



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1617882 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 02827638.8 *C12N 5/00* (2006.01)

(22) 申请日 2002.12.10 (56) 对比文件
US 6010844 A, 2000.01.04, 实施例.

(30) 优先权数据
10/006,223 2001.12.10 US 审查员 唐慧

(85) PCT申请进入国家阶段日
2004.07.28

(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2002/014005 2002.12.10

(87) PCT申请的公布数据
W02003/050275 EN 2003.06.19

(73) 专利权人 巴克斯特健康护理股份有限公司
地址 瑞士奥普菲孔

(72) 发明人 A·米特雷尔 C·陶尔 M·赖特尔
W·蒙德特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 李连涛 孟凡宏

(51) Int. Cl.
C12N 9/76 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 4 页

(54) 发明名称

从链霉蛋白酶中分离和纯化胰蛋白酶的方法及其用途

(57) 摘要

本发明提供在一步亲和层析中从链霉蛋白酶中分离和纯化灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT) 的方法以及纯化的 SGT 的用途。

1. 纯化的灰色链霉菌胰蛋白酶制品,所述制品的纯度至少为 95%灰色链霉菌胰蛋白酶,比活性至少为 $25 \times 10^3 \text{U/mg}$ 蛋白,并且进一步含有 0.5M-1.2M 精氨酸。
2. 根据权利要求 1 的制品在生物方法中的用途,所述生物方法包括细胞培养、病毒激活和蛋白纯化方法。
3. 生产细胞生物量的方法,包括提供细胞培养物、使用根据权利要求 1 的制品传代和传代培养所述的细胞以及使所述细胞生长到生物量的步骤。
4. 根据权利要求 3 的方法,其中让细胞在无血清培养基中生长。
5. 生产病毒或病毒抗原的方法,包括提供细胞培养物、使所述细胞生长到生物量、用病毒感染所述生物量的细胞以及培育所述的细胞以繁殖所述病毒的步骤,其中使用根据权利要求 1 的制品传代和传代培养所述细胞。
6. 生产病毒或病毒抗原的方法,包括提供细胞培养物、用病毒感染所述细胞、添加比活性至少为 $25 \times 10^3 \text{U/mg}$ 蛋白的纯化的灰色链霉菌胰蛋白酶制品以激活所述病毒以及收获所生产的所述病毒的步骤,其中使用根据权利要求 1 的制品传代和传代培养细胞,所述病毒从由副粘病毒、正粘病毒、轮状病毒组成的组中选出。
7. 根据权利要求 7 的方法,进一步包括纯化所生产的所述病毒的步骤。
8. 从重组细胞中生产重组产品的方法,包括提供重组细胞的细胞培养物的生物量、在生产重组产品的条件下培养所述细胞以及收获所生产的所述重组产品的步骤,其中使用根据权利要求 1 的制品传代和传代培养所述细胞。
9. 根据权利要求 1 的制品在病毒或病毒抗原的纯化方法中的用途。
10. 根据权利要求 1 的制品用于生产病毒疫苗产品的用途。
11. 根据权利要求 1 的制品用于从前蛋白活化蛋白的用途。

从链霉菌蛋白酶中分离和纯化胰蛋白酶的方法及其用途

发明领域

[0001] 本发明的目的是在一步亲和层析步骤中从链霉菌蛋白酶中分离和纯化灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT) 的方法以及纯化的 SGT 的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 胰蛋白酶是存在于各种各样哺乳动物的消化道中的丝氨酸蛋白酶。其功能是水解裂解肽键,因而降低大蛋白的体积并使其易于被其它蛋白酶进一步降解。在生物技术应用中,尤其是在哺乳动物细胞的培养中使用胰蛋白酶,其作为分解大细胞聚集物,或从象微载体或培养皿的表面除去细胞的工具。在非胰蛋白酶敏感的生物聚合体的加工中也使用胰蛋白酶作为蛋白降解酶。由于其公知的专一性,因此在分析和制备方法中胰蛋白酶也用作选择性的蛋白裂解工具。胰蛋白酶可被许多特异的或非特异的蛋白酶抑制剂灭活或者抑制,它们中的许多属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族。在生物技术应用中最广泛使用的是来自大豆的胰蛋白酶抑制剂。由于这些胰蛋白酶抑制剂中的大多数是非常特异的,因此它们对其它污染的蛋白酶无活性。

[0004] 胰蛋白酶一般是从各种动物种属的十二指肠腺中制备的并纯化到不同的纯度等级。可通过许多不同的生物化学方法,包括沉淀、离子交换层析以及亲和层析进行胰蛋白酶的纯化。已经证明纯化的牛胰蛋白酶 (I 型) 结合到固定在不溶载体上的胍脒,并可通过高浓度的胍或精氨酸或者通过降低洗脱液的 pH 将其洗脱下来 (Elouali 等,1991, Chromsymp, 2215 :255-265)。从哺乳动物胰腺中获得的哺乳动物胰蛋白酶也含有丝氨酸蛋白酶胰凝乳蛋白酶,其在理化特性,包括与胍衍生物的相互作用以及亲和作用上非常类似于胰蛋白酶。结果,这两种蛋白很难分离。视纯化方法而定,纯化的胰蛋白酶制剂因此可能含有不同量的污染酶,特别是胰凝乳蛋白酶。此外,来源于哺乳动物的胰蛋白酶可能含有外来试剂,如病毒和朊病毒。自从发现 TSE 试剂的作用以及其传染给人的可能性后,一直不断地在讨论在提供人使用药品的生物技术方法中是否使用人或动物来源的材料。

[0005] 链霉菌蛋白酶,一种来源于微生物灰色链霉菌 (*S. g.*) 的链霉菌蛋白酶,是从动物组织中制备的胰蛋白酶的可商业供应的替代物。链霉菌蛋白酶一直用于从组织中制备原代细胞培养物,以及将细胞从表面、微载体细胞培养物和在无血清培养基中悬浮生长的 VERO 细胞中分离 (Weinstein 1966, Exper. Cell Res. 43 :234-236 ;Manousos 等,1980, In vitro 16 : 507-515, Litwin 1992, Cytotechn. 10 :169-174)。其作用的确切机制不清楚。已知链霉菌蛋白酶是不同酶,包括各种类型的内肽酶、(丝氨酸和金属蛋白酶)、外肽酶(羧肽酶和氨肽酶)、中性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、羧肽酶、氨肽酶、以及中性和碱性磷酸酶的混合物。

[0006] 在酶处理后,通常添加胎牛血清抑制胰蛋白酶的活性,胎牛血清含有许多特异和非特异的蛋白酶抑制剂。然而,在疫苗和治疗蛋白生产中使用的细胞培养基中优选无血清和蛋白(特别是哺乳动物来源的)的培养基。因此,使用缺乏任何胰蛋白酶抑制剂活性的无血清培养基使得必需鉴定抑制剂活性的新来源。因为链霉菌蛋白酶是各种蛋白酶的混合物,因此蛋白酶活性的抑制需要不同抑制剂的混合物,导致非常复杂和昂贵的方法。由于无血

清培养物中使用链霉蛋白酶和抑制剂组合物所产生的蛋白负荷将远高于使用哺乳动物来源的胰蛋白酶和特异性胰蛋白酶抑制剂的培养物。而且,向培养基中添加链霉蛋白酶也将不利地影响纯化过程,因为在培养基中存在更多的蛋白。

[0007] 链霉蛋白酶的胰蛋白酶样活性,通常称为灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT),显示大约 33% 的序列与牛胰蛋白酶相同 (Olafson 等,1975, Biochem 14 :1168-1177)。已经使用不同类型的离子交换树脂通过层析技术纯化了灰色链霉菌胰蛋白酶。这些方法一般使用稳定基质,其使洗脱期间配体流入产品的问题减至最低程度。然而这些方法的选择性相对较低,导致纯化系数在 < 10 的范围。结果,为了获得高纯度,必需结合几个步骤,其转而可能导致胰蛋白酶的自身消化并因此丧失活性。Jurasek 等 (1971, Can. J. Biochem. 49 :1195-1201) 和 Olafson 等 (1975a, Biochem. 14 :1168-1177 ;1975b, Biochem. 14 :1161-1167) 已经描述了在 CM-Sephadex 上通过离子交换层析纯化,进而在离子交换柱中通过再层析进一步进行纯化。Miyata 等 (1991, Cell Structure and Function 16 :39-43) 描绘了三步阳离子交换层析法纯化 SGT。发现 SGT 在 PAGE 中作为分子量约 30,000 的单一一条带迁移并具有通过 BAEE 分析测定的高于牛胰蛋白酶的酯酶活性。然而,发现甚至通过三步层析纯化方法纯化的 SGT 也轻微污染羧肽酶 B 样活性。

