



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201307561 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：101115116

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 04 月 27 日

(51)Int. Cl.：

C12N7/02 (2006.01)

B01D15/16 (2006.01)

B01D15/34 (2006.01)

C12R1/93 (2006.01)

(30)優先權：2011/04/29

美國

61/480,561

(71)申請人：腫瘤防治生化科技公司 (加拿大) ONCOLYTICS BIOTECH INC. (CA)

加拿大

(72)發明人：卡非 麥修 C COFFEY, MATTHEW C. (CA)；哈格曼 艾利森 HAGERMAN, ALLISON (CA)；卡帕迪亞 羅克斯那 KAPADIA, ROXNA (CA)；瑟爾 莎拉 SERL, SARAH (CA)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：29 項 圖式數：0 共 32 頁

(54)名稱

使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法

METHODS OF PURIFYING VIRUSES USING GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY

(57)摘要

本文提供溶離緩衝液及使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法。該等方法適用於例如增加自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收。用於該等方法中之該等緩衝液包括至少一種選自組胺酸或蔗糖之賦形劑、二價陽離子、非離子型清潔劑及磷酸鹽緩衝鹽水。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201307561 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：101115116

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 04 月 27 日

(51)Int. Cl.：

C12N7/02 (2006.01)

B01D15/16 (2006.01)

B01D15/34 (2006.01)

C12R1/93 (2006.01)

(30)優先權：2011/04/29

美國

61/480,561

(71)申請人：腫瘤防治生化科技公司 (加拿大) ONCOLYTICS BIOTECH INC. (CA)

加拿大

(72)發明人：卡非 麥修 C COFFEY, MATTHEW C. (CA)；哈格曼 艾利森 HAGERMAN, ALLISON (CA)；卡帕迪亞 羅克斯那 KAPADIA, ROXNA (CA)；瑟爾 莎拉 SERL, SARAH (CA)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：29 項 圖式數：0 共 32 頁

(54)名稱

使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法

METHODS OF PURIFYING VIRUSES USING GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY

(57)摘要

本文提供溶離緩衝液及使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法。該等方法適用於例如增加自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收。用於該等方法中之該等緩衝液包括至少一種選自組胺酸或蔗糖之賦形劑、二價陽離子、非離子型清潔劑及磷酸鹽緩衝鹽水。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※ 申請案號： 10115116

※ 申請日期： 101.4.27

※IPC 分類： C12N7/02 (2006.01)
B01D15/16 (2006.01)
B01D15/34 (2006.01)
C12R1/93 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法/ METHODS OF PURIFYING VIRUSES
USING GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY

二、中文發明摘要：

本文提供溶離緩衝液及使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法。該等方法適用於例如增加自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收。用於該等方法中之該等緩衝液包括至少一種選自組胺酸或蔗糖之賦形劑、二價陽離子、非離子型清潔劑及磷酸鹽緩衝鹽水。

三、英文發明摘要：

Provided herein are elution buffers and methods for purifying viruses using gel permeation chromatography. The methods are useful, for example, in increasing recovery of a virus from a gel permeation chromatography column. The buffers for use in the methods include at least one excipient selected from histidine or sucrose, a divalent cation, a non-ionic detergent, and a phosphate buffered saline.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本案係關於溶離緩衝液及使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法。

優先權案之交互參照

本申請案主張 2011 年 4 月 29 日申請之美國臨時申請案第 61/480,561 號的優先權，該臨時申請案以全文引用之方式併入本文中。

【先前技術】

病毒製造包括使用例如諸如凝膠滲透層析法之層析方法純化病毒的步驟。儘管層析方法為純化病毒之有效途徑，但此等方法可能會導致病毒在層析管柱上有重大損失。因此，使用此等方法之病毒製造成本會相當大。

【發明內容】

本文提供溶離緩衝液及使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法。該等方法適用於例如增加病毒製造期間自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收。

本文所述之純化病毒方法包括：使凝膠滲透層析管柱與包含病毒及液體載劑之病毒製劑接觸，其中該病毒保留於該凝膠滲透層析管柱上；及用包含至少一種賦形劑、二價陽離子及磷酸鹽緩衝鹽水之溶離緩衝液自該凝膠滲透層析管柱回收該病毒。在該等方法中，該至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖。該液體載劑視情況為該溶離緩

衡液。視情況而定，該至少一種賦形劑包含甘露糖醇或山梨糖醇中之一或多者。該二價陽離子視情況為 Mg^{2+} 。視情況而定， Mg^{2+} 係以氯化鎂形式存在。

磷酸鹽緩衝鹽水可包括一或多種磷酸鹽與一或多種氯化物鹽之組合。視情況而定，一或多種磷酸鹽包括磷酸二鈉及/或磷酸二氫鉀。視情況而定，一或多種氯化物鹽包括氯化鈉及/或氯化鉀。

溶離緩衝液可更包括非離子型清潔劑，諸如聚山梨醇酯 80。視情況而定，溶離緩衝液包括甘露糖醇、組胺酸、山梨糖醇、聚山梨醇酯 80 及 MgCl_2 ，且磷酸鹽緩衝鹽水包括磷酸二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鈉及氯化鉀。視情況而定，溶離緩衝液包括蔗糖、聚山梨醇酯 80 及 MgCl_2 ，且磷酸鹽緩衝鹽水視情況包括磷酸二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鈉及氯化鉀。

本文所述之病毒製劑中所包括的病毒可例如為溶瘤病毒及/或無包膜病毒。本文提供一種病毒製劑，其中病毒為里奧病毒 (reovirus) (諸如哺乳動物里奧病毒)。哺乳動物里奧病毒之一實例為人類里奧病毒，諸如血清型 3 病毒 (例如 Dearing 株里奧病毒)。里奧病毒視情況為重組里奧病毒、重配里奧病毒或 IDAC #190907-01。本文中亦描述根據此等方法製備之經純化之病毒調配物。本文所述之方法可更包括將病毒儲存於溶離緩衝液中。

