



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101044237 B

(45) 授权公告日 2011.05.04

(21) 申请号 200580034446.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005.10.07

C12N 7/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

102004049290.5 2004.10.09 DE

(56) 对比文件

CN 1228474 A, 1999.09.15, 全文.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

WO 2003/049767 A2, 2003.06.19, 说明书第

2007.04.09

7 页第 24 — 27 行, 第 13 页实施例 5.

(86) PCT 申请的申请数据

CN 1482239 A, 2004.03.17, 全文.

PCT/EP2005/010810 2005.10.07

WO 9833886 A1, 1998.08.06, 说明书第 25 页

(87) PCT 申请的公布数据

W02006/040084 DE 2006.04.20

第 1 — 4 行, 第 27 页第 28 — 29 行, 第 28 页第 1 — 2 行, 第 29 页第 1 行 — 第 31 页第 13 行.

(73) 专利权人 爱库里斯股份有限两合公司

审查员 李美宣

地址 德国乌帕塔尔

(72) 发明人 M·波尔沙伊特 B·伯德克

T·米努尔 H·阿佩莱尔

U·朗格尔 K·布拉本德

D·奥托 - 布拉本德 J·克佩尔

H-J·亨茨勒

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

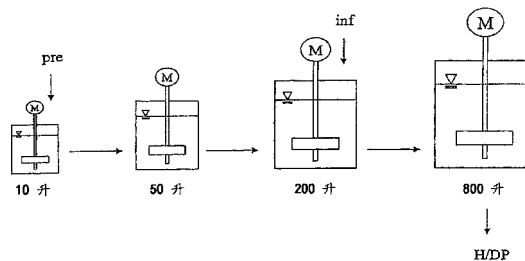
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

制备病毒材料的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种制备病毒悬浮液的方法。本发明特别涉及一种在细胞培养物中制备高滴度病毒悬浮液的方法。优选的方法包括在用病毒材料感染之前增加细胞培养物的体积, 及随后进一步将该体积扩大到明显大于感染前最大培养体积的终体积的步骤。



1. 一种在微载体细胞培养中制备病毒材料的方法,包括:
 - (a) 第一培养阶段,包括通过添加培养基和微载体材料扩大细胞培养体积,其中获得第一最大细胞培养体积;
 - (b) 感染步骤,其在所述第一培养阶段之后进行,包括向所述微载体细胞培养中添加感染性病毒材料;
 - (c) 第二培养阶段,其在所述感染步骤之后进行,包括将细胞培养体积进一步扩大至第二最大细胞培养体积,其中在所述第二培养阶段产生病毒材料;和
 - (d) 从微载体细胞培养中获得病毒材料的收获步骤,其特征在于所述第二最大细胞培养体积是所述第一最大细胞培养体积的 2-7 倍,且在感染步骤 (b) 之前,细胞培养体积连续地扩大。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述第二最大细胞培养体积是所述第一最大细胞培养体积的 3-4 倍。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中通过添加非浓缩的培养基实现所述细胞培养体积的扩大。
4. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中使用无血清培养基。
5. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的方法,其中在感染步骤中使用 0.001 到 2 的感染复数 (MOI)。

制备病毒材料的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备病毒悬浮液的方法。本发明特别涉及一种在细胞培养物中制备高滴度病毒悬浮液的方法。优选的方法包括在用病毒材料感染之前增加细胞培养物的体积,及随后进一步将该体积扩大到明显大于感染前最大培养体积的终体积的步骤。

背景技术

[0002] 现有技术中已经公开了许多制备病毒材料的方法,特别是由动物细胞培养物制备病毒材料的方法。

[0003] 本领域技术人员区分贴壁生长的细胞系,即优选在固体表面上生长的细胞系,和优选悬浮生长的细胞系。贴壁生长的细胞系或者直接在使用的培养容器表面上培养,或者在可以悬浮于营养培养基中的固体颗粒(例如微载体)上生长。

[0004] 使用悬浮生长的细胞系或贴壁生长的细胞系制备病毒材料的方法是已知的。

[0005] 在使用细胞培养物制备病毒悬浮液时培养基的组成是非常重要的。在许多情况下,必须添加胎牛血清(FCS)和动物或植物来源的生长因子。除了批间波动和在下游处理过程中干扰蛋白质成分外,血清的使用也成为生物学安全的危险因素(BSE/TSE、支原体、朊病毒等)。因此更倾向于使用无血清培养基,如果可能的话,使用合成培养基[MERTEN等人,1994]。

[0006] 例如在微载体培养中,使用贴壁细胞除了诸如保持充足的氧气供应、除去CO₂、用最小的剪切应力获得发酵罐培养物的充分匀化等典型的放大技术障碍外,特别地还会导致下一步较大生产规模的接种问题[GLACKEN等人,1990, J. B. GRIFFITHS等人,1985, AMERSHAM2001]。