[0008] 使用衍生自鲑精蛋白的胰蛋白酶消化物的寡肽作为高度特异的 SGT 配体,通过亲和层析也已经从链霉蛋白酶中纯化了 SGT。然而,用盐酸从链霉蛋白酶的蛋白酶混合物中洗脱胰蛋白酶样活性显示,发现纯化的 SGT 受羧肽酶 B 样活性污染 (Kasei 等,1975, J. Biochem. 78 :653-662 ;Yokosawa 等,1976, J. Biochem. 79 :757-763)。如果仅为了分析目的,也可以使用苜蓿作为配体通过亲和电泳 (affinophoresis) 从链霉蛋白酶中分离 SGT (Shimura 等,1982. J. Biochem. 92 :1615-1622)。

[0009] 需要简单的大规模分离和离析链霉蛋白酶的活性胰蛋白酶样部分的方法。这将允许在细胞培养方法中使用受控系统,并且提供确定微生物来源的馏分的活性,这将不具有人类病原体污染物的风险。

[0010] 也需要在细胞增殖 / 生长、生物质生产和产品生产过程中避免来自细胞培养基添加剂的污染物。降低细胞培养基中的蛋白负荷将允许用常规的纯化方法生产高纯度的蛋白产品。

[0011] 发明概述

[0012] 因此,本发明的一个目的是提供从链霉蛋白酶中分离纯化的灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT) 的方法。

[0013] 发明的另一个目的是提供具有高比活性的纯化的 SGT 制剂。

[0014] 发明的另一个目的是提供纯化的 SGT 在生物技术方法中的用途。

[0015] 发明的另一个目的是提供使用纯化的 SGT 生产真核细胞生物质的用途。

[0016] 发明的另一个目的是提供使用纯化的 SGT 生产病毒或病毒抗原的用途。

[0017] 发明的另一个目的是提供使用纯化的 SGT 生产仅用纯化的 SGT 进行细胞传代和传代培养生物产品的用途。

[0018] 附图的简要描述

[0019] 图 1 显示离子交换层析的 SDS-PAGE,其中第 1 泳道:根据实施例 1A 的离子交换层析的洗脱液,第 2 泳道:用 1M 精氨酸从根据实施例 1B 的亲和层析中洗脱后的纯化的 SGT。

[0020] 图 2 显示未纯化的灰色链霉菌链霉菌蛋白酶和纯化的 SGT 的 SDS-PAGE, 其中第 1 泳道: 未纯化的链霉菌蛋白酶, 第 2 泳道: 亲和层析的流通液, 第 3 道: 亲和层析和用 1M 精氨酸洗脱后的纯化的灰色链霉菌胰蛋白酶。

[0021] 图 3 显示在亲和层析和用 1M 精氨酸洗脱后, 两批不同纯化的 SGT 的蛋白质印迹分析。

[0022] 图 4 显示纯化的 SGT 的反相 HPLC 层析谱。

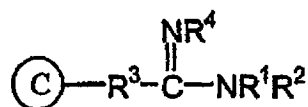
[0023] 发明详述

[0024] 发明的一个目的是提供大规模纯化灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT) 的简单方法。本发明的方法可用于大规模纯化 SGT, 并且在一些利用生理可接受的洗脱剂的实施方案中, 提供备用用于各种生物技术方法的稳定的 SGT 制剂。

[0025] 在一个实施方案中, 本发明致力于通过一步亲和层析分离 SGT 的方法, 其中将链霉菌蛋白酶与固定的亲和部分 (例如, 脘、胍或含胺的物质) 接触, 用与作为亲和部分的化合物相同类型的一种化合物选择性地从柱中洗脱胰蛋白酶。洗脱剂作为固定到载体上的 SGT 亲和部分的竞争剂。因而, 在一些实施方案中, 选择对 SGT 的亲合性高于亲和部分的洗脱剂。

[0026] 根据本发明的一些实施方案, 将链霉菌蛋白酶与固定化的包含脘的亲和柱接触。这里使用的术语“脘”包括脘及其衍生物 (例如, 其中连到脘基氮 (=NH) 上的氢原子被取代或未取代的烷基取代, 被取代或未取代的杂烷基取代, 被取代或未取代的芳基取代, 以及被取代或未取代的杂芳基取代)。在这些实施方案中, 脘具有下列结构:

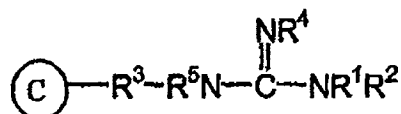
[0027]



[0028] 其中插入了字母“C”的圆圈代表柱或其它固体载体成分。符号 R^1 , R^2 和 R^4 各自独立选自氢、取代或未被取代的烷基、取代或未被取代的杂烷基、取代或未被取代的芳基以及取代或未被取代的杂芳基。 R^3 可以存在或者不存在, 并且可以有除了氢之外的上面列举特征中的任何一个。典型的脘衍生物包括取代的或未取代的苄脘物质。可用的脘包括但不限于苄脘盐酸盐; 对氨基苄脘二盐酸盐; 双 (5-脘基-2-苯并咪唑基)-甲烷; a, a'-双 (4-脘基-2-碘苯基)-对二甲苯; 1,2-双 (5-脘基-2-苯并咪唑基)-乙烷; 以及 6-脘基-2-(4-脘基苯基)-苯并-[β] 噻吩。

[0029] 在另一个示范的实施方案中, 亲和部分是胍。这里使用的术语“胍”包括胍及其衍生物 (例如, 其中连到脘基氮 (=NH) 上的氢原子被取代或未取代的烷基取代、被取代或未取代的杂烷基取代、被取代或未取代的芳基取代以及被取代或未取代的杂芳基取代)。在这些实施方案中胍衍生物具有下列结构:

[0030]



[0031] 其中插入了字母“C”的圆圈代表柱或其它固体载体成分。符号 R^1 , R^2 , R^4 和 R^5 各自独立选自氢、取代或未被取代的烷基、取代或未被取代的杂烷基、取代或未被取代的芳基

以及取代或未被取代的杂芳基。R³ 可以存在或者不存在,并且可以有除了氢之外的上面列举特征中的任何一个。典型的含胍物质包括胍基乙酸及其衍生物、取代或未取代的胍基苯甲酸、精氨酸及其类似物(例如,在羧基或 α -氨基处衍生的)。

[0032] 在另一个示范的实施方案中,亲和部分是含胺的物质。在实施本发明中使用的示范性的含胺物质包括氨基酸和氨基酸类似物(例如,在羧基或 α -氨基处衍生的)。在本发明中使用的典型的氨基酸是赖氨酸、其衍生物、 ϵ -氨基己酸等等。

[0033] 除非另有说明,术语“烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,意指直链或支链或者环状烷基,或者其组合,其可以是完全饱和的,单或多不饱和的并可以包括二价和多价自由基,具有指定的碳原子数(也就是 C₁-C₁₀ 指 1-10 个碳)。

[0034] 这里使用的“烷基”也包括“亚烷基”基团。术语“亚烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,意指来源于链烷的二价自由基,例如但不限于 -CH₂CH₂CH₂CH₂-, 进一步包括下面描述为“杂亚烷基”的那些基团。典型地,烷基(或亚烷基)基团将有 1-24 个碳原子,在本发明中优选具有 10 个或更少碳原子的那些基团。“低级烷基”或“低级亚烷基”是短链烷基或亚烷基,通常具有 8 个或更少的碳原子。

[0035] 除非另有说明,术语“杂烷基”本身或与其它术语组合,意指稳定的直链或支链或者环状烷基,或者其组合,由所述数量的碳原子和至少一个杂原子组成,其中杂原子从由 O、N、Si 和 S 构成的组中选出,其中可任选地氧化氮和硫原子,可任选地季铵化氮杂原子。

[0036] 除非另有声明,术语“芳基”意指多不饱和的芳香族的烃取代基,其可以是单环或者是稠合在一起的或共价连接的多环(优选 1-3 个环)。术语“杂芳基”是指含有 1-4 个选自 N、O 和 S 杂原子的芳基基团(或环),其中可任选地氧化氮和硫原子,可任选地季铵化氮原子。可通过杂原子将杂芳基连接到分子的其余部分上。上述芳基和杂芳基环系统中的每一个取代基从下面提到的可接受的取代基组中选出。

[0037] 如上面提到的,洗脱剂与使用的亲和部分相同或是其类似物。典型地,洗脱剂对 SGT 的亲合力将超过柱上的亲和部分。在一些实施方案中,洗脱剂是精氨酸。洗脱液中洗脱剂(例如精氨酸)的浓度通常至少为约 0.5M。已经发现浓度在约 0.5M 和约 1.2M 之间的洗脱液提供高纯度的 SGT 制品。最优选地是在约 0.8M 和约 1.0M 之间的浓度。通过本发明方法获得的产量高于现有技术的离子交换层析方法。

[0038] 在提供的方法中,从各种蛋白酶的混合物中选择性地纯化 SGT,其中的一些,特别是胰凝乳蛋白酶具有相似的理化特性,其很难用已知的方法分离。然而,用本发明的方法使用精氨酸浓度在约 0.5M 和约 1.2M 之间的洗脱液,可以从链霉菌蛋白酶混合物中选择性地将 SGT 与其它蛋白酶分离。