本文亦提供一種包括凝膠滲透層析管柱及溶離緩衝液之裝置。溶離緩衝液包括至少一種賦形劑、二價陽離子

及磷酸鹽緩衝鹽水，且至少一種賦形劑包括組胺酸或蔗糖。凝膠滲透層析管柱視情況用緩衝液平衡。視情況而定，該裝置更包括包含病毒及液體載劑之病毒製劑。

本文更提供一種經純化之病毒調配物，其包括自凝膠滲透層析管柱溶離之病毒及與凝膠滲透層析介質接觸之溶離緩衝液。在一些實例中，溶離緩衝液包含至少一種賦形劑、二價陽離子及磷酸鹽緩衝鹽水，且至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖。

本文亦提供凝膠滲透層析溶離緩衝液。在一些實例中，溶離緩衝液可包括至少一種賦形劑、二價陽離子、非離子型清潔劑及磷酸鹽緩衝鹽水。在此等實例中，至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖，且溶離緩衝液為凝膠滲透層析溶離緩衝液。視情況而定，溶離緩衝液包括蔗糖、 $MgCl_2$ 、聚山梨醇酯 80 及磷酸鹽緩衝鹽水。視情況而定，溶離緩衝液包括甘露糖醇、組胺酸、山梨糖醇、 $MgCl_2$ 、聚山梨醇酯 80 及磷酸鹽緩衝鹽水。

本文更提供增加自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收的方法。該等方法包括使凝膠滲透層析管柱與包含病毒及液體載劑之病毒製劑接觸，其中該病毒保留於該凝膠滲透層析管柱上；及用包含至少一種賦形劑、二價陽離子及磷酸鹽緩衝鹽水之溶離緩衝液自該凝膠滲透層析管柱回收該病毒，其中該至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖。在該等方法中，該病毒回收率比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 20%。視情況而定，該病

毒回收率比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 25% (例如, 比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 30% 或比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 35%)。

在以下隨附描述中陳述一或多個態樣之詳情。根據該描述及申請專利範圍, 其他特徵、目的及優勢將為顯而易見的。

【實施方式】

本文描述溶離緩衝液及使用凝膠滲透層析法純化病毒之方法。凝膠滲透層析法 (亦即凝膠過濾或尺寸排阻層析法) 為用於根據尺寸分離混合物之組分的擴散控制過程。本文描述之凝膠滲透層析溶離緩衝液可例如用於增加病毒製造期間自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收。本文描述之溶離緩衝液包括一或多種賦形劑、二價陽離子、非離子型清潔劑及磷酸鹽緩衝鹽水。

本文提供之溶離緩衝液包括至少一種賦形劑 (例如一種、兩種、三種、四種或四種以上賦形劑)。用於溶離緩衝液中之賦形劑包括 (但不限於) 糖及胺基酸。適用於本文所述之溶離緩衝液中的糖之一實例包括蔗糖。適用於本文所述之溶離緩衝液中的胺基酸之一實例包括組胺酸。視情況而定, 本文所述之溶離緩衝液包括組胺酸或蔗糖中之至少一者。

適用於本文所述之溶離緩衝液中的糖包括例如單醣及雙醣。在一些實例中，溶離緩衝液包括蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇或此等物質之組合。適合糖之其他實例包括乳糖、右旋糖、果糖、葡萄糖及麥芽糖。視情況而定，溶離緩衝液實質上不含海藻糖。實質上不含意謂以溶離緩衝液之重量計，溶離緩衝液可能包括小於 0.1%、小於 0.01%、小於 0.001%、小於 0.0001% 或 0% 之海藻糖。在一些實例中，溶離緩衝液實質上不含並非蔗糖之糖（亦即溶離緩衝液實質上不含非蔗糖多元醇）。

用於溶離緩衝液之糖可包括一種糖或兩種或兩種以上糖之組合。舉例而言，溶離緩衝液可包括蔗糖作為該緩衝液中所存在之糖。視情況而定，溶離緩衝液可包括甘露糖醇或山梨糖醇中之一或多者（例如甘露糖醇與山梨糖醇之組合）作為該緩衝液中所存在之糖。溶離緩衝液中所存在之糖的總濃度以溶離緩衝液重量計，可為 10 重量% 或以下。舉例而言，糖之總濃度以溶離緩衝液重量計，可為小於 7.5 重量%（例如，以溶離緩衝液重量計，小於 7.4 重量%、小於 7.3 重量%、小於 7.2 重量%、小於 7.1 重量%、小於 7 重量%、小於 6 重量%、小於 5 重量%、小於 4 重量%、小於 3 重量%、小於 2 重量%，或小於 1 重量%）。舉例而言，以溶離緩衝液重量計，蔗糖可以 0.1 重量% 至 5 重量%、1 重量% 至 4.5 重量%、2 重量% 至 4 重量% 範圍內之濃度（例如 3 重量%）或所述範圍內之任何量存在於溶離緩衝液中。視情況而定，甘露糖醇及山

梨糖醇以溶離緩衝液重量計，可以小於 7.5%（例如 7%）之組合濃度包括於溶離緩衝液中。例如，以溶離緩衝液重量計，甘露糖醇可以 0.01%至 7.4%（例如 0.1%至 7%、1%至 6%、2%至 5%、或 3%至 4%）範圍內之濃度包括在內，且山梨糖醇可以 0.01%至 7.4%（例如 0.1%至 7%、1%至 6%、2%至 5%、或 3%至 4%）範圍內之濃度包括在內，以至於糖之組合濃度小於 7.5%。

本文所述之溶離緩衝液中亦可包括胺基酸。適合胺基酸包括例如組胺酸、精胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、麩胺酸或此等者之混合物。一或多種胺基酸以溶離緩衝液重量計，可以 5%或以下之濃度存在於溶離緩衝液中。舉例而言，以溶離緩衝液重量計，胺基酸濃度可為 4.5%或以下、4.0%或以下、3.5%或以下、3.0%或以下、2.5%或以下、2.0%或以下、1.5%或以下、1.0%或以下、或 0.5%或以下。

