



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106367397 B

(45) 授权公告日 2021.07.20

(21) 申请号 201610566601.8

(22) 申请日 2016.07.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106367397 A

(43) 申请公布日 2017.02.01

(30) 优先权数据

62/195,936 2015.07.23 US

(73) 专利权人 基立福有限公司

地址 西班牙巴塞罗纳

(72) 发明人 布雷特·布诺 特里·乔尼根

约安·霍塔 迈克尔·伯迪克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

(56) 对比文件

WO 2007046962 A2, 2007.04.26

CN 103328004 A, 2013.09.25

Howard E. Davis et al.. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes.《Biophysical Chemistry》.2002,全文.

Nicole B. Glennon et al.. Transcriptome Profiling of the Virus-Induced Innate Immune Response in Pteropus vampyrus and Its Attenuation by Nipah Virus Interferon Antagonist Functions.《Journal of Virology》.2015,全文.

审查员 赵鹏

权利要求书2页 说明书10页

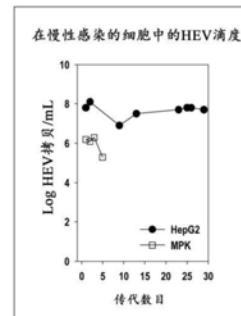
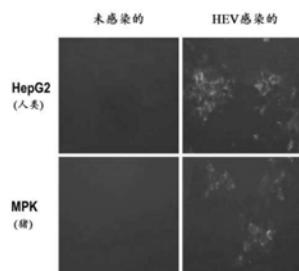
序列表2页 附图9页

(54) 发明名称

用于产生高滴度戊型肝炎病毒贮备物的方法及用于戊型肝炎病毒的滴定测定

(57) 摘要

本文提供了聚凝胺作为细胞培养基中的添加剂在用于产生高滴度戊型肝炎病毒贮备物的方法和用于滴定戊型肝炎病毒的测定中使用的用途。还提供了一种用于高滴度HEV产生的包含聚凝胺的细胞培养基、一种用于确定样品中HEV的存在和/或水平的方法、以及一种使用聚凝胺的HEV滴定测定。



1. 一种产生高滴度的戊型肝炎病毒 (HEV) 的方法,所述方法包括:
 - a) 在包含 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ - $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度的聚凝胺的培养基中体外培养细胞系,其中所述细胞系是以ATCC号HB-8065保藏的HepG2或以ATCC号CRL-10741保藏的HepG2/C3A,以及
 - b) 用戊型肝炎病毒感染所述细胞系。
 2. 根据权利要求1所述的方法,其中所产生的戊型肝炎病毒的高滴度为 10^8 拷贝/ mL - 10^{10} 拷贝/ mL 。
 3. 根据权利要求1所述的方法,其中所产生的戊型肝炎病毒的高滴度为 10^7 拷贝/ mL - 10^{10} 拷贝/ mL 。
 4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括以下步骤:
在包含 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ - $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度的聚凝胺的培养基中对步骤b) 的戊型肝炎病毒感染的细胞系传代。
 5. 根据权利要求4所述的方法,其中在所述培养基和/或感染的细胞中获得的戊型肝炎病毒的高滴度为 10^8 拷贝/ mL - 10^{10} 拷贝/ mL 。
 6. 根据权利要求4所述的方法,其中在所述培养基和/或感染的细胞中获得的戊型肝炎病毒的高滴度为 10^7 拷贝/ mL - 10^{10} 拷贝/ mL 。
 7. 包含细胞系和培养基的混合物在制备用于确定样品中戊型肝炎病毒的存在和/或水平的试剂中的用途,其中所述细胞系是以ATCC号HB-8065保藏的HepG2或以ATCC号CRL-10741保藏的HepG2/C3A,并且其中所述培养基包含 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ - $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度的聚凝胺,当所述试剂被使用时包括以下步骤:
 - a) 向所述混合物提供所述样品;
 - b) 孵育来自步骤a) 的包含所述样品的混合物,以允许戊型肝炎病毒的繁殖,如果戊型肝炎病毒存在于所述样品中;
 - c) 收集步骤b) 的部分,所述部分包含戊型肝炎病毒,如果戊型肝炎病毒存在并在步骤b) 期间被繁殖;以及
 - d) 测量所收集的部分中与戊型肝炎病毒相关的生物物质的存在和/或水平。
 8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述生物物质包括戊型肝炎病毒的多核苷酸和/或多肽序列。
 9. 根据权利要求7所述的用途,其中测量生物物质的存在和/或水平包括以下步骤:
 - a) 通过将所收集的部分与第一溶液混合来提供第一反应混合物,以便使戊型肝炎病毒的多核苷酸暴露,如果戊型肝炎病毒存在于所收集的部分中,其中所述多核苷酸是戊型肝炎病毒的RNA;
 - b) 通过将第一试剂添加至所述第一反应混合物来提供第二反应混合物,以便产生与所述戊型肝炎病毒的RNA至少部分互补的互补脱氧核糖核酸(cDNA);
 - c) 通过将第二试剂添加至所述第二反应混合物来提供第三反应混合物,所述第二试剂包含多核苷酸对以扩增与所述多核苷酸对中的每一个至少部分互补的互补脱氧核糖核酸的序列;
 - d) 通过扩增所述序列来提供第四反应混合物;以及
 - e) 确定所述第四反应混合物中所扩增的序列的浓度。
 10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述确定浓度包括:

- a) 提供所述第四反应混合物；
- b) 提供包含预定量的戊型肝炎病毒的互补脱氧核糖核酸的一个或更多个对照；
- c) 将试剂添加至所述第四反应混合物和所述一个或更多个对照，其中所述试剂对所述第四反应混合物中的扩增的序列和所述一个或更多个对照中的预定量的戊型肝炎病毒的互补脱氧核糖核酸至少部分地特异；以及
- d) 计算相对于所述一个或更多个对照所述第四反应混合物中由所述试剂识别的戊型肝炎病毒的水平。

11. 根据权利要求9所述的用途，其中所述多核苷酸对由以下组成：

- a) 5' -CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO:1)
- b) 5' -CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:2)。

12. 根据权利要求10所述的用途，其中所述试剂包括：

- 5' -FAM-TTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO:3)。

13. 一种非诊断目的的戊型肝炎病毒滴定测定方法，包括使用包含在1 μ g/ml-5 μ g/ml的范围内的聚凝胺的培养基和细胞系，其中所述细胞系是以ATCC号HB-8065保藏的HepG2或以ATCC号CRL-10741保藏的HepG2/C3A。

用于产生高滴度戊型肝炎病毒贮备物的方法及用于戊型肝炎 病毒的滴定测定

[0001] 描述

[0002] 优先权和相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2015年7月23日提交的美国临时申请62/195,936的优先权的权益，其在此通过引用以其整体被明确并入。

[0004] 序列表的引用

[0005] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表作为题为DURC6_006AUS_SEQLIST.txt的文件被提供，该序列表大小为1,093字节，创建日期为2016年5月31日且最后修改日期为2016年5月31日。该电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入本文。

[0006] 背景

[0007] 领域

[0008] 本发明涉及病毒学领域，更确切地涉及用于产生戊型肝炎病毒（下文称为HEV）贮备物的方法。具体地，本发明公开了用于繁殖和滴定高滴度HEV贮备物的方法。

[0009] 相关技术描述

[0010] HEV（戊型肝炎病毒属（Hepevirus），肝炎病毒科（Hepeviridae））是具有约7.2kb的单链正义的、聚腺苷酸化RNA基因组的小的无包膜病毒/假包膜病毒（pseudo-enveloped virus）。存在已被鉴定的HEV的四种基因型，但仅存在一种血清型。基因型1和2是不发达国家水源性感染的主要原因，并主要在人和高等灵长类中引起疾病。感染通常是自消退（self-resolving）的且急性的，持续至多2至7周，但特别是在孕妇中可能是致命的。基因型3和4与工业化国家的地方性（本土）感染相关。这两种基因型主要在猪中引起疾病，但人类可由于食物或动物传染病暴露成为偶然的宿主。临床疾病在青年人中通常是无症状且温和的，但在老年人中可变成临幊上明显的。另外，基因型3和4感染在免疫抑制者，诸如器官移植患者或AIDS患者中可变成慢性病。

[0011] 最近，戊型肝炎已被归类为输血可传播的传染病。鉴于近年来HEV的全世界传播，关于血液来源的产品和血浆来源的产品的安全性的关注已被提高。血液来源的产品和血浆来源的产品的病毒安全性谱可通过进行证明它们的制造过程的病毒减少和/或清除能力的清除研究来保证。在这些清除研究期间，已知量的病毒被有意地掺入血液或血浆产品的中间体中，并然后被掺入的材料使用实验室规模模式的制造过程来处理。跨步骤的病毒减少和/或清除通过比较处理之前和之后的病毒的量来确定。

[0012] 病毒清除研究要求大量的高滴度病毒，且用于HEV的有效细胞培养系统的缺乏已经阻碍了进行对于HEV的此类研究的能力。最近已开发了数种HEV细胞培养系统来解决这个问题。

[0013] 基因型3和基因型4毒株被Okamoto和同事调适为在A549人类肺细胞中生长，达到 3.9×10^8 拷贝/mL的HEV RNA滴度。另外，所述基因型4毒株还被培养在PLC/PRF/5细胞（人肝癌细胞）中但具有较低的滴度。