[0039] 洗脱液经典地包含精氨酸作为洗脱剂,并且可具有在约 pH 4.0 和约 9.0 之间,优选地在约 pH 5.0 和约 7.0 之间的 pH。其它可使用的胍衍生物类似物包括但不限于精氨酸类似物,如在分子的羧基端上修饰的类似物(参见,例如 Kasai, K. (1992) *Journal of Chromatography* 597, 3-18); 含有精氨酸作为 C-端氨基酸的肽,如亮抑蛋白酶肽,胃蛋白酶抑制剂(参见,例如 Kasai, supra); 赖氨酸或赖氨酸的类似物和含赖氨酸作为 C-端氨基酸的肽; 磺胺甲基异噻唑及其衍生物(参见,例如 Wu, X. 和 Liu, G. (1996) *Biomedical Chromatography* 10, 228-232); 胍及其在间位和 / 或对位上修饰的类似物; 胍及其衍生物(参见,例如 Ellouali 等, (1991) *Journal of Chromatography* 548, 25-265)。

[0040] 洗脱液可进一步包括无机盐。无机盐可以是钠盐、磷酸盐或硫酸盐。通常优选钠盐,如氯化钠。无机盐的浓度可在约 0.1M 和约 1M 之间。优选洗脱剂中的浓度在约 0.5M 和约 1.0M 之间。

[0041] 本发明的方法方便地在亲和层析柱中实施。可将任何可结合到亲和部分的基质用作亲和载体。这类基质或载体可选自琼脂糖如 **Sepharose®** (Pharmacia)、多孔颗粒或珠如 **Poros®** (Applied Biosystems) 或 **Toyopearl®** (Tosohaas) 或其它基于纤维素、葡聚糖、丙烯酸酯或硅酸盐的载体。

[0042] 在本发明的方法中,优选将链霉蛋白酶溶解。溶解剂可以是缓冲液,其中缓冲液可以是 Tris-HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液或硫酸盐缓冲液。任选地,缓冲液可包含盐,如钠盐。缓冲液优选具有约 6.0 和约 8.0 之间的 pH。将链霉蛋白酶与载体基质接触,通过竞争性洗脱,经典地用精氨酸来选择性地洗脱 SGT。

[0043] 当利用精氨酸作为洗脱剂时,通过这种方法获得的纯化 SGT 存在于含有约 0.5M 到约 1.2M 精氨酸的溶液中。这个实施方案的优点在于由于溶液中洗脱剂(例如精氨酸)的稳定特性而不必添加稳定剂。因此,纯化的 SGT 可以不用进一步添加任何稳定剂而储存在溶液中。通过该方法获得的 SGT 纯度至少为约 95%,优选地至少为约 98%,并且基本上无任何其它酶,如胰凝乳蛋白酶。

[0044] 在一些实施方式中,当洗脱剂不是生理上可接受的时,从纯化的 SGT 中除去洗脱液。可以使用许多标准方法中的任何一种用于这种目的。这些方法包括使用具有适当的分子量截止值的膜进行透析或超滤,允许洗脱剂通过,而将 SGT 阻滞在存留液中。这种膜是公知的,并且可以用再生纤维素、PVDF、聚醚砜等制造。也方便地使用各种层析技术,利用分子差异例如大小、电荷、疏水性、亲和性等。其它方法涉及洗脱剂或 SGT 的沉淀以及依赖洗脱剂与 SGT 具有不同的溶解特性。通常,当使用高亲和性的洗脱剂时,在除去洗脱剂前必需首先从 SGT 中分离出洗脱剂。典型的做法是改变环境参数如 pH、离子强度、温度、介电常数等。这些方法在现有技术中也是公知的。

[0045] 本发明进一步提供纯度至少为约 95% 的纯化的 SGT 的制品。纯化的制品常含有浓度至少为约 0.6M 的精氨酸。本发明的 SGT 制品具有至少约 25×10^3 U/mg 蛋白的比活性。优选地,比活性至少为约 40×10^3 U/mg 蛋白。

[0046] 发明的制品典型地在室温下在精氨酸约 0.5M 到约 1.2M 之间的溶液中能稳定存在至少 2 周,在 4°C 下至少 4 周。为了更长时间地贮藏可将制品冷冻或低压冻干。

[0047] 这里使用的“稳定”意指通过洗脱直接从亲和载体获得的原始 SGT 制品在室温下每 24 小时的比活性降低少于 5%。

[0048] “纯化的 SGT 制品”意指通过蛋白印迹分析和 HPLC 测定的纯度至少约 95% 的制品。SGT 的纯度也可以通过制品的残余胰凝乳蛋白酶活性来测定。通过胰凝乳蛋白酶的特异性酶试验测定制品中可能残留的胰凝乳蛋白酶的活性。这些分析可以根据例如实施例 1 中描述的方法进行。如果试验结果显示在制品中无可检测到的胰凝乳蛋白酶活性,那么该制品则被定义为无胰凝乳蛋白酶活性。

[0049] 可通过许多方法测定“比活性”。一个实例是特异性胰蛋白酶活性试验,如对特异性底物的酯酶活性,特异性底物例如为 N-苯甲酰基-L-精氨酸乙酯 (BAEE) 或 N-苯甲酰基-L-异亮氨酰-L-谷氨酰-甘氨酸-L-精氨酸-对-硝基-N-酰苯胺盐酸盐 (S222)。这

些分析根据例如实施例 1 和 2 中描述的方法进行。

[0050] “特异性”意指胰蛋白酶的抑制剂对纯化 SGT 的特异性抑制。胰蛋白酶抑制剂可来自植物或动物来源,如大豆或鸡蛋蛋白的胰蛋白酶抑制剂。

[0051] 可使用纯化的可商业得到的猪或牛来源的胰蛋白酶作为所有酶分析的对照。

[0052] 当使用生理上可接受的洗脱液如精氨酸时,本发明的方法是高效和简单的,因为仅需一个层析步骤就可获得高纯度的 SGT 制品。制品在洗脱剂中稳定并可贮藏在溶液中无显著的酶活性丧失。用这种方法获得高产量、高特异性活性和纯度的纯化 SGT。

[0053] 本发明提供纯化 SGT 的方法,其中将酶选择性地吸收到亲和部分(例如苯脒)上以及用亲和部分的类似物(例如精氨酸)通过竞争性洗脱来洗脱完整的 SGT。通过使用非常温和的竞争性洗脱方法,避免了配体如苯脒流入终产品中。此外,大量过剩的洗脱剂,例如精氨酸通过避免制备和贮藏过程中的自身消化而抑制酶的自身催化活性,并维持稳定的纯化的产品。另一个优点是终产品可以在生物技术方法中直接用于其预期目的,因为精氨酸与大多数细胞培养或纯化过程完全相容。

[0054] 根据本发明制备的最终纯化产品的生理特性允许其直接在例如细胞培养技术、蛋白纯化方法或任何其它使用胰蛋白酶的方法中使用。由于非常相似的作用模式和特异性,因此实际上可以在所有的生物技术应用中将 SGT 用作哺乳动物胰蛋白酶的替代品。当纯化到高度一致时,可通过公知的胰蛋白酶抑制剂完全抑制酶。

[0055] 根据发明的另一个方面,在生物方法,如细胞培养、病毒激活或纯化中使用本发明的纯化的 SGT。例如,纯化的 SGT 用于使真核细胞脱离基质,可任选地进而用于细胞的传代培养,或者用于发酵罐中的接种。本发明的 SGT 可以用于细胞的增殖和或/脊椎动物细胞的细胞培养生物物质的生产。

[0056] 本发明的 SGT 也可以用于细胞生物物质的生产或用于培养皿、Roux 扁瓶、滚瓶或微载体培养中表面依赖性真核细胞的传代。培养物可以是单层培养物、微载体培养物,用于层细胞的悬浮,从组织中分离细胞或者制备原代细胞培养物。脊椎动物细胞可以是来源于动物组织如器官,原代细胞或连续细胞系的任何细胞。原代细胞可来自猴肾、仓鼠肾、狗肾、卵巢或其它已知用于生产原代细胞培养物的器官。连续细胞系细胞的实例是 VERO ;CV-1 ; CHO ;BHK ;MDCK ;MRC-5, MDBK, WI-38 以及包括转化、转染和重组细胞。

[0057] 优选细胞在无血清培养基中培养和生长。培养基可以是基本培养基,如 DMEM 和 DMEM HAM' s F12 和现有技术中已知的其它基本培养基,如 Kistner 等 (1998, Vaccine 16 : 960-968) 描述的培养基。最优选地,细胞在如 WO 96/15213, WO 00/0300 或 WO 01/23527 中描述的无血清和蛋白的培养基中生长,其中所述的基本培养基可以补充酵母提取物或大豆蛋白胨。