如上所述，本文所述之溶離緩衝液中亦可包括二價陽離子。適用於溶離緩衝液中之二價陽離子包括鎂陽離子（亦即 Mg^{2+} ）。 Mg^{2+} 可與陰離子組合呈鹽形式引入溶離緩衝液中，諸如 MgCl_2 。在一些實例中，引入二價陽離子之鹽可為水合物（亦即，將二價陽離子引入至緩衝液中之鹽可含有結合至金屬中心或與複合物一起結晶之水分子）。水合物可為例如單水合物、二水合物、三水合物、四水合物、五水合物、六水合物或七水合物。舉例而言， Mg^{2+} 可呈 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 形式引入至溶離緩衝液中。視情況

而定，溶離緩衝液實質上不含 Zn^{2+} 。二價陽離子可以 0.01 mM 至 5 mM 範圍內之濃度存在於溶離緩衝液中。例如， Mg^{2+} 可呈 MgCl_2 或 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 形式以 0.1 mM 至 4.5 mM、0.5 mM 至 4 mM、1 mM 至 3 mM 範圍內之濃度（例如 2 mM）或所述範圍內之任何濃度存在於病毒調配物中。視情況而定，不包括磷酸鹽緩衝鹽水組分之溶離緩衝液中的賦形劑可實質上不含單價陽離子鹽，諸如含有鈉（ Na^+ ）、鋰（ Li^+ ）、鉀（ K^+ ）及銨（ NH_4^+ ）之鹽。

本文所述之溶離緩衝液中亦可包括清潔劑。清潔劑係指以組合形式具有親水性部分及疏水性部分之物質。適用於本文所述之溶離緩衝液中的清潔劑包括離子型及非離子型清潔劑。在一些實例中，聚山梨醇酯 80 視情況呈非離子型清潔劑形式包括於溶離緩衝液中。一或多種清潔劑以溶離緩衝液重量計，可視情況以小於 1 重量%之量存在於溶離緩衝液中。舉例而言，清潔劑可以小於 0.5 重量%、小於 0.1 重量%或小於 0.05 重量%（例如 0.01 重量%）之量存在於溶離緩衝液中。

視情況而定，溶離緩衝液實質上不含羧酸鹽。羧酸鹽之實例包括丁二酸鹽及檸檬酸鹽。

如上所述，本文提供之溶離緩衝液更包括磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）。磷酸鹽緩衝鹽水可包括例如一或多種磷酸鹽、一或多種氯化物鹽或此等物質之組合。視情況而定，一或多種磷酸鹽包括磷酸二鈉及/或磷酸二氫鉀。適用於溶離緩衝液中之氯化物鹽的實例包括氯化鈉及/或氯化

鉀。用於製備磷酸鹽緩衝鹽水之鹽視情況為水合物。如上所述，水合物可為例如單水合物、二水合物、三水合物、四水合物、五水合物、六水合物或七水合物。舉例而言，用於製備磷酸鹽緩衝鹽水之磷酸二鈉可為磷酸二鈉七水合物（亦即 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）。

用以製備用於溶離緩衝液中之磷酸鹽緩衝鹽水的鹽之例示性組合包括磷酸二鈉七水合物（亦即 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）、磷酸二氫鉀（亦即 KH_2PO_4 ）、氯化鈉（亦即 NaCl ）及氯化鉀（亦即 KCl ）。視情況而定， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 可以足夠量使用以在磷酸鹽緩衝鹽水中提供 5 mM 至 15 mM 之濃度或介於其之間的任何量的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。舉例而言， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 可以足夠量使用以提供 7.5 mM 至 12.5 mM、或 9 mM 至 11 mM（例如 10.14 mM）之濃度或介於其之間的任何量。視情況而定， KH_2PO_4 可以足夠量使用以在磷酸鹽緩衝鹽水中提供 0.5 mM 至 5 mM 之濃度或介於其之間的任何量。舉例而言， KH_2PO_4 可以足夠量使用以提供 1.0 mM 至 3.0 mM、或 1.5 mM 至 2.0 mM（例如 1.76 mM）之濃度或介於其之間的任何量。視情況而定， NaCl 可以足夠量使用以在磷酸鹽緩衝鹽水中提供 75 mM 至 200 mM 之濃度或介於其之間的任何量。舉例而言， NaCl 可以足夠量使用以提供 100 mM 至 175 mM、或 125 mM 至 150 mM（例如 137 mM）之濃度或介於其之間的任何量。視情況而定， KCl 可以足夠量使用以在磷酸鹽緩衝鹽水中提供 0.5 mM 至 5 mM 之濃度或介於其之

間的任何量。舉例而言，KCl 可以足夠量使用以提供 1.0 mM 至 4.0 mM、或 1.5 mM 至 3.0 mM（例如 2.68 mM）之濃度或介於其之間的任何量。

用於形成本文所述之溶離緩衝液的賦形劑、二價陽離子、清潔劑及磷酸鹽緩衝鹽水之例示性組合包括甘露糖醇、組胺酸、山梨糖醇、 MgCl_2 、聚山梨醇酯 80 及磷酸鹽緩衝鹽水。山梨糖醇以溶離緩衝液重量計，可以小於 3% 之濃度存在。舉例而言，山梨糖醇可以以下濃度存在：小於 2.9%、小於 2.8%、小於 2.7%、小於 2.6%、小於 2.5%、小於 2.4%、小於 2.3%、小於 2.2%、小於 2.1%、小於 2%、小於 1.9%、小於 1.8%、小於 1.7%、小於 1.6%、小於 1.5%、小於 1.4%、小於 1.3%、小於 1.2%、小於 1.1%，或小於 1%。在一些實例中，以溶離緩衝液重量計，甘露糖醇與山梨糖醇之組合濃度小於 10%。舉例而言，甘露糖醇濃度可為 3% 且組胺酸濃度可為 2% 以提供 5% 之組合濃度。聚山梨醇酯 80 可以小於溶離緩衝液重量之 0.1%（例如 0.01%）的量存在。在此等實例中，磷酸鹽緩衝鹽水可包含磷酸二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鈉及氯化鉀。另外，溶離緩衝液可實質上不含單價陽離子鹽、 Zn^{2+} 及 / 或海藻糖。

