

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810130050.6

[51] Int. Cl.

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 14 日

[11] 公开号 CN 101343625A

[22] 申请日 2005.2.21

[21] 申请号 200810130050.6

分案原申请号 200580005682.4

[30] 优先权

[32] 2004.2.23 [33] EP [31] PCT/EP04/050190

[71] 申请人 克鲁塞尔荷兰公司

地址 荷兰莱顿

[72] 发明人 米兰达·韦格曼

埃米尔·约安内斯·约瑟夫斯·玛丽亚·范考文

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 康健 林晓红

权利要求书 1 页 说明书 41 页 附图 12 页

[54] 发明名称

病毒纯化方法

[57] 摘要

本发明提供了一种从宿主细胞中纯化病毒的方法，所述方法包括如下步骤：a) 培养宿主细胞，b) 用病毒感染所述宿主细胞，c) 用核酸酶处理所述细胞培养物，d) 裂解所述宿主细胞以提供包含所述病毒的裂解物。所述病毒优选是重组腺病毒。本发明还提供了一种纯化重组病毒的方法，所述重组病毒表达一种能结合核酸的异源蛋白质，所述方法包括如下步骤：a) 培养宿主细胞，b) 用所述重组病毒感染所述宿主细胞，c) 裂解所述宿主细胞以提供包含所述重组病毒的裂解物，d) 将所述重组病毒进行阴离子交换层析和大小排阻层析，其特征在于将含有病毒的混合物用包含至少 2M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液进行至少一次缓冲液更换。

1. 一种从重组腺病毒制备物中除去游离腺病毒蛋白的方法，所述方法包括如下步骤：用含有阴离子交换基团的带电滤膜处理包含游离腺病毒蛋白的重组腺病毒制备物。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述重组腺病毒制备物包含 B 亚群重组腺病毒。
3. 前述任一项权利要求的方法，其中所述重组腺病毒是 Ad35 重组腺病毒。
4. 纯化 B 亚群重组腺病毒颗粒的方法，所述方法包括对所述 B 亚群重组腺病毒颗粒进行阴离子交换滤膜纯化步骤。
5. 权利要求 4 的方法，其中所述 B 亚群重组腺病毒是 Ad35 重组腺病毒。
6. 包含阴离子交换基团的带电滤膜在去除重组腺病毒制备物中的游离腺病毒蛋白中的用途。

病毒纯化方法

本申请为于2001年9月25日提交的发明名称为“病毒纯化方法”的200580005682.4号中国发明专利申请的分案申请。

发明领域

本发明属于从宿主细胞中纯化病毒、特别是纯化重组腺病毒的领域。

发明背景

病毒，无论是天然发生的还是其重组形式的，均可用于疫苗接种和基因治疗领域。许多病毒或者病毒样颗粒可以安全而有效地在宿主细胞中增殖(见例如 WO 01/38362，其描述了各种病毒在宿主细胞 E1 永生化的视网膜细胞中的增殖)。重组腺病毒是用于基因治疗和疫苗接种的一类优选的病毒载体。这些重组腺病毒通常至少在 E1 区域具有缺陷，并在提供 E1 区域的互补细胞(例如 293 细胞)或者 E1-永生化的视网膜细胞如 PER.C6™ 细胞中增殖 (见例如美国专利 5,994,128)。

病毒在宿主细胞中增殖之后，基本上对于所有应用，在进一步应用之前均需要从宿主细胞中纯化病毒。

国际专利申请 WO 98/22588 描述了生产和纯化腺病毒载体的方法。所述方法包括培养宿主细胞、用腺病毒感染所述宿主细胞、收获并裂解宿主细胞、浓缩粗制裂解物、更换所述粗制裂解物的缓冲液、用核酸酶处理该裂解物、以及使用层析进一步纯化病毒。

一些其它出版物描述了从宿主细胞中纯化病毒的方法，大多数注重使用特异性层析基质从宿主细胞裂解物中纯化病毒，见例如美国专利 6,008,036、6,586,226、5,837,520、6,261,823、6,537,793 和国际专利申请 WO 00/50573、WO 02/44348 和 WO 03/078592 所述。

大多数所述方法应用核酸酶处理步骤降解 DNA 杂质。尽管一些

方法描述了不同的层析基质,但仍需要从宿主细胞培养物中纯化病毒的替代及优选改良方法。本发明提供了这样的方法。

附图描述

图 1: 已知的收获细胞方法(T/B)与本发明的方法(B/T)的示意图,见实施例 1 所述。T: Triton, B: Benzonase, p. i.: 感染后。