[0058] 根据发明的另一个方面,纯化的 SGT 用于生产病毒或病毒抗原。该方法包括提供细胞培养物,使细胞生长到生物量以及用病毒感染细胞的步骤,其中通过使用本发明的纯化 SGT 传代和传代培养细胞。优选细胞在无血清或者无血清和蛋白的培养基中培养和生长。

[0059] 本发明提供的方法结合了细胞生物物质和病毒生产方法,其中所有步骤均在避免有任何哺乳动物来源,如培养基中血清或蛋白的条件下进行。此外,在传代和传代培养期间,由于细胞培养物中 SGT 的高特异性活性可以减少蛋白负荷。该方法因此显著减少污染蛋白

的总蛋白负荷。

[0060] 可用于本发明的病毒的实例是下列病毒家族组中的病毒：正粘病毒、副粘病毒、呼肠病毒、细小核糖核酸病毒、黄病毒、沙粒病毒、疱疹病毒、痘病毒、鼻病毒、呼肠病毒以及腺病毒。优选选自下列病毒组中的病毒：脊髓灰质炎病毒、流感病毒、Ross River 病毒、甲型肝炎病毒、风疹病毒、轮状病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、痘苗病毒和重组痘苗病毒、单纯疱疹病毒、TBEV、日本脑炎病毒、西尼罗病毒、黄热病毒及其嵌合体。筛选用于繁殖期望病毒的适宜宿主细胞和易感宿主病毒的方法是公知的。细胞可从上面描述的细胞中选出。

[0061] 根据特定的实施方案，将纯化 SGT 用于生产病毒或病毒抗原，其中通过蛋白酶激活病毒。这类病毒选自副粘病毒、正粘病毒和轮状病毒。该方法包括提供细胞培养物，用选自副粘病毒、正粘病毒和轮状病毒的病毒感染细胞，用纯化的 SGT 接触病毒以激活病毒，繁殖病毒以及收获产生的病毒的步骤，其中使用本发明的纯化 SGT 传代和传代培养细胞。

[0062] 为了细胞的传代和传代培养，以约 $4\ \mu\text{g}$ 和约 $1000\ \mu\text{g}$ 之间的量加入本发明的纯化的 SGT，依细胞培养物类型、培养物或培养基的体积以及培养过程中使用的纯化 SGT 的比活性而定。使用约 $26 \times 10^3\text{U}/\text{mg}$ 蛋白比活性的 SGT 制品，对于静置的培养物，加入的蛋白量可在约 $4\ \mu\text{g}/150\text{cm}^2$ 到约 $50\ \mu\text{g}/150\text{cm}^2$ 之间的范围内，对于滚瓶在约 $50\ \mu\text{g}/850\text{cm}^2$ 到约 $100\ \mu\text{g}/850\text{cm}^2$ 之间的范围内，对于微载体培养物在每升培养基约 $1000\ \mu\text{g}$ 到约 $2000\ \mu\text{g}/$ 每升培养基之间的范围内。确定最适传代和传代培养所需蛋白酶 / 蛋白的最小量在本领域技术人员的知识范围内。使用本发明的纯化 SGT 的优点是 (i) 避免动物来源的蛋白，和 (ii) 由于 SGT 在至少 5 倍到至少 25 倍之间的高比活性，与常规使用动物来源胰蛋白酶的细胞培养物相比，减少了蛋白负荷。

[0063] 根据本发明的一个方面，将本发明的纯化 SGT 用于在无血清和蛋白的培养基中生长的细胞生物物质的生产，其中使用纯化的 SGT 传代和传代培养所述的生物物质，与在相同条件下使用哺乳动物来源的胰蛋白酶培养的细胞培养物相比，总蛋白酶蛋白负荷减少了至少 75%。

[0064] 为了激活病毒，可以以培养物体积 (cm^2 或 cm^3) 约 $10\ \mu\text{g}$ 到 $500\ \mu\text{g}$ 的总蛋白量使用本发明的纯化 SGT，依使用的纯化 SGT 的比活性而定。依照描述的实施例并调整最适合病毒激活和进而病毒繁殖所需的至少 $2 \times 10^4\text{U}/\text{mg}$ 特定比活性的纯化 SGT 的总蛋白量在本领域技术人员的知识范围内。

[0065] 通过使用纯化的 SGT 制品进行传代，传代培养和任选的病毒激活与常规方法获得的细胞培养物相比，来自生物物质生产和病毒繁殖过程的蛋白负荷可减少至少 75%，优选至少 90%。

[0066] 通过所描述的方法获得病毒或病毒抗原制品，其中与常规细胞培养获得的制品相比，细胞和细胞培养基的污染蛋白的总蛋白负荷减少至少 75%，其中常规培养是在相似条件下培养但使用哺乳动物来源的胰蛋白酶。

[0067] 如上面描述的使用本发明的纯化 SGT 培养细胞并可任选地激活病毒的方法可进一步包括纯化所生产的病毒的步骤。由于污染蛋白（不是产品 / 病毒特异性的蛋白）的低负荷，可通过进一步纯化除去残余污染蛋白。获得的纯化病毒制品可进一步配制免疫原性组合物，如预防或治疗疫苗。

[0068] 根据本发明的另一个方面,在纯化过程中使用纯化的 SGT。对于广泛的纯化方法,使用特异蛋白酶如胰蛋白酶降解污染蛋白,其接着通过进一步的纯化步骤如过滤、层析或离心方法除去。可在制备纯化病毒如 HAV 的纯化方法中高效地使用本发明的纯化的 SGT。确定最适条件所需的本发明的最少纯化的 SGT 在本领域技术人员的知识范围内。

[0069] 本发明的纯化的 SGT 也可用于从重组细胞中生产重组产物。这种用途包括提供表达外源多肽或蛋白的重组细胞的细胞培养物,在生产重组多肽或蛋白的条件下培养细胞以及收获生产的所述重组多肽或蛋白的步骤,其中使用本发明的纯化的 SGT 进行传代和传代培养所述的细胞。优选地,细胞在无血清或无血清和蛋白的培养基中生长。细胞可以是重组细胞,如重组 CHO 细胞,能够表达重组蛋白。

[0070] 通过所描述的方法获得重组产物,其中与通过常规细胞培养获得的制品相比,来自细胞和细胞培养基的污染蛋白的总蛋白负荷减少了至少 75%,其中常规培养是在相似条件下培养。

[0071] 根据另一个方面,使用本发明的纯化 SGT 控制从原蛋白到其成熟形式的加工,例如在液体中或固定在不溶载体上如美国专利 No. 6, 010, 844 中描述。

[0072] 本发明的纯化的 SGT 可用于生物技术仪器的清洁,如被蛋白污染的过滤器、发酵罐等,可通过 SGT 的蛋白酶解活性消解污染蛋白。

[0073] 现在一般性地描述了本发明,可通过参考下列实施例理解本发明,其中这里提供的实施例仅仅是为了举例说明的目的,而不应当是限定。

[0074] 实施例 1:

[0075] 从链霉蛋白酶中纯化灰色链霉菌胰蛋白酶

[0076] A. 离子交换层析

[0077] 将 30g 链霉蛋白酶 (Boehringer Ingelheim) 溶解在缓冲液 A (0.02 吡啶, pH 5.0) 中制成终浓度 40mg/ml 的链霉蛋白酶。将 25ml 该溶液在用缓冲液 A 平衡的 CM 琼脂糖凝胶 C1-6B (Pharmacia) 上进行阳离子交换层析。在室温下用 5 倍柱体积的缓冲液 A (0.02M 吡啶) 和缓冲液 B (0.75M 吡啶 pH5.0) 的线性梯度进行洗脱。

[0078] 通过将馏分样品与大豆抑制剂按 1 : 10 的比例 (例如 1mg 大豆抑制剂 / 100 μ g 蛋白) 混合来检测所收集馏分的抑制特性,随后使用 S2222 进行层析底物分析。结果以每分钟的 Δ 吸光度单位 (ΔA /分钟) 表示。通过 SDS-PAGE 和用考马斯染色进一步分析对大豆抑制剂具有最高抑制活性的馏分 (图 1, 第 1 泳道。)

[0079] 使用 N-苯甲酰基-L-精氨酸乙酯 (BAEE, Tris 缓冲液 pH8.0, 20mM 氯化钙, 25 $^{\circ}$ C) 作为底物通过显色分析测定胰蛋白酶活性并且测定每分钟的 Δ 吸光度单位。使用比活性为 13×10^3 U/mg 的猪胰蛋白酶溶液 (1mg/ml) 作为对照参照。比活性定义为每 mg 蛋白的胰蛋白酶酶活性单位。结果总结在表 1 中。

[0080] 使用 3-羧基甲氧基丙酰基-L-精氨酸-L-丙基-L-酪氨酸-p-硝基酰苯胺盐酸盐 (S-2586, Chromogenix) 通过显色分析测量胰凝乳蛋白酶活性。结果表示为每分钟 Δ 吸光度单位 (ΔA /分钟)。