另一適合之溶離緩衝液包括蔗糖、 MgCl_2 、聚山梨醇酯 80 及磷酸鹽緩衝鹽水。視情況而定，蔗糖以溶離緩衝液重量計，係以小於 5% 之濃度存在。舉例而言，蔗糖以溶離緩衝液重量計，可以 4.5% 或以下、4% 或以下、3.5% 或以下、3% 或以下、2.5% 或以下、或 2% 或以下之濃度存在。

在此等實例中，磷酸鹽緩衝鹽水可包含磷酸二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鈉及氯化鉀。此外，溶離緩衝液可實質上不含單價陽離子鹽、非蔗糖多元醇及羧酸鹽（例如丁二酸鹽及檸檬酸鹽）。

本文所述之溶離緩衝液可作為凝膠滲透層析溶離緩衝液用於在例如病毒製造期間純化病毒。本文所述之純化病毒之方法包括使凝膠滲透層析管柱與包括病毒及液體載劑之病毒製劑接觸。

用於本文所述之病毒製劑中的病毒包括包膜病毒及無包膜病毒。包膜病毒及無包膜病毒可為 DNA 病毒、RNA 病毒或反轉錄病毒。視情況而定，用於本文所述之病毒製劑中的病毒為無包膜病毒。無包膜病毒包括例如屬以下科之病毒：腺病毒科 (Adenoviridae) (例如腺病毒)、小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) (例如脊髓灰質炎病毒 (polio virus))、呼腸病毒科 (Reoviridae) (例如里奧病毒)、乳頭瘤病毒科 (Papillomaviridae) (例如乳頭瘤病毒)、多瘤病毒科 (Polyomaviridae) (例如多瘤病毒)、細小病毒科 (Parvoviridae) (例如 Kilham 大鼠病毒) 及虹彩病毒科 (Iridoviridae) (例如大蚊虹彩病毒 (tipula iridescent virus))。

視情況而定，病毒為溶瘤病毒。適用於本文所述之病毒製劑及方法中的病毒包括（但不限於）肌尾噬菌體科 (myoviridae)、長尾噬菌體科 (siphoviridae)、短尾噬菌體科 (podoviridae)、復層噬菌體科 (tequiviridae)、

覆 蓋 噬 菌 體 科 (corticoviridae)、芽 生 噬 菌 體 科
 (plasmaviridae)、脂 毛 噬 菌 體 科 (lipothrixviridae)、微
 小 紡 錘 形 噬 菌 體 科 (fuselloviridae)、痘 病 毒 科
 (poxviridae)、虹 彩 病 毒 科 (iridoviridae)、藻 類 去 氧 核
 糖 核 酸 病 毒 科 (phycodnaviridae)、桿 病 毒 科
 (baculoviridae)、皰 疹 病 毒 科 (herpesviridae)、腺 病 毒
 科 (adenoviridae)、乳 多 空 病 毒 科 (papovaviridae)、多
 去 氧 核 糖 核 酸 病 毒 科 (polydnaviridae)、絲 狀 噬 菌 體 科
 (inoviridae)、微 小 噬 菌 體 科 (microviridae)、聯 體 病 毒
 科 (geminiviridae)、圓 環 病 毒 科 (circoviridae)、細 小
 病 毒 科 (parvoviridae)、嗜 肝 DNA 病 毒 科
 (hepadnaviridae)、反 轉 錄 病 毒 科 (retroviridae)、囊 狀
 噬 菌 體 科 (cystoviridae)、呼 腸 孤 病 毒 科 (reoviridae)、
 雙 核 糖 核 酸 病 毒 科 (birnaviridae)、副 黏 液 病 毒 科
 (paramyxoviridae)、彈 狀 病 毒 科 (rhabdoviridae)、絲
 狀 病 毒 科 (filoviridae)、正 黏 液 病 毒 科
 (orthomyxoviridae)、本 雅 病 毒 科 (bunyaviridae)、沙
 狀 病 毒 科 (arenaviridae)、光 滑 噬 菌 體 科 (leviviridae)、
 微 小 核 糖 核 酸 病 毒 科 (picornaviridae)、隨 伴 病 毒 科
 (sequiviridae)、豇 豆 鑲 嵌 病 毒 科 (comoviridae)、馬 鈴
 薯 Y 病 毒 科 (potyviridae)、杯 狀 病 毒 科 (caliciviridae)、
 星 狀 病 毒 科 (astroviridae)、野 田 病 毒 科 (nodaviridae)、
 四 病 毒 科 (tetraviridae)、番 茄 叢 矮 病 毒 科
 (tombusviridae)、冠 狀 病 毒 科 (coronaviridae)、黃 病

毒科 (flaviviridae)、披衣病毒科 (togaviridae)、桿菌狀核糖核酸病毒科 (barnaviridae) 及博爾納病毒科 (bornaviridae) 病毒。

病毒製劑視情況包括里奧病毒。如本文所用之里奧病毒係指歸於里奧病毒屬之任何病毒，包括天然存在之里奧病毒及重組之里奧病毒。里奧病毒為具有雙股、分段之 RNA 基因組的病毒。病毒粒子直徑尺寸為 60-80 nm 且具有兩個二十面體同心衣殼外殼。基因組由呈 10 至 12 個各別區段之雙股 RNA 組成且基因組總尺寸為 16 至 27 個千鹼基對 (kbp)。個別 RNA 區段尺寸不同。已自許多物種回收三個獨特但相關之類型的里奧病毒。所有三個類型具有共同的補體固定抗原。人類里奧病毒由以下三個血清型組成：1 型 (Lang 株、T1L)、2 型 (Jones 株、T2J) 及 3 型 (Dearing 株、T3D，或 Abney 株、T3A)。

