



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114085273 B

(45) 授权公告日 2024.07.12

(21) 申请号 202111173161.7

A61K 39/12 (2006.01)

(22) 申请日 2013.06.24

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114085273 A

(56) 对比文件

Huafang Lai等.Bioprocessing of plant-derived virus-like particles of Norwalk virus capsid protein under current Good Manufacture Practice regulations.《Plant Cell Reports》.2011,第31卷摘要,第576页左栏第1段,第580页的NVCP VLP产生、分离和纯化部分,图4,表3.

(43) 申请公布日 2022.02.25

Huafang Lai等.Bioprocessing of plant-derived virus-like particles of Norwalk virus capsid protein under current Good Manufacture Practice regulations.《Plant Cell Reports》.2011,第31卷摘要,第576页左栏第1段,第580页的NVCP VLP产生、分离和纯化部分,图4,表3.

(30) 优先权数据

61/663,218 2012.06.22 US

61/794,086 2013.03.15 US

(62) 分案原申请数据

201380043618.X 2013.06.24

审查员 王婷

(73) 专利权人 武田疫苗股份有限公司

权利要求书2页 说明书28页 附图5页

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·泰勒

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

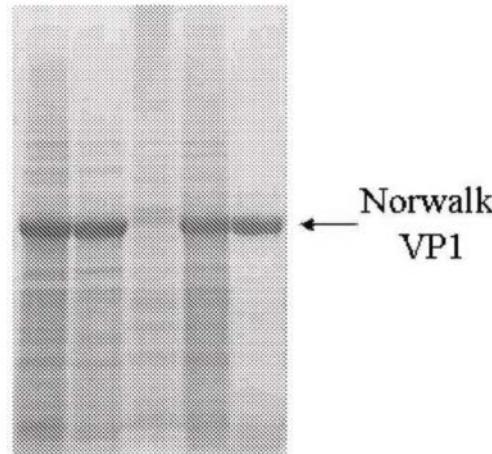
C07K 14/08 (2006.01)

(54) 发明名称

病毒样颗粒的纯化

(57) 摘要

本发明涉及病毒样颗粒的纯化,具体地涉及纯化病毒样颗粒(VLP)的方法,其基本上没有处理污染物(process contaminant)和传染剂(infectious agent)。所述方法包括,例如,收获期间的低pH处理和/或VLP捕获期间通过溶剂和/或去污剂失活。



泳道: 1 2 3 4 5

1. 一种用于纯化诺如病毒基因群II病毒样颗粒(VLP)的方法,其包括:

(a) 产生或获得含有所述VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液(filtrate);其中所述VLP在细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞中产生;其中所述VLP至少包括所述VLP的第一亚群和第二亚群;而且其中所述第一亚群包含具有全长VP1亚单位的VLP,并且所述第二亚群包含具有截短的VP1亚单位的VLP;

(b) 将所述裂解物、上清液或滤出液的pH值调节至低于5的pH 值,以产生pH被调节的溶液,其中所述pH调节被执行30分钟至48小时的时间;和

(c) 从所述pH被调节的溶液中去除非VLP微粒(particulate)/聚集物(aggregate)以产生包含所述VLP的纯化溶液;其中所述去除非VLP微粒/聚集物包括从所述pH被调节的溶液去除VLP的第二亚群;其中所述纯化溶液基本上保留了VLP的第一亚群;并且其中所述纯化溶液包含少于10%的具有截短的VP1亚单位的VLP。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述裂解物、上清液或滤出液使用重组方法产生。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述VLP包含酸稳定的VLP。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述pH被调节的溶液的pH为低于pH 4或低于pH 3。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述去除是经由一个或多个如下类型的处理来进行:离心、沉淀、絮凝、沉降和过滤。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述去除包括通过深层过滤使pH被调节的溶液澄清。

7. 根据权利要求6所述的方法,其在深层过滤之后包括一个或多个如下的处理:离心、沉淀、絮凝、沉降和额外过滤。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法将VLP的第一亚群与残余污染蛋白的比值增加至少2倍。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法从所述裂解物、上清液或滤出液中去除至少65%、至少95%、至少98%或至少99%的残余污染核酸。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中与所述裂解物、上清液或滤出液相比,从所述pH被调节的溶液中回收至少75%的所述VLP。

11. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括使用一种或多种色谱处理从所述纯化溶液中分离VLP的第一亚群。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述一种或多种色谱处理中的每一种独立地选自:羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、混合模式色谱、和亲和色谱。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法进一步包括使用多步色谱处理从所述纯化溶液中分离VLP的第一亚群,其中所述多步色谱处理中的至少一个色谱处理包括:

使所述裂解物、上清液或滤出液与色谱材料接触,其中VLP的第一亚群与所述色谱材料结合;

用溶剂和/或去污剂处理所述色谱材料;和

将VLP的第一亚群从所述色谱材料洗脱;

其中所述多步色谱处理包括:阳离子交换色谱;

而且其中所述方法回收存在于所述细胞裂解物、培养物上清液或滤出液中的VLP的至少75%。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述溶剂和/或去污剂包括如下的一种或多种: TnBP、辛基酚、环氧乙烷缩合物(ethyleneoxide condensate)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(polyoxyethylene sorbitan monooleate)、和胆酸钠、和Triton X-100。

## 病毒样颗粒的纯化

[0001] 本发明申请是基于申请日为2013年06月24日、申请号为201380043618.X (国际申请号为PCT/US2013/047249)、名称为“病毒样颗粒的纯化”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请相互参考

[0003] 本申请要求获得美国临时专利申请No. 61/663,218和美国临时专利申请No. 61/794,086的优先权, No. 61/663,218于2012年6月22日提出申请, No. 61/794,086于2013年3月15日提出申请,本文引用其每一个的全部内容作为参考。

### 发明领域

[0004] 本发明属于疫苗领域,包括诺如病毒疫苗。本发明的各方面涉及制备和纯化疫苗组合物的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 病毒样颗粒 (VLP) 的生产一般涉及VLP在宿主细胞表达系统内的表达和组装。为了从最终的生产培养物中除去传染剂 (infectious agent),普遍使用病毒过滤,虽然也可以使用其他方法,例如UV失活或化学失活(单独使用或者与基于过滤的方法联合使用)。然而,对于更大的生物组分如VLP,病毒过滤无效,因为VLP的大小经常与传染剂(例如,病毒)太接近,以致不能够仅通过过滤将之与这些传染剂分离。

[0007] 在具体的实施例中,在Sf9昆虫细胞中进行VLP的杆状病毒表达之后,所得的大量生产培养物含有高水平的处理污染物,包括宿主细胞蛋白、核酸和活的传染剂,包括杆状病毒。尽管通过低速离心和过滤收获VLP生产培养物可以产生澄清的适合于下游纯化的样品,但是这些方法不适合除去宿主细胞蛋白和活病毒,包括杆状病毒。因此,在制备VLP时,在收获期间需要使用其它的方法使传染剂失活和/或清除处理污染物,以方便下游的处理。

### 发明概要

[0008] 本文提供了可用于从VLP细胞裂解物和生产培养物中清除处理污染物的方法,以及由此生产的VLP组合物。在一个实施方案中,本发明的方法包括产生或获得含有所述VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液,和将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液。该方法进一步包括从pH被调节的溶液中除去非VLP微粒/聚集物,从而产生包含VLP的纯化溶液。

[0009] 在一些实施方案中,本发明的pH处理方法可用于分离结构上多样的 (diverse) VLP群体,其中VLP至少包括VLP的第一亚群和第二亚群。分离非VLP微粒/聚集物可以包括将VLP第二亚群与pH被调节的溶液分离,从而产生纯化溶液,其中纯化溶液基本上保留VLP的第一亚群。该方法可以进一步包括,在将VLP第二亚群与纯化溶液分离之后,将VLP第一亚群与纯化溶液分离。在一些实施方案中,VLP是诺如病毒VLP,其中第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒VLP,并且其中第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒VLP。在这种处理之后,VLP第一亚群与残余污染蛋白之间的比值被增加至少大约50%。在一些实施方案中,在这种处理之后,VLP第一亚群与残余污染蛋白之间的比值被增加至少大约80%。

[0010] 在一些实施方案中,分离包括一种或多种如下的处理:离心、沉淀、絮凝、沉降和过滤。在一些实施方案中,除去VLP包括使用一种或多种色谱处理将VLP第一亚群与纯化溶液分离。

[0011] 在本发明的一些方面中,用于纯化VLP的方法包括产生或获得含有VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液;和使用多步色谱处理纯化VLP,从而产生纯化溶液。多步色谱处理的至少一个色谱处理包括使裂解物、上清液或滤出液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合;用溶剂和/或去污剂处理色谱材料;和在所述处理后,将VLP从色谱材料洗脱。每一个色谱处理均独立地从下组中选出:羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、混合模式色谱、基于膜的色谱和亲和色谱。在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是离子交换色谱,其中离子交换色谱从阴离子交换色谱和阳离子交换色谱中选出。

[0012] 在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是阳离子交换色谱,并且所述处理步骤在阳离子交换色谱处理的阳离子交换柱上执行。在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是羟基磷灰石色谱,并且所述处理步骤在羟基磷灰石色谱处理的羟基磷灰石柱上执行。在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是亲和色谱,并且所述处理步骤在亲和色谱处理的亲和柱上执行。在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是混合模式色谱,并且所述处理步骤在混合模式色谱处理的混合模式柱上执行。在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是疏水相互作用色谱,并且所述处理步骤在疏水相互作用色谱处理的疏水相互作用柱上执行。在一些实施方案中,该方法进一步包括一种或多种额外的色谱处理。

[0013] 溶剂和/或去污剂包括如下的一种或多种:磷酸三丁酯(TnBP),非离子去污剂(包括Triton X-100和聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(polyoxyethylene sorbitan monooleate)),两性离子去污剂(包括CHAPS和Zwittergent 3-12)和离子去污剂(包括胆酸钠和二甲基二(十八烷基)溴化铵(Dimethyldioctadecylammonium bromide))。

[0014] 在一些实施方案中,VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群I VLP、诺如病毒基因群II VLP、诺如病毒基因群IV VLP、嵌合诺如病毒VLP,工程化的诺如病毒VLP变体、和沙波病毒(sapovirus)VLP。在一些实施方案中,VLP是一种或多种沙波病毒VLP。在一些实施方案中,VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少2倍。

[0015] 在一些实施方案中,与裂解物、上清液或滤出液相比,VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少10倍。在一些实施方案中,至少大约50%的残余污染蛋白被从裂解物、上清液或滤出液中除去。在一些实施方案中,在所述纯化期间,不超过大约50%的VLP被损失。

[0016] 在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液使用重组方法产生,并且VLP在细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞中产生。VLP还可以在植物细胞中产生。

[0017] 在本发明的一些方面中,纯化VLP的方法包括产生或获得含有VLP的细胞裂解物或培养物上清液/滤出液,所述VLP至少包含VLP的第一亚群和第二亚群。该方法进一步包括将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到低于大约5的pH,并使用过滤处理从pH被调节的溶液中除去VLP的第二亚群,从而产生过滤溶液。过滤溶液基本上保留VLP的第一亚群。该方法额外包括使用多步色谱处理将VLP的第一亚群与过滤溶液分离,其并入至少一个柱上溶剂和/或去污剂处理步骤。在一些实施方案中,VLP第一群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约2

倍。在一些实施方案中,过滤处理包括深层过滤处理。

[0018] 在一些实施方案中,VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群I VLP和诺如病毒基因群II VLP。在其他实施方案中,VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群IV VLP和其他可在将来被确定感染人类的诺如病毒基因群。

[0019] 在一些实施方案中,纯化VLP的方法包括产生或获得含有VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液。该方法进一步包括将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH,产生pH被调节的溶液。该方法额外包括从pH被调节的溶液中除去非VLP微粒/聚集物,从而产生纯化溶液,所述除去包括通过深层过滤处理使pH被调节的溶液澄清,从而产生纯化的深层过滤溶液。在一些实施方案中,所述深层过滤处理包括使pH被调节的溶液与一种或多种深层过滤器(depth filter)接触,从而产生纯化溶液。在一些实施方案中,至少一个深层过滤器是硅藻土深层过滤器。在一些实施方案中,一个或多个深层过滤器是多个硅藻土深层过滤器,其每一个具有从下述范围内独立选出的过滤容量:大约50升/ $\text{m}^2$ -大约1000升/ $\text{m}^2$ 。在一些实施方案中,一个或多个深层过滤器是单深层过滤器(single depth filter),其每一个具有从下述范围内选出的过滤容量:大约150升/ $\text{m}^2$ -大约400升/ $\text{m}^2$ 。在一些实施方案中,与裂解物、上清液或滤出液相比,至少大约95%的残余污染核酸被从pH被调节的溶液中除去。在一些实施方案中,与裂解物、上清液或滤出液相比,至少大约75%的VLP被从pH被调节的溶液中回收。

[0020] 在本发明的一些方面中,本发明的溶液包括诺如病毒VLP的纯化群,其中通过尺寸排阻色谱和ELISA测量,所述溶液含有不超过10%的残余污染蛋白。在一些实施方案中,溶液从含有诺如病毒VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液中纯化。在一些实施方案中,与裂解物、上清液或滤出液相比,溶液含有不超过35%残余污染核酸。在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液中至少大约50%的诺如病毒VLP被回收。在一些实施方案中,与裂解物、上清液或滤出液相比,诺如病毒VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少大约10倍。

[0021] 在本发明的一些方面中,本发明的溶液包括VLP的纯化群体,其中所述溶液含有至少大约50%的具有全长VP1亚单位的VLP。在一些实施方案中,溶液含有高达大约100%的具有全长VP1亚单位的VLP。在一些实施方案中,溶液基本上没有具有截短的VP1亚单位的VLP。在一些实施方案中,溶液从含有至少大约10%具有截短的VP1亚单位的VLP的起始材料中产生。在一些实施方案中,起始材料是含有VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液。

[0022] 在本发明的一些方面中,使含有活病毒和进一步含有由活宿主细胞病毒产生的VLP的溶液中的活病毒清除和/或失活的方法,包括将溶液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液。在一些实施方案中,pH被调节的溶液中活病毒的水平被减少至少大约 $10^4$ 倍。在一些实施方案中,pH被调节的溶液中活病毒的水平被减少至少大约 $10^5$ 倍。活病毒能够包括,但不仅限于,宿主细胞病毒、生产病毒(例如杆状病毒)、和其他污染病毒,例如由于人为处理产生的。

[0023] 在一些实施方案中,方法进一步包括从pH被调节的溶液中除去非VLP微粒/聚集物,从而产生纯化溶液,并且使用至少一种色谱处理对纯化溶液进行纯化。该至少一种色谱处理包括使纯化溶液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合,和用溶剂和/或去污剂处理色谱材料。该至少一个色谱处理进一步包括在所述处理之后将VLP从色谱材料洗脱,从而产生洗脱液。在一些实施方案中,与含有活病毒的溶液相比,洗脱液中活病毒的水平被

