃N₂、H₇N₇、H₅N₁、H₉N₂、H₁N₂、H₂N₂)。目前在甲型流感病毒中已鉴定出至少 16 种不同的 HA 亚型和 9 种不同的 NA 亚型。因此,所述甲型流感毒株可包含目前已知或将来鉴定的 HA 和 NA 亚型的任何组合,和 / 或可为重配株。在某些具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞具有非致瘤性。

[0063] 在某些其它实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)支持冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒形式的至少一种乙型流感毒株的复制。目前未根据血凝素和神经氨酸酶蛋白将乙型流感病毒分为亚型,而是通过谱系进行分类。目前将乙型流感病毒毒株分为 B/Yamagata 和 B/Victoria 两个谱系,它们具有大量亚谱系。因此,所述乙型流感毒株可来自目前已知或将来鉴定的任何谱系和 / 或亚谱系,和 / 或可以是重配株。在某些具体实施方式中,用于本发明方法的 MDCK 细胞具有非致瘤性。

[0064] 6.3 细胞培养基和培养方法

[0065] 本发明提供在生物反应器,包括单用途生物反应器和标准可重复使用生物反应器(例如,不锈钢和玻璃容器生物反应器)中生产大量疫苗材料的无血清细胞培养基和高再现性有效可升级方法。具体而言,本发明提供使流感病毒(例如,冷适应和 / 或稳定敏感性和 / 或减毒的)复制达到高效价的方法,例如 $\log_{10}$ TCID₅₀/mL 和 / 或 $\log_{10}$ FFU/mL 至少约 7.4、至少约 7.6、至少约 7.8、至少约 8.0、至少约 9.0 或至少约 10.0。在一个方面,本发明提供富集无血清细胞培养基,其支持 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)增殖达到高细胞密度并不需培养基交换步骤以获得高病毒效价。除去培养基交换步骤提供若干优点,如过程时间和培养基使用量减少。此外,其减少制备过程中所需的操作数量,从而降低污染可能性。在另一个方面,本发明提供在微载体上增殖非致瘤性细胞的改进方法,包括珠粒对珠粒转移方法。在另一个方面,本发明的富集无血清细胞培养基保持非致瘤性 MDCK 细胞的非致瘤性特征。

[0066] 6.3.1 富集无血清培养基

[0067] 本领域技术人员应理解,用于增殖细胞的细胞培养基可影响一种或多种细胞特征,包括但不限于:非致瘤性、非致癌性、以贴壁细胞形式生长、以非贴壁细胞形式生长、具有上皮样形态学特征、在培养时支持各种病毒复制和支持流感病毒复制达到本文所述高效价。为降低被外来物质(例如,支原体、病毒和朊病毒)污染的风险,应最大程度减少或甚至去除在组织培养应用中将血清或动物提取物用于生产治疗(例如疫苗)材料。此外,最

大程度减少细胞培养过程中所需操作数量可显著降低污染的可能性。因此,本发明提供可用于采用分批培养方法增殖 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)和生产疫苗材料的富集无血清培养基。具体而言,本发明的富集无血清培养基(本文也称为“本发明的无血清培养基”和“本发明的培养基”)可用于不采用培养基交换或补充的分批培养方法。因此,开发和使用本发明的无血清培养基可克服基于细胞培养生产疫苗材料(例如流感病毒)中最具挑战性的操作问题之一,即需要培养基交换/补充。

[0068] 在一个实施方式中,本发明的无血清培养基支持非致瘤性 MDCK 细胞的增殖,其中所述细胞在培养基中增殖后(即传代后)保持非致瘤性。在一个具体实施方式中,所述 MDCK 细胞在本发明的无血清培养基中进行至少 20 次传代后、至少 30 次传代后、至少 40 次传代后、至少 50 次传代后、至少 60 次传代后、至少 70 次传代后、至少 80 次传代后、至少 90 次传代后或至少 100 次传代后具有非致瘤性。

[0069] 在另一个实施方式中,本发明的无血清培养基支持 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)增殖达到高密度。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基支持 MDCK 细胞增殖达到的密度为至少 5×10^5 个细胞/mL、至少 6×10^5 个细胞/mL、至少 7×10^5 个细胞/mL、至少 8×10^5 个细胞/mL、至少 9×10^5 个细胞/mL、至少 1×10^6 个细胞/mL、至少 1.2×10^6 个细胞/mL、至少 1.4×10^6 个细胞/mL、至少 1.6×10^6 个细胞/mL、至少 1.8×10^6 个细胞/mL、至少 2.0×10^6 个细胞/mL、至少 2.5×10^6 个细胞/mL、至少 5×10^6 个细胞/mL、至少 7.5×10^6 个细胞/mL 或至少 1×10^7 个细胞/mL。在另一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基支持非致瘤性 MDCK 细胞增殖。

[0070] 在另一个实施方式中,本发明的无血清培养基支持 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)增殖达到高密度和随后流感病毒复制达到高效价而不需培养基交换步骤。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基支持 MDCK 细胞增殖达到高密度和随后流感病毒(例如 ca/ts 毒株)复制达到的 $\log_{10}$ TCID₅₀/mL 和/或 $\log_{10}$ FFU/mL 为至少约 6.0、至少约 6.2、至少约 6.4、至少约 6.6、至少约 6.8、至少约 7.0、至少约 7.2、至少约 7.4、至少约 7.6、至少约 7.8、至少约 8.0、至少约 8.2、至少约 8.4、至少约 8.6、至少约 8.8、至少约 9.0、至少约 9.2、至少约 9.4、至少约 9.6、至少约 9.8、至少约 10.0,而不需培养基交换步骤。在其它具体实施方式中,本发明的无血清培养基支持非致瘤性 MDCK 细胞增殖达到高密度和随后的流感病毒,包括但不限于上述流感病毒复制。

[0071] 在一个实施方式中,本发明的无血清培养基包含植物水解产物。植物水解产物包括但不限于来自以下一种或多种植物的水解产物:玉米、棉籽、豌豆、大豆、麦芽、马铃薯和小麦。植物水解产物可通过酶水解产生,通常包含肽、游离氨基酸和生长因子的混合物。植物水解产物易于从多种商业来源包括例如马可开发公司(Marcor Development)、海克隆公司(HyClone)和有机技术公司(Organo Technie)获得。还考虑到也可采用酵母水解产物代替植物水解产物或与之结合。酵母水解产物易于从多个商业来源包括例如西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)、USB 公司、吉布可(Gibco)/BRL 公司和其它公司获得。在某些实施方式中,除植物或酵母水解产物以外可采用合成水解产物,或采用合成水解产物代替植物或酵母水解产物。在某些实施方式中,本发明的无血清培养基包含的植物水解产物的终浓度为约 0.1g/L 到约 5.0g/L 之间、约 0.5g/L 到约 4.5g/L 之间、约 1.0g/L 到约 4.0g/L 之间、约 1.5g/L 到约 3.5g/L 之间或约 2.0g/L 到约 3.0g/L 之间。在一个具体实施方式中,

本发明的无血清培养基包含终浓度为 2.5g/L 的植物水解产物。在另一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含终浓度为 2.5g/L 的小麦水解产物。

[0072] 在另一个实施方式中，本发明的无血清培养基包含液体补充物。可用于补充培养基的液体包括但不限于化学成分确定的动物和植物来源的液体补充物以及合成来源的液体。可存在于液体补充物中的液体包括但不限于：胆固醇、饱和和 / 或不饱和脂肪酸（例如，花生四烯酸、亚油酸、亚麻酸、肉豆蔻酸、油酸、棕榈酸和硬脂酸）。胆固醇可以 0.10mg/ml-0.40mg/ml 的浓度存在于 100X 的液体补充物储备液中。脂肪酸可以 1 μ g/ml-20 μ g/ml 的浓度存在于液体补充物的 100X 储备液中。适用于培养基制剂的液体易于从多个商业来源包括例如海克隆公司、吉布可 /BRL 公司和西格玛 - 奥德里奇公司获得。在某些实施方式中，本发明的无血清培养基包含的化学成分确定的液体浓缩物的终浓度为约 0.1X 到约 2X 之间、约 0.2X 到约 1.8X 之间、约 0.3X 到约 1.7X 之间、约 0.4X 到约 1.6X 之间、约 0.5X 到约 1.5X 之间、约 0.6X 到约 1.4X 之间、约 0.7X 到约 1.3X 之间或约 0.8X 到约 1.2X 之间。在一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含终浓度为 1X 的化学成分确定的液体浓缩物 (CDCL) 溶液。在另一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含终浓度为 1X 的化学成分确定的液体浓缩物 (CDCL) 溶液（表 4）。

[0073] 在另一个实施方式中，本发明的无血清培养基包含痕量元素。可采用的痕量元素包括但不限于 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、亚硒酸 $\cdot 2\text{Na}$ 、柠檬酸铁、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、钼酸 - 铵盐、 NH_4VO_3 、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 SnCl_2 （无水）、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 AgNO_3 、 $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 、 KBr 、 CdCl_2 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 CrCl_3 （无水）、 NaF 、 GeO_2 、 KI 、 RbCl 、 $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 。痕量元素的浓缩储备溶液易于从多个商业来源包括例如细胞生长公司 (Cell Grow)（参见目录号 99-182、99-175 和 99-176）获得。在某些实施方式中，本发明的无血清培养基包含的痕量元素溶液 A、B 和 C（表 3）的终浓度在约 0.1X 到约 2X 之间、约 0.2X 到约 1.8X 之间、约 0.3X 到约 1.7X 之间、约 0.4X 到约 1.6X 之间、约 0.5X 到约 1.5X 之间、约 0.6X 到约 1.4X 之间、约 0.7X 到约 1.3X 之间或约 0.8X 到约 1.2X 之间。在一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含终浓度为 1X 的痕量元素溶液 A、B 和 C（表 3）。

[0074] 在另一个实施方式中，本发明的无血清培养基包含一种或多种激素、生长因子和 / 或其它生物分子。激素包括但不限于：三碘甲腺原氨酸 (triiodothyronine)、胰岛素和皮质醇。生长因子包括但不限于：表皮生长因子 (EGF)、胰岛素生长因子 (IGF)、转化生长因子 (TGF) 和成纤维细胞生长因子 (FGF)。在一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含表皮生长因子 (EGF)。其它生物分子包括细胞因子（例如，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素、白介素、TNF）、趋化因子（例如，调解活化正常 T 细胞表达和分泌的趋化因子 (Rantes)、嗜伊红粒细胞趋化蛋白、巨噬细胞炎性蛋白 (MIP)）和前列腺素（例如，前列腺素 E1 和 E2）。在一个实施方式中，本发明的无血清培养基包含的生长因子的终浓度为约 0.0001 到约 0.05mg/L 之间、约 0.0005 到约 0.025mg/L 之间、约 0.001 到约 0.01mg/L 之间、约 0.002 到约 0.008mg/L 之间或约 0.003mg/L 到约 0.006mg/L 之间。在一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含终浓度为 0.005mg/L 的 EGF。在一个实施方式中，本发明的无血清培养基包含的三碘甲腺原氨酸的终浓度在约 $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 到约 $10 \times 10^{-12}\text{M}$ 之间、约 $2 \times 10^{-12}\text{M}$ 到约 $9 \times 10^{-12}\text{M}$ 之间、约 $3 \times 10^{-12}\text{M}$ 到约 $7 \times 10^{-12}\text{M}$ 之间或约 $4 \times 10^{-12}\text{M}$ 到约 $6 \times 10^{-12}\text{M}$ 之间。在一个具体实施方式中，本发明的无血清培养基包含终浓度为 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 的三碘甲腺原氨酸。

在一个实施方式中,本发明的无血清培养基包含的胰岛素的终浓度在约 1mg/L 到约 10mg/L 之间、约 2.0mg/L 到约 8.0mg/L 之间或约 3mg/L 到约 6mg/L 之间。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 5mg/L 的胰岛素。在某些实施方式中,本发明的无血清培养基包含的前列腺素的终浓度在约 0.001mg/L 到约 0.05mg/L 之间、约 0.005mg/L 到约 0.045mg/L 之间、约 0.01mg/L 到约 0.04mg/L 之间、约 0.015mg/L 到约 0.035mg/L 之间或约 0.02mg/L 到约 0.03mg/L 之间。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 0.025mg/L 的前列腺素。在另一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 0.025mg/L 的前列腺素 E1。

[0075] 在另一个实施方式中,本发明的无血清培养基用一种或多种选自下组的培养基组分强化:腐胺、氨基酸、维生素、脂肪酸和核苷。在具体实施方式中,本发明的无血清培养基用一种或多种培养基组分强化,使所述培养基组分的浓度比在常规用于增殖细胞的培养基例如杜尔伯科改良伊格尔培养基/汉氏 F12 培养基(DMEM/F12)中通常发现的浓度高约 1 倍、约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍或约 5 倍或更多。DMEM/F12 的标准组成在以下表 1 中提供作为参考。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基用腐胺强化。在另一个实施方式中,本发明的无血清培养基用腐胺强化,使腐胺的浓度比在 DMEM/F12 中通常发现的浓度高约 5 倍或更多。

[0076] 可强化的脂肪酸包括:不饱和脂肪酸,包括但不限于亚油酸和 α -亚麻酸(也称为必需脂肪酸)以及肉豆蔻脑酸、棕榈油酸、油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸;饱和脂肪酸,包括但不限于丁酸、己酸、辛酸、癸酸、十二烷酸、十四烷酸、十六烷酸、十八烷酸、二十烷酸、二十二烷酸、二十四烷酸;以及含硫脂肪酸,包括硫辛酸。在某些实施方式中,本发明的无血清培养基用除由上述液体补充物提供的脂肪酸以外的额外脂肪酸强化。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基用亚油酸和亚麻酸强化。在另一个实施方式中,本发明的无血清培养基用亚油酸和亚麻酸强化,使亚油酸和亚麻酸的浓度比在 DMEM/F12 中通常发现的浓度高约 5 倍或更多。

[0077] 可强化的氨基酸包括 20 种标准氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)以及胱氨酸和非标准氨基酸。在某些实施方式中,强化通常称为“必需氨基酸”的非致瘤性 MDCK 细胞不合成的一种或多种氨基酸。例如,通常将 8 种氨基酸视作人类必需:苯丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、色氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸和赖氨酸。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基用胱氨酸和除谷氨酰胺以外的所有标准氨基酸强化(配制 DMEM/F12 通常不用谷氨酰胺,将其单独加入),使胱氨酸和标准氨基酸的浓度比在 DMEM/F12 中通常发现的浓度高约 5 倍或更多。在某些具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含的谷氨酰胺的浓度在约 146mg/L 到约 1022mg/L 之间、约 292mg/L 到约 876mg/L 之间或约 438mg/L 到约 730mg/L 之间。在另一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 584mg/L 的谷氨酰胺。

[0078] 可强化的维生素包括但不限于:抗坏血酸(维生素 A)、d-生物素(维生素 B₇ 和维生素 H)、D-泛酸钙、胆钙化甾醇(维生素 D₃)、氯化胆碱、氰钴胺素(维生素 B₁₂)、麦角钙化固醇(维生素 D₂)、叶酸(维生素 B₉)、甲基萘醌类(维生素 K₂)、肌醇、烟酰胺(维生素 B₃)、对氨基苯甲酸、泛酸(维生素 B₅)、叶绿醌(维生素 K₁)、吡哆醇(维生素 B₆)、视黄醇(维生

素 A)、核黄素 (维生素 B₂)、 α -生育酚 (维生素 E) 和硫胺素 (维生素 B₁)。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基用 d-生物素、D-泛酸钙、氯化胆碱、氰钴胺素、叶酸、肌醇、烟酰胺、吡哆醇、核黄素和硫胺素进行强化,使所述维生素的浓度比 DMEM/F12 中通常发现的浓度高约 5 倍或更多。

[0079] 可强化的核苷包括但不限于:胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、胸苷和次黄嘌呤。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基用次黄嘌呤和胸苷强化,使次黄嘌呤和胸苷的浓度比在 DMEM/F12 中通常发现的浓度高约 5 倍或更多。

[0080] 可加入细胞培养基的其它组分包括但不限于:碳酸氢钠、碳源(例如葡萄糖)和铁结合试剂。在一个实施方式中,本发明的无血清培养基包含的碳酸氢钠的终浓度在约 1200mg/L 到约 7200mg/L 之间、约 2400mg/L 到约 6000mg/L 之间或约 3600mg/L 到约 4800mg/L 之间。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 4400mg/L 的碳酸氢钠。在一个实施方式中,本发明的无血清培养基包含葡萄糖作为碳源。在另一个实施方式中,本发明的无血清培养基包含的葡萄糖的终浓度在约 1g/L 到约 10g/L 之间、约 2g/L 到约 10g/L 之间、约 3g/L 到约 8g/L 之间、约 4g/L 到约 6g/L 之间或约 4.5g/L 到约 9g/L 之间。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 4.5g/L 的葡萄糖。特别考虑到可将额外的葡萄糖加入到用于增殖非致瘤性 MDCK 细胞达到高密度和随后复制流感病毒的本发明无血清培养基中以避免碳源的耗尽。因此,在某些实施方式中,本发明的无血清培养基包含额外加入的 1-5g/L 葡萄糖以使葡萄糖终浓度在约 5.5g/L 到约 10g/L 之间。

[0081] 可利用的铁结合试剂包括蛋白质如运铁蛋白和化合物如托酚酮(参见例如,美国专利 5,045,454、5,118,513、6,593,140 和 PCT 公开 WO 01/16294)。在一个实施方式中,本发明的无血清培养基包含托酚酮(2-羟基-2,4,6-环庚三烯-1)和代替运铁蛋白的铁源(例如,柠檬酸铁铵、硫酸铁铵)。例如,托酚酮或托酚酮衍生物相对培养基中存在的铁将以过量摩尔浓度存在,摩尔比在约 5:1 到约 1:1 之间。在某些实施方式中,本发明的无血清培养基包含的托酚酮或托酚酮衍生物相对培养基中存在的铁的摩尔浓度过量,摩尔比为约 5:1、约 3:1、约 2:1、约 1.75:1、约 1.5:1 或约 1.25:1。在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含终浓度为 0.25mg/L 的托酚酮和终浓度为 0.20mg/L 的柠檬酸铁铵(FAC)(参见例如表 2)。

[0082] 向培养基制剂加入上述组分可改变重量摩尔渗透压浓度。因此,在某些实施方式中,减少在 DMEM/F12 中通常发现的一种或多种组分的量以保持所需的重量摩尔渗透压浓度。在一个实施方式中,降低本发明无血清培养基中的氯化钠(NaCl)浓度。在另一个实施方式中,本发明无血清培养基中的 NaCl 浓度约为 DMEM/F12 中通常发现浓度的约 10%到约 90%之间、约 20%到约 80%之间、约 30%到约 70%之间或约 40%到约 60%之间。在一个具体实施方式中,本发明无血清培养基中的 NaCl 终浓度为 DMEM/F12 中通常发现的 50%。在另一个具体实施方式中,本发明无血清培养基中的 NaCl 终浓度为 3500mg/L。

[0083] 在某些实施方式中,最大程度减少或甚至消除本发明无血清培养基中存在的动物来源组分的数量。例如,可利用市售的非动物来源的重组蛋白如胰岛素和运铁蛋白(例如,分别为生物工业公司(Biological Industries)目录号 01-818-1 和密理博公司(Millipore)目录号 9701)代替动物来源的蛋白质。在一个具体实施方式中,用非动物来源的产物代替所有动物来源组分,可能是化学成分确定的液体混合物组分的胆固醇例外。为

最大程度降低通常与动物来源产物相关的风险,胆固醇可来自与包括但不限于朊病毒的偶然因素无关地区的绵羊羊毛。

[0084] 在一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基包含表 2 中列出的 MediV SFM 110 培养基的所有组分,终浓度如表所示。在另一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基基本由表 2 中列出的 MediV SFM 110 培养基的所有组分组成,终浓度如表所示。在另一个具体实施方式中,本发明的无血清培养基是由表 2 中列出组分组成的 MediV SFM 110 培养基。

[0085] 表 1DMEM/F12 培养基配方

[0086]

组分	mg/L		组分	mg/L
盐			氨基酸	
无水氯化钙	116.6		L- 丙氨酸	4.45
氯化镁	28.64		L- 精氨酸 HCl	147.5
无水硫酸镁	48.84		L- 天冬酰胺 H ₂ O	7.5
氯化钾	311.8		L- 天冬氨酸	6.65
氯化钠	6999.5		L- 半胱氨酸 HCl H ₂ O	17.56
磷酸二氢钠一水合物	62.5		L- 胱氨酸 2HCl	31.29
无水磷酸氢二钠	71.02		L- 谷氨酸	7.35
			甘氨酸	18.75
痕量金属			L- 组氨酸 HCl H ₂ O	31.48
硫酸铜五水合物	0.0013		L- 异亮氨酸	54.47
硝酸铁九水合物	0.05		L- 亮氨酸	59.05
硫酸亚铁七水合物	0.417		L- 赖氨酸 HCl	91.25
硫酸锌七水合物	0.432		L- 甲硫氨酸	17.24
			L- 苯丙氨酸	35.48
其它			L- 脯氨酸	17.25
腐胺, 2HCl	0.081		L- 丝氨酸	26.25

碳酸氢钠	2200		L- 苏氨酸	53.45
丙酮酸钠	55		L- 色氨酸	9.02
			L- 酪氨酸 2Na	55.79
维生素			L- 缬氨酸	52.85
d- 生物素 (维生素 B ₇ 和维生素 H)	0.0035			
D- 泛酸钙	2.24		核苷	
氯化胆碱	8.98		次黄嘌呤, 钠盐	2.39
氰钴胺素 (维生素 B ₁₂)	0.68		胸苷	0.365
叶酸	2.65			
肌醇	12.6		脂肪酸	
烟酰胺	2.02		α - 亚油酸	0.042
吡哆醇 HCl (维生素 B ₆)	2.031		α -DL- 硫辛酸	0.105
核黄素 (维生素 B ₂)	0.219			
硫胺素 HCl (维生素 B ₁)	2.17			

[0087] 6.3.2 珠粒对珠粒转移

[0088] 在一个实施方式中,非致瘤性 MDCK 细胞在其附着表面以贴壁细胞形式培养。组织培养细胞可在其上生长的附着表面包括但不限于:表面改性聚苯乙烯塑料、蛋白质包被表面(例如纤连蛋白和/或胶原蛋白包被的玻璃/塑料)以及大量市售微载体(例如,DEAE-葡聚糖微载体珠粒,如多马塞尔公司(Dormacell)、P-L公司(Pfeifer&Langen);超珠粒公司(Superbead)、流体实验室(Flow Laboratories)的珠粒;苯乙烯共聚物-三甲胺珠粒,如希力克斯公司(Hillel)、索罗希尔公司(SoloHill)、安阿伯公司(Ann Arbor)、赛托代克斯(Cytodex)1和赛托代克斯3、GE医疗保健生命科学公司(GE Healthcare Life Science)的珠粒)。微载体珠粒是为每体积细胞培养物的贴壁细胞生长提供大表面积的小球(直径范围为100-200微米)。例如,一升培养基可包括超过2000万个微载体珠粒,提供大于8000平方厘米的生长表面。通过用于培养非致瘤性 MDCK 细胞的方法确定选择的附着表面。

[0089] 在一个实施方式中,所用微载体的浓度在约1到约4g/L之间。在另一个实施方式中,所用微载体的浓度在约2到约3g/L之间。在某些实施方式中,以约0.5到约 2×10^5 个细胞/mL的接种密度用待培养的 MDCK 细胞接种培养容器(例如生物反应器)。在一个具体实施方式中,所述接种密度在约0.7到约 1.8×10^5 个细胞/mL之间、在约0.8到约 1.6×10^5

个细胞/mL之间、在约 0.9 到约 1.4×10^5 个细胞/mL之间或在约 1.0 到约 1.2×10^5 个细胞/mL之间。或者可以每个微载体为基准计算所述接种密度。因此,在某些实施方式中,以约 10 到约 40 个细胞/微载体、约 12 到约 38 个细胞/微载体、约 14 到约 36 个细胞/微载体、约 16 到约 34 个细胞/微载体、约 18 到约 32 个细胞/微载体或约 20 到约 30 个细胞/微载体的接种密度用待培养的 MDCK 细胞接种培养容器(例如生物反应器)。

[0090] 在传代培养贴壁细胞(即增殖细胞、扩增细胞培养物)的过程中,必须将所述细胞从汇合支持表面(例如,烧瓶表面、微载体等)转移到新的支持表面上。可利用多种方法实现这样的细胞转移。例如,采用包括胰蛋白酶、TrypLE 和胶原酶在内的蛋白酶从烧瓶或微载体移出细胞,如果需要的话洗涤细胞,然后将细胞加入包含增殖培养基的较大烧瓶或较大体积微载体中稀释。该过程通常称为“分割”培养物,可以原始培养物和最终培养物的比率进行定量分析。例如,1:8 的分割比表示将 1 份原始培养物(例如 10mL)加入到 7 份新鲜培养基(例如 70mL)中以形成 80mL。或者根据所需接种密度和最终培养物的体积确定原始培养基中的细胞数量和计算稀释度。优选将非动物来源的蛋白酶如 TrypLE(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, CA))用于这样的应用。或者,在微载体培养物中,可在细胞脱离之后向培养物中加入新鲜培养基和/或微载体珠粒。在一些实施方式中,在加入新鲜培养基和/或微载体之前、期间或之后,将蛋白酶处理的培养物转移到较大培养容器中。

[0091] 在一个具体实施方式中,用蛋白酶(例如 TrypLE)处理在微载体上以贴壁细胞形式生长的 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)的细胞培养物。根据需要使所述蛋白酶失活(例如通过加入蛋白酶抑制剂,如利马豆胰蛋白酶抑制剂),然后可向培养物中加入新鲜培养基和/或微载体珠粒。在一些实施方式中,在加入新鲜培养基和/或微载体之前、期间或之后,将蛋白酶处理的培养物转移到较大培养容器中。

[0092] 在珠粒对珠粒转移方法中使用蛋白酶可导致细胞扩散差和细胞计数低。因此,本发明还提供最大程度减少或甚至消除所需蛋白酶用量以促进珠粒对珠粒转移的实现珠粒对珠粒转移的方法,包括但不限于第 8.2 节实施例中的示例的方法,其也用于第 8.1 节的实施例。具体而言,发明人已确定,通过用螯合剂进行预处理,具体为在高于细胞增殖所用 pH 的 pH 进行预处理可将微载体释放细胞所需的蛋白酶量减少至少 20 倍。

[0093] 在一些实施方式中,通过在加入蛋白酶(例如 TrypLE)之前用螯合剂预处理细胞来促进珠粒对珠粒转移。在其它实施方式中,通过在高于细胞增殖所用 pH 的 pH 加入螯合剂(例如 EDTA)并进行温育来促进珠粒对珠粒转移。在一个具体实施方式中,在加入蛋白酶之前在高于细胞增殖期间所用 pH 的 pH 用螯合剂(例如 EDTA)处理在微载体上以贴壁细胞形式生长的非致瘤性 MDCK 细胞的细胞培养物。在某些实施方式中,根据需要监测和调整 pH 以促进细胞从微载体基材脱离。在细胞脱离之后向培养物中加入新鲜培养基和/或微载体珠粒。在一些实施方式中,在加入新鲜培养基和/或微载体之前、期间或之后,将含或不含原始微载体的培养物转移到较大培养容器中。

[0094] 在某些实施方式中,在脱离细胞之前用洗涤介质(例如缓冲盐溶液)洗涤所述细胞。可用于洗涤细胞的介质包括但不限于:Hepes 缓冲溶液、磷酸盐缓冲盐水、杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水、汉克斯(Hank's)平衡盐溶液和厄尔(Earle's)平衡盐溶液。洗涤细胞的过程包括用新鲜洗涤介质(即缓冲盐溶液)替换一部分或全部培养基/介质(生长培养

基和 / 或洗涤介质)。可多次重复进行所述过程。通常,使微载体珠粒沉降一段时间(例如 10-40 分钟),从容器中移出生长培养基。任选地,可利用交互低剪切切向流装置从细胞培养物中移出培养基,参见例如 U. S. 6, 544, 424。在某些实施方式中,在洗涤步骤中移出约 50%到约 90%的培养基 / 介质(生长培养基和 / 或洗涤介质)。在某些实施方式中,用体积小于、等于或大于移出培养基 / 介质体积的洗涤介质(即缓冲盐溶液)替换所述培养基 / 介质。在一个实施方式中,加入洗涤介质使所得细胞培养物的体积在所述细胞培养物原始工作体积的约 25%到约 100%之间。在一个具体实施方式中,加入细胞培养物原始工作体积约 40%到约 60%的洗涤介质。在另一个具体实施方式中,加入细胞培养物原始工作体积约 90%到约 100%的洗涤介质。在某些实施方式中,将细胞洗涤两次或更多次。

[0095] 在某些实施方式中,所述洗涤介质包含螯合剂。可利用的螯合剂包括但不限于:乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚乙基双(氧亚乙基三次氨基)四乙酸(EGTA)。在一个具体实施方式中,所述螯合剂是 EDTA。在某些实施方式中,所述洗涤介质包含浓度在约 0. 25mM 到约 0. 75mM 之间的螯合剂。在某些其它实施方式中,所述洗涤介质包含浓度在约 0. 4mM 到约 0. 6mM 之间的螯合剂。在一个具体实施方式中,所述洗涤介质包含浓度为约 0. 5mM 的螯合剂。

[0096] 在一个实施方式中,包含螯合剂的洗涤介质的 pH 在约 7. 6 到约 8. 4 之间。在一个具体实施方式中,包含螯合剂的洗涤介质的 pH 在约 7. 8 到约 8. 2 之间。在另一个具体实施方式中,包含螯合剂的洗涤介质的 pH 在约 7. 9 到约 8. 1 之间。向细胞培养物中加入包含螯合剂的洗涤介质可改变洗涤介质中所得细胞培养物的 pH。因此,在某些实施方式中,在将洗涤介质加入到细胞培养物中之后,根据需要将由包含螯合剂的洗涤介质洗涤的细胞培养物的 pH 调整到约 7. 6 到约 8. 4 之间。在一个具体实施方式中,在将洗涤介质加入到细胞培养物中之后,根据需要将由包含螯合剂的洗涤介质洗涤的细胞培养物的 pH 调整到约 7. 8 到约 8. 2 之间。在另一个具体实施方式中,在将洗涤介质加入到细胞培养物中之后,根据需要将由包含螯合剂的洗涤介质洗涤的细胞培养物的 pH 调整到约 7. 9 到约 8. 1 之间。

[0097] 在某些实施方式中,在加入包含螯合剂的洗涤介质之后和加入另外洗涤步骤和 / 或加入蛋白酶之前,搅拌细胞培养物。可采用本领域已知手段,包括但不限于搅动、振荡、旋转等搅拌培养物。搅拌的速率和持续时间通过培养物体积、洗涤介质的组分和细胞培养物中的细胞类型确定。在某些实施方式中,以与增殖细胞所用速率类似的速率搅拌细胞培养物。在其它实施方式中,以高于细胞增殖所用速率的速率搅拌细胞培养物。在采用较高搅拌速率时,所述速率的增长在约 10%到约 90%之间、在约 20%到约 80%之间、在约 30%到约 70%之间或在约 40%到约 65%之间。在一个具体实施方式中,所用搅拌速率在约 40%到约 65%之间。在某些实施方式中,将细胞培养物搅拌约 5 分钟到约 60 分钟。在一个具体实施方式中,将细胞培养物搅拌约 20 分钟到约 40 分钟。

[0098] 在某些实施方式中,在洗涤过程中但在任何搅拌后将蛋白酶(例如,丝氨酸蛋白酶)加入到细胞培养物中。在一个具体实施方式中,将细胞洗涤两次或更多次,在最后一次洗涤过程中在任何搅拌后加入蛋白酶。在本发明的某些方面,所述蛋白酶是丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶或天冬酰胺蛋白酶。在一个具体实施方式中,所述蛋白酶是丝氨酸蛋白酶(例如,胰蛋白酶、TrypLE 等)。在另一个实施方式中,采用美国专利申请第 11/455, 818 号中描述的来自灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的蛋白酶。胰蛋白酶可来自动物来源,

或更优选来自重组来源。为在这些条件下实现脱离而加入的蛋白酶量比细胞未经螯合剂预处理时所需的量至少少 5 倍,其由培养物体积和蛋白酶浓度确定。例如,以 10X 储备液提供的市售 TrypLE™ Express 通常以约 1X 的终浓度使用(参见例如英杰公司 TrypLE 精选物新闻(Invitrogen™ TrypLE Select Product News))以使高度贴壁细胞如 MDCK 细胞脱离。如本文所示(参见第 8.2 节),细胞从微载体脱离所需的 TrypLE™ 终浓度是 0.05X,降低了 20 倍。因此,在某些实施方式中,向细胞培养物中加入的蛋白酶终浓度是约 0.5X、约 0.1X、约 0.09X、约 0.08X、约 0.07X、约 0.06X、约 0.05X、约 0.04X 或约 0.02X,其中 1X 表示在相同解离条件下使未经螯合剂预处理的细胞脱离所需的蛋白酶终浓度。

[0099] 在一个实施方式中,在培养系统中以贴壁细胞形式培养 MDCK 细胞。可用来培养 MDCK 细胞的培养系统包括例如,分批培养系统和由于营养物在起始培养基消耗而加入额外营养物(例如,碳源、氨基酸等)以促进细胞生长达到高密度的补料分批培养系统。或者或任选地,可采用灌注培养系统(例如,采用细胞滞留系统,如离心、过滤、旋转过滤器(spin filter)等)促进培养基交换和/或消耗营养物的补充。在一个具体实施方式中,采用本发明的无血清培养基(例如 MediV SFM 110)在无培养基交换/补充(例如,补料或灌注)的分批培养系统中以贴壁细胞形式培养非致瘤性 MDCK 细胞。关于以贴壁细胞形式培养 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)的其它指导可参见例如,美国专利申请公开第 2003/0108860、2005/0118140 号和 PCT 公开 WO 2008/105931。可用于培养 MDCK 细胞的常用培养系统包括搅拌容器生物反应器。

[0100] 6.3.3 流感病毒培养条件

[0101] 本发明提供在如上所述无血清培养基制剂中培养 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)和其它动物细胞的方法。特别考虑到其它培养条件可在保持 MDCK 细胞的性质中发挥作用,所述 MDCK 细胞的性质包括非致瘤性、非致癌性、以贴壁细胞形式生长、以非贴壁细胞形式生长、具有上皮样形态学特征、支持各种病毒复制和支持流感病毒(例如,冷适应和/或温度敏感性和/或减毒)生长达到高效价,例如,至少约 7.8、至少约 8.0 或至少约 9.0 的 $\log_{10}$ TCID₅₀/mL 和/或 $\log_{10}$ FFU/mL。这些培养条件包括但不限于:附着表面的选择、细胞密度、温度、CO₂ 浓度、培养方法、搅拌速率、溶氧含量和 pH。

[0102] 特别考虑到可以多种方式改变培养条件以优化 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)的生长。这样的改变还可引起病毒材料(例如病毒)产量增加,如例如美国专利申请公开第 2005/0118698 号所述。或者可改变培养条件以优化不考虑细胞生长从 MDCK 细胞生产疫苗材料。这些培养条件包括但不限于:附着表面、细胞密度、温度、CO₂ 浓度、培养方法、溶氧含量和 pH。

[0103] 在一个实施方式中,培养 MDCK 细胞(例如非致瘤性 MDCK 细胞)的 CO₂ 浓度为至少 1%、至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%或至少 20%。

[0104] 在一个实施方式中,在培养 MDCK 细胞的过程中优选调节溶氧(DO)浓度(pO₂值),使其处于 5% -100% (根据空气饱和度)或 10% -60% 的范围。在一个具体实施方式中,溶氧(DO)浓度(pO₂值)为至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 50%或至少 60%。在一个具体实施方式中,DO 浓度保持在 50%。在一个具体实施方式中,DO 下降到 50%,然后保持在该水平。保持 DO 水平的方法包括例如用纯氧喷淋。

[0105] 在另一个实施方式中,在培养过程中调节用于培养非致瘤性 MDCK 细胞的培养基的 pH,使其处于 pH 6.4-pH 8.0 或 pH 6.8-pH 7.4 的范围。在一个具体实施方式中,培养基的 pH 为约 6.4、约 6.6、约 6.8、约 7.0、约 7.2、约 7.4、约 7.6、约 7.8 或至少 8.0。在一个具体实施方式中,培养基的 pH 为约 7.4。

[0106] 在另一个实施方式中,在 25℃-39℃ 的温度于本发明的无血清培养基中培养 MDCK 细胞。特别考虑到培养温度可根据所需方法改变。例如,非致瘤性 MDCK 细胞可在 37±2℃ 生长以便增殖细胞,可在较低温度(例如,25℃-35℃)生产疫苗材料(例如病毒)。在另一个实施方式中,在低于 30℃、低于 31℃、低于 32℃、低于 33℃ 或低于 34℃ 的温度培养细胞以便生产疫苗材料。在另一个实施方式中,在 30℃、31℃、32℃、33℃ 或 34℃ 的温度培养细胞以便生产疫苗材料。在一个具体实施方式中,在 33±2℃ 的温度培养细胞以便生产疫苗材料。

[0107] 在某些实施方式中,在搅拌容器生物反应器(例如,塑料的单用途生物反应器、玻璃或不锈钢的可重复使用生物反应器)中于本发明的无血清培养基中培养 MDCK 细胞,监测和/或控制选自下组的一个或多个参数:温度、搅拌速率、pH、溶氧(DO)、O₂ 和 CO₂ 流速。在一个实施方式中,将温度保持在约 30℃ 到约 42℃ 之间、约 33℃ 到约 39℃ 之间或约 35℃ 到约 38℃ 之间。在一个具体实施方式中,温度保持在约 36℃ 到约 38℃ 之间。在一个实施方式中,搅拌速率保持在约 100 到 200rpm 之间。在一个具体实施方式中,采用单用途生物反应器,搅拌速率保持在约 80 到约 120rpm 之间或约 90 到约 100rpm 之间。在另一个具体实施方式中,采用可重复使用生物反应器,搅拌速率保持在约 150 到约 200rpm 之间或约 160 到约 180rpm 之间。通过本领域已知手段控制搅拌速率。所用生物反应器的类型和尺寸以及所用搅拌桨的类型和数量可能需要调整搅拌速率以最大程度增加细胞生长和/或最大程度减少细胞损伤。

[0108] 在另一个实施方式中,MDCK 细胞的 pH 保持在约 6.4 到 8.0 之间。在一个具体实施方式中,起始培养物的 pH 在约 6.8 到约 7.6 之间,培养物的 pH 在培养过程中保持在约 7.0 到约 7.5 之间。初始 pH 可低于或高于所需范围,可使 pH 升高或降低到所需水平(例如 7.4)并保持。在一个具体实施方式中,pH 保持在约 7.4。可根据需要通过喷淋 CO₂ 和/或加入酸(例如 HCl)或碱(例如,NaOH、NaHCO₃、Na₂CO₃)来控制 pH。

[0109] 在另一个实施方式中,DO 的可接受范围在约 100 到约 35% 之间。在一个具体实施方式中,MDCK 细胞培养物的 DO 保持在约 35% 到约 50% 之间或保持在约 50%。在另一个实施方式中,DO 不应降至低于约 35%。在某些实施方式中,初始 DO 可为 100%,可使 DO 下降到预定水平(例如 50%)并保持。通过例如喷淋 O₂ 保持 DO。在某些实施方式中,O₂ 流速保持在小于约 2.0L/分钟。在某些实施方式中,CO₂ 流速保持在小于约 0.4L/分钟。在其它实施方式中,保持恒定的总流速(例如 40mL/分钟),提供 N₂ 气体以保持流速。因此,可从用于保持 DO 和 pH 的 O₂ 和 CO₂ 气体计算 N₂ 气体的供给量。

[0110] 可在非致瘤性 MDCK 细胞的培养过程中很容易地操作培养基中葡萄糖、谷氨酰胺、乳酸、其它培养基组分的含量以及 pH 和 pO₂ 值和其它参数如搅拌,以优化细胞密度和/或病毒产量。

[0111] 6.3.4 呼吸道合胞病毒培养条件

[0112] 在一个具体实施方式中,在用本文所述细胞相关病毒感染之前培养细胞以达到一

定的活细胞总计数。例如,可在约 37℃在补充有 4mM L- 谷氨酰胺和 1% CDLC 的 VP-SFM 中培养 Vero 细胞,测定活细胞总计数和细胞活力。在一个具体实施方式中,在达到一定平均活细胞计数时,用细胞相关病毒感染细胞。例如,可在用本文所述细胞相关病毒如 RSV 感染细胞之前达到约 1.5×10^8 个细胞 / 组织培养容器或更多的平均活细胞数量。在一个实施方式中,采用例如 Vi- 细胞计数仪测定,在用本文所述细胞相关病毒感染细胞之前达到约 1×10^6 个细胞 / 组织培养容器到约 1×10^{14} 个细胞 / 组织培养容器的平均活细胞计数。在另一个实施方式中,采用例如 Vi- 细胞计数仪测定,在用本文所述细胞相关病毒感染细胞之前达到约 1×10^6 个细胞 / 组织培养容器、约 5×10^6 个细胞 / 组织培养容器、约 1×10^7 个细胞 / 组织培养容器或约 5×10^7 个细胞 / 组织培养容器的平均存活细胞计数。在另一个实施方式中,采用例如 Vi- 细胞计数仪测定,在用本文所述细胞相关病毒感染细胞之前达到约 1×10^8 个细胞 / 组织培养容器、约 5×10^8 个细胞 / 组织培养容器、约 1×10^9 个细胞 / 组织培养容器、约 5×10^9 个细胞 / 组织培养容器或约 1×10^{10} 个细胞 / 组织培养容器的平均存活细胞计数。

[0113] 采用确定对所选细胞最佳的感染复数 (MOI) 感染细胞。在一个具体实施方式中,采用约 0.0001 到约 1 或约 0.0005 到 0.005 的 MOI 感染本文所述细胞。在另一个实施方式中,采用约 0.0001、约 0.0005 或约 0.00075 的 MOI 感染本文所述细胞。在另一个实施方式中,采用约 0.001、约 0.005、约 0.0075 或约 0.01 的 MOI 感染本文所述细胞。在另一个实施方式中,采用约 0.05、约 0.075、约 0.1 或约 0.5 的 MOI 感染本文所述细胞。在一个具体实施方式中,采用 MOI 为约 0.01 的 rA2cp248/404/1030 Δ SH 感染 Vero 细胞。

[0114] 可将细胞相关病毒感染的细胞在适合所选细胞系和获得病毒效价最佳结果的培养基和条件 (例如,温度、CO₂ 条件和 pH) 下温育一段时间。例如,可将用 RSV 如 rA2cp248/404/1030 Δ SH 感染的 Vero 细胞在补充有 4mM L- 谷氨酰胺的 SF4MegaVir 培养基 (加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司) 中培育,并在约 30℃无 CO₂ 培育约 10 天,然后收获病毒。在一些实施方式中,将 RSV 感染细胞 (例如,RSV 感染的 Vero 细胞) 温育约 7-14 天,然后收获病毒。在具体实施方式中,将 RSV 感染细胞温育约 8 天,优选约 9 天、约 10 天、约 11 天或约 12 天,然后收获病毒。

[0115] 可在本领域技术人员已知的任何组织培育容器中培养本文所述细胞相关病毒感染细胞。在一些实施方式中,在 T-75 烧瓶或 T-225 烧瓶中培养细胞相关病毒感染细胞。在其它实施方式中,在 1 升、2 升、3 升、4 升或 5 升组织培养容器中培养细胞相关病毒感染细胞。在一个具体实施方式中,在至少 40 个 500ml 工作体积的滚瓶中培养细胞相关病毒感染细胞。在一个具体实施方式中,在 4 升组织培养容器如滚瓶中培养细胞相关病毒感染细胞。在其它实施方式中,在 10 升、15 升、20 升或 25 升组织培养容器中培养细胞相关病毒感染细胞。在其它实施方式中,在 50 升、75 升或 100 升组织培养容器中培养细胞相关病毒感染细胞。在其它实施方式中,在 250 升、500 升或 1000 升组织培养容器中培养细胞相关病毒感染细胞。可采用的组织培养容器包括烧瓶、滚瓶、生物反应器和本领域技术人员已知的任何其它组织培养容器。