如上所述，里奧病毒可為重組里奧病毒，其可為天然存在的或為非天然存在的。當里奧病毒可自自然界來源分離得之且未曾被人類於實驗室中有意地改變時，將其描述為天然存在的。里奧病毒例如可來自野外來源（亦即來自己受里奧病毒感染之人類）。亦可對里奧病毒進行選擇或誘使其發生突變以增強活性（例如溶瘤活性）。特定里奧病毒之實例可例如見於美國專利第 7,803,385 號或美國專利申請公開案第 2008/0292594 號中。

里奧病毒可被改變，但仍能夠以溶解方式感染具有活性 ras 路徑之哺乳動物細胞。里奧病毒可在投與增殖細

胞之前以化學方式或生化方式加以預處理（例如用諸如胰凝乳蛋白酶或胰蛋白酶之蛋白酶來處理）。用蛋白酶預處理可移除病毒之外殼或衣殼且可增加病毒之感染力。里奧病毒可披有脂質體或微胞包膜（Chandran 及 Nibert, *Journal of Virology*, 72(1):467-75 (1998)）。例如，病毒粒子可在形成微胞之濃度的烷基硫酸鹽清潔劑存在下用胰凝乳蛋白酶處理以產生新的感染性亞病毒顆粒（ISVP）。

里奧病毒可為由重組/重配來自兩種或兩種以上在遺傳上截然不同之里奧病毒的基因組區段而產生之重組或重配里奧病毒。可在自然界中繼宿主生物體受至少兩種在遺傳上截然不同之里奧病毒感染後發生里奧病毒基因組區段之重組/重配。重組病毒粒子亦可例如藉由使允許性宿主細胞共感染在遺傳上截然不同之里奧病毒而在細胞培養物中產生。因此，用於本文所述之調配物中的重組里奧病毒可由重配來自兩種或兩種以上在遺傳上截然不同之里奧病毒的基因組區段而產生，該等里奧病毒包括（但不限於）人類里奧病毒，諸如 1 型（例如 Lang 株）、2 型（例如 Jones 株）及 3 型（例如 Dearing 株或 Abney 株）；非人類哺乳動物里奧病毒；或禽類里奧病毒。在一些實例中，重組里奧病毒可由重配來自兩種或兩種以上在遺傳上截然不同之里奧病毒的基因組區段而產生，其中至少一種親本病毒已以遺傳方式加以工程改造，包含一或多個化學合成之基因組區段，已用化學或物理突變劑處理，或其本身為重組事件之結果。重組里奧病毒可

例如在以下突變劑存在下經歷重組：化學突變劑，包括（但不限於）硫酸二甲酯及溴化乙錠；或物理突變劑，包括（但不限於）紫外光及其他輻射形式。

適合之重組里奧病毒之其他實例包括在一或多個基因組區段中包含缺失或複製之重組里奧病毒，該（等）基因組區段包含由與宿主細胞基因組重組所產生之額外的遺傳資訊，或包含合成基因。里奧病毒亦可藉由使突變外殼蛋白（諸如 $\sigma 3$ ）併入病毒粒子外衣殼中而加以改變。可藉由置換、插入或刪除來使該等蛋白質突變。置換包括插入不同胺基酸以代替天然胺基酸。插入包括於蛋白質之一或多個位置處插入額外的胺基酸殘基。刪除包括刪除蛋白質中之一或多個胺基酸殘基。該等突變可藉由此項技術中已知之方法來產生。舉例而言，編碼外殼蛋白之一的基因之寡核苷酸定點突變誘發可使得所要突變外殼蛋白產生。在一個實施例中，里奧病毒為 IDAC #190907-01。

用於本文所述之病毒製劑中的病毒可已經歷一或多個先前純化步驟。該等病毒可在本文所述之凝膠滲透層析法之前，例如根據以下文獻中所述之方法來純化：美國專利第 6,808,916 號、第 7,186,542 號、第 7,223,585 號及第 7,901,921 號以及美國專利申請公開案第 2007/0269856 號，該等文獻以全文引用之方式併入本文中。例如，可使用以下技術來使該等病毒與其他顆粒分離：密度梯度離心、超濾、透濾、離子交換層析、高效

液相層析或此等技術之組合。

本文所述之病毒製劑更包括液體載劑。適合之液體載劑可為水性或非水性載劑。適合之非水性載劑之實例包括丙二醇、聚乙二醇、及油劑，包括源於石油、動物、植物或合成之油劑，諸如花生油、豆油、礦物油、芝麻油、橄欖油及其類似物。諸如油酸乙酯之有機酯類亦為合適之非水性載劑。水性載劑包括水、乙醇、甘油、醇性/水性溶液、乳液或懸浮液，包括鹽水及緩衝介質。鹽水溶液及右旋糖及甘油水溶液亦可用作液體載劑。若有需要時，該製劑亦可含有潤濕劑或乳化劑、潤滑劑、滑動劑、潤膚劑、保濕劑、增稠劑、調味劑、防腐劑或 pH 值緩衝劑。除磷酸鹽緩衝鹽水之外，還可在溶離緩衝液中包括 pH 值緩衝劑以控制病毒製劑之 pH 值。在一些實例中，包括該緩衝劑以將病毒製劑之 pH 值維持在 5 與 8.5 之間。舉例而言，可包括該緩衝劑以將病毒調配物之 pH 值維持在 6.8 與 8.0 之間或在 7.0 與 7.8 之間（例如 7.4）。適合緩衝劑之實例包括磷酸鹽緩衝劑（諸如 0.05 M 磷酸鹽緩衝劑）、乙酸鹽緩衝劑、苯甲酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑、乳酸鹽緩衝劑、順丁烯二酸鹽緩衝劑及酒石酸鹽緩衝劑。可使用如漢克氏溶液（Hanks's solution）、林格氏溶液（Ringer's solution）、右旋糖溶液、5% 人類血清白蛋白、林格氏右旋糖（Ringer's dextrose）、右旋糖及氯化鈉、乳酸化林格氏液及非揮發性油、聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮或卵磷脂之經緩衝之載劑。亦可使用單