[0014] 第二种基因型3（毒株Kernow-C1）被Emerson和同事调适为在HepG2/C3A人肝癌细

胞中生长,在6次传代之后获得 4.61×10^8 基因组/mL的滴度。研究显示,用于体外生长的调适导致之后获得S17人类核糖体蛋白基因的174个核苷酸。由于具有相同插入的基因组在原始病毒接种物(来自HIV-1慢性感染的患者的粪便悬液)中被检测到,因此重组/插入事件已自然发生而不是细胞培养的人为现象。虽然使所述毒株在PLC/PRF/5和A549细胞中生长的尝试是不成功的,或导致较低的滴度,但该病毒在来自猪,基因型3病毒的主要动物传染病宿主的肾细胞中感染并复制。

[0015] 人类肝癌细胞难以培养,并且可能要求特殊的细胞铺板方法,该特殊的细胞铺板方法包括使用涂层诸如胶原、纤连蛋白、明胶和/或聚L-赖氨酸以促进细胞附着和/或细胞生长。另外,并非所有这些涂层对于所有的细胞类型良好地工作。

[0016] 概述

[0017] 在一些实施方案中,提供了一种产生高滴度的戊型肝炎病毒的方法,所述方法包括:在包含一种浓度的聚凝胺的培养基中体外培养细胞系,以及用HEV感染该细胞系。在该方法的一些实施方案中,使用的细胞系是HepG2 (ATCC号HB-8065) 或HepG2/C3A (ATCC号CRL-10741)。在该方法的一些实施方案中,聚凝胺的浓度为约1 μ g/ml-约5 μ g/ml。在该方法的一些实施方案中,高滴度为约 10^8 拷贝/mL-约 10^{10} 拷贝/mL。在该方法的一些实施方案中,高滴度为约 10^7 拷贝/mL-约 10^{10} 拷贝/mL。在一些实施方案中,该方法还包括以下的步骤:将一种浓度的聚凝胺添加至培养基;在包含聚凝胺的培养基中对HEV感染的细胞系传代;以及收集培养基和/或感染的细胞。在该方法的一些实施方案中,聚凝胺的浓度为约1 μ g/ml-约5 μ g/ml。在该方法的一些实施方案中,在培养基和/或感染的细胞中获得的HEV的高滴度为约 10^8 拷贝/mL-约 10^{10} 拷贝/mL。在该方法的一些实施方案中,在培养基和/或感染的细胞中获得的HEV的高滴度为约 10^7 拷贝/mL-约 10^{10} 拷贝/mL。

[0018] 在一些实施方案中,提供了一种确定样品中HEV的存在和/或水平的方法,所述方法包括以下的步骤:向包含细胞系和培养基的混合物提供样品,其中所述培养基包含聚凝胺;孵育来自先前步骤的包含样品的混合物,以允许HEV的繁殖,如果HEV存在于样品中的话;收集先前步骤的部分,所述部分包含HEV,如果HEV存在并在先前步骤期间繁殖的话;以及测量所收集的部分中与HEV相关的生物物质的存在和/或水平。在该方法的一些实施方案中,细胞系选自由HepG2 (ATCC号HB-8065) 和HepG2/C3A (ATCC号CRL-10741) 的细胞系组成的组。在该方法的一些实施方案中,所述生物物质包括HEV的多核苷酸和/或多肽序列。在该方法的一些实施方案中,所述测量包括以下的步骤:通过将所收集的部分与第一溶液混合来提供第一反应混合物,以便使HEV的多核苷酸暴露,如果HEV存在于所收集的部分中的话,其中所述多核苷酸是HEV的RNA;通过将第一试剂添加至所述第一反应混合物来提供第二反应混合物,以便产生与所述HEV的RNA至少部分互补的互补脱氧核糖核酸(cDNA);通过将第二试剂添加至所述第二反应混合物来提供第三反应混合物,所述第二试剂包含多核苷酸对,以扩增与所述多核苷酸对中的每一个至少部分互补的cDNA的序列;通过扩增所述序列来提供第四反应混合物;以及确定所述第四反应混合物中扩增的序列的浓度。在该方法的一些实施方案中,所述确定浓度包括:提供第四反应混合物;提供包含预定量的HEV的cDNA的一个或更多个对照;将试剂添加至所述第四反应混合物和所述一个或更多个对照,其中所述试剂对所述第四反应混合物中的扩增的序列和所述一个或更多个对照中的预定量的HEV的cDNA至少部分地特异;以及计算相对于所述一个或更多个对照所述第四反应混合物中由所

述试剂识别的HEV的水平。在该方法的一些实施方案中，所述多核苷酸对包含：

[0019] a) 5' -CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO:1)

[0020] b) 5' -CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:2)。

[0021] 在该方法的一些实施方案中，试剂包括：

[0022] 5' -FAM-TTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO:3)。

[0023] 在一些实施方案中，提供了一种用于产生高滴度HEV的培养基，所述培养基包含在约1 μ g/ml-约5 μ g/ml的范围内的聚凝胺。在一些实施方案中，高滴度HEV为约10⁸拷贝/mL-约10¹⁰拷贝/mL。在一些实施方案中，高滴度HEV为约10⁷拷贝/mL-约10¹⁰拷贝/mL。

[0024] 在一些实施方案中，提供了包括使用聚凝胺的HEV滴定测定。在该测定的一些实施方案中，所使用的聚凝胺的浓度在约1 μ g/ml-约5 μ g/ml的范围内。

[0025] 附图简述

[0026] 图1A-图1C示出了根据本文公开内容的一些实施方案，用不同的细胞培养基培养1天的HepG2/C3A细胞的以20x放大率拍摄的图像。

[0027] 图1A示出了用DMEM+10%FBS+非必需氨基酸、两性霉素B、HEPES、庆大霉素(NHG)培养的HepG2/C3A细胞。

[0028] 图1B示出了用DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐培养的HepG2/C3A细胞。

[0029] 图1C示出了用DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐+聚凝胺培养的HepG2/C3A细胞。

[0030] 图2A-图2C示出了培养3天的HepG2/C3A细胞的以10x放大率(左)或20x放大率(右)拍摄的图像。

[0031] 图2A示出了用DMEM+10%FBS+NHG培养的HepG2/C3A细胞。

[0032] 图2B示出了用DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐培养的HepG2/C3A细胞。

[0033] 图2C示出了用DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐+聚凝胺培养的HepG2/C3A细胞。

[0034] 图3示出了根据本文公开内容的一些实施方案，对通过HEV PCR测定评估的慢性感染的HepG2(人类)细胞与MPK(猪)细胞中的HEV RNA滴度的比较。由于MPK细胞对铺板表面的附着是非常有效的，聚凝胺未被用于MPK细胞。

[0035] 图4示出了根据本文公开内容的一些实施方案的用于HEV PCR测定使用的引物和探针的核苷酸序列以及它们在HEV基因组上的位置。

[0036] 图5示出了根据本文公开内容的一些实施方案的用于HEV PCR测定的标准曲线。

[0037] 详述

[0038] 本发明涉及用于产生适合于在病毒清除研究中使用的戊型肝炎病毒(HEV)的高滴度贮备物的方法，以及用于确定感染性HEV滴度的方法。本发明包括一种用于在评价血液来源的产品和血浆来源的产品的制造过程的HEV清除能力的研究中使用的在细胞培养物中繁殖高滴度HEV的简单方法。

[0039] 如先前讨论的，HEV已被Okamoto和同事使用PLC/PRF/5人肝癌细胞和A549人类肺细胞以及被Emerson和同事使用HepG2/C3A人肝癌细胞调适以在细胞培养物中生长。人肝癌细胞难以培养，并且可能需要特殊的细胞铺板方法。Emerson的实验室在接种细胞之前用鼠尾胶原I涂覆板，而Okamoto的实验室使用购自IWAKI的板，该板的一些是胶原涂覆的。表1比较了来自多种细胞培养系统的HEV滴度并列出了被不同实验室使用的增强细胞铺板方法。胶原和其他涂层，诸如纤连蛋白、明胶和聚-L-赖氨酸促进细胞附着和/或细胞生长，所以难

以培养的细胞可达到较高的密度，并且从而产生高滴度病毒。

[0040] 表1. 来自多种细胞培养系统的HEV滴度的比较

实验室	细胞铺板增强方法	细胞	HEV 毒株(基因型)	HEV 传代数目	Log10RNA 拷贝/mL	参考文献
[0041]	Okamoto	IWAKI 板	PLC/PRF/5 & A549	JE03-1760F (3) JE-JF5/15F (4)	45 25	8 - 9 9 - 10
	Emerson	鼠尾胶原 I 涂覆的板	HepG2/C 3A	Kernow-C1 第 6 代 (3)	6	8.7
	Grifols	培养基中的聚凝胺	HepG2/C 3A	Kernow-C1 第 6 代 (3)	12 13 14 34 35 36	8.2 8.5 8.9 8.9 8.9 8.9

[0042] 在本发明的一些实施方案中，提供了一种针对HEV的培养方法，所述培养方法包括使用聚凝胺(还称为海地美溴铵(hexadimethrine bromide)和1,5-二甲基-1,5-二氮杂十一-亚甲基-聚甲氧溴化物(1,5-dimethyl-1,5-diazaundeca-methylene polymethobromide))，代替使用涂层诸如胶原或其他涂层来促进细胞附着和/或细胞生长。