减少至少大约 $10^2$ 倍。

[0024] 在本发明的一些方面中,使含有活病毒和进一步含有由活病毒产生的VLP的溶液中的活病毒清除和/或失活的方法,包括使用至少一种色谱处理对含有活病毒的溶液进行纯化。该至少一种色谱处理包括使含有活病毒的溶液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合,和用溶剂和/或去污剂处理色谱材料。该至少一种色谱处理进一步包括在所述处理之后将VLP从色谱材料洗脱,从而产生洗脱液。在一些实施方案中,与含有活病毒的溶液相比,洗脱液中活残余污染病毒的水平被减少至少大约 $10^5$ 倍。在一些实施方案中,与含有活病毒的溶液相比,洗脱液中活病毒的水平被减少至少大约 $10^7$ 倍。

[0025] 本发明还包括通过本文公开的方法产生的VLP组合物,和包含VLP以及一种或多种佐剂和/或赋形剂的疫苗组合物。本文产生的VLP组合物的优点在于,它们具有更少的处理污染物,并且在生产期间基本上没有形成异常的VLP结构。

[0026] 具体地,本发明涉及如下各项:

[0027] 1. 一种纯化病毒样颗粒(VLP)的方法,包括:

[0028] 产生或获得含有所述VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液;

[0029] 将所述裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液;和

[0030] 从pH被调节的溶液除去非VLP微粒(particulate)/聚集物(aggregate),从而产生包含所述VLP的纯化溶液。

[0031] 2. 根据项1所述的方法,其中该VLP至少包含VLP的第一亚群和第二亚群。

[0032] 3. 根据项2所述的方法,其中所述除去非VLP微粒/聚集物包括从pH被调节的溶液中除去VLP的第二亚群,其中纯化溶液基本上保留VLP的第一亚群。

[0033] 4. 根据项3所述的方法,进一步包括在从pH被调节的溶液中除去VLP的第二亚群从而产生纯化溶液之后,从纯化溶液中除去VLP的第一亚群。

[0034] 5. 根据项4所述的方法,其中细胞裂解物或培养物上清液/滤出液的VLP是诺如病毒(norovirus) VLP,其中第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒VLP,并且其中第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒VLP。

[0035] 6. 根据项4所述的方法,其中VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约2倍。

[0036] 7. 根据项3所述的方法,其中VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约2倍。

[0037] 8. 根据项1所述的方法,其中所述pH调节被执行大约30分钟至大约48小时的时间。

[0038] 9. 根据项1所述的方法,其中VLP包含酸稳定的VLP。

[0039] 10. 根据项1所述的方法,其中裂解物、上清液或滤出液的被调节pH小于大约3。

[0040] 11. 根据项1所述的方法,其中裂解物、上清液或滤出液的被调节pH小于大约4。

[0041] 12. 根据项1所述的方法,其中所述除去通过一种或多种如下类型的处理执行:离心、沉淀、絮凝(flocculation)、沉降(settling)和过滤。

[0042] 13. 根据项12所述的方法,其中所述除去包括通过深层过滤,随后进行额外的过滤使pH被调节的溶液澄清,从而产生纯化溶液。

[0043] 14. 根据项1所述的方法,其中所述纯化的结果使至少大约65%的残余污染核酸从

裂解物、上清液或滤出液中被除去。

[0044] 15. 根据项1所述的方法,其中所述纯化的结果使至少大约98%的残余污染核酸从裂解物、上清液或滤出液中被除去。

[0045] 16. 根据项1所述的方法,进一步包括使用一种或多种色谱处理将VLP的第一亚群与纯化溶液分离,每一个色谱处理均独立地从下组中选出:羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、混合模式色谱、和亲和色谱。

[0046] 17. 一种用于纯化病毒样颗粒(VLP)的方法,包括:

[0047] 产生或获得含有VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液;和

[0048] 使用多步色谱处理纯化VLP,其中该多步色谱处理的至少一个色谱处理包括:

[0049] 使裂解物、上清液或滤出液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合;

[0050] 用溶剂和/或去污剂处理色谱材料;和

[0051] 在所述处理后,将VLP从色谱材料洗脱。

[0052] 18. 根据项17所述的方法,其中溶剂和/或去污剂包括如下的一种或多种:TnBP、辛基酚、环氧乙烷缩合物(ethyleneoxide condensate)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(polyoxyethylene sorbitan monooleate)、和胆酸钠、Triton X-100、和磷酸三丁酯。

[0053] 19. 根据项17所述的方法,其中VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群I VLP、诺如病毒基因群II VLP、诺如病毒基因群IV VLP、嵌合诺如病毒VLP,和沙波病毒(sapovirus) VLP。

[0054] 20. 根据项17所述的方法,其中VLP与残余污染蛋白的比值与裂解物、上清液或滤出液相比被增加至少大约10倍。

[0055] 21. 根据项17所述的方法,其中VLP与残余污染蛋白的比值与裂解物、上清液或滤出液相比被增加至少大约90倍。

[0056] 22. 根据项17所述的方法,其中所述纯化的结果使至少大约50%的残余污染蛋白被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0057] 23. 根据项17所述的方法,其中所述纯化的结果使至少大约99%的残余污染蛋白被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0058] 24. 根据项17所述的方法,其中在所述纯化期间有不超过大约50%的VLP被损失。

[0059] 25. 根据项17所述的方法,其中在所述纯化的结果使至少大约65%的VLP被回收。

[0060] 26. 根据项17所述的方法,其中每一个色谱处理独立地从下组中选出:羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、混合模式色谱、基于膜的色谱和亲和色谱。

[0061] 27. 根据项26所述的方法,其中多步色谱处理的第一色谱处理是离子交换色谱,其中该离子交换色谱从阴离子交换色谱和阳离子交换色谱中选出。

[0062] 28. 根据项27所述的方法,其中所述处理步骤在离子交换色谱处理的离子交换柱上执行。

[0063] 29. 根据项27所述的方法,进一步包括一个或多个额外的色谱处理。

[0064] 30. 根据项17所述的方法,其中多步色谱处理的第一色谱处理选自下组:离子交换色谱、羟基磷灰石色谱和疏水相互作用色谱。

[0065] 31. 根据项17所述的方法,其中裂解物、上清液或滤出液使用重组方法产生。

- [0066] 32. 根据项31所述的方法,其中VLP在细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物或哺乳动物细胞中产生。
- [0067] 33. 一种纯化病毒样颗粒(VLP)的方法,包括:
- [0068] 产生或获得含有VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液,所述VLP至少包含VLP的第一亚群和第二亚群;
- [0069] 将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液;
- [0070] 使用过滤处理从pH被调节的溶液中除去VLP的第二亚群,从而产生过滤的纯化溶液,其中该过滤的纯化溶液基本上保留VLP的第一亚群;和
- [0071] 使用多步色谱处理将VLP的第一亚群从过滤的纯化溶液中分离。
- [0072] 34. 根据项33所述的方法,其中该多步色谱处理的至少一个色谱处理包括:
- [0073] 使过滤的纯化溶液与色谱材料接触,其中VLP的第一亚群与所述色谱材料结合;
- [0074] 用溶剂和/或去污剂处理色谱材料;和
- [0075] 将VLP的第一亚群从色谱材料洗脱。
- [0076] 35. 根据项34所述的方法,其中VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值与裂解物、上清液或滤出液相比被增加至少大约2倍。
- [0077] 36. 根据项33所述的方法,其中每一个色谱处理独立地从下组中选出:羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、混合模式色谱、和亲和色谱。
- [0078] 37. 根据项33所述的方法,其中VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群I VLP、诺如病毒基因群II VLP、诺如病毒基因群IV VLP、嵌合诺如病毒VLP,和沙波病毒VLP。
- [0079] 38. 根据项37所述的方法,其中VLP是诺如病毒基因群I VLP,其中第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒VLP,并且其中第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒VLP。
- [0080] 39. 根据项33所述的方法,其中裂解物、上清液或滤出液使用重组方法产生。
- [0081] 40. 根据项33所述的方法,其中VLP在细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物或哺乳动物细胞中产生。
- [0082] 41. 根据项33所述的方法,其中裂解物、上清液或滤出液的被调节pH小于大约3。
- [0083] 42. 根据项33所述的方法,其中裂解物、上清液或滤出液的被调节pH小于大约4。
- [0084] 43. 根据项33所述的方法,其中所述pH调节被执行大约30分钟至大约48小时的时间。
- [0085] 44. 根据项33所述的方法,其中过滤处理包括深层过滤处理。
- [0086] 45. 根据项33所述的方法,在过滤之后进一步包括一个或多个如下的处理:离心、沉淀、絮凝、沉降和额外过滤。
- [0087] 46. 一种疫苗,其包含通过根据项33所述的方法制备的VLP的第一亚群。
- [0088] 47. 一种用于纯化病毒样颗粒(VLP)的方法,包括:
- [0089] 产生或获得含有所述VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液;
- [0090] 将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液;和
- [0091] 从pH被调节的溶液中除去非VLP微粒/聚集物,所述除去包括通过深层过滤处理使

pH被调节的溶液澄清,从而产生纯化的深层过滤溶液。

[0092] 48. 根据项47所述的方法,其中深层过滤处理包括使pH被调节的溶液与一个或多个深层过滤器(depth filter)接触。

[0093] 49. 根据项47所述的方法,其中至少一个深层过滤器是硅藻土深层过滤器。

[0094] 50. 根据项48所述的方法,其中一个或多个深层过滤器是多个硅藻土深层过滤器,其每一个具有从下述范围中独立选出的过滤容量:大约50升/m<sup>2</sup>至大约1000升/m<sup>2</sup>。

[0095] 51. 根据项47所述的方法,其中一个或多个深层过滤器是单深层过滤器,其每一个具有从下述范围中选出的过滤容量:大约150升/m<sup>2</sup>至大约400升/m<sup>2</sup>。

[0096] 52. 根据项47所述的方法,其中与裂解物、上清液或滤出液相比,至少大约99%的残余污染核酸被从pH被调节的溶液中除去。

[0097] 53. 根据项47所述的方法,其中与裂解物、上清液或滤出液相比,至少大约95%的残余污染核酸被从pH被调节的溶液中除去。

[0098] 54. 根据项47所述的方法,其中与裂解物、上清液或滤出液相比,至少大约75%的VLP被从pH被调节的溶液中回收。

[0099] 55. 根据项47所述的方法,其中与裂解物、上清液或滤出液相比,至少大约100%的VLP被从pH被调节的溶液中回收。

[0100] 56. 根据项47所述的方法,其中VLP至少包含VLP的第一亚群和第二亚群,并且其中所述澄清将VLP的第二亚群从pH被调节的溶液中分离,从而产生深层过滤的纯化溶液,并且其中该深层过滤的纯化溶液基本上保留VLP的第一亚群。

[0101] 57. 根据项56所述的方法,所述分离进一步包括使用一个或多个色谱处理将VLP的第一亚群从深层过滤的纯化溶液中分离,每一个色谱处理独立地从下组中选出:羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、阴离子交换色谱、阳离子交换色谱、混合模式色谱、和亲和色谱。

[0102] 58. 根据项55所述的方法,其中VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群I VLP、诺如病毒基因群II VLP、诺如病毒基因群IV VLP、嵌合诺如病毒VLP,和沙波病毒VLP。

[0103] 59. 根据项58所述的方法,其中VLP是诺如病毒基因群I VLP,其中第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒VLP,并且其中第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒VLP。

[0104] 60. 根据项47所述的方法,其中细胞裂解物或培养物上清/滤出液使用重组方法产生。

[0105] 61. 根据项47所述的方法,其中VLP在细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物或哺乳动物细胞中产生。

[0106] 62. 一种包含诺如病毒VLP的纯化群体的溶液,其中通过尺寸排阻色谱和ELISA测量,所述溶液含有与VLP相比不超过大约80%的残余污染蛋白。

[0107] 63. 一种疫苗,包括从根据项62所述的溶液制备的诺如病毒VLP。

[0108] 64. 根据项62所述的溶液,从含有诺如病毒VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液中纯化出来。

[0109] 65. 根据项64所述的溶液,与裂解物、上清液或滤出液相比,含有不超过大约35%的残余污染核酸。

[0110] 66. 根据项64所述的溶液,其中至少大约50%的诺如病毒VLP被从裂解物、上清液或滤出液中回收。

[0111] 67. 根据项64所述的溶液,其中与裂解物、上清液或滤出液相比,诺如病毒VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少大约10倍。

[0112] 68. 根据项62所述的溶液,其中该溶液适合用在商业处理中,所述商业处理具有至少20升的处理体积。

[0113] 69. 根据项62所述的溶液,通过一个或多个如下的处理产生:pH处理、离心、沉淀、絮凝、沉降、过滤和色谱。

[0114] 70. 根据项69所述的溶液,通过如下产生:

[0115] 产生或获得含有诺如病毒VLP的细胞裂解物、培养物上清或滤出液,所述诺如病毒VLP至少包含诺如病毒VLP的第一亚群和第二亚群;

[0116] 将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH,从而产生pH被调节的溶液;

[0117] 使用过滤处理将诺如病毒VLP的第二亚群从pH被调节的溶液中除去,从而产生过滤的纯化溶液,其中该过滤的纯化溶液基本上保留诺如病毒VLP的第一亚群;和

[0118] 使用多步色谱处理将诺如病毒VLP的第一亚群从过滤的纯化溶液中分离。

[0119] 71. 根据项70所述的溶液,其中诺如病毒VLP是诺如病毒基因群I VLP,其中第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒基因群I VLP,并且其中第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒基因群I VLP。

[0120] 72. 根据项70所述的溶液,其中诺如病毒VLP是诺如病毒基因群II VLP,其中第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒基因群II VLP,并且其中第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒基因群II VLP。

[0121] 73. 一种包含VLP纯化群体的溶液,其中所述溶液含有至少50%的具有全长VP1亚单位的VLP。

[0122] 74. 根据项73所述的溶液,含有高达大约100%的具有全长VP1亚单位的VLP。

[0123] 75. 根据项73所述的溶液,其中该溶液基本上没有具有截短的VP1亚单位的VLP。

[0124] 76. 根据项73所述的溶液,从含有至少10%的具有截短的VP1亚单位的VLP的未纯化溶液中产生。

[0125] 77. 根据项76所述的溶液,其中未纯化的溶液包括含有VLP的细胞裂解物、培养物上清和滤出液。

[0126] 78. 根据项76所述的溶液,其中该溶液通过如下方法从未纯化的溶液中产生:

[0127] 将未纯化溶液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液;和

[0128] 从pH被调节的溶液中除去具有截短的VP1亚单位的VLP,从而产生作为纯化溶液的溶液,其中pH被调节的溶液基本上保留具有全长VP1亚单位的VLP。

[0129] 79. 根据项78所述的溶液,其中所述除去通过一个或多个如下的处理执行:离心、沉淀、絮凝、沉降和过滤。

[0130] 80. 一种具有全长VP1亚单位的VLP的纯化群体,通过向根据项73所述的溶液采用一种或多种色谱处理而产生。

[0131] 81. 一种清除和/或失活含有活病毒并进一步含有由活病毒产生VLP的溶液中的活

病毒的方法,该方法包括将含有活病毒的溶液的pH调节到小于大约5,从而产生pH被调节的溶液。

- [0132] 82.根据项81所述的方法,其中pH被调节的溶液中的活病毒水平被减少至少大约 $10^4$ 倍。
- [0133] 83.根据项81所述的方法,其中pH被调节的溶液中的活病毒水平被减少至少大约 $10^5$ 倍。
- [0134] 84.根据项81所述的方法,其中VLP从基因群I VLP和基因群II VLP中选出。
- [0135] 85.根据项81所述的方法,其中活病毒包括杆状病毒。
- [0136] 86.根据项81所述的方法,进一步包括:
  - [0137] 从pH被调节的溶液中除去非VLP微粒/聚集物,从而产生纯化溶液;和
  - [0138] 使用至少一种色谱处理对纯化溶液进行纯化,其中该至少一种色谱处理包括:
    - [0139] 使pH被调节的溶液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合;
    - [0140] 用溶剂和/或去污剂处理色谱材料;和
    - [0141] 在所述处理后,将VLP从色谱材料洗脱,从而产生洗脱物,
    - [0142] 其中与含有活病毒的溶液相比,洗脱物中活病毒的水平被减少至少大约 $10^2$ 倍。
  - [0143] 87.根据项86所述的方法,其中与含有活病毒的溶液相比,洗脱物中活病毒的水平被减少至少大约 $10^3$ 倍。
  - [0144] 88.根据项86所述的方法,其中VLP从基因群I VLP和基因群II VLP中选出。
  - [0145] 89.根据项86所述的方法,其中活病毒包括杆状病毒。
  - [0146] 90.一种纯化的VLP组合物,从根据项86所述的洗脱物中产生。
  - [0147] 91.一种从根据项86所述的洗脱物中产生的疫苗。
  - [0148] 92.一种清除和/或失活含有活病毒并进一步含有由活病毒产生VLP的溶液中的活病毒的方法,该方法包括使用至少一种色谱处理纯化含有活病毒的溶液,其中该至少一种色谱处理包括:
    - [0149] 使含有活病毒的溶液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合;
    - [0150] 用溶剂和/或去污剂处理色谱材料;和
    - [0151] 在所述处理后,将VLP从色谱材料洗脱,从而产生洗脱物。
  - [0152] 93.根据项92所述的方法,其中与含有活病毒的溶液相比,洗脱物中活病毒的水平被减少至少大约 $10^5$ 倍。
  - [0153] 94.根据项92所述的方法,其中与含有活病毒的溶液相比,洗脱物中活病毒的水平被减少至少大约 $10^7$ 倍。
  - [0154] 95.根据项92所述的方法,其中VLP从基因群I VLP和基因群II VLP中选出。
  - [0155] 96.根据项92所述的方法,其中活病毒包括杆状病毒。
  - [0156] 附图简述
  - [0157] 图1A图解了低pH处理,是经过染色的、以Norwalk VP1亚单位为主要条带的SDS-PAGE凝胶,其中泳道1是批量(bulk)Norwalk VLP生产培养物(总);泳道2是VLP生产培养物-微量离心上清液/滤出液;泳道3是VLP生产培养物-微量离心沉淀(pellet);泳道4是经过低pH处理之后的批量(bulk)VLP生产培养物(总);和泳道5是经过低pH处理、低速离心和0.2μm过滤之后的VLP生产培养物(最终收获材料);

[0158] 图1B图解了低pH处理,是经过染色的、以Consensus VP1亚单位为主要条带的SDS-PAGE凝胶,其中泳道1是批量Consensus VLP生产培养物(总);和泳道2是经过低pH处理、低速离心和0.2μm过滤之后的VLP生产培养物(最终收获材料);

[0159] 图2A图解了溶剂/去污剂处理,是在阳离子交换捕获色谱期间结合和洗脱单元操作的代表性色谱图,其中Norwalk VLP条件培养基以100mL/min加载于180mL柱床体积的Sartobind S囊室(capsule)上。色谱图显示:1) 条件培养基加载;2) 溶剂/去污剂清洗;和3) Norwalk VLP洗脱;

[0160] 图2B图解了溶剂/去污剂处理,是在羟基磷灰石捕获色谱期间结合和洗脱单元操作的代表性色谱图,其中Norwalk VLP条件培养基以80mL/min加载于250mL柱床体积的羟基磷灰石柱上。色谱图显示:1) 条件培养基加载;2) 溶剂/去污剂清洗;和3) 100mM磷酸盐清洗;和4) Norwalk VLP洗脱;

[0161] 图3A图解了VLP完整性分析,是分析型尺寸排阻色谱图,其中色谱图证明7.4分钟的峰与组装的颗粒一致;

[0162] 图3B图解了VLP完整性分析,是透射电子显微镜图,其证明有T3二十面体(icosohedral) VLP的预期~30-40nm颗粒;

[0163] 图4A图解了VLP生产和通过离心收获的流程图;和

[0164] 图4B图解了VLP生产和通过深层过滤收获的流程图。

[0165] 发明详述

[0166] 本发明涉及溶液和/或疫苗组合物的制备,特别地涉及纯化VLP的方法。特别地,本发明人发现,VLP生产培养物的低pH处理步骤有利于处理污染物,例如活宿主细胞病毒和残余污染蛋白、以及VLP群体的一些变体的清除,同时保持免疫原性和VLP结构的完整性。例如,为了纯化诺如病毒VLP,本发明人发现,低pH处理步骤导致使活病毒和具有截短VP1亚单位的诺如病毒VLP基本上被除去和/或失活。

[0167] 可以理解,本发明的方面可应用于纯化任何VLP及其变体。在一些实施方案中,VLP是属于杯状病毒科的病毒。在一些实施方案中,VLP是诺如病毒VLP,包括嵌合或工程化变体。在一些实施方案中,VLP是沙波病毒VLP。

[0168] 还可以理解,本发明的方案可应用于VLP纯化,其导致活病毒传染剂被除去。在一些实施方案中,活病毒是无包膜病毒,例如细小病毒、轮状病毒、和/或类似物。在一些实施方案中,活病毒是有包膜病毒,例如杆状病毒、逆转录病毒、漂游病毒(errantivirus)、虫媒病毒(arbovirus)、呼吸道合胞病毒、和/或类似物。

[0169] 此外,本发明人发现,用溶剂和/或去污剂处理是失活和除去病毒污染的有用步骤,包括残余杆状病毒(如果VLP是使用杆状病毒表达系统生产的话)。因此,本发明的方法可以额外或可选择地包括至少一个色谱处理,其涉及用溶剂和/或去污剂处理与包含VLP的组合物接触的(例如色谱柱的)色谱材料,和/或在与色谱材料接触之前,向包含VLP的组合物中添加溶剂/去污剂。随后将VLP从色谱材料上洗脱,并采用SDR Hyper-D除去残余溶剂/去污剂。

[0170] 此外,本发明人发现,用一个或多个深层过滤器,例如硅藻土和/或合成深层过滤器,进行深层过滤是除去残余污染核酸的有用步骤,包括杆状病毒核酸(如果VLP是使用杆状病毒表达系统生产的话)。因此,本发明的方法可以额外或可选择地包括通过深层过滤处

理澄清任何含有VLP和残余污染核酸的溶液,从而产生纯化的深层过滤溶液。

[0171] 本发明人还发现,通过一种或多种上述处理产生的纯化溶液可有利地导致纯化溶液与任何纯化前溶液相比,残余污染蛋白相对于VLP减少。因此,作为纯化的结果,本发明的溶液可以显示残余污染蛋白相对于VLP减少。

[0172] 本发明人还发现,通过一种或多种上述处理产生的纯化溶液可有利地导致与任何纯化前溶液相比,具有全长VP1亚单位的VLP的VLP水平相对增加。因此,作为纯化的结果,本发明的溶液可以显示具有全长VP1亚单位的VLP的水平增加。

[0173] 纯化病毒样颗粒(VLP)的方法包括产生或获得含有所述VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液。该方法还包括将裂解物、上清液或滤出液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液。该方法还包括从包含VLP的pH被调节的溶液中除去非VLP微粒/聚集物,从而产生纯化溶液。

[0174] 在一些实施方案中,VLP生产产生了至少包含VLP的第一亚群和第二亚群以及其他处理污染材料的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液。在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液是批量(bulk)生产培养物,或者从批量生产培养物产生。在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液从已经通过过滤和/或离心进行了预澄清的培养物上清液获得。

[0175] 在一些实施方案中,VLP的亚群根据它们对pH处理的不同响应,根据所诱发的抗原应答,和/或根据结构差异进行表征。因此,可以想象可能存在超过2种VLP亚群,这取决于病毒。在一些实施方案中,所产生的VLP是诺如病毒VLP,包含具有全长VP1亚单位的诺如病毒VLP的第一亚群,和包含具有截短的VP1亚单位的诺如病毒VLP的第二亚群。在一些实施方案中,诺如病毒VLP是如下的一种或多种:诺如病毒基因群I VLP,诺如病毒基因群II VLP,诺如病毒基因群III VLP,诺如病毒基因群IV VLP,和诺如病毒基因群V VLP。在一些实施方案中,VLP是酸稳定的VLP。

[0176] 本发明的方法包括调节裂解物、上清液或滤出液的pH,以便将VLP与处理污染物和异常形成的VLP样结构分离。处理污染物可以包括,但不仅限于,多糖,残余污染蛋白如宿主细胞蛋白,残余污染核酸如宿主细胞核酸,脂质,介质成分,活传染剂如活宿主细胞病毒(例如杆状病毒),和类似物,以及任何前述污染物的组装物或聚集物。异常形成的VLP样结构可以是任何与期望的VLP结构不同的VLP结构,所述不同是基于其对环境条件(例如pH处理或温度)的不同响应,所诱发的抗原应答,结构差异,分离模式(例如色谱、沉淀或过滤),和/或类似情况。

[0177] 在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液的pH被调节到小于大约5,从而产生pH被调节的溶液。在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液的pH被调节到小于大约4.5,小于大约4,小于大约3.5,小于大约3.4,小于大约3.3,小于大约3.2,小于大约3.1,小于大约3,小于大约2.9,小于大约2.8,小于大约2.7,小于大约2.6,小于大约2.5,小于大约2,小于大约1.5,小于大约1,和其间的全部范围/亚范围。

[0178] 裂解物、上清液或滤出液的pH通过本领域技术人员已知的任何方法进行调节。在一些实施方案中,pH通过向裂解物、上清液或滤出液添加一种或多种导致酸化的试剂而加以调节。酸化剂的实例可以包括:盐酸、乙酸、硫酸和磷酸。所添加试剂的pH、体积和组成可以被合适地选择,这是本领域已知的。

[0179] 在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液pH调节和/或处理的时间为大约30分

钟。在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液pH调节和/或处理的时间为大约1小时,大约2小时,大约3小时,大约4小时,大约5小时,大约10小时,大约15小时,大约20小时,大约25小时,大约30小时,大约35小时,大约40小时,大约45小时,大约46小时,大约47小时,大约48小时,和其间的所有范围和/或亚范围。

[0180] 在一些实施方案中,裂解物、上清液或滤出液包括VLP的第一亚群和第二亚群,如早前所讨论的,并且调节裂解物、上清液或滤出液的pH导致第一和第二亚群不均匀分布。在一些实施方案中,pH处理导致在pH被调节的溶液中形成微粒和/或聚集物,VLP的第二亚群基本上发现于所得微粒/聚集物中,而VLP的第一亚群保留在pH被调节的溶液的体积内。在一些实施方案中,例如本文中纯化的诺如病毒基因群II VLP,第二亚群包括含有截短的VP1蛋白的VLP,相比之下,第一亚群包含具有全长VP1蛋白的VLP。

[0181] 在一些实施方案中,纯化VLP的方法进一步包括将非VLP微粒/聚集物从pH被调节的溶液中除去,从而产生纯化溶液。在一些实施方案中,除去包括,但不仅限于,一种或多种如下的处理:离心、沉淀、絮凝、沉降和过滤。在一些实施方案中,分离至少涉及离心,以除去微粒/聚集物。

[0182] 在一些实施方案中,除去非VLP微粒/聚集物包括将VLP的第二亚群从pH被调节的溶液中分离,从而产生纯化溶液,其中纯化溶液基本上保留VLP的第一亚群。换言之,微粒/聚集物包括VLP的第二亚群。这样,选择除去非期望的VLP亚群可以在收获处理的早期阶段实现,即在培养物澄清期间。

[0183] 在一些实施方案中,除去/澄清通过一个或多个过滤处理完成。合适的过滤包括,但不仅限于,深层过滤、膜过滤、化学过滤、和/或类似方法。在一些实施方案中,至少一个过滤处理是使用一个或多个深层过滤器的深层过滤。深层过滤可以指任何采用多孔过滤器/过滤介质的过滤处理。合适的深层过滤器包括,但不仅限于,硅藻土深层过滤器、合成深层过滤器、和/或类似物。使用深层过滤器的好处包括容易操作和可以获得一次性材料,避免了重复使用装置(reused equipment)所要求的清洁确认。在一些实施方案中,也可以任意地采用一种或多种额外的过滤处理,例如使用亚微米过滤器。

[0184] 在一些实施方案中,在这一步骤之后,VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约2倍。在一些实施方案中,VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约3倍,至少大约4倍,至少大约5倍,至少大约10倍,至少大约15倍,至少大约20倍,至少大约50倍,至少大约75倍,至少大约100倍,和其间的所有数值。

[0185] 在一些实施方案中,在过滤之后,至少大约50%的残余污染核酸被从裂解物、上清液或滤出液中除去。术语“残余污染核酸”能够包括,但不仅限于,宿主细胞核酸、宿主细胞病毒的核酸、生产病毒(即用于产生VLP)的核酸,和/或类似物。在一些实施方案中,至少大约55%的残余污染核酸,至少大约60%的残余污染核酸,至少大约61%的残余污染核酸,至少大约62%的残余污染核酸,至少大约63%的残余污染核酸,至少大约64%的残余污染核酸,至少大约65%的残余污染核酸,至少大约66%的残余污染核酸,至少大约67%的残余污染核酸,至少大约68%的残余污染核酸,至少大约69%的残余污染核酸,至少大约70%的残余污染核酸,至少大约75%的残余污染核酸,至少大约80%的残余污染核酸,至少大约85%的残余污染核酸,至少大约90%的残余污染核酸,至少大约91%的残余污染核酸,至少大约92%的残余污染核酸,至少大约93%的残余污染核酸,至少大约94%的残余污染核酸,至少

大约95%的残余污染核酸,至少大约96%的残余污染核酸,至少大约97%的残余污染核酸,至少大约98%的残余污染核酸,至少大约99%的残余污染核酸,至少大约100%的残余污染核酸,和其间的全部数值,被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0186] 一般地,VLP在特定处理步骤之后的纯化程度可以通过VLP浓度与任何其他成分浓度的比值变化进行测量(相对于裂解物、上清液或滤出液)。例如,可以计算VLP浓度与传染剂浓度之间的比值,VLP浓度与残余污染蛋白之间的比值,和/或VLP浓度与宿主细胞处理污染物之间的比值。