乙醇胺、二乙醇胺、緩血酸胺及甘胺酸溶液作為適合之緩衝劑。脂質體及非水性媒劑（諸如非揮發性油）亦可用作載劑。適合載劑之其他實例描述於 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第 21 版) David B. Troy 編, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 中。在一些實例中，不在本文所述之病毒製劑或溶離緩衝液中使用 Tris 緩衝劑。

藉由組合病毒與液體載劑來製備病毒製劑。在一些實例中，提供適合量之病毒來製備效價在每毫升 1×10^5 個至 1×10^{14} 個病毒顆粒 (VP/mL) 範圍內之病毒製劑。或者，可將液體載劑添加至受病毒感染之細胞培養物中。如本文所用，細胞培養物係指一群受培養細胞，如見於其培養條件下（例如受病毒感染之細胞及培養基）。此外，受病毒感染之細胞的溶液或懸浮液可用液體載劑稀釋以製得病毒製劑。

視情況而定，病毒製劑之液體載劑為如本文所述之溶離緩衝液。在液體載劑不為溶離緩衝液之實施例中，病毒製劑可在凝膠滲透層析法中直接使用。或者，可進行緩衝液交換以提供具有溶離緩衝液作為液體載劑之病毒製劑。可根據熟習此項技術者已知之方法進行緩衝液交換。舉例而言，可使用過濾方法進行緩衝液交換。

如上所述，純化病毒方法包括使凝膠滲透層析管柱與如本文所述之病毒製劑接觸。純化病毒方法可使用包括如本文所述之凝膠滲透層析管柱及溶離緩衝液的裝置來

進行。用於本文所述之方法中及包括於本文所述之裝置中的凝膠滲透層析管柱可為市售者。舉例而言，凝膠滲透層析管柱可為 BPG 管柱，其可購自 GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)；XK 16/70 管柱，其可購自 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)；或其他等效物。適用於凝膠滲透層析管柱中之樹脂的實例包括 SEPHAROSE 4 Fast Flow 樹脂及 SEPHAROSE CL-4B 樹脂，其均可購自 GE Healthcare；或其他等效物。適合之凝膠滲透層析管柱的其他實例包括 SUPERDEX 管柱（例如 SUPERDEX-200 管柱）及 SEPHAROSE 管柱（例如 SEPHAROSE 4 FF 樹脂管柱），該兩者均可購自 GE Healthcare；或其他等效物。視情況而定，在使凝膠滲透層析管柱與病毒製劑接觸之前用緩衝液平衡該管柱。接觸凝膠滲透層析管柱包括例如用手裝載該製劑於該管柱上或使用自動系統裝載該製劑於該管柱上。在裝載之後病毒保留於凝膠滲透層析管柱上且隨後藉由使如本文所述之溶離緩衝液通過該管柱來自該管柱回收病毒。可使用例如紫外偵測器或藉由量測溶離劑之電導率或折射率來偵測病毒溶離情況。

相較於使用其他溶離緩衝液所獲得之病毒回收率，本文所述之方法使用本文所述之溶離緩衝液使自凝膠滲透層析管柱回收病毒之回收率提高。在一些實例中，使用本文所述之溶離緩衝液達成的病毒回收率比單獨用磷酸鹽緩衝鹽水（亦即無賦形劑、二價陽離子及視情況選用

之清潔劑的磷酸鹽緩衝鹽水)溶離之病毒的回收率大至少約 20%。舉例而言,該病毒回收率比單獨用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 25%、大至少約 30%,或大至少約 35%。

本文所述之方法提供經純化之病毒調配物。經純化之病毒調配物包括自凝膠滲透層析管柱溶離之病毒及已與凝膠滲透層析介質接觸之溶離緩衝液。所溶離之病毒可為經純化之病毒。如本文所用,經純化之病毒係指已與天然伴隨其之細胞組分分離的病毒。通常,當病毒以幹重計為至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%,不含與其天然締合之蛋白質及其他細胞組分時,認為其為經純化的。

視情況而定,本文所述之經純化之病毒調配物可在已與凝膠滲透層析介質接觸之溶離緩衝液中儲存一段時間。舉例而言,在含有經純化之病毒及溶離緩衝液的經純化之病毒調配物自凝膠滲透層析管柱溶離之後,經純化之病毒調配物可被儲存至多 12 個月(包括例如 1 天、1 週、1 個月、3 個月、6 個月、9 個月或 12 個月)。在一些實例中,經純化之病毒調配物在儲存期間保留病毒感染力。經純化之病毒調配物可儲存在大約環境溫度或低於環境溫度之溫度下。如本文所用,環境溫度係指介於約 10°C 與約 30°C 之間的溫度。

貫穿本申請案,參考多個公開案。此等公開案之全部揭示內容據此以引用方式併入本申請案中。

已描述了多個態樣。然而，應瞭解，可作出各種修改。此外，當描述一個特徵或步驟時，其可與本文中之任何其他特徵或步驟組合，即使未明確陳述該組合亦然。因此，其他態樣屬申請專利範圍之範疇內。

實例

實例 1：材料

除非另有指示，否則用於製備溶離緩衝液之材料係獲自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。藉由組合 50.06 公克之 Milli-Q 級水與 1.03 公克之吐溫 80 (Tween 80) 儲備液來製備 1%吐溫 80 於 Milli-Q 級水中之工作溶液。在混合各組分之後，添加額外的 Milli-Q 級水以獲得 100 g 溶液。藉由組合 80.61 公克之 Milli-Q 級水與 2.04 公克之 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 來製備 100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 之工作溶液。在混合各組分之後，添加額外的 Milli-Q 級水以獲得 100 g 溶液。