[0043] 聚凝胺是通常在细胞培养中被用来通过减少病毒和细胞之间的电荷排斥增加逆转录病毒的感染效率的廉价阳离子聚合物。聚凝胺使不同的对象更近地靠在一起的能力在本发明中被用来促进人类肝癌细胞对铺板表面以及HEV对细胞的附着。聚凝胺被简单地添加至被用于细胞和病毒繁殖的细胞培养基。本发明避免了购买用胶原或其他涂层试剂预涂覆的昂贵的板或者在细胞接种及病毒感染之前用胶原或其他涂层试剂预涂覆板的需要。

[0044] HEV通常在体内复制至低滴度，所以在体外生长是困难的。用于培养HEV以产生适合于在病毒清除研究中使用的高滴度贮备物的方法在之前是不可得的。

[0045] 在本文公开的发明的一个方面，通过使用补充有聚凝胺的培养基，在细胞培养物中繁殖高滴度HEV是可能的。

[0046] 通过减少病毒和细胞之间的电荷排斥，聚凝胺是在细胞培养中用来增加逆转录病毒(包膜病毒)的感染效率的廉价阳离子聚合物。在本发明的一些实施方案中，将聚凝胺添加至细胞培养基以促进HEV(一种无包膜/假包膜病毒)对细胞的附着。另外，聚凝胺的存在改进细胞附着和增殖，从而增强HEV在被感染的细胞中的总体产生。

[0047] 因此，在第一实施方案中，本发明涉及一种基于向细胞培养基添加聚凝胺，在体外培养物中产生高滴度的HEV的方法。

[0048] HEV在细胞培养物中不产生致细胞病变效应(CPE)，所以HEV检测是基于PCR。因此，在一些实施方案中，通过本发明的PCR测定，检测低浓度的HEV是可能的。PCR测定可被用来开发，例如，精确的、准确的且可靠的对于HEV的感染性测定。

[0049] 最初由国立卫生研究院(National Institutes of Health)(NIH)开发的PCR测定被改良以增加灵敏度。改变了反向引物被并设计了全新的探针。使用本发明的PCR测定的方法始终正确地将样品评分为阳性的或阴性的，并且在滴度计算中是有用的。因此，在一个另外的实施方案中，本发明公开了基于PCR的HEV滴度测定，所述基于PCR的HEV滴度测定包括

使用聚凝胺或包含所述聚凝胺的培养基(优选地,细胞培养基)。

[0050] 在一个实施方案中,本发明涉及包括以下的方法:通过使用补充有聚凝胺的培养基,在细胞培养物中繁殖高滴度HEV;以及通过灵敏PCR测定检测HEV。

[0051] 该方法对HEV可以是特异性的,但用于病毒繁殖的方法可应用于其他无包膜病毒。例如,在一些实施方案中,本发明用从Emerson实验室获得的第6代HEV基因型3毒株Kernow-C1来测试。

[0052] 设想了,在一些实施方案中,在体外培养物,优选地在体外器官、组织或细胞培养物中进行以上提及的产生高滴度HEV的方法。在最优先的实施方案中,本发明的产生高滴度HEV的方法在体外细胞培养物中进行。

[0053] 原代培养细胞系和建立的培养细胞系两者可在本发明的方法中使用。所使用的培养细胞系可来源于任何生物体。例如,设想到昆虫细胞或哺乳动物细胞的使用。优选地,所使用的培养细胞系来源于猪(或小型猪)和人类。

[0054] 此外,优选地,所使用的细胞系来源于肝或肾。细胞系来源于其的所述肝或肾可以是健康的、或患病的,或者包括恶性或良性生长物。在最优先的实施方案中,使用了已建立的细胞系HepG2(ATCC号HB-8065)或HepG2/C3A(ATCC号CRL-10741)。

[0055] 在一些实施方案中,聚凝胺的浓度在约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内。在一些实施方案中,聚凝胺的浓度为约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在一个优选的实施方案中,聚凝胺的浓度为约4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0056] 在一些实施方案中,本发明的方法产生了在约10⁸拷贝/mL-约10¹⁰拷贝/mL的范围内的HEV滴度。在一些实施方案中,本发明的方法产生了在约10⁷拷贝/mL-约10¹⁰拷贝/mL的范围内的HEV滴度。在一个优选的实施方案中,本发明的方法产生了约10⁹拷贝/mL的HEV滴度。

[0057] 在一个另外的实施方案中,本发明涉及产生高滴度HEV的方法,所述方法包括以下的步骤:a)在包含聚凝胺的培养基中铺板细胞,以及b)用HEV感染体外培养物。在一些实施方案中,收集来自体外培养物的细胞培养基以获得高滴度HEV。

[0058] 在以上步骤b)之后,培养的细胞可通过本领域的现有技术中已知的任何方法(优选地,通过胰蛋白酶消化)来收集,且可测定等分试样的HEV的含量。所述HEV的含量优选地通过PCR,甚至更优选地用本发明的和如下描述的PCR测定来确定。参见图5。在替代性实施方案中,HEV的含量可通过基于免疫荧光(IF)的测定来确定。参见图5。

[0059] 此外,在所述步骤b)之后,培养的细胞可通过本领域的现有技术中已知的任何方法(优选地,通过胰蛋白酶消化)来获得,且HEV贮备物可通过本领域的现有技术中已知的任何方法来获得。在一个优选的实施方案中,HEV贮备物通过几次,优选地1次或2次冻融细胞来产生。产生的HEV贮备物优选地被储存在-65°C或更冷温度下。

[0060] 设想了,在一些实施方案中,以上描述的方法还包括以下的步骤:c)将聚凝胺添加至细胞培养基;以及d)进一步传代被HEV感染的细胞。

[0061] 可重复步骤c)和d),例如以增加产生HEV的细胞的数目,并使病毒在培养物中的传播和感染最大化。本领域技术人员可基于例如,细胞的外观及其生长曲线容易地确定步骤c)和d)可被重复的次数,这是被感染的细胞系可忍受的传代数目。

[0062] 在各次传代的步骤d)之后,培养的细胞可通过本领域的现有技术中已知的任何方

法(优选地,通过胰蛋白酶消化)来获得,且可测定等分试样的HEV的含量。所述HEV的含量优选地通过PCR,甚至更优选地用本发明的和如下描述的PCR测定来确定。参见图5。

[0063] 此外,在各次传代的所述步骤d)之后,培养的细胞可通过本领域的现有技术中已知的任何方法(优选地,通过胰蛋白酶消化)来获得,且HEV贮备物可通过本领域的现有技术中已知的任何方法来获得。在一个优选的实施方案中,HEV贮备物通过几次,优选地1次或2次冻融细胞来产生。产生的HEV贮备物优选地被储存在-65°C或更冷温度下。

[0064] 可选地,还可仅在已用感染的细胞系进行期望的或要求数目的传代之后(即,在步骤c)和d)已被重复期望的或要求的次数之后),收集培养基。

[0065] 如本领域技术人员已知的,传代被HEV感染的细胞的步骤d)意味着通过本领域的现有技术中已知的任何方法获得细胞。假使细胞生长为附着至表面(例如,来自瓶或板),可能需要通过本领域的现有技术中已知的任何方法,优选地通过胰蛋白酶消化使细胞脱离。当酶(例如,胰蛋白酶)被用来脱离细胞时,通常所述酶需要被灭活。通常,在本领域的现有技术中,所述灭活通过用富含蛋白的溶液,优选地用具有FBS的细胞培养基稀释来进行。

[0066] 鉴于聚凝胶和包含所述试剂的培养基(优选地,细胞培养基)允许HEV在体外培养物(优选地,体外细胞培养物)中的有效感染和产生的事实,它们还可用在HEV滴度测定中。

[0067] 因此,在一个另外的实施方案中,本发明公开了HEV滴度测定,所述HEV滴度的特征为它们包括聚凝胶或包含所述聚凝胶的培养基(优选地,细胞培养基)的使用。

[0068] 体外培养物优选地是体外器官、组织或细胞培养物。在最优选的实施方案中,体外培养物是体外细胞培养物。

[0069] 可使用原代培养细胞系和建立的培养细胞系两者。所使用的培养细胞系可来源于任何生物体。例如,设想了昆虫细胞或哺乳动物细胞的使用。优选地,所使用的培养细胞系来源于猪(或小型猪)和人类。

[0070] 此外,优选地,所使用的细胞系来源于肝或肾。细胞系来源于其的所述肝或肾可以是健康的、或患病的,或者包括恶性或良性生长物。在最优选的实施方案中,使用已建立的细胞系HepG2 (ATCC号HB-8065) 或HepG2/C3A (ATCC号CRL-10741)。

[0071] 优选地,本发明的HEV滴度测定是按本领域技术人员已知的来进行的50%组织培养感染剂量(50%Tissue Culture Infective Dose) (TCID₅₀) 测定,例外是病毒的存在通过阳性PCR信号而不通过病毒细胞病理学来指示。