[0116] 6.4 疫苗材料的生产

[0117] 本发明提供采用 MDCK 细胞 (例如非致瘤性 MDCK 细胞) 产生病毒的在细胞培养物中生产病毒的可靠方法。具体而言,本发明提供生产流感病毒达到高效价而不需培养基交

换或补充的方法。

[0118] 在一个实施方式中,生产流感病毒的方法包括以下步骤:

[0119] (a) 在无血清培养基中增殖 MDCK 细胞,同时保持选自下组的一种或多种培养条件:约 100 到 200rpm 的搅拌速率、约 6.0 到约 7.8 的 pH、约 33℃到约 42℃的温度和约 35%到约 100%的溶氧(DO);

[0120] (b) 用流感病毒感染增殖 MDCK 细胞而不交换培养基;和

[0121] (c) 在允许流感病毒复制的条件下温育感染的增殖 MDCK 细胞。

[0122] 本文描述了可通过本发明方法产生的流感病毒(参见例如,第 7.2 和 6.7 节),其包括但不限于在减毒、温度敏感性、冷适应(ca/ts/att)主供体病毒的背景下引入所选凝血素和/或神经氨酸酶抗原的重配病毒。例如,病毒可包含例如温度敏感性(ts)、冷适应(ca)或减毒(att)(例如,A/Ann Arbor/6/60、B/Ann Arbor/1/66、PR8、B/Leningrad/14/17/55、B/14/5/1、B/USSR/60/69、B/Leningrad/179/86、B/Leningrad/14/55、B/England/2608/76等)中一种或多种的主供体病毒的主链(或一个或多个 vRNA 区段)。在卵或细胞系中生产重配流感疫苗毒株的方法包括例如, Kilbourne, E. D. 于《疫苗(Vaccines)》(第 2 版), Plotkin 和 Mortimer 编, WB 桑德斯公司出版(WB Saunders Co.)(1988)中公开的方法以及在 PCT 申请 PCT 专利公开号 WO 05/062820 和 WO 03/091401, 在美国专利号 6,951,754、6,887,699、6,649,372、6,544,785、6,001,634、5,854,037、5,824,536、5,840,520、5,820,871、5,786,199 和 5,166,057, 美国专利申请公开号 20060019350、20050158342、20050037487、20050266026、20050186563、20050221489、20050032043、20040142003、20030035814 和 20020164770 中公开的方法。可通过本发明方法产生的其它流感病毒包括可表达异源基因产物的重组流感病毒,参见例如,美国专利公开号 2004/0241139 和 2004/0253273。在某些实施方式中,所述方法用来产生冷适应和/或温度敏感性和/或减毒流感病毒。

[0123] 在一个具体实施方式中,产生的流感病毒达到至少约 8.0 的峰病毒效价 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 和/或 $\log_{10}\text{FFU}/\text{mL}$ 。在其它实施方式中,产生的流感病毒达到至少至少约 8.1、至少 8.2、至少 8.3、至少 8.4、至少 8.5、至少 8.6、至少 8.7、至少 8.8、至少 8.9 或至少 9.0 的峰病毒效价 $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 和/或 $\log_{10}\text{FFU}/\text{mL}$ 。

[0124] 在某些实施方式中,MDCK 细胞以贴壁细胞形式增殖。在一个具体实施方式中,所述 MDCK 细胞是非致瘤性 MDCK 细胞,以贴壁细胞形式增殖。在另一个具体实施方式中,所述 MDCK 细胞选自 ATCC 保藏号 PTA-6500、PTA-6501、PTA-6502、PTA-6503、PTA-7909 或 PTA-7910,以贴壁细胞形式增殖。可用于增殖贴壁细胞的生物反应器和方法如上所述(参见第 0 和 0 节)。在其它实施方式中,MDCK 细胞以非贴壁细胞形式增殖。增殖非贴壁 MDCK 细胞的方法为本领域已知,参见例如美国专利第 6,455,298 号。其它培养条件,例如温度、搅拌速率、pH、 pO_2 、 CO_2 浓度和细胞接种密度如上详述(参见第 0 和 0 节)。

[0125] 在一个具体实施方式中,所述 MDCK 细胞以贴壁细胞形式在搅拌容器生物反应器中增殖。在所述方法的某些实施方式中,如上所述在培养过程中调节培养细胞的培养基的温度、搅拌速率、pH、 pO_2 值、 CO_2 浓度和其它参数(参见第 0 和 0 节)。在某些实施方式中,所述 MDCK 细胞增殖达到约 5×10^5 到约 3×10^6 的细胞密度。或者或任选地,使所述 MDCK 细胞增殖一段固定时间。初始接种密度、倍增时间和所需最终细胞密度将确定增殖时间段。

在这样的实施方式中,所述细胞可例如增殖 1-10 天、2-8 天或 3-7 天。在一些实施方式中,MDCK 细胞增殖约 3 到约 5 天。

[0126] 在某些实施方式中,所述无血清培养基是如本文所述的富集无血清培养基(参见第 0 节)。在一个实施方式中,所述无血清培养基包含植物水解产物、液体补充物、痕量元素,并用一种或多种选自下组的培养基组分强化:腐胺、氨基酸、维生素、脂肪酸和核苷。在另一个实施方式中,所述无血清培养基包含表 2 列出的 MediV SFM110 培养基的所有组分。在一个具体实施方式中,所述无血清培养基主要由表 2 中列出的 MediV SFM 110 培养基的所有组分组成。在另一个具体实施方式中,所述无血清培养基由表 2 中列出的组分以所示终浓度组成。在某些实施方式中,所述无血清培养基包含终浓度为约 4.5g/L 的葡萄糖。在其它实施方式中,所述无血清培养基包含终浓度为约 9.0g/L 的葡萄糖。

[0127] 可用来感染细胞(步骤(b))的流感病毒包括但不限于本文所述的流感病毒(参见例如第 7.2 节和错误,未发现引用源)。为感染细胞加入的病毒量(本文称为“病毒输入量”)可测定为每个细胞加入的病毒数量(也通常称为感染复数或 MOI)。在一些实施方式中,采用约 0.00001FFU/细胞到约 10FFU/细胞、约 0.00001FFU/细胞到约 1FFU/细胞、约 0.00001FFU/细胞到约 0.1FFU/细胞或约 0.00001FFU/细胞到约 0.001FFU/细胞的病毒输入量实施用病毒感染细胞。在一个实施方式中,采用约 0.00001FFU/细胞到约 0.0001FFU/细胞或约 0.00002FFU/细胞到约 0.0002FFU/细胞的病毒输入量实施用病毒感染细胞。在一个具体实施方式中,采用约 0.00001FFU/细胞到约 0.00005FFU/细胞的病毒输入量实施用病毒感染细胞。在另一个具体实施方式中,采用约 0.0001FFU/细胞到约 0.0005FFU/细胞的病毒输入量实施用病毒感染细胞。可采用下式确定加入的病毒量:

[0128] 病毒量(μ L) = 总细胞数 $\times$ 病毒输入量 (FFU/细胞) / $10^{\text{病毒 FFA 效价}}$ (FFU/mL) $\times$ 1000。

[0129] 或者通过培养物中的病毒终浓度确定用于感染细胞的病毒量(即病毒输入量)。例如,可加入终浓度为约 1×10^3 FFU/mL 到约 0.001×10^3 FFU/mL 或约 0.1×10^3 FFU/mL 到约 0.01×10^3 FFU/mL 的病毒。可采用下式确定为达到所需终浓度加入的病毒量:

[0130] 病毒量(μ L) = 培养基体积 (mL) $\times$ 终浓度 (FFU/mL) / $10^{\text{病毒 FFA 效价}}$ (FFU/mL) $\times$ 1000。

[0131] 可任选加入蛋白酶,其可引起对血凝素前体蛋白 [HA₀] 的切割并由此吸附细胞上的病毒。可根据本发明在用流感病毒感染细胞之前不久、同时或之后不久加入蛋白酶。如果在感染同时加入,所述蛋白酶可直接向待感染的细胞培养物加入或例如以浓缩物形式连同病毒接种物加入。在本发明的某些方面,所述蛋白酶是丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶或天冬酰胺蛋白酶。在一个实施方式中,采用胰蛋白酶。在一个具体实施方式中,采用 TPCK 处理的胰蛋白酶。在一个实施方式中,向细胞培养物加入胰蛋白酶直到达到 1-5000mU/mL、5-1000mU/mL 或 100-500mU/mL 的终浓度。在一个替代实施方式中,向细胞培养物加入胰蛋白酶直到在培养基中达到 1-200 μ g/mL、5-50 μ g/mL 或 5-30 μ g/mL 的终浓度。

[0132] 所述蛋白酶可来自动物来源,或更优选来自重组来源。适用的重组蛋白酶易于从多个商业来源包括例如英杰公司 (TrypLE™)、西格玛-奥德里奇公司 (TrypZean™) 以储备溶液形式(例如 1X-100X) 获得。在某些实施方式中,所用重组蛋白酶的终浓度在约 0.01X 到约 1X 之间、约 0.02X 到约 0.8X 之间、约 0.03X 到约 0.7X 之间、约 0.04X 到约 0.6X 之间、约 0.05X 到约 0.5X 之间、约 0.06X 到约 0.4X 之间、约 0.07X 到约 0.3X 之间或约 0.8X 到约 0.2X 之间。在一个特定实施方式中,所用重组蛋白酶的终浓度在约 0.02X 到约 0.06X 之间。

在另一个实施方式中,所述蛋白酶是重组胰蛋白酶样蛋白酶,包括但不限于 TrypLE™(英杰公司)。在另一个实施方式中,如美国专利申请第 11/455,818 号所述,蛋白酶来自灰色链霉菌。

[0133] 感染之后,进一步培养受感染的细胞培养物以复制病毒,具体而言,直到可检测到最大致细胞病变效应或最大病毒或抗原量。在一个实施方式中,感染之后,在 30℃ 到 37℃ 之间的温度下培养细胞。在某些实施方式中,用病毒感染之后,在低于 39℃、低于 38℃、低于 37℃、低于 36℃、低于 35℃、低于 34℃、低于 33℃、低于 32℃、低于 31℃ 或低于 30℃ 的温度培养细胞。在 33℃ 以下的温度,具体为上述温度范围培养感染细胞引起某些流感病毒例如乙型毒株的高产率生产(参见例如美国专利公开 2006/0153872)。此外,考虑在 35℃ 以下的温度培养感染细胞以便生产温度敏感性冷适应(ts/ca)流感病毒。考虑 ts/ca 病毒也可被减毒(att)。在另一个实施方式中,在低于 30℃、低于 31℃、低于 32℃、低于 33℃ 或低于 34℃ 的温度培养细胞以便生产 ts/ca 流感毒株。在一个具体实施方式中,在 31℃ 的温度培养细胞以便生产乙型流感病毒毒株。在另一个实施方式中,感染之后,在 31±2℃ 的温度培养细胞。

[0134] 在某些实施方式中,感染之后将细胞温育(步骤(c))充足时间,如 2-10 天或任选 3-7 天以产生合适产率的病毒。在所述方法的一个实施方式中,感染之后将细胞温育(步骤(c))温育 2 天、3 天、4 天、5 天、6 天或 7 天。在其它实施方式中,感染之后将细胞温育(步骤(c))40-96 个小时。在一个具体实施方式中,感染之后将细胞温育(步骤(c))48-72 个小时。

[0135] 在所述方法的某些实施方式中,用病毒感染(步骤(b))之后,可例如温育细胞,如上所述维持搅拌速率、pH、pO₂ 值、CO₂ 浓度和其它参数(参见第 0 和 0 节)。

[0136] 在某些实施方式中,所述方法还包括步骤(c)后收获包含复制病毒的培养基(即已培养感染细胞的培养基)的步骤。收获的包含复制病毒的培养基在本文也称为“病毒收获物”。

[0137] 在一个实施方式中,在收获包含复制病毒的培养基之前,使用于增殖 MDCK 细胞的任何微载体沉降。或者或任选地,可利用交互低剪切切向流(ATF)装置收获包含复制病毒的培养基,参见例如 U. S. 6,544,424。采用 ATF 装置可减少或甚至消除收获前微载体沉降所需时间。在另一个实施方式中,用合适的缓冲液稳定病毒收获物。

[0138] 在一个具体实施方式中,通过加入包括但不限于蔗糖磷酸盐(SP)缓冲液的浓缩缓冲液稳定病毒收获物,可加入所述浓缩缓冲液在稳定病毒收获物中达到约 218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 磷酸盐缓冲液的终浓度。

[0139] 在另一个具体实施方式中,将收获包含复制病毒的培养基的步骤与复制病毒的纯化结合。例如,可采用交互切向流(ATF)收获包含复制病毒的培养基,收获的材料可直接进行以下详述的一个或多个纯化步骤。

[0140] 6.5 疫苗材料的纯化

[0141] 本发明提供纯化病毒,具体为在细胞培养物中复制供临床应用的活病毒的可靠方法。本发明的纯化方法可用于从哺乳动物细胞培养物纯化病毒,所述哺乳动物细胞包括但不限于:人二倍体肺成纤维细胞系(例如, MRC-5 和 WI-38)、人成视网膜细胞瘤细胞系、人肾细胞系(例如, PER. C6 和 293)、胎儿猕猴肺细胞系(例如 FRhL2)、非洲绿猴肾细胞系

(例如 Vero) 和狗肾细胞系 (例如 MDCK)。本发明的纯化方法提供的病毒, 具体为活病毒的总回收率高, 使宿主细胞 DNA (HCD)、宿主细胞蛋白质 (HCP) 和非特异性内切核酸酶 (例如 Benzonase) 的水平低于管理机构要求的规格。

[0142] 减少病毒制备物的 HCD 量对意图临床用于动物 (包括人) 的病毒特别重要。此外, 考虑到任何残留 HCD 的大小均应小于癌基因的平均大小 (1925 个碱基对) 以降低致癌可能性。因此, 在一个方面, 本发明提供将任何残留 HCD 的量和大小降低到可注射疫苗可接受的水平 (WHO 推荐胃肠道外给予疫苗为每剂量 10ng ;Griffiths, 1999, 《发育生物学标准 (Dev Biol Stand)》瑞士巴塞尔卡格公司出版 (Basel, Karger), 第 98 卷, 第 153-157 页) 以下的纯化流感病毒或 RSV 的方法。在另一个方面, 本发明提供将任何残留 HCD 的量和大小降低到 150ng/ 剂量水平以下的纯化吸入病毒的方法。

[0143] 在某些实施方式中, 纯化病毒包含少于约 10ng HCD/ 剂量、少于约 9ngHCD/ 剂量、少于约 8ng HCD/ 剂量、少于约 7ng HCD/ 剂量、少于约 6ngHCD/ 剂量、少于约 5ng HCD/ 剂量、少于约 4ng HCD/ 剂量、少于约 3ngHCD/ 剂量、少于约 2ng HCD/ 剂量、少于约 1ng HCD/ 剂量、少于约 0.8ngHCD/ 剂量、少于约 0.6ng HCD/ 剂量、少于约 0.4ng HCD/ 剂量或少于约 0.2ng HCD/ 剂量。在一个具体实施方式中, 纯化病毒包含少于约 1ng HCD/ 剂量、少于约 0.8ng HCD/ 剂量、少于约 0.6ng HCD/ 剂量、少于约 0.4ng HCD/ 剂量或少于约 0.2ng HCD/ 剂量。

[0144] 在某些实施方式中, 纯化病毒包含少于约 200ng HCD/ 剂量、少于约 190ng HCD/ 剂量、少于约 180ng HCD/ 剂量、少于约 170ng HCD/ 剂量、少于约 160ng HCD/ 剂量、少于约 150ng HCD/ 剂量、少于约 140ng HCD/ 剂量、少于约 130ng HCD/ 剂量、少于约 120ng HCD/ 剂量、少于约 110ng HCD/ 剂量、少于约 100ng HCD/ 剂量、少于约 90ng HCD/ 剂量、少于约 80ng HCD/ 剂量或少于约 70ng HCD/ 剂量。在一个具体实施方式中, 纯化病毒包含少于约 120ng HCD/ 剂量、少于约 105ng HCD/ 剂量、少于约 100ng HCD/ 剂量、少于约 90ng HCD/ 剂量或少于约 75ng HCD/ 剂量。

[0145] 在其它实施方式中, 所述纯化病毒是流感病毒, 包含少于约 10ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 9ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 8ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 7ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 6ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 5ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 4ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 3ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 2ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 1ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.8ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.6ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.4ngHCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 或少于约 0.2ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU。在一个具体实施方式中, 所述纯化病毒包含少于约 1ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.8ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.6ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.4ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 或少于约 0.2ng HCD/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU。

[0146] 在一个实施方式中, 采用 PicoGreen 试验测定 HCD 量。在另一个实施方式中, 采用实时聚合酶链反应 (rtPCR) 测定 HCD 量。可采用第 8.3 节提供的实施例中示例的方法进行这些鉴定试验。

[0147] 在某些实施方式中, 纯化病毒中存在的至少约 50%、至少约 60%、至少约 70% 或

至少约 80% 的 HCD 长度少于约 1000 个碱基对 (bp)。在一个具体实施方式中,纯化病毒中存在的至少约 80% 的 HCD 长度少于约 1000bp。在另一个具体实施方式中,纯化病毒中存在的约 90% 的 HCD 长度少于约 1000bp。在其它实施方式中,纯化病毒中存在的至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70% 或至少约 80% 的 HCD 长度少于约 500bp。在一个具体实施方式中,纯化病毒中存在的至少约 60% 的 HCD 长度少于约 500bp。

[0148] 在一些实施方式中,所述纯化病毒包含少于约 100 μ g HCP/ 剂量、少于约 90 μ g HCP/ 剂量、少于约 80 μ g HCP/ 剂量、少于约 70 μ g HCP/ 剂量、少于约 60 μ g HCP/ 剂量、少于约 50 μ g HCP/ 剂量、少于约 40 μ g HCP/ 剂量、少于约 30 μ g HCP/ 剂量、少于约 20 μ g HCP/ 剂量、约 10 μ g HCP/ 剂量、少于约 9 μ g HCP/ 剂量、少于约 8 μ g HCP/ 剂量、少于约 7 μ g HCP/ 剂量、少于约 6 μ g HCP/ 剂量、少于约 5 μ g HCP/ 剂量、少于约 4 μ g HCP/ 剂量、少于约 3 μ g HCP/ 剂量、少于约 2 μ g HCP/ 剂量、少于约 1 μ g HCP/ 剂量、少于约 0.8 μ g HCP/ 剂量、少于约 0.6 μ g HCP/ 剂量、少于约 0.4 μ g HCP/ 剂量或少于约 0.2 μ g HCP/ 剂量。在一个具体实施方式中,所述纯化病毒包含少于约 1ngHCP/ 剂量、少于约 0.8 μ g HCP/ 剂量、少于约 0.6 μ g HCP/ 剂量、少于约 0.4 μ g HCP/ 剂量或少于约 0.2 μ g HCP/ 剂量。

[0149] 在其它实施方式中,所述纯化病毒是流感病毒,包含少于约 10 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 9 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 8 μ gHCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 7 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 6 μ gHCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 5 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 4 μ gHCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 3 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 2 μ gHCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 1 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.8 μ gHCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.6 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.4 μ gHCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 或少于约 0.2 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU。在一个具体实施方式中,所述纯化病毒包含约 1ng HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.8 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.6 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU、少于约 0.4 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 或少于约 0.2 μ g HCP/ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU。

[0150] 在一个实施方式中,采用 HCP 的抗体检测通过酶联免疫吸附鉴定 (ELISA) 测定 HCP 量。可采用第 8.3 节提供的实施例中示例的方法进行该鉴定试验。

[0151] 制备用于疫苗组合物的灭活/裂解病毒颗粒的方法为本领域熟知,已使用了 40 余年。然而,这些方法引入了苛刻的步骤,如用去污剂或甲醛处理,其通常不可用于制备完整的病毒颗粒,特别是减毒的活病毒。因此,本发明提供采用足以从病毒收获物分离 HCD 和 HCP 的膜和条件来纯化完整的活病毒(例如流感病毒或 RSV)的方法。本发明的方法提供高活病毒总回收率。在一个实施方式中,纯化病毒的总回收率为至少 3%、至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60% 或至少 70%。监测纯化活病毒回收率的方法包括为测定病毒感染和/或生长设计的鉴定试验。例如,可采用聚焦荧光鉴定和中值组织培养感染性量 (TCID₅₀) 鉴定监测纯化活流感病毒的回收率。在某些实施方式中,本发明的纯化病毒的方法提供至少 30% 的病毒总回收率,其中所述纯化病毒在每 $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 病毒中包含少于 0.1ng HCD、少于 0.3 μ g HCP 和少于 0.0050ng 非特异性核酸酶。

[0152] 病毒收获物的纯化包括多个步骤,可根据所述病毒和纯化条件进行优化。在某些

实施方式中,所述纯化方法可以单独或组合形式包括以下任何一个步骤:a)澄清病毒收获物;b)浓缩和/或缓冲液交换;c)通过色谱纯化和d)无菌过滤。这些步骤可包括其它步骤,如用非特异性内切核酸酶处理和稳定病毒收获物或病毒载荷。这些步骤可在纯化过程中多次进行,以最大程度提高病毒回收率,同时如上所述充分去除 HCP 和 HCD。

[0153] 可用于澄清病毒收获物的方法包括但不限于离心、透析和膜过滤,其包括但不限于,如液体直接流过滤介质的单程死端直流过滤 (DF) 和液体沿膜表面切向流动的交叉流或切向流过滤 (TFF) 这样的方法。可运行 TFF 系统以保持恒定的滤液流量速率 (Filtrate Flux rate) (常简称为“流量 (Flux)”,可测定为每小时每平方米膜的渗透液升数 (LMH)) 或保持恒定的跨膜压力 (缩写为“TMP”,可测定为每平方英寸的磅数 (psi))。然而,可调节恒定的流和 TMP 以防止膜积垢。用于过滤应用的膜可从商业来源获得。

[0154] 本领域中普遍接受四种类型的膜,由其从载体液体去除的材料大小限定。按孔径最小到最大排列,它们是反渗透膜、纳米过滤膜、超滤膜和微滤膜。用上述膜进行过滤通过采用具有特定孔径的膜将分子根据其分子量进行分离。例如,采用孔径小于 0.001 微米的反渗透膜的分离用来分离分子量小于 200 道尔顿的分子。采用孔径为 0.001–0.008 微米 (包括端值) 的纳米过滤膜的过滤用来分离分子量为 200 道尔顿到 15 千道尔顿 (kDa) (包括端值) 的分子。采用孔径为 0.005–0.1 微米 (包括端值) 的超滤膜的过滤用来分离分子量为 5kDa–300kDa (包括端值) 的分子。采用孔径为 0.05–3.0 微米 (包括端值) 的微滤膜的过滤用来分离分子量为 100kDa–3000kDa 和更大的分子。因此,膜过滤可通过利用具有由膜孔径决定的特定分子量截留值 (MWCO) 的膜根据尺寸排阻分离感兴趣的分子 (例如病毒) 与其它细胞组分。MWCO 也称为标称分子量界限 (NMWL) 或标称分子量截留值 (NMWCO),是膜过滤的千道尔顿大小名称。将 MWCO 定义为 90% 被膜截留的分子的分子量。因为例如,分子量相同的分子可具有显著不同的形状,所以 MWCO 不是精确的度量,但其仍为一种有用的度量并常为过滤器制造商所用。所用膜可采用平坦薄片或螺旋环绕式构造。也可根据过滤方法的类型采用中空纤维。可采用任何数量的潜在膜材料,包括但不限于:再生纤维素、聚醚砜 (可经或可不经改性以改变其固有的疏水性)、聚偏氟乙烯 (PVDF)、陶瓷和金属氧化物聚集体以及聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯和 PTFE (TEFLON®)。考虑到可在分离中采用过滤方法和膜类型的组合,并根据处理材料的体积和/或浓度调整包含分离膜的过滤器、柱等的容量。

[0155] 可用于浓缩和/或缓冲液交换的方法包括但不限于透析、超滤 (UF) 和膜渗滤 (DF)。TFF 可同时包括可用于浓缩的 UF 和可用于交换缓冲液的 DF。此外,采用 UF 和/或 DF 可引起分级过程的额外纯化,其通过膜洗涤可以是污染物的较小分子,将感兴趣的较大分子留在渗余物中。因此,包括 UF 和/或 DF 的 TFF 可用来浓缩和/或交换缓冲液和/或进行纯化。用于过滤应用的膜的选择如上所述。根据本发明,DF 可以是不连续或连续的 DF。在不连续 DF 中,溶液浓缩,损失的体积被新的缓冲液替换。在连续 DF 中,通过流入新的缓冲溶液保持溶液体积,同时移出旧的缓冲溶液。

[0156] 在某些实施方式中,澄清病毒浓缩约 2X、约 3X、约 4X、约 5X、约 6X、约 7X、约 8X、约 9X、约 10X 或更多,其中“X”等于加入操作/最终渗余物体积的总起始体积。在一个具体实施方式中,所述澄清病毒浓缩约 3X 到约 5X 之间。在另一个具体实施方式中,所述澄清病毒浓缩约 4X,其中“X”等于加入操作/最终渗余物体积的总起始体积。在某些实施方式中,所述澄清病毒浓缩约 10X 或更多,以增加所有随后纯化步骤的加载量。在某些实施方式中,浓

缩之后,通过 DF 交换约 1 体积倍数 (diavolume)、约 2 体积倍数、约 3 体积倍数、约 4 体积倍数、约 5 体积倍数、约 6 体积倍数、约 7 体积倍数、约 8 体积倍数、约 9 体积倍数、约 10 体积倍数或更多体积倍数的缓冲液,其中体积倍数是在 DF/ 渗余物体积中引入操作的总缓冲液体积。在一个具体实施方式中,交换约 4 体积倍数到约 6 体积倍数的缓冲液,其中体积倍数是在 DF/ 渗余物体积中引入操作的总缓冲液体积。在另一个具体实施方式中,交换约 5 体积倍数的缓冲液,其中体积倍数是在 DF/ 渗余物体积中引入操作的总缓冲液体积。

[0157] 在某些实施方式中,在交换所需体积的缓冲液之后收集包含病毒 (例如,流感病毒、RSV) 的渗余物。在收集渗余物之后,一些病毒可与膜保持弱结合。因此,在一些实施方式中,用向收集的渗余物加入的额外交换缓冲液漂洗所述膜。所述收集的渗余物在本文也称为“条件病毒载荷”或“#XUF#XDF”,其中“#”表示 UF 和 DF 过程分别交换的缓冲液的浓缩倍数或体积倍数的数量。在一个具体实施方式中,将具有 500kDa MWCO 的膜用于浓缩和缓冲液交换。在一些实施方式中,可在过程后清洁所述膜并重复使用。在其它实施方式中,将新膜用于各批次澄清病毒。在另一个具体实施方式中,浓缩澄清收获物,如第 8.3 和 8.4 节提供的实施例所示交换缓冲液。

[0158] 可用于纯化病毒 (例如,流感病毒或 RSV) 的色谱类型包括但不限于亲和色谱以及离子交换色谱和 / 或羟基磷灰石色谱。在某些实施方式中,采用离子交换色谱。在一个实施方式中,采用阳离子交换色谱。在另一个实施方式中,在高 pH 进行阳离子交换色谱。在一个实施方式中,采用阴离子交换色谱。在一个具体实施方式中,采用强季铵 (Q) 阴离子交换剂 (例如,Capto™ Q,GE 医疗保健公司)。在另一个实施方式中,在低 pH 进行阴离子交换色谱。可用于离子交换色谱的阴离子介质包括但不限于阴离子膜吸附剂 (例如,Sartobind® Q15、D15) 和阳离子膜吸附剂 (例如,Sartobind® S15 和 C15)。在另一个实施方式中,采用阴性色谱,其中通过阴离子或阳离子交换结合杂质,随后从所述杂质如宿主细胞蛋白质和 / 或核酸分离或纯化病毒。考虑到可在分批过程中或采用柱过程进行所述色谱。在某些实施方式中,条件病毒载荷通过柱色谱纯化。

[0159] 可用于有效去除污染性 HCD 的方法包括连同纯化过程的其它步骤,用非特异性内切核酸酶 (例如 Benzonase®) 进行处理。然而,就用于动物 (包括人) 临床应用的病毒而言,希望最终纯化病毒中非特异性内切核酸酶的量达到最小。因此,在另一个方面,本发明提供将方法中所用的任何残留非特异性内切核酸酶量降低到可注射疫苗的可接受水平以下的纯化病毒的方法。

[0160] 在一个实施方式中,所述纯化病毒每剂量包含少于约 0.0060ng、少于约 0.0055ng、少于约 0.0050ng、少于约 0.0045ng、少于约 0.0040ng、少于约 0.0035ng、少于约 0.0030ng、少于约 0.0025ng、少于约 0.0020ng、少于约 0.0015ng、少于约 0.0010ng 或更少的非特异性内切核酸酶。在一个具体实施方式中,所述纯化病毒每剂量包含少于约 0.0040ng、少于约 0.0035ng、少于约 0.0030ng、少于约 0.0025ng 的非特异性内切核酸酶。

[0161] 在其它实施方式中,所述纯化病毒是流感病毒或 RSV,每 $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 包含少于约 0.0060ng、少于约 0.0055ng、少于约 0.0050ng、少于约 0.0045ng、少于约 0.0040ng、少于约 0.0035ng、少于约 0.0030ng、少于约 0.0025ng、少于约 0.0020ng、少于约 0.0015ng、少于约 0.0010ng 或更少的非特异性内切核酸酶。在一个具体实施方式中,所述纯化病毒是流感病毒或 RSV,每 $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 包含少于约 0.0040ng、少于约 0.0035ng、少于约

0.0030ng、少于约 0.0025ng 的非特异性内切核酸酶。在另一个具体实施方式中,所述纯化病毒是 RSV,每 $5.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 包含少于约 0.009ng、少于约 0.01ng 或少于检测水平 (ELISA 测定为 0.1ng/mL) 以下的非特异性内切核酸酶。在另一个具体实施方式中,所述非特异性内切核酸酶是 Benzonase®。

[0162] 无菌性对用于动物 (包括人) 临床应用的那些病毒和 / 或病毒组分特别重要。因此,本发明的纯化病毒 (例如,流感病毒或 RSV) 方法包括灭菌,可作为末端过滤步骤 (例如 RSV) 或采用已知的灭菌方法 (例如流感病毒) 进行。可用于疫苗组分 (例如,病毒、递送装置等) 灭菌的方法包括但不限于:辐射、过滤、化学处理和其它合适的方案。在一个实施方式中,通过过滤对配制的病毒批量灭菌。可用于灭菌的过滤方法包括但不限于如上所述的单程死端直流过滤 (DFF) 和切向流过滤 (TFF)。然而,由于 RSV 的脆弱性质,该病毒不可采用灭菌梯度过滤器灭菌。

[0163] 本文提供纯化用于配制疫苗的流感病毒和 RSV 的特定方法。

[0164] 6.5.1 流感病毒的纯化

[0165] 在某些实施方式中,待纯化的病毒是流感病毒 (例如,冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒)。

[0166] 在一个实施方式中,从细胞培养物纯化病毒的方法包括以下步骤:

[0167] (a) 澄清病毒收获物;

[0168] (b) 在步骤 (a) 之后进行浓缩和 / 或缓冲液交换;

[0169] (c) 在步骤 (b) 之后通过色谱进行纯化;

[0170] (d) 在步骤 (c) 之后进行浓缩和 / 或缓冲液交换;和

[0171] (e) 在步骤 (d) 之后灭菌。

[0172] 在一个实施方式中,所述病毒是流感病毒。在一个具体实施方式中,所述流感病毒是冷适应和 / 或温度敏感性和 / 或减毒流感病毒。

[0173] 在一个具体实施方式中,步骤 (a)、(b)、(d) 和 (e) 通过膜过滤进行。在另一个具体实施方式中,步骤 (b) 和 (d) 通过切向流过滤进行。在另一个具体实施方式中,步骤 (a) 和 (e) 通过直流过滤进行。在另一个具体实施方式中,步骤 (b) 同时包括超滤浓缩和通过渗滤进行缓冲液交换。在另一个具体实施方式中,步骤 (d) 仅包括浓缩。纯化病毒方法的其它实施方式如下详述。

[0174] 在一个具体实施方式中,步骤 (c) 通过亲和柱色谱进行。在另一个具体实施方式中,步骤 (c) 还包括非特异性核酸酶处理。

[0175] 如上所述,可在收获后稳定获自细胞培养物的病毒 (例如通过加入蔗糖磷酸盐 (SP))。因此,本发明的纯化方法包括澄清稳定的病毒收获物。或者可结合收获和澄清步骤。例如,可采用 ATF 收获细胞培养物复制病毒,并将病毒收获物泵入用于澄清所述病毒的介质和 / 或装置中。

[0176] 例如,可先通过在例如 1000–2000xg 离心一段足以去除细胞碎片和其它大颗粒物的时间,例如 10–30 分钟来澄清来自感染培养物的粗培养基。或者,通过孔径限定范围大到足以允许病毒通过而截留完整细胞和其它大颗粒物的半透膜过滤所述培养基。

[0177] 在一个实施方式中,采用孔径大到足以使病毒通过但小到足以截留完整细胞和细胞碎片的 MF 膜通过 DFF 和 / 或 TFF 澄清病毒收获物。在一个实施方式中,采用孔径为约 1.2

微米或更小的至少一个膜通过 DFF 和 / 或 TFF 澄清病毒收获物。在一个具体实施方式中, 采用孔径在约 1.2 微米到约 0.45 微米之间的至少一个膜通过 DFF 澄清病毒收获物。在另一个具体实施方式中, 采用孔径为 1.2 微米的第一膜和孔径为 0.45 微米的第二膜通过 DFF 澄清病毒收获物。在某些实施方式中, 采用聚丙烯和 / 或 PVDF 膜。在另一个具体实施方式中, 如第 8.3 节中提供的实施例所示通过 DFF 澄清病毒收获物。在另一个具体实施方式中, 将细胞培养物复制病毒的收获与 DFF 步骤结合。例如, 收获细胞培养物复制病毒, 并将其直接用于 DFF 介质和装置。结合收获和澄清步骤减少操作步骤, 消除对收获罐的需求, 并减少总处理时间。

[0178] 在一个实施方式中, 浓缩澄清收获物和 / 或交换缓冲液。在一个实施方式中, 通过 UF 和 DF 进行浓缩和 / 或缓冲液交换。在另一个实施方式中, 将 TFF 同时用于 UF 和 DF。在另一个具体实施方式中, 将细胞培养物复制病毒的收获与结合 TFF 步骤的 DFF 步骤偶联。结合收获、澄清和浓缩 / 缓冲液交换步骤减少操作数量并减少总处理时间。在某些实施方式中, 运行 TFF 以保持恒定的滤液流量速率。在其它实施方式中, 运行 TFF 以保持恒定的 TMP。在某些实施方式中, 先通过 UF 浓缩澄清病毒, 然后通过 DF 交换缓冲液。考虑到所述交换缓冲液可能与病毒收获物中存在的缓冲液相同或不同。在一个实施方式中, 所述交换缓冲液是中性 pH 的 SP 缓冲液。在一个具体实施方式中, 所述交换缓冲液包含 (一种或多种组分的变化在 10% 以内) 218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液。在一个具体实施方式中, 所述交换缓冲液由 (一种或多种组分的变化在 10% 以内) 218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液组成。在某些实施方式中, 在交换所需体积的缓冲液之后收集包含病毒 (例如流感病毒) 的渗余物。在收集渗余物之后, 一些病毒可与膜保持弱结合。因此, 在一些实施方式中, 用向收集的渗余物加入的额外交换缓冲液漂洗所述膜。所述收集的渗余物在本文也称为“条件病毒载荷”或“#XUF#XDF”, 其中“#”表示 UF 和 DF 过程分别交换的缓冲液的浓缩倍数或体积倍数的数量。在一个具体实施方式中, 将具有 500kDa MWCO 的膜用于浓缩和缓冲液交换。在一些实施方式中, 可在过程后清洁所述膜并重复使用。在其它实施方式中, 将新膜用于各批次澄清病毒。在另一个具体实施方式中, 浓缩澄清收获物, 如第 8.3 和 8.4 节提供的实施例所示交换缓冲液。

[0179] 在某些实施方式中, 条件病毒载荷通过色谱纯化。在一些实施方式中, 条件病毒载荷通过亲和和色谱纯化。可利用具有类似分离性质的各种亲和和色谱介质, 例如, 可利用多种亲和和色谱介质浓缩和纯化多种病毒和病毒蛋白质, 包括但不限于 N(对氨基苯基) 草氨酸琼脂糖、Cellufine™ 硫酸酯。在一个具体实施方式中, 将 Cellufine™ 硫酸酯 (奇索公司 (Chisso Corp.)) 亲和介质用于亲和和色谱。在另一个实施方式中, 将 FluSelect™ (GE 医疗保健公司) 用于亲和和色谱。在某些实施方式中, 将条件病毒载荷直接加载到亲和介质上。在某些实施方式中, 可使未结合材料通过亲和介质以促进其它病毒结合。

[0180] 在一个实施方式中, 向每毫升亲和介质加载约 $10^{9.0}$ 到约 10^{10} 、约 $10^{9.2}$ 到约 $10^{9.8}$ 、约 $10^{9.4}$ 到约 $10^{9.6}$ 个病毒颗粒。在另一个实施方式中, 向每毫升亲和介质加载至少约 $10^{9.0}$ 、至少约 $10^{9.1}$ 、至少约 $10^{9.2}$ 、至少约 $10^{9.3}$ 、至少约 $10^{9.4}$ 、至少约 $10^{9.5}$ 、至少约 $10^{9.6}$ 、至少约 $10^{9.7}$ 、至少约 $10^{9.9}$ 或至少约 $10^{9.9}$ 个病毒颗粒。在某些实施方式中, 所述病毒颗粒是活病毒。确定样品中活病毒数量的方法如本文所述。

[0181] 在另一个实施方式中, 向每毫升亲和介质加载约 $9.0 \log_{10}$ FFU 到约 $10 \log_{10}$ FFU、约

9.2log₁₀FFU 到约 9.8log₁₀FFU、约 9.4log₁₀FFU 到约 9.6log₁₀FFU 的病毒。在另一个实施方式中,向每毫升亲和介质加载至少约 9.0log₁₀FFU、至少约 9.1log₁₀FFU、至少约 9.2log₁₀FFU、至少约 9.3log₁₀FFU、至少约 9.4log₁₀FFU、至少约 9.5log₁₀FFU、至少约 9.6log₁₀FFU、至少约 9.7log₁₀FFU、至少约 9.8log₁₀FFU 或至少约 9.9log₁₀FFU 的病毒。在一个具体实施方式中,采用 Cellufine™ 硫酸酯(奇索公司)亲和介质,向每毫升 Cellufine™ 硫酸酯加载 9.2log₁₀FFU 到 9.8log₁₀FFU 的病毒。在另一个具体实施方式中,采用 Cellufine™ 硫酸酯(奇索公司)亲和介质,向每毫升 Cellufine™ 硫酸酯加载 9.4log₁₀FFU 到 9.6log₁₀FFU 的病毒。在另一个具体实施方式中,采用 Cellufine™ 硫酸酯(奇索公司)亲和介质,向每毫升 Cellufine™ 硫酸酯加载至少约 9.4log₁₀FFU、至少约 9.5log₁₀FFU、至少约 9.6log₁₀FFU 或至少约 9.7log₁₀FFU 的病毒。

[0182] 在一个实施方式中,用其中病毒与亲和介质保持结合的充足体积的缓冲液(例如 SP 缓冲液)洗涤亲和介质,以从亲和介质去除未结合和弱结合的污染物。在某些实施方式中,所述洗涤缓冲液包含(一种或多种组分的变化在 10%以内)218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液。在另一个具体实施方式中,所述洗涤缓冲液由(一种或多种组分的变化在 10%以内)218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液组成。在某些实施方式中,洗涤之后采用充足体积的缓冲液从亲和介质洗脱病毒并收集所述病毒,其中所述病毒不与亲和树脂结合,以洗脱所述病毒而不释放与柱结合的任何污染物。在某些实施方式中,所述洗脱缓冲液包含盐。可用于从亲和柱洗脱病毒(例如流感病毒)的盐包括氯化钠、氯化钾、氯化铵、氯化镁和氯化钙。通常向所述树脂施用 0 到 1.0M 浓度范围的梯度或步骤的洗脱缓冲液。用作洗脱缓冲液中盐的阳离子和阴离子的有效性与霍夫梅斯特系列(Hofmeister series)系列相关联,其中常用阳离子的置换顺序为:Ca²⁺ > Mg²⁺ > Na⁺ > K⁺ > NH₄⁺,常用阴离子的置换有效性顺序为:PO₄³⁻ > SO₄²⁻ > COO⁻ > Cl⁻。在一个实施方式中,所述洗脱缓冲液包含(变化在 10%以内)终浓度为 1M 的氯化钠。在另一个实施方式中,所述洗脱缓冲液包含(一种或多种组分的变化在 10%以内)1M 氯化钠、218mM 蔗糖和 11mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液。收集的洗脱病毒在本文也称为“纯化病毒洗出液”。可通过监测紫外(UV)吸光度,特别是 280 纳米的吸光度来监测病毒洗脱。在一些实施方式中,通过柱色谱纯化条件病毒载荷,其中监测病毒洗脱并收集包含病毒的特定组分。在希望最大程度减小洗脱病毒体积时可采用这样的方法。在另一个具体实施方式中,如第 8.3 节中提供的实施例所示通过色谱纯化条件病毒载荷。

[0183] 在某些实施方式中,纯化病毒(例如流感病毒)的方法包括非特异性内切核酸酶(例如 Benzonase®)处理。在某些实施方式中,所述非特异性内切核酸酶处理在病毒纯化的早期进行。在一个实施方式中,非特异性内切核酸酶处理在步骤(a)之后但在步骤(b)之前进行。在另一个实施方式中,非特异性内切核酸酶处理在步骤(b)之后但在步骤(c)之前进行。或者在步骤(c)中用非特异性内切核酸酶处理病毒。该方法的优点见第 8.3 节提供的实施例所示。在一个具体实施方式中,条件病毒载荷与亲和介质结合,然后与包含非特异性内切核酸酶的缓冲液接触。在一些实施方式中,缓冲液中存在的非特异性内切核酸酶的浓度在约 10U/mL 和约 100U/mL 之间。在其它实施方式中,缓冲液中存在的非特异性内切核酸酶的浓度在约 40U/mL 和约 60U/mL 之间。在一个实施方式中,所述非特异性内切核酸酶存在于包含蔗糖的缓冲液中。在一个具体实施方式中,所述非特异性内切核酸酶存在

于包含 218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 磷酸盐缓冲液的缓冲液中。在另一个具体实施方式中,由(一种或多种组分的变化在 10%以内)218mM 蔗糖、11mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液组成的缓冲液中存在的特异性内切核酸酶的终浓度在约 40U/mL 到约 60U/mL 之间。在某些实施方式中,调整加载和洗涤条件以确保结合的病毒将与非特异性内切核酸酶接触约 10 分钟到约 120 分钟。在一个实施方式中,调整加载和洗涤条件以确保结合的病毒将与非特异性内切核酸酶接触约 40 分钟到约 80 分钟。在其它实施方式中,调整加载和洗涤条件以确保结合的病毒与非特异性内切核酸酶接触至少 10 分钟、至少 20 分钟、至少 30 分钟、至少 40 分钟、至少 50 分钟、至少 60 分钟、至少 70 分钟、至少 80 分钟、至少 90 分钟、至少 100 分钟、至少 110 分钟或至少 120 分钟。在本发明的某些方面,可调整与非特异性内切核酸酶的接触时间、非特异性内切核酸酶的浓度和包含非特异性内切核酸酶的缓冲液体积。例如,为最大程度减少切割 DNA 污染物所需时间,可增大非特异性内切核酸酶的浓度,或者,为最大程度减少所用非特异性内切核酸酶的量,可增加接触时间。非特异性内切核酸酶处理之后,优选其中病毒与亲和介质保持结合的充足体积的缓冲液(例如 SP 缓冲液)洗涤亲和介质,以去除任何残留的消化 DNA 污染物。因此,在某些实施方式中,在非特异性内切核酸酶处理之前和/或之后如上所述洗涤亲和树脂。在另一个具体实施方式中,所述非特异性内切核酸酶是 Benzonase®。在另一个具体实施方式中,在如第 8.3 节提供的实施例所示进行亲和色谱纯化的同时用 Benzonase®处理条件病毒载荷。