图 2: 在 T/B 及 B/T 方法(示意图见图 1)后澄清除去宿主细胞蛋白。图中示出了 5 个单独纯化的处理中样品(in process samples)的银染 SDS-PAGE(4-12% bis-tris NuPAGE, Invitrogen)分析(样品见实施例 1 和表 1 所述)。第 2 组来自 T/B 收获方法,其中裂解后加入核酸酶;第 3—7 组来自 B/T 收获方法,其中核酸酶在裂解之前加入。将收获物(泳道 1)通过 0.5 μ m Clarigard 滤膜(泳道 2)澄清,随后用 0.8/0.45 μ m Sartopore 2 滤膜(泳道 3)过滤。M: 标记物,以 kD 表示的 M_w 在旁边示出。

图 3: 在处理期间用高盐渗滤除去组蛋白(见实施例 2)。图中示出了银染 SDS-PAGE。

A. 渗透物,样品: 1: 初始渗透物; 2: 4x 浓度之后; 3: 第 1 个 DFV 0.3 M NaCl; 4: 第 3 个 DFV 0.6 M NaCl; 5: 第 4 个 DFV 0.6 M NaCl; 6: 第 5 个 DFV 1.0 M NaCl; 7: 第 6 个 DFV 1.0 M NaCl; 8: 第 7 个 DFV 0.3 M NaCl; 9: 第 9 个 DFV 0.3M NaCl。M: 标记物,以 kD 表示的 M_w 在旁边示出。

B. 渗余物,样品: 1: 起始样品, 2: 4x 浓度之后; 3: 第 1 个 DFV 0.3 M NaCl; 4: 第 2 个 DFV 0.6 M NaCl; 5: 第 6 个 DFV 0.6 M NaCl; 6: 第 7 个 DFV 1.0 M NaCl; 7: 第 8 个 DFV 1.0 M NaCl; 8: 第 9 个 DFV 0.3 M NaCl; 9: 第 9 个 DFV millex (样品 8 的 0.22 μ m 过滤物)。M: 标记物,以 kD 表示的 M_w 在旁边示出。

图 4: 本发明优选方法的示意图(见实施例 1)。

图 5: 从重组病毒制备物中除去埃博拉病毒核蛋白(NP) (见实施例 3 实验 3.1 详述)。图中示出银染 SDS-PAGE(4-12%bis-tris NuPAGE, Invitrogen)。A:起始材料, B:与 1% Tween 20 温育, C:与 2.5 M NaCl 温育。箭头表示 NP。

图 6: 从重组病毒制备物中除去埃博拉病毒核蛋白的实验(见实施例 3 实验 3.3 详述)。

图 7: 从重组病毒制备物中除去埃博拉病毒核蛋白(NP)的非还原 SDS-PAGE (第 1 组)和 Western 印迹(第 2 组)分析(见实施例 3 实验 3.3 详述)。泳道 A、B、C 分别含有产物 A、B 和 C (见图 6 和实验 3.3 所述)。对于 Western 印迹分析, 使用识别 NP 的抗体。箭头表示 NP。

图 8: 从重组病毒中除去埃博拉病毒核蛋白(NP)的 RP-HPLC 分析。对产物 A、B 和 C 进行分析。详见实施例 3 实验 3.3 所述。纵轴是 AU ($\times 10^{-3}$)。在横轴(洗脱时间)下, 箭头 1 表示异己酮蛋白的峰, 箭头 2 表示 NP 的峰。

图 9: 示出使用高盐和过滤从重组病毒制备物中除去埃博拉病毒核蛋白的 SDS-PAGE (A 组)和 Western 印迹(B 组)分析。在阴离子交换层析后, 将样品用含有 5M NaCl 的溶液进行缓冲液更换。将样品直接经过 0.45 μ m Millipac 20 滤膜(Millipore)过滤。泳道 1: 过滤之前, 泳道 2: 过滤之后。对于 Western 印迹分析, 使用识别 NP 的抗体。箭头表示 NP。

图 10: 加样于 Q-XL 柱(A 组)和带电滤膜(B 组)上的 Ad35 TFF 渗余物的层析图。B 组中的圆圈表示额外的峰, 其仅分离自使用带电滤膜的病毒峰。