[0072] 在所述滴定测定中,聚凝胶或包含所述聚凝胶的细胞培养基被用于细胞培养,HEV样品将在所述聚凝胶或包含所述聚凝胶的细胞培养基中被滴定。

[0073] 在另一个实施方案中,提供了一种用于检测HEV贮备物中的HEV的方法。

[0074] 所述检测可通过本领域的现有技术中已知的任何方法或手段(means)来进行。然而,在一个优选的实施方案中,检测通过PCR进行。

[0075] 在一个优选的实施方案中,用于检测HEV使用的PCR是实时逆转录酶PCR,其包括将病毒RNA逆转录为互补DNA(cDNA)的第一步,以及优选地使用双猝灭探针(double quenched probe)进行的实时PCR的第二步。

[0076] 在最优选的实施方案中,在第二步骤中,以下寡核苷酸被用作引物和探针(图4):

[0077] a) 正向引物:5' -CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID NO:1)

[0078] b) 反向引物:5' -CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO:2)

- [0079] c) 探针: 5' -FAM-TTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO:3)。
- [0080] 来自评估基于PCR的HEV感染性测定的性能的研究的数据被总结于表2中。
- [0081] 表2. 基于PCR的HEV感染性测定性能的评估

测定参数	方法描述	接受标准	结果
[0082]	精确度-再现性 在一天内通过一种分析物多次测量单个样品	CV ≤ 30%	高: 0% 中: 0.7% 低: 0% 通过
	精确度-中间产物 在数天内通过多种分析物多次测量单个样品	p-值>0.01 或平均滴度差异<0.5 log ₁₀	高: P 0.4 中: 平均滴度差异 p 0.4 低: P 0.6 通过
	准确度 测量结果与预期的滴度的接近度	CV ≤ 30% 标称(Nominal) 50-150%	CV: 2-17% 标称: 105-136% 通过
	线性度 测量测定结果与实际病毒浓度的关系	对于回归线的R ² >0.95	R ² = 0.99 通过

测定参数	方法描述	接受标准	结果
定量限值	以可接受的精确度&准确度检测到的病毒的最低浓度	具有 CV ≤ 30% 的最低浓度	10 ^{0.8} TCID ₅₀ /mL 通过
范围	以可接受的精确度、准确度&线性度检测病毒的区间	CV ≤ 30%	10 ^{0.8} 至 10 ^{6.4} TCID ₅₀ /mL 通过
检测限值 - 标准滴定	可检测到的病毒的最低浓度	具有 CV ≤ 50% 的最低浓度	10 ^{0.8} TCID ₅₀ /mL 通过
检测限值 - 大体积滴定	在 10 ^{6.6} 倍稀释之后, 滴定的 12.6 mL 的 10 ^{6.4} TCID ₅₀ /mL 贮备物	预期值: 0-2 阳性/252 孔	2 阳性/252 孔 = 10 ^{-0.5} TCID ₅₀ /mL NA

- [0084] 在一个优选的实施方案中, 在96孔板中滴定细胞, 且用磁性Bioclone珠或磁性Dynabeads来提取HEV RNA, 更优选地使用Dynabeads。
- [0085] 为了更好地理解, 本发明的某些实施方案参考通过举例的方式呈现的附图并参考不是对本发明的限制的示例性实施例来更详细地描述。

实施例

- [0086] 实施例1.HepG2/C3A细胞在不同的生长培养基中的细胞生长模式
- [0087] HepG2/C3A(10⁶个)细胞被接种在25cm²瓶中并被培养在以下细胞培养基的一种中:
- [0088] -DMEM+10%FBS+NHG(非必需氨基酸、两性霉素B、HEPES、庆大霉素);
- [0089] -DMEM+10%FBS+NHG+1mM丙酮酸盐;或
- [0090] -DMEM+10%FBS+NHG+1mM丙酮酸盐+4ug/mL聚凝胺。

[0091] 在1天之后以20x放大率拍摄的图像示于图1中。在培养基DMEM+10%FBS+NHG (A) 或 DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐 (B) 中培养的HepG2/C3A细胞以团块生长,这将使得用病毒(例如HEV)感染非常困难。另一方面,当HepG2/C3A细胞被培养在DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐+聚凝胶 (C) 中时,细胞附着并以平面甚至单层生长,这应该容易被病毒(例如HEV)感染。

[0092] 在3天之后以10x和20x放大率拍摄的图像示于图2中。类似于第1天的细胞,在DMEM +10%FBS+NHG (A) 或DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐 (B) 中培养的HepG2/C3A细胞以团块生长,但在DMEM+10%FBS+NHG+丙酮酸盐+聚凝胶 (C) 中生长的细胞以平面甚至单层生长。由于细胞团块将阻碍病毒的均匀感染,在聚凝胶的存在下生长的细胞中HEV感染的效率将是有可能较高的。

[0093] 实施例2.HEV感染的细胞的建立

[0094] 接种细胞培养瓶以便如下感染:根据本领域的现有技术中已知的方案或程序胰蛋白酶消化HepG2或HepG2/C3A细胞。添加十毫升生长培养基(根据所使用的细胞系的要求的基础培养基加在约1-约5 μ g/mL浓度的聚凝胶)以中和胰蛋白酶,并用移液管上下吸取悬液以打碎细胞团块。然后以每150cm²瓶约10⁶个细胞的密度接种细胞并在37°C培养箱中放置过夜。

[0095] 通过从瓶去除培养基并添加HEV贮备物(澄清的病毒感染的细胞裂解物),以0.1-1.0的感染复数(MOI)并在5-10mL的总体积中用HEV感染细胞。细胞在37°C孵育至少1小时,在该时间期间,周期性地来回摇动瓶,以防止细胞变干燥并使病毒接种物均匀地跨过细胞。添加另外的生长培养基(每瓶10-20mL),并将瓶保持在37°C直到细胞单层汇合(约1周)。

[0096] 实施例3.HEV感染的细胞的繁殖

[0097] 当细胞单层变得汇合时,根据实施例1胰蛋白酶消化150cm²瓶中的感染的细胞(HepG2或HepG2/C3A)。如果多个瓶待被胰蛋白酶消化,在继续进行之前,将细胞悬液汇集在一起。

[0098] 取不少于1mL的胰蛋白酶消化的细胞悬液的等分试样以通过PCR分析HEV RNA。将剩余细胞悬液丢弃或以等于汇合单层的1/6的细胞数目分进其他150cm²瓶中(1:6分配)。添加生长培养基,以使每个150cm²瓶中的终体积达到20-25mL,并将瓶孵育直到细胞达到汇合(约1周)。

[0099] 每周重复该程序,直到被取出用于PCR分析的1mL样品中HEV RNA的量达到高滴度。在一些实施方案中,高滴度在约10⁸拷贝/mL-约10¹⁰拷贝/mL的范围内。在一些实施方案中,高滴度在约10⁷拷贝/mL-约10¹⁰拷贝/mL的范围内。然后一些瓶被胰蛋白酶消化,并被分配以便HEV感染的细胞的继续传代,而剩余的瓶作为HEV贮备物处理。

[0100] 将HEV贮备物的瓶冷冻和解冻1-2次,以破裂感染的细胞并释放病毒。然后汇集被感染的裂解物、等分进适当的容器中并储存在不高于-65°C下。

[0101] 实施例4.基于PCR的HEV感染性测定

[0102] 虽然在该实施例中,HEV滴定在96孔板格式中被描述,但该测定可容易地被调整为适应其他尺寸的多孔板。

[0103] 制备HEV贮备物的系列稀释液并添加至接种有HepG2或HepG2/C3A细胞的孔。允许病毒在37°C吸收不少于1小时,并添加生长培养基。在37°C孵育板不少于2天,然后从孔吸出培养基,并用缓冲液(例如PBS)洗涤/吸出细胞不少于2x。然后板被提取用于PCR或被储存在

不高于-65°C下直到准备用于提取。

[0104] 使用Dynabeads®mRNA DIRECT™微型试剂盒(Life Technologies)遵循制造商的说明书从滴定板的每个孔中的细胞提取聚腺苷酸化RNA(例如HEV RNA)。所得的洗脱液(聚A RNA)被立即处理用于PCR扩增或储存在不高于-65°C下直到准备用于PCR扩增。

[0105] 使用如先前讨论的引物和探针,使用一步RT-PCR检测样品中的HEV RNA。用于每个反应的测定条件如下:

[0106] a) 试剂:5.0μl 4x TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies)、0.08μL 100mM引物F+R、0.04μL 100mM探针、0.4μL SUPERase In (Life Technologies)、4.4μL水和10μL模板(总计20μl)

[0107] b) 反应:52°C10分钟、95°C30秒,以及95°C15秒、56°C45秒的40个循环,

[0108] PCR和循环阈值(Ct)确定根据制造商的说明书使用AB 7500实时PCR系统(Applied Biosystems,Foster City,CA)和附带软件来进行。

[0109] PCR是定量的或定性的。对于定量PCR,从NIH获得的HEV cDNA质粒用MluI被线性化,并使用mMESSAGE mMACHINE®试剂盒(Life Technologies)转录,以产生具有7-甲基鸟苷帽和聚A尾的7.2kb RNA转录物。将该转录物用Ambion MegaClear试剂盒(Life Technologies)纯化,用定量-iT™ RiboGreen® RNA试剂和试剂盒(Invitrogen)定量并用作构建RNA标准校正曲线的标准品。