[0081] 表 1

[0082] 通过离子交换层析纯化链霉蛋白酶

[0083]

灰色链霉菌链霉蛋白酶	未纯化的链霉蛋白酶	纯化的馏分
蛋白(克)	1	0.08
比活性 U/mg	1.6×10^3	16.5×10^3
回收的 U%	100	70
通过 SDS-PAGE 测定的稳定性	n. d.	不稳定, 低分子量碎片
通过大豆抑制剂测定的抑制(抑制%)	n. d.	90 ± 0.1
胰凝乳蛋白酶活性(ΔA /分钟)	450	38

[0084] *n. d. 未测定

[0085] 表 1 显示含有具有胰蛋白酶样活性的蛋白的馏分可通过离子交换层析纯化, 其比活性高于链霉蛋白酶约 10 倍, 并且回收到约 70% 的活性, 正如用大豆抑制剂的抑制试验测定的那样。然而, 该蛋白不稳定, 在 SDS-PAGE 中显示的不是单一条带, 而是多个条带。这是蛋白碎裂和自我裂解的迹象(图 1, 第 1 泳道)。

[0086] B. 在固定化的苜蓿上的亲和层析

[0087] 将 40ml 链霉蛋白酶的溶液(75mg/ml, 缓冲液 A) 装入用缓冲液 A(50mM Tris, 0.5M 氯化钠 pH7.0) 平衡的苜蓿琼脂糖凝胶 6B 速流柱(Pharmacia)。用缓冲液 B(50mM Tris, 0.5M 氯化钠 pH 7.0, 10mM 盐酸苜蓿 pH 7.0)、缓冲液 C(0.5M 氯化钠, 0.6M 精氨酸, pH 5.5) 或缓冲液 D(0.5M 氯化钠, 1M 精氨酸, pH 5.5) 进行洗脱。

[0088] 用大豆抑制剂测试所收集馏分的抑制特性, 以及按照实施例 1A 中描述的方法测试胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性。测定比活性, 以每毫克蛋白酶活性单位表示。

[0089] 表 2

[0090] 通过固定化的苜蓿上的亲和层析和用苜蓿洗脱纯化链霉蛋白酶

亲和层析和用苜蓿洗脱 (缓冲液 B)		
灰色链霉菌链霉蛋白酶	未纯化的链霉蛋白酶	纯化的馏分
蛋白 (克)	3	0.13
比活性 U/mg	1.6×10^3	19×10^3
[0091] 回收的 U%	100	60
通过 SDS - PAGE 测定的稳定性	稳定	稳定
通过大豆抑制剂测定的抑制 (抑制%)	n. d	$99.98 \pm 0.1\%$
胰凝乳蛋白酶活性 (Δ A/分钟)	n. d	0.1

[0092] 在表 2 中总结的结果显示,通过苜蓿的竞争性洗脱,以高比活性回收的 60%的链霉蛋白酶的纯化胰蛋白酶样活性。然而,优选进一步纯化含有纯化的胰蛋白酶样蛋白酶的馏分,在用于包括细胞培养物生长或生产应用于人的生物制品的方法中之前除去苜蓿。

[0093] 表 3

[0094] 通过固定化的苜蓿的亲和层析和用 0.6M 精氨酸和 1M 精氨酸洗脱纯化链霉蛋白酶

[0095]

亲和层析和用 0.6 M 精氨酸洗脱 (缓冲液 C)		
灰色链霉菌链霉蛋白酶	未纯化的链霉蛋白酶	纯化的馏分
蛋白 (克)	3	0.13
比活性 U/mg	1.6×10^3	26×10^3
回收的 U%	n. d	63
通过 SDS - PAGE 测定的稳定性	稳定	稳定
通过大豆抑制剂测定的抑制 (抑制 %)	n. d	$99.89 \pm 0.1 \%$
胰凝乳蛋白酶活性 (Δ A/分钟)	n. d	<0.1
亲和层析和用 1 M 精氨酸洗脱 (缓冲液 D)		
灰色链霉菌链霉蛋白酶	未纯化的链霉蛋白酶	纯化的馏分
蛋白 (克)	3	0.13
比活性 U/mg	1.6×10^3	46.5×10^3
回收的 U%	n. d	71%
通过 SDS - PAGE 测定的稳定性	稳定	稳定
通过大豆抑制剂测定的抑制 (抑制 %)	n. d	$99.99 \pm 0.1 \%$
胰凝乳蛋白酶活性 (Δ A/分钟)	n. d	<0.1
LAL (EU / 1000U)	88	<4

[0096] 从表 3 的结果可以看出,当使用含 0.6M 精氨酸的缓冲液时,回收到约 63% 的链霉蛋白酶的最初胰蛋白酶样活性,而用含 1M 精氨酸的缓冲液时回收到约 71% 的活性。用精氨酸从苜蓿亲和载体上洗脱的纯化 SGT 与通过离子交换层析或用苜蓿从苜蓿载体上洗脱获得的 SGT 相比,也具有较高的比活性。此外,当使用含精氨酸体积摩尔浓度逐渐增高的缓冲液时获得更高纯度和比活性的产品。

[0097] 通过 SDS-PAGE 分析未纯化的灰色链霉菌链霉蛋白酶样品、亲和层析柱流通液以及用 1M 精氨酸洗脱的纯化 SGT (图 2)。

[0098] 通过用来自豚鼠的抗 SGT 血清的蛋白印迹进一步分析对大豆抑制剂具有最高抑制活性的馏分样品 (图 3)。通过分析性反相 HPLC 测定 SGT 的纯度,其中将纯化的 SGT 装入反相柱 (Nucleosil 300-5C18-150×2mm) 中并用乙腈线性梯度洗脱。图 4 给出了反相

HPLC 的层析谱。以主峰值对总峰面积的相对值表示纯度。纯化 SGT 的反相 HPLC 表明纯度 > 95%。层析谱显示相当于 SGT 的尖峰。使用联机 HPLC-电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 测定纯化的 SGT 的分子量。如此,层析谱的主峰分子量为 23096.5D,其与理论质量 23099D 极为一致。数据通过正确的 N 端 (NH₂-V-V-G-G-T-R-A-A-Q-G-E-F-P-F-M-V-) 评估得到进一步证实。

[0099] 通过在苜蓿上的一步亲和层析和用精氨酸洗脱纯化的纯化胰蛋白酶样蛋白酶在精氨酸溶液中稳定。纯化的产品在 SDS-PAGE 中显示单一条带并且如图 1(第 2 泳道)没有可见的显著的低分子量多肽碎片,而通过离子交换层析纯化的 SGT 分裂成如图 1(第 1 泳道)中所见的低分子量多肽。

[0100] 通过用精氨酸竞争性洗脱的亲和层析纯化方法导致至少 95%纯度的纯化 SGT,如通过 SDS/蛋白印迹和 HPLC 显示,其是完整和稳定的。另外,其基本上无其它蛋白酶活性,特别是胰凝乳蛋白酶、内毒素以及与方法有关的杂质,如苜蓿。由于在纯化的 SGT 制品中含有高浓度的精氨酸,SGT 在室温下至少稳定 2 周并且显示无自身催化活性、产品的不稳定性、SGT 降解产物或比活性丧失的增加。在 0.5M 到 1.2M 之间 (pH 在 2 和 10 之间)的精氨酸溶液中稳定的 SGT 制品在绝大多数生物方法中是生理上可接受的,并且易于用于进一步的方法,如蛋白、病毒的活化,或者如下面描述的纯化方法。

[0101] 实施例 2

[0102] 测定用于哺乳细胞培养的猪胰蛋白酶和纯化 SGT 的酶活性

[0103] 通过使用 BAEE (N-苯甲酰基-L-精氨酸乙酯) 作为底物测量每种酶的蛋白含量和酯酶活性,其中所述酶是猪胰蛋白酶(纯度级, IX 型, 结晶的, Sigma)、链霉蛋白酶(纯度级, Boehringer Ingelheim) 和根据实施例 1B 通过苜蓿琼脂糖 6B 亲和层析以及用 0.6M 精氨酸洗脱获得的纯化 SGT。这个结果和进一步的实验总结在表 4 中。

[0104] 表 4

[0105] 用于 Vero 培养实验的蛋白酶的比活性

[0106]

蛋白酶	BAEE 活性 (单位 /ml)	蛋白 (μg/ml)	BAEE 活性 / 蛋白 (U/μg)
猪胰蛋白酶	12,555	940	13.4
粗链霉蛋白酶	1,844	740	1.5
纯化的 SGT	8,564	330	26.0

[0107] 实施例 3

[0108] 测定无血清和蛋白的 VERO 细胞传代培养的总蛋白负荷

[0109] 在无血清和蛋白的培养基中培养购自美国典型细胞培养物保藏中心, Rockville, Maryland, 指定名称为 ATCC CCL 81 的传代 124 次的 VERO 细胞(非洲绿猴, *Cercopithecus aethiops*, 肾)。如 Kistner 等(1998, Vaccine 16:960-968, WO 96/15231, 或 US 6,100,061)描述的,使细胞在无血清或无血清和蛋白的培养基中适应性生长。对于在无血清的培养基中的生长,使用补充了无机盐、氨基酸、碳酸氢钠(2g/l)以及酵母或大豆提取