图 11: 带电滤膜层析的两种级分的圆盘离心分析。A 组示出 Ad35 病毒峰的沉降模式图, B 组示出额外峰的沉降模式图(图 10 中的圆形所示)。

图 12: 层析级分 Ad35 的 SDS-PAGE 分析(见实施例 6)。4-12%

bis-tris 凝胶用银染色。凝胶 A 示出带电滤膜级分的电泳。1: 标记物, 2: 起始物, 3: 流经液, 4: 峰 1 (图 10 中圆形所示), 5: Ad35 峰。凝胶 B 示出 Q-XL 级分的电泳。1: 起始物, 2: 流经液, 3: Ad35 峰。

发明描述

本发明提供了一种从宿主细胞中纯化病毒的方法, 所述方法包括如下步骤: a) 培养感染病毒的宿主细胞, b) 向细胞培养物中加入核酸酶, c) 裂解所述宿主细胞以提供包含所述病毒的裂解物。在优选的实施方案中, 所述方法进一步包括: d) 澄清所述裂解物。在更优选的实施方案中, 所述方法进一步包括: e) 优选使用至少一个层析步骤进一步纯化所述腺病毒。本发明的方法与迄今为止已揭示的方法最重要的差别是在那些方法中是在细胞裂解之后或者在纯化过程的较晚阶段加入核酸酶。根据本发明, 核酸酶是在细胞裂解之前加入。如本发明所揭示, 现在意外地发现这导致优于仅在细胞裂解之后加入核酸酶的方法的改良。在本发明的方法中, 与在细胞裂解之后加入核酸酶的方法相比, 得自本发明这种方法的纯化的病毒批次含有较少的宿主细胞 DNA。在一个优选的实施方案中, 所述病毒是重组腺病毒。在一个实施方案中, 步骤 b) 使用的核酸酶是 benzonase®。在一个实施方案中, 裂解宿主细胞的步骤(步骤 c) 使用去污剂进行, 在一个实施方案中所述去污剂是 Triton-X100。在一个实施方案中, 裂解物的澄清(步骤 d) 包括深层过滤(depth filtration)和膜过滤。在一个优选的实施方案中, 所述膜过滤使用孔径大小为 0.8 μ m 和 0.45 μ m 的滤膜组合进行, 例如使用包含孔径大小为 0.8 μ m 和 0.45 μ m 的两个不对称聚醚砜滤膜的组合滤膜, 如 Sartopore™-2 组合滤膜。在一个实施方案中, 将澄清的裂解物(得自步骤 d) 进行超滤和/或渗滤。在一个优选的实施方案中, 渗滤导致针对包含 0.8—2.0 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液的缓冲液更换(buffer exchange)。在某些优选的实

施方案中,病毒的进一步纯化(步骤e)包括阴离子交换层析。在另一个实施方案中,所述病毒的进一步纯化(步骤e)包括大小排阻层析步骤,优选以组分分离模式(group separation mode)进行。在另一个优选的实施方案中,步骤e)同时包括阴离子交换层析和大小排阻层析。在本发明的某些实施方案中,澄清的裂解物和进一步纯化的病毒(得自步骤d)处于没有去污剂、氯化镁和蔗糖的缓冲液中。

另一方面,本发明提供了包含选自如下一组转基因的重组腺病毒批次:埃博拉病毒(Ebola)核蛋白、埃博拉病毒糖蛋白、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)环孢子基因和麻疹病毒血凝素,所述重组腺病毒批次特征在于每 1×10^{11} 个病毒颗粒含有少于0.1 ng 宿主细胞DNA。

本发明进一步提供了一种生产包含编码核酸结合蛋白的核酸序列的病毒的方法,所述方法包括如下步骤:a)培养已经感染病毒的宿主细胞,b)将所述宿主细胞的培养物及其中产生的所述病毒进行宿主细胞的裂解,以提供包含所述病毒的裂解物,c)将病毒进行阴离子交换层析,其特征在于在阴离子交换层析之后,将含有病毒的混合物用包含至少1 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液进行缓冲液更换。优选地,所述溶液包含至少1.5 M NaCl、更优选至少2 M NaCl、更优选至少3 M NaCl、更优选大约5 M NaCl,或者提供相等离子强度的另一种盐。优选地,将所述病毒使用孔径优选不大于 $1.2 \mu\text{m}$ 的亲水性滤膜过滤和/或通过大小排阻层析而进一步纯化。所述病毒优选是重组病毒,更优选是重组腺病毒。所述核酸结合蛋白可以是核蛋白,如出血热病毒的核蛋白,所述出血热病毒例如为埃博拉病毒、马尔堡病毒(Marburg virus)或者拉沙病毒(Lassa virus),优选埃博拉病毒。

