



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I803725 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108146543

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K1/22 (2006.01)

(30)優先權：2018/12/20 南韓 10-2018-0166428

(71)申請人：南韓商怡諾安有限公司(南韓) HK INNO.N CORPORATION (KR)  
南韓

(72)發明人：柳在林 YU, JAELIM (KR)；鄭恩朱 JUNG, EUN JU (KR)；蔡珍娥 CHAE, JINA (KR)；李東億 LEE, DONG EOK (KR)

(74)代理人：陳昭明；許文馨

(56)參考文獻：

US 2015/0210986A1

期刊 Tan, Chee Wah, et al. "Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor." Journal of virology 87.1 (2013): 611-620.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：11 共 29 頁

(54)名稱

使用親和層析法之用於疫苗病毒的純化方法

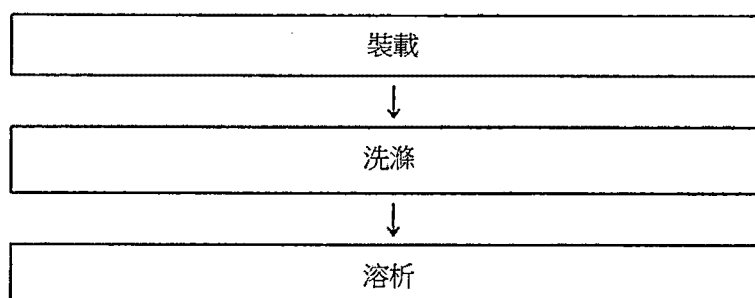
(57)摘要

本發明是有關使用親和層析法之用於疫苗病毒的分離及純化方法，且更具體而言，有關使用包含一疫苗病毒親和樹脂之親和層析法，而能夠在高純度及高產量下獲得疫苗病毒的病毒純化方法。

The present disclosure relates to separation and purification methods for a vaccine virus using affinity chromatography, and more particularly, to a purification method for a virus capable of obtaining a vaccine virus with a high purity and a high yield using affinity chromatography containing a vaccine virus-affinity resin.

指定代表圖：

圖 1



I803725

## 發明摘要

### 【發明名稱】(中文/英文)

使用親和層析法之用於疫苗病毒的純化方法/PURIFICATION METHOD  
FOR VACCINE VIRUS USING AFFINITY CHROMATOGRAPHY

### 【中文】

本發明是有關使用親和層析法之用於疫苗病毒的分離及純化方法，且更具體而言，有關使用包含一疫苗病毒親和樹脂之親和層析法，而能夠在高純度及高產量下獲得疫苗病毒的病毒純化方法。

### 【英文】

The present disclosure relates to separation and purification methods for a vaccine virus using affinity chromatography, and more particularly, to a purification method for a virus capable of obtaining a vaccine virus with a high purity and a high yield using affinity chromatography containing a vaccine virus-affinity resin.

### 【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

使用親和層析法之用於疫苗病毒的純化方法 / PURIFICATION  
METHOD FOR VACCINE VIRUS USING AFFINITY  
CHROMATOGRAPHY

## 【技術領域】

【0001】 本發明是有關使用親和層析法之用於疫苗病毒的分離及純化方法，且更具體而言，有關使用包含一疫苗病毒親和樹脂之親和層析法，而能夠在高純度及高產量下獲得疫苗病毒的病毒分離及純化方法。

## 【先前技術】

【0002】 在使用自人類以外之物種所衍生之細胞作為宿主細胞而培養的疫苗病毒中，必須移除由宿主所衍生之材料。為了移除由宿主衍生之材料，在相關技術領域中，已使用糖密度梯度離心法(sugar density gradient centrifugation method)、粒徑排阻層析法(size-exclusion chromatography)，或離子交換層析法(ion-exchange chromatography)。作為頻繁用於病毒純化的方法，由於這些方法無論對於何種病毒的種類為可以輕易應用的，這些方法較親和層析法(affinity chromatography)更常被使用。

【0003】 糖密度梯度離心法是利用使用糖而形成密度差異以純化病毒的方法，且作為最傳統及古老的方法，由於其不需要獨立的過程研究(process studies)，其是最常用於研究的初始階段的方法。為了將該方法應用至工業生產階段，額外需要昂貴的設備，且需要加入諸如透析法或粒徑排阻層析法之用於移除糖的方法，而因此具有總處理時間過長的缺點。在一

項研究中亦被報導的是，糖的黏度及高滲透壓影響病毒之感染蛋白(infective proteins)而降低該方法的整體病毒產率(Peng HH *et al.* (2006) *Anal Biochem*, 354(1):140–147)。

**【0004】** 粒徑排阻層析法是不受到蛋白修飾(protein modification)或滲透壓之影響的方法，且在現有技術中(CN101695570B、CN101780278B)，已揭露使用粒徑排阻層析法製備用於手足口症(hand-foot-and-mouth disease)的未活化疫苗。然而，由於過量的濃縮過程涉及於粒徑排阻層析法中作為預處理過程，存在有病毒結構由於濃縮過程而被破壞，或是由於增加之過程而降低產率的缺點。再者，由於規模擴增(scale-up)受限，粒徑排阻層析法的應用在研究階段是較簡單的，但在工業量產的規模下其應用受限。

**【0005】** 已使用無論病毒樣品之容量為何都能被使用之離子交換層析法進行研究(CN101695570B、Ashok Raj Kattur Venkatachalam *et al.* (2014) *Virology Journal*, 11:99)。大部分的研究是藉由將病毒吸附至諸如DEAE(二乙氨基乙基)的具有電荷的樹脂，並接著以具有高鹽濃度之緩衝劑溶析(eluting)該經吸附之病毒之方法進行。然而，為了使用離子交換層析法，需要使用透析過程(dialysis process)以降低樣品的鹽濃度，且存在有由於額外過程而降低產率的缺點。另外，由於病毒是由各種種類之蛋白質所組成而非僅由單一蛋白質組成，病毒具有各種電荷，且因此需要用以維持病毒之溶析條件的過程研究。另外，存在有具有與病毒相似電荷之雜質可能被一同溶析的缺點。

## **【發明內容】**

## 欲解決之技術問題

**【0006】** 基於此技術背景，本發明之發明人已盡相當努力以找尋在高純度及高產率下純化疫苗病毒的方法，結果，他們研發出當使用親和層析法得以在高純度及高產量下獲得疫苗病毒的純化方法，藉此完成本發明。

## 解決問題的技術手段

**【0007】** 本發明的一個態樣提供一種用於疫苗病毒之純化方法，其包含：(a)將包含一疫苗病毒之一樣品裝載於包含一病毒親和樹脂之一親和層析管柱；(b)以一洗滌溶液洗滌該親和層析管柱；以及(c)使用一溶析溶液自該親和層析管柱回收一所欲之疫苗病毒。