[0184] 在本发明的某些方面,色谱纯化之后,浓缩纯化病毒洗出液和/或交换缓冲液。可用于浓缩和/或缓冲液交换的方法如上所述。在某些实施方式中,采用 DF 交换纯化病毒洗出液的缓冲液。在一个实施方式中,通过 DF 交换大于约 5 体积倍数的缓冲液,其中体积倍数是在 DF/ 渗余物体积中引入操作的总缓冲液体积。交换大于约 5 体积倍数的优点在第 8.3 节提供的实施例中详述。在另一个实施方式中,通过 DF 交换约 6 体积倍数、约 7 体积倍数、约 8 体积倍数、约 9 体积倍数、约 10 体积倍数或更多体积倍数的缓冲液,其中体积倍数是在 DF/ 渗余物体积中引入操作的总缓冲液体积。在一个具体实施方式中,通过 DF 交换约 8 体积倍数或更多体积倍数的缓冲液,其中体积倍数是在 DF/ 渗余物体积中引入操作的总缓冲液体积。在一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含(一种或多种组分的变化在 10%以内)200mM 蔗糖、100mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液。在另一个具体实施方式中,所述交换缓冲液由(一种或多种组分的变化在 10%以内)200mM 蔗糖、100mM pH 7.0-7.4 的磷酸盐缓冲液组成。在某些实施方式中,在交换所需体积的缓冲液之后收集包含病毒的渗余物。在收集渗余物之后,一些病毒可与膜保持弱结合。因此,在一些实施方式中,用向收集的渗余物加入的额外交换缓冲液漂洗所述膜。收集的渗余物在本文也称为“配制病毒批量”或“#XDF”,其中“#”表示在 DF 过程中分别交换的缓冲液体积倍数的数量。在一个具体实施方式中,将具有 500kDa MWCO 的膜用于浓缩和/或缓冲液交换。在一些实施方式中,可在过程后清洁所述膜并重复使用。在其它实施方式中,将新膜用于各批次纯化病毒洗出液。在另一个具体实施方式中,如第 8.3 节中提供的实施例所示交换纯化病毒洗出液的缓冲液。在其它实施方式中,如上所述通过 UF 浓缩澄清病毒并通过 DF 交换缓冲液。包括 UF 步骤将减少所得配制病毒批量的体积。在某些实施方式中,所述病毒洗出液浓缩约 2X、约 3X、约 4X、约 5X 或更多,其中“X”等于加入操作/最终渗余物体积的总起始体积。在其它实施方式中,所述病毒洗出液浓缩在 2X 和 4X 之间。在一个具体实施方式中,将所述病毒洗出液浓缩约

2X,然后如上所述通过 DF 交换缓冲液。在一个具体实施方式中,浓缩纯化病毒洗出液的缓冲液,并如第 8.4 节中提供的实施例所示交换缓冲液。

[0185] 在一个实施方式中,通过 DFF 和 / 或 TFF 对配制病毒批量灭菌。在另一个实施方式中,采用孔径大到足以使病毒通过但小到足以截留其它污染物的 MF 膜对配制病毒批量灭菌。在一个实施方式中,采用孔径为约 0.45 微米的至少一个膜通过 DFF 和 / 或 TFF 对配制病毒批量灭菌。在某些实施方式中,采用聚丙烯和 / 或 PVDF 膜。在一个实施方式中,在灭菌前向配制病毒批量加入其它组分。在某些实施方式中,在灭菌前向配制病毒批量加入选自下组的至少一种组分:氨基酸赋形剂(例如,谷氨酸、精氨酸)、蛋白质水解产物(例如,胶原、明胶)、螯合剂(例如 EDTA)和防腐剂。在一个具体实施方式中,在灭菌前向配制病毒批量加入谷氨酸、精氨酸和明胶。在另一个具体实施方式中,以 1 : 9 的体积 / 体积 (v/v) 比向纯化病毒批量加入 cGAG (200mM 蔗糖、100mM 磷酸盐、12.1% 重量 / 体积 (w/v) 精氨酸、10% 明胶和 54mM 或 0.9% 谷氨酸)。在另一个具体实施方式中,在灭菌前分别以 5.4mM 或 0.09%、1.21w/v 和 1w/v 的终浓度(变化在 10% 以内)向配制病毒批量加入谷氨酸钠、精氨酸和明胶。在另一个具体实施方式中,如第 8.3 节中提供的实施例所示通过 DFF 对配制病毒批量灭菌。

[0186] 在一个具体实施方式中,从细胞培养物纯化流感病毒的方法包括以下步骤:

[0187] (a) 采用孔径在约 1.2 微米到约 0.45 微米之间的至少一个膜通过直流过滤 (DFF) 澄清病毒收获物;

[0188] (b) 在步骤 (a) 之后,采用具有 500kDa 分子量截留值 (MWCO) 的膜通过切向流超滤 (UF) 浓缩,并通过渗滤 (DF) 进行缓冲液交换;

[0189] (c) 在步骤 (b) 之后通过亲和柱色谱进行纯化;

[0190] (d) 在步骤 (c) 之后采用具有 500kDa 分子量截留值 (MWCO) 的膜通过 DF 进行缓冲液交换;和

[0191] (e) 在步骤 (d) 之后采用孔径在约 0.45 微米到约 0.22 微米之间的至少一个膜通过 DFF 进行灭菌,

[0192] 其中纯化病毒的总回收率为至少 30%,且纯化病毒在每 $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU 病毒中包含少于 0.1ng HCD 和少于 0.3 μ g HCP。

[0193] 可引入从细胞培养物纯化病毒具体为流感病毒的方法的其它参数见以下第 8.3 节提供的实施例中所示。

[0194] 6.5.2RSV 纯化

[0195] 在一个具体实施方式中,待纯化的病毒是呼吸道合胞病毒 (RSV) (例如, rA2cp248/404/1030 Δ SH)。

[0196] 在一个实施方式中,从细胞培养物纯化病毒的方法包括以下步骤:

[0197] (a) 澄清病毒收获物;

[0198] (b) 在步骤 (a) 之后进行稳定和 / 或缓冲液交换;

[0199] (c) 在步骤 (b) 之后进行浓缩和 / 或缓冲液交换;

[0200] (d) 在步骤 (c) 之后通过色谱进行纯化;和

[0201] (e) 在步骤 (d) 之后末端灭菌。

[0202] 在一个具体实施方式中,步骤 (a) 包括多个过滤步骤。在另一个具体实施方式中,

步骤 (a) 还包括非特异性内切核酸酶处理。在另一个具体实施方式中,步骤 (a) 和 (c) 通过直流过滤进行。在另一个具体实施方式中,步骤 (c) 通过切向流过滤进行。在另一个具体实施方式中,步骤 (c) 同时包括通过切向流过滤的浓缩和通过渗滤的缓冲液交换。在一个具体实施方式中,步骤 (d) 通过离子交换色谱 (例如阳离子交换) 进行。在另一个实施方式中,步骤 (c) 仅包括浓缩。纯化病毒 (例如 RSV) 方法的其它实施方式如下详述。

[0203] 本发明的纯化方法包括澄清病毒收获物 (步骤 (a))。可先通过在例如 1000-2000x g 离心一段足以去除细胞碎片和其它大颗粒物的时间,例如 10-30 分钟来澄清来自感染培养物的粗培养基。或者,通过孔径限定范围大到足以允许病毒通过而截留完整细胞和其它大颗粒物的一系列半透膜过滤包含病毒的上清液。纯化过程中的该澄清步骤可包括非特异性内切核酸酶 (例如 Benzonase) 处理以降解细胞宿主 DNA,其中所述病毒收获物:i) 通过直流过滤 (DFF) 进行过滤,ii) 用非特异性内切核酸酶处理和 iii) 再次通过 DFF 进行过滤。

[0204] 在一个实施方式中,采用孔径大到足以使病毒通过但小到足以截留完整细胞和细胞碎片的 MF 膜通过 DFF 和 / 或 TFF 澄清病毒收获物。在某些实施方式中,通过 DFF 结合非特异性内切核酸酶处理来澄清病毒收获物。在一个具体实施方式中,采用孔径为约 10 微米或更小的至少一个膜过滤病毒收获物,之后用非特异性内切核酸酶处理,然后采用孔径为约 3.0 微米或更小的至少一个膜再次过滤。在一个具体实施方式中,采用孔径在约 5.0 微米到约 1.0 微米之间的至少一个膜进行澄清过程中的第一过滤步骤。在一个具体实施方式中,采用孔径在约 3.0 微米到约 0.45 微米之间的至少一个膜进行澄清过程中的第二过滤步骤。在某些实施方式中,所述第一或第二过滤步骤以单独或组合形式采用双膜过滤器,其中叠置不同大小的两个过滤器以防止孔径较小的过滤器堵塞。在一个实施方式中,该双过滤器大小为约 3/0.8 微米,其中 3 微米过滤器作为预过滤器去除较大细胞碎片。在另一个具体实施方式中,采用孔径为约 3.0 微米的第一膜和孔径为约 3/0.8 或约 0.65 微米的第二膜通过 DFF 澄清病毒收获物。

[0205] 在某些实施方式中,纯化病毒 (例如 RSV) 的方法包括非特异性内切核酸酶 (例如 Benzonase®) 处理以降解宿主细胞 DNA (HCD)。在某些实施方式中,所述非特异性内切核酸酶处理在病毒纯化的早期进行。在一个实施方式中,在步骤 (a) 中用非特异性内切核酸酶处理病毒。在一个具体实施方式中,将过滤的病毒收获物与包含非特异性内切核酸酶的缓冲液混合。在一些实施方式中,缓冲液中存在的非特异性内切核酸酶的浓度在约 5U/mL 和约 100U/mL 之间。在其它实施方式中,缓冲液中存在的非特异性内切核酸酶的浓度在约 5U/mL 和约 60U/mL 之间。在一个具体实施方式中,存在的非特异性内切核酸酶为约 50U/mL。在另一个具体实施方式中,存在的非特异性内切核酸酶为约 10U/mL。在一个实施方式中,所述非特异性内切核酸酶存在于包含约 1.0mM 到约 10mM $MgCl_2$ 的缓冲液中。在一个具体实施方式中,所述缓冲液包含 50U/mL 非特异性内切核酸酶和 5mM $MgCl_2$ 。在另一个具体实施方式中,存在的 $MgCl_2$ 为 2mM。在另一个具体实施方式中,所述缓冲液包含 10U/mL 非特异性内切核酸酶和 5mM $MgCl_2$ 。

[0206] 在澄清过程的第一过滤步骤之后,将非特异性内切核酸酶与过滤的病毒收获物在约 32°C $\pm$ 3 温育约 1 小时到约 4 小时。在一个具体实施方式中,将非特异性内切核酸酶与病毒收获物在 32°C 温育约 3 小时。在其它实施方式中,调整温育非特异性内切核酸酶的条件以确保病毒与非特异性内切核酸酶接触至少 10 分钟、至少 20 分钟、至少 30 分钟、至少 40

分钟、至少 50 分钟、至少 60 分钟、至少 70 分钟、至少 80 分钟、至少 90 分钟、至少 100 分钟、至少 110 分钟、至少 120 分钟、至少 150 分钟、至少 180 分钟、至少 210 分钟或至少 240 分钟。在本发明的某些方面,可调整与非特异性内切核酸酶的接触时间、非特异性内切核酸酶的浓度和包含非特异性内切核酸酶的缓冲液体积。例如,为最大程度减少切割 DNA 污染物的时间,可增大非特异性内切核酸酶的浓度,或者,为最大程度减少所用非特异性内切核酸酶的量,可增加接触时间。在一个具体实施方式中,所述非特异性内切核酸酶是 Benzonase®。在非特异性内切核酸酶处理之后,再次过滤经处理的过滤病毒收获物,以去除任何残留消化的 DNA 污染物和剩余的宿主细胞碎片。

[0207] 在某些实施方式中,通过加入蔗糖磷酸盐 (SP)、tris 蔗糖 (TS) 或蔗糖磷酸盐谷氨酸 (SPG) 缓冲液稳定经 Benzonase 处理的澄清病毒收获物。这些缓冲液还可包含盐,如氯化钠或氯化钾。在某些实施方式中,稳定缓冲液是 SP 缓冲液,其中所述缓冲液包含蔗糖、磷酸钾(一价和二价形式的组合)和氯化钾。在一个具体实施方式中,所述 SP 缓冲液包含约 250mM 到约 200mM 蔗糖、100mM 磷酸钾和约 150mM 氯化钾,pH 7.2。在一个具体实施方式中,SP 包含 214mM 蔗糖。在某些实施方式中,稳定缓冲液是 TS 缓冲液,其中所述缓冲液包含约 2.5mM 到约 75mM pH 7.2 TrisCl 和约 250mM 到约 150mM 蔗糖。在一个具体实施方式中,稳定缓冲液包含 50mM pH 7.2 TrisCl 和 218mM 蔗糖。所述 TS 缓冲液还可以单独或组合形式包含 NaCl、KCl、KH₂PO₄ 或 K₂HPO₄。在一个实施方式中,NaCl 或 KCl 的浓度为约 125mM 到约 175mM。在一个具体实施方式中,稳定缓冲液包含 5mM pH 7.2 TrisCl、175mM 蔗糖和 150mM NaCl 或 150mM KCl。在另一个具体实施方式中,稳定缓冲液包含 36mM pH 7.2 TrisCl、214mM 蔗糖和 150mM NaCl 或 KCl。在一个实施方式中,存在的 KH₂PO₄ 或 K₂HPO₄ 为约 10mM 到约 2.5mM。在一个具体实施方式中,稳定缓冲液包含 5mM pH 7.2 TrisCl、175mM 蔗糖、150mM NaCl 和 5mM KH₂PO₄。在某些实施方式中,稳定缓冲液是 SPG,其中所述缓冲液包含 218mM 蔗糖、3.8mM KH₂PO₄、7.2mM K₂HPO₄ 和 5mM 谷氨酸钠。本领域技术人员应理解,可根据病毒、病毒收获物和纯化条件改变稳定缓冲液的浓度,以获得稳定病毒收获物的最高产量。

[0208] 在某些实施方式中,浓缩澄清收获物和/或交换缓冲液。在一个实施方式中,通过 UF 和 DF 进行浓缩和/或缓冲液交换。在另一个实施方式中,将 TFF 同时用于 UF 和 DF。在某些实施方式中,运行 TFF 以保持恒定的滤液流量速率。在其它实施方式中,运行 TFF 以保持恒定的 TMP。在一个具体实施方式中,采用 500kDa 中空纤维筒 (GE 医疗保健公司) 进行 UF 步骤,其中采用 15psi 的运行 TMP 和 12000 秒⁻¹ 的剪切速率将病毒收获物浓缩 5 倍。可根据病毒和纯化条件改变这些参数,以最大程度提高最终疫苗制剂的最终病毒产率。

[0209] 在某些实施方式中,先通过 UF 浓缩澄清病毒,然后采用一种或两种 DF 缓冲液进行缓冲液交换。举例但不构成限制,先通过 UF 浓缩澄清收获物,然后采用蔗糖和盐浓度不同的交换缓冲液进行两个 DF 步骤。因此,考虑到所述交换缓冲液可能与病毒收获物中存在的相同或不同。此外,根据其它缓冲液交换步骤,所述交换缓冲液可与最终的配制缓冲液相同或不同。在一个实施方式中,所述交换缓冲液是具有中性 pH 的 SP、TS 或蔗糖柠檬酸盐缓冲液。在一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含约 7-25% w/v 蔗糖,因此提供约 100mM 到约 800mM 的由低到高的蔗糖范围。在一个实施方式中,所述交换缓冲液包含浓度为约 1mM 到约 150mM 的 NaCl 或 KCl。在另一个实施方式中,所述交换缓冲液包含浓度为约 2.5mM 到约 50mM 的 TrisCl。在另一个实施方式中,所述交换缓冲液包含浓度为约 5.0mM 到约 50mM 的

柠檬酸钠或柠檬酸钾。在一个实施方式中,所述交换缓冲液包含浓度为约 20mM 到约 150mM 的磷酸钾。在某些实施方式中,所述浓度的磷酸钾是一价和二价物的组合,其低或高浓度通常与蔗糖的高或低浓度对应。在一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含约 5mM 到约 30mM 磷酸二氢钾。在另一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含约 10mM 到约 80mM 磷酸氢二钾。具体交换缓冲液的例子包括但不限于:5mM TrisCl;7-25% w/v 蔗糖;1mM 到 150mM NaCl;20mM 柠檬酸钠或柠檬酸钾、7-25% w/v 蔗糖、150mM NaCl 或 KCl;和 100mM 磷酸钾、7-25% w/v 蔗糖、150mM KCl。在一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含 25% w/v 蔗糖、约 100mM 磷酸钾缓冲液和约 150mM KCl, pH 7.2。在其它实施方式中,这样的交换缓冲液中所述浓度的磷酸钾是一价和二价物的组合,例如,28.5mM 一价物和 71.2 二价物。在另一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含 25% w/v 蔗糖、约 5mM TrisCl 和约 150mM NaCl, pH 7.2。在另一个具体实施方式中,所述交换缓冲液包含 10% w/v 蔗糖、约 20mM 磷酸钾缓冲液和约 100mM KCl, pH 7.0。在另一个实施方式中,这样的交换缓冲液中所述浓度的磷酸钾是一价和二价物的组合,例如,7.7mM 一价物和 12.3 二价物。可根据病毒和纯化条件改变交换缓冲液组分,以最大程度提高色谱步骤和最终过滤步骤的病毒产率,并将纯化病毒置于最终制剂相容的缓冲液中。

[0210] 在某些实施方式中,如上所述通过色谱进一步纯化稳定病毒收获物。在一些实施方式中,采用离子交换色谱(例如,阴离子或阳离子)。在一个具体实施方式中,在通过 UF 减小体积和通过渗滤经处理的澄清病毒收获物进行缓冲液交换之后,通过离子交换色谱进一步纯化所述病毒。在一个实施方式中采用阴性色谱进行该色谱步骤或精制步骤(polishing step)。在该实施方式中,衍生化表面(例如聚合珠粒)以结合 HCD 或 HCP 而排除结合病毒颗粒,由此允许病毒经过表面。该概念也可应用于其它表面,使包含病毒颗粒的缓冲液可通过或经过衍生化表面。所述完整的色谱过程不含添加剂,易于放大规模以便在用于疫苗制剂的病毒大规模生产中应用。考虑到可在分批过程中或采用柱过程进行所述色谱。在某些实施方式中,条件病毒载荷通过柱色谱纯化。

[0211] 在色谱步骤(如果进行)或缓冲液交换之后,浓缩的病毒收获物经历灭菌步骤。在一个实施方式中,所述灭菌步骤是末端过滤步骤。在一个实施方式中,所述末端过滤是采用孔径为 3 微米或更小的至少一个膜的 DFF。在一个具体实施方式中,所述过滤器是双 3/0.8 微米膜。在另一个具体实施方式中,所述过滤器为约 1μm 或更小。在一个方面,所述过滤器为 0.8、0.65 或 0.45 微米。

[0212] 在一个具体实施方式中,从病毒感染细胞纯化呼吸道合胞病毒的方法包括以下步骤:

[0213] a. 澄清病毒收获物,包括:

[0214] i. 采用孔径在约 10 微米到约 3 微米之间的至少一个澄清过滤器通过直流过滤(DFF)过滤病毒收获物;

[0215] ii. 用非特异性内切核酸酶处理病毒收获物;

[0216] iii. 采用孔径在约 3 微米到约 0.45 微米之间的至少一个澄清过滤器通过 DFF 过滤病毒收获物;

[0217] b. 用蔗糖、磷酸盐或含盐(NaCl 或 KCl)的 Tris 缓冲液稳定澄清病毒收获物;

[0218] c. 采用分子量截留值(MWCO)为 500kDa-0.1 μm 的中空纤维筒通过切向流过滤

(TFF) 浓缩稳定病毒收获物并通过渗滤 (DF) 进行缓冲液交换；

[0219] d. 采用孔径在约 0.8 微米到约 0.45 微米之间的至少一个澄清过滤器通过 DFF 过滤浓缩的病毒收获物；

[0220] 其中呼吸道合胞病毒从病毒感染细胞纯化, 其最终病毒感染性效价为至少 $5.7 \log_{10}$ FFU/mL。

[0221] 在另一个具体实施方式中, 所述纯化方法在浓缩病毒收获物和缓冲液交换之后包括阳离子交换色谱纯化步骤。

[0222] 在另一个具体实施方式中, 从病毒感染细胞纯化呼吸道合胞病毒的方法包括以下步骤：

[0223] a. 澄清病毒收获物, 包括：

[0224] i. 采用孔径在约 3 微米到 8 微米之间的至少一个澄清过滤器通过直流过滤 (DFF) 过滤病毒收获物；

[0225] ii. 用非特异性内切核酸酶处理病毒收获物；

[0226] iii. 采用孔径为约 0.65 微米的至少一个澄清过滤器通过 DFF 过滤病毒收获物；

[0227] b. 用蔗糖、磷酸盐或含盐 (NaCl 或 KCl) 的 Tris 缓冲液稳定澄清病毒收获物；

[0228] c. 采用分子量截留值 (MWCO) 为 500kDa-0.1 μ m 的中空纤维筒通过切向流过滤 (TFF) 浓缩稳定病毒收获物并通过渗滤 (DF) 进行两次缓冲液交换；

[0229] d. 采用孔径为约 3/0.8 微米的至少一个双澄清过滤器通过 DFF 过滤浓缩的病毒收获物；

[0230] 其中呼吸道合胞病毒从病毒感染细胞纯化, 其最终病毒感染性效价为至少 $5.7 \log_{10}$ FFU/mL。

[0231] 在另一个实施方式中, 步骤 c 中的两次缓冲液交换用相同的交换缓冲液进行。或者所述两次交换缓冲液用不同的交换缓冲液进行。在一个具体实施方式中, 采用包含约 25% w/v 蔗糖、约 100mM 磷酸钾缓冲液和约 150mM KCl, pH 7.2 的第一交换缓冲液进行 DF。在另一个具体实施方式中, 采用包含约 10% w/v 蔗糖、约 20mM 磷酸钾缓冲液和约 100mM KCl, pH 7.0 的第二交换缓冲液进行 DF。

[0232] 6.6 疫苗组合物及其使用方法

[0233] 本发明还涉及通过本发明方法可获得的病毒 (例如, 流感病毒或 RSV)。这些病毒可通过已知方法配制, 以提供给予人或动物的疫苗。所述病毒可采用完整病毒颗粒 (例如减毒活病毒) 或灭活 / 裂解病毒 (例如用甲醛去污剂处理) 的形式。任选地, 可通过本领域技术人员已知的方法从病毒分离指定的病毒组分 (例如蛋白质), 并将其用于制备疫苗。产生和配制用于疫苗组合物的灭活 / 裂解病毒颗粒的方法为本领域熟知, 已使用了 40 余年。

[0234] 6.6.1 流感病毒疫苗

[0235] 完整病毒颗粒 (例如减毒活病毒) 制剂可包括缓冲液、氨基酸赋形剂 (例如, 谷氨酸、精氨酸)、蛋白质水解产物 (例如, 胶原、明胶)、螯合剂 (例如 EDTA) 和防腐剂。可用于这样制剂的缓冲液可包含 200mM 蔗糖和 pH 7.0-7.4 的磷酸盐或组氨酸缓冲液。在某些实施方式中, 所述完整病毒颗粒制剂包含氨基酸赋形剂, 如谷氨酸和精氨酸。在某些其它实施方式中, 所述完整病毒颗粒制剂包含稳定蛋白质水解产物, 如胶原或明胶 (例如, 猪、鱼、鸟的明胶)。在一些实施方式中, 所述完整病毒颗粒制剂可包含采用液体形式的活病毒, 其稳定

性足以能在整个流感疫苗接种季节（例如，在北半球通常从约 9 月到 3 月）“实际”储存（例如，在冷冻于 2-8℃、4℃、5℃ 等时进行出售和商业化）。因此，需要所述病毒 / 疫苗组合物保持其效力或在储存期间的效力损失速率可接受。在其它实施方式中，液体形式的此类溶液 / 疫苗在约 2℃ 到约 8℃，例如冰箱温度下稳定。例如，配制冰箱稳定减毒流感疫苗的方法和组合物见 PCT 专利公开第 WO/2006/041819 号所述，另参见 PCT 专利公开 WO/2005/014862。

[0236] 因此，在某些实施方式中，本发明提供一种冰箱稳定性疫苗制剂，其包含以下终浓度的一种或多种以下组分（一种或多种组分的变化在 10% 以内）：1-5% 精氨酸、1-4% 明胶、5-10% 蔗糖（任选溶于磷酸盐缓冲液）、0.01-0.1% 谷氨酸（谷氨酸钠、一水合物）、10-150mM 磷酸钾和 80-150mM 组氨酸。

[0237] 在一个具体实施方式中，所述疫苗制剂包含一种或多种以下组分（一种或多种组分的变化在 10% 以内）：1-2% 精氨酸、2% 明胶、7-10% 蔗糖（任选溶于磷酸盐缓冲液）和 100mM 组氨酸。在另一个具体实施方式中，所述疫苗制剂包含一种或多种以下组分（一种或多种组分的变化在 10% 以内）：0.01-0.1% 谷氨酸（谷氨酸钠、一水合物）、1-2% 精氨酸、1% 明胶和 7-10% 溶于磷酸盐缓冲液的蔗糖。

[0238] 在某些其它实施方式中，本发明提供冰箱稳定性疫苗制剂，其在最终制剂中包含一种或多种以下组分：蔗糖 6-8% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1-2% w/v；谷氨酸钠一水合物 0.05-0.1% w/v；明胶水解产物，猪 A 型（或其它来源如鱼或鸟）0.5-2% w/v；磷酸氢二钾 1-2%；和磷酸二氢钾 0.25-1% w/v。

[0239] 在一个具体实施方式中，所述疫苗组合物包含一种或多种以下组分：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v；谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v；猪 A 型（或其它来源）明胶水解产物 1% w/v；磷酸氢二钾 1.13%；和磷酸二氢钾 0.48% w/v。在另一个具体实施方式中，所述疫苗组合物包含所有以下组分：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v；谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v；猪 A 型（或其它来源）明胶水解产物 1% w/v；磷酸氢二钾 1.13%；和磷酸二氢钾 0.48% w/v。

[0240] 在另一个具体实施方式中，所述疫苗制剂包含所有以下组分（一种或多种组分的变动在 10% 以内）：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v；谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v；猪 A 型（或其它来源）明胶水解产物 1% w/v；磷酸氢二钾 1.13%；和磷酸二氢钾 0.48% w/v。在另一个具体实施方式中，所述疫苗制剂包含所有以下组分（一种或多种组分的变化在 10% 以内）：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v；猪 A 型（或其它来源）明胶水解产物 1% w/v。在这样的实施方式中，制剂溶于缓冲液中（例如，磷酸钾缓冲液 (pH 7.0-7.2)）。在另一个具体实施方式中，疫苗制剂包含所有以下组分（一种或多种组分的变化在 20% 以内）：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v；谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v；猪 A 型（或其它来源）明胶水解产物 1% w/v；磷酸氢二钾 1.13%；和磷酸二氢钾 0.48% w/v。

[0241] 在另一个具体实施方式中，所述疫苗制剂包含所有以下组分（一种或多种组分的变动在 30% 以内）：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v；谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v；猪 A 型（或其它来源）明胶水解产物 1% w/v；磷酸氢二钾 1.13%；和磷酸二氢钾 0.48% w/v。在另一个具体实施方式中，所述疫苗制剂包含所有以下组分（一种或多种组分的变动在 40% 以内）：蔗糖 6.84% 重量 / 体积 (w/v)；精氨酸一氢氯化物

1.21% w/v ;谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v ;猪 A 型 (或其它来源) 明胶水解产物 1% w/v ;磷酸氢二钾 1.13% ;和磷酸二氢钾 0.48% w/v。

[0242] 在另一个具体实施方式中,所述疫苗制剂包含所有以下组分(一种或多种组分的变动在 1% 以内):蔗糖 6.84% 重量/体积 (w/v) ;精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v ;谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v ;猪 A 型 (或其它来源) 明胶水解产物 1% w/v ;磷酸氢二钾 1.13% ;和磷酸二氢钾 0.48% w/v。在另一个具体实施方式中,所述疫苗制剂包含所有以下组分(一种或多种组分的变动在 3% 以内):蔗糖 6.84% 重量/体积 (w/v) ;精氨酸一氢氯化物 1.21% w/v ;谷氨酸钠一水合物 0.094% w/v ;猪 A 型 (或其它来源) 明胶水解产物 1% w/v ;磷酸氢二钾 1.13% ;和磷酸二氢钾 0.48% w/v。在一个具体实施方式中,所述疫苗制剂可包含例如磷酸钾(例如,至少 50mM、至少 100mM、至少 200mM 或至少 250mM) 作为缓冲液或组氨酸(例如,至少 50mM、至少 100mM、至少 200mM 或至少 250mM)。

[0243] 可任选利用喷雾干燥延长疫苗制剂的储存时间,所述喷雾干燥是一种将制剂液体原料在干燥加热气体流作用下喷成细小液滴的雾状物的快速干燥方法。所述细小液滴的蒸发形成由溶解溶质组成的干燥粉末(参见例如美国专利公开第 2004/0042972 号)。

[0244] 通常,可采用合适的载体或赋形剂预防性给予病毒或病毒组分,以刺激对一种或多种病毒毒株的特异性免疫应答。所述载体或赋形剂通常是药学上可接受的载体或赋形剂,如无菌水、水性盐水溶液、水性缓冲盐水溶液、水性右旋糖溶液、水性甘油溶液、乙醇或其组合。根据本领域确立的方案实现确保无菌性、pH、等渗性和稳定性的这类溶液的制备。通常选择载体或赋形剂以最大程度减少过敏性和其它不希望出现的作用,并适用于具体的给药途径,例如,皮下、肌内、鼻内等。

[0245] 用于病毒或其组分预防性给药的制剂还任选包含增强对流感病毒抗原免疫应答的一种或多种佐剂。合适的佐剂包括:皂苷、矿物质凝胶如氢氧化铝、表面活性物质如溶血卵磷脂、普流罗尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油或烃乳剂、卡介苗(BCG)、短小棒状杆菌(*corynebacterium parvum*) 以及合成佐剂 QS-21 和 MF59。

[0246] 通常给予的疫苗制剂的量足以刺激对一种或多种流感病毒毒株的特异性免疫应答。优选给予所述病毒引发保护性免疫应答。引发针对一种或多种病毒毒株的保护性免疫应答的剂量和方法为本领域技术人员已知。例如,给予每剂量提供的灭活流感病毒的范围是约 1-1000HID₅₀(人感染剂量),即约 10^5 - 10^8 pfu(蚀斑形成单位)。或者不含佐剂给予约 10-50 μ g,例如约 15 μ g HA,含佐剂则给予的剂量较小。通常根据例如,年龄、身体状况、体重、性别、饮食、给药时间和其它临床因素在该范围内调整剂量。例如采用针和注射器或无针注射装置通过皮下或肌内注射全身给予所述预防性疫苗制剂。或者通过滴剂、大颗粒气溶胶(大于约 10 微米)或喷雾向上呼吸道鼻内给予所述疫苗制剂。尽管任何以上递送途径均可形成保护性全身免疫应答,但鼻内给药能提供在流感病毒进入部位引发粘膜免疫的额外益处。就鼻内给药而言,常优选减毒活病毒疫苗,例如,减毒、冷适应和/或温度敏感性重组或重配流感病毒。尽管优选单剂量刺激保护性免疫应答,但可通过相同或不同途径给予额外的剂量以达到所需预防性作用。这些方法可适用于任何病毒,包括但不限于:正粘病毒(包括流感毒株 A 和 B)、副粘病毒(包括 RSV、人肺炎后病毒和副流感病毒)、弹状病毒和黄病毒。

[0247] 6.6.2RSV 疫苗

[0248] 在一个实施方式中,本文提供在对象中引发免疫应答的方法,包括给予有此需要的对象有效量的本文所述包含减毒纯化活病毒(例如 RSV)的免疫原性组合物。在一些实施方式中,所述减毒病毒是嵌合病毒。

[0249] 在一个具体实施方式中,本文提供在哺乳动物(例如人)中引发免疫应答的方法,包括给予有此需要的哺乳动物有效量的本文所述包含减毒 RSV 的免疫原性组合物。在一个具体实施方式中,所述减毒 RSV 是 rA2cp248/404/1030 Δ SH。

[0250] 本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物可用于对象的活性免疫接种。在一个实施方式中,本文提供预防病毒感染的方法,包括给予对象有效量的本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物,即疫苗。在一些实施方式中,减毒活病毒是嵌合病毒。

[0251] 在一个具体实施方式中,本文提供预防 RSV 感染的方法,包括向哺乳动物(例如人)给予有效量的本文所述包含减毒纯化活 RSV 的免疫原性组合物,即疫苗。在一个具体实施方式中,减毒活 RSV 是 rA2cp248/404/1030 Δ SH。

[0252] 本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物可用于抑制病毒感染。在一个实施方式中,本文提供抑制病毒感染的方法,包括给予有此需要的对象有效量的本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物。在一些实施方式中,所述减毒病毒是嵌合病毒。在一个具体实施方式中,本文提供抑制 RSV 感染的方法,包括向哺乳动物(例如人)给予有效量的本文所述包含减毒纯化活 RSV 的免疫原性组合物。在一个具体实施方式中,所述减毒 RSV 是 rA2cp248/404/1030 Δ SH。

[0253] 本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物可用于在对象中诱导引起病毒效价降低的免疫应答。在一个实施方式中,本文提供降低对象中病毒效价的方法,包括给予本文所述包含减毒活细胞相关病毒的免疫原性组合物。在一些实施方式中,所述减毒病毒是嵌合病毒。在一个具体实施方式中,本文提供降低 RSV 效价的方法,包括向哺乳动物(例如人)给予有效量的本文所述包含减毒活 RSV 的免疫原性组合物。在一个具体实施方式中,所述减毒 RSV 是 rA2cp248/404/1030 Δ SH。

[0254] 在一些实施方式中,本文所述有效量的免疫原性组合物使病毒刺激对象中的病毒效价相对于未处理对象降低约 2 倍,优选约 5 倍或更多、约 10 倍或更多、约 20 倍或更多。在某些实施方式中,相对于未处理对象,本文所述有效量的免疫原性组合物降低随后用细胞相关病毒感染对象中与细胞相关病毒感染相关的一种或多种症状的持续时间和/或严重程度。在一些实施方式中,相对于未处理对象,本文所述有效量的免疫原性组合物提高随后用纯化病毒感染对象的存活率。

[0255] 可将本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物给予未经免疫的对象,即未曾并目前未受感兴趣的病毒感染的对象。在一个实施方式中,可将本文所述包含减毒活细胞相关病毒的免疫原性组合物给予具有产生病毒感染风险的未经免疫对象。在一个具体实施方式中,可将本文所述包含减毒活 RSV 的免疫原性组合物给予具有产生 RSV 感染风险的未经免疫对象。在一个具体实施方式中,所述减毒 RSV 是 rA2cp248/404/1030 Δ SH。

[0256] 可将本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物给予之前受感兴趣病毒的不同群、亚群或毒株感染的对象。在一个实施方式中,将免疫原性组合物给予之前受与感兴趣病毒不同的病毒群、亚群或毒株感染并具有产生感兴趣病毒感染风险的对象。

[0257] 在一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH)

的免疫原性组合物给予人婴儿或人早产婴儿。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予患囊性纤维化、支气管肺发育异常、先天性心脏病、先天性免疫缺陷或获得性免疫缺陷的人。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予人幼童。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予人儿童。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予人学龄儿童。

[0258] 在一个具体实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予 1-24 月龄的人。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予 1-3 月龄的人。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予 6-24 月龄的人。

[0259] 在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予经历过骨髓移植的人。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予老年人。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予疗养院的人。在另一个实施方式中,将本文所述包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物给予在群居房(即 15 个或更多个人对象居住的住所)居住的人。

[0260] 在一个具体实施方式中,将包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物在 RSV 季节,在北半球通常为 11 月到 4 月之前给予人对象(在一个具体实施方式中,所述人对象是人婴儿、人早产婴儿或人幼童)。在另一个具体实施方式中,将包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物在 RSV 季节,在北半球通常为 11 月到 4 月期间给予人对象(在一个具体实施方式中,所述人对象是人婴儿、人早产婴儿或人幼童)。在另一个具体实施方式中,将包含减毒活 RSV(例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH) 的免疫原性组合物在 RSV 季节,在北半球通常为 11 月到 4 月之前和其期间给予人对象(在一个具体实施方式中,所述人对象是人婴儿、人早产婴儿或人幼童)。

[0261] 在某些实施方式中,本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物不产生对病毒感染的完全保护作用,但相对于未处理对象在受到所述病毒刺激时产生较低病毒效价。在某些实施方式中,给予本文所述包含减毒纯化活病毒的免疫原性组合物相对于未处理对象在受到所述病毒刺激时引起病毒效价降低 0.5 倍、1 倍、2 倍、4 倍、6 倍、8 倍、15 倍、25 倍、50 倍或更多。在一些实施方式中,给予本文所述包含减毒活病毒的免疫原性组合物相对于未处理对象在受到所述病毒刺激时引起病毒效价降低 10%,优选 25%、50%、75%或更多。病毒效价降低的益处包括但不限于:病毒感染症状的严重程度降低、病毒感染的症状减少和病毒感染的时间长度减少。

[0262] 可将本文所述包含减毒活嵌合细胞相关病毒的免疫原性组合物用于诱导对非病毒抗原的免疫应答。可将本文所述包含减毒活嵌合细胞相关病毒的免疫原性组合物用于向对象递送感兴趣的蛋白质、多肽或肽以预防和/或治疗疾病。

[0263] 可采用多种方法引入本文所述免疫原性组合物例如疫苗制剂,这些方法包括但不

限于：鼻内、气管内、口服、肺部、皮内、腹膜内和胃肠道外（例如，肌内、静脉内和皮下）途径。在一些实施方式中，通过病毒感染的天然途径给予本文所述包含减毒活细胞相关病毒的免疫原性组合物。在一个具体实施方式中，鼻内给予本文所述包含减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物。

[0264] 在免疫接种步骤中，所用免疫原性组合物的量和接种方案由本领域医师确定，参考所述对象的免疫应答和抗体效价进行给予。在一个具体实施方式中，给予人婴儿、人早产婴儿或人幼童一剂量的包含减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物，其中所述剂量的免疫原性组合物包含约 125–200FFU 减毒 RSV。在另一个实施方式中，给予人婴儿、人早产婴儿或人幼童一剂量的包含减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物，其中所述剂量的免疫原性组合物包含约 125FFU、约 150FFU、约 175FFU 或约 200FFU 减毒 RSV。

[0265] 在一些实施方式中，给予人婴儿、人早产婴儿或人幼童 2–6 剂量的包含约 125–200FFU 减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物。在一些实施方式中，所述各剂量的免疫原性组合物间隔 1–6 个月或 2–12 个月给予。在一个具体实施方式中，间隔 2 个月给予人婴儿、人早产婴儿或人幼童 3 剂量的包含约 125–200FFU 减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物。例如，给予小于 1 月龄的婴儿第一剂量的包含 150FFU 减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物，给予约 2 月龄的人婴儿第二剂量的包含 150FFU 减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物，给予约 4 月龄的人婴儿第三剂量的包含 150FFU 减毒活 RSV（例如 rA2cp248/404/1030 Δ SH）的免疫原性组合物。

[0266] 7.7 病毒

[0267] 细胞相关病毒可以是天然产生的病毒、诱变产生的病毒（例如通过接触紫外辐射、诱变剂和 / 或传代发生突变的病毒）、重配（就具有分区段基因组的细胞相关病毒而言）和 / 或遗传工程改造病毒。细胞相关 RNA 病毒的非限制性例子包括呼吸道合胞病毒（RSV）、麻疹病毒、流感病毒、人泡沫病毒、逆转录病毒如 HTLV、慢病毒如 HIV 和 SIV、以及呼肠孤病毒。或者，细胞相关病毒是 DNA 病毒，如疱疹病毒。细胞相关 DNA 病毒的非限制性病毒包括疱疹病毒、EBV、CMV 和马瑞克病（Marek's disease）病毒。在某些实施方式中，通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的细胞相关病毒具有复制缺陷性。在一个具体实施方式中，病毒基因组复制和 / 或合成必需的一种或多种功能在复制缺陷性细胞相关病毒中具有缺陷。在另一个实施方式中，病毒颗粒装配必需的一种或多种功能在复制缺陷性细胞相关病毒中具有缺陷。在另一个实施方式中，病毒基因组复制或合成以及病毒颗粒装配必需的一种或多种功能在复制缺陷性细胞相关病毒中具有缺陷。

[0268] 在一个具体实施方式中，通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的细胞相关病毒是减毒病毒。在一个具体实施方式中，细胞相关病毒是减毒活病毒。相对于野生型细胞相关病毒，减毒细胞相关病毒可能例如，复制其病毒基因组的能力降低、在所希望宿主中复制的能力降低、装配感染病毒颗粒的能力降低和 / 或感染宿主细胞的能力降低。可通过本领域技术人员已知的任何方法测试细胞相关病毒的减毒作用。参见例如，2004 年 4 月 23 日提交的美国专利申请序列号 10/831,780（2005 年 1 月 27 日以美国专利申请公开号 2005/0019891 公开），具体在标题为“重组病毒的减毒（Attenuation of

Recombinant Viruses) ”的第 5.7 节。在一些实施方式中,采用众所周知的诱变技术,如病毒冷传代或接触紫外辐射和 / 或诱变剂产生减毒病毒。在其它实施方式中,所述减毒病毒是遗传工程改造病毒。

[0269] 细胞相关病毒可以是嵌合病毒。在一个具体实施方式中,所述嵌合病毒是复制缺陷性病毒。在一个具体实施方式中,所述嵌合病毒是减毒病毒。

[0270] 6.7.1 流感病毒

[0271] 本文的培养基、方法、过程和组合物可特别用于疫苗用流感病毒的生产和纯化。流感病毒由包含分区段单链 RNA 基因组的内部核糖核蛋白核心和由基质蛋白衬里的外部脂蛋白包膜组成。甲型流感病毒和乙型流感病毒各包含 8 个区段的单链负义 RNA。甲型流感病毒基因组编码 11 种多肽。区段 1-3 编码 3 种多肽,组成 RNA 依赖性 RNA 聚合酶。区段 1 编码所述聚合酶复合体蛋白 PB2。其余聚合酶蛋白 PB1 和 PA 分别由区段 2 和区段 3 编码。此外,一些流感病毒毒株的区段 1 编码一种小蛋白质 PB1-F2,其由 PB1 编码区域内的另起读框产生。区段 4 编码参与感染期间细胞附着和进入的血凝素 (HA) 表面糖蛋白。区段 5 编码核壳体核蛋白 (NP) 多肽,其为与病毒 RNA 相关的主要结构组分。区段 6 编码神经氨酸酶 (NA) 包膜糖蛋白。区段 7 编码称为 M1 和 M2 的两种基质蛋白,其从差别剪接的 mRNA 翻译得到。区段 8 编码 NS1 和 NS2 两种非结构蛋白,其从选择性剪接的 mRNA 变体翻译得到。

[0272] 乙型流感病毒的 8 个基因组区段编码 11 种蛋白质。3 个最大的基因编码 RNA 聚合酶组分 PB1、PB2 和 PA。区段 4 编码 HA 蛋白。区段 5 编码 NP。区段 6 编码 NA 蛋白和 NB 蛋白。NB 和 NA 两种蛋白均从双顺反子 mRNA 的重叠阅读框翻译得到。乙型流感病毒的区段 7 也编码两种蛋白质:M1 和 M2。最小的区段编码两种产物,即从全长 RNA 翻译得到的 NS1 和从剪接 mRNA 变体翻译得到的 NS2。