物 (0.1 到 10g/l) 的基本 DMEM HAM's F12 培养基。不使用任何动物来源的培养基成分来制备工作细胞库。

[0110] 在补充了大豆或酵母提取物的无血清培养基中重新悬浮一安瓿 VERO 细胞工作细胞库 (WCB) 的细胞, 其中在 DMEM 培养基与 Ham's F12 营养物以 1 : 1 比例混合的混合物中培养 VERO 细胞。

[0111] 将在 $1 \mu\text{g}$ 和 $10,000 \mu\text{g}$ 之间的不同蛋白浓度的猪胰蛋白酶 (纯度级, IX 型, 结晶的, Sigma)、链霉蛋白酶 (纯度级, Boehringer Ingelheim) 和具有如实施例 2 测定的比活性的纯化 SGT 加到 T- 瓶的静止培养物、转瓶中的细胞或者结合到微载体的细胞中。在表 5 中给出了细胞完全脱离和随后附着 (传代培养) 培养物所需的胰蛋白酶、链霉蛋白酶和纯化 SGT 的总蛋白量。

[0112] 表 5 显示当使用纯化的 SGT 时, 细胞脱离和传代所需蛋白酶的总蛋白负荷相对于使用胰蛋白酶所需的量在静止培养中减少了 4%, 在滚瓶中减少了 17%, 在微载体培养系统中减少了 20%。

[0113] 表 5

[0114] 比较 VERO 细胞完全脱离和传代培养所需蛋白酶的总蛋白量

[0115]

细胞培养类型	猪胰蛋白酶 (μg)	纯化 SGT (μg)	蛋白负荷的缩小
静止培养 (150cm^2)	100	4	25 倍
转瓶 (850cm^2)	300	51	6 倍
微载体培养 (1 升)	5,000	1,000	5 倍

[0116] 实施例 4

[0117] 哺乳动物来源的胰蛋白酶、链霉蛋白酶和纯化的 SGT 对细胞生长影响的比较

[0118] 在小规模的基础上, 比较在静止培养 (T- 瓶) 和微载体培养 (**Cytodex3®**, Pharmacia) 中生长的 Vero 细胞的细胞附着和增殖特性。如上面描述的在无血清和蛋白培养基中培养 VERO 细胞。

[0119] VERO 细胞或者在 T- 瓶内生长或者在微载体上生长 (37°C , CO_2 浓度 5-10%)。通过使用实施例 3 中测定的猪胰蛋白酶 (纯度级, IX 型, 结晶的, Sigma) 和链霉蛋白酶 (纯度级, Boehringer Ingelheim) 进行传代培养, T- 瓶终量为 $100 \mu\text{g}$, 微载体培养物为 $5000 \mu\text{g}$ 。将比活性为 $2.6 \times 10^4 \text{U/mg}$ 的纯化 SGT 以终量 $4 \mu\text{g}$, 微载体培养物 $1000 \mu\text{g}$ 加到 T- 瓶培养中。通过目测和计数非附着细胞测量细胞附着和细胞生长, 并以增殖活性表示。表 6 显示以占生长在 T- 瓶或微载体上的 VERO 细胞总量的百分数表示增殖活性。

[0120] 表 6

[0121] 胰蛋白酶、链霉蛋白酶和 SGT 对细胞增殖活性的影响

[0122]

细胞培养类型	蛋白酶 (μg)		
	胰蛋白酶	链霉蛋白酶	纯化 SGT
T-瓶	100 μg	100 μg	4 μg
附着/生长	90 - 100 %	90 - 95 %	90 - 100 %
微载体培养	5000 μg	5000 μg	1000 μg
附着/生长	95 - 100 %	70 %	95 - 100 %

[0123] 如表 6 所示,粗链霉蛋白酶不充分允许生长在无血清培养基中的 Vero 细胞的重复转移,而纯化的 SGT 与猪胰蛋白酶一样有效,但显著减少终蛋白负荷。

[0124] 实施例 5

[0125] 使用纯化的 SGT 在 Vero 细胞中生产病毒抗原

[0126] 5.1 流感病毒的体内激活和在转瓶中生产病毒

[0127] 将两种 Vero 培养物在转瓶中生长到融合,细胞终密度为每单位约 2×10^8 。用 0.01 感染复数的流感病毒 Nanchang A/H3N2 株感染培养物。加入猪胰蛋白酶(总蛋白量:500 μg)或纯化 SGT(总蛋白量:50 μg)用于流感病毒的体内激活,这使得病毒进一步增殖。48 小时后测定培养物中的血细胞凝集活性。

[0128] 表 7

[0129] 用胰蛋白酶或纯化的 SGT 体内激活流感病毒

[0130]

	胰蛋白酶	纯化 SGT
酶量	500 μg	50 μg
48 小时后的 HAU/ml	2560	2560

[0131] 表 7 中给出的数据显示为了有效地体内激活流感病毒和进行病毒增殖,与哺乳动物来源的胰蛋白酶相比,需要约十分之一总蛋白量的纯化 SGT。因此,使用纯化的 SGT 允许在体内激活步骤期间减少 90% 的总蛋白负荷,并且与哺乳动物来源的胰蛋白酶相比,在 Vero 细胞中产生相似的流感病毒增殖。

[0132] 5.2 在无血清和蛋白的培养基中生长的细胞内大规模生产流感病毒并且用纯化的 SGT 激活病毒

[0133] 在补充了大豆或酵母提取物的无血清培养基中重新悬浮一安瓿 VERO 细胞工作细胞库(WCB)中的细胞,其中在 DMEM 培养基与 Ham's F12 营养物以 1:1 比例混合的混合物中培养 VERO 细胞。从液氮中解冻具有确定的传代数的 Vero 细胞,并在 Roux 和转瓶中传代以生产足够接种 1.5 升生物反应器的细胞。细胞在 37°C 生长 6-8 天。控制培养条件:氧饱和度 $20\% \pm 10\%$ 、pH 7.1 ± 0.2 以及转速 30-60rpm。达到细胞终密度 $1.5(1.0-2.0) \times 10^6$ 个细胞/ml 后,用纯化的 SGT(1mg/升)分离细胞并转移到含 2.5g/l 浓度的微载体(Cytodex III®, Pharmacia)的 10 升生物反应器中。通过细胞的胰酶消化和用 CASY® 细胞计数器计数来测

定细胞数量。在融合培养条件下培养细胞以达到具有 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个细胞 /ml 的细胞密度的生物量。

[0134] 用流感病毒 Nanchang 株或 Texas-36 株感染生物物质。在病毒繁殖过程和流感病毒进一步分裂感染周期期间,以 $150 \mu\text{g/升}$ 的浓度添加纯化 SGT 来激活病毒。表 8 总结了 72 小时后通过 HAU/ml 测定的流感病毒的产量。

[0135] 表 8

[0136] 用纯化的 SGT 激活后不同流感病毒株的产量

[0137]

流感毒株	72 小时后的 HAU/ml
A/Nanchang033/95	10, 240
A/Texas-36	5, 120

[0138] 根据如表 8 中给出的结果,Vero 细胞传代和用纯化的 SGT 扩大在大规模生物反应器中高效地繁殖和生产了流感病毒。

[0139] 实施例 6

[0140] 通过无血清和蛋白培养基中生长的细胞内的繁殖获得的流感病毒抗原的纯度以及 SGT 或胰蛋白酶用于病毒激活的用途

[0141] 将两组 Vero 细胞的平行细胞培养物繁殖到实施例 5.2 描述的生物量,其中一组用胰蛋白酶传代和传代培养,一组在 Roux 和转瓶中用纯化的 SGT 生产足够接种 1.5 升生物反应器的细胞。当达到细胞终密度 $1.5(1.0-2.0) \times 10^6$ 个细胞 /ml 后,用纯化 SGT 和胰蛋白酶分离细胞并转移到含 2.5g/l 浓度微载体的 10 升生物反应器中。当在融合培养条件达到 $1.0-1.5 \times 10^6$ 个细胞 /ml 细胞密度后,用流感病毒 Texas-36 株 (0.01 感染复数) 感染生物物质。向各自细胞培养物中加入纯化的 SGT 或胰蛋白酶激活病毒。在病毒繁殖过程结束时,通过蔗糖梯度超速离心纯化含病毒的澄清的上清收获液。通过抗原对蛋白的比率测定蔗糖梯度纯化的抗原的纯度。通过 Wood 等 (1977, J. Biol. Stand. 5 :237-247) 描述的单向径向免疫扩散 (SRD) 测定血凝素的浓度,比较 72 小时后 A/Texas-36 株的结果。结果总结在表 9 中。