[0007] 在本文中,仅仅通过造成细胞至少部分损失其粘附力的方式进行操作,可以发生纯贴壁生长的细胞从载体向载体的“直接迁移”。消除贴壁生长细胞粘附力的策略和其中可以使用的酶是本领域技术人员公知的[E. LINDNER等人,1987, AMERSHAM 2001, D. ÜRRSCHMID等人,2003],在关于清除或灭活所用酶的方面对所述方法的研究中必须考虑。在二十世纪七十年代和八十年代,较小规模地进行了在滚瓶、培养皿和T形瓶中从容器表面向微载体的直接细胞迁移的成功实验。本领域技术人员只知道在固定床反应器中贴壁生长的细胞从载体向载体的成功迁移,但是存在悬浮生长和贴壁生长的细胞系这一事实必然限制了这种认识[AMERSHAM 2001, D. ÜRRSCHMID等人,2003]。

[0008] 特别重要的是实施该方法的方式。文献中描述了多种方法,例如分批培养或灌注培养。灌注培养在此用于消除停留时间与比生长速率之间的关系,用于避免培养基的抑制或限制,以提高生产力,并且以“高密度细胞培养”(HDCC)模式在几个月的时间里频繁地运行。但是,除了复杂的外围设备(分离器、旋转过滤器、超声细胞截留装置等)以外,这些系统还需要长时间的且复杂的启动期[M. REITER等人,1989, GLACKEN等人,1990, J. B. GRIFFITHS等人,1985, AMERSHAM 2001, D. ÜRRSCHMID等人,2003A]。

[0009] 也可以通过给细胞培养物补充高度浓缩的基质溶液来提供足够的营养物质。补料

引起的抑制,例如铵和 / 或乳酸盐,可能导致较低的产率 and 生产力,特别是在 HDCC 模式下。迄今为止,已推荐用灌注或透析系统本身来避免抑制性的浓缩。

[0010] 在利用动物细胞培养物制备病毒材料时可能会发生过程控制问题,包括观察细胞和病毒的复杂的耦合动力学,特别是当使用微载体细胞培养物时。

[0011] 例如,通过复合灌注使引起 CPE(细胞病变效应)的病毒增殖的有效性受到怀疑,因为所述病毒通常在短时间内(有时在感染后不到 3-7 天)破坏或裂解细胞。

[0012] 文献中描述了在小试和生产规模(50-1000 升)进行病毒增殖的分批法。在所有描述的微载体方法中都以较低的细胞密度进行病毒增殖。用将要增殖的病毒感染后,所述感染一直持续到收获,例如在后来生产规模的终体积中[B. MONTAGNON 等人. 1984, B. BAIJOT 等人. 1987]。在有些情况中,已经描述了缓慢裂解或非裂解的病毒的实验室规模的灌注培养。在一种情况中,描述了培养基改变为初始体积[AMERSHAM 2001]。

[0013] US 6,455,298-B1 和 US 6,656,720-B2 描述了一种使用悬浮生长的细胞系制备流感病毒材料的方法。该公开的方法包括细胞材料在悬浮培养中增殖的第一培养阶段,感染步骤,以及之后生产病毒的第二培养阶段。在该阶段,可以进一步通过加入培养基稀释培养物,或者可以象灌注培养一样进行。该方法的优点是所述方法的生产量不受培养容器有限的内表面大小所限制。但是不利的是,悬浮培养获得的细胞密度不能象使用基于微载体的病毒生产方法可能获得的那样高。而且,与基于微载体的方法相比,悬浮培养从营养培养基中除去细胞材料更加复杂。本发明的方法克服了这些缺点,因为它利用在微载体上贴壁生长的细胞系制备病毒材料。

[0014] US 6,726,907 和 WO 95/24468 描述了制备病毒材料的方法,包括使细胞材料增殖的第一培养阶段,感染步骤,以及之后生产病毒材料的第二培养阶段。与本发明的方法不同,其在第二培养阶段不另外添加培养基,因此在所述第二培养阶段培养体积不会进一步增加。这导致收获的体积较小,而且培养物的病毒滴度也比本发明的方法更低。

[0015] US 5,994,134、US 5,719,051 和 US 6,194,210 公开了基于微载体的制备病毒材料的方法,这些方法同样包括第一培养阶段,感染步骤,和第二培养阶段。与本发明的方法不同,该第二培养阶段培养体积没有任何增加,而是象灌注培养那样进行。供应连续流动的新鲜培养基,而排出等体积的培养基流,因此培养体积保持不变。与使用悬浮细胞系的上述方法相比,该方法的优点在于,首先,能够达到较高的细胞密度,其次,能够在较长的时间内收获大量含病毒的培养基。但是,这种基于微载体的制备病毒材料的方法具有一个缺点,即获得的含病毒培养基的病毒滴度(每单位体积的病毒颗粒)低于本发明的方法。这使得分离病毒材料较困难,从而增加了生产成本。此外,供应新鲜培养基并同时排出含病毒的培养液对灭菌技术提出了更高的要求,并且增加了污染的危险。如果将要生产的病毒导致生产细胞裂解,由此导致细胞病变效应(CPE),则不可能以灌注模式使用具有第二培养阶段的制备病毒材料的方法。

[0016] 这也适用于外部或内部透析与通过具有特定分子量截止值的半透膜的质量转移的复合方法。为了这个目的,在以逆流法或顺流法通过外部施加的膜用新鲜培养基透析之前,被消耗的培养基必须与细胞分离开。除了细胞碎片堵塞该模块内的膜等问题以外,问题特别还包括复杂的装置和放大。