发明详述

宿主细胞

本发明的宿主细胞可以是所希望的病毒可以在其中繁殖的任何宿主细胞。例如，重组腺病毒载体的繁殖在可以互补腺病毒中的缺陷的宿主细胞中进行。这些宿主细胞优选地在其基因组中具有至少一个腺病毒 E1 序列，从而能互补在 E1 区域中具有缺失的重组腺病毒。另外，所述腺病毒可在 E3 区域中具有缺失，这在 Ad 基因组中是不重要的，因此不必互补这种缺失。可以使用任何互补 E1 的宿主细胞，如 E1 永生化的人视网膜细胞例如 911 (见美国专利 5,994,128)、E1-转化的羊水细胞(见 EP 专利 1230354)、E1-转化的 A549 细胞(见例如 WO 98/39411，美国专利 5,891,690)、GH329: HeLa (Gao et al, 2000, Human Gene Therapy 11 : 213-219)、293 等等。优选 PER.C6™细胞(美国专利 5,994,128)或者衍生自其中的细胞被用作宿主细胞，因为它们适于各种不同病毒包括但非限于重组腺病毒的繁殖(见例如 WO 01/38362)。

用于重组腺病毒载体的繁殖的进一步的细胞系和方法例如在美国专利 6,492,169 和 WO 03/104467 中公开。

可以直接用作宿主细胞以繁殖病毒的或者可以被转变为互补宿主细胞以用于复制缺陷病毒的其它有用哺乳动物细胞系的实例是 Vero 和 HeLa 细胞及中国仓鼠卵巢细胞系、W138、BHK、COS-7、HepG2、3T3、RIN 和 MDCK 细胞，这些细胞为本领域技术人员所已知。

本发明的宿主细胞被培养以增加细胞和病毒数目和/或病毒效价。培养细胞使得其可以代谢和/或生长和/或分裂和/或产生本发明感兴趣的病毒。这可以通过本领域技术人员熟知的方法实现，所述方法包括但不限于为细胞提供营养物，例如在合适的培养基中。所述方法可包括附着在表面生长、悬浮生长，或者这些生长的组合。培养例如

可以在培养皿、滚瓶或者生物反应器中使用分批培养、补料分批培养、连续系统、中空纤维等方式进行。为了实现通过细胞培养而大规模(连续)生产病毒,本领域优选使细胞能悬浮生长,并优选使细胞在不含动物或人衍生的血清或者动物或人衍生的血清成分的条件下培养。本领域熟知合适的培养条件(见例如 Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), 和 R. I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc. , 2000, ISBN 0-471-34889-9)。

本发明包括培养感染病毒的宿主细胞使其裂解。本领域技术人员熟知培养宿主细胞并使其感染病毒的方法。感染宿主细胞例如可简便地将病毒在生理条件下暴露于合适的宿主细胞,使得宿主细胞摄取该病毒。对于某些病毒,甚至不需要用病毒本身开始,因为可以使用核酸序列在培养的细胞中重建该病毒。

适于培养宿主细胞以产生腺病毒的一些方面和系统也可见于 WO 98/22588, p.11-28。培养细胞及在宿主细胞中繁殖病毒的方法在例如美国专利 6,168,944、5,994,134、6,342,384、6,168,941、5,948,410、5,840,565、5,789,390、6,309,650、6,146,873 和国际专利申请 WO01/38362、WO 01/77304 和 WO 03/084479 中也有描述。

病毒

本发明的方法适用于广泛的病毒,包括但不限于腺病毒、痘病毒、虹彩病毒、疱疹病毒、乳多空病毒、副粘病毒、正粘病毒(如流感病毒)、反转录病毒、腺伴随病毒、痘苗病毒、轮状病毒等等,特别优选腺病毒。所述病毒优选是重组病毒,但可以包括临床分离株、减毒的疫苗株等等。在某些实施方案中,本发明用于浓缩携带异源转基因的重组病毒,优选腺病毒,以用于基因治疗或者疫苗接种。只是为了例证目的,本发明将更详细地描述重组腺病毒,但无限于此之意。