**【0008】** 本發明的另一態樣提供根據該純化方法而純化的疫苗病毒。

## 有益的技术功效

**【0009】** 根據本發明之純化方法，除了所欲之疫苗病毒外大多數的雜質被移除，該疫苗病毒可在適用於量產之高純度及高產率下被純化。

## 【圖式簡單說明】

### 【0010】

圖1顯示進行本發明之純化方法的程序。

圖2及圖3顯示使用包含硫酸葡聚糖之Capto™ DeVirS樹脂純化疫苗病毒的結果。

圖4及圖5顯示使用包含肝素之HiTrap肝素樹脂純化疫苗病毒的結果。

圖6及圖7顯示使用一Fractogel DEAE樹脂純化疫苗病毒的結果。

圖8及圖9顯示使用一Fractogel TMAE樹脂純化疫苗病毒的結果。

圖10及圖11顯示使用一CIM DEAE樹脂純化疫苗病毒的結果。

### 【實施方式】

【0011】 此後將詳細敘述本發明。

【0012】 同時，揭示於本發明中的各敘述及實施例亦可被各自應用至其他敘述及實施例。亦即，揭示於本發明中之各種組件的所有組合屬於本發明的範圍。另外，本發明的範圍不可由下列具體敘述限制。

【0013】 再者，所屬技術領域具有通常知識者可以藉由僅使用一般實驗而認知或決定在本發明中敘述的具體實施例的多個均等實施例。另外，這些均等實施例意欲被包括於本發明中。

【0014】 圖1顯示進行本發明之純化方法的程序之一實例。

【0015】 參考圖1，本發明之一態樣提供用於疫苗病毒的純化方法，其包含：(a)將包含一疫苗病毒之一樣品裝載於包含一病毒親和樹脂之親和層析管柱；(b)以一洗滌溶液洗滌該親和層析管柱；以及(c)使用一溶析溶液自該親和層析管柱回收一所欲之疫苗病毒。

【0016】 以下將各別詳細敘述用於疫苗病毒之純化方法的各步驟。首先，步驟(a)為將包含一疫苗病毒之一樣品裝載於包含一病毒親和樹脂之親

和層析管柱。

【0017】 只要包含該疫苗病毒之該樣品包含一疫苗病毒，對於材料及製造方法沒有限制。具體而言，包含該疫苗病毒之該樣品可包括一腸病毒(enterovirus)，但不限於此。該樣品可由人類衍生之細胞(human-derived cells)之外的宿主細胞製備，但不限於此。

【0018】 用於本發明之該「親和層析法(affinity chromatography)」代表使用以親和力而連結至特定蛋白質之材料的一層析方法。以親和力而連結至特定蛋白質之材料為其中之功能性基團共軛於聚合性材料的材料，且其連結至溶解於一極性或非極性溶劑中且具有親和力的材料。

【0019】 為了本發明的目的，該親和層析法可為包含一疫苗病毒親和樹脂(vaccine virus-affinity resin)的親和層析法。具體而言，該層析法可使用能夠特別連結至該疫苗病毒蛋白質的樹脂而進行。舉例而言，該疫苗病毒親和樹脂可包括選自於由硫酸葡聚糖(dextran sulfate)、肝素(Heparin)及其等之混合物所組成之群組的至少一者。例如，該疫苗病毒親和樹脂包含Capto™ DeVirS(GE Healthcare)及HiTrap Heparin(GE Healthcare)，但不限於此，且任何能夠特別連結(specifically binding)至該疫苗病毒蛋白的樹脂皆可。

【0020】 舉例而言，該Capto™ DeVirS樹脂包含硫酸葡聚糖，該HiTrap Heparin樹脂包含肝素，而該樹脂可特別連結至該疫苗病毒蛋白。

【0021】 於一實施例中，在步驟(a)中裝載包含該疫苗病毒之該樣品之前，一管柱可由pH 7.5至pH 8.0的一平衡溶液平衡(equilibrated)。具體而言，該平衡溶液可包括選自於由下列所組成之群組的至少一鹽類：磷酸鈉、

氯化鈉、三羥甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)、2-(*N*-嗎啉基)乙磺酸(2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, MES)、3-嗎啉丙烷-1-磺酸(3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, MOPS)、哌嗪 $N,N'$ -雙(2-乙磺酸)(Piperazine- $N,N'$ -bis(2-ethanesulfonic acid), PIPES)、磷酸鉀、氯化鉀及2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, HEPES), 但不限於此。

**【0022】** 於一實施例中，該方法可在步驟(a)之前進一步包括離子交換層析、濃縮，及/或透析。此步驟是用以藉由移除包含該疫苗病毒之該樣品中的主要雜質(primary impurities)而增加該樣品的純度。具體而言，在步驟(a)之前，包含該疫苗病毒之該樣品被濃縮及透析，且在藉由離子交換層析法預先進行純化後，包含該疫苗病毒之該樣品可被裝載於使用該親和樹脂之該親和層析管柱。用以移除未連結至該親和樹脂之主要雜質及增進該樣品之純度的任何操作可被應用而不被限制。

**【0023】** 於一實施例中，使用親和層析法之用於疫苗病毒的該純化方法的特徵可在於在該親和層析法之前未進行另外的濃縮或透析過程。在此情形中，雖然該過程是簡單的，卻能夠獲得具有高產率及高純度的結果。

**【0024】** 在用於該疫苗病毒的純化方法中，步驟(b)是將洗滌溶液施用(apply)於裝載有該樣品之該層析管柱的步驟，作為以該洗滌溶液洗滌該樣品的步驟。

【0025】 該洗滌溶液可具有pH 7.5至pH 8.0之範圍。具體而言，該洗滌溶液可包括選自於由下列所組成之群組的至少一鹽類：磷酸鈉、氯化鈉、三羥甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)、2-(*N*-嗎啉基)乙磺酸(MES)、3-嗎啉丙烷-1-磺酸(MOPS)、哌嗪 $N,N'$ -雙(2-乙磺酸)(PIPES)、磷酸鉀、氯化鉀及2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES)，但不限於此。

【0026】 為了本發明的目的，在步驟(b)中，非特別(non-specifically)連結至該疫苗病毒親和樹脂之雜質可藉由該洗滌溶液而移除。

【0027】 於一實施例中，該純化方法可進一步包括在步驟(a)或(b)後，以該平衡溶液排放(discharging)對該樹脂不具有親和性的雜質的步驟。該步驟可被特別進行至少一次，但一般而言，其可不被限制地進行直到達成平衡。

【0028】 於一實施例中，該純化方法可進一步包括在步驟(a)或(b)後以一再平衡溶液(re-equilibrium solution)進行再平衡(re-equilibration)的步驟。該再平衡溶液不與該洗滌步驟及該溶析(eluting)步驟之間的任何物質反應、在所欲之疫苗病毒未被溶析之步驟(a)中該平衡溶液之相同條件下流通，且接著於該溶析溶液流動之前再次流通以作為該洗滌溶液及該溶析溶液之間的橋樑。