[0017] 发明概述

[0018] 考虑到上述现有技术,本发明的技术问题是提供一种制备病毒材料的方法,该方

法可以在较短时间内生产大量含有高浓度所述病毒材料的病毒悬浮液。

[0019] 本发明通过一种在微载体细胞培养中制备病毒材料的方法解决了所述技术问题，该方法包括：(a) 第一培养阶段，包括通过添加培养基和微载体材料扩大细胞培养体积，其中获得第一最大细胞培养体积；(b) 感染步骤，其在所述第一培养阶段之后进行，包括向所述微载体细胞培养物中添加感染性病毒材料；(c) 第二培养阶段，其在所述感染步骤之后进行，包括将细胞培养体积进一步扩大至第二最大细胞培养体积，在所述第二培养阶段产生病毒材料；和 (d) 从微载体细胞培养物中获得病毒材料的收获步骤，其特征在于所述第二最大培养体积明显大于所述第一最大培养体积。在本发明的一个优选实施方案中，所述第二最大培养体积至少是所述第一最大培养体积的两倍。

[0020] 本发明的方法的一个优点特别是，通过在感染步骤后向培养基补料，培养液的病毒滴度可以比分批法提高 10 倍。一个特别的优点是，如果在感染步骤之后补充非浓缩的培养基，从而再次充分提高第二培养阶段的培养体积，也可以实现所述病毒滴度的提高。产生的病毒材料的总量因此可以比补充浓缩物的本发明的方法大大提高。

[0021] 通过研究实施例和以下给出的说明，本发明的其他实施方案对于本领域技术人员来说是显然的。

附图说明

[0022] 图 1：本发明的方法的示例性图示，体积从 10 升经 50 升和 200 升变化为 800 升。感染在 200 升规模上进行（缩写：pre，预培养；inf，感染；H/DP，收获 / 下游处理）。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明涉及一种制备病毒悬浮液的方法。本发明的方法具有至少两个培养阶段。在第一培养阶段（感染步骤前），培养体积增加数次或者连续增加。在本发明的方法中，甚至在感染步骤之后，培养体积逐步地或连续地进一步增加，其结果是，将要收获的终体积明显大于感染前的最大培养体积。

[0025] 本发明涉及：

[0026] 1. 一种在微载体细胞培养中制备病毒材料的方法，包括：

[0027] (e) 第一培养阶段，包括通过添加培养基和微载体材料扩大细胞培养体积，其中获得第一最大细胞培养体积；

[0028] (f) 感染步骤，其在所述第一培养阶段之后进行，包括向所述微载体细胞培养物中添加感染性病毒材料；

[0029] (g) 第二培养阶段，其在所述感染步骤之后进行，包括将细胞培养体积进一步扩大至第二最大细胞培养体积，其中在所述第二培养阶段产生病毒材料；和

[0030] (h) 从微载体细胞培养物中获得病毒材料的收获步骤，

[0031] 其特征在于所述第二最大培养体积大于所述第一最大培养体积。

[0032] 2. 根据第 1 项所述的方法，其中所述第二最大培养体积是所述第一最大培养体积的 2-7 倍。

[0033] 3. 根据第 2 项所述的方法，其中所述第二最大培养体积是所述第一最大培养体积的 3-4 倍。

[0034] 4. 根据第 1-3 项中任一项所述的方法，其中通过添加非浓缩的培养基实现所述细

胞培养体积的扩大。

[0035] 5. 根据第 1-4 项中任一项所述的方法,其中使用无血清培养基。

[0036] 6. 根据第 1-5 项中任一项所述的方法,其中在感染步骤中使用 0.001 到 2 的感染复数 (MOI)。

[0037] 7. 通过根据第 1-6 项所述的方法制备的病毒材料。

[0038] 8. 纯化的通过根据第 1-6 项所述的方法制备的病毒材料。

[0039] 9. 纯化和配制的通过根据第 1-6 项所述的方法制备的病毒材料。

[0040] 本发明的核心是生产体积的显著的相继或连续增加,优选使用相同种类的培养基或相似种类的培养基。下面以羊副痘病毒 (Parapoxvirus ovis) 的增殖为例描述了与经典方法相比效率的提高。

[0041] 实施例

[0042] 实施例 1

[0043] 首先,在静置培养 (叠板 (tray stacks), 滚瓶) 或分批微载体细胞培养中培养一种已知的贴壁牛肾细胞系。为此目的,使用 1-8g/l, 优选 3-7g/l 的微载体浓度。以 $1-6 \times 10^5$ 细胞 /ml 向反应器中接种。在营养物质被消耗后,在该细胞增殖阶段利用微载体的沉淀进行培养基更换。在达到 $0.2-2 \times 10^7$ 细胞 /ml, 优选 $0.3-0.7 \times 10^7$ 细胞 /ml 的最大细胞数后,使用含有添加物的培养基的培养包括通过多次沉淀进行洗涤步骤,以及用不含添加物或具有明显较低添加物浓度的培养基更换上清液,以减少诸如 FCS、生长激素等添加物的浓度。然后用 0.001-2, 优选 0.005-0.1 的感染复数 (MOI) 感染。

[0044] 所述感染在为发酵罐体积 10-100% 的培养体积中进行。在分批模式中不进行进一步的操作,感染持续约 3-15 天, 优选 7-11 天。在 40-100%, 优选 40-90% 的被感染细胞达到细胞病变效应 (CPE) 后,收获培养物。