[0273] 产生重配病毒以便在也称为主供体病毒 (MDV) 的获准主毒株的背景中引入从临床分离物选择的血凝素和 / 或神经氨酸酶抗原。例如,FluMist[®] 利用获准的冷适应、减毒、温度敏感性 MDV 毒株 (例如, A/AnnArbor/6/60 和 B/Ann Arbor/1/66)。可用作主供体病毒的其它毒株包括但不限于:ca A/AnnArbor/6/60、ca B/Ann Arbor/1/66、ca A/Leningrad/134/17/57、A/PuertoRico/8/34 (PR8)、ca B/Ann Arbor/1/94、B/Leningrad/14/17/55、B/USSR/60/69 和 B/Leningrad/179/86。

[0274] 有多种方法可用于产生重配病毒,包括基于卵的方法和最近的细胞培养方法。参见例如, PCT 专利公开 WO 03/091401、WO 05/062820, 美国专利第 6,544,785、6,649,372、6,951,75 号,以及美国专利公开第 11/455,818、11/455,734 和 11/501,067 号。考虑到本发明的培养基和方法可用于生产流感病毒,其包括但不限于本文公开的流感病毒毒株和包含主供体病毒基因的重配病毒 (例如, ca A/AnnArbor/6/60、ca B/AnnArbor/1/66、PR8 等)。还考虑到本发明的培养基和方法可用于生产流感病毒,其包括具有一种或多种以下表型的重配病毒:温度敏感性、冷适应、减毒。重配株可通过经典重配技术,例如通过共感染方法或任选通过质粒获救技术产生 (参见例如, PCT 专利公开 WO 03/091401 和 WO 05/062820; 美国专利号 6,544,785、6,649,372、6,951,754、6,887,699、6,001,634、5,854,037、5,824,536、5,840,520、5,820,871、5,786,199 和 5,166,057; 美国专利申请公开号 20060019350、20050158342、20050037487、20050266026、20050186563、20050221489、20050032043、20040142003、20030035814 和 20020164770; 以及 Neumann 等 (1999) “完全

从克隆 cDNA 产生流感病毒 A (Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs.)”Proc Natl Acad Sci USA 96 :9345-9350 ;Fodor 等 (1999)“从重组 DNA 拯救流感病毒 A (Rescue of influenza A virus from recombinant DNA.)”J.Virol 73 :9679-9682 ; Hoffmann 等 (2000) “从 8 个质粒产生流感病毒 A 的 DNA 转染系统 (A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids)”Proc Natl Acad Sci USA 97 :6108-6113 ;WO 01/83794 ;Hoffmann 和 Webster (2000),“从 8 个质粒产生流感病毒 A 的单向 RNA 聚合酶 I- 聚合酶 II 转录系统 (Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids)”,81 :2843-2847 ;和 Hoffmann 等 (2002),“从 8 个质粒拯救流感病毒 B (Rescue of influenza B viruses from 8 plasmids)”,99 (17) :11411-11416)。近来, 已通过 MDCK 细胞中的质粒拯救产生了重配株 (参见例如, PCT 专利公开 WO 2007/124327 ; Wang 和 Duke ;2007 年 10 月 23 日, J. Virol., 4 :102)。

[0275] 6.7.2 呼吸道合胞病毒

[0276] 本文的培养基、方法和组合物可特别用于疫苗用 RSV 的生产和纯化。RSV 的任何群、亚群或毒株 (例如, A 群或 B 群) 均可通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述的免疫原性组合物中。参见例如, Sato 等, 2005, Journal of Clinical Microbiology 43 : 36-40 对 RSV 群和亚群的讨论。在一个实施方式中, 所述 RSV 属于 A 群。在另一个实施方式中, 所述 RSV 属于 B 群。

[0277] 通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的 RSV 可以是天然产生的 RSV 毒株、诱变产生的 RSV (例如通过接触紫外辐射、诱变剂和 / 或传代发生突变的病毒) 和 / 或遗传工程改造 RSV。在一个实施方式中, RSV 基因组在一个或多个病毒基因, 如 F、G、NS1、NS2、M1 (开放阅读框 (“ORF”) 1)、M2 (ORF2)、SH2、N、P 或 L 基因中包含一个或多个突变。在一些实施方式中, 向 RSV 基因组引入取代、缺失和 / 或插入的组合。在一些实施方式中, RSV 基因组在一个或多个病毒基因, 如 F、G、NS1、NS2、M1 (ORF1)、M2 (ORF2)、SH2、N、P 或 L 基因中包含一个或多个错义突变。在一些实施方式中, RSV 基因组在一个或多个病毒基因, 如 NS1、NS2、M1 (ORF1)、M2 (ORF2)、SH2、N、P 或 L 基因中的所有或一部分中包含一个或多个缺失。

[0278] 在一个实施方式中, 可通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的 RSV 具有复制缺陷性。在一个具体实施方式中, 可通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的 RSV 是减毒的。可引入 RSV 基因组以使所述病毒减毒的突变的非限制性例子参见例如, 2004 年 4 月 23 日提交的美国专利申请序列号 10/831, 780 (2005 年 1 月 27 日以美国专利申请公开号 2005/0019891 公开) 和 2006 年 3 月 24 日提交的美国专利申请序列号 11/389, 618 (2006 年 7 月 20 日以美国专利申请公开号 2006/0160130 公开)。减毒 RSV 包括但不限于: 冷传代 (cp) 突变株 (例如, 在例如 Kim 等., 1971, Pediatrics 48 :745-755 描述的 cpRSV, 其通过引用全文纳入本文)、温度敏感性 (ts) 突变株 (例如, 在例如 Crowe 等, 1993, Vaccine 11 :1395-1404 ;Crowe 等, 1995, Vaccine 13 :847-855 ;Mills 等, 1971, J Immunol. 107 :123-130 ;和 Pringle 等, Vaccine 1993 11 :473-478 中描述的 RSV ts-1、RSV ts-2、ts1A、ts19A 和 ts1C)、冷传代温度敏感性 (cpts) 突变株 (例如, cpts248/404、cpts248/255、cpts 248/955 和 cpts 530/1009,

参见例如, Karron 等, 1997, J Infect Dis. 176 :1428-1436) 和遗传工程改造突变株 (例如, 在例如 Karron 等, J. of Infect. Diseases 191 :1093-1140 ;Whitehead 等, 1999, J. Virol. 73 :3438-3442 ;和 Collins 等, 2005, Proc. Am. Thorac. Soc. 2 :166-173 中描述的 rA2cp248/404 Δ SH、rA2cp248/404/1030 Δ SH、r Δ NS1、r Δ M2-2 和 r248 Δ NS2)。

[0279] 在一个具体实施方式中, 可通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的 RSV 是 rA2cp248/404/1030 Δ SH。该减毒 RSV 包含形成其温度敏感性和减毒性质的多个减毒遗传元件, 包括: (i) 使冷适应 RSV 减毒的 N、F 和 L 蛋白中的一组 5 个错义突变; (ii) 降低限制性温度、形成温度敏感性表型并使病毒减毒的 L 蛋白中的独立错义突变 248 和 1030 修饰; (iii) 一起形成额外温度敏感性的 M2 基因的基因起始转录信号中核苷酸取代和 L 蛋白中一个错义突变的组合 404 修饰; 和 (iv) 形成减毒表型的整个 SH 基因的一个缺失 Δ SH。参见以下表 1 中引入 RSV 基因组的氨基酸取代的位置。

[0280] 表 1

[0281]

核苷酸取代	氨基酸取代*	基因	表型
G1939A	V 到 I	N	Att
A5895C	E 到 A	F	Att
C6810T	T 到 I	F	Att
T7187C	T 到 C	M2 基因起始	Ts
G9035A, T9036C	C 到 Y	L	Att
C10570T, A10571T	Q 到 L	L	ts
T11628G	D 到 E	L	Ts
T12040A	Y 到 N	L	Ts
C13147T, T13149C	H 到 Y	L	Att

[0282] * 相对于野生型 RSV A2 的氨基酸取代

[0283] 在一些实施方式中, 改造可通过本文所述方法纯化和 / 或包含于本文所述免疫原性组合物中的 RSV 以表达一种或多种异源序列 (即所述 RSV 是嵌合病毒)。可将异源序列引入例如, F、G、NS1、NS2、M1 (ORF1)、M2 (ORF2)、N、P、SH2 和 / 或 L 编码序列。可改造 RSV 来表达的异源序列的非限制性例子包括: 抗原 (例如, 病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原 (如 Robbins 和 Kawakawi, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8 :628-636 描述的抗原)、真菌抗原和寄生虫抗原)、标记或标签 (例如, flag 标签和 His 标签)、嵌合蛋白质 (例如, 来自两种不同 RSV 毒株的 RSV G 蛋白的杂合体) 以及具有所需生物性质或活性的蛋白质、多肽或肽 (例如, 细胞因子, 如干扰素 (IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-2、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-22)。在一个具体实施方式中, 所述嵌合 RSV 是减毒的。就嵌合 RSV 的非限制性例子而言, 参见例如, 2004 年 4 月 23 日提交的美国专利申请序列号 10/831, 780 (2005 年 1 月 27 日以美国专利申请公开

号 2005/0019891 公开) 和 2006 年 3 月 24 日提交的美国专利申请序列号 11/389,618 (2006 年 7 月 20 日以美国专利申请公开号 2006/0160130 公开)。

[0284] 在一个实施方式中,改造 RSV 以表达属于不同于 RSV 载体的 RSV 群、亚群或毒株的病毒的一种或多种病毒抗原。例如但不构成限制,所述 RSV 载体可来自 B 群 RSV,所述异源序列可来自 A 群 RSV。

[0285] 在另一个实施方式中,改造 RSV 以表达获自或来自非 RSV 病毒的一种或多种病毒抗原。病毒抗原的非限制性例子包括来自以下的抗原:腺病毒科(例如,乳腺病毒和禽腺病毒)、疱疹病毒科(例如,单纯疱疹病毒 1、单纯疱疹病毒 2、单纯疱疹病毒 5、单纯疱疹病毒 6、非洲淋巴细胞瘤病毒、HHV6-HHV8 和巨细胞病毒)、光滑病毒科(例如,光滑病毒、肠细菌噬菌体 MS2、异轻小噬菌体)、痘病毒科(例如,脊椎动物痘病毒亚科、副痘病毒、禽痘病毒、山羊痘病毒、兔痘病毒、猪痘病毒、软疣痘病毒和昆虫痘病毒亚科)、乳多孔病毒科(例如,多瘤病毒和乳头瘤病毒)、副粘病毒科(例如,副粘病毒、副流感病毒 1、麻疹病毒属(例如麻疹病毒)、腮腺炎病毒属(例如流行性腮腺炎病毒)、肺病毒亚科(例如,肺病毒、人呼吸道合胞病毒)、人呼吸道合胞病毒和肺炎后病毒(例如,禽肺病毒和人肺炎后病毒)、小核糖核酸病毒科(例如,肠道病毒、鼻病毒、肝病毒(例如人甲型肝炎病毒)、心病毒和口蹄疫病毒)、呼肠孤病毒科(例如,正呼肠孤病毒、环状病毒、轮状病毒、质型多角体病毒、斐济病毒、植物呼肠病毒和水稻病毒)、逆转录病毒科(例如,哺乳动物 B 型逆转录病毒、哺乳动物 C 型逆转录病毒、禽 C 型逆转录病毒、D 型逆转录病毒群、BLV-HTLV 逆转录病毒、慢病毒(例如,人免疫缺陷病毒 1 和人免疫缺陷病毒 2(例如 HIV gp160)、泡沫病毒)、黄病毒科(例如丙型肝炎病毒、登革热病毒、西尼罗病毒)、肝 DNA 病毒科(例如乙型肝炎病毒)、披膜病毒科(例如 α 病毒属(例如辛德毕斯病毒)和风疹病毒属(例如风疹病毒))、弹状病毒科(例如,水疱病毒、狂犬病病毒、短暂热病毒、质型弹状病毒和核型弹状病毒)、沙粒病毒科(例如,沙粒病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、伊派病毒和拉沙病毒)和冠状病毒科(例如冠状病毒和环状病毒)。在一个具体实施方式中,所述病毒抗原来自产生呼吸疾病的病毒,如流感病毒抗原(例如,血凝素 H5 和 H7)、肺炎后病毒抗原、副流感病毒抗原、新城疫病毒抗原、仙台病毒抗原和传染性喉气管炎病毒抗原(ILV)。在某些实施方式中,所述病毒抗来自 1 型人副流感病毒、2 型人副流感病毒、3 型人副流感病毒或仙台病毒。在另一个实施方式中,所述病毒抗原是 HIV gp120、HIV nef、流感病毒神经氨酸酶、流感病毒血凝素、HTLV tax、单纯疱疹病毒糖蛋白(例如, gB、gC、gD 和 gE)、乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎病毒 E 蛋白或冠状病毒突起蛋白。

[0286] 在另一个实施方式中,改造 RSV 以表达一种或多种细菌抗原(例如,细菌外被蛋白或细菌相关保护性抗原)。细菌抗原的非限制性例子包括来自以下的抗原:水螺菌科(Aquaspirillum)、固氮螺菌科(Azospirillum)、固氮菌科(Azotobacteraceae)、类杆菌科(Bacteroidaceae)、巴尔通体(Bartonella)、蛭弧菌科(Bdellovibrio)、弯曲杆菌(Campylobacter)、衣原体(Chlamydia)(例如,肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae))、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)(例如,柠檬酸菌(Citrobacter)、爱德华菌(Edwardsiella)、产气肠杆菌(Enterobacter aerogenes)、欧文菌(Erwinia)、大肠杆菌(Escherichia coli)、哈夫尼菌(Hafnia)、克雷伯菌(Klebsiella)、摩根菌(Morganella)、普通变形杆菌(Proteus vulgaris)、普罗威登斯菌(Providencia)、沙门菌(Salmonella)、

粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*) 和弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*))、加特纳菌科 (*Gardinerella*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、盐杆菌科 (*Halobacteriaceae*)、螺杆菌科 (*Helicobacter*)、军团菌科 (*Legionellaceae*)、李斯特菌 (*Listeria*)、甲基球菌科 (*Methylococcaceae*)、分枝杆菌 (*Mycobacteria*) (例如结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*))、奈瑟球菌科 (*Neisseriaceae*)、海洋螺菌科 (*Oceanospirillum*)、巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*)、螺菌科 (*Spirillum*)、螺状菌科 (*Spirosomaceae*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) (例如甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和致热葡萄球菌 (*Staphylococcus pyrogenes*))、链球菌属 (*Streptococcus*) (例如, 肠炎链球菌 (*Streptococcus enteritidis*)、粪链球菌 (*Streptococcus faeciae*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*))、蝙蝠弧菌螺杆菌科 (*Vampirovibr Helicobacter*)、耶尔森菌科 (*Yersinia*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 和蝙蝠弧菌科 (*Vampirovibrio*)。在一个具体实施方式中, 所述细菌抗原来自引起呼吸疾病或与其相关的细菌, 如肺炎球菌、流感嗜血杆菌、链球菌属和肺炎衣原体。

[0287] 在另一个实施方式中, 改造 RSV 以表达获自或来自致病性真菌的一种或多种真菌抗原。真菌抗原的非限制性例子包括来自以下的抗原: 新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*); 皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*); 皮炎艾里欧菌 (*Aiellomyces dermatitidis*); 荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*); 粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*); 念珠菌属 (*Candida*), 包括白色念珠菌 (*C. albicans*)、热带念珠菌 (*C. tropicalis*)、近平滑念珠菌 (*C. parapsilosis*)、季也蒙假丝酵母 (*C. guilliermondii*) 和克鲁斯念珠菌 (*C. krusei*); 曲霉属 (*Aspergillus*), 包括烟曲霉 (*A. fumigatus*)、黄曲霉 (*A. flavus*) 和黑曲霉 (*A. niger*); 根霉属 (*Rhizopus*); 根毛霉属 (*Rhizomucor*); 小克银汉霉 (*Cunninghamella*); 囊托霉属 (*Apophysomyces*), 包括瓶囊托霉 (*A. saksenae*)、毛囊托霉 (*A. mucor*) 和犁头囊托霉 (*A. absidia*); 申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*); 巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*); 波氏假性阿利什利菌 (*Pseudallescheria boydii*); 光滑球拟酵母菌 (*Torulopsis glabrata*); 毛癣菌属 (*Trichophyton*); 小孢子菌属 (*Microsporum*) 和皮肤癣菌属 (*Dermatophyte*) 的抗原。在一个具体实施方式中, 所述真菌抗原来自引起呼吸疾病或与其相关的致病性真菌。

[0288] 在另一个实施方式中, 改造 RSV 以表达一种或多种寄生虫抗原。寄生虫抗原的非限制性例子包括来自以下的抗原: 顶复亚门成员, 例如, 巴贝虫属 (*Babesia*)、弓形虫 (*Toxoplasma*)、疟原虫属 (*Plasmodium*)、艾美虫属 (*Eimeria*)、等孢球虫属 (*Isospora*)、鸟类弓形球虫属 (*Atoxoplasma*)、隐等孢球虫属 (*Cystoisospora*)、哈蒙德虫属 (*Hamondia*)、贝斯尼虫属 (*Besnotia*)、肉孢子虫属 (*Sarcocystis*)、弗伦克虫属 (*Frenkelia*)、变形血原虫属 (*Haemoproteus*)、住白细胞虫属 (*Leucocytozoon*)、泰勒虫属 (*Theileria*)、帕金虫属 (*Perkinsus*) 和簇虫属 (*Gregarina*); 卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*); 微孢子门成员, 例如, 微孢子虫属 (*Nosema*)、肠类微孢子虫属 (*Enterocytozoon*)、脑类微孢子虫属 (*Encephalitozoon*)、间隔孢子虫属 (*Septata*)、马拉泽虫属 (*Mrazekia*)、钝孢子虫属 (*Amblyospora*)、阿米森虫属 (*Ameson*)、格留虫属 (*Glugea*)、具褶孢虫属 (*Pleistophora*) 和微孢子虫属 (*Microsporidium*); 囊孢子虫亚门成员, 例如, 单孢子虫属 (*Haplosporidium*),

以及以下各种,包括:恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*)、三日疟原虫 (*P. malaria*);刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*);墨西哥利什曼原虫 (*Leishmania mexicana*)、热带利什曼原虫 (*L. tropica*)、硕大利什曼原虫 (*L. major*)、埃塞俄比亚利什曼原虫 (*L. aethiopica*)、杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*);克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、布氏锥虫 (*T. brucei*);曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、埃及血吸虫 (*S. haematobium*)、日本血吸虫 (*S. japonium*);旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*);班氏丝虫 (*Wuchereria bancrofti*);马来丝虫 (*Brugia malayli*);溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*);蛲虫 (*Enterobius vermicularis*);猪带绦虫 (*Taenia solium*)、牛带绦虫 (*T. saginata*);阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、人毛滴虫 (*T. hominis*)、口腔毛滴虫 (*T. tenax*);蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*);微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*);卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*);牛巴贝虫 (*Babesia bovis*)、分歧巴贝虫 (*B. divergens*)、田鼠巴贝虫 (*B. microti*);贝氏等孢球虫 (*Isospora belli*)、人等孢球虫 (*I. hominis*);脆弱双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*);旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*);似蚓蛔线虫 (*Ascaris lumbricoides*);美洲钩虫 (*Necator americanus*);十二指肠钩虫 (*Ancylostoma duodenale*);粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*);菲律宾毛细线虫 (*Capillaria philippinensis*);广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*);微小膜壳绦虫 (*Hymenolepis nana*);阔节裂头绦虫 (*Diphyllobothrium latum*);细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、多房棘球绦虫 (*E. multilocularis*);卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*)、卡里并殖吸虫 (*P. caliensis*);华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*);猫肝吸虫 (*Opisthorchis felinus*)、泰国肝吸虫 (*O. viverrini*);肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*);疥螨 (*Sarcoptes scabiei*);人虱 (*Pediculus humanus*);阴虱 (*Phthirus pubis*) 和人肤皮蝇 (*Dermatobia hominis*)。

8. 实施例

[0289] 参照以下实施例描述本发明。提供这些实施例的目的仅用于说明,不应认为本发明仅限于这些实施例,而应认为本发明包括由本文提供内容显而易见的任何和所有变化形式。当然,应理解,对所用具体设备和试剂、大小、制造商等的具体列举或描述不应视作对本发明的限制,除非特别说明如此。还应理解,可很容易地替换性能类似的其它设备和试剂。

[0290] 8.1 实施例 1 培养基和细胞培养方法

[0291] 已对可用于增殖 MDCK 细胞,具体为非致瘤性 MDCK 细胞达到高密度的无血清培养基制剂(例如,MediV SFM 107、MediV SFM 105)进行了描述(参见例如,FL410US 和 G-FL414US)。然而,采用这些无血清培养基制剂对适应无血清培养基的非致瘤性 MDCK 细胞(例如,ATCC 登录号 PTA-7909 或 PTA-7910)进行的研究表明,尽管可不交换培养基获得重配流感病毒的合理峰病毒效价(通常测定为 $\log_{10}$ FFU/mL),但所述峰效价仍低于交换培养基获得的效价,其中在细胞增殖之后且在感染之前(或同时)去除一部分(约 67%)生长培养基并用感染介质替换。此外,需要额外的蛋白酶(TrypLE)获得这些峰效价。为克服需要培养基交换和/或需要额外蛋白酶的缺点,开发了强化培养基 MediV SFM 110。MediV SFM 110 包含 5X 浓度的维生素、亚油酸、硫辛酸、核苷、腐胺和存在于之前描述的培养基中

几乎所有的氨基酸（参见表 2）。相对于用 MediV SFM 105+TE（数据未显示）获得的细胞密度，使用 MediV SFM 110 不提高细胞密度。然而，采用 MediV SFM 110, 0% 和 67% 的培养基交换显示类似的病毒效价。

[0292] 采用无培养基交换 (MX) 方法和通过 4 个种子反应器的珠粒对珠粒转移（参见以下第 8.2 节提供的实施例）制备并在 MediV SFM 110 培养基中培养的细胞进行了 12 个轮次的实验，其效果如下所述。产生 2L 规模的包含来自野生型毒株 A/Uruguay/716/2007、A/South Dakota/6/2007 和 B/Florida/4/2006 的 HA 和 NA 的三个冷适应 (ca)、温度敏感性 (ts)、减毒 (att) 重配流感病毒毒株（用标识“ca”在前的野生型毒株名称表示），所有三个毒株均产生效价为至少 $8.4 \log_{10}$ FFU/mL 的病毒。采用 1x DPBS 洗涤并采用 TrypLE 精选物和 EDTA 在 pH 8.0 胰蛋白酶消化进行珠粒对珠粒转移之后，观察到种子反应器中的细胞正确脱离和最终生产反应器 (FPR) 中的细胞附着。在感染之后，对这些细胞进行周期性取样以确定最佳收获时间。发现所有病毒类型在感染 3 天后 (dpi) 观察到峰病毒效价。对这些毒株各进行 4 个轮次实验，以证实结果的再现性且数据彼此一致。ca A/Uruguay/716/2007 在感染 3 天后 (dpi) 产生 $8.7 \pm 0.05 \log_{10}$ FFU/mL 的最高效价，而 ca A/SouthDakota/6/2007 和 ca B/Florida/4/2006 的峰效价在 3dpi 分别为 $8.8 \pm 0.0 \log_{10}$ FFU/mL 和 $8.45 \pm 0.25 \log_{10}$ FFU/mL。

[0293] 这些轮次数据的再现性表示无培养基交换方法是一种可靠方法。因此，所述强化培养基在不交换或加入培养基或组分的情况下保持了生产力。因此，所述强化培养基的开发和使用克服了基于细胞培养的流感疫苗生产中最具挑战性的操作问题之一，即需要培养基交换 / 补充。

[0294] 8.1.1 材料和方法

[0295] 材料、试剂和设备：可替换性能类似的其它材料、设备和试剂。

[0296] 1. 杜尔伯科改良伊格尔培养基 (DMEM) / 汉氏 F12 培养基（纽约州格兰德岛的吉布可公司 (Gibco, Grand Island, NY)，目录号 ME080012）。

[0297] 2. MilliQ 或 WFI 水

[0298] 3. MediV SFM 110 基料粉末（纽约州格兰德岛的吉布可公司，目录号 ME080045）

[0299] 4. 葡萄糖（加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司 (Invitrogen, Carlsbad, California)，目录号 15023-021）

[0300] 5. 亚硒酸钠（密苏里州圣路易斯的西格玛公司 (Sigma, St. Louis, MO)，目录号 6607-31）

[0301] 6. L- 谷氨酰胺（纽约州格兰德岛的吉布可公司，目录号 25030-081）

[0302] 7. CD 脂类（纽约州格兰德岛的吉布可公司，目录号 11905-031）

[0303] 8. 小麦蛋白胨（法国拉库尔纳沃的有机技术公司 (Organotechnie, SAS, La Courneuve, France)，目录号 19559）。

[0304] 9. 胰岛素（佐治亚州诺克罗斯的血清公司 (Serological, Norcross, GA)，目录号 4506）

[0305] 10. T3（密苏里州圣路易斯的西格玛公司，目录号 T5516）

[0306] 11. 皮质醇（纽约州菲利普斯堡的马林克罗特公司 (Mallinckrodt, Phillipsburg, NY)，目录号 8830(-05)）

- [0307] 12. 前列腺素 E1 (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录号 P7527)
- [0308] 13. EGF (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录号 E9644)
- [0309] 14. 柠檬酸铁铵 (新泽西州菲利普斯堡的 J-T 贝克公司 (J T Baker, Phillipsburg, NJ), 目录号 1980-01)
- [0310] 15. 托酚酮 (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录号 T89702-5G)
- [0311] 16. 痕量元素 A (弗吉尼亚州马纳萨斯的赛尔格罗 / 密迪亚泰克公司 (Cellgro/Mediatech, Manassas, VA), 目录号 99-182-cl)
- [0312] 17. 痕量元素 B (弗吉尼亚州马纳萨斯的赛尔格罗 / 密迪亚泰克公司, 目录号 99-175-cl)
- [0313] 18. 痕量元素 C (弗吉尼亚州马纳萨斯的赛尔格罗 / 密迪亚泰克公司, 目录号 99-176-cl)
- [0314] 19. 碳酸氢钠 (加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司, 目录号 91425/87-5067)
- [0315] 20. 杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) pH 7.4 (加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司, 目录号 14190-367)
- [0316] 21. EDTA-DPBS 溶液包 (吉布可公司, 目录号 14190-367)
- [0317] 22. 0.5M EDTA pH8 (纽约州格兰德岛的吉布可公司, 目录号 15575-038)
- [0318] 23. 0.2 μ m 斯特里杯 (steri cup) 过滤器 (马萨诸塞州贝尔福德的密理博公司 (Millipore, Bedford, MA), 目录号 SCGPU05RE)
- [0319] 24. TrypLE 精选物 (纽约州格兰德岛的吉布可公司, 目录号 12563)
- [0320] 25. 利马豆抑制剂 (新泽西州雷克伍德的沃辛顿公司 (Worthington, Lakewood, NJ), 目录号 LS002829)
- [0321] 26. Cytodex 3 (新泽西州皮斯卡特维的阿莫山生物科学公司 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 目录号 17-0485-03)
- [0322] 27. 蔗糖磷酸盐 (犹他州洛根的海克隆公司 (Hyclone, Logan, UT), 目录号 SH3A1578-01)
- [0323] 28. 10-20L 无菌包 (堪萨斯州来尼克谢的 SAFC 生物科学公司 (SAFC Biosciences JRH, Lenexa, Kansas), 1329B)
- [0324] 29. 滚瓶 (纽约州康宁的康宁公司 (Corning, Corning, NY), 目录号 3907)
- [0325] 30. NaOH 1M 溶液 (德国达姆施塔特的 EMD 公司 (EMD, Darmstadt, Germany), 目录号 1071)
- [0326] 31. 0.2 μ m 无菌过滤器 (纽约州康宁的康宁公司, 目录号 430320、430767)
- [0327] 32. 1mL、5mL、10mL、25mL、50mL 移液器 (加利福尼亚州布里斯贝恩的 VWR 公司 (VWR, Brisbane, CA), 目录号分别为 53284-700、53283-704、708、710)
- [0328] 33. 5mL 吸入移液管 (加利福尼亚州布里斯贝恩的 VWR 公司, 目录号 53392-044)
- [0329] 34. 1.8mL 艾本多夫 (Eppendorf) 管 (佛罗里达州奥卡拉的美国科学公司 (USA Scientific, Ocala FL), 目录号 1415-5510)
- [0330] 35. 微量移液器尖头 (加利福尼亚州圣迭戈的技术分子生物产品公司 (Art Molecular Bioproducts, San Diego CA), 目录号 20E、200E 和 1000E)
- [0331] 36. 蔗糖磷酸盐, 10x (犹他州洛根的海克隆公司, 目录号 SH3A1578-01)

- [0332] 37. 阿普利康控制器单元 (加利福尼亚州福斯特城的阿普利康生物技术公司 (Applikon Biotechnology, Foster City, CA), 模型 :ADI 1010, ADI1025)
- [0333] 38. 3L 玻璃容器和封头板 (加利福尼亚州福斯特城的生物技术公司 (Biotechnology, Foster City, CA))
- [0334] 38. 2.5" A310 叶轮搅拌机 (纽约州罗切斯特的莱特宁公司 (Lightnin, Rochester, NY))
- [0335] 40. 60mm 船用叶轮 (加利福尼亚州福斯特城的阿普利康生物技术公司)
- [0336] 41. 45mm 船用叶轮 (加利福尼亚州福斯特城的阿普利康生物技术公司)
- [0337] 42. 蠕动泵 (马萨诸塞州威明顿的 WMB 泵公司 (Watson Marlow Bredel Pump, Wilmington, MA), 模型 520S/R)
- [0338] 43. 生物安全柜 (缅因州桑福德的贝克公司 (The Baker Company, Sanford, ME), SG-600)
- [0339] 44. 滚瓶培养箱 (新泽西州维因兰的贝尔科生物技术公司 (Bellco Biotechnology, Vineland, NJ), 模型 7630-80589)
- [0340] 45. 水浴 (宾夕法尼亚州西切斯特的 B-G 公司, PB-1400)
- [0341] 46. 细胞计数仪 (新泽西州艾迪森的新布兰斯维克科学公司 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ), M1293-0000)
- [0342] 47. Bioprofile 400 参数分析仪 (马萨诸塞州沃森姆的诺瓦生物医学公司 (Nova Biomedical, Waltham, MA), Bioprofile 400)
- [0343] 48. 显微镜 (纽约州桑恩伍德的蔡司公司 (Zeiss, Thornwood, NY), Axiovert 25)
- [0344] 49. 数码相机 (纽约州梅尔维尔的尼康公司 (Nikon, Melville, NY), 模型 E5400)
- [0345] 50. 微量移液器 (马萨诸塞州波士顿的实验室系统公司 (Lab system, Boston, MA), 模型号 P2-20, P100, P200, P1000)
- [0346] 51. 辅助移液器 (宾夕法尼亚州布鲁马尔的德罗蒙德公司 (Drummond, Broomall, PA), 目录号 4-000-100)
- [0347] 51. CO₂ 振荡烧瓶培养箱 (马里兰州劳瑞尔的 ATR 生物技术公司 (ATRBiotech, Laurel, MD), 模型 AJ118)
- [0348] 细胞来源: 采用含痕量元素 A、B 和 C 的 MediV SFM105 或 MediV SFM1094 在滚瓶中培养来自过程开发库 (Process Development Bank (PDB)) 的无血清 MDCK 克隆 ID 9B9-1E4 细胞。含痕量元素 A、B 和 C 的 MediV SFM105 的组成和 MediV SFM 109 培养基类似, 除 MediV SFM 105 由液体制成而 MediV SFM109 由粉末制成以外。根据 SOP D02005, 除不进行 2x DPBS 洗涤以外, 通常在接种后每 3-4 天对细胞进行传代。
- [0349] 病毒种: 该过程用 2008/2009 FluMist® 季节性毒株 :A/Uruguay/716/2007 (批次 #nb3903pg94, 141900675A)、A/South Dakota/6/2007 (批次 #141900666) 和 B/Florida/4/2006 (141900641A) 进行。所有这些种均在卵中产生。采用质粒拯救方法已获得类似的种病毒结果 (参见例如, Wang 和 Duke ;2007 年 10 月 23 日, J. Virol., 4 :102 ; Hoffmann 等, 2000, PNAS, 97 (11) :6108-13 ;和 Hoffmann 等, 2002, PNAS, 99 (17) :11411-6)。
- [0350] 培养基: 就这些轮次而言, 在滚瓶和种子反应器 (SR) 轮次中所有常规细胞传代分别采用含 1X 痕量元素 A、B 和 C 以及总浓度 4.5g/L 的 D- 葡萄糖的 MediV SFM 105 或含总

浓度 4.5 或 9.0g/L 的葡萄糖的 MediV SFM 109。将含总浓度 9.0g/L 的 D- 葡萄糖的 MediV SFM 110 培养基用于最终生产反应器 (FPR) 轮次。根据接种条件和预计, 可将 D- 葡萄糖浓度调节到约 4.5 到约 9.0g/L 之间。各培养基的组成见表 2 详示。

[0351] 表 2MediV SFM 培养基制剂

[0352]

组分 ^a	MediV SFM 105 + TE ^d mg/L	MediV SFM 109 mg/L	MediV SFM 110 mg/L
盐			
无水氯化钙	116.6	116.6	116.6
氯化镁	28.64	28.64	28.64
无水硫酸镁	48.84	48.84	48.84
氯化钾	311.8	311.8	311.8
氯化钠 ^c	6999.5	6999.5	3500
磷酸二氢钠一水合物	62.5	62.5	62.5
无水磷酸氢二钠	71.02	71.02	71.02
痕量金属			
NH ₄ VO ₃	0.00065	0.00065	0.00065
AgNO ₃	0.00017	0.00017	0.00017
氯化铝 6H ₂ O	0.0012	0.0012	0.0012
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	0.00255	0.00255	0.00255
氯化镉(CdCl ₂)	0.00228	0.00228	0.00228
氯化铬(无水 CrCl ₃)	0.00032	0.00032	0.00032
氯化钴 6H ₂ O	0.00238	0.00238	0.00238
硫酸铜五水合物	0.0029	0.0029	0.0029
柠檬酸铁	1.1551	1.1551	1.1551
硝酸铁九水合物	0.05	0.05	0.05
柠檬酸铁铵(FAC)	0.2	0.2	0.2
硫酸亚铁七水合物	0.417	0.417	0.417
GeO ₂	0.00053	0.00053	0.00053
MnSO ₄ H ₂ O	0.00017	0.00017	0.00017
钼酸铵盐	0.00124	0.00124	0.00124
硫酸尼凯罗伊铝铜镍合金 (NiSO ₄ 6H ₂ O)	0.00013	0.00013	0.00013
溴化钾	0.00012	0.00012	0.00012
碘化钾	0.00017	0.00017	0.00017
氯化铷	0.00121	0.00121	0.00121
亚硒酸钠	0.0173	0.0173	0.0173
亚硒酸钠五水合物	0.00263		
氟化钠	0.0042	0.0042	0.0042
硅酸钠 .9H ₂ O	0.14	0.14	0.14
含锡氯化物(氯化锡-SnCl ₂)	0.00012	0.00012	0.00012
硫酸锌七水合物	1.295	1.295	1.295
ZrOCl ₂ 8H ₂ O	0.00322	0.00322	0.00322

[0353]

核苷 ^b			
次黄嘌呤, 钠盐	2.39	2.39	11.95
胸苷	0.365	0.365	1.825
氨基酸 ^b			
L-丙氨酸	4.45	4.45	22.25
L-精氨酸 HCl	147.5	147.5	737.5
L-天冬酰胺 H ₂ O	7.5	7.5	37.5
L-天冬氨酸	6.65	6.65	33.25
L-半胱氨酸 HCl H ₂ O	17.56	17.56	87.8
L-胱氨酸 2HCl	31.29	31.29	156.45
L-谷氨酸	7.35	7.35	36.75
L-谷氨酰胺	584	584	584
甘氨酸	18.75	18.75	93.75
L-组氨酸 HCl H ₂ O	31.48	31.48	157.4
L-异亮氨酸	54.47	54.47	272.35
L-亮氨酸	59.05	59.05	295.25
L-赖氨酸 HCl	91.25	91.25	456.25
L-甲硫氨酸	17.24	17.24	86.2
L-苯丙氨酸	35.48	35.48	177.4
L-脯氨酸	17.25	17.25	86.25
L-丝氨酸	26.25	26.25	131.25
L-苏氨酸	53.45	53.45	267.25
L-色氨酸	9.02	9.02	45.1
L-酪氨酸 2Na	55.79	55.79	278.95
L-缬氨酸	52.85	52.85	264.25
维生素 ^b			
d-生物素 (维生素 B ₇ 和维生素 H)	0.0035	0.0035	0.0175
D-泛酸钙	2.24	2.24	11.2
氯化胆碱	8.98	8.98	44.9
氰钴胺素 (维生素 B ₁₂)	0.68	0.68	3.4
叶酸	2.65	2.65	13.25
肌醇	12.6	12.6	63
烟酰胺	2.02	2.02	10.1
吡哆醇 HCl (维生素 B ₆)	2.031	2.031	10.155
核黄素 (维生素 B ₂)	0.219	0.219	1.095
硫胺素 HCl (维生素 B ₁)	2.17	2.17	10.85
脂肪酸 ^b			
α-亚油酸	0.042	0.042	0.21
α-DL-硫辛酸	0.105	0.105	0.525
其它			
腐胺 ^b , 2HCl	0.081	0.081	0.405
碳酸氢钠	2200	2200	4400
丙酮酸钠	55	55	55

[0354]

托酚酮	0.25	0.25	0.25
葡萄糖 ^e	≥4500	≥4500	≥4500
胰岛素	5	5	5
T3	0.000003367	0.000003367	3.367E-06
PGE1	0.025	0.025	0.025
皮质醇	0.01812	0.01812	0.01812
EGF	0.005	0.005	0.005
小麦蛋白胨	2500	2500	2500
CDLC 储存溶液 (组分如下)	1X	1X	1X
花生四烯酸	0.02	0.02	0.02
胆固醇	2.2	2.2	2.2
DL-α-生育酚-乙酸	0.7	0.7	0.7
亚油酸	0.1	0.1	0.1
亚麻酸	0.1	0.1	0.1
肉豆蔻酸	0.1	0.1	0.1
油酸	0.1	0.1	0.1
棕榈酸	0.1	0.1	0.1
棕榈油酸	0.1	0.1	0.1
普流罗尼克 F68	1000	1000	1000
硬脂酸	0.1	0.1	0.1
吐温 80	22	22	22
最终 pH			7.3

[0355] ^a 未在 DMEM/F12 中发现的组分以斜体显示

[0356] ^b 在 DMEM/F12 中发现并在 MediV SFM 110 中强化的组分

[0357] ^c 在 MediV SFM 110 中为保持重量摩尔渗透压浓度而降低的浓度

[0358] ^d 痕量元素 A、B 和 C

[0359] ^e 葡萄糖存在的终浓度为至少 4.5g/L, 可最高补充到终浓度为约 9.0g/L

[0360] 表 3 1000X 痕量元素溶液 A、B 和 C

[0361]

痕量元素溶液A		痕量元素溶液C	
组分	mg/L	组分	mg/L
CuSO ₄ •5H ₂ O	1.60	AlCl ₃ •6H ₂ O	1.20
ZnSO ₄ •7H ₂ O	863.00	AgNO ₃	0.17
亚硒酸•2Na	17.30	Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	2.55
柠檬酸铁	1155.10	KBr	0.12
痕量元素溶液B		CdCl ₂	2.28
组分	mg/L	CoCl ₂ •6H ₂ O	2.38
MnSO ₄ •H ₂ O	0.17	CrCl ₃ (无水)	0.32
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140.00	NaF	4.20
NH ₄ VO ₃	0.65	GeO ₂	0.53
NiSO ₄ •6H ₂ O	0.13	KI	0.17
SnCl ₂ (无水)	0.12	RbCl	1.21
钼酸铵盐	1.24	ZrOCl ₂ •8H ₂ O	3.22

[0362] 表 4 100X 化学成分确定的液体 (CDCL) 溶液

[0363]

组分	FW	mg/L
花生四烯酸	304.5	2
胆固醇	387	220
DL- α -生育酚-乙酸	473	70
亚油酸	280	10
亚麻酸	278.43	10
肉豆蔻酸	228.37	10
油酸	282.46	10
棕榈酸	256.42	10
棕榈油酸	254.41	10
普流罗尼克 F68		100000
硬脂酸	284.48	10
吐温 80		2200

[0364] 生物反应器条件和方法:就所有实验而言,采用来自种子反应器 (SR) 的 1 : 8 分割组分接种 FPR,用 2008/2009 季节性病毒 ca A/Uruguay、ca A/South Dakota 和 ca B/Florida 的重配株进行感染。在相同的条件下操作若干 FPR,以确保过程的可靠性和捕获可变性。进行第一批 3 个实验以平行比较培养基交换 (MX) 和无培养基交换 (No-MX) 过程,各实验各采用一种 2008/2009 病毒。就第一批 3 个实验各自而言,在相同的条件下一式两份进行 2x2LFPR,其中在感染时不进行培养基交换,用相同的病毒毒株感染反应器以捕获过程可变性。因此,用来自 SR 的 1 : 8 分割细胞培养物接种总共 6x2L 生物反应器,用所有三种 2008/2009 季节性病毒毒株进行无培养基交换过程的感染。

[0365] 进行最后两个实验以产生 08/09 毒株的无培养基交换过程效果的更多数据。就第 4 个实验而言,从 1x2L SR 接种 3x2L FPR,用所有三种季节性病毒重配株类型进行感染。实验 5 采用相同的条件重复实验 4。重复实验以捕获过程可变性,从而获得无培养基交换过程的效果。

[0366] 各实验中用于感染的病毒毒株和用于接种 FPR 的细胞来源见表 5 所示。

[0367] 表 5 用于最终生产反应器 (FPR) 感染的病毒毒株和细胞来源

[0368]

实验	细胞来源(SR)	FPRs	感染病毒
实验 1	SR1	FPR1.1.1	A/Uruguay

[0369]

		FPR1.1.2	A/Uruguay
实验 2		FPR2.2.1	A/South Dakota
	SR2	FPR2.2.2	A/South Dakota
实验 3		FPR3.2.1	B/Florida
		FPR3.2.2	B/Florida
		FPR4.3.1	A/Uruguay
实验 4	SR3	FPR4.3.2	A/South Dakota
		FPR4.3.3	B/Florida
		FPR5.4.1	A/Uruguay
实验 5	SR4	FPR5.4.1	A/South Dakota
		FPR5.4.3	B/Florida

[0370] 种子反应器 (SR) :就所有实验而言,在含痕量元素 A、B 和 C 的 MediV SFM 105 培养基 (MediV SFM 105+TE) 或 MediV SFM 109 中采用 2g/LCytodex 3 微载体以 2L 或 5L 的规模在种子反应器中培养细胞。含痕量元素 A、B 和 C 的 MediV SFM 105 的组成和 MediV SFM 109 培养基几乎相同,除 MediV SFM 105 由液体制成而 MediV SFM109 由粉末制成并包含较少亚硒酸钠以外。葡萄糖和谷氨酰胺的浓度分别是 9.0g/L 和 4mM。实验 1-3 中以 1.35×10^5 个细胞 /mL 接种容器,实验 4 和 5 以 1.8×10^5 个细胞 /mL 接种。采用具有 0.02vvm 恒定总流速的纯氧和 N_2 的组合使 SR 中的溶氧 (D.O.) 保持在 50%。对所有 SR 同时采用 CO_2 和 1N NaOH 双重控制 pH。实验 1 和实验 2 的 SR 工作体积分别是 2L 和 5L。二者均配有一个船用叶轮,在 175RPM 进行搅拌。实验 3 和 4 的 SR 工作体积是 2L。二者均配有 2 个莱特宁 (Lightnin) 叶轮,在 175RPM 进行搅拌。对所述研究范围忽略叶轮和工作体积对细胞生长和代谢的影响。就第一批 3 个实验而言,以 22.5 个细胞 /MC 接种 SR。为达到更好的细胞生长,以 30 个细胞 /MC 接种实验 4 和 5 的 SR。描述各 FPR 和其各自 SR 的实验设计在表 5 中列出,各 SR 的过程条件见表 6 所示。接种 4 天后,关闭 SR 的搅拌器、气流、D.O. 和温度控制以使微载体沉降,基本如以下第 8.2 节提供的实施例所述,洗涤细胞,加入 10x TrypLE 在 pH 8 对生物反应器的一半工作体积进行胰蛋白酶消化。采用如表 7 所示的 B2B 转移方案对 SR 组分进行胰蛋白酶消化。