【0029】 具體而言，該再平衡溶液可具有pH 7.5至pH 8.0之範圍。具體而言，該再平衡溶液可包括選自於由下列所組成之群組的至少一鹽類：磷酸鈉、氯化鈉、三羥甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)、2-(*N*-嗎啉基)乙磺酸

(MES)、3-嗎啉丙烷-1-磺酸(MOPS)、哌嗪N,N'-雙(2-乙磺酸)(PIPES)、磷酸鉀、氯化鉀及2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES)，但不限於此。

【0030】 在該病毒的純化方法中，步驟(c)是使用該溶析溶液自該親和層析管柱回收該所欲之疫苗病毒的步驟。

【0031】 該溶析溶液可具有pH 7.5至pH 8.0的範圍。具體而言，該溶析溶液可包括選自於由下列所組成之群組的至少一鹽類：磷酸鈉、氯化鈉、三羥甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)、2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES)、3-嗎啉丙烷-1-磺酸(MOPS)、哌嗪N,N'-雙(2-乙磺酸)(PIPES)、磷酸鉀、氯化鉀及2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES)，但不限於此。

【0032】 另外，該溶析溶液可包含0.1 M至0.5 M之氯化鈉，但可自該親和層析管柱分離該所欲之疫苗病毒的鹽類可以在不限濃度之下被使用。

【0033】 使用本發明之純化方法而被分離之該所欲之疫苗病毒可具有88%或更高之純度，且具體而言90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高，或98%或更高的純度，但不限於此。該用語「純度(purity)」表示被移除雜質之一純的(pure)疫苗病毒，且作為一實例，若純度為92%，則剩下的8%代表雜質。另外，純度可單純代表自該經溶析之溶液分離的材料之純度，但最終純度%可根據所裝載之樣品的純度百分比而改變。

【0034】 該用語「雜質(impurity)」為該所欲之疫苗病毒之外的任何

其他材料，且例如，可包括一自宿主衍生之DNA(host-derived DNA)、一自宿主衍生之蛋白質、一內毒素(endotoxin)等，但並未限制於此。

【0035】 再者，該疫苗病毒之純度可藉由特別被提供用以自該溶析溶液之總蛋白質量而量測衍生自宿主之雜質的一酵素結合免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))法加以分析，但並未限制於此，且當然地，該疫苗病毒之純度可使用陽離子交換高效液相層析法(CEX-HPLC)、粒徑排阻高效液相層析法(SEC-HPLC)等加以分析。

【0036】 在本發明中，該病毒較佳為腸病毒(enterovirus)，但未限制於此。

【0037】 再者，藉由本發明之純化方法所純化之疫苗病毒可被用作疫苗或免疫性組成物(immunogenic composition)，但並未限制於此。

【0038】 本發明的另一態樣提供根據該純化方法所純化的一疫苗病毒。該疫苗病毒可被用作疫苗或免疫性組成物，但並未限制於此。

#### **發明模式(Mode for Invention)**

【0039】 此後，較佳的實例被提出以輔助了解本發明。然而，下列實例僅是為了使本發明能被更輕易地理解而提供，且本發明的內容並不受實例限制。

#### **實例1. 使用包含硫酸葡聚糖之Capto™ DeVirS樹脂之純化**

【0040】 於實例1中，對於疫苗病毒之純化產率(purification yield)及雜質移除率(impurity removal rate)是使用包含一硫酸葡聚糖配位基之Capto™ DeVirS樹脂加以確認。

【0041】 一20 mM磷酸鈉pH 7.5緩衝劑被用作一平衡溶液及一洗滌溶液(0 M氯化鈉)，而一溶析溶液被製備並使用一pH 7.5緩衝劑，其中在平衡溶液中氯化鈉會達到2 M之濃度。

【0042】 首先，包含一腸病毒之含疫苗病毒之樣品被裝載於一管柱，然後，藉由流通該洗滌溶液進行洗滌。接著，0 M至2 M氯化鈉之溶析溶液以線性濃度梯度(linear concentration gradient)被流通，該經溶析之溶液被收集，且接著該疫苗病毒含量以TCID<sub>50</sub>量測，且該雜質含量被量測。

【0043】 圖2及3顯示使用包含硫酸葡聚糖之Capto™ DeVirS樹脂之純化疫苗病毒的結果。

【0044】 參考圖2及3，已確認的是將該經裝載之樣品的雜質量(impurity amount)與流經(flowthrough)(F/T)者相比，大量的雜質已自該經裝載之樣品移除。再者，已確認的是當將包括於該經裝載之樣品中之該病毒含量與流經(F/T)者相比，大部分的疫苗病毒被純化而未遭受疫苗病毒的損失。

【0045】 同時，該溶析溶液之氯化鈉濃度被自0 M增加至2 M以取得各別的餾分(fractions)。結果，當該餾分是在0.1 M至0.9M，較佳0.1 M至0.5 M的鹽濃度下取得時，已確認的是大量的雜質被移除，且同時，大多的疫苗病毒在未遭受疫苗病毒之損失下被純化。

【0046】 作為一實例，當餾分3及4在0.1 M至0.5 M之鹽濃度內取得，

已確認的是約81.1%之該疫苗病毒被回收，且此時，雜質之移除率是約97.7%，且因此雜質之含量與其他餾分相比為非常低的。

### **實例2. 使用包含肝素之HiTrap Heparin樹脂之純化**

【0047】 於實例2中，對於疫苗病毒之純化產率及雜質移除率使用包含肝素配位基之HiTrap Heparin樹脂加以確認。

【0048】 50 mM Tris-HCl pH 8.0緩衝劑被用作平衡溶液及洗滌溶液，且一溶析溶液被製備並使用，俾使氯化鈉得於該平衡溶液中會達到2 M。

【0049】 首先，包含一腸病毒之含疫苗病毒之樣品被裝載於一管柱，且接著藉由流通該洗滌溶液進行洗滌。接下來，0 M至2 M氯化鈉之溶析溶液以線性濃度梯度被流通、該經溶析之溶液被收集，且接著該疫苗病毒含量以TCID<sub>50</sub>量測，且該雜質含量被量測。

【0050】 圖4及5顯示使用包含肝素之HiTrap Heparin樹脂而純化一疫苗病毒的結果。

【0051】 參考圖4及圖5，已確認的是將該經裝載之樣品的雜質量與流經(flowthrough)(F/T)者相比，大量的雜質已自該經裝載之樣品移除。再者，已確認的是當將包括於該經裝載之樣品中之該病毒含量與流經(F/T)者相比，大部分的疫苗病毒被純化而未遭受疫苗病毒之損失。

【0052】 同時，該溶析溶液之氯化鈉濃度被自0 M增加至2 M以取得各別的餾分(fractions)。結果，當該餾分是在0.1 M至0.9M，較佳0.1 M至0.5 M且最佳0.1 M至0.3 M的鹽濃度下取得時，已確認的是大量的雜質被移除，且同時，大多的疫苗病毒在未遭受疫苗病毒之損失下被純化。