[0110] RNA标准曲线由AB7500软件系统通过对Ct值相对于对标准品计算的拷贝数目的对数作图来产生。

[0111] 图5(右图)显示典型的标准曲线。所有的曲线具有宽的动态范围,范围从每反应 10^0 至 10^7 拷贝,并且是线性的,具有 $r^2 > 0.99$ 的相关系数。扩增的效率百分比被计算为%E=[$10(-1/\text{斜率}) - 1$]*100。基于n=22HEV qPCR标准曲线,HEV定量PCR的效率为100.4%(数据未示出)。

[0112] 对于定性PCR,基于阳性PCR信号的存在,孔被评分为阳性或阴性。病毒滴度使用适当的统计学方法:Spearman-Kärber、MPN或泊松(Poisson)被计算为TCID₅₀/mL。

[0113] 实施例5. 基于PCR的HEV感染性测定性能的评估

[0114] 进行测定资格研究,以评估HEV感染性测定的运行特征。评价的参数是精确度、准确度、线性度、定量和检测的限值及动态范围。

[0115] 接受标准与对于其他病毒滴定测定通常使用的那些相同。

[0116] 结果总结于表2中,并表明该测定通过所有测试。

[0117] 定义

[0118] HepG2:从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得的肝细胞癌细胞(ATCC号HB-8065)

[0119] MPK:从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得的小型猪肾细胞(ATCC号CCL-66)

[0120] DMEM:Dulbecco氏改良的Eagle培养基

[0121] FBS:胎牛血清

[0122] HEPES:N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸

- [0123] NEAA:非必需氨基酸
- [0124] NHG:以下的混合物:非必需氨基酸、两性霉素B、HEPES和庆大霉素
- [0125] 滴定:连续稀释样品以包括期望的病毒滴度并将稀释的样品转移至板以确定TCID₅₀/mL的过程
- [0126] 滴度:通过滴定确定的溶液中物质(病毒)的浓度或此类物质的强度
- [0127] SK:Spearman-Karber是计算具有相对高浓度病毒的样品中的病毒滴度的统计学方法。当阳性孔在任何稀释度下的比例>25%时,使用该方法
- [0128] MPN:最大概率数是计算具有相对低浓度病毒的样品中的病毒滴度的统计学方法。当阳性孔在所有稀释度下的比例<25%时,使用MPN。
- [0129] 泊松:泊松是计算具有极低浓度病毒的样品中的病毒滴度的统计学方法。当未观察到阳性孔时,使用该方法。
- [0130] ATCC:美国典型培养物保藏中心
- [0131] TCID₅₀:对应于50%组织培养感染剂量(终点稀释测定)。它是感染性病毒滴度的测量值,其定量了杀死50%的被感染的宿主或在50%的接种的组织培养细胞中产生细胞病变效应所需的病毒的量。
- [0132] 参考文献
- [0133] 1.Okamoto H(2011) Hepatitis E virus cell culture models.Virus Research 161:65-77.
- [0134] 2.Tanaka T,等(2007) Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus.J Gen Virol 88:903-911.
- [0135] 3.Tanaka T,等(2009) Development and Characterization of a Genotype 4 Hepatitis E Virus Cell Culture System Using a HE-JF5/15F Strain Recovered from a Fulminant Hepatitis Patient.J Clin Microbiol 47:1906-1910.
- [0136] 4.Shukla P,等(2011) Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant.PNAS.108 (6) :2438-2443.
- [0137] 5.Shukla P,等(2012) Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination.J Virol 86 (10) :5697-5707
- [0138] 6.美国临时专利申请号61/431,377
- [0139] 7.美国临时专利申请号61/554,323
- [0140] 8.美国专利申请号13/978,839
- [0141] 9.国际PCT申请号PCT/US2012/020830