[0045] 例如,通过无气泡和低剪切膜通气供应气体。将 pO_2 调节为 15-65%, 优选 25-55%。

[0046] 用碳酸氢钠、氢氧化钠和 / 或 CO_2 气体将 pH 调节为 pH6.6 至 pH7.6, 优选 pH6.9 至 pH7.5。温度为 32°C 至 37°C。在细胞生长阶段和病毒增殖阶段调节的参数可能不同。

[0047] 通过在病毒增殖阶段补加培养基浓缩物或各种基质的浓缩物可以实现病毒产率的进一步优化。已经为各种系统建立和描述了这种过程控制。但是,特别是当使用贴壁细胞系在微载体培养中进行病毒增殖时,确定实质需要的比消耗速率是极其困难的,一定程度上与确定细胞数的问题有关,这是专家所知道的。即使基质单独的消耗率是已知的,还存在培养抑制的问题。文献中特别描述了铵或乳酸盐引起的限制。没有普遍有效的阈值,因此必须对使用的生物系统具体地确定。

[0048] 如果已经检测到限制 / 抑制,为了获得高产物滴度,必须加以避免。因此在最近几年,特别是在 HDCC 领域,已经采用灌注或透析培养,其在引起 CPE 的病毒增殖方面的缺点已经在上面讨论。

[0049] 实施例 2

[0050] 以下是本发明的体积扩大补料分批 (VEF) 法与现有技术中公开的方法的比较。

[0051] 上述在感染后通过用新鲜培养基稀释培养物获得的相继体积扩大 (例如一次放大达到 1 : 2-1 : 7, 优选 1 : 3-1 : 5) 令人惊奇地不显示预期的病毒滴度减少,尽管被稀释,但滴度仍然惊人地增加了平均 8-13 倍。与所述的分批法相比,尽管体积显著增加了

2-7 倍,优选 3-4 倍,但是仍然达到所述效果。这导致病毒产率大大改善。

[0052] 使用所述的对比方法,例如透析、浓缩补料、灌注和 / 或简单减少细胞数,均进行数次,不能达到或提高所述的产率(表 1)。

[0053] 表 1:已知方法与体积扩大补料分批法的比较,例如从 3.5 升反应器开始。作为例子,显示了使用等同的运行时间和等同的细胞数,利用贴壁 BK 细胞系进行 PPV0 增殖。培养条件在以上分批法的描述中提到,也应用于其它方法。对于透析,使用 20kD 分子量截断值的模块,预培养以灌注模式进行。所述透析以逆流法进行。显示了基于分批培养的相对值。

	分批	透析	补料分批 [使用浓缩培养基]	VEF 分批 [使用非浓缩培养基]
TCID ₅₀ [基于分批]	1	10	9	10
终体积 [基于分批]	1	1	1	4
生产力 [基于分批]	1	10	9	40

[0054] 在下游处理中还特别看到除病毒产率明显增加以外的阳性结果。特别明显的是较低的细胞污染,如每单位剂量的宿主细胞蛋白质、蛋白质和 DNA(在使用病毒样人治疗剂时特别重要) 和过滤后较少的产率损失。例如,在分批模式中,20 μ m 过滤平均达到大约 0.6-1logTCID₅₀ 的损失。与之相比,在 VEF 分批中损失仅为 0.1-0.4log TCID₅₀。

[0055] 体积扩大同样有利地影响上述放大的技术障碍。对于例如通过低剪切和防泡沫膜充气法的氧气供应,稀释引起的连续体积扩大能够使规模明显增大(反应器的物理参数所致),因为由于稀释和病毒裂解引起细胞数减少,必须向系统中导入较少的氧气。为了更好地理解,图 1 举例说明了生产相关规模的方法。示出的步骤,特别是关于将 BK 细胞转移至下一发酵规模时直接迁移的频率和效率,在实验中得到证实。未发现对生产力的影响。

[0056] 该实施例开始于 10 升反应器的接种。如以上对于分批模式所述控制其过程。在达到汇合时,以与 10 升规模相同或相当的相对于培养基的比例,用新鲜微载体直接 1 : 5 稀释为 50 升的规模。在再次达到汇合时,使用相同的方法接种 200 升反应器。短暂的沉淀(进行或不进行内部搅拌)是有利的。

[0057] 如果在生长阶段使用含血清的 / 含蛋白质培养基,则用无血清和无蛋白质的培养基进行洗涤步骤,以减少添加物的浓度。如分批法一样,用所述的 MOI 进行感染。

[0058] 然后在感染后 10-36 小时开始 VEF 分批。包括用新鲜培养基可靠充分地稀释悬浮液,这可以在相同反应器中或者在较大的反应器中进行。这只需要极少的努力。以足够的时间间隔逐步地和 / 或连续地使 200 升病毒 - 细胞悬浮液增加到例如 400 升,然后 600 升,最后 800 升。令人惊奇的是,这不导致病毒生产力的降低,如以上所述和表 1 所示。

[0059] 在含血清、含蛋白质和合成培养基中培养的细胞之间未发现差异。对于适合无血清和合成条件的牛肾细胞系的实施例,从载体到载体的迁移、细胞数 and 生产力方面均未发现差异。这意味着该方法可以用于含血清、含蛋白质和合成培养基。