腺病毒

优选地,腺病毒载体在病毒复制所需的腺病毒基因组 E1 区域(例如 E1a 和/或 E1b 区域)的至少一个必需基因功能中具有缺陷。在某些实施方案中,所述载体在 E1 区域的至少一个必需基因功能和至少部分非必需的 E3 区域(例如 E3 区域的 Xba I 切除)中具有缺陷。腺病毒载体可以是“多重缺陷的”,这是指腺病毒载体在腺病毒基因组的两或多个区域的每一个区域均具有一或多个必需基因功能缺陷。例如,前述 E1 缺陷的或者 E1-、E3-缺陷的腺病毒载体可以进一步在 E4 区域的至少一个必需基因和/或 E2 区域的至少一个必需基因(例如 E2A 区域和/或 E2B 区域)中具有缺陷。缺失全部 E4 区域的腺病毒载体可激发较低的宿主免疫应答。合适的腺病毒载体例如包括缺少如下结构的腺病毒载体:(a)全部或部分 E1 区域和全部或部分 E2 区域,(b)全部或部分 E1 区域、全部或部分 E2 区域、及全部或部分 E3 区域,(c)全部或部分 E1 区域、全部或部分 E2 区域、全部或部分 E3 区域、及全部或部分 E4 区域,(d)至少部分 E1a 区域、至少部分 E1b 区域、至少部分 E2a 区域、及至少部分 E3 区域,(e)至少部分 E1 区域、至少部分 E3 区域、及至少部分 E4 区域,及(f)所有必需腺病毒基因产物(例如仅包含 ITR 和包装信号的腺病毒扩增子)。在缺失腺病毒基因组必需区域的情况中,这些区域编码的功能需被反式提供,优选通过宿主细胞反式提供,即当腺病毒缺失部分或全部 E1、E2 和/或 E4 区域时,这些区域需存在于宿主细胞中,例如整合进基因组中,或者以所谓的辅助腺病毒或者辅助质粒形式存在。

复制缺陷的腺病毒载体可以使用腺病毒或者嵌合腺病毒的任何病毒物种、病毒株、亚型,或者这些病毒物种、病毒株或者亚型的混合物作为载体 DNA 的来源而产生(见例如 WO 96/26281, WO 00/03029),它们例如可以为腺病毒载体提供具有感染某些希望细胞类

型的能力。腺病毒载体可以是能在细胞中生长的任何腺病毒载体,其一些主要部分(尽管不必是实质上地)衍生自或者基于腺病毒基因组。腺病毒载体可包含野生型腺病毒 C 群、特别是血清型 5 (即 Ad5) 或者 Ad2 的腺病毒基因组。腺病毒载体还可以包含衍生自腺病毒 B 群例如 Ad11、Ad35、Ad51 等的腺病毒基因组或者至少一种纤维蛋白(见例如 WO 00/70071), 这些实施方案具有在种群中很少遇到针对这些血清型的中和抗体的优势, 并且赋予靶定其它类型细胞的可能性, 因为这些腺病毒载体的向性与衍生自 Ad5 的那些载体不同。当然, 本领域技术人员已知也可以应用任何其它血清型。本领域技术人员意识到使用例如美国专利 6,492,169 或者 WO 03/104467 及其参考文献当中所论述的方法而繁殖特异于宿主细胞的不同血清型的腺病毒载体的可能性。本领域熟知腺病毒载体、构建腺病毒载体的方法及繁殖腺病毒载体的方法, 见例如美国专利 No. 5,559,099、5,837,511、5,846,782、5,851,806、5,994,106、5,994,128、5,965,541、5,981,225、6,040,174、6,020,191 和 6,113,913, 及 Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Chapters 67 and 68, respectively, in Virology, B. N. Fields et al. , eds. , 3d ed., Raven Press, Ltd. , New York (1996)及其它参考文献所揭示。本领域熟知腺病毒载体的构建, 其包括标准分子生物学技术的应用, 例如 Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), Watson et al., Recombinant DNA, 2d ed., Scientific American Books (1992)及 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), 及其它参考文献所述。

转基因

在一个实施方案中, 本发明的病毒是野生型病毒, 或者在本发明

的宿主细胞中仍具有感染力的其突变体或一部分。

在另一个实施方案中，所述病毒是包含异源信息的重组病毒，其可用于基因治疗目的中的治疗性方案，或者作为抗原用于免疫接种目的。优选使用例如腺病毒载体。所述异源信息是指“转基因(transgene)”。本发明的方法可适用于包含任何转基因的病毒、优选腺病毒，因此转基因自身的性质对于本发明无关重要。