實例 2：溶離緩衝液 1

根據以下程序製備溶離緩衝液 1。在室溫下組合 Milli-Q 級水 (1.0 kg) 與 L-組胺酸 (32.0 g) 且攪拌 10 分鐘。接著將混合物加熱至 $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 以使 L-組胺酸完全溶解於水中。接著移除熱且向混合物中添加以下組分：D-甘露糖醇 (48.02 g)、1%吐溫 80 工作溶液 (16.02 g)、D-山梨糖醇 (32.03 g)、100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作溶液 (32.0 g)、 KH_2PO_4 (0.38 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.36 g)、KCl (0.32 g)

及 NaCl (12.80 g)。充分混合各組分且添加額外的 Milli-Q 級水以獲得 1.6 kg 緩衝液。

使用在製備緩衝液之同一日校準之 pH 計測知，緩衝液之 pH 值為 7.52。接著經由具有 0.45 μm HA 膜之 Millipore 過濾系統 (Millipore; Billerica, MA) 過濾溶離緩衝液，且在室溫下使其脫氣 30 分鐘以形成溶離緩衝液 1。

實例 3：溶離緩衝液 2

根據以下程序製備溶離緩衝液 2。組合 Milli-Q 級水 (1.0 kg)、蔗糖 (64.0 g)、吐溫 80 (0.81 g)、100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作溶液 (32.0 g)、 KH_2PO_4 (0.38 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.35 g)、KCl (0.32 g) 及 NaCl (12.80 g)。充分混合各組分且添加額外的 Milli-Q 級水以獲得 1.6 kg 緩衝液。

使用在製備緩衝液之同一日校準之 pH 計測知，緩衝液之 pH 值為 7.40。接著經由具有 0.45 μm HA 膜之 Millipore 過濾系統 (Millipore; Billerica, MA) 過濾溶離緩衝液，且在室溫下使其脫氣 30 分鐘以形成溶離緩衝液 2。

實例 4：溶離緩衝液 1-2 $\times$

根據以下程序，以如實例 2 中所示之濃縮調配物兩倍的濃度製備溶離緩衝液 1。在室溫下組合 Milli-Q 級水 (61.78 g) 與 L-組胺酸 (4.00 g) 且攪拌 10 分鐘。接著將混合物加熱至 40°C 後維持 27 分鐘以使 L-組胺酸完全溶解於水中。接著移除熱且向混合物中添加以下組分：D-甘露糖醇 (6.00 g)、1%吐溫 80 工作溶液 (2.02 g)、

D-山梨糖醇(4.00 g)、100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作溶液(4.01 g)、 KH_2PO_4 (0.024 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27 g)、KCl(0.021 g)及 NaCl(0.81 g)。充分混合各組分且添加額外的 Milli-Q 級水以獲得 100 g 緩衝液。

使用在製備緩衝液之同一日校準之 pH 計測知，緩衝液之 pH 值為 7.59。接著經由具有 0.45 μm 乙酸纖維膜之 150 mL Corning 過濾系統(Corning Incorporated; Corning, NY)過濾溶離緩衝液以形成溶離緩衝液 1-2x。

實例 5：溶離緩衝液 2-2x

根據以下程序，以如實例 3 中所示之濃縮調配物兩倍的濃度製備溶離緩衝液 2。組合 Milli-Q 級水(60.0 g)、蔗糖(8.00 g)、1%吐溫 80 工作溶液(10.0 g)、100 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作溶液(4.01 g)、 KH_2PO_4 (0.024 g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27 g)、KCl(0.021 g)及 NaCl(0.80 g)。充分混合各組分且添加額外的 Milli-Q 級水以獲得 100 g 緩衝液。

使用在製備緩衝液之同一日校準之 pH 計測知，緩衝液之 pH 值為 7.28。接著經由具有 0.45 μm 乙酸纖維膜之 150 mL Corning 過濾系統(Corning Incorporated; Corning, NY)過濾溶離緩衝液以形成溶離緩衝液 2-2x。

實例 6：病毒製劑

藉由在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中提供 2.76×10^{14} 個里奧病毒顆粒來製備對照病毒製劑(對照製劑)。藉由在溶

離緩衝液 1 中提供 2.76×10^{14} 個里奧病毒顆粒來製備病毒製劑 1。藉由在溶離緩衝液 2 中提供 2.76×10^{14} 個里奧病毒顆粒來製備病毒製劑 2。

實例 7：凝膠滲透層析後之病毒回收

將實例 6 中所製備之病毒製劑（對照製劑、病毒製劑 1 及病毒製劑 2）各自個別地裝載於凝膠滲透層析管柱上。分別用 PBS、緩衝液調配物 1 及緩衝液調配物 2 溶離對照製劑、病毒製劑 1 及病毒製劑 2。各別實驗之平均值數據展示於表 1 及表 2 中。

表 1

病毒製劑	溶離緩衝液	GPC 前之病毒顆粒總數	GPC 後之病毒顆粒總數	步驟回收率%
對照調配物	PBS	2.76×10^{14}	2.07×10^{14}	75%
病毒製劑 1	溶離緩衝液 1	2.76×10^{14}	2.96×10^{14}	107%
病毒製劑 2	溶離緩衝液 2	2.76×10^{14}	3.05×10^{14}	111%

表 2

病毒製劑	溶離緩衝液	GPC 前之病毒顆粒總數	GPC 後之病毒顆粒總數	步驟回收率%
對照調配物	PBS	2.51×10^{16}	1.70×10^{16}	68%
對照調配物	PBS	1.31×10^{16}	9.58×10^{15}	73%
病毒製劑 1	溶離緩衝液 1	1.57×10^{16}	1.42×10^{16}	90%
病毒製劑 1	溶離緩衝液 1	4.29×10^{16}	4.13×10^{16}	96%
病毒製劑 1	溶離緩衝液 1	3.28×10^{16}	3.48×10^{16}	106%