序列表

<110> 基立福有限公司

<120> 用于产生高滴度戊型肝炎病毒贮备物的方法及用于戊型肝炎病毒的滴定测定

<130> DURC6.006AUS

<150> US 62/195,936

<151> 2015-07-23

<160> 3

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0001] <223> 合成的；HEV 来源的引物

<400> 1

cggctatcgg ccagaagtt

19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的；HEV 反向引物

<400> 2

ccgtggctat aactgtggtc t

21

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的; HEV 探针

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = Fam

<220>

[0002] <221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> n = Zen

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> n = 3IABkFQ

<400> 3

nttttacgc naggctgccca aggccn

26

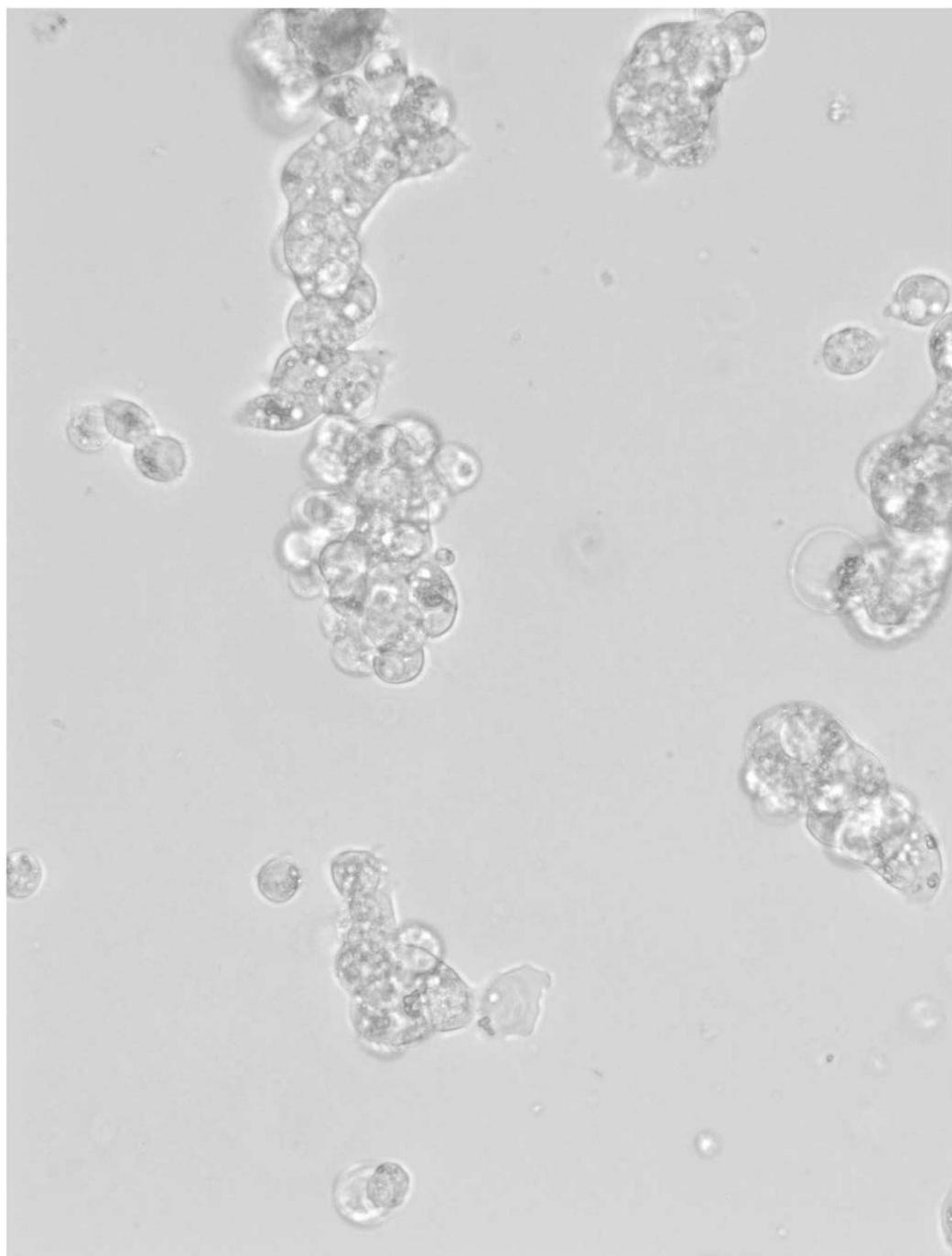


图1A

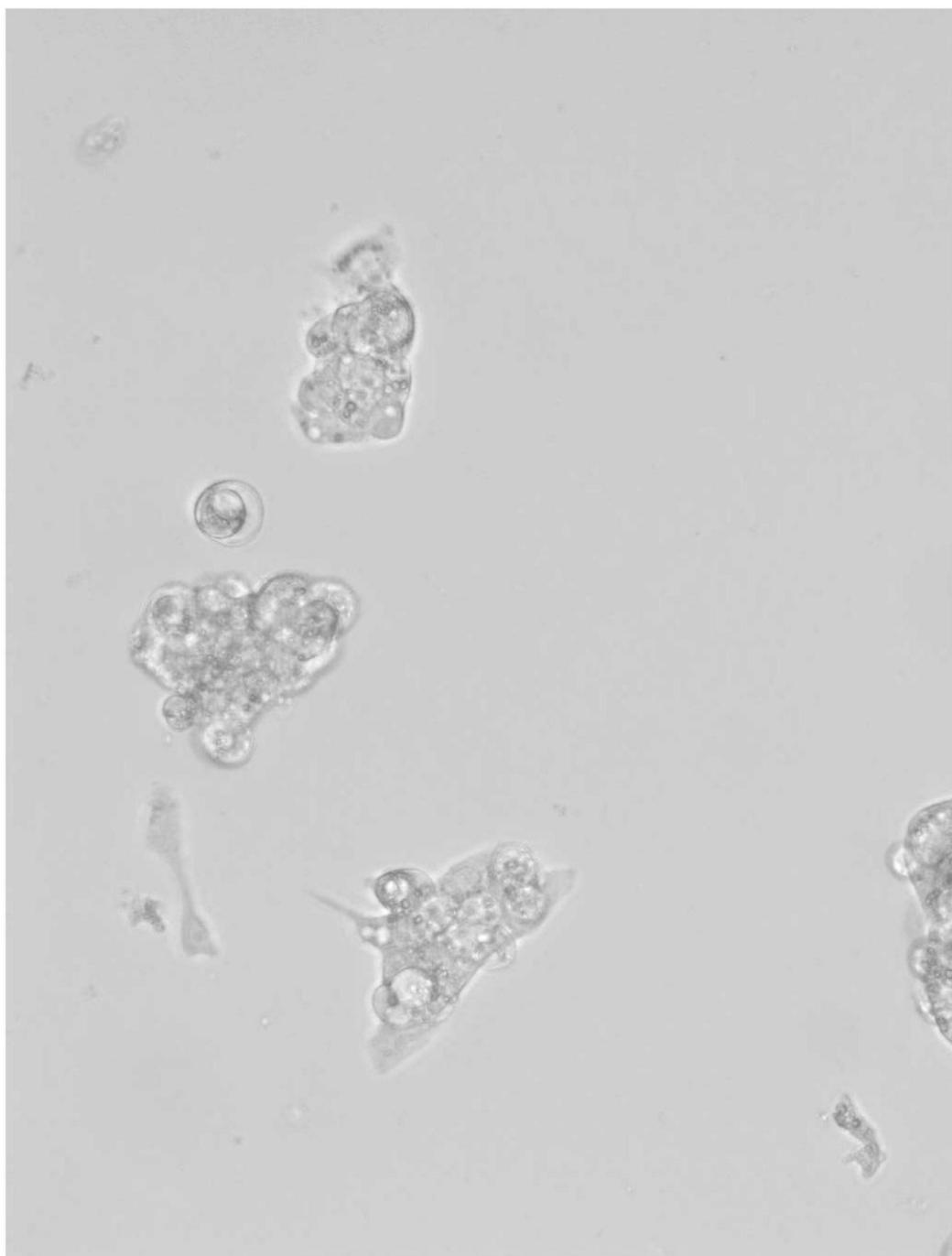


图1B

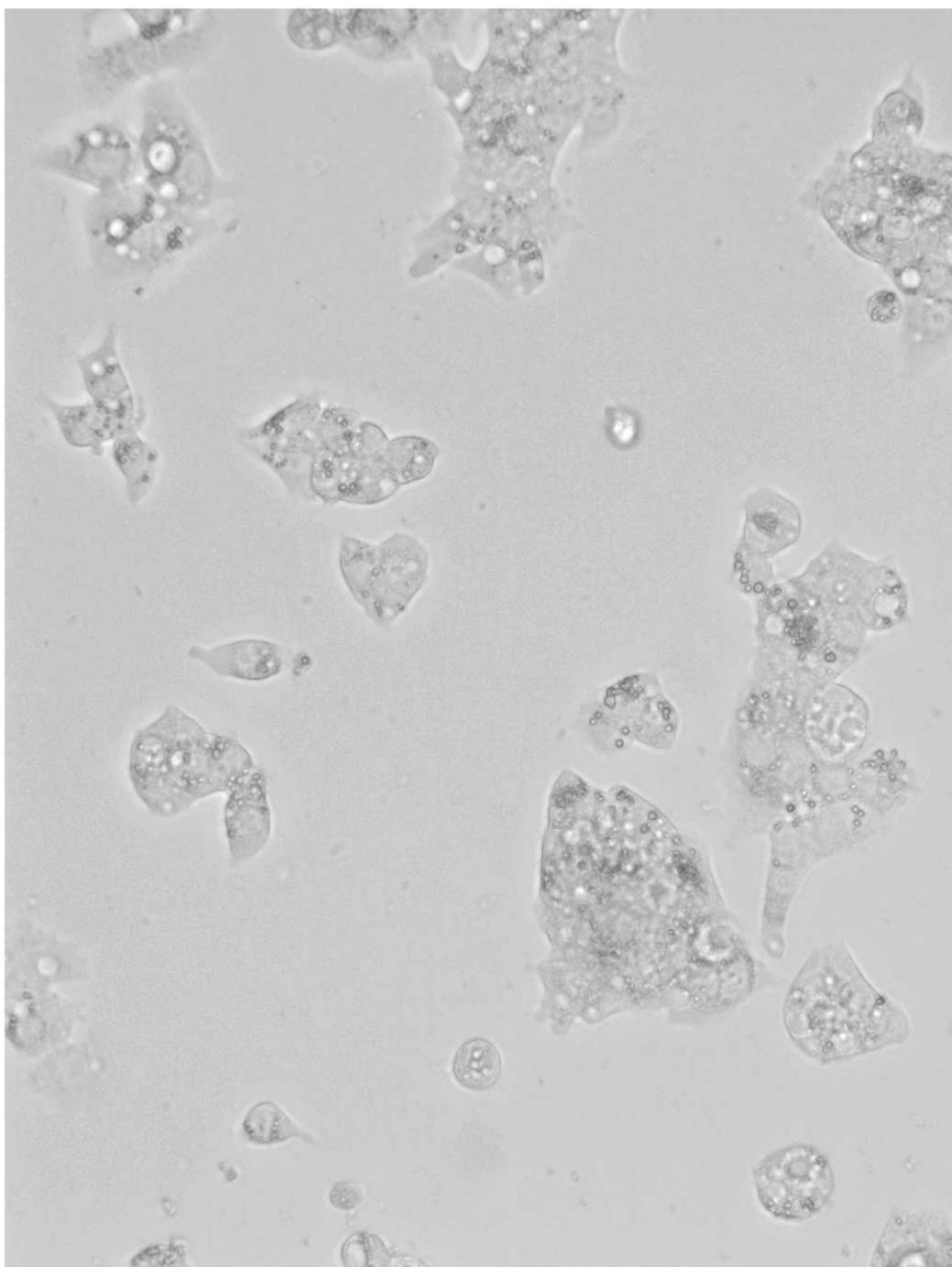