【0053】 作為一實例，當餾分4至7在0.1 M至0.5 M的鹽濃度內取得，已確認的是約85.4%之該疫苗病毒被回收，且此時，雜質之移除率是約92.0%。

#### 比較例1. 使用Fractogel DEAE樹脂之純化

【0054】 於比較例1中，對於疫苗病毒之純化率及雜質移除率使用包含二乙氨基乙基(diethylaminoethyl, DEAE)之Fractogel DEAE樹脂加以確認。

【0055】 50 mM之Tris-HCl pH 8.0緩衝劑被用作平衡溶液及洗滌溶液，而溶析溶液被製備並使用，俾使氯化鈉在該平衡溶液中能達到2 M。

【0056】 首先，包含腸病毒之含疫苗病毒的樣品被裝載於一管柱，且接著藉由流通該洗滌溶液進行洗滌。接下來，該溶析溶液以線性濃度梯度被流通、該經溶析之溶液被收集，且接著該疫苗病毒含量以TCID<sub>50</sub>量測，且該雜質含量被量測。

【0057】 圖6及圖7顯示使用一Fractogel DEAE樹脂之純化疫苗病毒的結果。

【0058】 參考圖6及7，當鹽濃度被增加且各別的餾分被取得時，在餾分11中於特定的鹽濃度下，約25.7%之該疫苗病毒被回收，且此時，雜質移除率為51.3%。亦即，已確認的是，在與其他餾分相比，其中疫苗病毒之回收率為較高的餾分中，其雜質含量是非常高的。

#### 比較例2. 使用Fractogel TMAE樹脂之純化

【0059】 在比較例2中，對於疫苗病毒之純化率及雜質移除率是使用

包含三甲基銨甲基(TMAE)之Fractogel TMAE樹脂加以確認。

【0060】 —50 mM Tris-HCl pH 8.0緩衝劑被用作平衡溶液及洗滌溶液，而溶析溶液被製備並使用，俾使氯化鈉在該平衡溶液中能達到2 M。

【0061】 首先，包含一腸病毒之含疫苗病毒之樣品被裝載於一管柱，且接著藉由流通該洗滌溶液進行洗滌。接下來，該溶析溶液以線性濃度梯度被流通，該經溶析之溶液被收集，且接著該疫苗病毒含量以TCID<sub>50</sub>量測，且該雜質含量被量測。

【0062】 圖8及9顯示使用一Fractogel TMAE樹脂純化疫苗病毒的結果。

【0063】 參考圖8及9，當鹽濃度被增加且各別的餾分被溶析，已確認的是在一特定的餾分(餾分5)中，約20.5%的該疫苗病毒被回收，且在此時，雜質移除率為89.2%。

### 比較例3. 使用CIM DEAE樹脂之純化

【0064】 於比較例3中，對於疫苗病毒之純化產率及雜質移除率使用由DEAE組成之碟型單體(disk-shaped single body)加以確認。

【0065】 —50 mM Tris-HCl pH 8.0緩衝劑被用作平衡溶液及洗滌溶液，而溶析溶液被製備並使用，俾使氯化鈉在該平衡溶液中能達到2 M。

【0066】 首先，包含一腸病毒之含疫苗病毒之樣品被裝載於管柱，且接著藉由流通該洗滌溶液進行洗滌。該平衡溶液及該溶析溶液以預定比例混合以通過一濃度梯度流動，使得氯化鈉的濃度為100 mM、140 mM、200 mM、400 mM及600 mM，該經溶析之溶液被收集，且接著該疫苗病毒含量

以TCID<sub>50</sub>量測。

【0067】 圖10及圖11顯示使用CIM DEAE樹脂純化疫苗病毒的結果。

【0068】 參考圖10及圖11，當鹽濃度被增加且各別的餾分被溶析，已確認的是在140 mM的鹽濃度下，約34.2%的該疫苗病毒被回收，且已確認的是由於該過程中過高的壓力(overly high pressure)，而難以應用於實際的過程中。

【0069】 實例1及2以及比較例1至3之方法及結果被總結於下表1中。

[表1]

	實例 1	實例 2	比較例 1	比較例 2	比較例 3
樹脂	Capto DeVirS	HiTrap Heparin	Fractogel DEAE	Fractogel TMAE	CIM DEAE
製造商	GE	GE	Merck Millipore	Merck Millipore	BIA separation
管柱容量 (mL)	20	5	5	5	0.34
平衡溶液	20 mM 磷酸鈉 pH 7.5	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0
洗滌溶液	20 mM 磷酸鈉 pH 7.5	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0
溶析溶液	20 mM 磷酸鈉 pH 7.5 0.1 M 至 0.5 M NaCl	50 mM Tris-HCl pH 8.0 0.1 M 至 0.5 M NaCl	50 mM Tris-HCl pH 8.0 0.05 M 至 0.1 M NaCl	50 mM Tris-HCl pH 8.0 0 M 至 0.1 M NaCl	50 mM Tris-HCl pH 8.0 0.05 M 至 0.14 M NaCl
雜質移除 率(%)	97.9	92.0	51.3	89.2	-

純化產率 (TCID <sub>50</sub> , %)	81.1	85.4	25.7	20.5	34.2
結果	雜質移除率非常好；所欲之材料可在高產率下分離(圖 2 至 5)	所欲之材料可在高產率下分離，但雜質移除率低(圖 6 及 7)	雜質移除率非常好，但純化產率非常低(圖 8 及 9)	由於過程中之高壓，其利用(usage)存在難度(圖 10 及 11)	

**【0070】** 這些結果指出，相較於使用離子交換層析法之傳統純化方法，本發明之使用親和層析法的用於疫苗病毒之純化方法中，所欲之疫苗病毒可以高雜質移除率及高產率而被分離。

**【0071】** 可由所屬技術領域具有通常知識者了解的是，以上敘述之本發明可以其他具體的形式實施而不自本發明之技術精神或必要特徵偏離。因此，應被了解的是上述實施例完全意欲為顯示性的而非限制性的。舉例而言，上述實例1及2中，該疫苗病毒之純化產率及雜質移除率是使用包含硫酸葡聚糖之樹脂及包含肝素之樹脂加以確認，但根據實例，硫酸葡聚糖及肝素以預定比例被混合之樹脂亦可被使用。

**【0072】** 本發明之範圍是藉由以下敘述之申請專利範圍而不是詳細說明所表示，且申請專利範圍之意義及範圍及衍生自其等之均等意義及範圍的所有改變或修飾應被解讀為落於本發明之範圍內。

### **【符號說明】**

(無)