[0142] 表 9

[0143] 比较通过使用纯化 SGT 或胰蛋白酶繁殖的流感病毒制品的纯度

[0144]

活化的蛋白酶	72 小时后的 HAU/ml	SRD ($\mu\text{g/升}$)	SRD/ 蛋白比
纯化的 SGT	5, 120	1245	0.32
胰蛋白酶 (猪)	10, 240	1125	0.13

[0145] 从 Vero 细胞传代和用纯化的 SGT 放大获得的流感病毒制品允许产生具有较低蛋白污染的病毒抗原。这些结果显示,在简单的第一次纯化步骤后,与使用胰蛋白酶相比能获得

得较高纯度的病毒制品。此外,容量生物反应器的产率(以每个反应器容积的总 SRD 表示)增加 45%。

[0146] 实施例 7

[0147] 甲型肝炎病毒的生产

[0148] 7.1 在无血清和蛋白培养基上生长的细胞内生产 HAV 抗原

[0149] 使用克隆到细菌质粒 pHAV/7 (Cohen 等, 1987, J. Virol. 61 :3035-3039) 中的减毒株 HM175/7 基因组的全长 cDNA, 通过体外转录制备全长基因组 RNA。用体外转录的 HAV RNA 在 34°C 转染无血清和蛋白的 VERO 细胞, 以产生无外来试剂的 HAV HM175/7 病毒原种。根据实施例 5.2 制备 VERO 细胞生物物质。

[0150] 为了大规模生产 HAV HM175/7 病毒, 将生物量为 1×10^{11} 个细胞的 VERO 细胞培养物接种在微载体上, 在 37°C 无血清培养基条件下在 100 升发酵罐中繁殖。将温度降至 34°C, 在随后的发酵周期期间细胞数量增加 8 到 10 倍。在终发酵罐中用 HAV 以 0.01 到 0.1 的感染复数感染细胞。通过细胞培养基的持久灌流, 感染细胞可在 34°C 进行繁殖直到 350 天。当在培养基中检测到病毒抗原时, 收集含病毒的上清液并贮藏在 4°C。在感染后 35-45 天开始收获细胞培养物上清液。

[0151] 7.2 HAV 收获物的纯化和纯化的 HAV 的表征

[0152] 通过在 Prostack 超滤膜 200K 上的超滤以及随后用交换成 50mM Tris 缓冲液 pH8.0, 0.01% Tween 缓冲液的渗滤步骤 (Prostack 200K, 渗滤膜), 将实施例 7.1 的细胞培养物上清液的 HAV 收获物浓缩 100 倍。在室温下通过把渗滤保留物与浓度为 1000U/L (溶于 1mM 氯化钙) 商品名 **Benzonase®** 一起温育 3 小时, 除去制品中可能存在的残余的宿主细胞核酸, 其中 **Benzonase®** 是来自粘质沙雷氏菌的核酸内切酶, 以商品名 **Benzonase®** 商业供应 (Benzon Pharma/S)。随后, 加入浓度 0.5 到 5U/ml 的纯化的灰色链霉菌胰蛋白酶 (SGT), 将滞留物在室温下进一步温育 24 小时。宿主细胞污染物, 也就是核酸和 / 或蛋白, 通过用 20mM PBS pH7.4 作为缓冲液在 100K 膜上渗滤而被除去。

[0153] 在每次过滤步骤期间采取含有至少 1000 ELISA 单位 /ml HAV 抗原的样品进行 SDS-PAGE, 并进行银染以显现总蛋白或者通过蛋白印迹分析以测定 HAV 的特异抗原。使用对 HAV 衣壳蛋白特异的抗血清, 通过蛋白印迹分析方法鉴定 HAV 的特异抗原。显示在纯化过程期间除去了 HAV 的前体蛋白。在用纯化的 SGT 处理后, 在不存在于渗滤保留物中的细胞培养物上清物的原材料中检测到 HAV 的特异多肽, 而 HAV 特异的衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 不受蛋白酶处理的影响。通过对不同中间物的银染和蛋白印迹分析, 清楚地表明使用纯化 SGT 的蛋白酶处理纯化方法的效率。

[0154] 使用升高的抗 VERO 细胞蛋白的抗血清进行的蛋白印迹分析显示在原材料和纯化中间物中可检测到宽范围的占绝对多数的高分子量 VERO 蛋白。然而, 在最终的滞留物中仅检测到较少 VERO 细胞蛋白污染物。这显示用高度纯化的 SGT 处理在 HAV 生产和纯化过程期间高效地降解了 VERO 细胞蛋白污染物和 HAV 前体多肽。

[0155] 实施例 8

[0156] 通过固定化的纯化的 SGT 将凝血酶原活化成凝血酶以及通过亲和层析回收凝血酶

[0157] 将纯化的 SGT (100mg 蛋白 /g 湿凝胶) 偶联到琼脂糖凝胶上 (5000BAEE U SGT/ml

凝胶)。用 0.1ml 固定化的 SGT- 琼脂糖填充玻璃柱,在与 US 6,010,844 中描述的条件相同条件下将重组的凝血酶原上到固定化的 SGT 上。根据 US 6,010,844 描述的方法分离和制备凝血酶,其方法在此并入作为参考。

[0158] 提供上面的实施例用于举例说明本发明,但不限定其范围。对于本领域普通技术人员来说,本发明的其它变化是非常显而易见的,并且包含在所附权利要求中。所有这里引用的出版物、专利以及专利申请在此并作为参考目的。