[0371] 最终生产反应器 (FPR) :然后将种子反应器的内含物泵入种子瓶中,采用 125mL 该细胞接种物以 1 : 8 分割比接种 FPR。在含 9.0g/L 葡萄糖浓度的 MediV SFM 110 中培养 FPR 中的细胞。2L FPR 玻璃容器配有 2 个莱特宁叶轮,在 175RPM 进行搅拌。用 0.02vvm 的总流动策略将 D.O. 控制在 50% 空气饱和度,其中保持 40mL/ 分钟的恒定总流速,从 O_2 和 CO_2 气体计算 N_2 气体供应 ($N_2 = 40 - O_2 - CO_2$)。对所有 FPR 同时采用 CO_2 和 1N NaOH 双重支持 pH 控制。生长和感染期间的温度分别控制在 37℃ 和 33℃。用于 FPR 的病毒毒株列于表 5,生长和感染期间的 FPR 过程条件列于表 8。

[0372] 表 6 种子反应器 (SR) 过程条件

[0373]

参数设定点	控制量			
	SR1	SR2	SR3	SR4
葡萄糖(g/L)	9.0	9.0	9.0	9.0
初始细胞/微载体(λ)	22.5	22.5	30	30
最终工作体积(L)	2	5	2	2
微载体(MC)浓度(g/L)	2	2	2	2
溶氧	50	50	50	50
pH	7.4	7.4	7.4	7.4
生长温度($^{\circ}\text{C}$)	37	37	37	37
叶轮数量/类型	1/船用	1/船用	2/莱特宁	2/莱特宁
搅拌(RPM)	175	175	175	175
pH 控制	用 1N NaOH 和 CO_2	用 1N NaOH 和 CO_2	用 1N NaOH 和 CO_2	用 1N NaOH 和 CO_2
总流速(整个运作中保持恒定) (mL/分钟)	40	40	40	40
所用培养基	含痕量元素 A、B 和 C 的 SFM105	SFM109	SFM109	SFM109

[0374] 表 7 采用珠粒对珠粒方案的胰蛋白酶消化条件

[0375]

步骤	说明和设定点	值	单位
1.	去除培养基	80	%
2.	向原始工作体积加入 0.5 mM EDTA/DPBS 洗涤溶液	80	%
3.	以原始设定开始搅拌	15 ± 5	分钟
4.	停止搅拌以使 MC 沉降	15 ± 5	分钟
5.	去除培养基和 DBPS	80	%
6.	向一半原始工作体积加入 0.5 mM EDTA/DPBS 洗涤溶液	50	%
7.	设定搅拌器速率	250	RPM
8.	以原始设定开启 DO 和温度控制	50, 37	%, $^{\circ}\text{C}$
9.	调整控制器上的 pH 设定	8.0	pH

[0376]

10.	加入 10x TypLE 精选物(剩余体积的 X)	0.05	X
11.	胰蛋白酶消化的时间	50 ± 10	分钟

[0377] 表 8 最终生产反应器 (FPR) 过程条件

[0378]

参数设定点	FPRs
最终工作体积(L)	2
最终微载体(MC)浓度(g/L)	2
细胞来源	B2B SR
分割比	1:8
珠粒对珠粒转移后的 SR 组分体积(mL) [#]	125
溶氧	50
pH	7.4
pH 控制	用 1N NaOH 和 CO ₂
搅拌(RPM)	175
最终生长培养基葡萄糖浓度(g/L)	9.0
生长温度(°C)	37
培养基	SFM110
感染温度(°C)	33
10x TrypLE 精选物浓度(X)	0.03

[0379] [#] 珠粒对珠粒转移过程中的细胞含量浓缩 2X。因此,珠粒对珠粒转移后的 125mL 相当于珠粒对珠粒之前的 250mL。

[0380] 分析步骤:每天对容器进行取样。采用 Nucleocounter 细胞计数仪计数细胞,采用显微镜在 10x 放大下拍摄照片以检测细胞形态学特征。采用诺瓦 Bioprofile 400 参数分析仪每天监测 pH、pO₂、pCO₂ 以及葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺和铵的浓度。当在线和离线值的差异高于 0.03pH 单位时,进行生物反应器的 pH 重校准。用 10x 蔗糖磷酸盐 (SP) 稳定感染样品,并在 -80°C 冷冻直至用于分析。基本如下所述,通过采用聚焦荧光鉴定 (FFA) 测定病毒感染性分析病毒复制的进程。

[0381] 聚焦荧光鉴定 (FFA):在 96 孔板中用 MEM/EBSS+1X 非必需氨基酸 +2mM 谷氨酰胺 +PEN(青霉素)/Strep(链霉素)(VGM) 在 36±1°C、5±2% CO₂ 培养 MDCK 细胞,直至汇合(约 4 天)。然后去除 VGM,用新鲜 VGM 洗涤细胞,之后用采用 VGM 连续稀释(例如,10⁻¹、10⁻²...10⁻⁷) 的 100 μL 病毒接种物(例如,ca A/Uruguay、ca A/South Dakota 和 ca B/Florida) 进行感染,在 33±1°C、5±2% CO₂ 温育约 19-20 个小时。一式三份地将各病毒稀释物接种到细胞。在 33±1°C、5±2% CO₂ 温育约 19-20 个小时之后,根据以下方案用抗流感病毒抗体对细胞进行免疫染色,以确定样品的病毒效价。从各板去除包含病毒的细胞培养基,用 200 μL/孔 DPBS 洗涤所述板,之后用 100 μL 冷的 4%低聚甲醛在室温固定 15±3 分钟。然后用 250 μL/孔的 1X 磷酸盐缓冲盐水 +0.05%吐温 20 (TPBS) 洗涤两次板,之后用对 A 毒株或 B 毒株具有特异性的一抗温育细胞。用含 0.1%皂苷、1% BSA 和 0.1%叠氮化钠的 1X PBS (SBSA) 将所述一抗稀释到所需稀释度。在 37±1°C 温育 60±5 分钟之后,去除初次抗体,用 250 μL TPBS 洗涤三次细胞,向孔中加入用 SBSA 制备到所需稀释度的偶联荧光染料的两抗(例如,用 FITC 标记的兔抗绵羊)。在 37±1°C 温育 60±5 分钟之后,去除二抗,如上所述洗涤两次板,并用纳米水洗涤两次,之后用纸巾吸干干燥。然后在室温避光开盖将所述板空气干燥至少 10 分钟。采用倒置荧光显微镜在 100x 总放大率下观察荧光信号。可采用成像软件如 SPOT 程序拍摄图片。通常检测各孔的中间条带,计数所有焦点,并仅计数具有 8-12 个焦点计数的孔。计算各孔的 log₁₀ FFU/mL,并计算三个孔的平均值和标准偏差。

[0382] 8.1.2 结果和讨论

[0383] 第一批 3 个实验和最后 2 个实验分别用 22.5 和 30 个细胞 / 微载体 (MC) 接种种子生物反应器的细胞。图 1 是对所有实验所有 SR 的活细胞密度 (VCD) 和细胞活力 (V%) 作图。在 4dps, 种子反应器的细胞密度的范围是 0.94-1.14 百万个细胞 /mL。细胞密度差异可能是 22.5 和 30 个细胞 /MC 的接种细胞浓度差异造成的。以 22.5 和 30 个细胞 /MC 接种的 SR 中接种 4 天后的细胞密度分别是 0.95 ± 0.01 和 1.12 ± 0.024 百万个细胞 /mL。所有生物反应器的细胞活力均在 90% 以上。培养 4 天后, 在种子反应器中采用 $1 \times 0.5\text{mM}$ EDTA-DPBS 洗涤和 $10 \times$ TrypLE 精选物进行珠粒对珠粒转移以对细胞进行胰蛋白酶消化。胰蛋白酶消化持续 30 ± 10 分钟, 间歇取样以在显微镜下观察细胞脱离。胰蛋白酶消化 30-40 分钟之后, 约 90% 的细胞与 MC 脱离, 在图 2 中可见单个细胞。在所有实验中采用胰蛋白酶消化细胞以 1 : 8 的分割比接种最终生物反应器。所有 FPR 的细胞生长见图 3 所示。由于实验 2 中所有 FPR 在 4dps 的 VCD 均小于 0.6×10^6 个细胞 /mL, 且这些 FPR 中的细胞培养物经历了较长的延迟期, 因此在 5dps 而不是 4dps 接种这些细胞。此外, 未提供实验 4 中 FPR 的感染后 VCD 数据。最后, 尽管小于 0.5×10^6 个细胞 /mL 的 VCD 较低, 在实验 5 中仍在 4dps 感染 FPR。FPR 细胞生长期过程中的活力在 90% 以上。

[0384] 所有 FPR 在感染时间的细胞密度记录于表 9。可看到活细胞密度具有很大差异。其变化范围是 $0.44-1.12 \times 10^6$ 个细胞 /mL。该差异与细胞计数误差相关。SR 和 FPR 的平均 VCD 记录于表 10。SR 和 FPR 在 4dps 的平均 VCD 分别是约 1.12×10^6 个细胞 /mL 和 0.73×10^6 个细胞 /mL。

[0385] 表 9 所有 FPR 在感染时的活细胞密度 (单位: $\times 10^6$ 个细胞 /mL)

[0386]

轮次	感染时的 VCD ($\times 10^6$ 个细胞/mL)	接种后 天数
FPR1.1.1	1.12	4
FPR1.1.2	0.98	4
FPR2.2.1	0.56	4
FPR2.2.2	0.66	4
FPR3.2.1	0.68	5
FPR3.2.2	0.44	5
FPR4.3.1	1.09	4
FPR4.3.2	0.69	4
FPR4.3.3	1.07	4
FPR5.4.1	0.51	4
FPR5.4.2	0.51	4
FPR5.4.3	0.44	4

[0387] 表 10 所有 SR 和 FPR 的平均活细胞密度

[0388]

4dps 平均 VCD ($\times 10^6$ 个 细胞/mL)	22.5 个细胞/MC 的 SR w/λ	0.95 $\pm$ 0.01
	30 个细胞/ MC 的 SR w/λ	1.12 $\pm$ 0.024

感染时的平均 VCD ($\times 10^6$ 个细胞/mL)	无 MX 过程的 FPR	0.73 $\pm$ 0.026
---	---------------------	------------------------------------

[0389] 胰蛋白酶消化之后, FPR 中的细胞在 0dps 附着到微载体珠粒, 然后开始在微载体珠粒表面增殖。在 4dps 时, 大多数微载体被细胞覆盖, 仅有一些珠粒保持空闲状态(无细胞覆盖珠粒)。所有实验中的细胞形态学特征均类似。显示 3dps 和 4dpi 典型细胞形态学特征的照片分别见图 4 和图 5 所示。

[0390] 在 4 或 5dps, 分别用 ca A/Uruguay、ca A/South Dakota 和 ca B/Florida 感染实验 1、2 和 3 中的 FPR。在感染之前, 向细胞培养基加入 0.03x 的 10xTrypLE 精选物。在实验 4 和 5 中, 用三种季节性毒株 ca A/Uruguay、ca A/South Dakota 和 ca B/Florida 中的一种感染各 FPR。图 6 显示在感染后 68-74 小时(hpi) 达到峰病毒效价。此外, 所述病毒效价之后一致保持高水平直到 92hpi。

[0391] 各病毒毒株类型的平均病毒效价总结于表 11。caA/Uruguay、ca A/South Dakota 和 ca B/Florida 的平均病毒效价分别为 8.7、8.8 和 8.45 $\log_{10}$ FFU/mL。这与作 67% 培养基交换时观察到这些病毒的情况一致或更高。

[0392] 采用 67% 培养基交换过程(基本如国际专利公开 WO 08/105931 所述, 参见实施例 12) 相对无培养基交换过程(基本如上所述进行), 进行另外的实验以比较四种毒株(ca A/Wisconsin/67/05、A ca A/Uruguay、ca A/SouthDakota 和 ca B/Florida) 产生的病毒效价。对各方法和毒株进行至少两个轮次实验。从图 7 可看出, 各毒株在 67% 培养基交换和无培养基交换过程之间的峰病毒效价相当。

[0393] 表 11 FPR 各病毒毒株的平均峰病毒效价

[0394]

病毒毒株	平均峰病毒效价 ($\log_{10}$FFU/mL)	峰收获日(dpi)	FPR 数量
A/Uruguay/716/2007	8.7 $\pm$ 0.05	3	4x2L
A/SouthDakota/6/2007	8.8 $\pm$ 0.0	3	4x2L
B/Florida/4/2006	8.45 $\pm$ 0.25	3	4x2L

[0395] 培养基交换是目前基于细胞培养的流感疫苗制备方法中的一个主要操作步骤。已为去除感染之前的培养基交换付出了大量努力, 因为不进行培养基交换可降低微生物污染的可能性并可实施更多的操作友好性方法。通过无培养基交换的一系列 12 个生物反应器轮次, 收集过程结果数据, 更具体为细胞脱离/附着、细胞生长和病毒效价以评价新疫苗生产方法的可变性和采用新珠粒对珠粒转移方案用直接从 SR 取出的细胞接种 FPR 的可行性。不进行感染前的培养基交换, 将三种病毒毒株, 即 ca A/Uruguay、ca A/SouthDakota 和 ca B/Florida 各生产 4 次。已证实 4dps 时 SR 中的 VCD 可达到最高 1×10^6 个细胞/mL, 且采用 1x DPBS、TrypLE 精选物和 EDTA 可成功完成的 B2B 转移, 其中胰蛋白酶消化 30-40 分钟后种子反应器中发生有效(> 90%) 细胞解离。FPR 中的细胞在微载体珠粒表面增殖, 并在感染时达到约 0.73×10^6 个细胞/mL 的平均 VCD。所有无 MX 过程的 FPR 轮次中 ca A/Uruguay、

ca A/South Dakota 和 ca B/Florida 的峰病毒效价在 3dpi 时分别是 8.7 ± 0.05 、 8.8 ± 0.0 和 $8.45 \pm 0.25 \log_{10}$ FFU/mL。这与通常观察到的进行 67% 培养基交换的病毒毒株情况一致或更好（参见图 8）。所有病毒类型的峰病毒效价均大于 $8.4 \log_{10}$ FFU/mL。这些结果清楚地表明，本文所述的 B2B 转移和无 MX 方法是非常可靠的方法。它们最大程度减少对昂贵培养基试剂的使用并可降低污染可能性。

[0396] 8.2 采用低浓度蛋白酶的快速珠粒对珠粒转移方法

[0397] 该实施例描述采用 DPBS/0.5mM EDTA pH8 洗涤溶液和低浓度蛋白酶（例如，0.05X TrypLE）在旋转烧瓶、振荡烧瓶或搅拌罐生物反应器中进行 MDCK 细胞快速有效的珠粒对珠粒转移的方法和参数。过程流的整体视图见图 8 提供。可用于所述方法的代表性设备和试剂见表 12、表 13 和表 14 详示。当然，也可任选用性能类似的其它设备和试剂代替，且除非明确说明，对具体品牌或类型的设备和试剂的特别提及不应理解为构成限制。

[0398] 在上述 12 个轮次中采用该方法。根据所述，通过采用 EDTA 的 1x DPBS 洗涤和 TrypLE 精选物在 pH 8 的胰蛋白酶消化的珠粒对珠粒转移方案观察到种子反应器中正确的细胞脱离和 FPR 中的细胞附着。因此，所述珠粒对珠粒转移方法是快速、有效和可靠的。

[0399] 表 12 设备列表

设备	制造商	模型
[0400] 生物安全柜 (BSC)	贝克公司	SG-600
控制器/控制台	阿普利康公司	ADI1030/ADI1035
搅拌罐生物反应器 (5L, 10L; 15L)	阿普利康公司	Z611000010
[0401] 显微镜	蔡司公司或尼康公司	Axiovert25
Cedex 细胞计数仪	英诺瓦公司 (Innovatis)	G007D00138
蠕动泵	科尔帕尔默公司 (Cole Parmer)	7553-70 或等效产品

[0402] 表 13 材料和试剂

组分	建议供应商	目录号
10X TrypLE 精选物	英杰公司	04-0090DG
乙二胺四乙酸 (EDTA, 二钠盐二水合物) FW 372.24	西格玛公司或同等公司	Cat #E5134-500G
[0403] 0.5M EDTA pH8	吉布可公司	15575-038
0.5M EDTA pH8	内部提供	NA
杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水 (20L 包); 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}	吉布可公司或同等公司	14190-367
杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水粉末 10X; 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}	吉布可公司或同等公司	21600-069

[0404] 表 14 DPBS/0.5mM EDTA-pH8 洗涤溶液的制备

组分	浓度	体积 (mL)
[0405] DPBS	无	1000
0.5M EDTA pH8 (吉布可公司或内部提供)	0.5mM	1
pH	8.0	无

[0406] 从 10X DPBS 粉末制备 1X 液体培养基 DPBS :将粉末培养基加入室温水,温和搅拌。(勿加热水)。漂洗容器内部以去除所有痕量粉末。用水稀释到所需体积。搅拌直至溶解。(勿过度混合)。将培养基 pH 调整到 7.8 ± 0.1 (最终工作 pH 是 8.0)。pH 单位在过滤后通常会上升 0.1-0.3。在调整 pH 之后,将容器保持封闭,直至过滤培养基。立即采用 0.1 微米膜灭菌。

[0407] 0.5M EDTA 储液的制备 :向 800mL 去离子水加入 186.1g EDTA (二钠二水合物)。在搅拌时加入约 20g NaOH 片或 10N NaOH,使 pH 达到 8.0。注 :缓慢加入最后几克以避免使 pH 过头。EDTA 在 pH 大约为 8 时溶解。用去离子水将体积调整到 1L。用 0.1 微米过滤器过滤。等分为较小体积 (每瓶 200mL) 并在室温储存。

[0408] DPBS/0.5M EDTA 储液的制备 :每升 DPBS 加入 1mL 0.5M pH 8 的 EDTA 储液。如果必要,将培养基 pH 调整到 7.8 ± 0.1 (最终工作 pH 为 8.0)。注 :pH 单位在过滤后通常会上升 0.1-0.3。用 0.1 微米过滤器过滤。

[0409] 1X DPBS/0.5mM EDTA-pH8.0 洗涤步骤 :如果适用,停止搅拌、pH、DO、温度控制。使微载体珠粒沉降 15 ± 5 分钟。通过出口移出 $80 \pm 10\%$ 用过的生长培养基。参见表 15。注 :该方案可采用交互切向流 (ATF) 完成。用等体积的 1X DPBS/0.5mM EDTA-pH8.0 洗涤溶液替换到培养容器中。参见表 15。以原始设定开始搅拌,将细胞洗涤 25 ± 5 分钟。停止搅拌,使微载体珠粒沉降 15 ± 5 分钟。通过出口移出 $80 \pm 10\%$ 洗涤溶液。参见表 16。注 :该方案可采用 ATF 完成。向容器加入 1X DPBS/0.5mM EDTA-pH8.0 洗涤溶液,最多达到工作培养基体积的 50%。参见表 15。将搅拌器速率设定到所需 rpm。参见表 16。开启搅拌器、pH、DO 和温度控制。将 pH 设定调整到 8.0。参见表 16。

[0410] 表 15 DPBS/0.5mM EDTA-pH8.0 洗涤体积和搅拌速率

[0411]

	生物反应器工作体积			
	2L	5L	10L	15L
待移出体积 (L)	1.6 ± 0.2	4 ± 0.5	8 ± 1	12 ± 1.5
待加入体积 (L)	1.6 ± 0.2	4 ± 0.5	8 ± 1	12 ± 1.5
搅拌 (rpm)	175	175	134	134

[0412] 表 16 1X DPBS/0.5mM EDTA pH8.0 洗涤体积、搅拌速率、pH、温度和 DO 设定

[0413]

	生物反应器工作体积			
	2L	5L	10L	15L
待移出体积 (L)	1.6 ± 0.2	4 ± 0.5	8 ± 1	12 ± 1.5
待加入体积 (L)	0.6 ± 0.2	1.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	4.5 ± 1.5
搅拌 (rpm)	250	250	220	220
pH	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
[0414]				
温度	37 ± 0.1°C	37 ± 0.1°C	37 ± 0.1°C	37 ± 0.1°C
DO	50%	50%	50%	50%

[0415] 细胞脱离方案:在培养基 pH 达到 8 ± 0.1 时,通过注射口或通过培养基口加入计算体积的 10X TrypLE 达到 0.05X 的终浓度。参见表 17。注:也可相对于所需工作体积对 10X TrypLE 进行 1 : 200 稀释。通过取样口每 15 ± 2 分钟提取样品等分,直至完全脱离。注:细胞脱离应在 < 60 分钟内完成。向培养容器的原始工作体积中加入基础培养基。停止除搅拌器和 pH 控制以外的所有控制回路。

[0416] 珠粒对珠粒方案:将所需体积的脱离细胞转移到最终生产反应器中。参见表 18。

[0417] 表 17 10X TrypLE 体积

	生物反应器工作体积			
	2L	5L	10L	15L
10X TrypLE (mL)	5	12.5	25	37.5

[0421] 表 18 向最终生产反应器的珠粒对珠粒方法转移

1:8 分割	生物反应器工作体积			
	2L	5L	10L	15L
胰蛋白酶消化细胞的体积	0.250L	0.625L	1.25L	1.875L
完全生长培养基	1.725L	4.375L	8.75L	13.125L
Cytodex 3 微载体	3.45g	8.75g	17.5g	26.25g

[0423] 8.3 实施例 3 细胞培养物产生的流感病毒的纯化过程

[0424] 产生于细胞培养物中的流感病毒的可靠大规模纯化方法的发展需要加强开发。开发的早期方法中将病毒收获物(感染后 60-65 小时)泵入包内,向病毒收获物(VH)包加入 1/10 稀释度的 10X 蔗糖磷酸盐(SP)缓冲液以便稳定病毒。首先在 32°C,用含 2mM MgCl₂ 的 50 单位/mL Benzonase 对稳定的病毒收获物(SVH)处理 3 小时,以去除 MDCK 宿主细胞 DNA,通过加入 5mM EDTA 停止该反应。Benzonase 是一种改造的重组内切核酸酶,其在镁离子的存在下将 DNA 降解为寡核苷酸。然后通过 1.2 μm 聚丙烯(PP)和 0.45 μm PVDF 胶囊式过滤器澄清 Benzonase 处理的病毒收获物。通过在 500kDa 分子量截留值的中空纤维筒上用 SP 缓冲液进行 5 倍(5X)超滤和 5 倍渗滤使澄清的 VH 达到要求。病毒颗粒会被截留在渗余物侧,而宿主细胞蛋白质(HCP)、宿主细胞 DNA(HCD)和 Benzonase 会被渗滤到中空纤维的渗透物侧。采用 Cellufine 硫酸酯(CS)色谱柱纯化经浓缩和渗滤的病毒,以进一步去除 HCD、HCP 和 Benzonase 杂质。CS 是结合柱上病毒的亲和树脂,采用 SP 高盐缓冲液洗脱结合的病毒。在 500kDa 分子量截留值的中空纤维筒上通过 5 体积倍数的 SP100(200mM 蔗糖和 100mM 磷酸钾,pH 7.2)缓冲液对从柱洗出液纯化的病毒进行渗滤,以去除高盐洗脱

缓冲液并配制纯化病毒。然后通过加入 1/9 稀释度的 cGAG 稳定经渗滤的病毒产物,并采用 0.22 μm 过滤器无菌过滤以产生最终的批量产物。

[0425] 对初始方法进行充分的改动,改善可升级性、过程效率和最终产物的质量。对所述方法的改动基于对回收率和杂质 (HCD、HCP 和 Benzonase) 水平的评价,实施到原始建立的方法中。总共实施 5 个方法步骤,以解决可升级性和改善过程效率和最终产物的质量。首先,将采用 2000FFU/mL 病毒输入量感染的细胞的病毒收获改为感染后 48 小时,该时间与峰病毒效价对应。第二,将 HCD 去除步骤从分批模式 Benzonase 处理改为柱上 Benzonase 处理。这两个步骤一起通过显著降低起始材料和最终批量的 HCD 水平来改善最终产物的质量。第三,将 CS 树脂的加载浓度从 9.0log₁₀FFU/mL 增大到 9.5log₁₀FFU/mL,这使生产柱的大小从 4L 减小到 1.4L 并改善过程效率。第四,将第二缓冲液交换体积从 5 体积倍数增大到 8 体积倍数以增强 Benzonase 清除。第五,将最终过滤器流量减少一半到平均 25L/m²,以避免在 CTM 轮次的最终过滤过程中发生任何堵塞。最终的方法(以下详述)提供产生平均总回收率为 43.4%的过程,其中含 0.72ng/ 剂量(通过 PicoGreen 测定)和 0.1ng/ 剂量(通过 PCR 测定)HCD、0.21 μg / 剂量 HCP 和 0.0035ng/ 剂量 Benzonase,以上各物质均在管理机构要求的规格以下。图 10 提供初始和改进纯化方法的概览。

[0426] 8.3.1 材料和方法

[0427] 材料,试剂和设备:可很容易地替换性能类似的其它材料、设备和试剂。

[0428] 1.1.2 μm Polygard CN Opticap XL5 过滤器(马萨诸塞州比莱瑞卡的密理博公司(Millipore Corporation, Billerica, MA),目录号 KN12A05HH1)

[0429] 2.0.45 μm Durapore Opticap XL4 过滤器(马萨诸塞州比莱瑞卡的密理博公司,目录号 KPHLA04HH3)

[0430] 3.50L 包(犹他州洛根的海克隆公司,目录号 SH30712.04)

[0431] 4.10L 包(犹他州洛根的海克隆公司,目录号 SH30712.12)

[0432] 5.中空纤维,500KD,4800cm²(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司(GE Healthcare, Uppsala, Sweden),目录号 UFP-500-C-6A)

[0433] 6.中空纤维,500KD,290cm²(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 UFP-500-C-3X2MA)

[0434] 7.Cellufine 硫酸酯树脂(日本东京的奇索公司(Chisso Corporation, Tokyo, Japan),目录号 19847)

[0435] 8.凸缘 O 环(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 18-8494-01)

[0436] 9.接头 O 环(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 18-8475-01)

[0437] 10.床层支座,23 μm ,端片(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 18-9252-01)

[0438] 11.床层支座,23 μm ,接头(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 18-1103-08)

[0439] 12.25mm 内径垫片,EPDM(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 18-0019-27)

[0440] 13.4 口 2 向阀(瑞典厄普萨拉的 GE 医疗保健公司,目录号 18-5757-01)

[0441] 14.Sartopore2 300 过滤器胶囊,0.45 μm /0.22 μm ,300cm²(马萨诸塞州萨托里斯公司(Satorius, MA),目录号 5441307H5--00--B)

- [0442] 15. Sartopore2 150 过滤器胶囊, $0.45\mu\text{m}/0.22\mu\text{m}$, 150cm^2 (马萨诸塞州萨托里斯公司, 目录号 5441307H4--00--B)
- [0443] 16. 1L PETG 瓶 (纽约州罗切斯特的纳尔金公司 (Nalgene, Rochester, NYU), 目录号 2019-1000)
- [0444] 17. 2L PETG 瓶 (纽约州罗切斯特的纳尔金公司, 目录号 2019-2000)
- [0445] 18. MasterFlex 铂处理硅氧烷管 L/S 24 号 (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司 (Cole Parmer, Vernon Hills, IL), 目录号 96410-24)
- [0446] 19. MasterFlex 铂处理硅氧烷管 L/S 36 号 (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司, 目录号 96410-36)
- [0447] 20. 1X 蔗糖磷酸盐缓冲液 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录号 SH3A1577)-218mM 蔗糖和 11mM 磷酸钾, pH 7 缓冲液
- [0448] 21. 1XSP/1M NaCl 缓冲液 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录号 SH3A2034)
- [0449] 22. SP100 缓冲液 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录号 SH3A1796)-200mM 蔗糖和 100mM 磷酸钾, pH 7.2 缓冲液
- [0450] 23. cGAG 缓冲液 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录号 SH3A1795)
- [0451] 24. Benzonase (德国达姆施塔特的 EMD 公司, 目录号 1.01697.0002)
- [0452] 25. 1M MgCl_2 (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录号 M1028, 批次 #085K8920)
- [0453] 26. Quant-iT PicoGreen 双链 DNA 试剂盒 (俄勒冈州尤金的英杰公司 (Invitrogen, Eugene, Oregon), 目录号 P11496, 批次 #22987)
- [0454] 27. 0.5N NaOH, 从 10N NaOH 稀释得到 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司 (VWR, West Chester, Pennsylvania), 目录号 VW3247-7)
- [0455] 28. 蠕动泵 (马萨诸塞州威明顿的 WM 公司 (Watson Marlow Inc., Wilmington, MA), 模型 520U、520S 和 520Di)
- [0456] 29. 波混合器 (瑞典厄普萨拉 GE 医疗保健公司, 目录号: 混合器 20/50EH)
- [0457] 30. AKTA 过程色谱滑道 (瑞典厄普萨拉 GE 医疗保健公司, 目录号 28409334)
- [0458] 31. Uniflux10 过滤滑道 (瑞典厄普萨拉 GE 医疗保健公司, 目录号 28920799)
- [0459] 32. BPG 100 色谱柱 (瑞典厄普萨拉 GE 医疗保健公司, 目录号 18-1103-01)
- [0460] 33. BPG 200 色谱柱 (瑞典厄普萨拉 GE 医疗保健公司, 目录号 18-1103-11)
- [0461] 34. Flexstand (瑞典厄普萨拉 GE 医疗保健公司, 目录号 56-4107-54)
- [0462] 表 19 来自单用生物反应器的病毒收获批次 (67% 培养基交换)
- [0463]

毒株	细胞培养物批次 #	纯化批次轮次 #	感染后收获时间
A/New Caledonia/20/99	Sub 08012007-PP	1	60-65 小时
A/Wisconsin67/05	Sub 05012007-PD	2	60-65 小时
A/Wisconsin67/05	Sub 15012007-PP	3	60-65 小时
A/New Caledonia/20/99	Sub 19012007-PD	4	60-65 小时
B/Malaysia2506/04	Sub 22012007-PP	5	60-65 小时
B/Malaysia2506/04	Sub 26012007-PD	6	60-65 小时
A/New Caledonia/20/99	Sub 05022007-PP	7	60-65 小时
A/Wisconsin67/05	Sub 16022007-PD	8	48 小时
B/Malaysia2506/04	Sub 26022007-PP	9	48 小时

[0464] 细胞培养病毒收获 (VH): MDCK 细胞生长和病毒生产的详细内容见国际专利申请公开 WO 08/105931 (特别参见实施例 12)。所有病毒生产轮次均在包括 67% 培养基交换过程的单用生物反应器 (SUB) 中进行, 采用 2000FFU/mL 的病毒输入量感染细胞。在感染 MDCK 细胞约 60-65 小时 (轮次 1-7) 或 48 小时 (轮次 8-9) 后收获病毒。在病毒收获 (VH) 前使 SUB 中的微载体沉降不少于 45 分钟。将约 18L 病毒以约 0.2L/分钟泵入 50L 包, 将 2L 10X SP 缓冲液泵入相同包以便稳定病毒收获物 (SVH)。混合后, 提取 SVH 阶段的样品以便通过 FFA 测试感染性和进行 HCD 和 HCP 试验。

[0465] 直流过滤 1 (DFF1): 准备过滤器器材, 在病毒收获前一天进行高压灭菌。显示 1.2 μm Polygard CN 聚丙烯过滤器囊和 0.45 μm Durapore PVDF 过滤器囊的过滤器器材图见图 9A 上图详示。通过封闭器材组合件以 1.5 升/分钟 (LPM) 抽吸约 20L SVH, 在 SVH 通过过滤器时对其进行灌注。1.2 μm Polygard CN 聚丙烯过滤器囊的总膜表面积为 1800 cm^2 , 0.45 μm Durapore PVDF 过滤器囊的总膜表面积为 1900 cm^2 。在 1.5LPM 的过滤流速下, 1.2 μm 和 0.45 μm 的流量分别为每小时每平方米面积 500 升 (LMH) 和 474LMH。1.2 μm 和 0.45 μm 过滤器的实际加载量分别为 111 和 105L/ m^2 。将澄清滤液作为 DFF1 收集在 20L 包中。对 DFF1 滤液取样并通过 FFA 测试感染性并测试残留的 HCD 和 HCP。

[0466] 切向流过滤 1、5X 超滤 (UF)/5X 膜渗滤 (DF) (TFF1): 准备 Uniflux 滑道的管道器材, 在病毒收获前一天高压灭菌。所有管道器材图见图 9A 下图详示。采用以下操作参数通过 Uniflux 滑道进行 TFF1 步骤。Uniflux 滑道是一种设计为操作中空纤维筒的自动化膜分离过滤系统。采用腔径为 0.5mm、总膜表面积为 4,800 cm^2 、通道长度为 60cm 的 500kDa 分子量截留值 (MWCO) 中空纤维。该方法产生 41.7L/ m^2 膜面积的最终 DFF1 加载量, 处于之前评价的 TFF 1 过程的 40-150L/ m^2 的最佳范围内。就轮次 1-6 而言, 过程后清洁同一中空纤维筒并重复使用。就轮次 7-9 而言, 准备新的中空纤维用于各轮次。在进行各轮次之前, 通过用去离子 (DI) 水漂洗 90 分钟去除甘油防腐剂、用 0.5N NaOH 消毒 1 小时并用 1X SP 缓冲液平衡至 pH 7.0 来准备新的中空纤维筒。整个 5XUF/5XDF 过程采用程序设置为 16000 s^{-1} 恒定剪切速率和 20psi 恒定 TMP 的 Uniflux 滑道操作。

[0467] 通过 Uniflux 滑道处理全部体积的 DFF1。首先将约 5L 的 DFF1 泵入 Uniflux 过程罐。渗透物管线初始封闭以建立 8.6L/分钟的再循环 (渗余物) 流速, 其相当于 16,000 s^{-1} 的剪切速率。再循环 5 分钟后, 开始 5XUF 过程。开放渗透物管线以使小于 500kDa 的杂质如 HCP 和 DNA 通过膜, 而渗余物控制阀逐渐关闭以达到 1.4 巴 (20.3psi) 的跨膜压力

(TMP) 设定点。将剩余 DFF1 滤液连续泵入过程罐,以保持 5 ± 0.1 L 的恒定罐水平,直至将全部体积的 DFF1 进料到罐中。所有 DFF1 材料进料之后,关闭进料泵,渗余物继续浓缩直至最终渗余物体积达到 4L 或收集到 16L 渗透物。通过用 5X 体积倍数的 1X SP 缓冲液 (20L) 进行缓冲液交换对所述 4L 渗余物 (5XUF) 进行渗滤,以上述相同的剪切速率和 TMP 操作所述过程。开放渗滤缓冲液管线,再次开启进料泵以泵入 1X SP 缓冲液。5XDF 过程在收集到 20L 渗滤渗透物之后结束。在 5XDF 结束时,完全开放渗余物控制阀并再次关闭渗透物管线,以使系统再循环而清除所述过程中弱结合于中空纤维膜表面上的任何可回收病毒。排出包含浓缩和渗滤病毒产物的渗余物,并将其收集在 10L 产物包中。就最后两个纯化轮次 (8 和 9) 而言,在渗余物收集之后引入另外的缓冲液漂洗步骤。将约 1.5L 1X SP 泵入过程罐中,在渗透物管线关闭状态下再循环 5 分钟。也将该缓冲液漂洗物收集到同一 10L 产物包中,将所述包标记为 5XUF 5XDF TFF1 产物,总体积为约 5.5L。对所述 TFF1 产物取样以通过 FFA 测试感染性、HCD 和 HCP。在各过程轮次之后用 0.5N NaOH 以 8.6L/ 分钟的再循环流速将中空纤维筒和 Uniflux 系统清洁 1 小时。

[0468] BPG 100/200 Cellufine 硫酸酯 (CS) 柱填充和柱评价:将 CS 树脂以约 50% 浆液储存在 20% 乙醇中。采用 1 : 1 的压缩比计算填充 BPG 100 或 BPG200 柱所需的树脂量。通过用 1X SP 缓冲液进行两次缓冲液交换,之后用 1X SP/1M NaCl 缓冲液进行一次缓冲液交换来制备计算的树脂量。

[0469] 根据制造商的说明,组装 BPG 100 和 BPG 200 柱。准备空柱,使用前用 0.5N NaOH 消毒并用 DI 水漂洗。采用 AKTA 过程滑道,用 1X SP 缓冲液将 CS 树脂以 500cm/ 小时流动填充到 BPG 100 柱,以产生 15-20cm (目标 17.5cm) 的柱床层高度。AKTA 过程是一种自动化液体色谱系统。

[0470] 沿空柱侧壁倾倒 1X SP/1M NaCl 缓冲液制备的树脂浆液,用注射瓶中的水将壁上剩余的任何残留树脂漂洗下来。使树脂沉降到液体水平以下至少 10cm 的树脂床层高度。不破坏树脂床层将顶部接头插入柱中,然后用止动螺钉 / 螺母固定。在柱入口处安装 4 口 2 向阀 (4-2 阀)。将四个不同端口进行如下连接:

[0471] 1-AKTA 过程系统柱入口

[0472] 2- 柱人工冲洗 (连接到废料或再循环管线)

[0473] 3- 针刺测试连接器 (采用凹形路厄锁紧套口注射高盐溶液进行 HETP 测试)

[0474] 4-BPG 100/200 柱入口

[0475] 然后将 BPG100 底部出口连接到 AKTA 系统柱出口。在降低柱接头之前,检查 4-2 阀、端口 3 和 4 的连接。缓慢将顶部接头降低进入树脂床层,从 4-2 阀的端口 3 冲洗出小体积缓冲液。这确保用缓冲液冲洗顶部接头的入口。

[0476] 然后转换 4-2 阀以连接端口 1 和 2。将 1X SP 缓冲液与 AKTA 系统入口连接,首先以 500cm/ 小时开启流体以通过柱冲洗端口 (4-2 阀上的端口) 在该点绕过柱。在流速在流量计上达到 500cm/ 小时时,迅速调整 4-2 阀使端口 1 和 4 连接。在树脂床层达到目标床层高度时,较近的接头低于树脂床层。重复这些步骤直至树脂床高度无变化和接头到达树脂床层。将接头进一步降低 1-3mm 以压缩树脂床层,从而避免接头和树脂床层之间出现任何顶部空间。

[0477] 在填充评价之前,用 1X SP 平衡 CS 柱以建立稳定的传导率基线。采用针刺测试连

接器(4-2 阀上的端口 3-4)通过注射 2%柱体积(CV)的 1XSP/1M NaCl 评价柱填充。用 1X SP 以 50cm/ 小时的流速(4-2 阀上的端口 1-4)平衡柱。传导率峰值出现在约 1/2CV。将 Unicorn 软件上所得的传导率峰值用来评价柱板高度(HETP)和峰不对称性。一旦达到所需柱 HETP,使用前对柱进行消毒并将其储存在 0.5N NaOH 中。

[0478] Cellufine 硫酸酯色谱(CS):准备 AKTA 过程滑道的管道器材,在病毒收获前一天进行高压灭菌。所有管道器材图见图 9B 上图详示。通过程序化方法将整个色谱过程自动化。

[0479] 在各轮次之前用 1X SP 人工平衡 AKTA 过程滑道的所有流体通道。在过程开始时,首先用 3 个柱体积(CV)的 1X SP 以 150cm/ 小时的线性流速平衡柱。然后将全部体积的 5XUF 5XDF TFF1 加载到柱上,收集作为流通物的未结合材料。加载之后,用 1CV 的 1X SP 以 150cm/ 小时洗涤柱,之后用含 50U/mL Benzonase 和 2mM MgCl₂(1X SPB)的 2.5CV 1X SP 以 50cm/ 小时进行柱上 Benzonase 处理。减小的线性流速和计算的 1X SPB 洗涤体积允许柱树脂与 Benzonase 有 50 分钟的接触时间。然后用 1CV 1X SP 以 50cm/ 小时洗涤柱以替换最后 1CV 1X SPB 柱上 Benzonase 处理,并用另外 1CV 1X SP 以 150cm/ 小时洗涤。用 3CV 1X SP/1M NaCl 缓冲液从柱上洗脱结合的病毒。将 CS 洗出液收集在 10L 包中,洗脱峰的收集基于紫外吸光度(采用 5mm 通道长度紫外流式细胞从 50mAU 到 50mAU(0.1 O.D. 到 0.1 O.D.)读出的 A₂₈₀)。来自 BPG 100 柱的 CS 洗脱体积为约 0.6-0.9L。在各过程轮次之后用 0.5N NaOH 对柱和 AKTA 过程系统消毒。对柱加载物、流通物、洗涤物和洗出液取样通过 FFA 测试感染性、Benzonase、HCD 和 HCP。

[0480] 切向流过滤 2,8XDF(TFF2):根据制造商的说明进行 Flexstand 的设置和使用。采用腔径为 0.5mm、通道长度为 60cm、总膜表面积为 290cm²的 500kDa MWCO 中空纤维。在上述该大小的膜面积和 CS 洗脱体积的情况下,最终加载量在 20-50L/m²膜面积的范围中,其为之前评价的 TFF2 过程的最佳范围。在病毒收获前一天在 Flexstand 上设置新的中空纤维。用 DI 水将所述中空纤维漂洗 90 分钟以去除甘油防腐剂,用 0.5N NaOH 消毒 1 小时并用 SP 100 缓冲液平衡直至 pH 达到 7.2。

[0481] 通过 Flexstand 系统处理全部体积的 CS 洗出液。最初封闭渗透物管线以允许 CS 洗出液以 0.5L/ 分钟的流速再循环,从而产生 16,000 秒⁻¹的剪切速率。再循环 5 分钟后,开放渗透物管线开始渗滤。同时抽吸 SP100 缓冲液通过渗滤管线,渗余物控制阀逐渐获得 20-21psi 的跨膜压力(TMP)。通过控制 SP100 渗滤管线的泵流速使整个过程中渗余物储存库的体积保持恒定,与 CS 洗脱体积相等(在 0.4-0.8L 的范围内)。在轮次 8 之前,用 5X 体积倍数的 SP100 缓冲液对 CS 洗出液进行渗滤。纯化轮次 8-9 的 CS 洗出液与 8X 体积倍数的 SP100 缓冲液进行缓冲液交换。在渗滤结束时,渗余物阀完全开放并再次关闭渗透物管线,以在产品回收前使系统再循环 5 分钟。将渗滤产物排出到 10L 产物包中。对所述渗滤产物取样以通过 FFA 测试感染性、Benzonase、HCD 和 HCP。用 0.5N NaOH 以 0.5L/ 分钟的再循环流速将中空纤维筒和系统清洁 1 小时。

[0482] 直流过滤 2(DFF2):准备过滤器器材,在病毒收获前一天进行高压灭菌。过滤器器材图见图 9B 下图详示。轮次 1-5 所用 0.22 μm 聚醚砜膜囊的总表面积为 150cm²,轮次 6-9 所用的为 300cm²。最终无菌过滤 DFF2 步骤在生物安全柜中进行。

[0483] 向 8XDF 产物加入 1 : 9(v/v) 稀释的浓缩的谷氨酸精氨酸明胶(cGAG),以形成纯

化病毒的最终制剂。300cm² 囊通过封闭器材组合件以约 0.38LPM 抽吸配制的病毒,采用最终产物灌注过滤器。将滤液收集在无菌的 2L 瓶中作为最终批量产物。在 0.38LPM 的过滤流速下,300cm² 过滤器流量为 760LMH。对膜面积的配制批量加载量在 20–150L/m² 的范围内。对 0.22 μm 过滤最终批量产物取样以通过 FFA 测试感染性、Benzonase、HCD 和 HCP 水平。将最终批量产物等分为若干 1、10 和 100mL 等份,快速冷冻并储存于 -80℃。

[0484] 样品分析和计算:将所有用于分析的样品快速冷冻并储存在 -80℃。基本如下所述进行 HCP 试验。基本如上所述采用 PicoGreen 和 PCR 方法进行 HCD 试验。通过补骨脂内酯-生物素(印迹)直接标记方法和在琼脂糖凝胶中直接染色进行 HCD 筛份分析。基本如下所述进行 Benzonase 定量分析试验。以 ng 或 μg/剂量计算的所有数值基于 7log₁₀FFU/剂量(一个剂量也常称为 10⁷FFU)的效价。