[0187] 在一些实施方案中,纯化VLP包括,在将VLP第二亚群从pH被调节的溶液中除去之后,从纯化溶液分离VLP的第一亚群。在一些实施方案中,将VLP第一亚群从纯化溶液中分离包括任何合适的分离处理,例如离心(如连续流)、沉淀、相分离、切向流过滤、缓冲液交换方法,和/或类似方法。在一些实施方案中,将VLP第一群从纯化溶液分离包括使用一种或多种色谱处理。每一个色谱处理可以独立地选自下组,但不仅限于,羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、混合模式色谱、和亲和色谱。离子交换色谱可以是阴离子交换色谱或阳离子交换色谱。

[0188] 在一些实施方案中,在这一步骤之后,VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约2倍。在一些实施方案中,VLP第一亚群与残余污染蛋白的比值被增加至少大约3倍,至少大约4倍,至少大约5倍,至少大约10倍,至少大约15倍,至少大约20倍,至少大约50倍,至少大约75倍,至少大约100倍,和其间的所有的数值。在一些实施方案中,在此步骤之后,至少大约50%的残余污染核酸被从裂解物、上清液或滤出液中除去。术语“残余污染核酸”能够包括,但不仅限于,宿主细胞核酸、生产病毒核酸、病毒核酸、细菌核酸、真菌核酸,来自其它可能与本文所述系统和方法有关或无关的生物体的核酸,和/或类似物。在一些实施方案中,至少大约55%的残余污染核酸,至少大约60%,至少大约61%,至少大约62%,至少大约63%,至少大约64%,至少大约65%,至少大约66%,至少大约67%,至少大约68%,至少大约69%,至少大约70%,至少大约75%,至少大约80%,至少大约85%,至少大约90%,至少大约91%,至少大约92%,至少大约93%,至少大约94%,至少大约95%,至少大约96%,至少大约97%,至少大约98%,至少大约99%,至少大约100%,和其间的全部数值的残余污染核酸,被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0189] 本发明人还发现,溶剂和/或去污剂处理步骤可用于将活病毒传染剂(例如杆状病毒)从VLP制备物中纯化除离。如早前提到的,溶剂和/或去污剂可以在与色谱柱接触之前添加到VLP制备物中,和/或能够在与色谱柱接触之前添加到批量溶液中,和/或能够在与VLP制备物接触之后添加到色谱柱中。因此,尽管本文出于简化的目的通过柱上溶剂/去污剂处理进行的描述,但是应当理解,这些可能性的每一个均在本发明的范围内。在这些实施方案中,本发明方法包括产生或获得含有VLP的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液,和使用多步色谱处理纯化VLP。多步色谱处理中的至少一个色谱处理包括使裂解物、上清液或滤出液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合。至少一个色谱处理还包括用溶剂和/或去污剂处理色谱材料。至少一个色谱处理进一步包括在处理后将VLP从色谱材料上洗脱。

[0190] 在一些实施方案中,至少一个色谱处理还包括用溶剂和/或去污剂处理色谱材料。在一些实施方案中,色谱材料是色谱柱,并且处理包括用溶剂和/或去污剂的柱上处理或清洗。可以采用任何合适的溶剂和/或去污剂。在一些实施方案中,溶剂是有机溶剂,并且包括

但不仅限于,如下的一种或多种:磷酸三丁酯(TnBP)。在一些实施方案中,去污剂包括,但不仅限于,如下的一种或多种:Triton X-100、辛基酚环氧乙烷缩合物(octylphenol ethyleneoxide condensate)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(polyoxyethylene sorbitan monooleate)、和胆酸钠,和其各种组合。组合物实例包括:非离子去污剂(包括Triton X-100和聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯),两性离子去污剂(包括CHAPS和Zwittergent3-12))和离子去污剂(包括胆酸钠和二甲基二(十八烷基)溴化铵)。

[0191] 在一些实施方案中,溶剂和/或去污剂包括至少大约0.01%去污剂(w/v),至少大约0.1%,至少大约0.2%,至少大约0.3%,至少大约0.4%,至少大约0.5%,至少大约1%,至少大约2%,至少大约3%,至少大约4%,至少大约5%,至少大约10%去污剂(w/v),和其间的所有数值。在一些实施方案中,溶剂和/或去污剂包括至少大约0.01%溶剂(w/v),至少大约0.1%,至少大约0.2%,至少大约0.3%,至少大约0.4%,至少大约0.5%,至少大约1%,至少大约2%,至少大约3%,至少大约4%,至少大约5%,至少大约10%溶剂(w/v),和其间的所有数值。在一些实施方案中,溶剂和/或去污剂额外含有通用的生物缓冲液(例如,乙酸、柠檬酸、组氨酸、磷酸、Tris、和/或类似物)和/或盐(例如,氯化钠、氯化钾、氯化镁、和/或类似物)。

[0192] 在一些实施方案中,用溶剂和/或去污剂处理的时间为大约10分钟。在一些实施方案中,用溶剂和/或去污剂处理的时间为大约20分钟,大约30分钟,大约1小时,大约2小时,大约3小时,大约4小时,大约5小时,大约10小时,大约15小时,大约20小时,大约21小时,大约22小时,大约23小时,大约24小时,和其间的所有范围/亚范围。

[0193] 在一些实施方案中,细胞裂解物或培养物上清液/滤出液使用重组方法产生,如早前所讨论的。在一些实施方案中,VLP在如下的一种或多种中产生:细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞、植物或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,VLP是诺如病毒基因群I VLP,诺如病毒基因群II VLP,和/或诺如病毒基因群IV VLP。

[0194] 在一些实施方案中,纯化VLP包括使用多步色谱处理纯化VLP。每个色谱处理被独立地选择,如早前所列举的。在一些实施方案中,多步色谱处理的第一色谱处理是阳离子交换色谱,并且也可以采用一种或多种后续色谱处理。

[0195] 在一些实施方案中,至少一个色谱处理涉及使裂解物、上清液或滤出液与色谱材料接触,其中VLP与所述色谱材料结合。所用的色谱材料取决于所采用的特殊色谱处理,可包括,但不仅限于,阳离子交换柱、羟基磷灰石柱、疏水相互作用柱、尺寸排阻柱、阴离子交换柱、混合模式柱,或亲和柱等。当至少一个色谱处理是阳离子交换色谱时,色谱材料是阳离子交换柱或膜。

[0196] 在一些实施方案中,至少一种色谱处理还包括在柱上处理之后将VLP从色谱材料洗脱。洗脱机制可能取决于实验因素,例如但不仅限于,色谱处理的选择,所用的溶剂和/或去污剂,VLP/色谱基质和洗脱液的相互作用等。洗脱可以通过用本领域已知的任何合适的并且通用的生物学缓冲液(乙酸、柠檬酸、组氨酸、磷酸、Tris)和盐(氯化钠、氯化钾、氯化镁)调节色谱系统的pH和/或离子强度加以执行。在一些实施方案中,至少一种色谱处理是阳离子交换色谱,并且洗脱通过用乙酸清洗阳离子交换柱加以执行。在另一个实施方案中,至少一种色谱处理是羟基磷灰石色谱,并且洗脱通过用磷酸钠清洗羟基磷灰石柱加以执行。

[0197] 在一些实施方案中,在涉及溶剂和/或去污剂处理的至少一种色谱处理之后,VLP与残余污染蛋白的比值与裂解物、上清液或滤出液相比被增加大约2倍。术语“残余污染蛋白”可以包括,但不仅限于,宿主细胞蛋白,来自宿主细胞病毒、生产病毒核酸、病毒核酸、细菌核酸、真菌核酸、来自其他可能与生产系统有关或无关的生物体的核酸的蛋白组分,和/或类似物。在一些实施方案中,VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少3倍,至少大约4倍,至少大约5倍,至少大约10倍,至少大约15倍,至少大约20倍,至少大约50倍,至少大约75倍,至少大约80倍,至少大约85倍,至少大约90倍,至少大约95倍,至少大约100倍,和其间的所有数值。在一些实施方案中,在多步色谱处理之后,VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少2倍。在一些实施方案中,VLP与残余污染蛋白的比值被增加至少3倍,至少大约4倍,至少大约5倍,至少大约10倍,至少大约15倍,至少大约20倍,至少大约50倍,至少大约75倍,至少大约80倍,至少大约85倍,至少大约90倍,至少大约95倍,至少大约100倍,和其间的所有数值。

[0198] 在一些实施方案中,在至少一种涉及溶剂和/或去污剂处理的色谱处理之后,至少大约30%的残余污染蛋白被从裂解物、上清液或滤出液中除去。在一些实施方案中,至少大约35%,至少大约40%,至少大约45%,至少大约46%,至少大约47%,至少大约48%,至少大约49%,至少大约50%,至少大约51%,至少大约52%,至少大约53%,至少大约54%,至少大约55%,至少大约60%,至少大约65%,至少大约70%,至少大约75%,至少大约80%,至少大约85%,至少大约90%,至少大约91%,至少大约92%,至少大约93%,至少大约94%,至少大约95%,至少大约96%,至少大约97%,至少大约98%,至少大约99%,至少大约100%,和其间的所有数值的残余污染蛋白被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0199] 在一些实施方案中,在至少一种涉及溶剂和/或去污剂处理的色谱处理之后,裂解物、上清液或滤出液中的VLP没有损失。在一些实施方案中,在至少一种涉及溶剂和/或去污剂处理的色谱处理之后,裂解物、上清液或滤出液中的VLP有不超过大约1%,不超过大约2%,不超过大约3%,不超过大约4%,不超过大约5%,不超过大约6%,不超过大约7%,不超过大约8%,不超过大约9%,不超过大约10%,不超过大约15%,不超过大约20%,不超过大约25%,不超过大约30%,不超过大约35%,不超过大约40%,不超过大约45%,不超过大约50%,不超过大约55%,不超过大约60%,和其间的所有数值被损失。

[0200] 在一些实施方案中,在至少一种涉及溶剂和/或去污剂处理的色谱处理之后,大约100%的VLP被从裂解物、上清液或滤出液中回收。在一些实施方案中,在至少一种涉及溶剂和/或去污剂处理的色谱处理之后,至少大约99%,至少大约98%,至少大约97%,至少大约96%,至少大约95%,至少大约94%,至少大约93%,至少大约92%,至少大约91%,至少大约90%,至少大约85%,至少大约80%,至少大约75%,至少大约70%,至少大约65%,至少大约60%,至少大约55%,至少大约50%,至少大约45%,至少大约40%,和其间所有数值的VLP被从裂解物、上清液或滤出液中回收。

[0201] 在一些实施方案中,本文所述的发明方法还提供了将含有活病毒并进一步含有由活病毒产生的VLP的溶液中的活病毒清除和/或失活,其中该方法包括将含有活病毒的溶液的pH调节到小于大约5的pH值,从而产生pH被调节的溶液。活病毒可以是,但不仅限于,活宿主细胞病毒、生产病毒(例如杆状病毒)、与生产系统有关或无关的污染病毒,和/或类似物。VLP可以是,但不仅限于,基因群I VLP和/或基因群II VLP。

[0202] 在一些实施方案中,pH被调节的溶液中活病毒的水平比含有活病毒的溶液中低至

少大约10倍。在一些实施方案中, pH被调节的溶液中活病毒的水平比含有活病毒的溶液中低至少大约100倍, 至少大约10<sup>3</sup>倍, 至少大约10<sup>4</sup>倍, 至少大约10<sup>5</sup>倍, 至少大约10<sup>6</sup>倍, 至少大约10<sup>7</sup>倍, 至少大约10<sup>8</sup>倍, 至少大约10<sup>9</sup>倍, 至少大约10<sup>10</sup>倍, 和其间的所有数值。

[0203] 在一些实施方案中, 非VLP微粒/聚集物可以从pH被调节的溶液中除去, 从而产生纯化溶液, 其能够通过至少一种色谱处理进行处理。该至少一种色谱处理可以包括使纯化溶液与色谱材料接触, 其中VLP与色谱材料结合, 和用溶剂和/或去污剂处理色谱材料。至少一种色谱处理还可以包括在处理之后, 将VLP从色谱材料洗脱, 从而产生洗脱液。在一些实施方案中, 洗脱液中活病毒的水平与含有活病毒的溶液相比被减少至少大约10<sup>2</sup>倍。在一些实施方案中, 洗脱液中活病毒的水平与含有活病毒的溶液相比被减少至少大约10<sup>3</sup>倍, 至少大约10<sup>4</sup>倍, 至少大约10<sup>5</sup>倍, 至少大约10<sup>6</sup>倍, 至少大约10<sup>7</sup>倍, 至少大约10<sup>8</sup>倍, 至少大约10<sup>9</sup>倍, 至少大约10<sup>10</sup>倍, 至少大约10<sup>11</sup>倍, 至少大约10<sup>12</sup>倍, 至少大约10<sup>13</sup>倍, 至少大约10<sup>14</sup>倍, 至少大约10<sup>15</sup>倍, 至少大约10<sup>16</sup>倍, 和其间的所有数值。

[0204] 在一些实施方案中, 本文所述发明方法还提供了将含有活病毒并进一步含有由活病毒产生的VLP的溶液中的活病毒清除和/或失活, 其中该方法包括使用至少一种色谱处理纯化含有活病毒的溶液。该至少一种色谱处理可以包括使溶液与色谱材料接触, 其中VLP与色谱材料结合, 和用溶剂和/或去污剂处理色谱材料。至少一种色谱处理还可以包括在处理之后, 将VLP从色谱材料洗脱, 从而产生洗脱液。在一些实施方案中, 洗脱液中活病毒的水平与含有活病毒的溶液相比被减少至少大约10倍。在一些实施方案中, 洗脱液中活病毒的水平与含有活病毒的溶液相比被减少至少大约10<sup>2</sup>倍, 至少大约10<sup>3</sup>倍, 至少大约10<sup>4</sup>倍, 至少大约10<sup>5</sup>倍, 至少大约10<sup>6</sup>倍, 至少大约10<sup>7</sup>倍, 至少大约10<sup>8</sup>倍, 至少大约10<sup>9</sup>倍, 至少大约10<sup>10</sup>倍, 和其间的所有数值。

[0205] 在一些实施方案中, 本发明进一步可操作用于使用低pH处理步骤和过滤处理/步骤从含有VLP的裂解物、上清液或滤出液中纯化病毒样颗粒(VLP), 从而除去处理污染物和/或VLP的第二亚群, 以及至少一种涉及柱上溶剂和/或去污剂处理的色谱处理, 以便使活病毒传染剂失活。在一些实施方案中, 第一亚群包括具有全长VP1亚单位的诺如病毒VLP, 而第二亚群包括具有截短的VP1亚单位的诺如病毒VLP。裂解物、上清液或滤出液通过任何合适的方法产生, 如早前所述。

[0206] 调节裂解物、上清液或滤出液的pH的执行方式与已描述的相似, 包括pH值的条件(例如小于大约5)、处理的时间(例如大约30分钟)等。pH处理导致形成含有VLP第二亚群的微粒和/或聚集物, 而VLP的第一亚群仍保留在pH被调节的溶液体积中。

[0207] 过滤处理的执行方式与已描述的相似, 并且可以是深层过滤处理。过滤步骤导致除去含有VLP第二亚群的微粒/聚集物, 以及处理污染物如残余污染核酸, 从而产生过滤的纯化溶液, 其中VLP的第一亚群保留在该过滤的纯化溶液体积中。