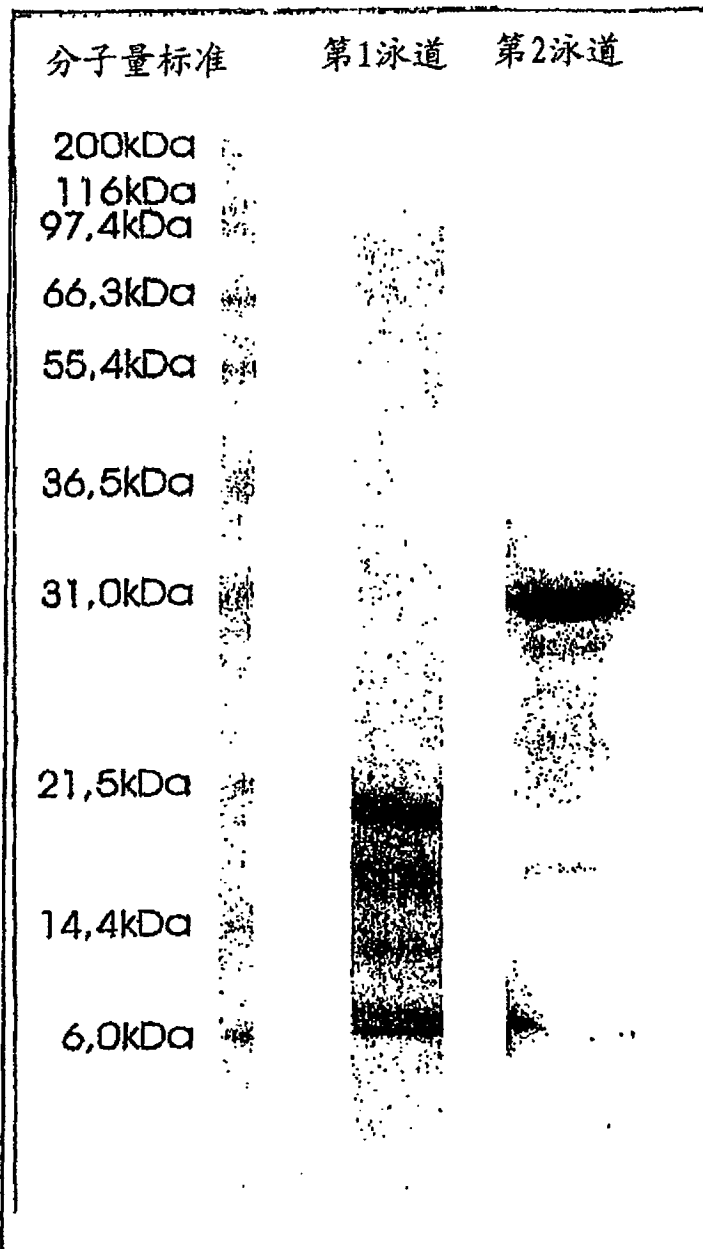


图 1

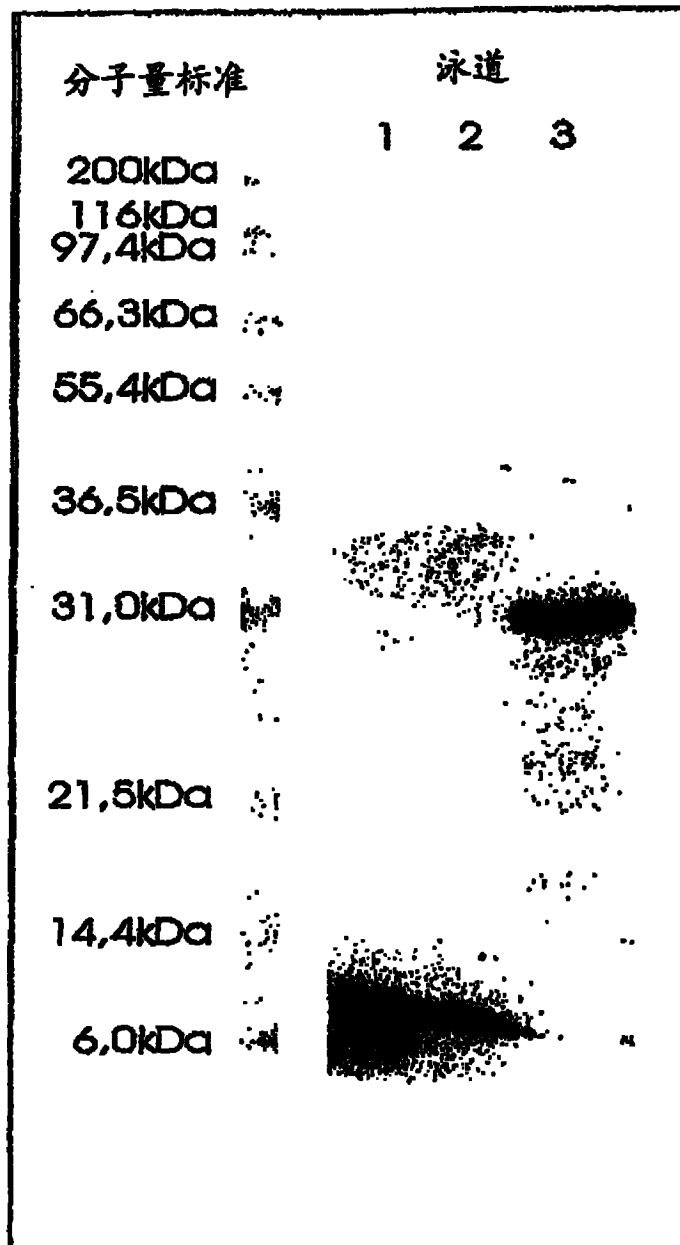


图 2

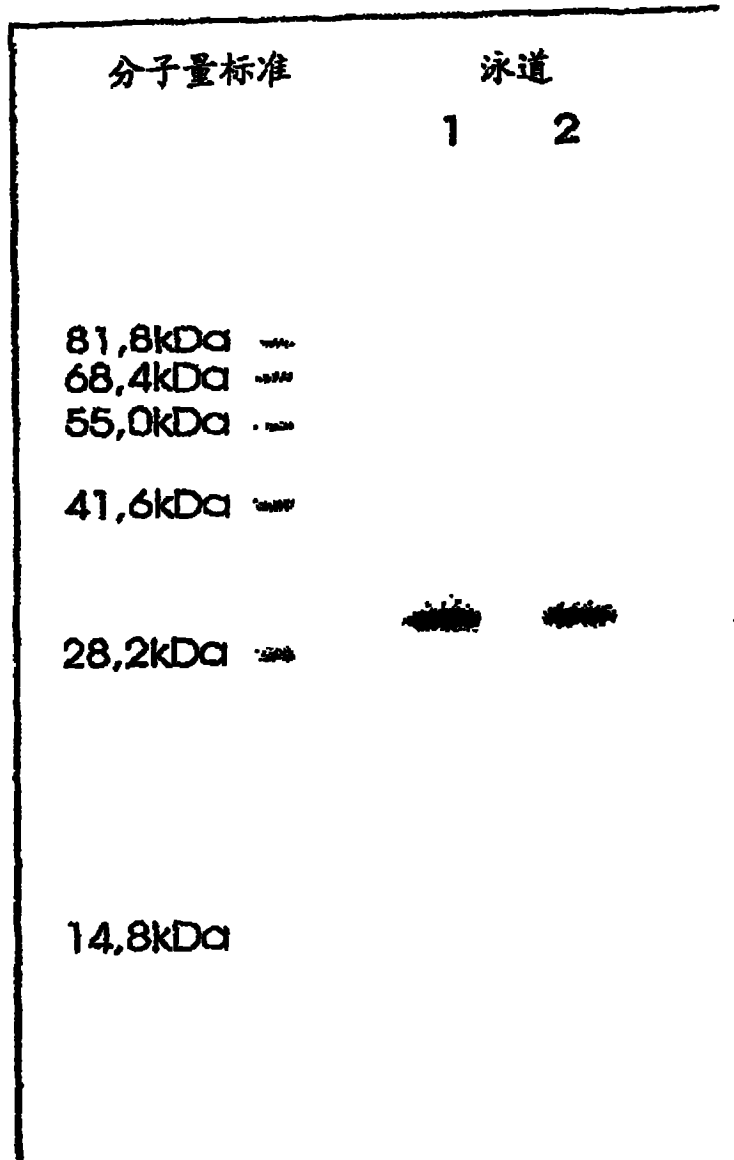


图 3

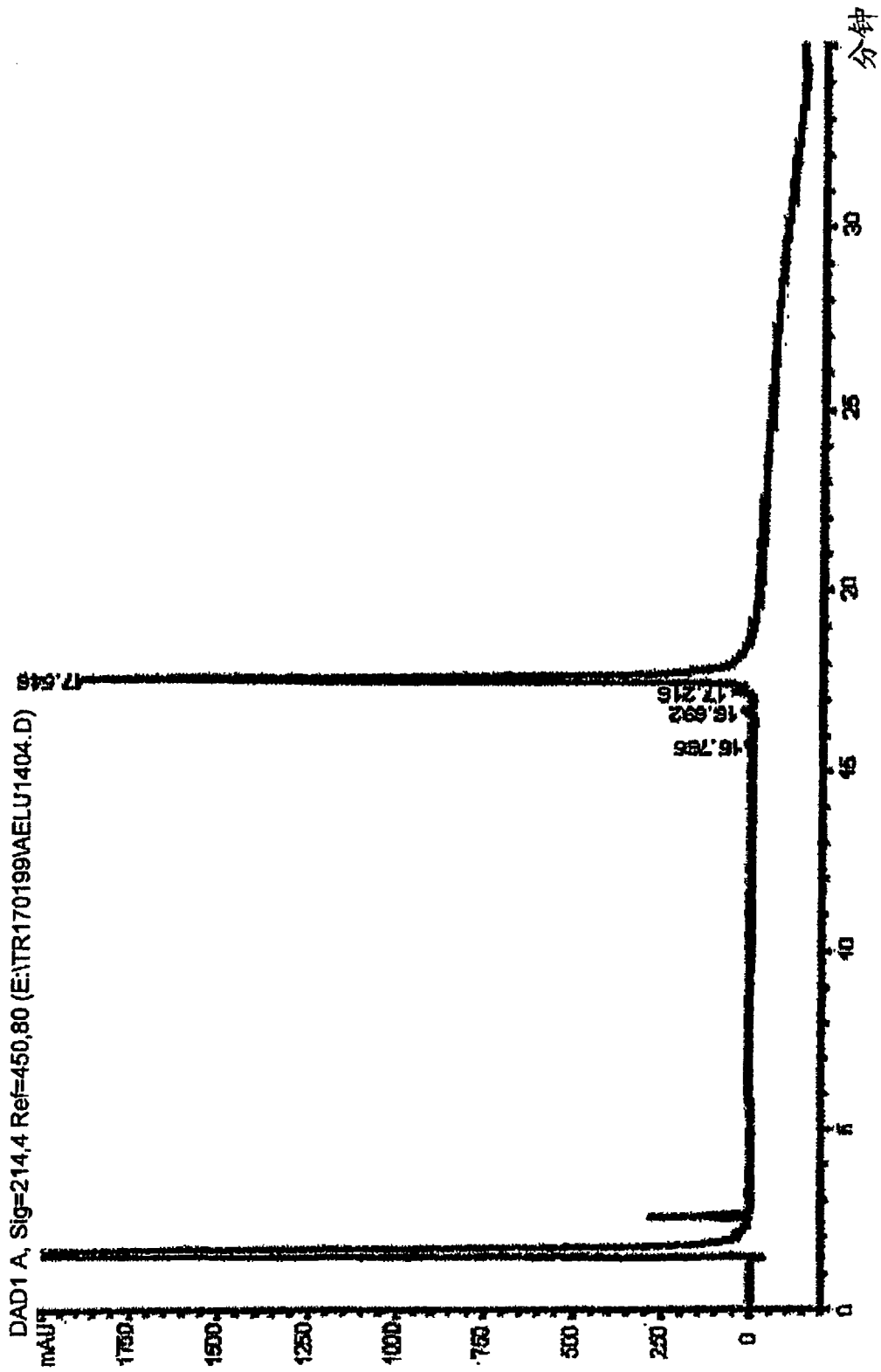


图 4