[0485] 残余宿主 NDA 测定:采用微孔形式的实时 PCR 方法定量分析残余的 MDCK 宿主细胞 DNA。该试验的靶是狗细胞色素氧化酶亚基 I(Cox I)基因内的独特序列。采用一组优化的寡核苷酸引物,从模板产生 MDCK Cox I 特异性 PCR 产物,通过 SYBR®绿色染料检测。微孔形式能容纳很宽动态范围(1000 到 0.1ng/ml)的 DNA 校准器。各试验包括合适的阳性和阴性对照。采用 DNA 提取试剂盒获得测试样品 DNA。从标准曲线计算 0.1ng/ml 量化下限以上的样品 DNA 量。根据掺加物的对照回收率,准确率在 75–125%以内。报道的结果是产生 50–150%掺加物回收率值的样品提取重复实验的平均 DNA 量。

[0486] 残余宿主细胞蛋白质测定:通过酶联免疫吸附测定(ELISA)采用针对 HCP(来自未感染 MDCK 培养物)产生的生物素化兔一抗和链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(HRP0)偶联物测定残余的宿主细胞(MDCK)蛋白质(HCP)。将针对 MDCK 细胞裂解物的抗体吸附到聚苯乙烯微板上。加入含牛血清白蛋白的封闭溶液以使过量的结合位点饱和。在向包被板加入测试物样品的稀释物时,如果 MDCK HCP 存在,就会与包被抗体结合。向板中加入在兔中针对 MDCK 裂解物产生的生物素标记一抗,之后加入辣根过氧化物酶(HRP0)标记的链霉抗生物素偶联物。最终加入 HRP0 底物,用 ELISA 板读数仪测定形成的有色末端产物的强度。形成的颜色强度与测试物中存在的 MDCK HCP 的量成比例。从已知蛋白质浓度的 MDCK 细胞裂解物校准器产生标准曲线。从标准曲线确定 MDCK 细胞裂解物的蛋白质浓度。

[0487] 残余 Benzonase 测定:通过 Benzonase 切割鲐精 DNA 的能力确定其活性。将一式两份的测试物与 Benzonase 标准曲线比较,其中用分光光度计在 260nm 测定读数。计算百分比掺加物回收率(Benzonase 活性)以确定净 Benzonase U/ml。就可定量的活性而言,掺加物参照标准的净 Benzonase 活性应在 1.1–1.9U/ml 之间,相关系数应≥0.995,未掺加样品稀释物中的活性应≥0.7U/ml,百分比掺加物回收率应在 80–120%之间。

[0488] 8.3.2 结果和讨论

[0489] 所有 SUB 轮次均显示在 8.0–8.6log₁₀FFU/mL 范围内的收获物效价。用来评价各纯化轮次效果的回收率、HCD 和 HCP 结果总结于表 20、表 21 和表 22 中。以下部分将总结和讨论为改善过程效率和最终产物质量进行的变动。初始和最终纯化方案的过程发展总结于图 10 中,其显示从早期纯化轮次到最后纯化轮次的主要变动。

[0490]

表 20 纯化轮次 1-9 回收率小结

纯化轮次	1	2	3	4	5	6	7	8	9
毒株	A/NC	A/Wis	A/Wis	A/NC	B/Mal	B/Mal	A/NC	A/Wis	B/Mal
收获 (小时)	60-65	60 – 65	60 – 65	60 – 65	60 – 65	60 – 65	60 – 65	48	48
CS 柱	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100
CS 加载量 (log ₁₀ /mL 凝胶)	N/A	8.3	8.7	8.7	8.4	9.2	9.1	9.3	9.0
过程*	1a	1a	1a	1a	1b	1b	1b	1b	1b
效价 (VH-CC)	8.3	8.4	8.4	8.4	8.3	8.6	8.4	8.6	8.0
效价 (VH-P)	7.9 [^]	7.7 [^]	8.4	8.6	8.1	8.3	8.3	8.4	7.9
DFF1	99.1%	154.6%	79.4%	52.7%	124.1%	124.3%	124.2%	78.3%	123.1%
TFF1	107.2%	73.8%	50.9%	53.4%	30.3%	42.2%	74.5%	80.0%	76.1%
CS 洗出液	N/A	54.9%	81.4%	19.0%	60.8%	40.0%	37.0%	96.8%	60.5%
TFF2	N/A	110.1%	73.9%	106.9%§	125.9%§	150.8%	94.0%	64.0%†	92.0%†
DFF2	N/A	88.3%#	111.1%#	110.8%#	88.3%#	69.8%	65.8%	78.4%	108.0%
最终效价	N/A	8.3	8.5	8.5	8.5	8.9	8.6	9.2	9.0
总产率	N/A	60.9%	27.0%	6.3%	25.4%	22.0%	21.2%	30.4%	56.3%

VH-CCD: 病毒收获细胞培养, VH-PD: 病毒收获纯化

* 1a: SVH 包中的 Benzonase 处理; 1b: 柱上的 Benzonase 处理

[^] 基于抗 NA 而非抗 HA 的 FFA 试验

§ 1400 cm² 中空纤维 (其余为 290 cm² 中空纤维)

150 cm² 过滤器 (轮次 6-9 为 300 cm² 过滤器)

† 8X DF (其余为 5X DF)

若干过程变动以**黑体**显示

[0491]

表 21 纯化轮次 HCD 小结

轮次	2		3		4		5		6		7		8		9	
菌株	A/Wis		A/Wis		A/NC		B/Mal		B/Mal		A/NC		A/Wis		B/Mal	
收获 (小时)	60-65		60-65		60-65		60-65		60-65		60-65		48		48	
柱	BPG200		BPG200		BPG200		BPG200		BPG100		BPG100		BPG100		BPG100	
过程*	1a		1a		1a		1b		1b		1b		1b		1b	
DNA 水平	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量
SVH	3228.8	644.2	7200	286.6	5480	137.7	3821	303.5	5720	286.7	10800	541.3	3440	136.9	2070	260.6
DFF1	2910	366.3	3920	196.5	1720	86.2	5328	336.2	4120	164	4490	178.8	1440	72.17	1060	106
TFF1	2520	126.3	1940	38.7	1610	32.1	14000	557.4	28200	562.7	17100	171	3690	73.63	1690	67.28
CS 洗出液	1204.9	47.97	537.4		146.1		37.8	1.2	135 [^]	1.7 [^]	123 [^]	1.55 [^]	91.2	0.29	150.5	1.51
TFF2 (5X)	928.3	36.96	385.9	12.2	144	4.56	57.1	1.43	159.9	1.27	72.1	1.14	135	0.54	190	1.9
TFF2 (8X)													16.8 [^]	0.067 [^]	34.8 [^]	0.35 [^]
													128.8	0.65	161.4	1.6
DFF2	807.8	40.49	365.6	11.56	29 [^]	0.92 [^]	38.1	1.21	18.6 [^]	0.23 [^]	7.2 [^]	0.18 [^]	5 [^]	0.032 [^]	16.4 [^]	0.164 [^]
					102.9	3.25			69.9	0.88	56.6	1.42	93.8	0.59	83.7	0.84

* 1a: 包中的 Benzonase 处理; 1b: 柱上的 Benzonase 处理

[^] 基于实时 PCR 和 Picogreen 试验的 HCD 试验也在轮次 2-9 进行

若干过程变动以**黑体**显示

表 22 纯化轮次 2-9 的 HCP 小结

轮次	2		3		4		5		6		7		8		9	
毒株	A/Wis		A/Wis		A/NC		B/Mal		B/Mal		A/NC		A/Wis		B/Mal	
收获 (小时)	60-65		60-65		60-65		60-65		60-65		60-65		48		48	
柱	BPG200		BPG200		BPG200		BPG200		BPG100		BPG100		BPG100		BPG100	
过程*	1a		1a		1a		1b		1b		1b		1b		1b	
HCP 水平	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量	ig/mL	ig/剂量
SVH	278	55.5	392	15.6	269	6.76	231	18.35	250	12.53	233	11.68	135	5.37	174	21.9
DFE1			369	18.5			329	20.76					83.7	4.19	140	14
TFF1	82.3	4.12	382	7.62	68.2	1.36	345	13.73	108.7	2.17	86.8	0.87	24.3	0.48	27	1.07
CS 洗出液	15.7	0.63	258	5.15	46.6	4.66	209	6.61	157	1.98	188	2.37	67.2	0.21	98.1	0.98
TFF2 (5X)	51	2.56	142	4.49	69.1	2.19	149	3.74	60.3	0.48	42.1	0.67	46.3	0.18	81.9	0.82
TFF2 (8X)													42.1	0.21	79	0.79
DFE2	22	1.1	17.6	0.56	32.7	1.03	27.3	0.86	49.8	0.63	23.8	0.6	20.9	0.13	29.3	0.29

* 1a: 包中的 Benzonase 处理; 1b: 柱上的 Benzonase 处理

表 23 纯化轮次 2-9 的总 DNA 清除

混合 SVH 批次					柱上 CS				
轮次 #	所用柱	剩余DNA %	最终批量 DNA 水平 (ng/剂量)	50 U/mL Benzonase 体积	轮次 #	所用柱	剩余 DNA %	最终批量 DNA 水平 (ng/剂量)	50 U/mL Benzonase 体 积
2	BPG 200	3.36%	40.49	20 L	5	BPG 200	0.10%	1.21	13 L
3	BPG 200	1.09%	11.56	20 L	6	BPG 100	0.07%	0.88	3.5 L
4	BPG 200	0.15%	3.25	20 L	7	BPG 100	0.02%	1.42	3.5 L
					8	BPG 100	0.11%	0.59	3.5 L
					9	BPG 100	0.15%	0.84	3.5 L

[0494]

表 24 纯化轮次 2-9 残余 Benzonase 小结

轮次	2		3		4		5		6		7		8		9	
	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量	ng/mL	ng/剂量
菌株	A/Wis		A/Wis		A/NC		B/Mal		B/Mal		A/NC		A/Wis		B/Mal	
收获 (小时)	60-65		60-65		60-65		60-65		60-65		60-65		48		48	
柱	BPG200		BPG200		BPG200		BPG200		BPG100		BPG100		BPG100		BPG100	
过程*	1a		1a		1a		1b		1b		1b		1b		1b	
Benzonase 水平																
SVH			0.35	0.014	0.06	0.002			0.18	0.009	检测不到		0.12	0.005	0.14	0.0176
DFF1	70.9	8.926	50	2.506	46	2.306			检测不到		检测不到		0.09	0.005	0.066	0.007
TFF1			2	0.04	9	0.18	0.07	0.003	检测不到		检测不到		0.12	0.002	0.11	0.004
SPB 洗涤后 1CV							0.078						0.15		0.28	
SPB 洗涤后 2CV							0.12						0.21		0.15	
SPB 洗涤后 3CV							0.26						0.33		0.14	
SPB 洗涤后 4CV							0.28								0.05	
CS 洗出液																
TFF2 (5X DF)			0.54	0.017	0.66	0.021	89	2.814	>75	>0.944	4.2	0.053	221.7	0.701	192	1.92
TFF2 (8X DF)							5.1	0.128	6.6	0.052	0.6	0.01	1.62	0.006	1.38	0.0138
DFF2													0.36	0.002	0.45	0.005
DFF2	0.9	0.045	0.21	0.007	0.69	0.022	2.1	0.066	6.6	0.083	3.6	0.09	0.27	0.002	0.52	0.005

* 1a: 包中的 Benzonase 处理; 1b: 柱上的 Benzonase 处理

若干过程变动以**黑体**显示

[0495]

表 25 所有纯化轮次过程特征小结

纯化轮次	2	3	4	5	6	7	8	9
毒株	A/Wis	A/Wis	A/NC	B/Mal	B/Mal	A/NC	A/Wis	B/Mal
收获(小时)	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	48	48
柱	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100
加载量 (log ₁₀ FFU/mL 凝胶)	8.3	8.7	8.7	8.4	9.2	9.1	9.3	9
过程*	1a	1a	1a	1b	1b	1b	1b	1b
VH 效价 (CCD)	8.4	8.4	8.4	8.3	8.6	8.4	8.6	8.0
VH 效价 (PD)	7.7 [^]	8.4	8.6	8.1	8.3	8.3	8.4	7.9
最终批量效价	8.3	8.5	8.5	8.5	8.9	8.6	9.2	9.0
总产率 §	60.9%	27.0%	6.3%	25.4%	22.0%	21.2%	30.4%	56.3%
VH HCD (ng/mL)	3229	7200	5480	3821	5720	10800	3440	2070
批量 HCD (ng/剂 量) PicoGreen	40.49	11.56	3.25	1.21	0.88	1.42	0.59	0.84
批量 HCD (ng/剂 量) rPCR	未检测	未检测	0.92	未检测	0.23	0.18	0.032	0.164
VH HCP (g/mL)	278	392	269	231	250	233	135	174
Bulk HCP (g/剂 量)	1.1	0.56	1.03	0.86	0.63	0.6	0.13	0.29
Benzonase (ng/剂 量)	0.045	0.007	0.022	0.066	0.083	0.09	0.002	0.005

* 1a: 包中的 Benzonase 处理; 1b: 柱上的 Benzonase 处理

[^] 基于抗 NA 而非抗 HA 的 FFA 试验

§ 基于 VH-PD 效价

若干过程变动以**黑体**显示

[0496] SVH- 从 SVH Benzonase 处理到柱上 Benzonase 处理的变化: 在初始过程中, 在 SVH 步骤进行 Benzonase 处理以去除宿主细胞 DNA。该过程步骤包括在进行 DFF1 步骤前

在 32℃ 将 20L SVH 与 50U/mL Benzonase 混合 3 小时。在纯化轮次 1-4 中, 向 SVH 步骤加入 Benzonase, 而在纯化轮次 5-9 中, 从 SVH 步骤去除 Benzonase 处理, 采用含 50U/mL Benzonase 的色谱缓冲液和 50 分钟树脂接触时间在 CS 色谱步骤期间作为柱上 Benzonase 处理过程进行。如表 21 所示, 在纯化轮次 2-4 中, 以 ng/ 剂量表示的 HCD 水平在 SVH 和 DFF1 之间无显著降低; 然而, 在纯化轮次 5-9 中, HCD 水平在 Benzonase 柱上 CS 色谱步骤之后明显降低。发现相对于纯化轮次 1-4 (3.25-40.49ng/ 剂量), 通过 PCR 和 PicoGreen 分析的纯化轮次 5-9 的最终批量产物的 HCD 水平大大降低 (0.84-1.42ng/ 剂量)。该变化不仅通过将最终批量 HCD 降低到小于或等于 1ng/ 剂量的水平来改善最终产品的质量, 而且通过减少 Benzonase 处理时间和所需 Benzonase 总量来提高过程效率。柱上 Benzonase 处理的影响将在 CS 色谱部分进一步讨论。

[0497] DFF1: 如表 20 所述, 除轮次 4 (52.7%) 以外, DFF1 步骤显示出良好的回收率 (78.3-154.6%)。DFF1 步骤去除细胞和细胞碎片, 并通常显示效价无损失。该步骤还去除一定量的 HCD (表 21) 但不去除 HCP (表 22)。用来过滤 20L SVH 的两种过滤器 (1.2 和 0.45 μm) 的膜面积基于两种过滤器的容量, 之前由缩小 $V_{\text{max}}/P_{\text{max}}$ 研究分别采用 2.6 和 1.5 的安全因子测定。就 1.5LPM 的过滤流速而言, 1.2 μm 和 0.45 μm 过滤器的流量分别为 500LMH 和 474LMH。1.2 μm 和 0.45 μm 过滤器的实际 SVH 加载量分别为 111 和 105L/ m^2 。

[0498] TFF1- 为改善 TFF1 步骤回收率的设置和回收方法的变化: 第一批 6 个纯化轮次显示出各轮次在 TFF1 步骤的效力回收率从 107.2% 到 30.3% 逐渐损失 (表 20)。就纯化轮次 1-6 而言, 用 0.5N NaOH 清洁 TFF1 中空纤维筒, 并在过程后重复使用。尚未了解中空纤维筒的清洁效率是否足够在各轮次后完全去除凝胶层, 这可导致病毒回收率在该过程步骤后降低。为产生更为一致的步骤回收率, 对以纯化轮次 7 开始的现有方案实施三种主要变动。第一, 各轮次采用新的中空纤维以消除中空纤维未充分清洁的可能性。第二, 在收集 TFF1 产物之前, 使浓缩的渗余物在渗余物阀开放和渗透物阀关闭的情况下在中空纤维筒中再循环 5 分钟。这可去除在浓缩和渗滤过程中膜表面可能形成的任何潜在凝胶层, 能够实现回收。第三, 以相同的再循环流速和时间 (5 分钟) 进行额外的缓冲液漂洗步骤以回收中空纤维筒中的残余病毒, 连同产物一起回收缓冲液漂洗物。实施这些变动之后, 纯化轮次 7-9 中 TFF1 的步骤回收率保持一致的高水平, 约为 75-80% (表 20)。图 11 显示在 16000 s^{-1} 的剪切速率和 20psi 的恒定 TMP 下 (纯化轮次 8) 进行的 TFF1 过程的典型流量曲线。流量随病毒溶液浓缩度增大 (5XUF) 而减小, 其在渗滤步骤开始时继续减小但在膜渗滤步骤接近结束时 (5XDF) 略微增大。流量在所有纯化轮次中处于 70-100LMH 的范围内, 显示与病毒效价和 DFF1 滤液的混浊度相关。流量在渗滤步骤结束时的略微增大可能由 5XDF 结束时额外去除 HCP 和 HCD 杂质造成。如表 22 所示, 大部分 (80-90%) HCP 杂质在第一 TFF (TFF1) 步骤去除, 因为小于 500kDa 的任何 HCP 均应在渗透物中去除。病毒收获物缓冲液交换为 1X SP 的完成见于 5XDF 过程结束时的传导率曲线从 12.5mS/cm 降低到 1mS/cm (图 11)。

[0499] CS 柱上 Benzonase 处理以提高 HCD 的去除: 采用床层高度为 10cm、病毒加载浓度为约 9.01log₁₀FFU/mL 树脂的小规模 CS 柱设计初始实验。由于过程得到了改进, 每毫升树脂的病毒加载浓度、线性流速和柱床层高度均得到线性放大。在 9.01log₁₀FFU/mL 树脂的加载效价下, 需要 4L 床层体积的 CS 以处理收获 20L 收获效价为 8.31log₁₀FFU/mL 的稳定病毒收获物。在轮次 1-5 的进展中, 将 4L CS 树脂填充到 BPG 200 柱 (20cm 内径 (i. d.)) 达到

12.5cm 的床层高度。在以 200cm/ 小时填充 BPG 200 柱时,背压超过了 2.5 巴压力的推荐填充压力。(图 12)。进行的动态结合能力研究显示,CS 树脂在上述填充条件下实际上可结合最多为约 $9.7 \log_{10}$ FFU/mL 树脂。同样地,在 $9.5 \log_{10}$ FFU/mL 树脂的病毒加载量下,仅需要 1.3L CS 树脂以处理 20L 收获效价为 $8.3 \log_{10}$ FFU/mL 的稳定病毒收获物。

[0500] 用 1.3L CS 树脂填充的 BPG 200 柱形成 4.5cm 的最终柱床层高度。与床层高度为 15-20cm(用于大规模过程的典型高度)的填充柱相比,柱床层高度的显著降低造成分辨率较低。从纯化轮次 6 开始,将 BPG 100 柱填充到 $17.5\text{cm} \pm 2.5\text{cm}$ 的目标床层高度以形成 1.4L 的 CS 柱体积。就 BPG100 柱而言,采用 500cm/ 小时的填充流速,所得填充压力不超过树脂的推荐填充压力极限,其不同于 BPG 200 柱的填充压力(图 12)。

[0501] 比较纯化轮次 6-9(BPG 100)与纯化轮次 2-5(BPG 200),在实际加载量从 $8.4-8.9 \log_{10}$ FFU/mL 树脂(BPG 200 柱)增大到 $9-9.3 \log_{10}$ FFU/mL 树脂(BPG 100 柱)时,CS 洗出液步骤回收率类似,平均值分别为 54%和 59%(表 20)。就采用柱上 Benzonase 处理进行的 HCD 去除的柱性能而言,纯化轮次 6-9(BPG 100)显示与纯化轮次 5(BPG 200)中 CS 洗出液 HCD 水平($1.2\text{ng}/\text{剂量}$)相当的 CS 洗出液 HCD 水平($0.3-1.5\text{ng}/\text{剂量}$)(表 21)。尽管柱性能类似,但通过减小 CS 洗出液和缓冲液制备物体积来减小柱大小改善过程效率在用于大规模制备时是非常重要的。图 13 显示从 CS BPG 100 柱(轮次 9)洗脱的单个病毒峰的典型色谱。

[0502] 如表 23 所示,柱上 Benzonase 处理(轮次 5-9)的总 HCD 清除效果好于分批模式 Benzonase 处理(轮次 2-4)。Benzonase 处理病毒纯化后的剩余 HCD 百分比处于 0.15-3.4%的范围(轮次 2-4),而柱上 Benzonase 处理病毒纯化后的剩余 HCD 百分比处于 0.02-0.15%的范围(轮次 5-9)。CS 步骤的柱上 Benzonase 处理显示的总 HCD 去除率高于 SVH 步骤的分批模式 Benzonase 处理,由此产生最终批量的较低 DNA 水平。

[0503] 采用柱上 Benzonase 处理相比分批模式 Benzonase 处理具有若干优点。首先,通过将两个过程步骤结合为一个步骤并用 CS 柱上步骤的 1 小时 Benzonase 处理代替 SVH 步骤的 3 小时 Benzonase 处理可提高过程效率。第二,可减少纯化过程所需的 Benzonase 总量。分批模式 Benzonase 处理需要 100 万单位的 Benzonase 用于 20L 病毒收获物,而柱上 Benzonase 处理仅需要 20 万单位的 Benzonase。因此,柱上 Benzonase 处理将 Benzonase 总量减少了 5 倍。

[0504] TFF2- 大 TFF2 渗滤体积以提高 Benzonase 清除:如表 20 所示,所有 9 个纯化轮次的 TFF2 步骤回收率均一致达到 64%以上($64-150.8\%$)。在轮次 3 中,CS 洗脱体积是 3.2L。采用 290cm^2 中空纤维,加载到中空纤维膜上的 CS 洗出液增加到 $110\text{L}/\text{m}^2$,总过程时间为 6 小时。在接下来的两个连续轮次中采用 1400cm^2 中空纤维膜,以避免过程时间长并将加载浓度保持在小规模研究建立的约 $20-50\text{L}/\text{m}^2$ 。然而,从轮次 6 开始,柱大小从 4L 变为 1.4L,洗脱体积也减小到不超过 0.9L。该洗出液体积的降低与柱大小成正比。在轮次 6-9 中,采用 290cm^2 中空纤维筒将 CS 洗出液加载浓度保持在 $20-50\text{L}/\text{m}^2$ 。图 14 显示在 16000秒^{-1} 剪切速率和 21psi 恒定 TMP 下进行的纯化轮次 8 的 TFF2 过程的典型流量痕迹曲线。TFF2 流量在整个渗滤过程中具有适度的稳定性,表明所述操作条件未造成任何积垢。所有纯化轮次的物流均处于 80-110LMH 的范围。

[0505] TFF2 缓冲液交换体积也从 5 体积倍数增大到 8 体积倍数以增强 Benzonase 清

除。如表 24 所示,在所述过程变为柱上 Benzonase 处理步骤(轮次 5)时,CS 洗出液的 Benzonase 水平 $> 75\text{ng/mL}$,表明 Benzonase 与 CS 柱结合并与病毒产物共洗脱。还通过在 1X SPB 后评价 1CV 到 4CV 的流通样品证实 Benzonase 与 CS 柱的结合。流通样品显示具有低 Benzonase 水平(表 24)。因此,纯化轮次 8 和 9 的 TFF2 缓冲液交换体积从 5 体积倍数增大到 8 体积倍数,以提高 Benzonase 清除达到检测极限(LOD)以下的水平。因此,通过将渗滤从 5XDF 增加到 8XDF 使 Benzonase 水平再降低 4-5 倍。该变化使最终批量中的 Benzonase 水平降低到 LOD 以下,达到小于 0.1ng/剂量 (表 24)。

[0506] DF2- 增大最终批量最终无菌过滤的过滤器大小:如表 20 所示,采用 150cm^2 和 300cm^2 $0.22\mu\text{m}$ 最终过滤器的平均步骤回收率分别为 88.3-111.1%和 65.8-108%。选择 300cm^2 过滤器作为最终过滤器大小以避免在 CTM 实施轮次的最终无菌过滤过程中出现任何加料流堵塞。用于过滤 0.6-1L 最终批量的膜面积基于之前建立的 $20\text{-}150\text{L/m}^2$ 范围加载量的小规模研究。 300cm^2 过滤器的过滤流速为 0.38LPM ,所述过滤器的流量为 760LMH 。所述过滤器的实际加载量为 $20\text{-}33\text{L/m}^2$,处于小规模研究确定的范围内。

[0507] 上游(SUB)过程收获时间从 3dpi 变为 2dpi:从纯化轮次 8 开始,病毒收获时间从 3dpi(60-65 小时收获)变为 2dpi(48 小时收获)。在采用 $0.001\text{-}0.003\text{FFU/细胞}$ 的病毒输入量时,在 48 小时 dpi 观察到峰病毒效价。如纯化轮次 8 和 9 的 SVH 步骤所示,收获时间的变动引起起始 HCD 和 HCP 水平降低(表 21 和表 22)。该变动还引起最终批量产物中 HCD 和 HCP 杂质水平变低(表 21 和表 22),因此改善了最终产物的质量。

[0508] 实施的纯化过程产生良好的病毒回收率和纯度:完整的实施过程见纯化轮次 8 和 9 所示。这两个轮次的平均总效价回收率为 43.4%,平均 HCD 杂质水平为 0.72ng/剂量 (通过 PicoGreen 测定)和 0.1ng/剂量 (通过 PCR 测定),HCP 杂质水平为 $0.21\mu\text{g/剂量}$,Benzonase 杂质水平为 0.0035ng/剂量 ,这些数值均处于纯化批量规格以下。

[0509] 总体而言,对初始纯化过程进行若干变动以改善过程效率和最终产物质量,包括:1) 将病毒收获从 3dpi 变为 2dpi,以在 SVH 中形成较低 HCD 和 HCP 杂质水平,2) 将 HCD 处理步骤从 SVH 的分批模式 Benzonase 处理变为 CS 柱上 Benzonase 处理,以改善总 HCD 降解和去除,3) 将 CS 树脂的目标加载浓度从 $9.0\log_{10}\text{FFA/mL}$ 增加到 $9.5\log_{10}\text{FFA/mL}$,其使柱大小从 4L 减小到 1.4L,4) 将 TFF2 的最终制剂缓冲液交换体积从 5 体积倍数增大到 8 体积倍数,以改善 Benzonase 去除,和 5) 将最终无菌过滤加载量减少一半达到 25L/m^2 的平均值以避免在 CTM 轮次的最终过滤过程中出现任何堵塞。

[0510] 最终纯化过程见图 10 所示,所有纯化轮次的数据总结于表 25。基于改进纯化过程的平均总病毒回收率为 43.4%,Benzonase 的平均杂质水平为 0.0035ng/剂量 ,HCD 为 0.72ng/剂量 (PicoGreen)和 0.1ng/剂量 (PCR),HCP 为 $0.19\mu\text{g/剂量}$ 。这些杂质水平处于规格以下。通过 DNA 大小分析采用直接标记方法(补骨脂内酯-生物素)印迹和直接染色方法(琼脂糖凝胶)分析纯化轮次 6-9 的最终批量。这些分析中的主要信号显示 DNA 大小分布 $\leq 500\text{bp}$ (未显示数据)。

[0511] 8.4 实施例 4 细胞培养物产生的流感病毒的改良纯化过程

[0512] 可对第 8.3 节所述的可靠大规模纯化过程进行的其它改动列于图 10b 并详述于下。具体而言,可结合收获、澄清和 TFF1 步骤以避免对收获罐的需求、降低操作数量和改进总处理时间。就较平稳的结合操作而言,可将 TFF1 操作从恒定 TMP 变为恒定流量。或者或

此外,采用较低 TMP(低于 20psi,例如处于约 10psi(12000 秒⁻¹) 到约 14.5psi(16000 秒⁻¹) 之间)。可向 TFF2 步骤加入 2X UF 步骤以减小批量体积。任选在 TFF1 中采用 10XUF 以可能使所有随后纯化步骤的加载量加倍。

[0513] 表 26 总结了若干纯化轮次的参数变化、回收率和 HCD。这些轮次基本如上所述采用产生于无培养基交换的 MediV SFM 110 的病毒(参见第 8.1 节提供的实施例)。除以下说明以外,基本如 1b 过程(参见第 8.3 节提供的实施例)所述进行所有纯化轮次。通过结合收获、DFP 和 TFF1 步骤进行轮次 #25、#27 和 #30。就这些轮次而言,在恒定流量(50LMH, 剪切速率为 12000 秒⁻¹) 下运行 TFF1。不结合收获、DFP 和 TFF1 步骤进行轮次 #24、#26 和 #31。就这些轮次而言,在较低 TMP(10psi, 剪切速率为 16,000 秒⁻¹) 下运行 TFF1。对 CS 步骤分割条件病毒载荷,在 2mM MgCl₂ 或 10mM MgCl₂ 下处理。DNA 分析显示增大 MgCl₂ 浓度不会降低 DNA 大小(未显示数据)。然而,在一种情况中,产率降低(参见表 26)。

[0514] 表 27 总结了采用培养基交换在 MediV SFM 105 中产生的病毒的若干纯化轮次的参数变化、回收率和 HCD。这些轮次采用基本如国际专利申请公开 W0 08/105931(特别参见实施例 12) 所述产生的病毒。除以下说明以外,基本如 1b 过程(参见第 8.3 节提供的实施例) 所述进行所有纯化轮次。通过结合收获、DFP 和 TFF1 步骤进行轮次 #40、#41 和 #42。就这些轮次而言,在恒定流量(35LMH, 剪切速率为 12,000 秒⁻¹) 或恒定 TMP(10psi, 剪切速率为 12,000 秒⁻¹) 下运行 TFF1。以小规模进行恒定流量的轮次,并仅处理至 CS 步骤。不结合收获、DFP 和 TFF1 步骤进行轮次 #43。

[0515] 这些研究一起表明,来自 MediV SFM 110(无 MX) 和 MediV SFM 105(含 MX) 过程的材料显示类似的流量/TMP 特征。采用较低剪切(12,000 秒⁻¹)、较低 TMP(10psi) 和较低流量(35LMH) 确实会产生较长步骤 TFF 过程时间,但在实施收获、DFP 和 TFF 步骤的结合时,总过程时间可变短。可看到这些纯化轮次的最终 HCD 浓度在 0.01-0.6ng/ 剂量之间,与上述 1b 过程获得的浓度相当。总产率通常在 30% 以上。

[0516] 表 26 无 MX 其它参数变化的 HCD 和产率小结

[0517]

轮次编号	#24	#25	#26	#27	#30	#31
毒株	B/Flo	B/Flo	A/SD	A/SD	A/Uru	A/Uru
SVH 体积 (L)	14.5	10	12.5	15	11	14.5
TFF 结合	无	有	无	有	有	无
TFF 模式	TMP	流量	TMP	流量	流量	TMP
TFF1 参数	16k s-1, 10 psi	12k s-1, 50 LMH	16k s-1, 10 psi	16k s-1, 50 LMH	12k s-1, 50 LMH	16k s-1, 10 psi
效价 (SVH) (log ₁₀ FFU/mL)	8.5	8.5	8.9	8.9	8.8	9.1
DNA (SVH) (ng/mL)	277	2048	1672	2667	3649	1266
最终批量 DNA (ng/剂 量)	0.23	0.39	0.07	0.09	0.59	0.05
最终批量 DNA (ng/剂 量) (10 mM MgCl ₂)	0.18	0.31	0.07	0.07	0.57	0.04
PB 效价 (2 mM MgCl ₂)	10	10	10	9.9	9.9	10.8
PB 效价 (10 mM MgCl ₂)	10.1	10	9.9	10	9.8	10.6
总产率 (%) (2 mM MgCl ₂)	43	36	13	23	42	69
总产率 (%) (10 mM MgCl ₂)	46	40	8	21	15	59

[0518] 表 27 含 MX 其它参数变化的 HCD 和产率小结

[0519]

轮次编号	#40**		#41		#42		#43
毒株	A/UR		A/SD		A/UR		A/UR
收获 (dpi)	3		3		3		3
ATF/DFF 结合	有		有		有		无
恒定流量/TMP	TMP	流量*	TMP	流量*	TMP	流量*	TMP
TFF1 参数	12k s-1, 10 psi	12k s-1, 35 LMH	12k s-1, 10 psi	12k s-1, 35 LMH	12k s-1, 10 psi	12k s-1, 35 LMH	12k s-1, 10 psi
CS 加载量 (log ₁₀ FFU/ mL)	9.51	9.03	9.88	9.82	9.41	9.23	9.18
收获效价	8.7	8.7	8.8	8.8	8.4	8.4	8.2

[0520]

(log ₁₀ FFU/ mL)							
收获 DNA (ng/mL)	395	395	1105	1105	2923	2923	2362
最终批量 DNA (ng/剂 量)	0.2	0.41*	0.12	0.21*	0.2	0.77*	0.4
最终批量效价 (log ₁₀ FFU/ mL)	9.7	9.0*	10*	10.0	9.7*	9.4*	9.5
总产率	17%	22%*	26%	45%*	32%	43%*	40%

[0521] * 以小规模进行恒定流量轮次, 并仅处理至 CS 柱步骤

[0522] ** #40 由于在周五收获而在 TFF1 后保持度过周末

[0523] 8.5 实施例 5: RSV 生产的下游制备方法

[0524] 用于基于细胞的 RSV 疫苗的可靠和可升级制备方法的开发需要筛选和优化不同的过程参数。早期的下游方法开发在 10L 规模下进行, 制备方法升级到了 30L。病毒收获物 (VH) 在生物反应器中产生, 并在感染后 7 天 (dpi) 收获。将 VH 泵入 HyQtainer 容器, 采用 $3\mu\text{m}$ 直流过滤澄清。初始过滤去除细胞碎片、微载体、40-70% 的宿主细胞 DNA 和 VH 中存在的其它颗粒。在该步骤之后用 10U/mL 的非特异性内切核酸酶 Benzonase 对病毒收获物中其余宿主细胞 DNA 进行酶消化。用 5mM EDTA 终止反应。在 Benzonase 处理之后, 通过 $0.65\mu\text{m}$ 过滤澄清 VH, 并用稳定缓冲液 (稳定缓冲液的组成参见材料节) 进行 1/6 (v/v) 稀释来稳定。稳定 VH 可在室温 ($21\pm 2^\circ\text{C}$) 储存 12-16 小时。在第二天采用通道长度为 60cm、内纤维直径为 1mm 的 500kDa 中空纤维筒对稳定 VH 材料进行切向流过滤 (TFF)。TFF 步骤浓缩所述稳定 VH 并去除外源内切核酸酶和污染物如宿主细胞 DNA 和宿主细胞蛋白质。TFF 步骤还用来将浓缩的 VH 交换为所选制剂缓冲液。TFF 步骤包括 5 倍浓缩稳定 VH 和与 SPP2 缓冲液 (缓冲液组成参见材料节) 进行 7 倍缓冲液交换。在用 SPP2 缓冲液进行 7X 渗滤之后, 用 SPP3 缓冲液 (缓冲液组成参见材料节) 进行 4X 渗滤。随后采用末端 Sartorius Sartoclean 乙酸钠纤维素 3/0.8 μm 过滤器澄清渗余物。3 个 10L 和 2 个 30L 生物反应器轮次的纯化过程的效价回收率和纯化 RSV 药物物质的效价和杂质特征在以下以实施例方式进行描述。

[0525] 8.5.1 材料和方法

[0526] 材料, 试剂和设备: 可很容易地替换性能类似的其它材料、设备和试剂。

[0527] 1) 10X SPG; 2180mM 蔗糖, 1100mM 磷酸钾和 540mM 谷氨酸钠, pH 7.3 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录 #SH3A2025.01)

[0528] 2) SPP1; 1498mM 蔗糖, 200mM 磷酸二氢钾, 500mM 磷酸氢二钾, 1050mM KCl, pH 7.2 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录 #SH3A2559.01)

[0529] 3) SPP2; 730mM 蔗糖, 28.5mM 磷酸二氢钾, 71.2mM 磷酸氢二钾, 150mM KCl, pH 7.2 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录 #SH3A2560.03)

[0530] 4) SPP3; 292mM 蔗糖, 7.7mM 磷酸二氢钾, 12.3mM 磷酸氢二钾, 100mM KCl, pH 7.0 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录 #SH3A2561.03)

[0531] 5) 注射用水 (WFI), 10L/包 (犹他州洛根的海克隆公司, 目录 #SH30221.24)

[0532] 6) 适于通常实验室应用的水 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #BDH1168-4LP)

[0533] 7) Benzonase 内切核酸酶, 纯化级 I (新泽西州吉布斯镇的 EMD 化学品公司 (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ), 目录 #1.01697.00021, 批次 #K38894897)

[0534] 8) 1M 氯化镁 (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录 #M-1028)

[0535] 9) 0.5M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 二钠盐溶液 (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录 #E-7889)

[0536] 10) 10N 氢氧化钠 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #VW3247-7)

[0537] 11) 0.5N 氢氧化钠 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #VW3221-4)

- [0538] 12) 8N 氢氧化钾 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #200056-170)
- [0539] 13) 无水乙醇 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #BJAH090-4)
- [0540] 14) 蔗糖 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #EM 1.07653.9028)
- [0541] 15) 磷酸二氢钾 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #JT3248-7)
- [0542] 16) 磷酸氢二钾 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #JT3250-7)
- [0543] 17) 氯化钾 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #EM-PX1405-5)
- [0544] 18) Sartopure PP2, 3 μ m, 200cm² 过滤器 (纽约州艾哲伍德的萨托瑞斯公司 (Sartorius, Edgewood, NY), 目录 #5595302P9-00-A)
- [0545] 19) Sartopure PP2, 0.65 μ m, 1000cm² 过滤器 (纽约州艾哲伍德的萨托瑞斯公司, 目录 #5595305P8-00-A)
- [0546] 20) Sartopure PP2, 0.65 μ m, 500cm² 过滤器 (纽约州艾哲伍德的萨托瑞斯公司, 目录 #5595305P7-00-A)
- [0547] 21) Sartoclean CA, 3.0+0.8mm, 500cm² 过滤器 (纽约州艾哲伍德的萨托瑞斯公司, 目录 #5625304E7-00-A)
- [0548] 22) Acro50 0.2 μ m PTFE 排气式过滤器 (新罕布什尔州东山的泊尔公司 (Pall Corporation, East Hills, NH), 目录 #4251)
- [0549] 23) 500kDa 中空纤维筒 (膜面积 :850cm², 腔 ID :1mm) (新泽西州皮斯卡特维的 GE 医疗保健公司 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), 目录 #UFP-500-E-4X2MA)
- [0550] 24) 500kDa 中空纤维筒 (膜面积 :2800cm², 腔 ID :1mm) (新泽西州皮斯卡特维的 GE 医疗保健公司, 目录 #UFP-500-E-6A)
- [0551] 25) 3/8" 聚砵管线内软管倒钩 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #16001-592)
- [0552] 26) 3/8" 聚砵硅氧烷密封 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #16001-600)
- [0553] 27) Masterflex 铂处理硅氧烷管 L/S 36 号 (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司, 目录 #EW-96410-36)
- [0554] 28) Masterflex 铂处理硅氧烷管 L/S 24 号 (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司, 目录 #EW-96410-24)
- [0555] 29) Masterflex 精密 PharMed 管 L/S 16 号 (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司, 目录 #06485-16)
- [0556] 30) 铂处理硅氧烷管, 1/2" ID x 3/4" OD (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司, 目录 #EW-95802-23)
- [0557] 31) 道康宁制药加强管, 1/2" ID (伊利诺斯州维农山的科尔帕尔默公司, 目录 #EW-96108-10)
- [0558] 32) Quant-iT PicoGreen 双链 DNA 试剂盒 (俄勒冈州尤金的英杰公司, 目录 #P11496)
- [0559] 33) 加考马斯 - 较佳 Bradford 鉴定试剂盒 (伊利诺斯州洛克福德的热科学公司 (Thermo Scientific, Rockford, IL), 目录 #23236)
- [0560] 34) Benzonase ELISA 试剂盒 II (新泽西州吉布斯镇的 EMD 化学品公司, 目录 #1.01681.0002)

- [0561] 35) 1M $MgCl_2$ (密苏里州圣路易斯的西格玛公司, 目录号 M1028, 批次 #085K8920)
- [0562] 36)
- [0563] 37) 96 孔微板 (纽约州纽约的格雷纳生物一公司 (Greiner Bio-one, New York, NY), 目录 #655090)
- [0564] 38) 125mL 二醇类改性聚对苯二甲酸乙二酯 (PETG) 方形培养基瓶 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #16159-130)
- [0565] 39) 1L PETG 方形培养基瓶 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #16159-136)
- [0566] 40) 2L PETG 方形培养基瓶 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #16159-138)
- [0567] 41) 10L Flexboy 组合件 (纽约州艾哲伍德的 S-S 生物系统公司 (Sartorius Stedim Biosystem, Edgewood, NY), 目录 #SH30712. 02)
- [0568] 42) 20L Flexboy 组合件 (纽约州艾哲伍德的 S-S 生物系统公司, 目录 #SH30712. 03)
- [0569] 43) 50L Flexboy 组合件 (纽约州艾哲伍德的 S-S 生物系统公司, 目录 #SH30712. 04)
- [0570] 44) 10L 聚丙烯酸坛 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #36494-090)
- [0571] 45) 20L 聚丙烯酸坛 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #36494-092)
- [0572] 46) 2mL 低温聚丙烯小瓶, 无菌 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #66008-728)
- [0573] 47) 试纸 pH 4-9 双分配器 (宾夕法尼亚州西切斯特的 VMR 公司, 目录 #60777-049)
- [0574] 设备
- [0575] 1) 泵, 520S (马萨诸塞州威明顿的 WM 公司, 目录 #050. 7131. 10A)
- [0576] 2) 泵, 620Di N/R (马萨诸塞州威明顿的 WM 公司, 目录 #060. 417N. 02A)
- [0577] 3) 泵, 720SN/RE (马萨诸塞州威明顿的 WM 公司, 目录 #070. 413N. E0A)
- [0578] 4) 含清洁装置的 12mmSta 纯 620LoadSure 元件 (马萨诸塞州威明顿的 WM 公司, 目录 #960. 0120. PFT)
- [0579] 5) 含清洁装置的 19mmSta 纯 720LoadSure 元件 (马萨诸塞州威明顿的 WM 公司, 目录 #960. 0190. PFT)
- [0580] 6) 生物安全柜, 纯化级 II (加利福尼亚州圣拉蒙的莱布康可公司 (Labconco, San Ramon, CA), 模型 #96212042726)
- [0581] 7) 波混合器 (新泽西州萨莫赛特的波生物技术公司 (Wavebiotech, LLC, Somerset, NJ), 部分 # 混合器 20/50EH)
- [0582] 8) 天平, 最大度量 :3100g (萨托瑞斯机械公司 (Sartorius Mechatronics), 目录 #BL3100)
- [0583] 9) 天平, 最大度量 :60kg (萨托瑞斯机械公司, 目录 #EB60EDE-I)
- [0584] 10) 天平, 最大度量 :150kg (萨托瑞斯机械公司, 目录 #E150EDE-I)
- [0585] 11) 含压力计的标准 FlexStand (新泽西州皮斯卡特维的 GE 医疗保健公司, 目录 #FS-01S-30)
- [0586] 12) 含压力计的低空隙容积 FlexStand (新泽西州皮斯卡特维的 GE 医疗保健公司, 目录 #FS-03LVS-30)

[0587] 13)SciPres 压力流电池(威斯康星州米德尔顿的塞洛格公司(Scilog, Middleton, WI),部分 #080-699PS-5)