[0208] 在本实施方案中, pH处理和过滤步骤在多步色谱处理之前执行, 并且纯化VLP包括使用多步色谱处理将VLP第一亚群与过滤的纯化溶液分离, 其中多步色谱处理的每个色谱处理如前所述地独立选出。VLP的第一亚群与色谱材料/柱结合, 所述色谱材料/柱用溶剂和/或去污剂处理。可采用任何合适的溶剂和/或去污剂, 如前所述。然后, 将VLP的第一亚群从色谱材料上洗脱。

[0209] 在一些实施方案中, VLP与残余污染蛋白的比值在低pH处理和至少一种色谱处理

之后被增加大约2倍。在一些实施方案中, VLP与残余污染蛋白的比值被增加大约3倍, 大约4倍, 至少5倍, 至少10倍, 至少15倍, 至少20倍, 至少50倍, 至少75倍, 至少100倍, 和其间的所有数值。在一些实施方案中, VLP与残余污染蛋白的比值在低pH处理和多步色谱处理之后被增加大约2倍。在一些实施方案中, VLP与残余污染蛋白的比值被增加大约3倍, 大约4倍, 至少5倍, 至少10倍, 至少15倍, 至少20倍, 和其间的所有数值。

[0210] 在一些实施方案中, 本发明进一步可操作用于使用低pH处理步骤和深层过滤处理/步骤纯化VLP, 从而除去处理污染物和/或非期望的VLP亚群, 例如VLP的第二亚群。pH处理步骤的执行可以如前所述。

[0211] 深层过滤处理能够包括将pH被调节的溶液与一个或多个深层过滤器接触, 从而产生过滤的纯化溶液。可以根据任何生产因素为纯化系统选择一个或多个深层过滤器, 例如处理体积, 颗粒装载或负载, 产物回收率, 最终浊度, 过滤器容量, 和/或类似因素。在一些实施方案中, 至少一个深层过滤器是硅藻土深层过滤器。在一些实施方案中, 数个深层过滤器是硅藻土深层过滤器, 其每一个具有从下组独立选出的过滤器容量: 大约50升/ $\text{m}^2$ , 大约100升/ $\text{m}^2$ , 大约200升/ $\text{m}^2$ , 大约300升/ $\text{m}^2$ , 大约400升/ $\text{m}^2$ , 大约500升/ $\text{m}^2$ , 大约600升/ $\text{m}^2$ , 大约700升/ $\text{m}^2$ , 大约800升/ $\text{m}^2$ , 大约900升/ $\text{m}^2$ , 大约1000升/ $\text{m}^2$ , 和其间的所有数值。在一些实施方案中, 使用具有选自下组的过滤器容量的单深层过滤器: 大约150升/ $\text{m}^2$ , 大约200升/ $\text{m}^2$ , 大约250升/ $\text{m}^2$ , 大约300升/ $\text{m}^2$ , 大约350升/ $\text{m}^2$ , 大约400升/ $\text{m}^2$ , 和其间的所有数值。可以使用的一个示例性深层过滤器是Millistak+HC pod过滤器。

[0212] 在一些实施方案中, 与细胞裂解物或培养物上清液/滤出液相比, 通过深层过滤处理可以将至少大约50%的残余污染核酸从pH被调节的溶液中除去。在一些实施方案中, 与细胞裂解物或培养物上清液/滤出液相比, 通过深层过滤处理可以将至少大约55%, 至少大约60%, 至少大约65%, 至少大约70%, 至少大约75%, 至少大约80%, 至少大约85%, 至少大约90%, 至少大约91%, 至少大约92%, 至少大约93%, 至少大约94%, 至少大约95%, 至少大约96%, 至少大约97%, 至少大约98%, 至少大约99%, 至少大约100%, 和其间所有数值的残余污染核酸从pH被调节的溶液中除去。

[0213] 在一些实施方案中, 与细胞裂解物或培养物上清液/滤出液相比, 通过深层过滤处理, 大约100%的VLP被从pH被调节的溶液中回收。在一些实施方案中, 与细胞裂解物或培养物上清液/滤出液相比, 通过深层过滤处理, 至少大约99%, 至少大约98%, 至少大约97%, 至少大约96%, 至少大约95%, 至少大约94%, 至少大约93%, 至少大约92%, 至少大约91%, 至少大约90%, 至少大约85%, 至少大约80%, 至少大约75%, 至少大约70%, 至少大约65%, 至少大约60%, 至少大约55%, 至少大约50%, 至少大约45%, 至少大约40%, 和其间所有数值的VLP被从pH被调节的溶液中回收。

[0214] 在一些实施方案中, 所回收的VLP是VLP的第一亚群。在一些实施方案中, 一种或多种色谱处理可用于将VLP的第一亚群从深层过滤的纯化溶液中分离, 如前所述。

[0215] 在一些实施方案中, 本发明的方面进一步可操作用于提供根据尺寸排阻色谱和ELISA测量, 含有与VLP相比不超过80%残余污染蛋白的诺如病毒VLP纯化群体的溶液。诺如病毒VLP纯化群体的溶液可以从先前所述的细胞裂解物、培养物上清液或滤出液产生, 或者从先前所述的任何其他溶液产生, 如pH被调节的溶液、深层过滤的溶液等。在一些实施方案中, 诺如病毒VLP纯化群体的溶液通过纯化含有诺如病毒VLP的裂解物、上清液或滤出液获

得。在一些实施方案中,诺如病毒VLP纯化群体的溶液通过一种或多种如下的处理产生:pH处理、离心、沉淀、絮凝、沉降、过滤和色谱。在一些实施方案中,诺如病毒VLP纯化群体的溶液从任何经过处理的/未处理的溶液产生,例如通过pH处理和过滤步骤,随后进行多步色谱处理,如前所述。

[0216] 在一些实施方案中,诺如病毒VLP纯化群体的溶液与细胞裂解物或培养物上清液/滤出液相比不含残余污染核酸。在一些实施方案中,诺如病毒VLP纯化群体的溶液与细胞裂解物或培养物上清液/滤出液相比含有不超过大约1%,不超过大约2%,不超过大约3%,不超过大约4%,不超过大约5%,不超过大约10%,不超过大约15%,不超过大约20%,不超过大约25%,不超过大约30%,不超过大约35%,不超过大约40%,不超过大约45%,不超过大约50%,不超过大约55%,不超过大约60%,不超过大约65%,不超过大约70%,不超过大约75%,不超过大约80%,和其间所有数值的残余污染核酸。

[0217] 在一些实施方案中,溶液含有大约100%的来自原始裂解物、上清液或滤出液的诺如病毒VLP。在一些实施方案中,溶液含有大约95%,大约90%,大约85%,大约80%,大约75%,大约70%,大约65%,大约60%,大约55%,大约50%,大约45%,大约40%,和其间所有数值的来自原始裂解物、上清液或滤出液的诺如病毒VLP。

[0218] 在一些实施方案中,诺如病毒VLP与残余污染蛋白的比值与原始裂解物、上清液或滤出液相比被增加至少大约50倍。在一些实施方案中,诺如病毒VLP与残余污染蛋白的比值与原始裂解物、上清液或滤出液相比被增加至少大约45倍,至少大约40倍,至少大约35倍,至少大约30倍,至少大约25倍,至少大约15倍,至少大约10倍,至少大约5倍,至少大约4倍,至少大约3倍,至少大约2倍,和其间所有数值。

[0219] 在一些实施方案中,诺如病毒VLP纯化群体的溶液可用于商业方法,例如用于疫苗的临床和大规模制造。在一些实施方案中,与临床和大规模制造过程相关的加工体积可以低至20升。例如,在一些实施方案中,疫苗能够从包含诺如病毒VLP的溶液中制备。

[0220] 在一些实施方案中,本发明的方面进一步可操作用于提供具有VLP纯化群体的溶液,其中所述溶液含有至少大约50%具有全长VP1亚单位的VLP。在一些实施方案中,具有VLP纯化群体的溶液含有至少大约55%,至少大约60%,至少大约65%,至少大约70%,至少大约75%,至少大约80%,至少大约85%,至少大约90%,至少大约95%,至少大约100%,和其间所有数值的具有全长VP1亚单位的VLP。换言之,具有VLP纯化群体的溶液可以基本上没有具有截短的VP1亚单位的VLP。在一些实施方案中,具有VLP纯化群体的溶液含有至多大约5%,至多大约10%,至多大约15%,至多大约20%,至多大约25%,至多大约30%,至多大约35%,至多大约40%,至多大约45%,至多大约50%,和其间所有数值的具有截短的VP1亚单位的VLP。

[0221] 在一些实施方案中,具有VLP纯化群体的溶液可以从含有至少大约5%具有截短的VP1亚单位的VLP的未纯化溶液中产生。在一些实施方案中,未纯化的溶液可以含有至少大约6%,至少大约7%,至少大约8%,至少大约9%,至少大约10%,至少大约15%,至少大约20%,至少大约25%,至少大约30%,至少大约35%,至少大约40%,至少大约45%,至少大约50%,和其间所有数值的具有截短的VP1亚单位的VLP。

[0222] 未纯化的溶液可以是任何经过处理的/未经处理的溶液,包括细胞裂解物溶液、培养物上清液、滤出液、pH被调节的溶液,和/或类似物。在一些实施方案中,具有VLP纯化群体

的溶液通过pH处理步骤和从pH处理除去被截短的VP1亚单位,从未经纯化的溶液中产生,如前所述。除去通过如下的一种或多种执行:离心、沉淀、絮凝、沉降、过滤、和/或类似方法。在一些实施方案中,具有全长VP1亚单位的VLP的纯化群体可以通过向具有VLP纯化群体的溶液应用一种或多种色谱处理而产生。

[0223] 有利地,通过这些实施方案的任一个产生的纯化VLP基本上没有活病毒传染剂。没有传染剂可以指不存在能够传染的活性剂,例如活的宿主细胞病毒自身。换言之,纯化的VLP可以含有失活的并且不能传染的试剂。作为举例,含有已经被处理从而杆状病毒不再能够传染的杆状病毒的样品,虽然该样品仍然含有失活的杆状病毒,但是没有了传染剂。而且,样品不需要绝对没有能够传染的试剂,相反,样品仅需要充分地没有活性剂从而使样品可以用于其意图的目的,如人或动物疫苗即可(即,它满足任何美国联邦法规关于人或动物疫苗内传染剂的可接受水平即可)。

[0224] 本发明的方法特别可用作规模放大VLP生产用于临床和商业制造的方法。并入了低pH处理和/或柱上溶剂和/或去污剂处理步骤的纯化方法可产生至少大约50-250mg纯化VLP/L起始培养物,至少大约200-400mg纯化VLP/L起始培养物,至少大约350-500mg纯化VLP/L起始培养物,至少大约400-750mg纯化VLP/L起始培养物,至少大约700-850mg纯化VLP/L起始培养物,至少大约800-1000mg纯化VLP/L起始培养物,和其间所有数值。所产生的VLP基本上没有处理污染物和异常VLP结构。在这种情况下,基本上没有意味着,正如本领域技术人员会意识到的,尽管可以意图除去所有的处理污染物和异常VLP结构,但是与本文所述程序相关的实际方面可能不会导致从最终组合物中完全清除掉污染物和异常VLP,但仍可用于其意图的目的。

[0225] 本发明的实施方案进一步可操作以包含疫苗,其包括通过上述方法纯化的VLP的第一亚群。典型地,这些疫苗可以制备成注射剂,作为液体溶液或混悬液;也可以制备成适合于在注射前溶解或混悬在液体中的固体形式。这些制备物还可以被乳化或者生产成干粉。活性免疫原性成分经常与药物可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂包括,例如,水、生理盐水、葡萄糖、甘油、乙醇或类似物,及其组合。

[0226] 此外,如果期望,疫苗可以含有辅助物质(*auxiliary substance*),例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、或可提高疫苗效力的佐剂。在一些实施方案中,疫苗组合物包括一种或多种与纯化VLP联合的佐剂。大多数佐剂含有被设计成保护抗原免于快速分解代谢的物质,例如氢氧化铝或矿物油,和免疫应答的刺激剂,例如百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)或结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)来源的蛋白质。合适的佐剂是商业可获得的,例如,弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Pifco Laboratories, Detroit, Mich.);Merck佐剂65(Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.);铝盐例如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝;钙、铁或锌盐;酰化酪氨酸、酰化糖的不溶混悬液;阳离子或阴离子衍生化多糖;聚磷腈;生物可降解微球;和Quil A。

[0227] 合适的佐剂还包括,但不仅限于, toll样受体(TLR)激动剂,特别是toll样受体4型(TLR-4)激动剂(例如单磷酰脂质A(MPL)、合成脂质A、脂质A模拟物或类似物),铝盐,细胞因子,皂苷,胞壁酰二肽(MDP)衍生物,CpG寡聚体,革兰氏阴性菌的脂多糖(LPS),聚磷腈,乳剂,病毒颗粒(virosome),cochleate,聚(乙交酯/丙交酯)(PLG)微球,泊洛沙姆(poloxamer)颗粒,微粒,脂质体,水包油乳剂,MF59,和角鲨烯。在一些实施方案中,佐剂不

是细菌来源的外毒素。优选的佐剂包括刺激Th1型响应的佐剂,例如3DMPL或QS21。

[0228] 单磷酰脂质A (MPL),一种来自沙门氏菌 (Salmonella) 脂质A的无毒衍生物,是强TLR-4激动剂,已经被开发作为疫苗佐剂 (Evans等2003)。在临床前鼠科动物研究中,鼻内施加MPL显示可增强分泌性以及系统性体液响应 (Baldridge等2000; Yang等2002)。还已经在超过120,000名患者的临床研究中证明了其作为疫苗佐剂的安全性和有效性 (Baldrick等, 2002; Baldridge等2004)。MPL刺激通过TLR-4受体诱发先天免疫,因此能够引发针对广泛传病原体的非特异性免疫应答,所述传病原体包括革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌、病毒和寄生虫 (Baldridge等2004; Persing等2002)。在疫苗制剂中包含MPL应当可实现快速诱发先天响应,由病毒刺激 (challenge) 引起非特异性免疫应答,同时增强由疫苗的抗原组分产生的特异性响应。

[0229] 在一些实施方案中,本发明提供了疫苗,其包括单磷酰脂质A (MPL) 或3De-0-酰化单磷酰脂质A (3D-MPL) 作为获得性和先天性免疫的增强剂。在化学上,3D-MPL是具有4、5或6个酰化链的3De-0-酰化单磷酰脂质A的混合物。3De-0-酰化单磷酰脂质A的优选形式在欧洲专利0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) 中被公开,本文引用其内容作为参考。在另一个实施方案中,本发明提供了疫苗组合物,其包括合成脂质A、脂质A模拟物或类似物,例如BioMira's PET脂质A,或被设计成发挥类似TLR-4激动剂功能的合成衍生物。

[0230] 在某些实施方案中,疫苗组合物包含两种佐剂。佐剂的组合可以从上面所述的那些中选出。在一个特殊的实施方案中,两种佐剂是MPL和氢氧化铝(例如明矾)。在另一个特殊实施方案中,两种佐剂是MPL和油。