[0060] 表 2:在含血清、无血清和合成条件的 BK 细胞系通过各种方法进行 PPV0 病毒增殖

的 TCID₅₀ 的示例性比较,基于标准化的滴度(这里是基于含血清的条件)

	含血清	含蛋白质	合成
滚瓶	1	0.9	1
分批培养	1	1.1	1
VEF分批	1	0.9	1.1

[0061] 本发明所述的体积扩大补料分批法相对于建立的且已知的方法的优点总结如下:
(1) 它是安全、可靠、有效的病毒增殖方法。(2) 达到较高的病毒产率。(3) 不需要增加复杂的装置。(3) 过程控制比较简单。(4) 监控该过程所需的人数较少。(5) 产物质量改善,特别是对于下游处理而言。(6) 可以使用较大的发酵罐。(7) 该方法易于放大。(8) 该方法可适应各种含血清、无血清、含蛋白质和合成培养基。

[0062] 实施例 3

[0063] 使用含蛋白质培养基,利用微载体细胞培养,以分批模式在 10 升搅拌罐中增殖 PPV0

[0064] 从细胞库开始,首先在 T 形瓶中,然后在滚瓶中,培养适合无血清但是含蛋白质条件的牛肾细胞系。在 37℃ 和 pH7.2±0.2 下在 CO₂ 培养箱中进行培养。通过胰蛋白酶消化收获细胞材料。

[0065] 按照厂商说明制备的 Cytodex 3 微载体 (Amersham, Sweden) 的浓度为 3g/l。以 2×10⁵ 细胞 /ml 的细胞数在 10 升体积中进行接种。在细胞培养阶段,在葡萄糖浓度 c < 0.5g/l 时通过沉淀更换培养基。借助于锚式搅拌器以 30rpm 搅拌反应器。将 pO₂ 调节为 40% ±10%。pH 为 7.2±0.2。

[0066] 10 天后,细胞数达到 3.1×10⁶ 细胞 /ml,细胞处于稳定生长期。用不含添加物的培养基洗涤 3 次后,用 PPV0(MOI = 0.01) 感染终体积。

[0067] 在随后的病毒增殖过程中不进行操作。8 天后,达到 90% 的 CPE。经沉淀及 20 μm 过滤终止发酵。表 3 显示收获时和收获后的 TCID₅₀。

[0068] 表 3:举例说明的分批发酵的 TCID₅₀

	收获前	收获后	体积
log ₁₀ (TCID ₅₀)	6.7±0.3	6.0±0.3	约 10 升
[log ₁₀ (l/ml)]			

[0069] 实施例 4

[0070] 使用含蛋白质培养基,在体积扩大补料分批(转移到 15 升反应器)中利用微载体细胞培养,在 3.5 升搅拌罐中增殖 PPV0

[0071] 从细胞库开始,首先在 T 形瓶中,然后在滚瓶中,培养适合无血清但是含蛋白质条件的牛肾细胞系。在 37℃ 和 pH7.2±0.2 下在 CO₂ 培养箱中进行培养。通过胰蛋白酶消化收获细胞材料。

[0072] 按照厂商说明制备的 Cytodex 3 微载体 (Amersham, Sweden) 的浓度为 5g/l。以 3×10⁵ 细胞 /ml 的细胞数在 3.5 升体积中进行接种。在细胞培养阶段,在葡萄糖浓度 c

< 0.5g/l 时通过沉淀更换培养基。借助于锚式搅拌器以 45rpm 搅拌反应器。将 pO_2 调节为 40% +/-10%。pH 为 7.2 +/-0.2。

[0073] 10 天后,细胞数达到 7.1×10^6 细胞 /ml,细胞处于稳定生长期。用不含添加物的培养基洗涤 3 次后,在 $n = 14\text{rpm}$ 下用 PPVO(MOI = 0.01) 感染 1.7 升体积 2 小时,然后增加到 3.5 升,将搅拌转数增加到 $n = 45\text{rpm}$ 。

[0074] 感染后 16 小时,将全部培养物转移到 15 升反应器中,加入 7 升 (1 : 2 稀释)。在 15 升反应器中调节相同的参数。

[0075] 感染后 46 小时,将培养物稀释为 10.5 升 (1 : 3 稀释,基于 3.5 升)。基于 3.5 升反应器中的细胞数并考虑稀释因素,CPE 约为 30%。

[0076] 感染后 70 小时,体积增加到 12.5 升,最后,在感染后 94 小时,体积增加到 13.8 升 (1 : 3.9 稀释)。

[0077] 感染后 7 天 (最后一次稀释后 2.5 天),通过沉淀及随后 $20 \mu\text{m}$ 过滤培养物,终止发酵 (CPE = 93%)。

[0078] 表 4 显示收获时和收获后的 TCID_{50}

[0079] 表 4 :本发明的 VEF 分批中的 TCID_{50}

	收获前	收获后	体积
$\log_{10}(\text{TCID}_{50})$	7.7 +/-0.3	7.6 +/-0.3	14 升
$[\log_{10}(\text{l/ml})]$			