## 申請專利範圍

1. 一種用於疫苗病毒的純化方法，其包含下列步驟：
  - (a)將包含一腸病毒之一樣品裝載於包含一病毒親和樹脂之親和層析管柱，其中該病毒親和樹脂包含硫酸葡聚醣或肝素；
  - (b)以一洗滌溶液洗滌該親和層析管柱；以及
  - (c)使用在0.1M至0.5M之濃度下的包含氯化鈉之一溶析溶液自該親和層析管柱回收一所欲之腸病毒。
2. 如請求項1所述之用於疫苗病毒的純化方法，其中該病毒親和樹脂被提供以特別連結於該腸病毒。
3. 如請求項1所述之疫苗病毒的純化方法，其中步驟(b)中之該洗滌溶液包含選自於由下列所組成之群組的至少一鹽類：磷酸鈉、氯化鈉、三羥甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)、2-(*N*-嗎啉基)乙磺酸(MES)、3-嗎啉丙烷-1-磺酸(MOPS)、哌嗪 $N,N'$ -雙(2-乙磺酸)(PIPES)、磷酸鉀、氯化鉀及2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES)。
4. 如請求項1所述之疫苗病毒的純化方法，進一步包含：  
在步驟(a)之前以一平衡溶液平衡該親和層析管柱。
5. 如請求項4所述之疫苗病毒的純化方法，其中該平衡溶液包含選自於由下列所組成之群組的至少一鹽類：磷酸鈉、氯化鈉、三羥甲基氨基甲烷-HCl(Tris-HCl)、2-(*N*-嗎啉基)乙磺酸(MES)、3-嗎啉丙烷-1-磺酸(MOPS)、哌嗪 $N,N'$ -雙(2-乙磺酸)(PIPES)、磷酸鉀、氯化鉀及2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES)。
6. 如請求項1或2所述之疫苗病毒的純化方法，進一步包含：在步驟(a)

- 及(b)之至少一者後以一平衡溶液平衡該親和層析管柱。
7. 如請求項1所述之疫苗病毒的純化方法，進一步包含：在步驟(a)及(b)之至少一者後以一再平衡溶液對該親和層析管柱進行再平衡。
  8. 如請求項1所述之疫苗病毒的純化方法，其中該樣品是從人類衍生之細胞之外的宿主細胞所製備。