[0231] 术语“有效佐剂量”或“有效量佐剂”是本领域技术人员充分理解的,包括能够刺激针对所施加抗原的免疫应答的一种或多种佐剂的量,即在根据鼻洗液 (nasal washing) 的IgA水平、血清IgG或IgM水平、或B和T细胞增殖进行测量时,可增加所施加抗原组合物的免疫应答的量。免疫球蛋白水平的适当有效增加包括与没有任何佐剂的相同抗原组合物相比,超过5%,优选地超过25%,特别地超过50%。

[0232] 在一个实施方案中,本发明提供了被制备成用于肠胃外给药的疫苗组合物,其中该组合物包括纯化的VLP联合氢氧化铝和缓冲液。缓冲液可以选自下组:L-组氨酸、咪唑、琥珀酸、tris、柠檬酸、bis-tris、pipes、mes、hepes、甘氨酰胺、和tricine。在一个实施方案中,缓冲液是L-组氨酸或咪唑。优选地,缓冲液的存在浓度为大约15mM-大约50mM,更优选地大约18mM-大约40mM,或者最优选地大约20mM-大约25mM。在一些实施方案中,抗原或疫苗组合物的pH为大约6.0-大约7.0,或者大约6.2-大约6.8,或大约6.5。疫苗组合物可以是水成制剂。

[0233] 在一些实施方案中,除了VLP、氢氧化铝和缓冲液之外,疫苗组合物进一步包括至少一种佐剂。例如,佐剂可是toll样受体激动剂,例如MPL、鞭毛蛋白、CpG寡聚体、合成脂质A或脂质A模拟物或类似物。在一些实施方案中,佐剂是MPL。

[0234] 在一个实施方案中,本发明的疫苗可以被制备成干粉,其含有一种或多种纯化VLP抗原作为免疫原,佐剂如MPL,生物聚合物如壳聚糖以促进附着于粘膜表面,和膨胀剂 (bulking agent) 如甘露醇和蔗糖。使用诺如病毒作为无包膜病毒的非限制性实例,诺如病毒疫苗可以被制备成10mg干粉,含有一种或多种诺如病毒基因群抗原 (例如Norwalk病毒、

Houston病毒、雪山病毒(Snow Mountain virus)、MPL佐剂、壳聚糖粘膜粘着剂、和甘露醇和蔗糖(或其他糖,如葡萄糖、乳糖、海藻糖和甘油)作为膨胀剂并提供合适的流动特性。制剂可以包含大约7.0mg(25-90%w/w范围)壳聚糖,大约1.5mg甘露醇(0-50%w/w范围),大约1.5mg蔗糖(0-50%w/w范围),大约25 $\mu$ g MPL(0.1-5%w/w范围),和大约100 $\mu$ g诺如病毒抗原(0.05-5%w/w范围)。

[0235] 继续使用上述的诺如病毒疫苗制剂,诺如病毒抗原在疫苗中的存在浓度可为大约0.01%(w/w)-大约80%(w/w)。在一些实施方案中,诺如病毒抗原可被制备成每10mg干粉制剂含大约5 $\mu$ g,大约15 $\mu$ g,和大约50 $\mu$ g的剂量(0.025,0.075和0.25%w/w),用于施加到两个鼻孔中,或者大约10 $\mu$ g,大约30 $\mu$ g,和大约100 $\mu$ g(0.1,0.3和1.0%w/w),用于施加到一个鼻孔中。制剂可在每次给药期间施加到一个或两个鼻孔中。在第一次给药后,可以有一个1-12周的加强给药(boost administration),以提高免疫应答。免疫和抗原制剂中诺如病毒抗原含量的范围可为1 $\mu$ g-100mg,优选地1-500 $\mu$ g,更优选地5-200 $\mu$ g,最典型地10-100 $\mu$ g。每个剂量施加的总诺如病毒抗原可以是大约10 $\mu$ g,大约30 $\mu$ g,或大约100 $\mu$ g,在施加给两个鼻孔时,总共含于20mg干粉中,或者在施加给一个鼻孔时,总共含于10mg干粉中。干粉特征是使少于10%的颗粒的直径小于10 $\mu$ m。平均颗粒尺寸范围是直径为10-500 $\mu$ m。

[0236] 在一些实施方案中,疫苗组合物是冻干粉并被重建成水成制剂。因此,本发明包括制造纯化诺如病毒组合物的方法,包括(a)制备包含诺如病毒抗原、蔗糖和壳聚糖的冻干前溶液,其中蔗糖与壳聚糖的比值为大约0:1-大约10:1;(b)冷冻溶液;和(c)将冷冻溶液冻干30-72小时,其中最终的冻干产物含有一定百分比的呈聚集形式的所述诺如病毒抗原。冻干可以在环境温度、低温下发生,或者在各种温度的循环中进行。仅出于例证的目的,冻干可以通过一系列步骤发生,例如通过如下的周期:开始于-69°C,在3小时内逐渐调节到-24°C,然后保持该温度18小时,然后在1小时内逐渐调节到-16°C,然后保持该温度6小时,然后在3小时内逐渐调节到+34°C,最后保持该温度9小时。在一个实施方案中,冻干前溶液进一步包括膨胀剂。在另一个实施方案中,所述膨胀剂是甘露醇。

[0237] 为了产生期望百分比的聚集,蔗糖与壳聚糖的合适比值可根据指导加以确定。含有质量比范围为大约2:1-大约10:1的蔗糖与壳聚糖的冻干前混合物在冻干后可以产生大约50%-100%的完整病毒抗原(即0%-50%的聚集抗原),这取决于冻干前溶液的浓度。0:1的蔗糖与壳聚糖质量比会产生少于30%的完整诺如病毒抗原(即大于70%的聚集抗原)。同时省略蔗糖和壳聚糖并且仅适用膨胀剂如甘油,将产生少于10%的完整抗原(即大于90%的聚集抗原,这取决于冻干前溶液浓度)。使用这些指导,技术人员可以调节冻干前混合物中蔗糖与壳聚糖的质量比和浓度,以获得产生最佳免疫应答所需的期望量的聚集。

[0238] 疫苗可以按照与剂量制剂相容的方式给药,并且给药量是治疗有效的和致免疫的。而且,实现疫苗佐剂效果的各种方法是已知的,并可以和本文公开的VLP组合使用。

[0239] 可以使用多种宿主表达载体系统表达VLP多肽。这些宿主表达系统代表了可用于产生VLP多肽从而生成VLP的媒介。

[0240] 在哺乳动物宿主细胞中,可使用大量基于病毒的表达系统。此外,可选择宿主细胞株,其调节插入序列的表达,或者以特定的期望方式修饰和加工基因产物。这些蛋白产物修饰对于VLP的产生或者VLP多肽的功能或者额外的多肽如佐剂或额外抗原的功能可能是重要的。不同的宿主细胞对蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰具有特征性且特异的机制。

可选择合适的细胞系或宿主系统,以确保所表达外来蛋白的正确修饰和加工。为此,可使用具有用于适当加工初级转录物,基因产物糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。

[0241] 本发明的某些方面包括与VLP制备物有关的额外抗原,并能够是任何能够引发免疫应答的物质。在一些实施方案中,抗原可以是任何变应原。变应原包括,但不仅限于,细胞、细胞提取物、蛋白质、多肽、肽、多糖、多糖偶联物、多糖和其他分子的肽和非肽模拟物、小分子、脂质、糖脂、和碳水化合物。

[0242] 通过参考下面的非限制性实施例可以对本发明有更好的理解。如在本说明书中使用的,除非另外明确指出,否则单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数的参考物。当上述方法和/或图表(schematic)指示某些按照特定次序发生的事件和/或流程图时,某些事件和/或流程图的次序可以被修改。例如,通过低pH处理执行的VLP处理可以被执行用于在疫苗制造过程期间产生的任何处理中间产物,包括但不仅限于,批量生产培养物、澄清的生产培养物、色谱洗脱级分、色谱流过/清洗级分、超滤/渗滤(diafiltration)保留级分、和/或处理级分滤出液。

[0243] 此外,某些事件在可能的情况下可在平行的处理中被同时执行,也可被顺次执行。

## 实施例

[0244] Sf9培养

[0245] Sf9昆虫细胞的常规培养在烧瓶中在27°C和环境空气饱和状态下执行。Sf9细胞经过多次传代培养,用于杆状病毒扩增和VLP产生。Sf9培养物的常规计数使用自动细胞计数仪(T4 Cellometer,Nexcelom Bioscience)执行。

[0246] 重组杆状病毒

[0247] 重组杆状病毒的产生是通过使用Cellfectin按照制造商的使用说明将转化载体和线性杆状病毒DNA共转染到贴壁(adherent)的Sf9昆虫细胞中,随后进行噬斑纯化和额外轮次的杆状病毒扩增。然后,收获重组杆状病毒作为通过低速离心获得的上清液级分。将所得的重组杆状病毒调节成10%DMSO终产物(v/v),分成等份,并保存于-80°C。用于VLP生产的冷冻杆状病毒的扩增如上所述地执行。

[0248] VLP生产

[0249] 诺如病毒VLP的生产使用一次性Wave生物反应器执行。对于生物反应器生产,将Sf-900 II无血清培养基无菌转移到Wave生物反应器中,并接种培养物。一旦到达合适的细胞密度,向生物反应器培养物中无菌添加重组杆状病毒,并在上述条件下温育表达培养物。生物反应器培养物通常在传染后4-6天收获,这取决于活细胞的密度。

[0250] 除了诺如病毒VLP之外,生产培养物的产生可以通过用含有沙波病毒VP1亚单位的重组杆状病毒传染。可选择地,生产培养物的产生可以用含有诺如病毒VP1亚单位的重组杆状病毒传染,其已经被工程化在表面暴露的环区内含有外来氨基酸和/或抗原(嵌合诺如病毒VLP)。

[0251] 生物反应器收获

[0252] 为了收获,通过添加HCl将生物反应器培养物调节到pH-3.0,然后在室温下搅拌温育2h。然后,通过添加咪唑将培养物调节到pH-5.0(Norwalk)或pH-6.0(Consensus),然后通过低速离心使之澄清。生物反应器的最终澄清通过过滤离心后的上清液执行。在下一单元

操作之前,将所得收获材料(条件培养基)保存在环境室温≤24h,或者保存于4℃≤1周。

[0253] 为了收获含有沙波病毒或嵌合诺如病毒VLP的批量生产培养物,通过研究评估在pH-2.5处理30min-48h时间段后的污染物去除和VLP回收。被证明最有利于结构完整的VLP的回收和除去处理污染物的条件将被用于放大规模的处理。适合于本目的的工程化VLP,包括嵌合变体的列表可以在概括性见于PCT专利申请系列号PCT/US2011/022094和美国实用专利申请(utility application)系列号13/023,363中,PCT/US2011/022094于2011年1月21日提出申请,题目为“Calicivirus病毒样颗粒上的靶向异源抗原呈递(Targeted Heterologous Antigen Presentation on Calicivirus Virus-Like Particles)”,13/023,363于2009年8月10日提出申请,题目为“包含用于增强交联反应性的Composite衣壳蛋白氨基酸序列的病毒样颗粒(Virus-Like Particles Comprising Composite Capsid Amino Acid Sequences for Enhanced Cross Reactivity)”,本文引用它们的全部内容作为参考。

[0254] 阳离子交换捕获色谱

[0255] 诺如病毒VLP的阳离子交换(CE)捕获色谱使用Sartobind S囊室(capsule)执行。为了纯化,用乙酸(pH-5.0)平衡囊室(capsule),并加载条件培养基(≤1.5g VLP总)。然后,用乙酸(pH-5.0)清洗囊室,直至流过液在280nm( $A_{280}$ )的光吸收<200mAU。然后用乙酸(pH-5.0)、1% Triton X-100、0.2% 磷酸三丁酯使囊室饱和,并清洗。经过此次柱上溶剂/去污剂处理之后,用乙酸(pH-5.0)以100mL/min的速度清洗囊室,直至 $A_{280}<50$ mAU。诺如病毒VLP的洗脱用乙酸(pH-5.0)和NaCl执行。将VLP洗脱级分收集在一次性瓶或生物处理袋(bioprocess bag)中。

[0256] 通过阳离子交换色谱纯化Consensus VLP如上所述地执行,只是在所有处理缓冲液中使用乙酸(pH-6.0)代替乙酸(pH-5.0)。

[0257] 羟基磷灰石(HA)捕获色谱

[0258] Norwalk VLP的羟基磷灰石(HA)捕获色谱使用250mL柱床体积CHT陶瓷羟基磷灰石柱(BioRad)执行。为了纯化,用MES(pH-6.0)平衡囊室(capsule),并加载条件培养基(≤250mg VLP总)。然后,用MES(pH-6.0)清洗囊室,直至流过液在280nm( $A_{280}$ )的光吸收<200mAU。然后用MES(pH-6.0)、1% Triton X-100、0.2% 磷酸三丁酯使囊室饱和,并清洗。经过此次柱上溶剂/去污剂处理之后,用MES(pH-6.0)以70mL/min的速度清洗囊室,直至 $A_{280}<50$ mAU。诺如病毒VLP的洗脱用100mM磷酸钠(pH-6.8)进行清洗,并用400mM磷酸钠(pH-6.8)进行VLP洗脱。将VLP洗脱级分收集在一次性瓶或生物处理袋(bioprocess bag)中。

[0259] 对于使用柱上溶剂/去污剂处理的沙波病毒或嵌合诺如病毒VLP的色谱,通过研究评估能够使VLP高效结合并从色谱基质上洗脱的缓冲液条件(pH和离子强度),色谱基质包括,但不仅限于,阳离子交换柱、羟基磷灰石柱、疏水相互作用柱、尺寸排阻柱、阴离子交换柱、混合模式柱、或亲和柱。对于被证明最有利于回收结构完整的VLP并除去处理污染物的条件,将按照与上面列出的相似的方式执行VLP处理(包括溶剂/去污剂处理)。

[0260] VLP表征

[0261] 纯化后,通过一系列分析方法分析诺如病毒VLP的纯度。SDS-PAGE分析使用NuPAGE梯度凝胶执行。最终的PAGE凝胶用Imperial Protein Stain染色或银染色。通过标准的菌斑分析对生产培养物的低pH处理和捕获色谱步骤期间的柱上溶剂/去污剂处理进行杆状病

毒失活评估。

[0262] Norwalk VLP结构完整性分析通过使用尺寸排阻色谱(SEC)和透射电子显微镜(EM)对纯化产物进行分析。对于SEC,将纯化的Norwalk VLP进行稀释,并在Superose 6柱上进行分析。对于EM分析,将VLP在L-组氨酸(pH-6.5)、氯化钠中稀释,点播于铜细网(mesh grid)上,并用2%乙酸双氧铀染色。

[0263] 结果

[0264] 生物反应器生产—为了开发一种用于生产VLP的可放大规模方法,将Sf9培养物在Wave生物反应器中生长,使用本领域众所周知的技术用重组杆状病毒进行感染。