如表 1 中所示，相較於單獨使用 PBS，在里奧病毒下於凝膠滲透管柱上使用溶離緩衝液 1 使病毒回收率增加 75% 至 107%。表 2 展示相較於單獨使用 PBS，使用溶離

緩衝液 1 使病毒回收率有一致的增加。此外，相較於單獨使用 PBS，在里奧病毒下於凝膠滲透管柱上使用溶離緩衝液 2 使病毒回收率增加 75%至 111%(參見表 1)。因而，相較於對里奧病毒使用 PBS，向里奧病毒添加溶離緩衝液 1 及 2 分別使效價提高約 32%及 36%。

隨附申請專利範圍之組合物及方法的範疇不受本文所述之特定組合物及方法的限制，後述者意欲說明申請專利範圍之數個態樣，且在功能上等同之任何組合物及方法屬□本發明之範疇內。除本文所示及所述以外之組合物及方法的各種變體意欲屬□隨附申請專利範圍之範疇內。此外，儘管僅特定地描述了此等組合物及方法之某些代表性組合物、方法及態樣，但其他組合物及方法以及該等組合物及方法之各種特徵之組合意欲屬□隨附申請專利範圍之範疇內，即使未特定地陳述亦然。因而，可在本文中明確地提及步驟、要素、組分或成分之組合；然而，即使未明確陳述，亦包括步驟、要素、組分及成分之所有其他組合。

【圖式簡單說明】

無

【主要元件符號說明】

無



七、申請專利範圍：

1. 一種純化病毒之方法，其包括：

使凝膠滲透層析管柱與包含病毒及液體載劑之病毒製劑接觸，其中該病毒保留於該凝膠滲透層析管柱上；及用包含至少一種賦形劑、二價陽離子及磷酸鹽緩衝鹽水之溶離緩衝液自該凝膠滲透層析管柱回收該病毒，

其中該至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該液體載劑為該溶離緩衝液。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該至少一種賦形劑包含甘露糖醇或山梨糖醇中之一或多者。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該二價陽離子為 Mg^{2+} 。

5. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中 Mg^{2+} 係以氯化鎂形式存在。

6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該磷酸鹽緩衝鹽水包含一或多種磷酸鹽與一或多種氯化物鹽之組合。

7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該一或多種磷酸鹽包含磷酸二鈉或磷酸二氫鉀。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該一或多種磷酸鹽包含磷酸二鈉及磷酸二氫鉀。

9. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該一或多種氯化物鹽包含氯化鈉或氯化鉀。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該一或多種氯化

物鹽包含氯化鉀及氯化鈉。

11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該溶離緩衝液更包含非離子型清潔劑。

12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該非離子型清潔劑為聚山梨醇酯 80。

13. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該溶離緩衝液包含甘露糖醇、組胺酸、山梨糖醇、聚山梨醇酯 80 及 MgCl_2 ，且其中該磷酸鹽緩衝鹽水包含磷酸二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鈉及氯化鉀。

14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該溶離緩衝液包含蔗糖、聚山梨醇酯 80 及 MgCl_2 ，且其中該磷酸鹽緩衝鹽水包含磷酸二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鈉及氯化鉀。

15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其更包含將該病毒儲存在該溶離緩衝液中。

16. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該病毒為溶瘤病毒或無包膜病毒。

17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該病毒為里奧病毒。

18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該里奧病毒為哺乳動物里奧病毒。

19. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該哺乳動物里奧病毒為人類里奧病毒。

20. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中該人類里奧病毒為血清型 3 病毒。

21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該血清型 3 病毒為 Dearing 株。

22. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該里奧病毒為重組或重配里奧病毒。

23. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該里奧病毒為 IDAC #190907-01。

24. 一種裝置，其包含：

凝膠滲透層析管柱；及

溶離緩衝液，

其中該溶離緩衝液包含至少一種賦形劑、二價陽離子及磷酸鹽緩衝鹽水，且

其中該至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖。

25. 如申請專利範圍第 24 項之裝置，其中用該緩衝液平衡該凝膠滲透層析管柱。

26. 如申請專利範圍第 24 項之裝置，其更包含包含病毒及液體載劑之病毒製劑。

27. 一種溶離緩衝液，其包含：

a) 至少一種賦形劑；

二價陽離子；

非離子型清潔劑；及

磷酸鹽緩衝鹽水，

其中該至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖，且

其中該溶離緩衝液為凝膠滲透層析溶離緩衝液；

b) 蔗糖；

MgCl₂；

聚山梨醇酯 80；及

磷酸鹽緩衝鹽水，

其中該溶離緩衝液為凝膠滲透層析溶離緩衝液；或

c)甘露糖醇；

組胺酸；

山梨糖醇；

MgCl₂；

聚山梨醇酯 80；及

磷酸鹽緩衝鹽水，

其中該溶離緩衝液為凝膠滲透層析溶離緩衝液。

28. 一種增加自凝膠滲透層析管柱進行之病毒回收的方法，其包含：

使凝膠滲透層析管柱與包含病毒及液體載劑之病毒製劑接觸，其中該病毒保留於該凝膠滲透層析管柱上；及

用包含至少一種賦形劑、二價陽離子及磷酸鹽緩衝鹽水之溶離緩衝液自該凝膠滲透層析管柱回收該病毒，其中該至少一種賦形劑包含組胺酸或蔗糖，

其中該病毒回收率比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 20%。

29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該病毒回收率比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 25%，比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少約 30%，或比用磷酸鹽緩衝鹽水溶離之病毒的回收率大至少

約 35%。

八、圖式：

無

約 35%。

八、圖式：

無