圖式

圖 1

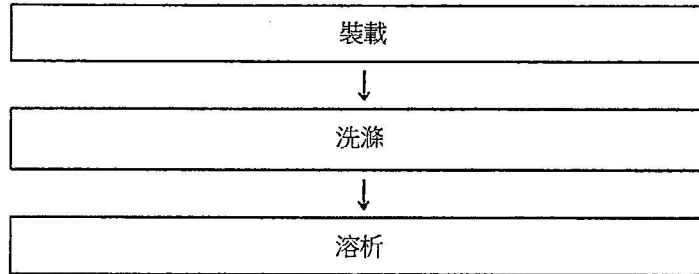


圖 2

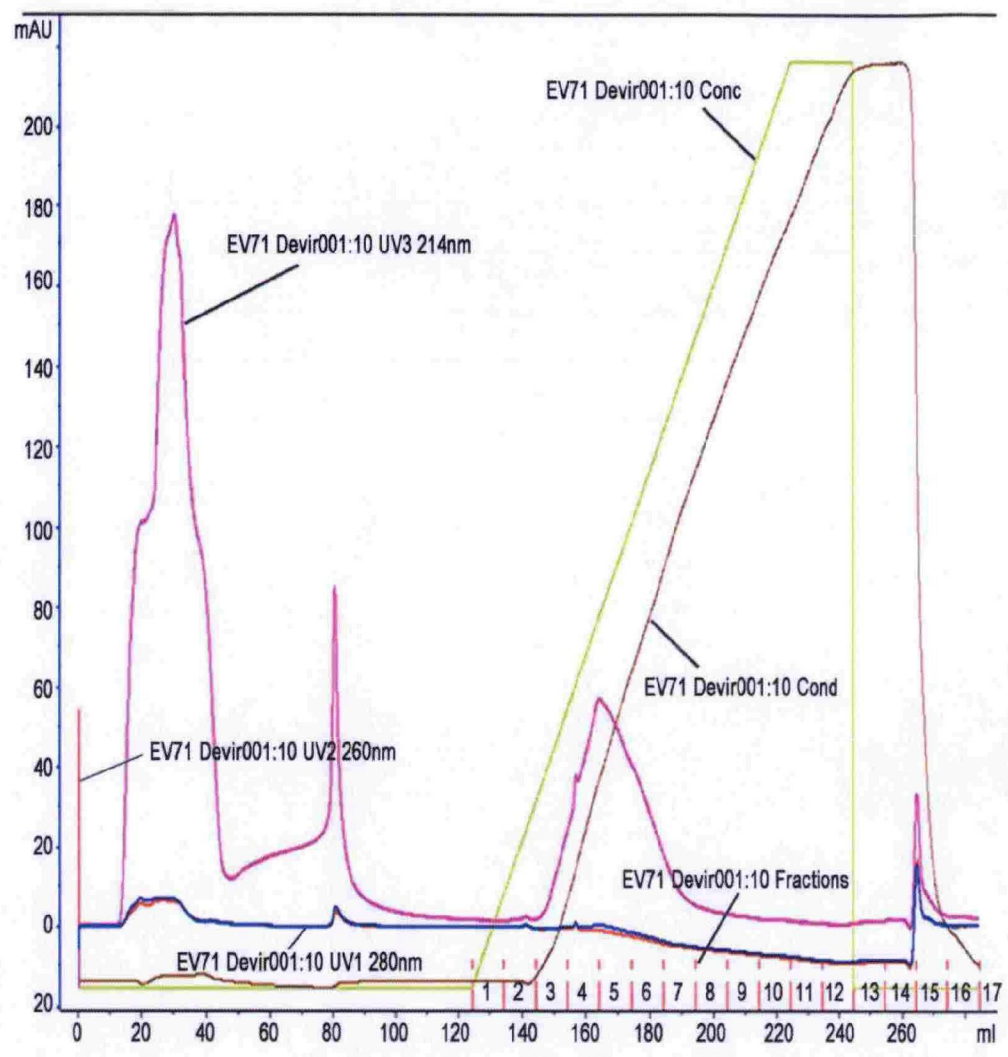


圖 3

使用包含硫酸葡聚醣之Cpto™ DeVirS 樹脂之純化

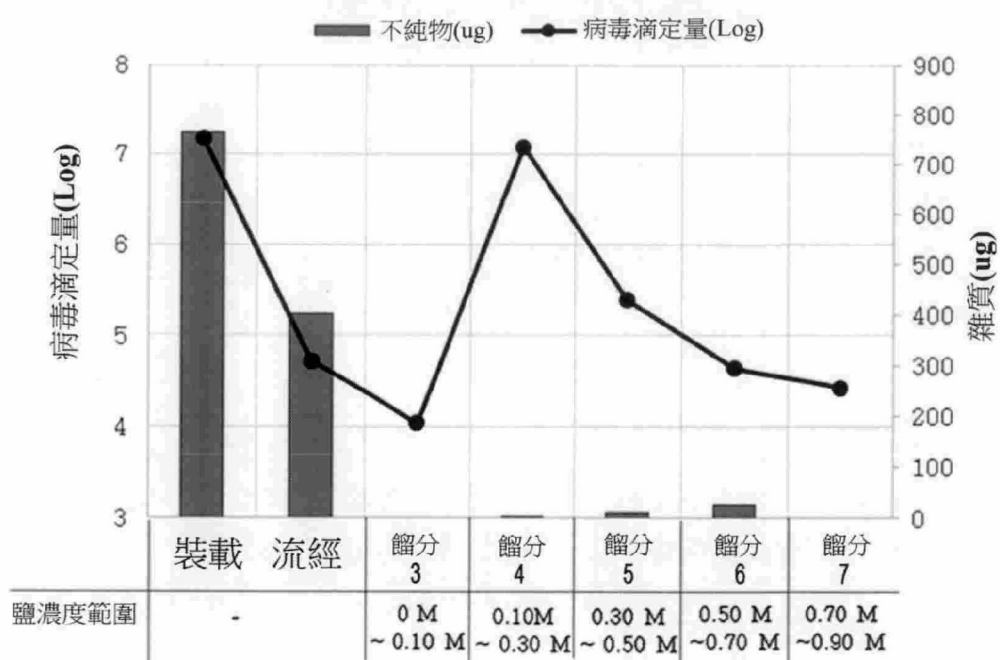


圖 4