[0588] 14) 分子动力学 SpectraMax GEMINI 微板读数仪(加利福尼亚州萨尼维尔的分子装置公司(Molecular Devices, Sunnyvale, California),部分 #EM)

[0589] 15)SoftMax Pro 程序,版本 4.8(加利福尼亚州萨尼维尔的分子装置公司,部分 #SMP53-GXP-SITE)

[0590] 16)Win 楔,标准版(宾夕法尼亚州费城的 TAL 技术公司(TALTechnologies, Philadelphia, PA),部分 #Winwedge Std)

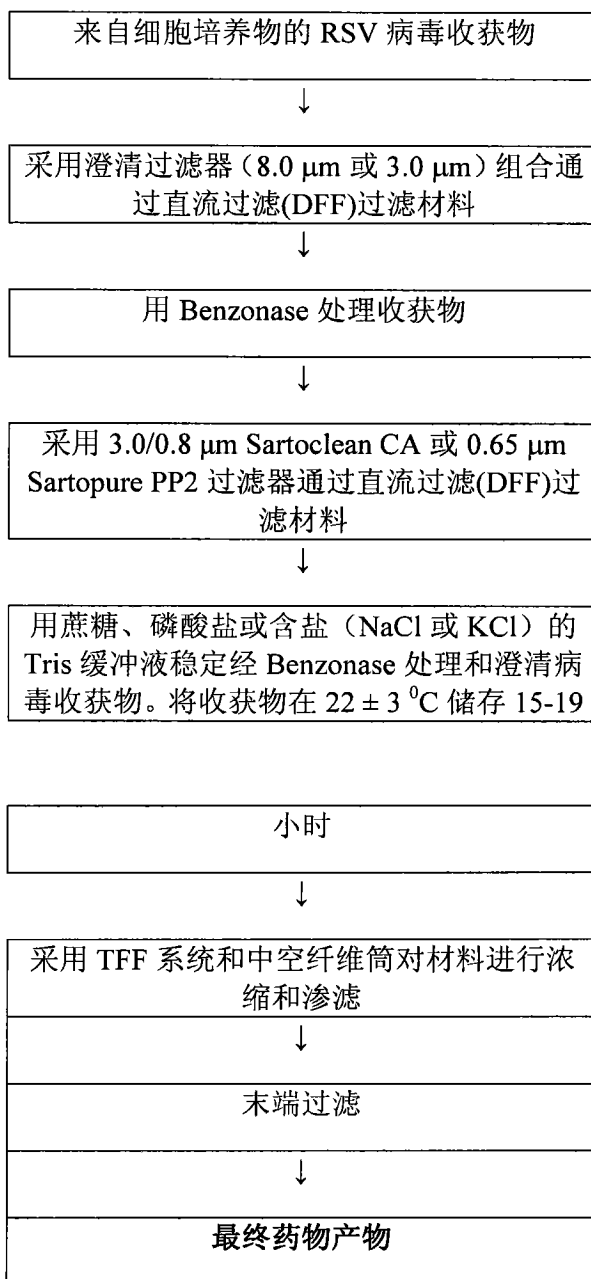
[0591] 从 10L 生物反应器收获物纯化 RSV

[0592] 用 $3.0\ \mu\text{m}$ 过滤器(Sartopure PP2, 2000cm^2)以 $0.41\text{mL}/\text{分钟}/\text{cm}^2$ 的流量澄清获自 10L 生物反应器轮次的 RSV VH(约 8L)。在 10L HyQtainer 组合件中波混合器上在 $32\pm 3^\circ\text{C}$ 将所得滤液与 10U Benzonase/mL 病毒收获物和 5mM MgCl_2 温育 3 小时以降解宿主细胞 DNA。加入 EDTA 达到 5mM 的终浓度终止反应。用 $0.65\ \mu\text{m}$ (Sartopure PP2, 500cm^2) 过滤器以 $3.0\text{mL}/\text{分钟}/\text{cm}^2$ 的流量澄清经 Benzonase 处理的收获物。然后采用 SPP1 缓冲液的 7X 浓缩溶液稳定滤液达到 1X SPP 的终浓度,并在室温($21\pm 2^\circ\text{C}$)储存过夜(12-16 小时)。将稳定的病毒收获物浓缩 5 倍,并用 SPP2 缓冲液进行 7 倍渗滤,之后用 SPP3 缓冲液进行 4 倍渗滤。采用 850cm^2 中空纤维筒进行 TFF 过程。加载比(单位膜面积的病毒加料重量)、剪切速率和跨膜压力(TMP)分别为 $10\text{g 加料}/\text{cm}^2$ 、 $12,000\ \text{秒}^{-1}$ 和 15psi (TFF 参数参见表 1)。用 $3/0.8\ \mu\text{m}$ (Sartoclean CA, 500cm^2) 过滤器以 $3.8\text{mL}/\text{分钟}/\text{cm}^2$ 的流量澄清渗余物。随后通过 1/3 渗余物体积的 SPP3 洗涤该过滤器。将所得滤液混合,以 100mL 等份快速冷冻或控速冷冻在 125mL PETG 瓶中,并储存在 -80°C 。也在各纯化步骤之后收集样品(1 或 10mL)用于分析。将其快速冷冻并储存在 -80°C 。

[0593] 从 30L 生物反应器收获物纯化 MEDI-559

[0594] 用两个平行排列的 $3.0\ \mu\text{m}$ 过滤器(Sartopure PP2, 2000cm^2)以 $0.41\text{mL}/\text{分钟}/\text{cm}^2$ 的流量澄清获自 30L 生物反应器轮次的 RSV 病毒收获物(约 25L)。在 50L HyQtainer 组合件中波混合器上在 32°C 将所得滤液与 10UBenzonase/mL 病毒收获物和 5mM MgCl_2 温育 3 小时以降解宿主细胞 DNA。加入 EDTA 达到 5mM 的终浓度终止反应。用 $0.65\ \mu\text{m}$ (Sartopure PP2, 1000cm^2) 过滤器以 $3.0\text{mL}/\text{分钟}/\text{cm}^2$ 的流量澄清经 Benzonase 处理的收获物。然后采用 SPP1 缓冲液的 7X 浓缩溶液稳定滤液达到 1X SPP 的终浓度,并在室温($21\pm 2^\circ\text{C}$)储存过夜(12-16 小时)。采用 2800cm^2 中空纤维筒进行 TFF 过程。加载比(单位膜面积的病毒加料重量)、剪切速率和跨膜压力(TMP)分别为 $10\text{g 加料}/\text{cm}^2$ 、 $12,000\ \text{秒}^{-1}$ 和 15psi (TFF 参数参见表 28)。用 $3/0.8\ \mu\text{m}$ (Sartoclean CA, 500 或 1000cm^2) 过滤器以 $3.8\text{mL}/\text{分钟}/\text{cm}^2$ 的流量澄清渗余物。随后通过 1/3 渗余物体积的 SPP3 洗涤该过滤器。将所得滤液混合,以 100mL 等份快速冷冻或控速冷冻在 125mL PETG 瓶中,并储存在 -80°C 。也在各纯化步骤之后收集样品(1 或 10mL)用于分析。将其快速冷冻并储存在 -80°C 。

[0595]



[0596]

[0597] 图表 1 :10 和 30L 规模的 RSV 生产的下游制备过程

[0598]

表 28 切向流过滤研究的操作参数

实验编号	病毒收获物	病毒种子	HF 筒	进料流速(L/分钟)	TFF 过程	TFF 系统
1	BR09-068	V559-2a	UFP-500-E-4X2MA	3.53	5X UF ⇨ 含 SPP2 的 7X DF ⇨ 含 SPP3 的 4X DF	低空隙容积 Flexstand
2	BR09-069	V559-2a	UFP-500-E-4X2MA	3.53	5X UF ⇨ 含 SPP2 的 7X DF ⇨ 含 SPP3 的 4X DF	低空隙容积 Flexstand
3	BR09-073	V559-2a	UFP-500-E-4X2MA	3.53	5X UF ⇨ 含 SPP2 的 7X DF ⇨ 含 SPP3 的 4X DF	低空隙容积 Flexstand
4	SUB 090529	V559-1b	UFP-500-E-6A	12.0	5X UF ⇨ 含 SPP2 的 7X DF ⇨ 含 SPP3 的 4X DF	标准 Flexstand
5	SUB 09-005	V559-2a	UFP-500-E-6A	12.0	5X UF ⇨ 含 SPP2 的 7X DF ⇨ 含 SPP3 的 4X DF	标准 Flexstand

[0599] 通过荧光聚焦鉴定试验确定感染性

[0600] 由 VAS(疫苗分析科学) 研究组确定样品的病毒效价。该鉴定试验利用 F 蛋白特

异性单克隆抗体以定量分析测试样品中的病毒。

[0601] 通过 Quant-iT PicoGreen 双链 DNA 鉴定试验定量分析总 DNA

[0602] 采用 Quant-iT PicoGreen 双链 DNA 鉴定试验试剂盒根据制造商的说明确定样品的总 DNA 浓度。一式两份地制备样品的 4 个连续稀释物 (1 : 2)。一式三份地制备 1.95-1000ng/mL 的标准品。所有稀释均采用 1X SPG 缓冲液在 96 孔微板中进行。将荧光强度发射量对标准 DNA 浓度作图。通过从标准曲线的线性回归拟合外推确定样品的总 DNA 浓度,之后用合适的稀释倍数调整。在 (0,0) 设定拟合线的 y 截距以增强低 DNA 浓度外推值的精确度。报道的各样品的总 DNA 浓度是测定的连续稀释液浓度的平均值。

[0603] 通过实时 PCR 定量分析残留的 Vero 宿主细胞 DNA

[0604] 由 VAS 研究组确定样品中 Vero 宿主细胞 DNA 的浓度。所述鉴定试验通过实时 PCR 检测含包含疫苗病毒的细胞底物的样品中的非洲绿猴 (来自 Vero 细胞) 特异性 DNA。

[0605] 通过 Bradford 蛋白质鉴定试验定量分析总蛋白质

[0606] 根据 SOP Q0169 采用含牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准品的加考马斯 (Bradford) 鉴定试验试剂盒确定样品的总蛋白质浓度。一式三份地制备 2.5-25 μ g/mL 的标准品。最初进行各样品的 10 倍稀释。然后一式三份地制备各稀释样品的 3 个连续稀释物 (1 : 2)。所有稀释均采用 1X SPG 缓冲液在 96 孔微板中进行。将 595nm 处的吸光度对标准 BSA 浓度作图。通过合适的稀释倍数确定样品的总蛋白质浓度。报道的各样品的总蛋白质浓度是计算的连续稀释液浓度的平均值。

[0607] 通过 ELISA 定量分析残留的 Vero 宿主细胞蛋白质

[0608] 由 VAS 研究组确定样品中残留的 Vero 宿主细胞蛋白质的浓度。该鉴定试验采用酶联免疫吸附鉴定以定量分析非洲绿猴 (来自 Vero 细胞) 特异性蛋白质。所用抗体是针对 Vero 细胞裂解物在山羊中形成的纯化多克隆抗体。

[0609] 通过 ELISA 定量分析 Benzonase

[0610] 采用 Benzonase 内切核酸酶 ELISA 试剂盒确定样品的 Benzonase 浓度。该鉴定试验采用酶联免疫吸附鉴定试验以定量分析 Benzonase。一抗结合 Benzonase,二抗结合 Benzonase 和一抗复合物,在 450nm 进行比色检测。采用 Benzonase 储液产生标准曲线。

[0611] RSV-F 蛋白表达的确定

[0612] 通过 Western 印迹确定 RSV-F 蛋白存在的鉴定测试。在该鉴定中,使样品在 SDS PAGE 上与标记、阳性和阴性对照一起进行实验。采用转移设备和转移缓冲液将蛋白质条带从 SDS PAGE 转移到尼龙膜。将尼龙膜与 RSV F 单克隆抗体温育,所述抗体进而通过二抗的结合检测。

[0613] 通过毛细管电泳筛分 DNA

[0614] 由 VAS (疫苗分析科学) 研究组进行 DNA 筛分。将样品加载到毛细管电泳上以分离 DNA。通过对相对荧光单位读数定量分析不同大小的 DNA 片段。

[0615] 重量摩尔渗透压浓度的确定

[0616] 采用高级仪器公司 (Advanced Instruments) 的渗透压力计确定样品的重量摩尔渗透压浓度。使第一标准品在渗透压力计上进行实验,然后将样品加载到样品管中,记录重量摩尔渗透压浓度读数。

[0617] 8.5.2 结果和讨论

[0618] 30L 规模 (SUB 092529 和 SUB 09-005) 的 RSV 制备过程的效果与 10L 规模 (BR09-068、BR09-069 和 BR09-73) 的效果相当。总回收产率在 6-14% 之间, 在 5 个轮次之间一致 (表 29)。病毒收获物的感染性为 $6.5-7.0 \log_{10} \text{FFU/mL}$, 纯化药物物质的感染性为 $6.0-6.7 \log_{10} \text{FFU/mL}$ (表 30)。SUB090529 病毒收获物的效价特别低, 因为该培养物用病毒种子 V559-1b 而非 V559-2b 感染。因此, 所得纯化批量的效价也是 5 个批次中最低的。因为 V559-1b 在 T 烧瓶中通过细胞刮擦产生, 其显示高度的异质性, 且相比使用在滚瓶中产生并通过用玻璃珠粒移出贴壁细胞而制备的 V559-2b, 其使用可产生更高的效价可变性和更低的感染性。由于感染时的细胞密度低, SUB09-005VH 和最终批量的效价也很低。

[0619] 纯化批量的残留 Benzonase、宿主细胞 DNA 和宿主细胞蛋白质浓度均满足 RSV 药物物质提出的规格 (表 31)。< 300bp 的残留 DNA 片段的百分比大于 80%, > 1000bp 的百分比小于或等于 5% (表 32)。在所有 5 个批次的纯化批量中检测到 RSV-F 蛋白的表达, 证实了 RSV 的存在 (表 31)。

[0620] 结论

[0621] 在 10L 和 30L 的规模上评价为来自生物反应器收获物的 RSV 开发的纯化方法, 以评价过程的可靠性和最终药物物质的质量。两种规模的病毒收获物感染性、纯化批量感染性和总效价回收产率分别为 $6.5-7.0 \log_{10} \text{FFU/mL}$ 、 $6.0-6.7 \log_{10} \text{FFU/mL}$ 和 6-14%。纯化批量的残留 Benzonase、宿主细胞蛋白质和宿主细胞 DNA 浓度均满足 RSV 药物物质提出的规格。此外, 超过 80% 的残留 DNA 片段的大小 < 300bp。

[0622]

表 29 10 和 30 L 规模的 RSV 制备过程的效价回收率

步骤效价回收率(%)	BR09-068 (10-L)	BR09-069 (10-L)	BR09-073 (10-L)	SUB 090529 (30-L)	SUB 09-005 (30-L)
3 μm 过滤	97	87	91	93	87
Benzonase 处理 (10 U/mL, 32°C, 3 小时)	56	63	64	53	40
0.65 μm 过滤	79	67	65	63	63.1
稳定	186	186	125	59	77.4
过夜储存后的稳定	54	71	61	99	316.2
5X UF ⇨ 含 SPP2 的 7X DF ⇨ 含 SPP3 的 4X DF	32	43	59	74	21.6
3/0.8 μm 过滤 + 过滤器洗涤	53	67	46	85	40
总计	7	14	8	11	6

[0623]

表 30 来自 10 L 和 30 L RSV 生物反应器轮次的病毒收获物和纯化药物物质的感染性、总 DNA 浓度和总蛋白质浓度

属性		制备过程规格	BR09-068 (10-L)	BR09-069 (10-L)	BR09-073 (10-L)	SUB 092529 (30-L)	SUB 09-005 (30-L)
病毒收获物	感染性 (log ₁₀ FFU/mL)	-	6.95	7.02	6.83	6.50	6.65
	总 DNA (ng/mL)	-	587	807	454	627	692.4
	总蛋白质 (µg/mL)	-	153	134	156	115	103.5
纯化药物物 质	感染性 (log ₁₀ FFU/mL)	≥6.0 log ₁₀ FFU/mL	6.31	6.65	6.27	6.01	6.0
	总 DNA (ng/mL)	-	71	79	26	48	35.1
	总蛋白质 (µg/mL)	-	106	120	84	36	58.3

[0624]

[0625]

表 31 从 10 L 和 30 L 生物反应器轮次纯化的 RSV 药物物质的属性

属性	制备过程规格	BR09-068 (10-L)	BR09-069 (10-L)	BR09-073 (10-L)	SUB 090529 (30-L)	SUB 09-005 (30-L)
残留宿主细胞 DNA (ng/10 ⁵ 剂量)	<100 ng/10 ⁵ 剂 量	0.30	0.19	0.12	0.89	--*
残留宿主细胞蛋白质 (µg/10 ⁵ 剂量)	<40 µg/10 ⁵ 剂量	1.02	0.54	0.35	--*	--*
残留 Benzonase (ng/10 ⁵ 剂量)	<0.1 ng/10 ⁵ 剂 量	0.01	BLD	0.01	BLD	BLD
重量摩尔渗透压浓度 (mOs/kg)	报道结果	607	596	595	600	597
pH	报道结果	7.14	7.13	7.12	7.11	7.12
RSV-F 蛋白表达	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性

* 正在进行的分析

表 32 0.65 μm 过滤后和纯化药物物质中的残留 DNA 片段的大小分布

批次号	过程步骤	<300 bp	300 – 500 bp	500 – 1000 bp	>1000 bp
BR09-068 (10-L)	0.65 μm 过滤后	74.6	10.8	7.1	7.6
	纯化药物物质	83.4	8.5	4.1	3.9
BR09-069 (10-L)	0.65 μm 过滤后	72.4	10.2	7.9	9.5
	纯化药物物质	81.8	8.6	4.8	4.7
BR09-073 (10-L)	0.65 μm 过滤后	72.5	10.2	7.5	9.9
	纯化药物物质	87.9	6.6	2.8	2.6
SUB 090520 (30-L)	0.65 μm 过滤后	68.9	13.2	8.3	9.7
	纯化药物物质	83.2	7.8	4.1	5.0
SUB 09-005 (30-L)	0.65 μm 过滤后	68.7	9.5	9.1	12.7
	纯化药物物质	82.9	8.9	4.4	3.8

[0626] 尽管已经出于清楚和理解的目的在某种程度上详细地描述了本发明,但是本领域技术人员通过阅读本说明书可清楚地了解,可在不背离本发明真实范围的情况下进行各种形式和细节的变化。例如,上述所有的技术和设备都可以各种组合联用。本申请中提到的所有公开出版物、专利、专利申请或其它文献均通过引用全文纳入本文中用于所有目的,具有与所述各单独的公开出版物、专利、专利申请或其它文献均独立地通过引用纳入本文中用于所有目的一样的相同程度。此外,以下美国临时专利申请:2006年9月16日提交的60/845,121、2006年12月22日提交的60/871,721、2007年5月9日提交的60/917,008、

2007 年 7 月 25 日提交的 60/951,813、2008 年 9 月 24 日提交的 61/099,749 和 2007 年 9 月 14 日提交的美国专利申请 11/855,769 均通过引用全文纳入本文。

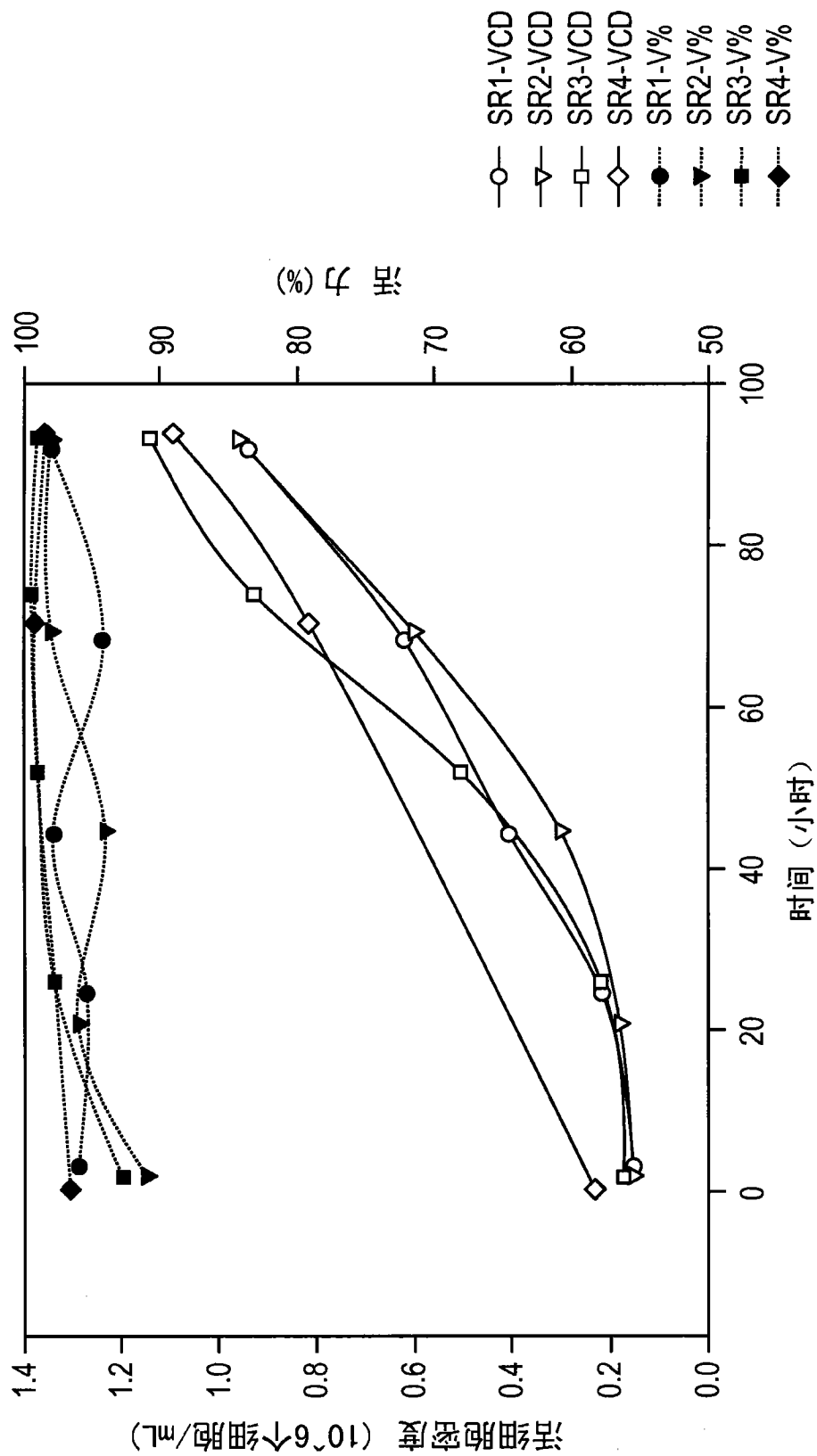


图 1

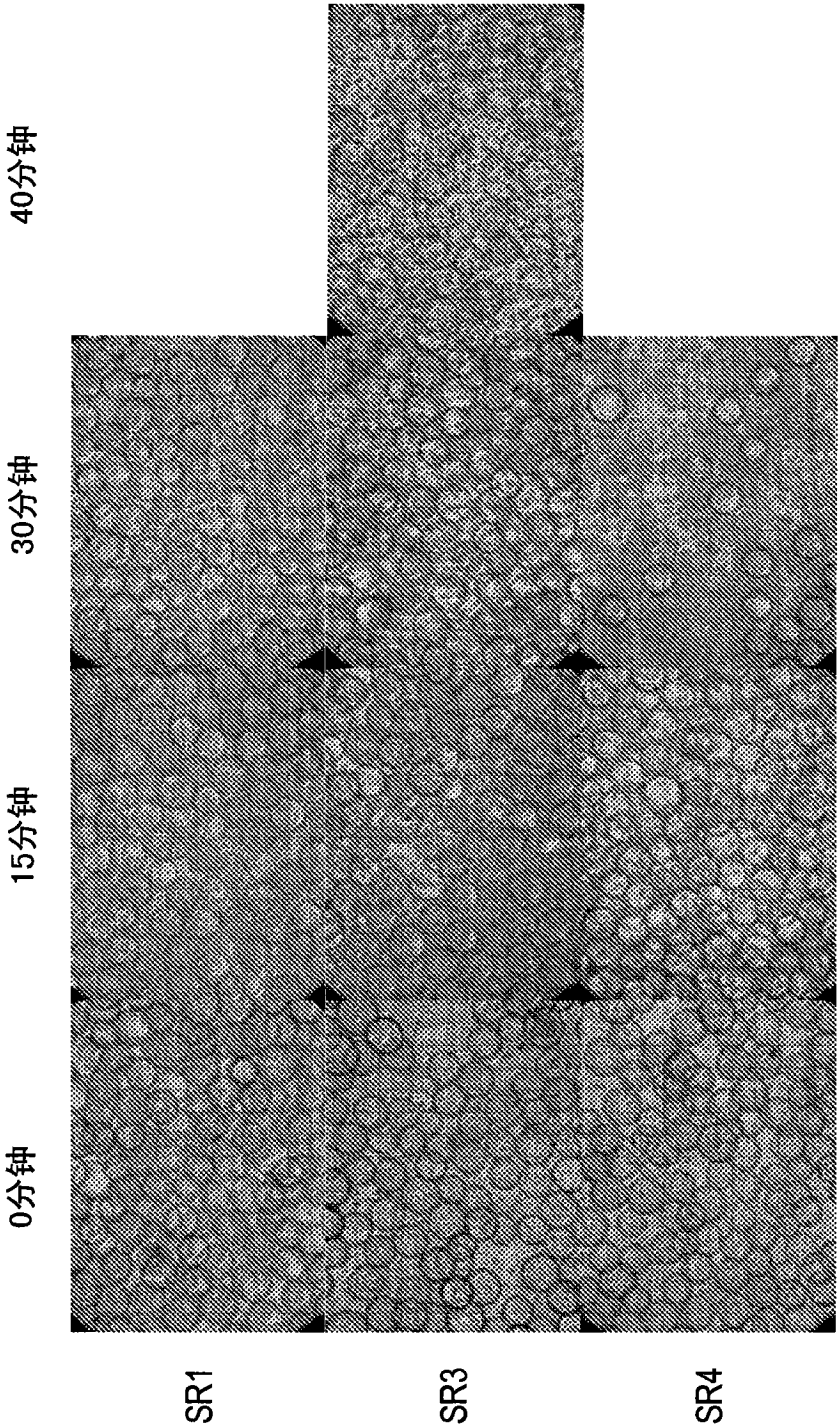


图 2

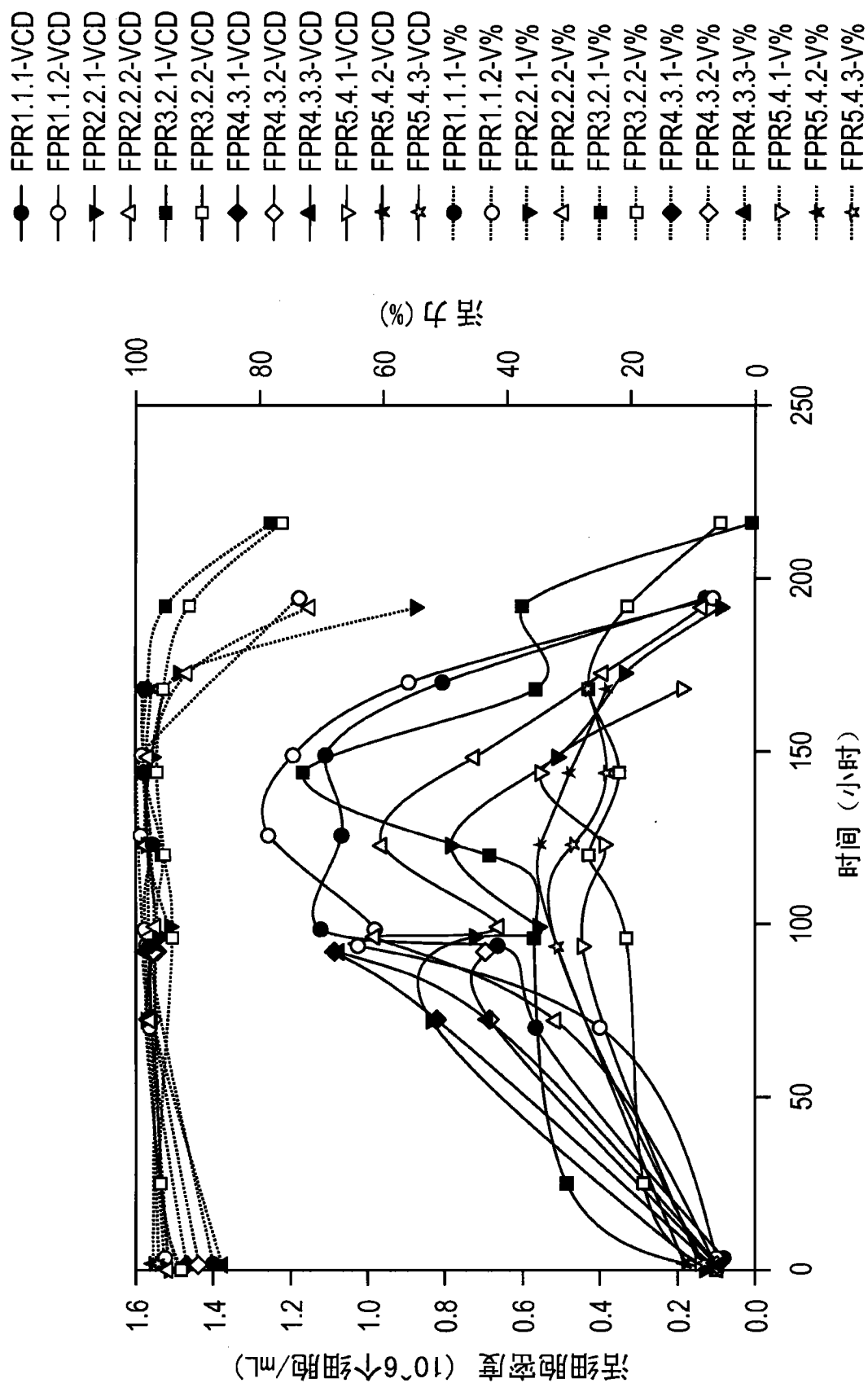


图 3

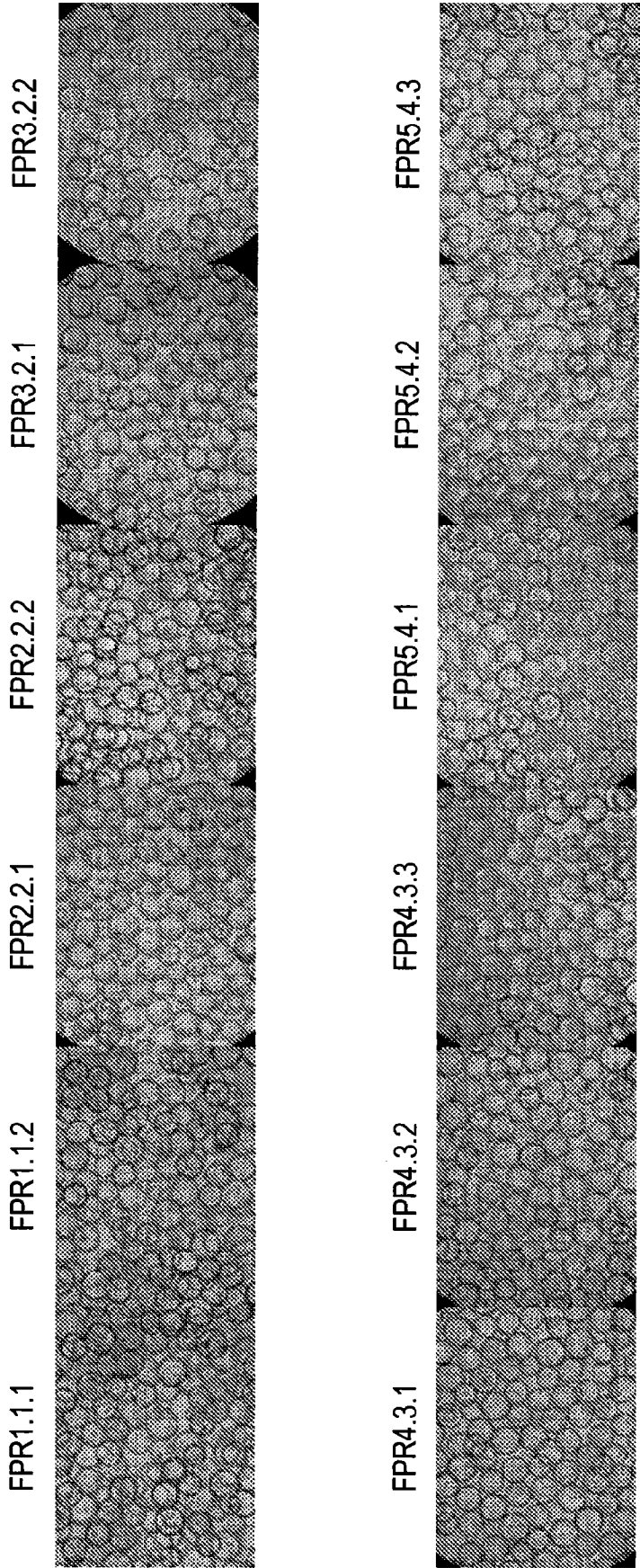


图 4

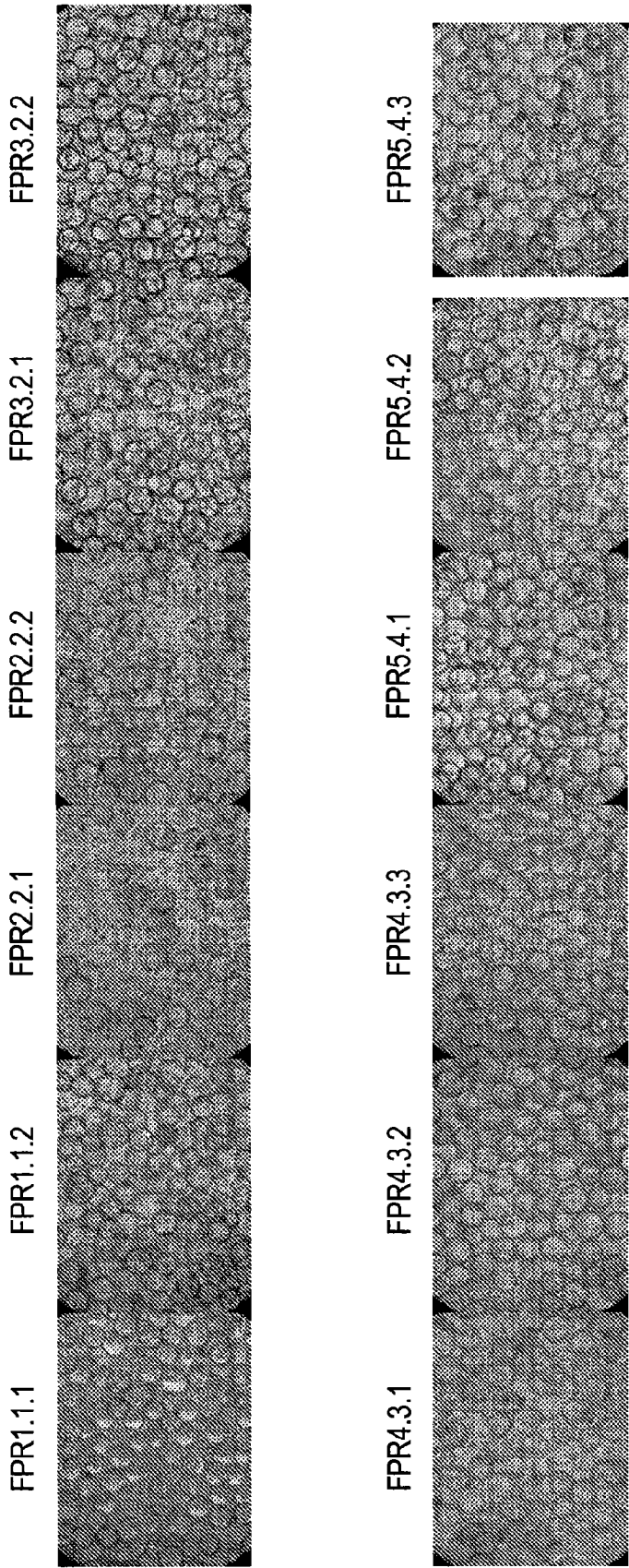


图 5

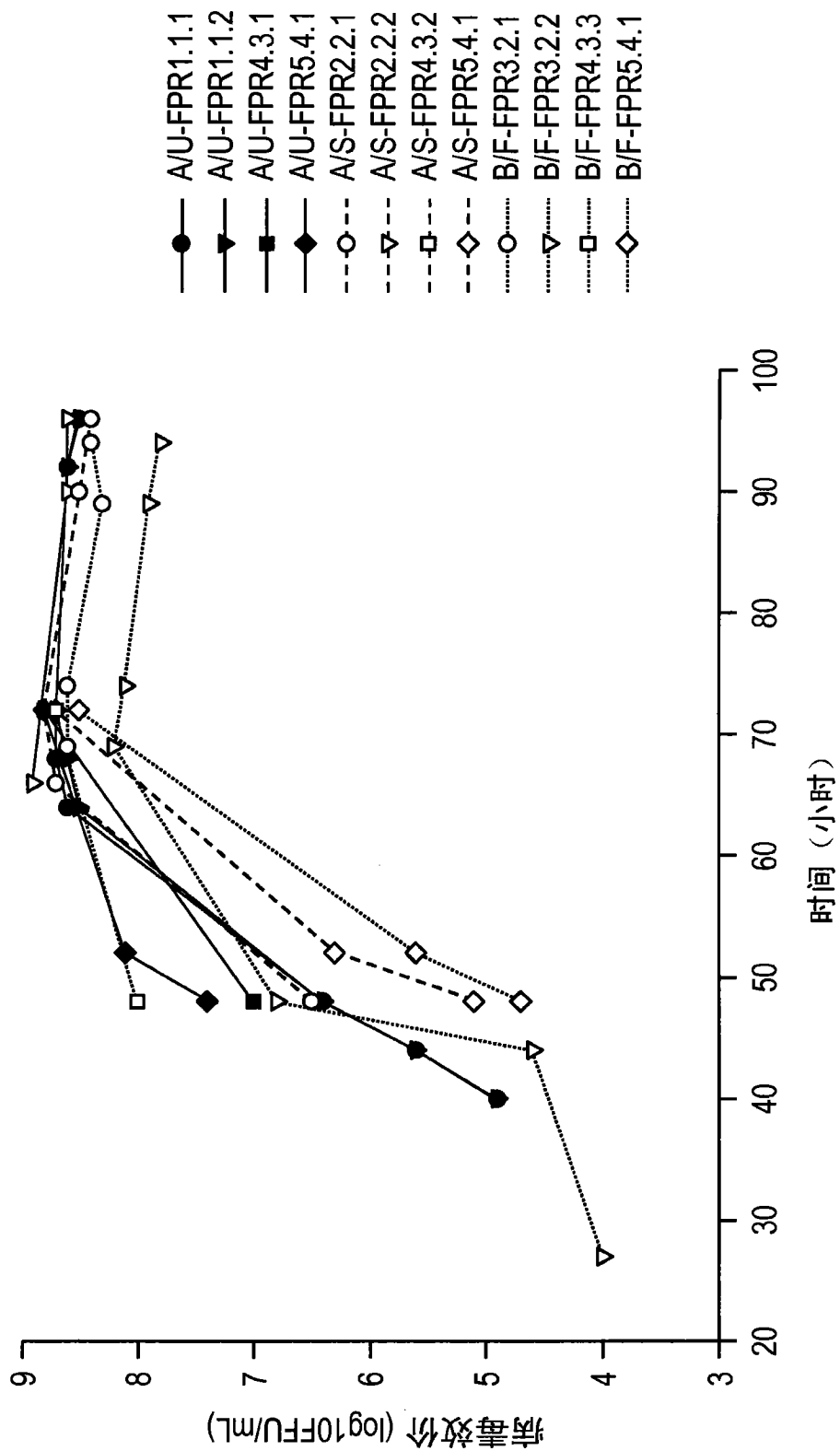


图 6

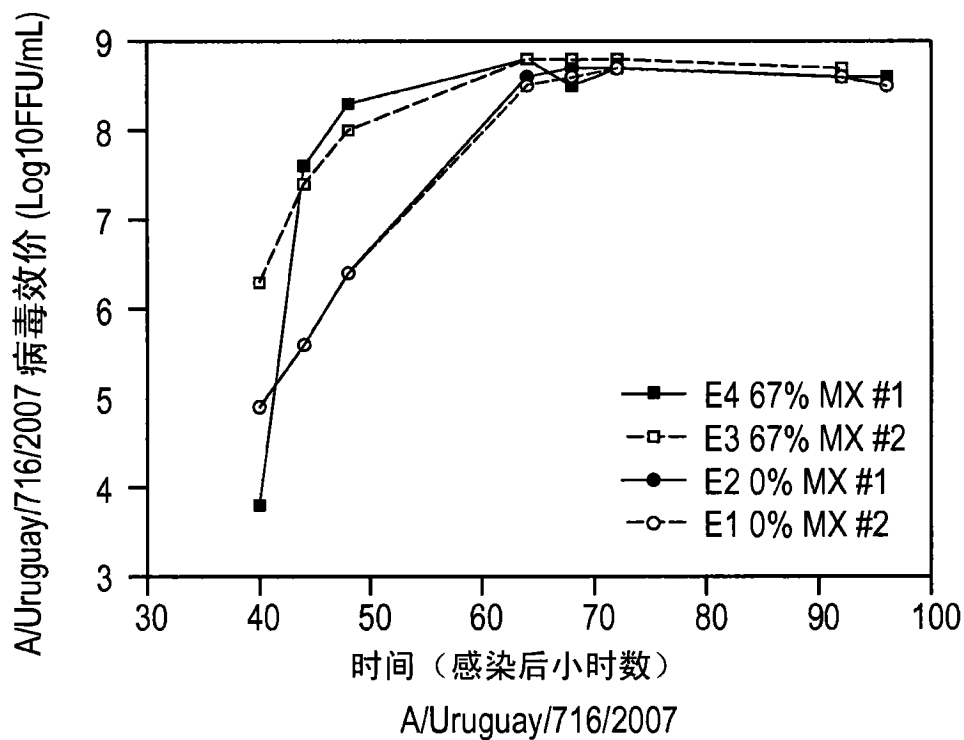
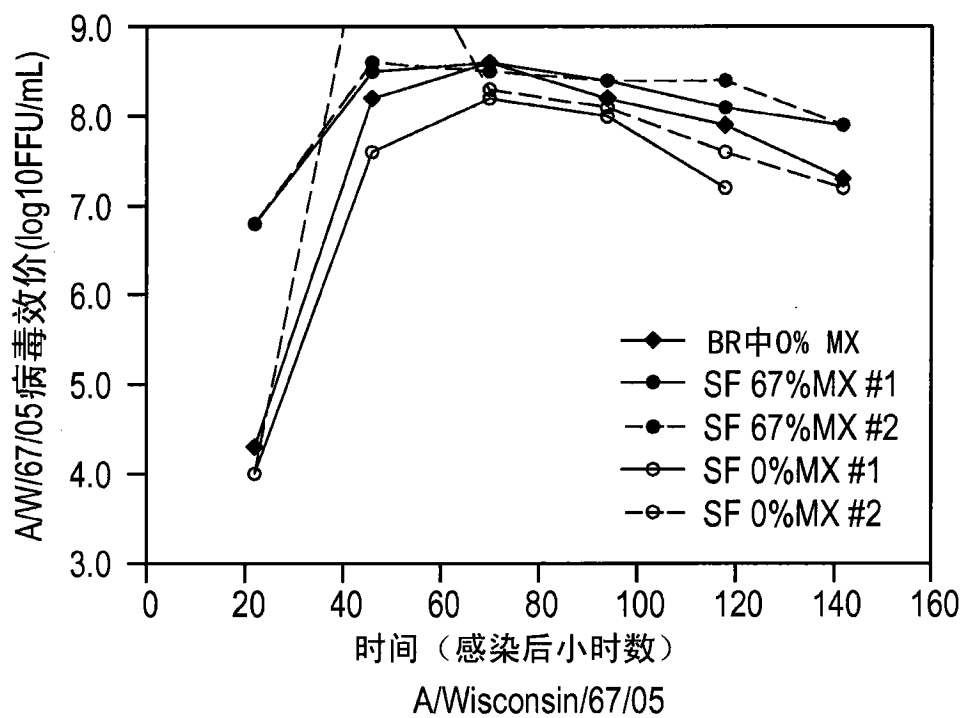