[0080] 实施例 5

[0081] 使用无蛋白质无血清培养基,在体积扩大补料分批 (转移到 15 升反应器) 中利用微载体细胞培养,在 3.5 升搅拌罐中增殖 PPVO

[0082] 从细胞库开始,首先在 T 形瓶中,然后在滚瓶中,培养适合合成条件的牛肾细胞系。在 37°C 和 pH7.2 +/-0.2 下在 CO_2 培养箱中进行培养。通过胰蛋白酶消化收获细胞材料。

[0083] 按照厂商说明制备的 Cytodex 3 微载体 (Amersham, Swede) 的浓度为 5g/l。以 3.8×10^5 细胞 /ml 的细胞数在 3.5 升体积中进行接种。在细胞培养阶段,在葡萄糖浓度 $c < 0.5\text{g/l}$ 时通过沉淀更换培养基。借助于锚式搅拌器以 45rpm 搅拌反应器。将 pO_2 调节为 40% +/-10%。pH 为 7.2 +/-0.2。

[0084] 13 天后,细胞数达到 5.6×10^6 细胞 /ml,细胞处于稳定生长期。用相同培养基洗涤 3 次后,用 PPVO(MOI = 0.01) 感染 3.5 升体积, $n = 40\text{rpm}$ 。

[0085] 感染后 20 小时,将全部培养物转移到 15 升反应器中,加入 7 升 (1 : 2 稀释)。在 15 升反应器中调节为相同的参数。

[0086] 感染后 49 小时,将培养物稀释为 11 升 (1 : 3 稀释,基于 3.5 升)。基于 3.5 升反应器中的细胞数并考虑稀释因素,CPE 约为 30%。

[0087] 感染后 69 小时,体积增加到 12.5 升,最后,在感染后 86 小时,体积增加到 13.5 升 (1 : 3.9 稀释)。

[0088] 感染后 7 天,通过沉淀及随后 $20 \mu\text{m}$ 过滤培养物,终止发酵 (CPE = 93%)。

[0089] 表 5 显示收获时和收获后的 TCID_{50}

[0090] 表 5 :如该实施例所述,在 VEF 分批发酵中使用合成细胞系获得的 TCID₅₀

	收获前	收获后	体积
log ₁₀ (TCID ₅₀)	7.8+/-0.3	7.4+/-0.3	约 14 升
TCID ₅₀ [l/ml]			

[0091] 实施例 6

[0092] 为了获得高度纯化的病毒制品,使用不含微载体的病毒收获物。例如,如实施例 1 至 5 所述进行病毒增殖。首先,用病毒收获物进行温和的微过滤。为此,例如,可以使用来自 Sartorius(Germany) 的柱套(cartridge holder)和来自 Sartorius(Germany) 的膜柱(membranecartridge)。或者,也可以使用来自 Minntech(USA) 或 Pall(USA) 的中空纤维模块。更倾向于使用孔径为 0.1 μm 的微过滤膜或中空纤维。利用微过滤阶段将体积减少 5-20 倍,调节 pH(优选 pH7.5-9.0),并稀释发酵的低分子量辅助成分(coingredient)。使用用于病毒灭活的 3-20mM 的乙撑亚胺浓度,在 pH8.6 下用乙撑亚胺化学灭活这样获得的病毒浓缩物。所述灭活分两个阶段进行。反应混合物首先在 pH 控制下 37℃温育 3-6 小时,然后在另一反应容器中于 37℃过夜完成病毒灭活。加入 1.5-3.0 摩尔过量的硫代硫酸钠中和被灭活的病毒悬浮液。中和后以 4000-8000g 低转数离心 2-4 小时。这第一个纯化步骤用来从被中和的灭活溶液中分离出病毒颗粒。这第一个纯化阶段后,灭活的病毒颗粒可以贮存在 2-8℃或 -65℃以下,直到进一步处理。例如,可以使用 20%蔗糖垫通过低转数离心进行第二个纯化阶段。但是,也可以使用来自 Sartorius(Germany) 或 Pall(USA) 的膜吸附器。第二离心阶段以 4000-8000g 进行过夜。利用不对称流动场流动分离法(AF4 分析)和折射法以及定量电子显微镜法分析纯化过程。表 6 和表 7 显示典型的产率分布。

[0093] 表 6 :利用不对称流动场流动分离法(AF4 分析)和折射法对上述纯化过程的分析

实验号	处理阶段	样品	总颗粒	累积产率[%]
508623	3.0/0.8 μm	初始物	5.9×10^{13}	100
	颗粒过滤	过滤物	2.5×10^{13}	42
	离心阶段	初始物	2.5×10^{13}	
	1	沉淀物	5.5×10^{12}	9
	离心阶段	初始物	5.5×10^{12}	
	2	沉淀物	3.6×10^{12}	6
508624	3.0/0.8 μm	初始物	6.6×10^{13}	100
	颗粒过滤	过滤物	2.3×10^{13}	35
	离心阶段	补料	2.3×10^{13}	
	1	沉淀物	5.9×10^{12}	9
	离心阶段	补料	5.9×10^{12}	
	2	沉淀物	3.6×10^{12}	5
508627	3.0/0.8 μm	初始物	3.6×10^{13}	100
	颗粒过滤	过滤物	1.5×10^{13}	43
	离心阶段	补料	1.5×10^{13}	
	1	沉淀物	3.1×10^{12}	8
	离心阶段	补料	3.1×10^{12}	
	2	沉淀物	2.0×10^{12}	5
			平均产率	5