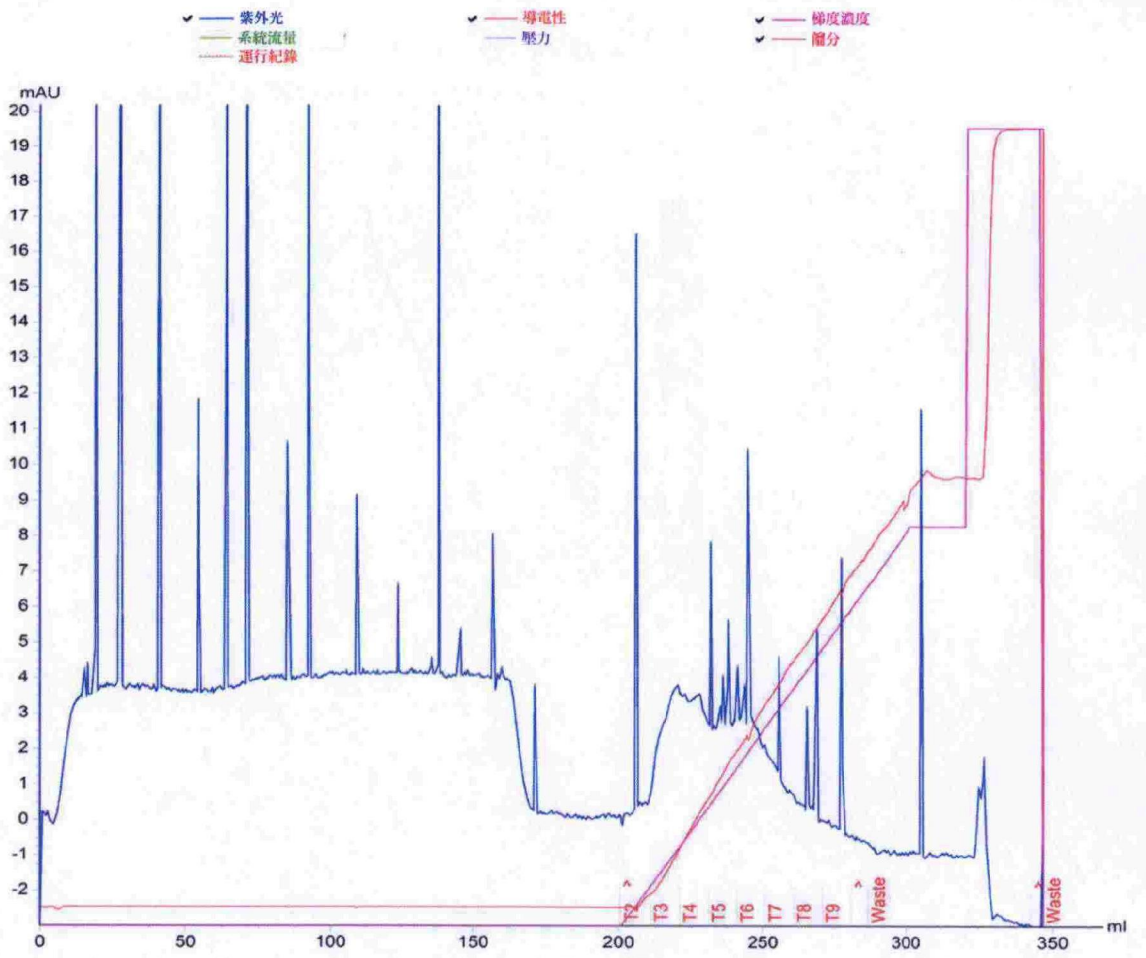


圖 5

使用包含肝素之HiTrap Heparin樹脂之純化

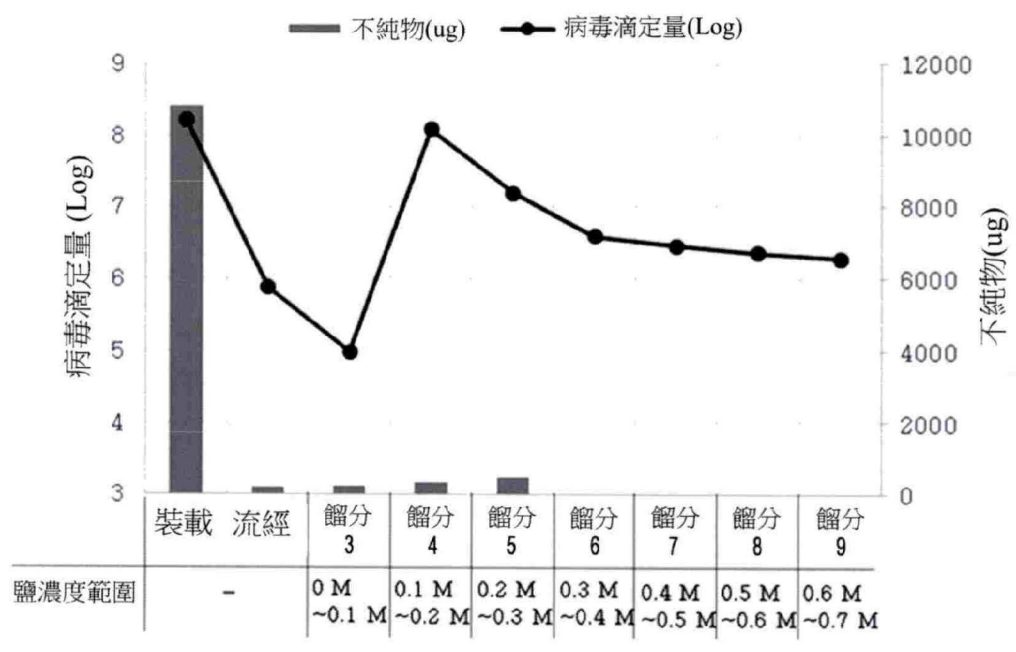


圖 6

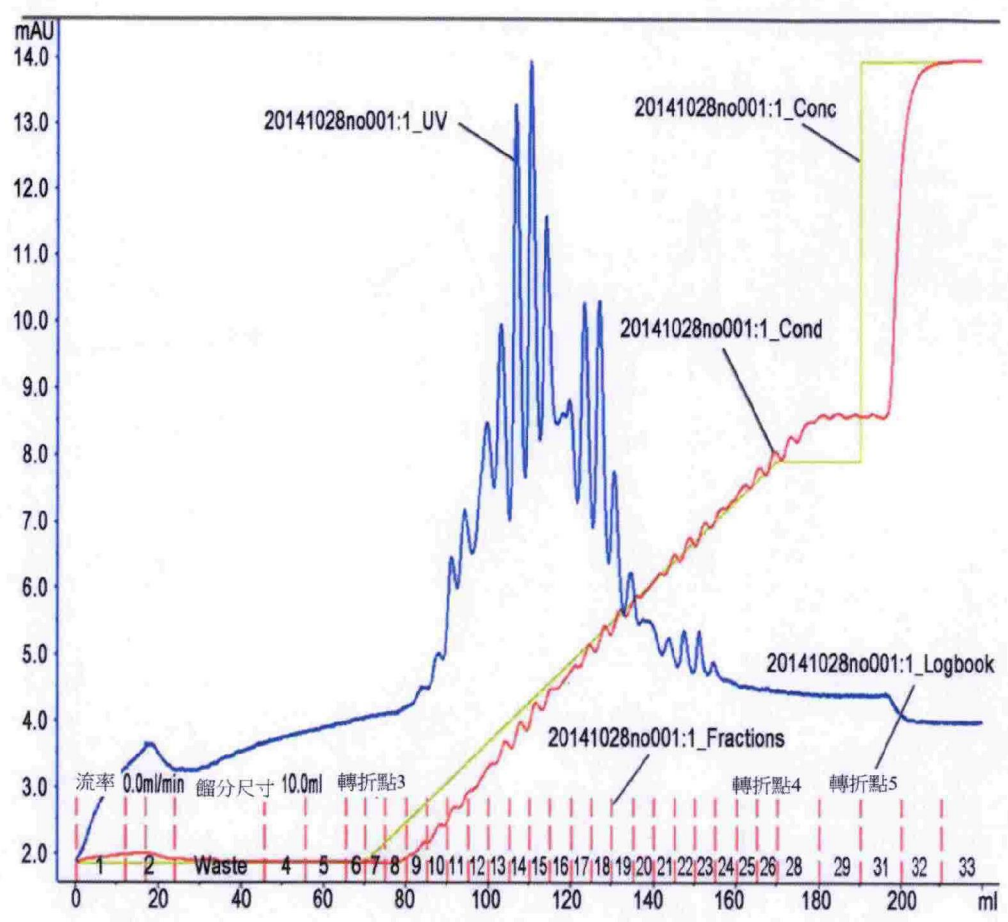


圖 7

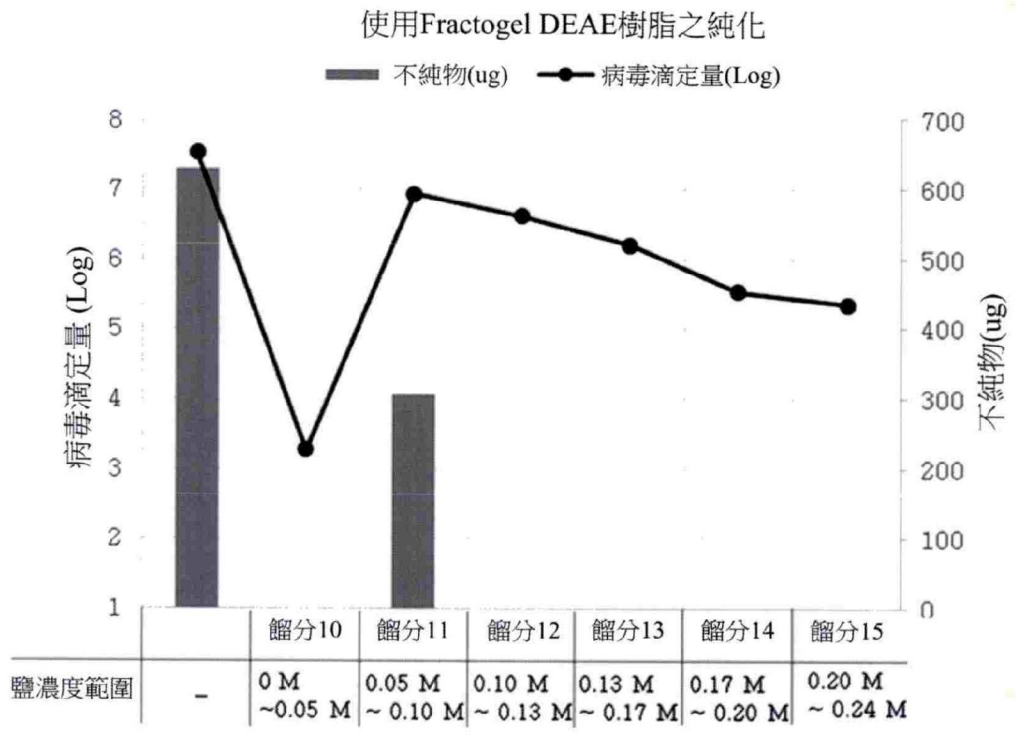