[0265] 生物反应器收获—在诺如病毒VLP生产之后,生物反应器培养物含有高水平的活杆状病毒( $\sim 10^7$ - $10^8$  pfu/mL),其在VLP制造期间必须被失活和清除。通过研究确定生产培养物的低pH处理是否代表了收获期间的一个可行步骤。如表1所示,研究中实现了高水平杆状病毒(AcNPV)失活(对于Norwalk VLP处理 $>5\log_{10}$ ,对于Consensus VLP处理 $>4\log_{10}$ ),其中生产培养物在室温下在pH<3.5下温育1h。表1还证明,实现了高水平的逆转录病毒(A-MuLV)失活(对于Norwalk VLP处理 $>7\log_{10}$ ,对于Consensus VLP处理 $>6\log_{10}$ )。相反,通过SDS-PAGE和尺寸排阻色谱对生产培养物进行分析的结果证明,在生产培养物的低pH处理之后, Norwalk和Consensus VLP仍保持可溶并且结构完整。在生产期间,在诺如病毒VP1亚单位中普遍观察到N端蛋白裂解切割。除了清除显著水平的Sf9宿主细胞蛋白质外,还证明通过批量培养物的低pH处理还选择性除去了含有截短的VP1的VLP(图1A和1B)。

[0266] 表1.Norwalk和Consensus批量生产培养物通过低pH处理使有包膜病毒失活

[0267]	处理步骤	Norwalk VLP处理		Consensus VLP处理	
		(log10减少)		(log10减少)	
	低pH处理	A-MuLV	AcNPV	A-MuLV	AcNPV
		>7.79	5.55	>6.37	4.47

[0268] 根据上述发现,开发了通过低pH处理和通过低速离心进行初级澄清的收获策略。为了进一步保护下游捕获步骤,将所得的低速上清液/滤出液级分通过PES囊室过滤器,然后进入含有囊室过滤器的无菌生物处理袋中。这种收获策略实现了诺如病毒VLP的高效回收,它们在最终的条件培养基中在所述储存条件下是稳定的,并为下游处理产生了相对纯的VLP级分。

[0269] 下游处理—对于下游处理,强调使用可良好适用于放大cGMP生产的正交纯化方法。设计了如下的操作规程用于处理来自起始条件培养基的VLP。

[0270] 阳离子交换色谱—基于膜的色谱被发现可用于纯化大量大分子复合物,因为在大直径( $\sim 1\mu\text{m}$ )膜孔中具有高效的质量转移。与已经用于从条件培养基捕获和纯化VLP的传统的基于球珠的色谱基质相比,Sartobind S阳离子交换膜可高效结合诺如病毒VLP(图2A)。为了增加诺如病毒VLP下游处理期间杆状病毒的失活,在捕获步骤中并入柱上溶剂/去污剂处理步骤,其使用含有1% Triton X-100、磷酸三丁酯的平衡缓冲液。在囊室清洗以除去溶剂/去污剂缓冲液之后,用含有氯化钠的不连续梯度平衡缓冲液洗脱诺如病毒VLP。当前的处理方案规定(specifies),加载在Sartobind S 10"囊室上的条件培养基中最大含1.5g诺如病毒VLP。如表2所示,实现了高水平杆状病毒(AcNPV)失活(对于Norwalk VLP处理 $>4\log_{10}$ ,对于Consensus VLP处理 $>4\log_{10}$ )。表2还证明,实现了高水平的逆转录病毒(A-

MLuV) 失活(对于Norwalk VLP处理 $>7\log_{10}$ ,对于Consensus VLP处理 $>6\log_{10}$ )。进一步观察到,当同时采用低pH处理和柱上溶剂/去污剂处理时,表1和2中列出的纯化数值的数字增加(numerical addition)是对有包膜病毒失活的精确测量。

[0271] 表2通过阳离子交换色谱使用柱上溶剂/去污剂处理将有包膜病毒失活

[0272]	处理步骤	Norwalk VLP处理 ( $\log_{10}$ 减少)		Consensus VLP处理 ( $\log_{10}$ 减少)	
		A-MuLV	AcNPV	A-MuLV	AcNPV
	阳离子交换 (S/D)处理	>7.15	>4.48	>6.96	>4.96

[0273] 与阳离子交换色谱相似,具有柱上溶剂/去污剂处理的羟基磷灰石捕获色谱也显示可高效处理诺如病毒VLP(图2B)。

[0274] 纯化诺如病毒VLP的表征—为了评估VLP在生产和使用多步色谱处理的下游处理之后的组装状态,通过尺寸排阻色谱(SEC)和透射电子显微镜(EM)对纯化的VLP进行分析。当在所述条件下通过SEC进行分析时,Norwalk和Consensus VLP显示大约7.2-7.6分钟的保留时间,与具有数百万道尔顿分子量的纯化产物一致(图3A)。因为分解的VP1衣壳蛋白洗脱物的保留时间为大约15分钟,所以这些结果确证,在大部分衣壳蛋白被整合在组装的VLP中。通过透射对纯化材料进行分析表明,Norwalk和Consensus VLP均主要为~35-40nm的均匀颗粒,与VP1衣壳蛋白单体的T3二十面体组装物(assemblage)一致(图3B)。

[0275] 通过溶剂/去污剂处理的病毒失活/清除

[0276] 用模式病毒对Consensus VLP条件培养基进行掺杂(spiked with),并通过有和没有柱上溶剂/去污剂处理的阳离子交换色谱进行处理。如表3所示,仅通过CE步骤的观察到了最小的模式病毒减少,而包含柱上溶剂/去污剂处理可实现高水平清除/失活。

[0277] 表3.通过溶剂/去污剂处理使病毒失活/清除

[0278]	一致的VLP处理步骤	模式病毒( $\log_{10}$ 减少)	
		A-MuLV <sup>1</sup>	AcNPV <sup>2</sup>
	阳离子交换	1.18	0.59
	阳离子交换(S/D处理)	>6.96	>4.96

[0279] <sup>1</sup>双嗜性鼠白血病病毒

[0280] <sup>2</sup>杆状病毒

[0281] 通过低pH和溶剂/去污剂处理的病毒失活/清除

[0282] 在Sf9昆虫细胞中生产诺如病毒VLP之后,生物反应器生产培养物在通过传统方法(低速离心和过滤)收获后含有高水平的活杆状病毒(~10<sup>8</sup>pfu/mL)。表4显示,尽管单独的低pH处理不能使生产培养物中所发现水平的杆状病毒完全失活。但是,通过组合低pH和溶剂/去污剂处理,生产培养物中杆状病毒失活的水平超过~10pfu/mL。

[0283] 表4.通过低pH和溶剂/去污剂处理使病毒失活/清除

处理步骤	杆状病毒减少( $\log_{10}$ )	
	Norwalk VLP	Consensus VLP
低pH处理	5.55	4.47
阳离子交换(S/D处理)	>4.48	>4.96
累加	>10.03	>9.43

[0285] 通过低pH处理除去VP1蛋白裂解片段

[0286] 在杆状病毒表达系统中进行生产期间,Consensus VP1亚单位会经历蛋白裂解切割,产生表达材料某些部分的N端截短产物。该蛋白裂解片段被组装到VLP中,并在下游处理中与含有全长VP1亚单位的VLP一起纯化。在开发研究中发现,批量生物反应器生产培养物的低pH处理可选择除去含有N端截短产物的VLP群体,为下游处理提供更均匀的材料。

[0287] 在下游处理之后,通过银染SDS-PAGE和密度计量(densitometry)对Consensus VLP药物物质进行分析证明,从收获时没有pH处理的生物反应器培养物纯化的VLP中有显著水平的VP1 N端截短产物(表5)。相反,从pH被处理的生物反应器培养物纯化的VLP则完全由全长VP1亚单位构成。

[0288] 表5.通过低pH处理除去Consensus VP1蛋白裂解片段

生物反应器收获方法	全长VP1(%)	N-端截短(%)
无pH处理1	77±14	23±13
低pH处理1	100±0	0±0

[0289]<sup>1</sup>显示了5份单独的Consensus VLP的结果

[0290] 通过柱上溶剂/去污剂处理清除宿主细胞蛋白

[0291] 在生物反应器生产培养物收获之后,通过具有柱上溶剂/去污剂处理的阳离子交换(CE)色谱对Norwalk和Consensus VLP进行处理。对生物反应器收获材料(CE加载样)和阳离子交换洗脱级分(CE洗脱物)均进行VLP和Sf9宿主细胞蛋白(HCP)含量评估。对于这些研究,VLP含量通过尺寸排阻色谱进行确定,HCP含量使用商业可得的ELISA试剂盒(Cygnus Technologies,Cat:F020)确定。表6显示了多个VLP批次中处理级分HCP含量的平均数据,并证明通过CE步骤可显著减少HCP,如上述实验所确定的。

[0292] 表6.通过柱上溶剂/去污剂处理纯化Norwalk和Consensus VLP

处理级分	VLP含量	HCP含量	HCP相对于VLP的含量(%)
<b>Norwalk VLP</b>			
CE加载	1245	1258	101
CE洗出液	804	71	9
<b>Consensus VLP</b>			
CE加载	1580	1706	108
CE洗出液	1281	15	1

[0293] 通过低pH处理和深层过滤收获Norwalk和Consensus VLP生物反应器生产培养物

[0294] 对于Norwalk和Consensus VLP的当前生产,通过低pH处理并通过离心/过滤进行澄清来收获生物反应器生产培养物。使用当前收获程序的低pH处理步骤进行病毒失活和处理污染物去除,同时使用离心对生产培养物进行初级澄清。尽管离心代表了一种用于生物

反应器澄清的良好建立并且规模可放大的方法(见图4A),但是可选择地使用深层过滤用于初级澄清(见图4B)提供了大量的优势,包括容易操作和可以获得一次性材料,从而不需要清洁确认(cleaning validation)。

[0297] 为了进一步表征和精炼生物反应器生产培养物的收获,进行了开发研究以便:1)评估杆状病毒和宿主细胞核酸处理污染物的清除;和2)评估使用硅藻土深层过滤器用于初级澄清。上面列出的研究总结在图4A-4B中,并且如下执行:

[0298] Norwalk和Consensus VLP生产培养物在摇瓶或搅拌罐生物反应器中产生。

[0299] 生产培养物的收获通过:低速离心和0.2μm过滤;低pH处理,随后进行低速离心和0.2μm过滤;低pH处理,随后进行深层过滤和0.2μm过滤。

[0300] 处理级分的核酸含量通过qPCR评估,VLP回收通过尺寸排阻色谱评估。

[0301] 对于表7所示的研究,收获中的低pH处理步骤对Norwalk (12.7-47.4倍减少) 和 Consensus (2.9-3.0倍减少) VLP生产培养物均造成显著的核酸污染物清除。此外,使用深层过滤器代替离心的初级澄清可以为Norwalk (65.0-110.9倍增加) 和 Consensus (30.7-51.9倍增加) VLP生产培养物均增加核酸污染物的总体清除。

[0302] 表7.通过低pH处理和深层过滤的核酸清除

处理级分	杆状病毒核酸(pg/mL)	Sf9核酸(pg/mL)
<b>Norwalk VLP收获物</b>		
起始培养物 <sup>1</sup>	747.7	7420.0
低pH收获物 <sup>2</sup>	58.9	156.3
低pH/深层过滤收获物 <sup>3</sup>	11.5	66.9
<b>Consensus VLP收获物</b>		
起始培养物 <sup>1</sup>	$1.6 \times 10^5$	$8.3 \times 10^5$
低pH收获物 <sup>2</sup>	$5.3 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$
低pH/深层过滤收获物 <sup>3</sup>	$5.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4$

[0304] <sup>1</sup>收获的级分通过离心/0.2μm过滤(无pH处理)澄清

[0305] <sup>2</sup>收获的级分通过pH处理和离心/0.2μm过滤

[0306] <sup>3</sup>收获的级分通过pH处理和Millistak+DOHC深层过滤/0.2μm过滤

[0307] 如表8所示,使用各种深层过滤器,在收获研究中观察到的容量范围是155-390L/m<sup>2</sup>,VLP回收率为73-101%。所观察到的有利过滤器容量和VLP回收率使得这种方法适用于规模放大生产。

[0308] 表8.深层过滤容量和VLP回收

参数	深层过滤				
	Zeta+BC25 10SP02A	Zeta+BC25 30SP02A2	Sartoclear PB2 Cap	Millistak+ D0HC	
<b>Norwalk VLP</b>					
[0309]	过滤器容量(L/m <sup>2</sup> )	N/A	N/A	179	163
	通过深层过滤的VLP回收(%)	N/A	N/A	98	101
<b>Consensus VLP</b>					
	过滤容量(L/m <sup>2</sup> )	202	155	334	390
	通过深层过滤的VLP回收(%)	87	79	73	90