[0094] 表 7 :利用定量电子显微镜法对上述纯化过程的分析

实验号	处理阶段	样品	总颗粒	累积产率[%]
508623	3.0/0.8 μm	初始物	1.5×10^{13}	100
	颗粒过滤	过滤物	n.d.	-
	离心阶段	补料	n.d.	-
	1	沉淀物	4.4×10^{12}	30
	离心阶段	补料	4.5×10^{12}	-
	2	沉淀物	4.2×10^{12}	29
508624	3.0/0.8 μm	初始物	2.4×10^{13}	100
	颗粒过滤	过滤物	n.d.	-
	离心阶段	补料	n.d.	-
	1	沉淀物	4.6×10^{12}	19
	离心阶段	补料	4.6×10^{12}	-
	2	沉淀物	3.2×10^{12}	13
508627	3.0/0.8 μm	初始物	7.3×10^{12}	100
	颗粒过滤	过滤物	n.d.	-
	离心阶段	补料	n.d.	-
	1	沉淀物	2.3×10^{12}	31
	离心阶段	补料	2.3×10^{12}	-
	2	沉淀物	3.5×10^{12}	48
平均产率				13-48

[0095] 在选择的处理阶段的宿主细胞蛋白质含量用比宿主细胞蛋白质试验来测定,并用于确定稀释倍数。典型的稀释结果在表 8 中示出。

[0096] 表 8 :病毒纯化过程中宿主细胞蛋白质的稀释度

实验号	处理阶段	样品	HCP含量 [$\mu\text{g}/1 \times 10^{10}$ VP]	累积HCP 稀释度
508623	3.0/0.8 μm	过滤前	58	-
	颗粒过滤	过滤后	n.d.	-
	离心阶段	补料	n.d.	-
	1	沉淀物	3.5	17
	离心阶段	补料	3.5	-
	2	沉淀物	3	19
508624	3.0/0.8 μm	过滤前	80	-
	颗粒过滤	过滤后	n.d.	-
	离心阶段	补料	n.d.	-
	1	沉淀物	4.8	17
	离心阶段	补料	4.8	-
	2	沉淀物	5	16
508627	3.0/0.8 μm	过滤前	187	-
	颗粒过滤	过滤后	n.d.	-
	离心阶段	补料	n.d.	-
	1	沉淀物	14	13
	离心阶段	补料	14	-
	2	沉淀物	14	13
			平均稀释度	13-19

[0097] 用常规标准方法检查微生物的纯度。表明上述纯化过程可以在无菌条件下进行。

[0098] 表 9 :微生物纯度的评价

实验号	处理阶段	样品	生物负担 [计数/ml]
508623	3.0/0.8 μm	初始物	0/0
	颗粒过滤	过滤物	0/0
	离心阶段	补料	-
	1	沉淀物	0/0
	离心阶段	补料	-
	2	沉淀物	0/0
508624 (02KUR02)	3.0/0.8 μm	初始物	0/0
	颗粒过滤	过滤物	0/0
	离心阶段	补料	-
	1	沉淀物	0/0
	离心阶段	补料	0/0
	2	沉淀物	0/0
508627 (02KUR05)	3.0/0.8 μm	初始物	0/0
	颗粒过滤	过滤物	0/0
	离心阶段	补料	-
	1	沉淀物	1/0
	离心阶段	补料	-
	2	沉淀物	0/0

[0099] 第二个纯化阶段后,利用微过滤配制高纯度的病毒制品。该配制阶段可以使用来自 Sartorius(Germany) 或 Pall(USA) 的膜和来自 Minntech(USA) 或 Amersham Biosciences(USA) 的中空纤维。优选的孔径是 0.1 μm 。该配制阶段的目的包括调节病毒悬浮液的 pH、摩尔渗透压浓度和颗粒含量。在加入合适的稳定剂(1-5%聚明胶肽)后,以这种方式产生的病毒制品可以冻干后长期保存。在作为药物使用前,冻干物必须根据初始体积与不含热原的无菌 WFI(注射用水)混合。利用上述程序制备的病毒组合物适合非肠

胃应用。

[0100] 表 10 总结了配制的病毒制品在冷冻干燥前特征测定的典型结果。

[0101] 表 10 :配制的病毒悬浮液在冷冻干燥前的分析

参数	508623	508624	508627
颗粒含量AF4/RI [VP/ml]	1.8×10^{10}	2.0×10^{10}	1.0×10^{10}
利用定量电子显微镜法测定的颗粒含量[VP/ml]	4.15×10^{10}	3.58×10^{10}	2.5×10^{10}
生物活性（转基因HBV小鼠）	对应于		
生物负担[计数/ml]	0	0	0
内毒素含量[EU/ml]*	6	6	2.4
宿主细胞蛋白质含量[μg/ml]	4.7-6.4	8.6-9.3	9.9-13.3
核酸含量[ng/ml]	3.7	2.9	1.6

[0102] * :所使用的病毒稳定剂已具有 2-8EU/ml 的平均内毒素含量。

[0103] 专利：

[0104] US 6, 455, 298

[0105] US 6, 656, 720

[0106] US 5, 994, 134

[0107] US 5, 719, 051

[0108] US 6, 194, 210

[0109] US 6, 726, 907

[0110] WO 95/24468

[0111] 参考文献：

[0112] AMERSHAM, " Microcarrier Cell Culture-Principals and Methods" ,Manual Amersham Pharmacia, Sweden, 2001