圖 8

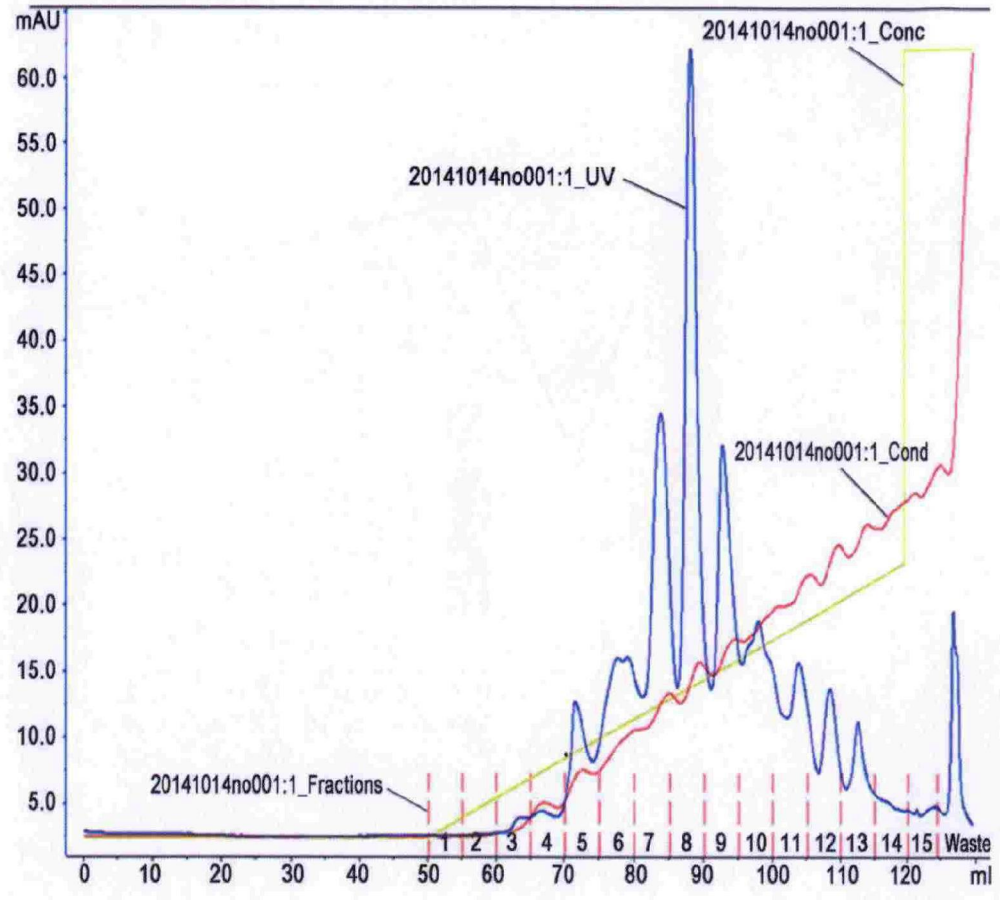


圖 9

使用Fractogel TMAE樹脂之純化

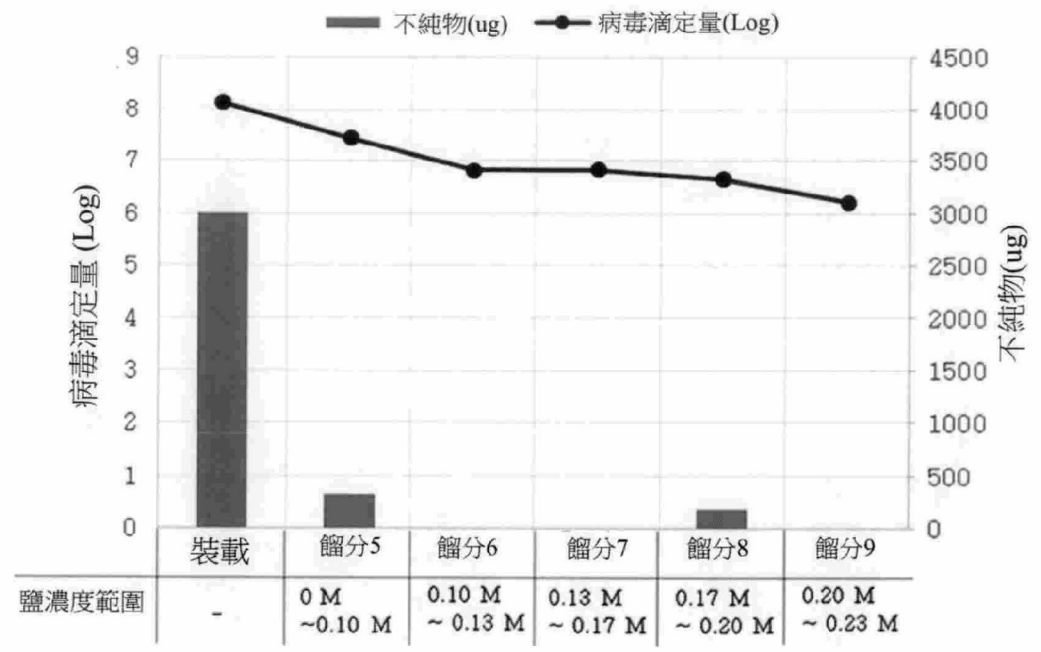


圖 10

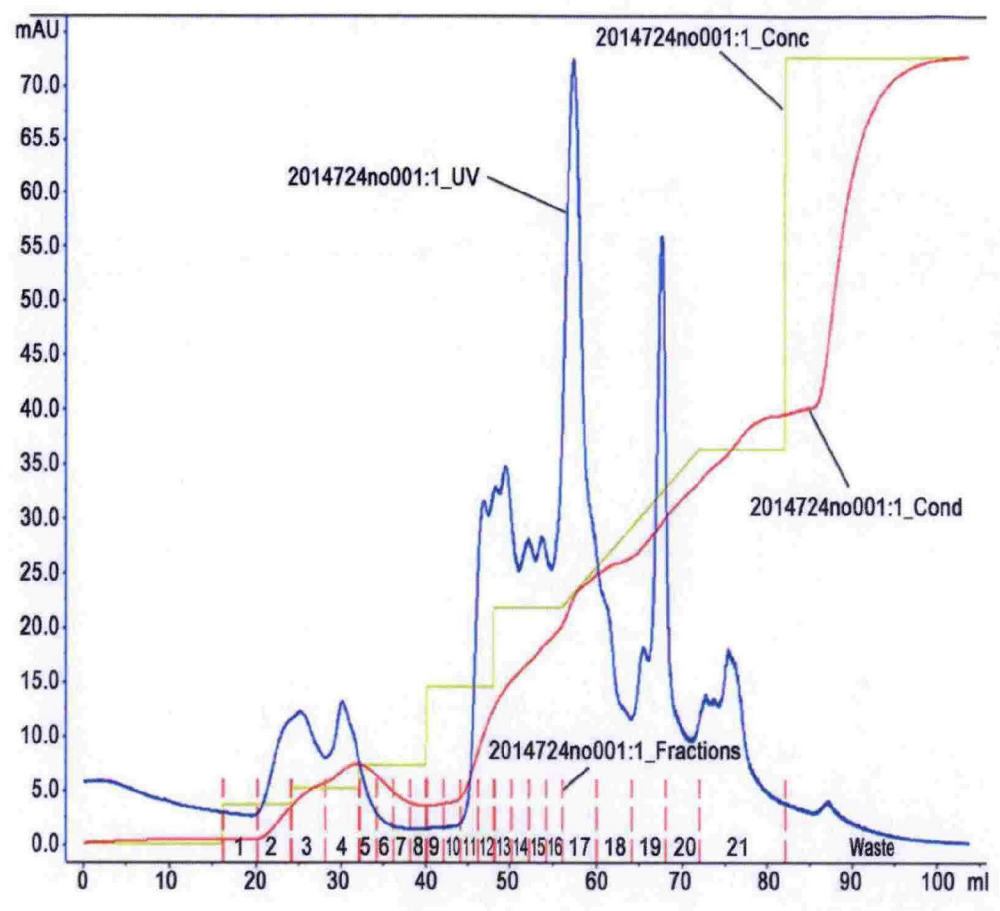


圖 11

使用CIM DEAE樹脂之純化