[0310] N/A-不可获得。

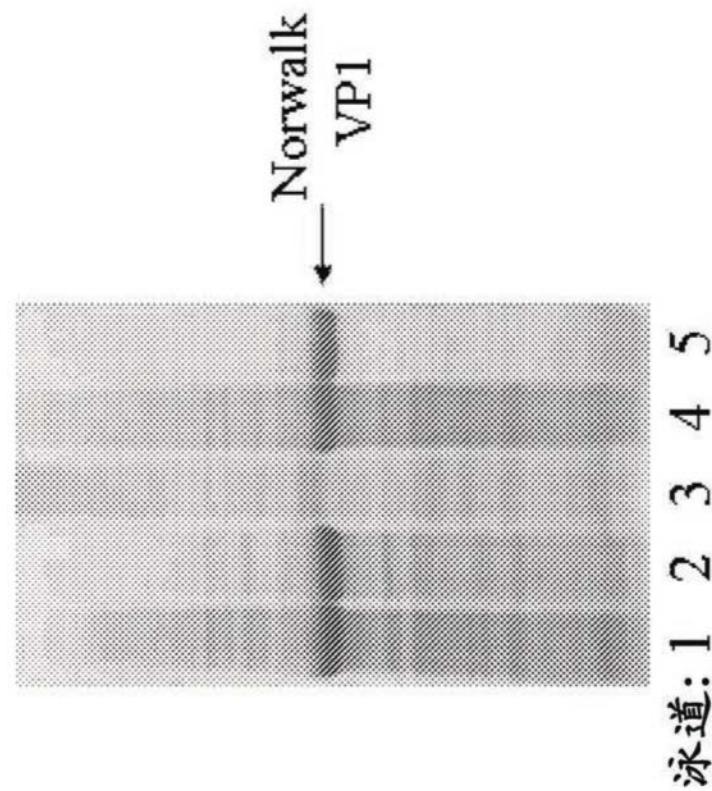


图1A

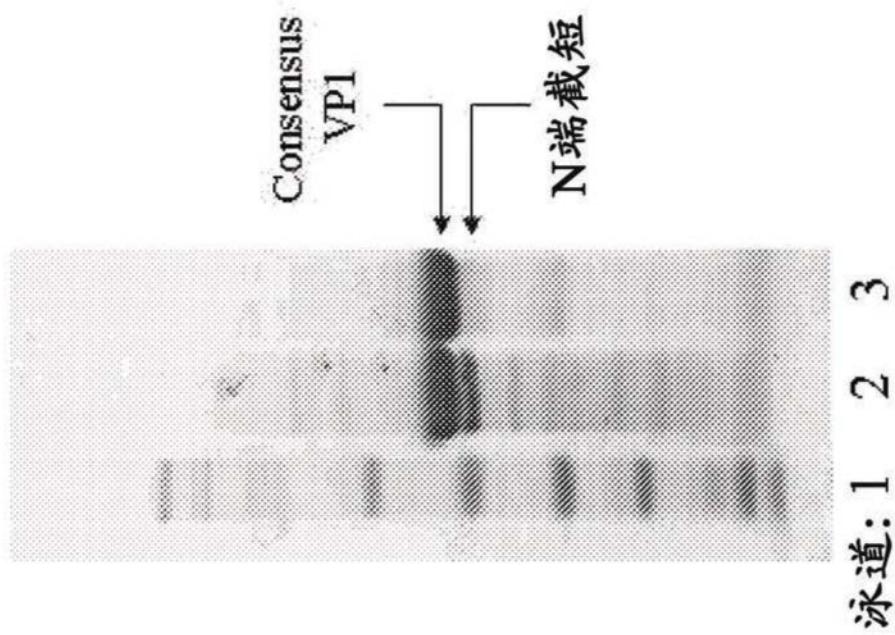


图1B

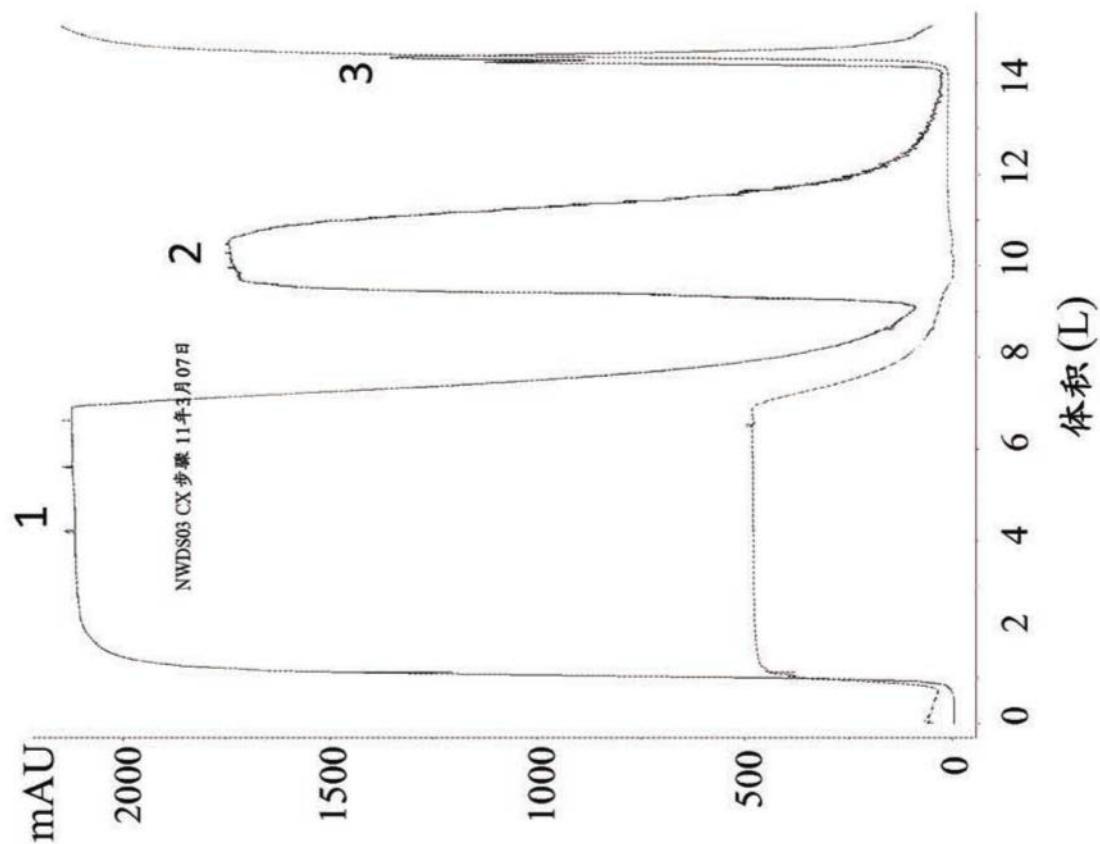


图2A

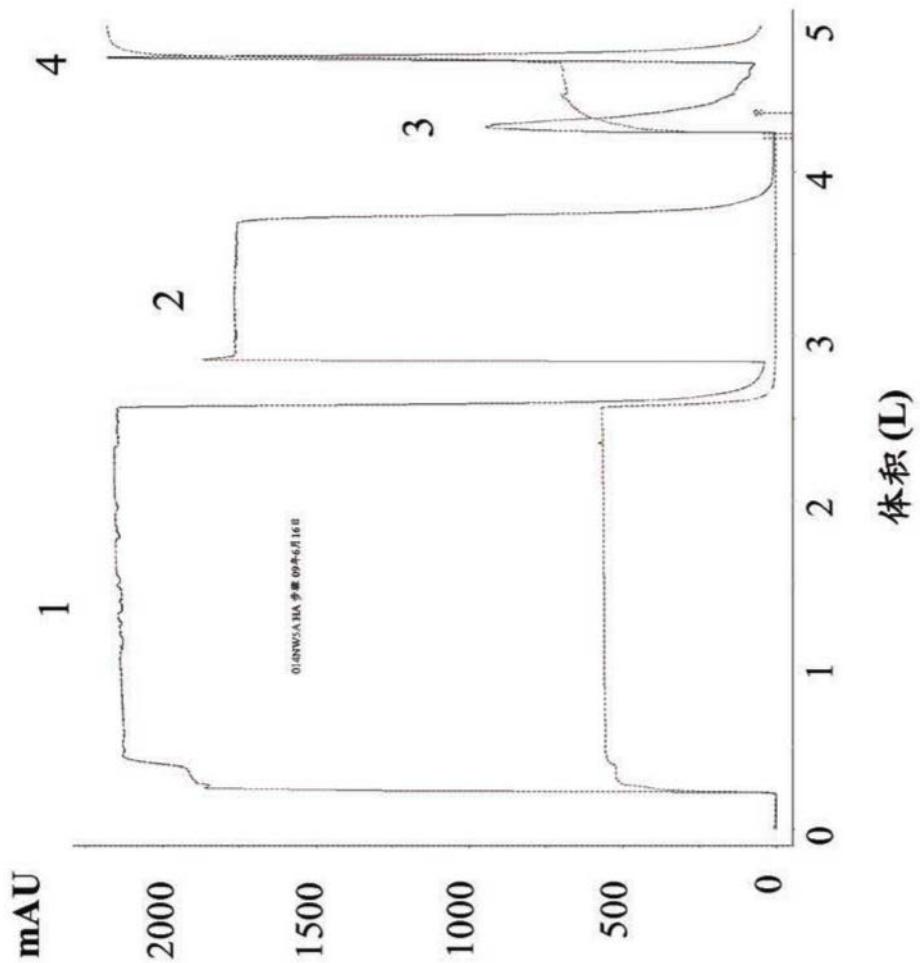


图2B

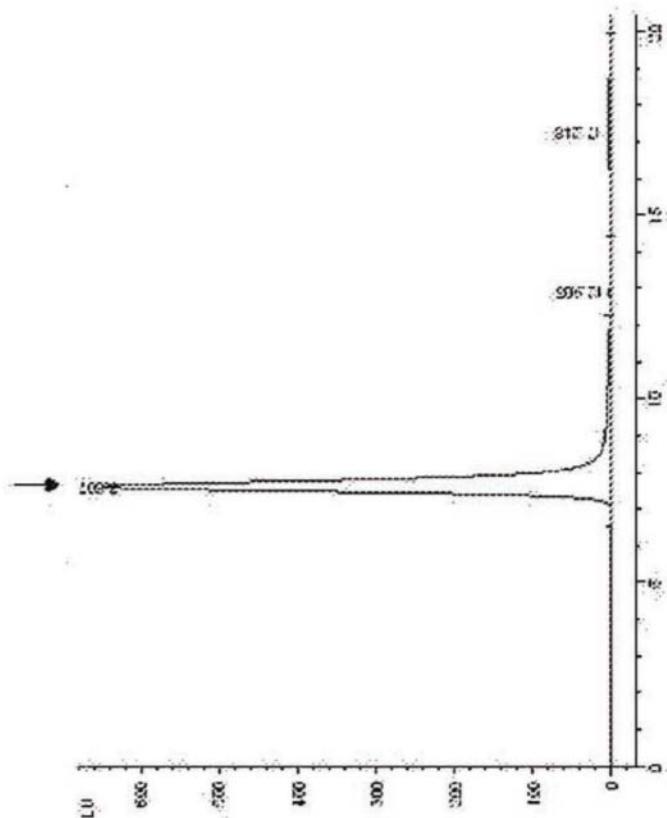


图3A

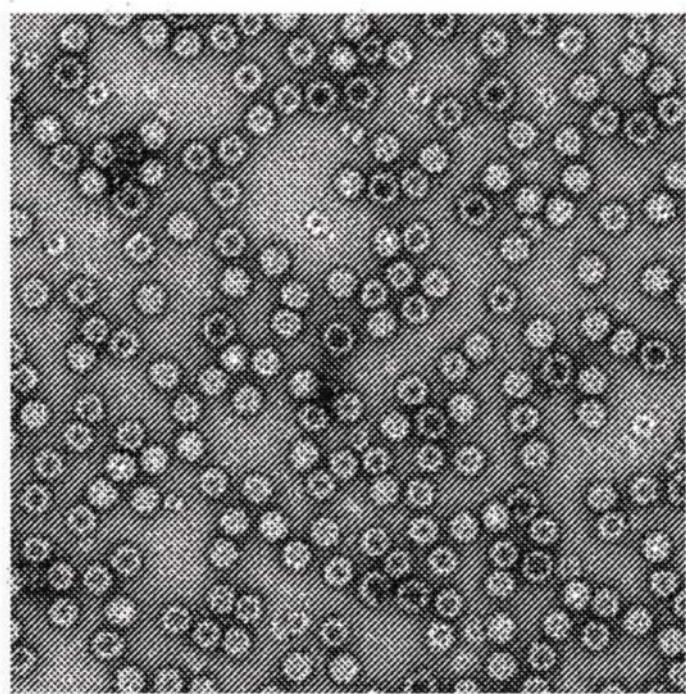


图3B

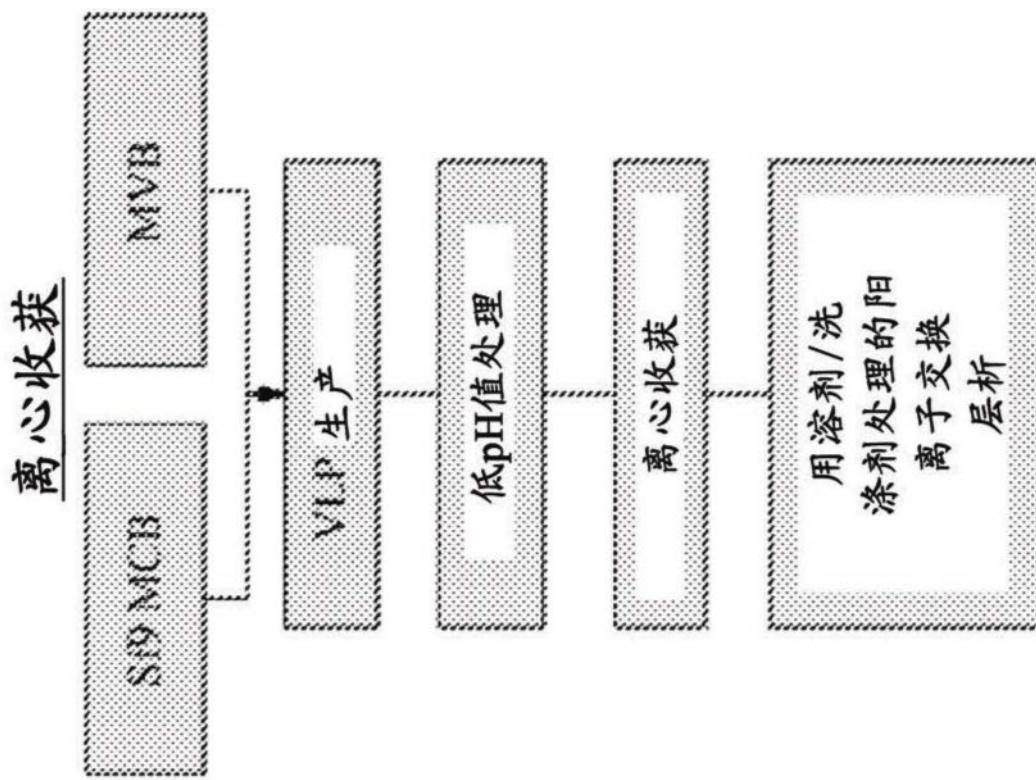


图4A

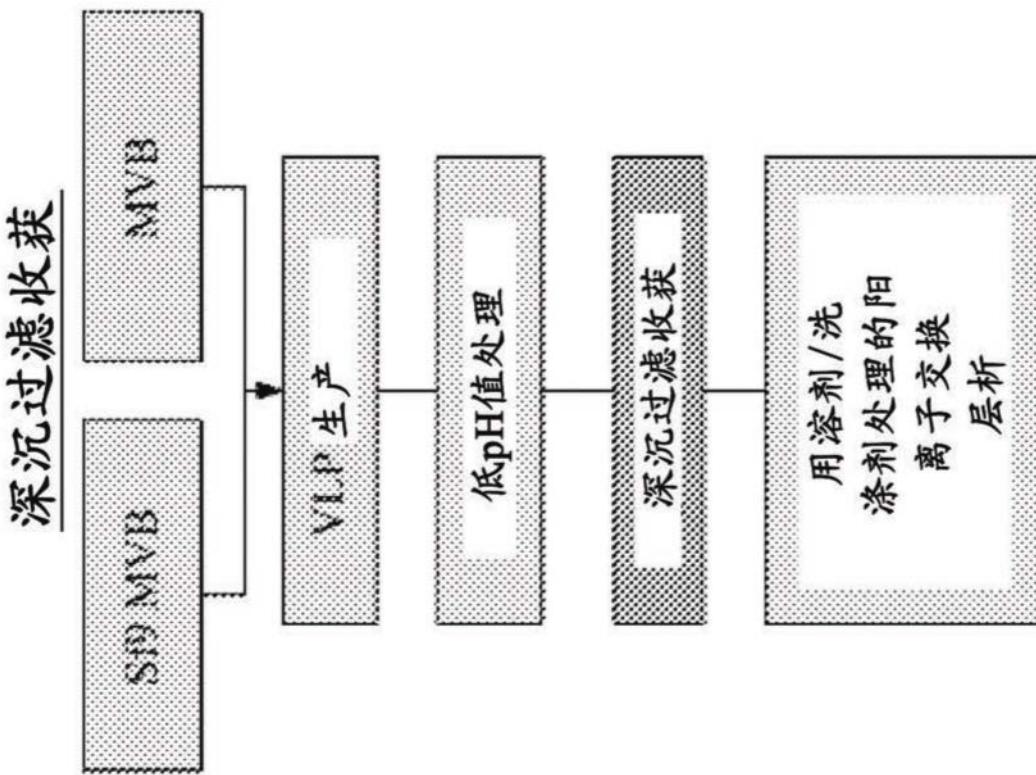


图4B