图 7A

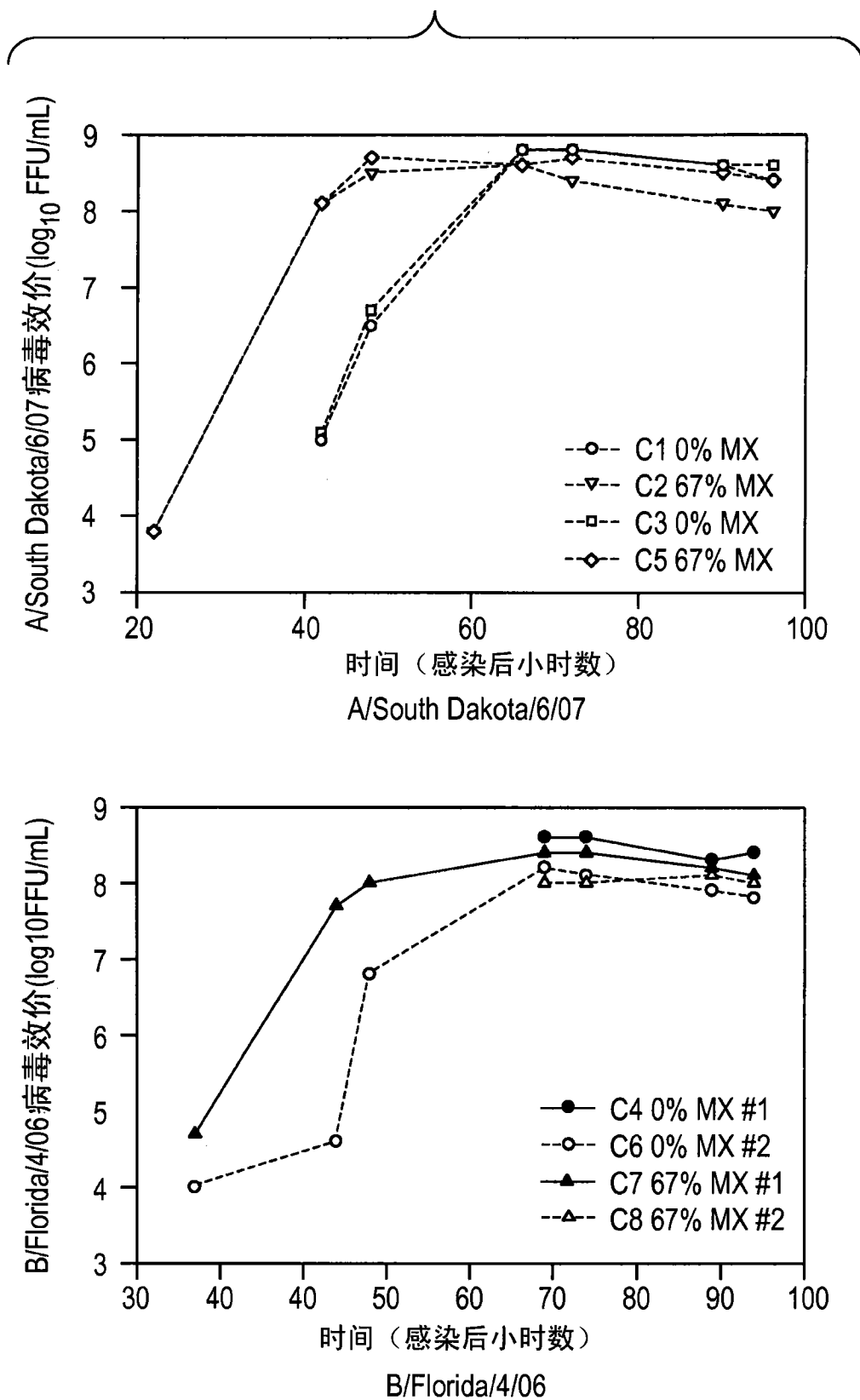


图 7B

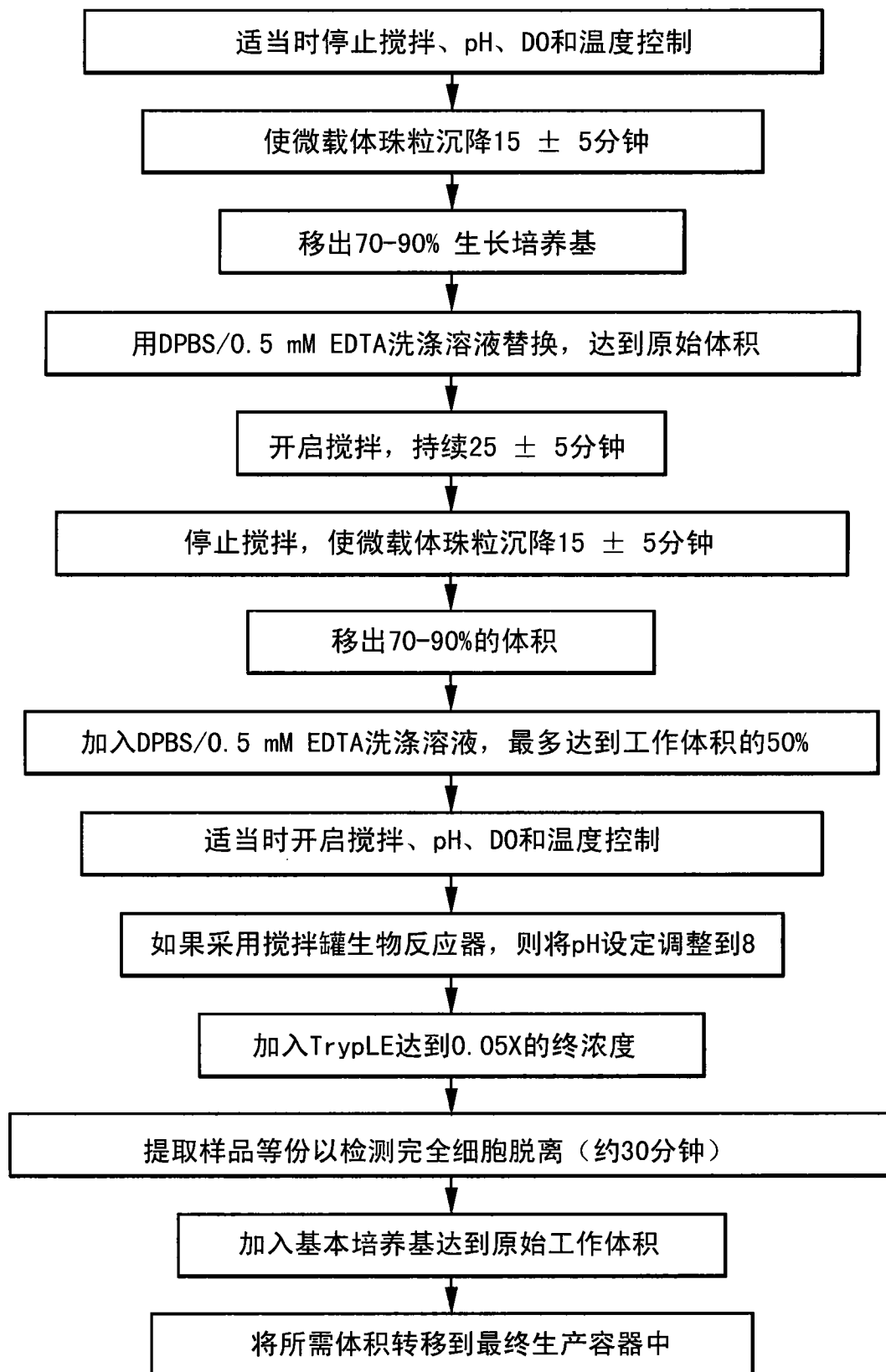
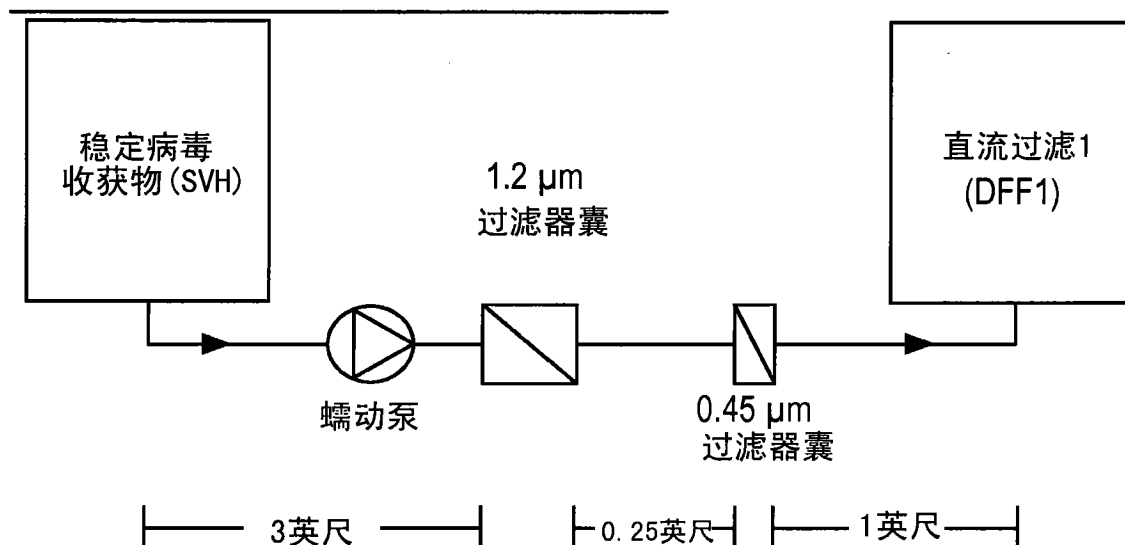


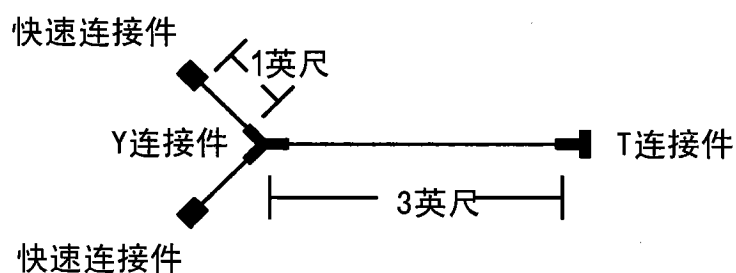
图 8

直流过滤1 (DFF1) 过滤器器材图

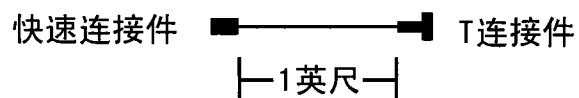


GE医疗保健公司Uniflux滑道管道器材图

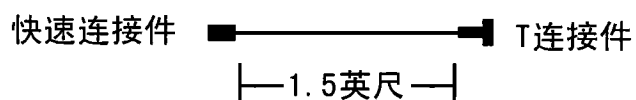
UNIFLUX样品/缓冲液进料管道器材



UNIFLUX进料排水管道器材



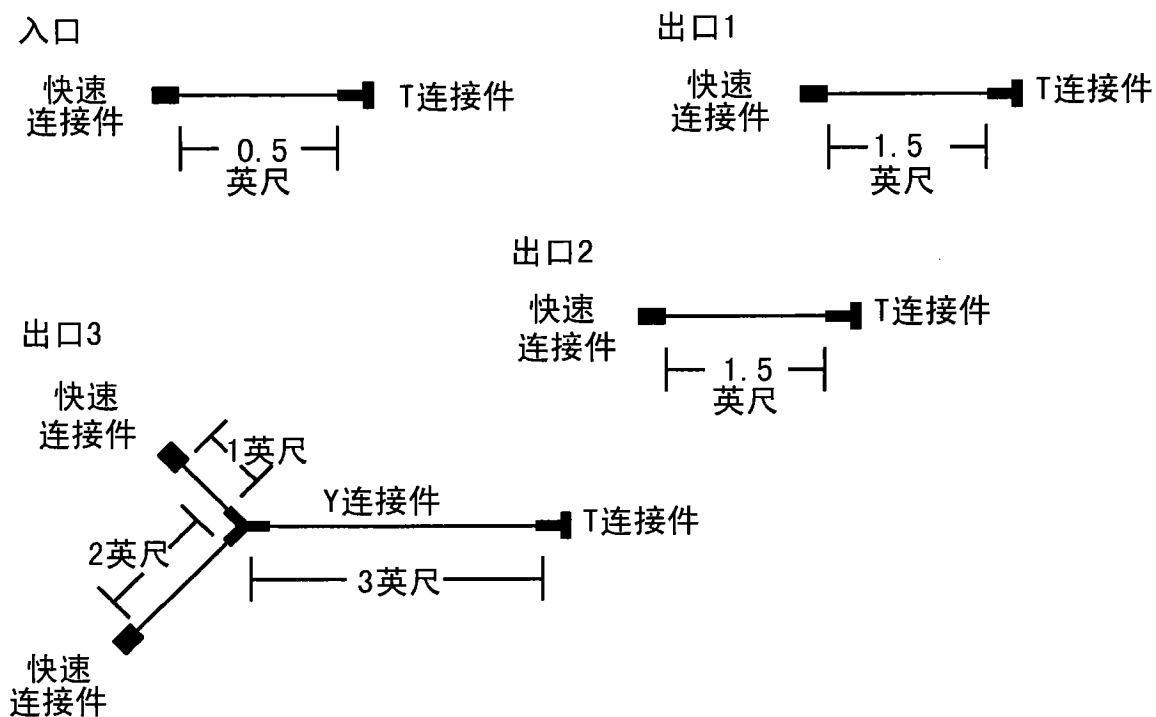
UNIFLUX渗透物管道器材



注：所有管道器材均用3/8"内径硅氧烷管制备。

图 9A

GE医疗保健公司AKTA过程滑道管道器材图



注：所有管道器材均用3/8"内径硅氧烷管制备。

直流过滤2 (DFF2) 过滤器器材图

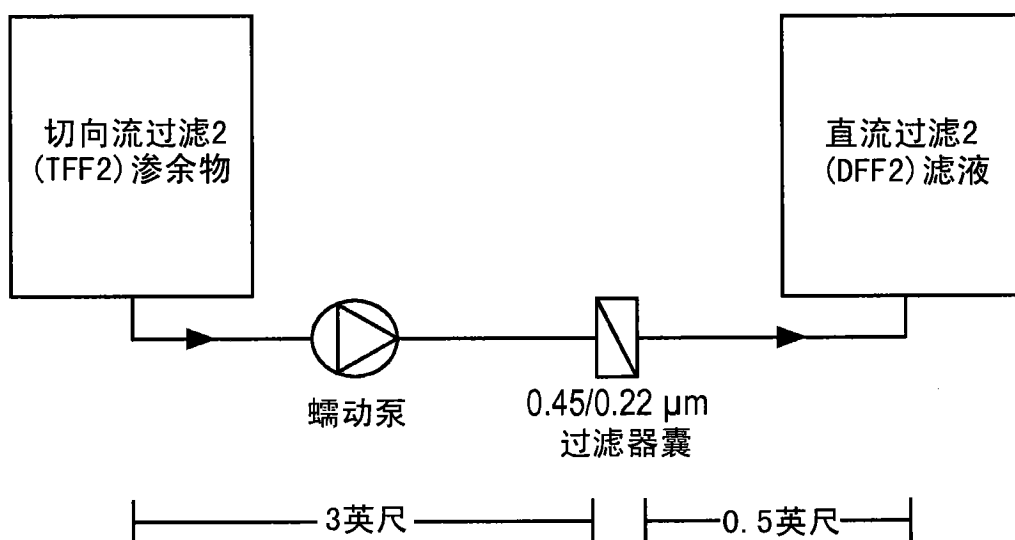


图 9B

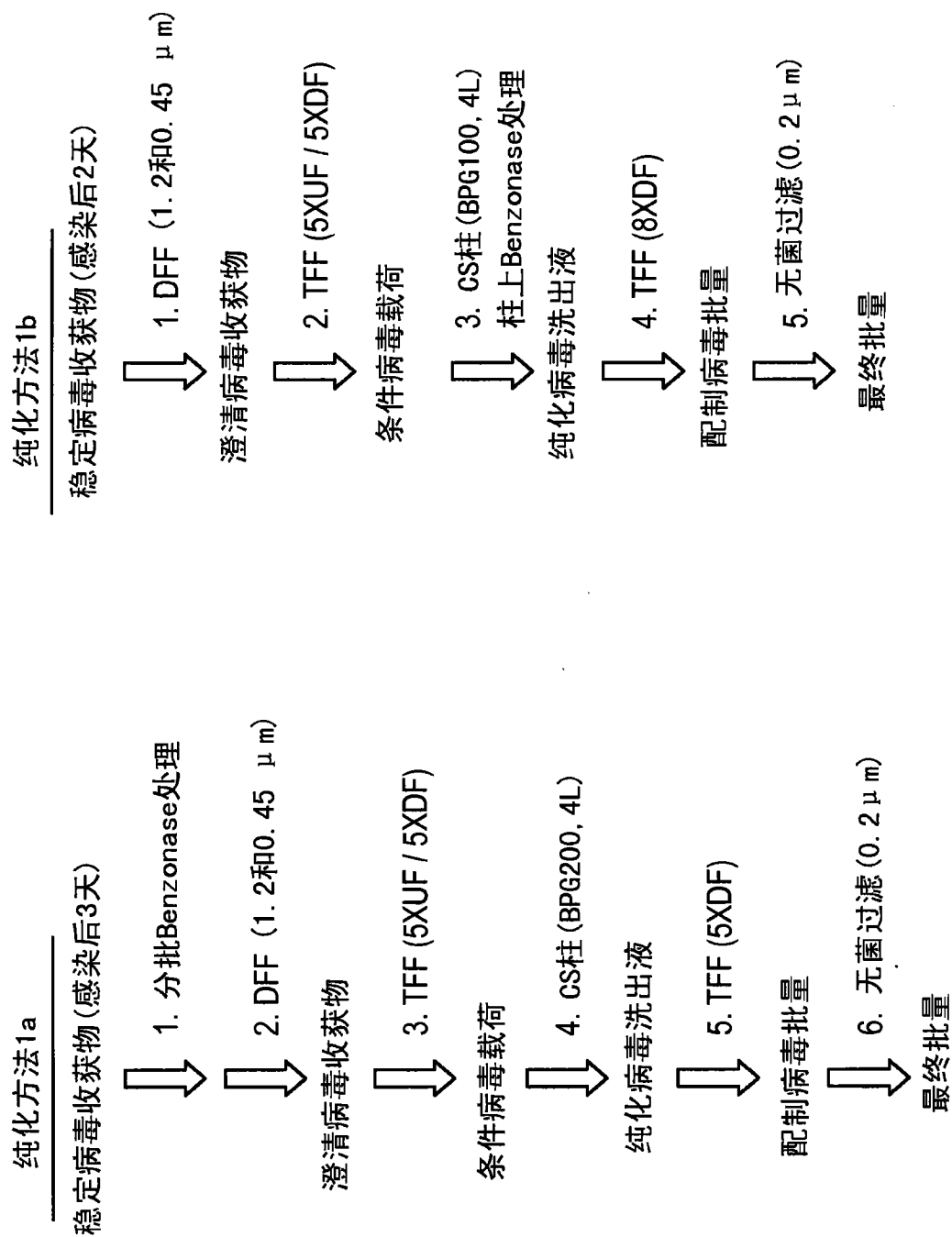


图 10A

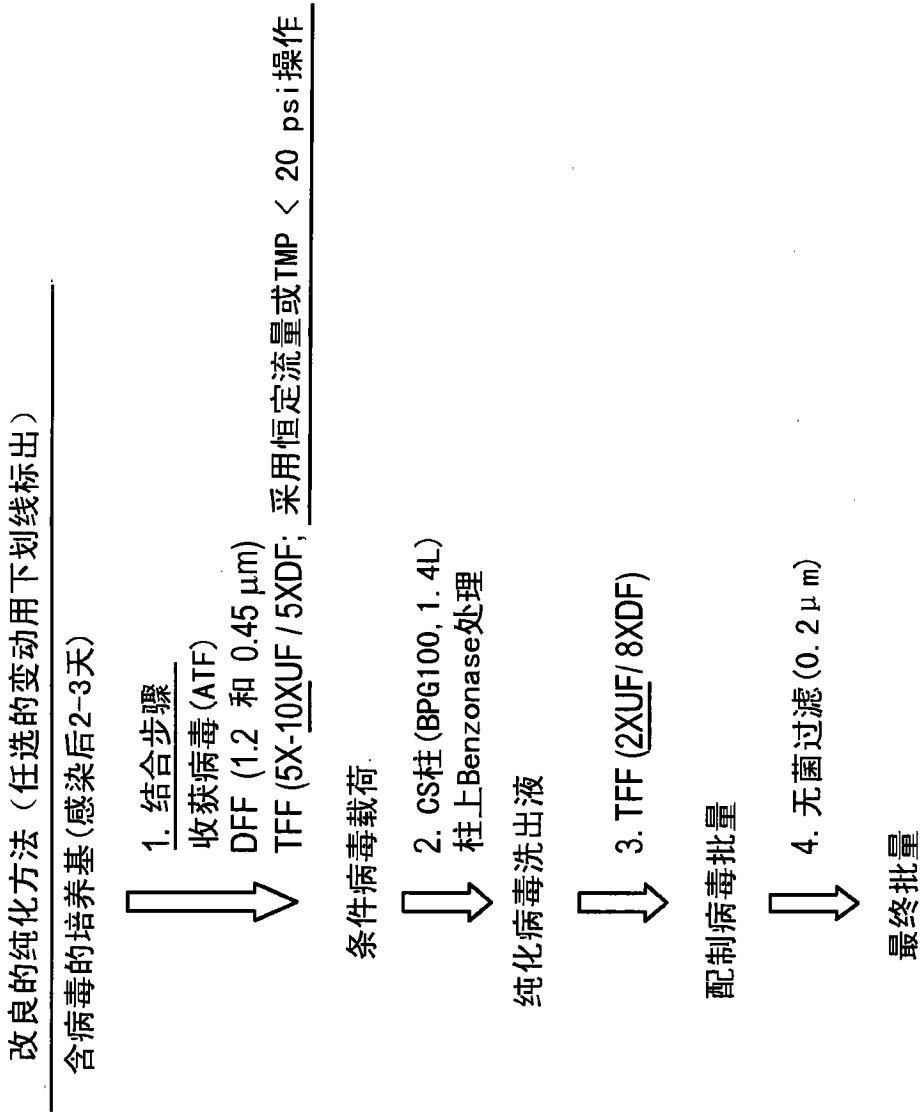


图 10B

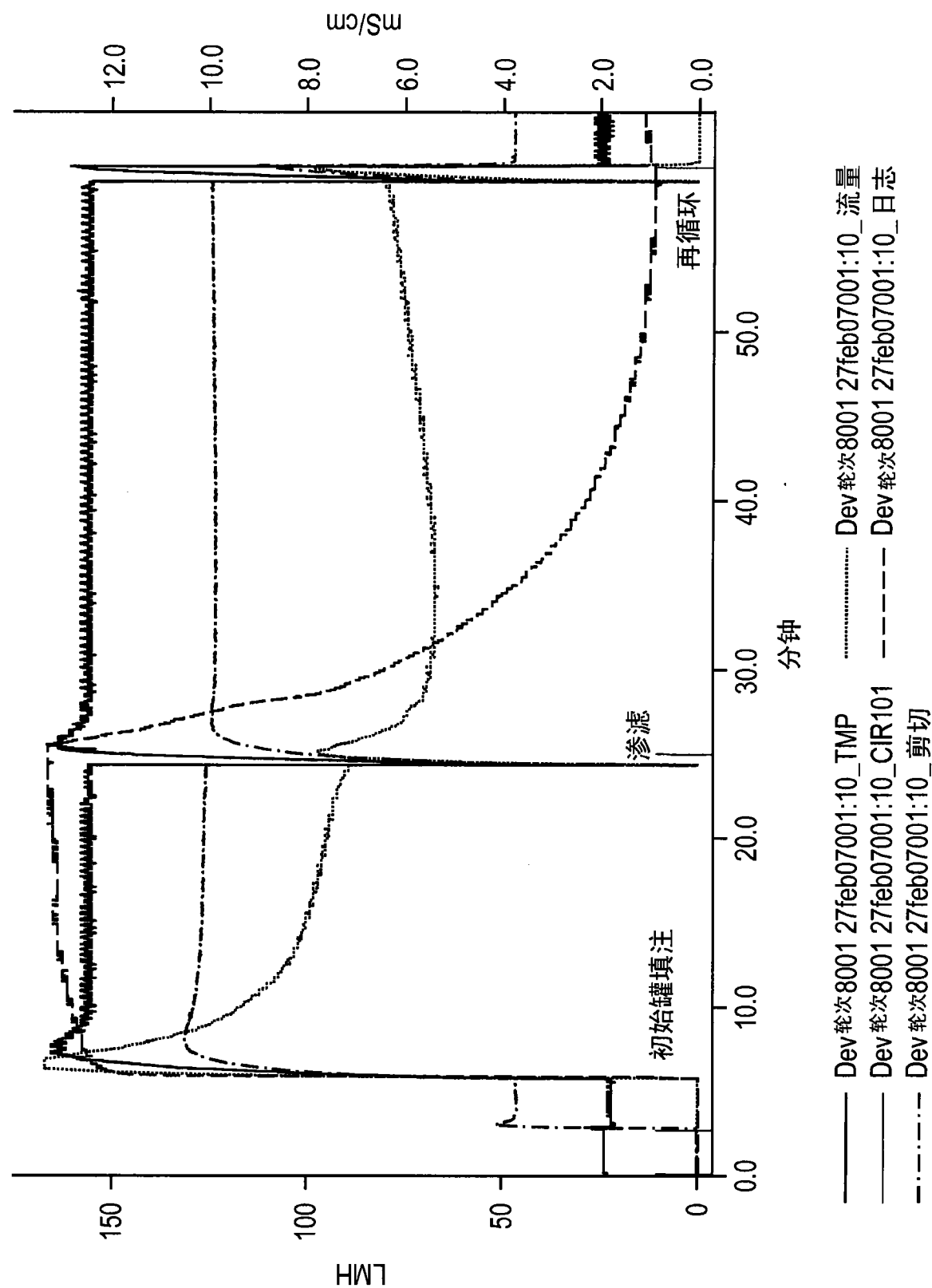


图 11

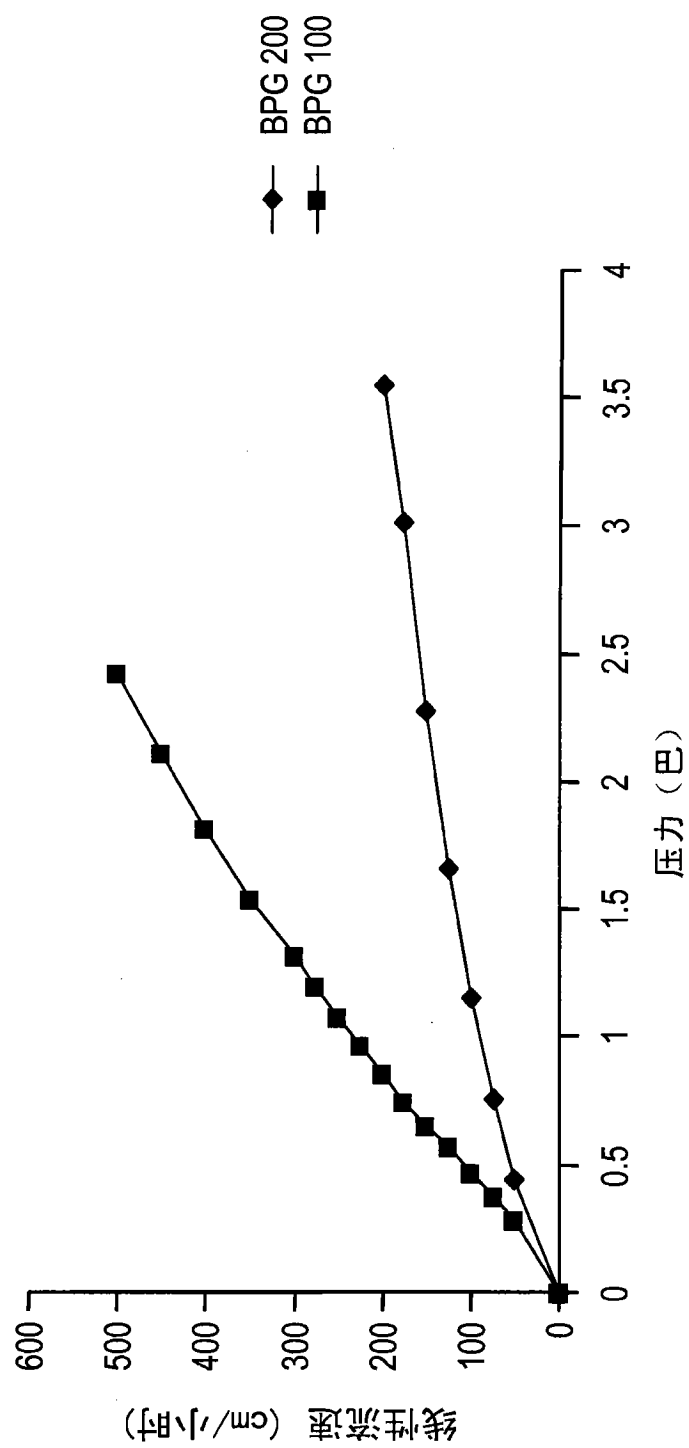


图 12

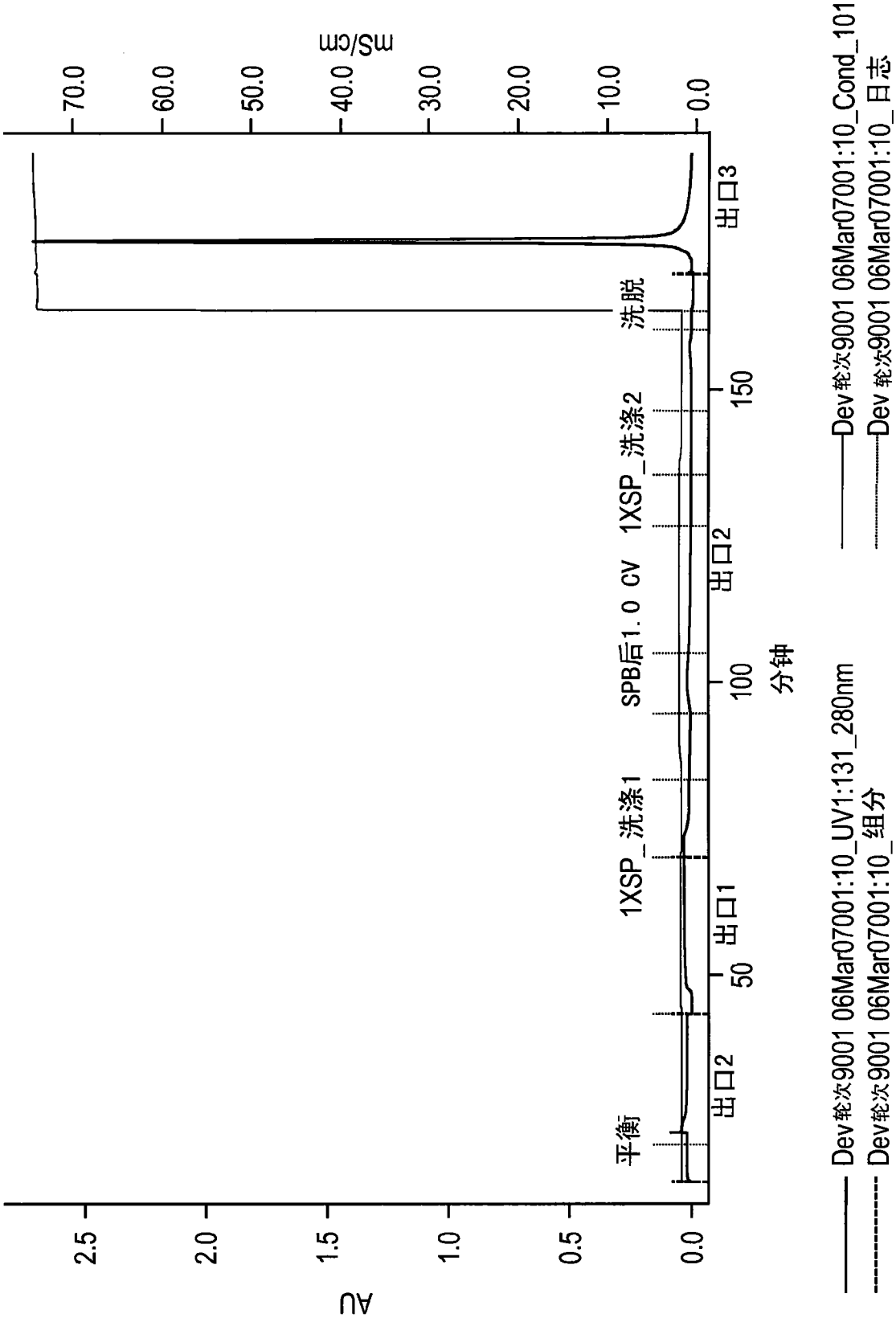


图 13

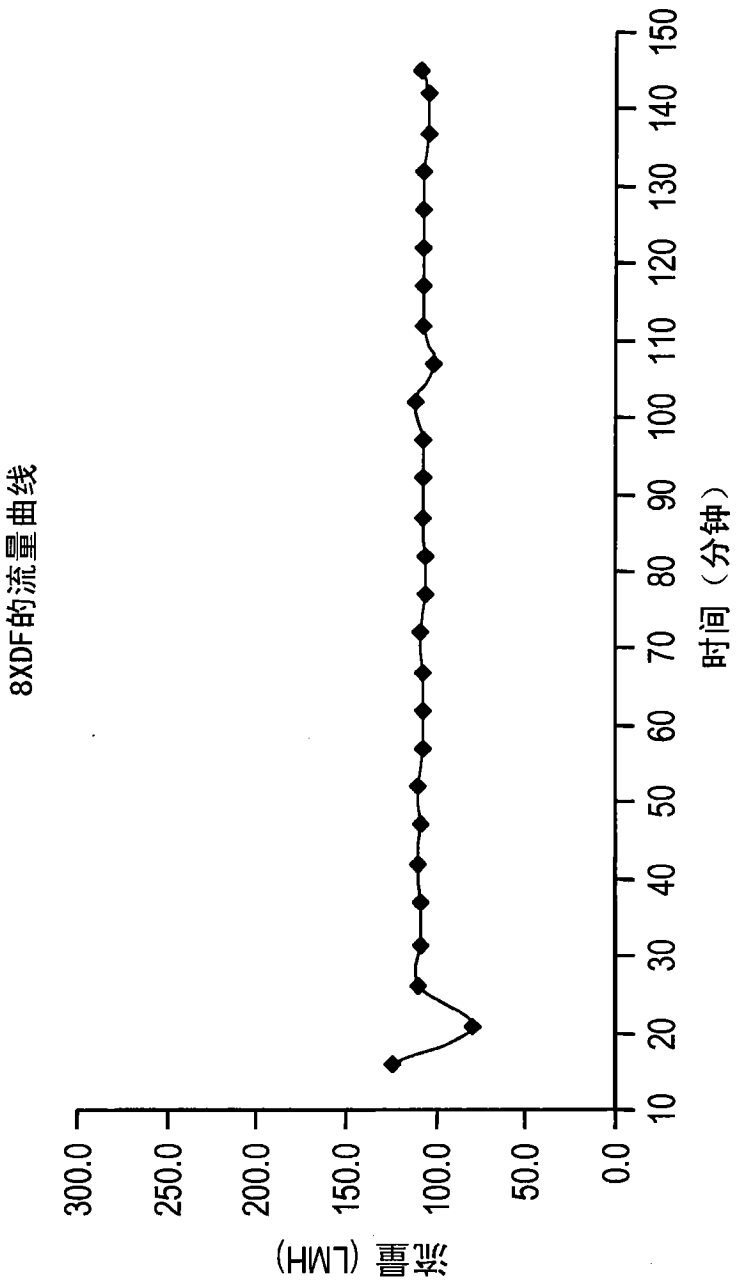


图 14

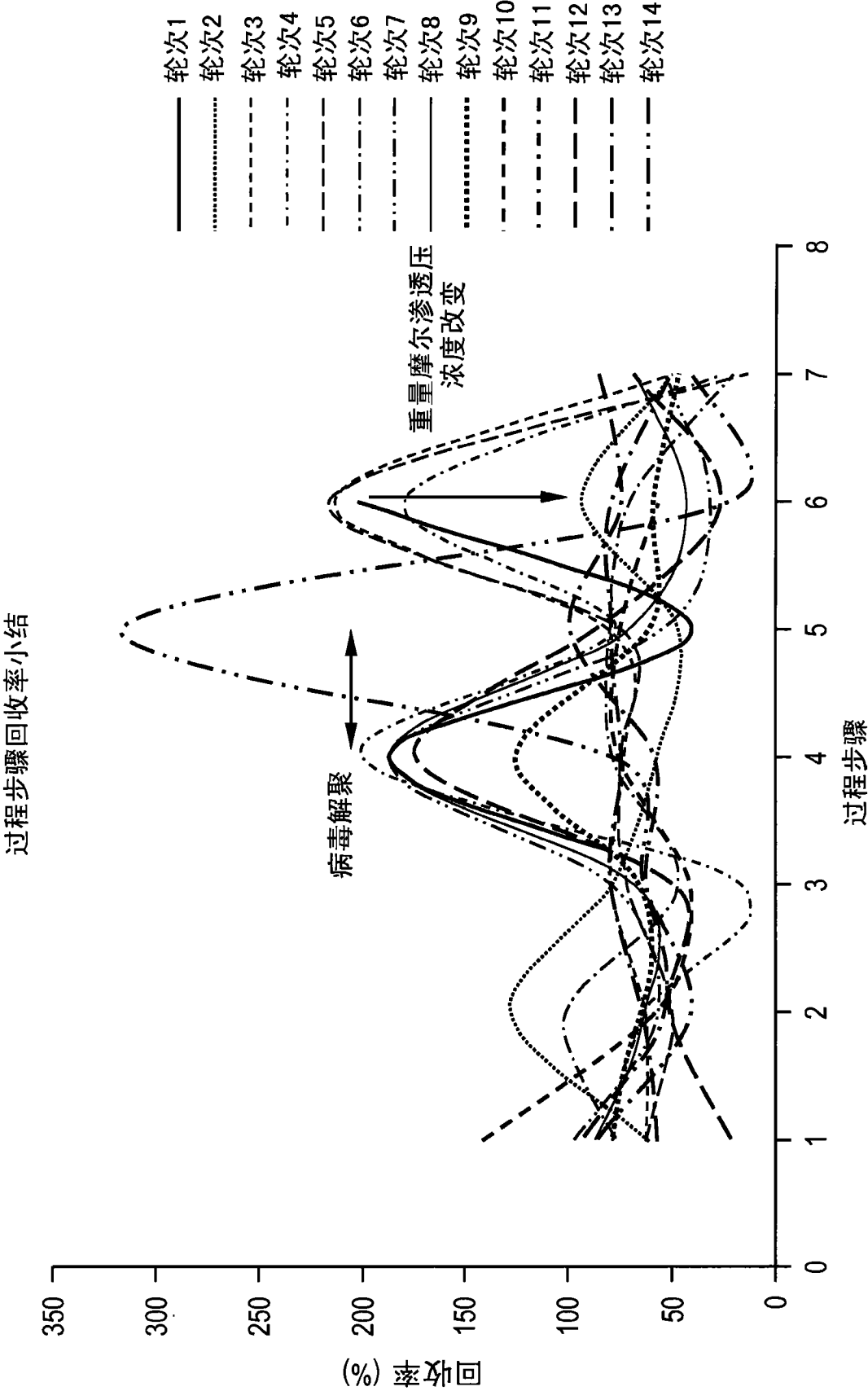


图 15

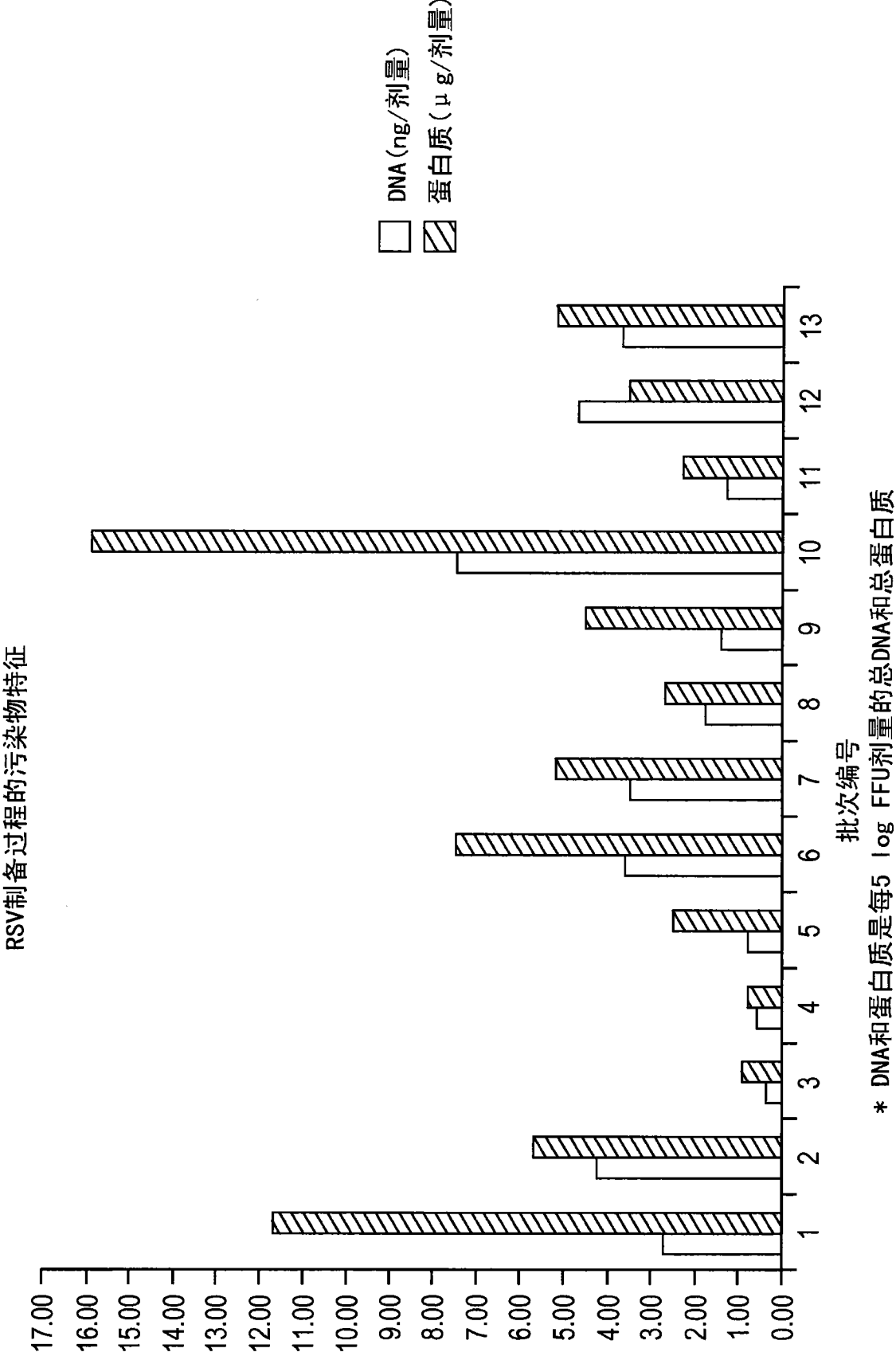


图 16