[0113] B. BAIJOT, M. DUCHENE, J. STEPHENNE, " Production of Aujeszky Vaccine by the Microcarrier Technology" , Devel. Biol. Standard, 66, 523-530, 1987

[0114] M. P. D. Ü RRSCHMID, K. LANDAUER, G. SIMIC, H. KLUG, T. KEIJZER, F. TRAMPLER, A. OUDSHOORN, M. GR. Ö SCHL, D. M. Ü LLER, O. DOLBHOFF-DIER, " Comparison of Fluidized Bed and Ultrasonic Cell Retention Systems for High Cell Density Mammalian Cell Culture" , Biotechnol. Prog. , 19, 1045-1048, 2003

[0115] M. P. D. Ü RRSCHMID, K. LANDAUER, G. SIMIC, G. BL. Ü ML, O. DOLBHOFF-DIER, " Scaleable Inoculation Strategies for Microcarrier Based Animal Cell Bioprocesses" , Biotechnol. And Bioeng. , 83, No. 6, 2003

[0116] M. W. GLACKEN, R. J. FLEISCHAKER, A. J. SINSKEY, " Large Scale Production of

Mammalian Cells and Their Products", in Annals New York Academy of Sciences, 355-372, 1989

[0117] J. B. GRIFFITHS, D. R. CAMERON, D. LOBBY, " A Comparison of Unit Process Systems for Anchorage Dependent Cells", Devel. Biol. Standard, 66, 331-338, 1994

[0118] E. LINDNER, A. -C. ARVIDSSON, I. WERGELAND, D. BILLIG, " Subpassaging Cells on Microcarriers", Devel. Biol. Standard, 66, 299-305, 1987

[0119] MERTEN, O. W., KIERULFF J. V., CASTINGOLLES, N., PERRIN, P, " Evaluation of the new serum free medium (MSDSS2) for the production of different biologicals: Use of various cell lines", Cytotechnol. 14, 47-59, 1994

[0120] B. J. MONTAGNON, B. FANGET, J. C : VINCENT-FALQUET, " Industrial Scale Production of Inactivated Poliovirus Vaccine Prepared by Culture of Vero Cells on Microcarrier", Rev. Of Inf. Diseases, 6, Supplement 2, 1984

[0121] B. J. MONTAGNON, J. C : VINCENT-FALQUET, B. FANGET, " Thousand Litre Scale Microcarrier Culture of Vero Cells for Killed Polio Viruses Vaccine", Devel. Biol. Standard, 55, 37-42, 1984

[0122] M. REITER, F. WEIGANG, W. ERNST, " High Density Microcarrier Culture with a New Device which Allows Oxygenation and Perfusion of Microcarrier Cultures", Cytotechnology, 3, 39-42, 1990

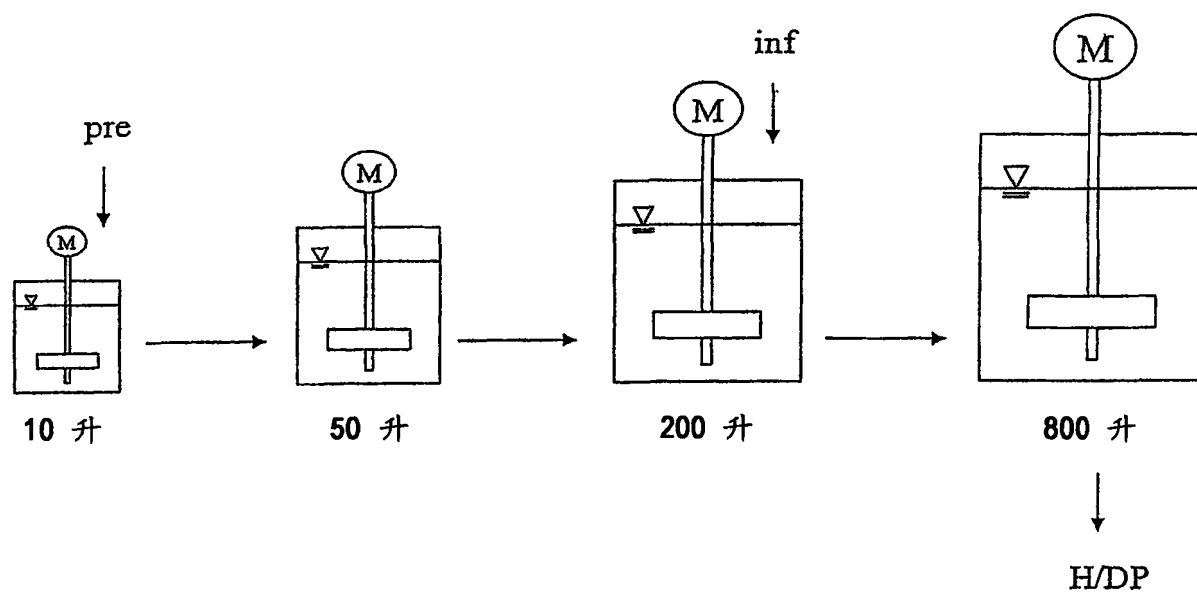


图 1