图1C

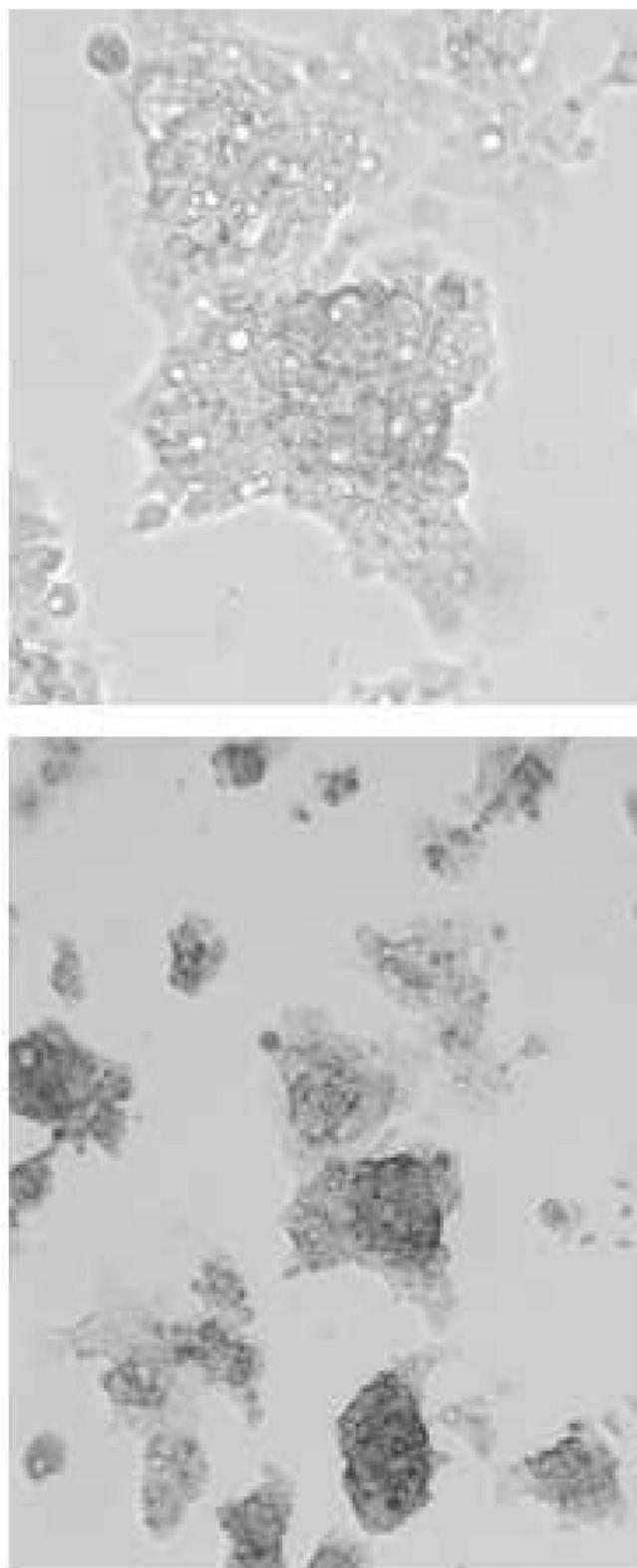


图2A

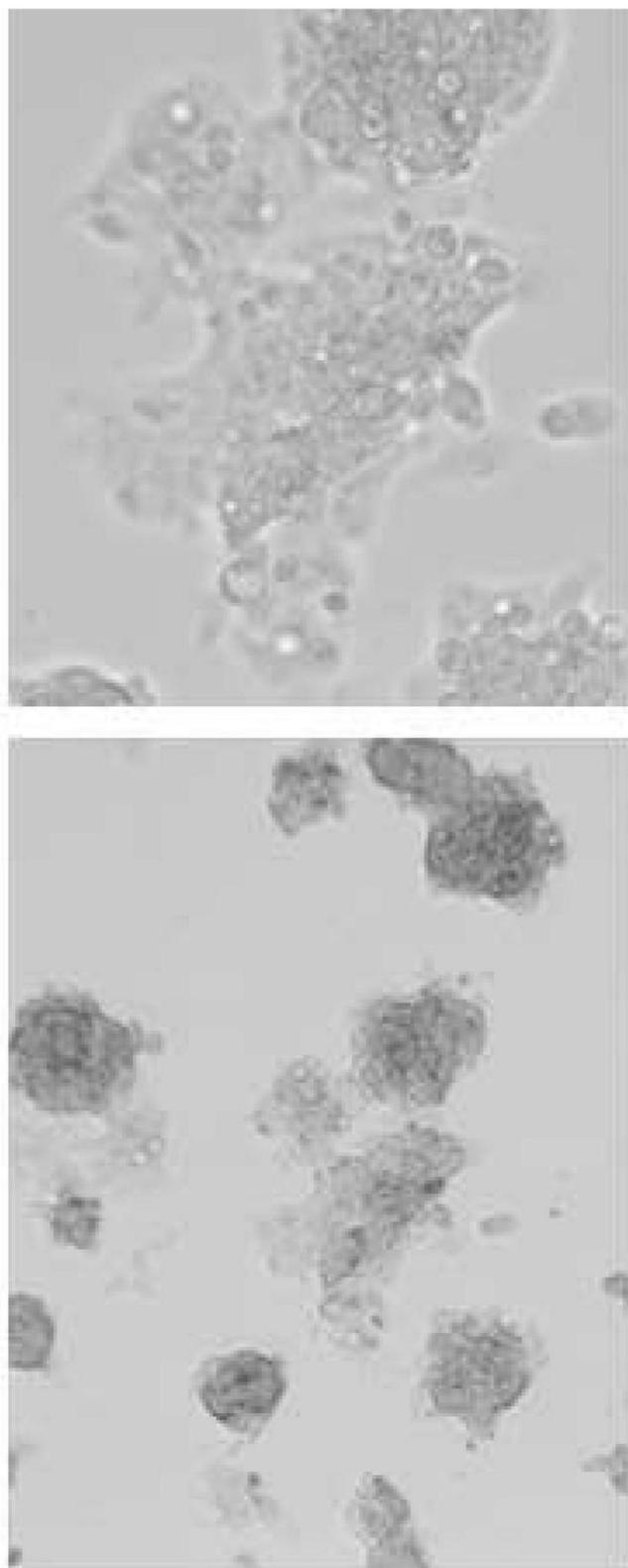


图2B

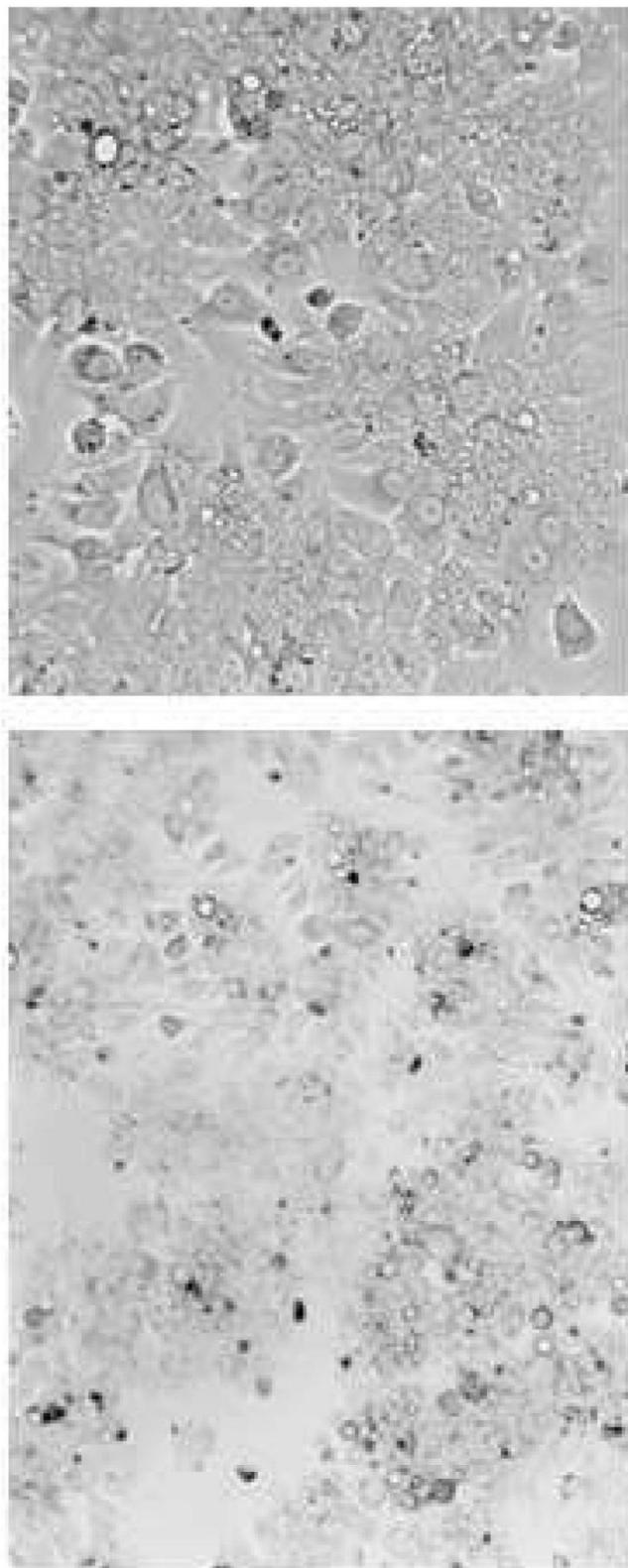


图2C

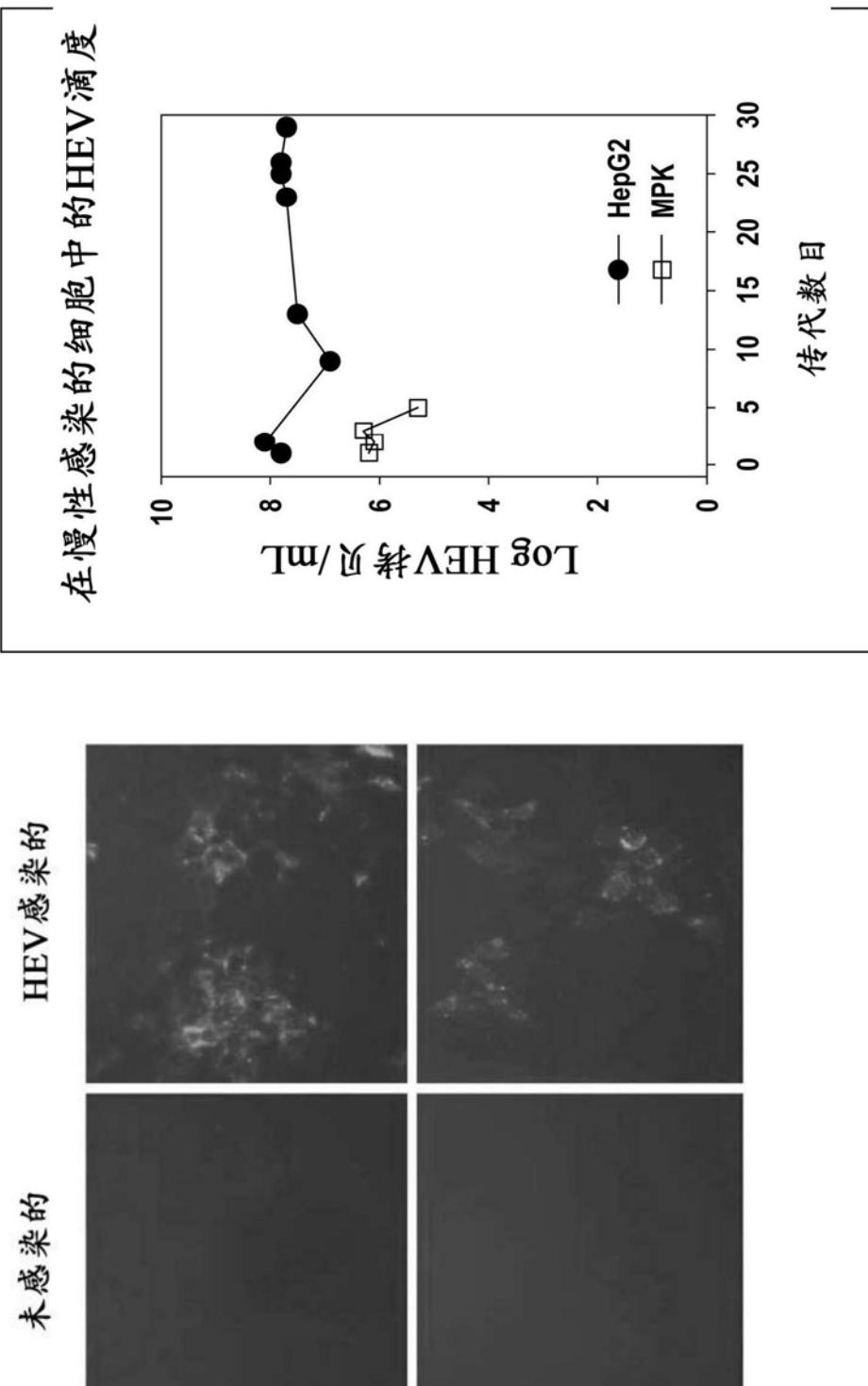


图3

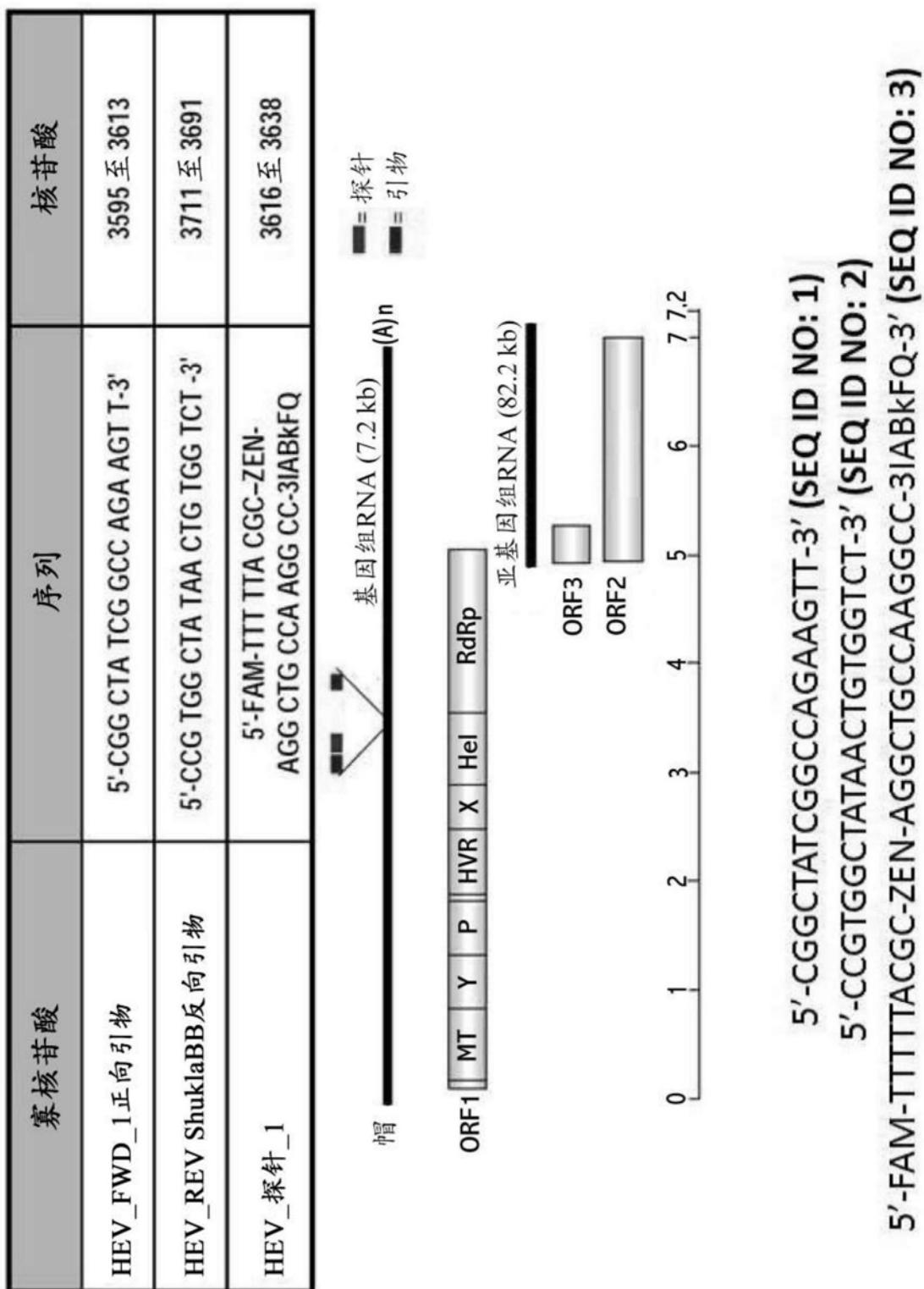
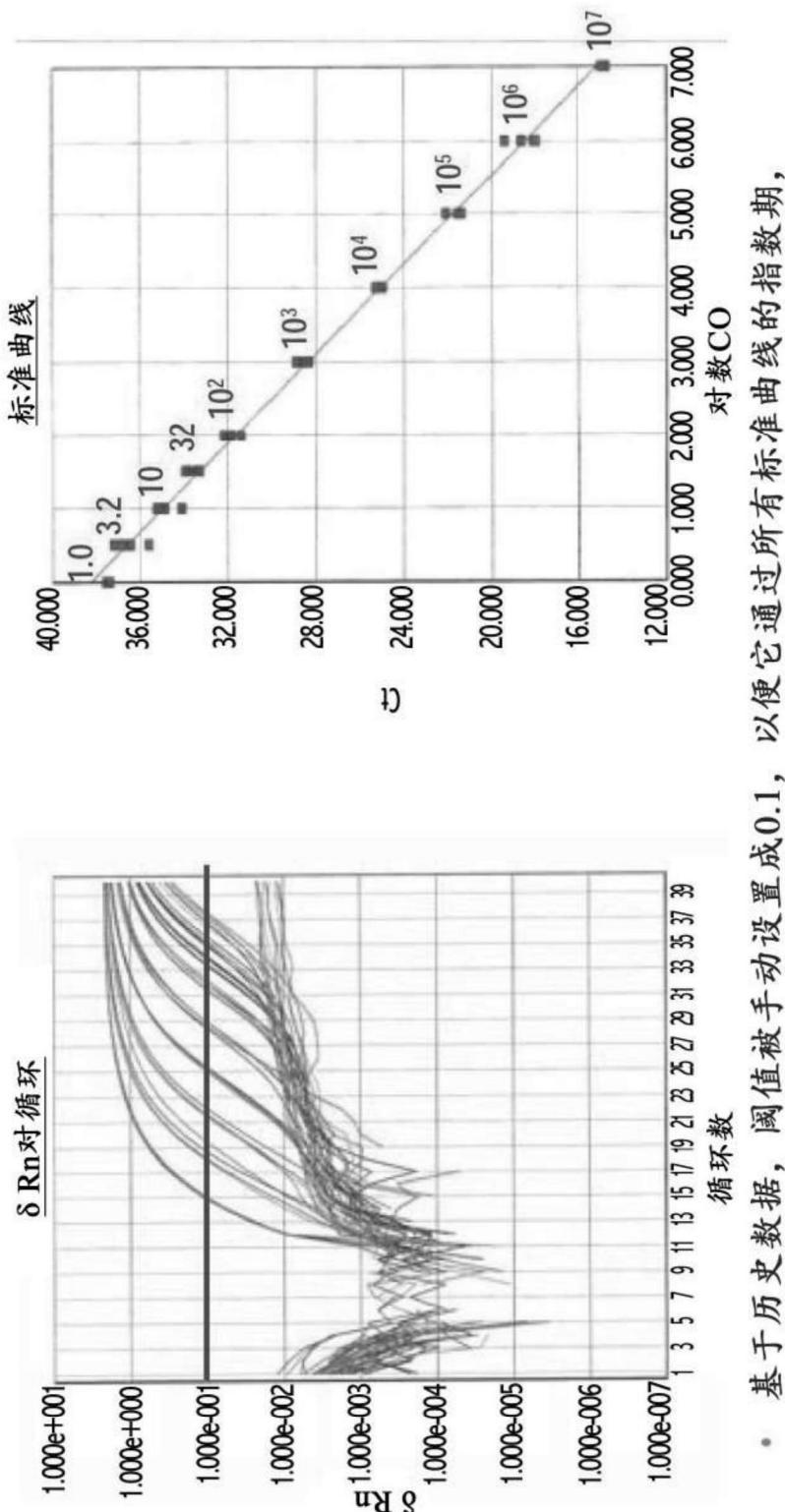


图4



- 基于历史数据，阈值被手动设置成0.1，以便它通过所有标准曲线的指数期，并确保每rxn 1 RNA拷贝的检测
- 斜率 = -3.3
- $R^2 = 0.997$

图5