一些可能的转基因例如在 WO 98/22588, p. 42-49 中描述。可存在于本发明的病毒中的转基因例如可以是治疗性基因，如肿瘤抑制基因，包括但不限于 p53、p16、APC、DCC、NF-1、WT-1、p21、BRCA1、BRCA2 等；酶，如胞嘧啶脱氨酶、HGPRT、葡糖脑苷脂酶、HSV 胸苷激酶或者人胸苷激酶等等；激素，如生长激素、促乳素、红细胞生成素、绒毛膜促性腺激素、甲状腺刺激激素、瘦素(leptin)、ACTH、血管紧张素、胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素、降钙素、加压素等等；白细胞介素和细胞因子，如 IL-1、IL-3、IL-12、G-CSF、GM-CSF、TNF 等等；在特殊疾病中缺少或突变的置换基因(replacement gene)，如 ADA、因子 IX、CFTR 等等；其它治疗基因如血管发生抑制剂、细胞周期抑制剂等等；抑制例如癌基因表达的反义构建体，所述癌基因如 ras、myc、jun、bcl、abl 等等；以及疫苗抗原如病毒抗原，例如衍生自小核糖核酸病毒、冠状病毒、披膜病毒、黄病毒、弹状病毒、副粘病毒、正粘病毒、痘病毒、嗜肝 DNA 病毒、呼肠孤病毒、反转录病毒、疱疹病毒等等，及例如更特异性的来自流感病毒(具有潜在抗原例如 HA 和/或 NA)、乙型肝炎病毒(具有潜在抗原乙型肝炎表面抗原)、西尼罗脑炎病毒(West Nile Virus)、狂犬病病毒、SARS-CoV、单纯疱疹病毒 1 和 2、麻疹病毒、小痘病毒、脊髓灰质炎病毒、HIV (具有潜在抗原例如 HIV-1 衍生的 gag、env、nef，或者其修饰物，包括密码子优化的形式，见例如 WO 02/22080 所述)、埃博拉病毒、马尔堡病毒，拉沙病毒的抗原；或者细菌抗原、真菌抗

原、寄生虫（包括锥虫、绦虫、线虫、蠕虫、疟原虫等等）抗原等等。显而易见，本领域技术人员可选择可用于所设计的治疗方案的感兴趣的基因，其用于基因治疗和/或免疫接种，并且不限于上述那些基因。同样显而易见，转基因的控制区域优选地存在于用于表达所述转基因的重组病毒载体中，例如包括启动子和聚腺苷酸化信号。这些均为本领域技术人员所熟知，在此不需要进一步描述。一些控制区域在 WO 98/22588, p. 49-55 中论述。

本发明使用的一些腺病毒在实施例中进一步论述。

裂解宿主细胞

在腺病毒感染后，所述病毒在细胞内复制并从而被扩增。腺病毒感染最终导致被感染的细胞裂解。腺病毒的裂解特性因此使得可以用两种不同形式进行病毒生产。第一种形式是在细胞裂解之前使用外部因素使细胞裂解而收获病毒。第二种形式是在产生的病毒使得细胞（几乎）完全裂解之后收获病毒上清（见例如美国专利 6,485,958 所述，其描述了不用外部因素使得宿主细胞裂解而收获腺病毒）。对于后一种形式，需要较长的温育时间以达到完全的细胞裂解及因此的高病毒产量。另外，宿主细胞成分逐渐流至培养基中可能对于获得的病毒的完整性和产量有害处。因此，本发明优选使用外部因素主动裂解细胞。

可用于主动裂解细胞的方法为本领域技术人员所已知，例如 WO 98/22588, p.28—35 所论述。这方面有用的方法例如是冷冻—解冻、固体剪切(solid shear)、高渗和/或低渗性裂解、液体剪切(liquid shear)、超声、高压挤压、去污剂裂解、上述方法的组合等。在本发明的一个实施方案中，使用至少一种去污剂使细胞裂解。使用去污剂进行裂解的优势是这是一种简便的方法，并且可易于规模生产。在另一个实施方案中，细胞是使用中空纤维超滤通过剪切裂解的，如 WO 03/084479 所述。

去污剂

根据本发明可以使用的去污剂及其应用方式为本领域技术人员所已知。一些实例例如在 WO 98/22588, p.29—33 中揭示。

本文所用术语“去污剂”可包括阴离子、阳离子、两性离子和非离子去污剂。去污剂例如包括但非限于牛磺胆酸, 脱氧胆酸, 牛磺脱氧胆酸, 鲸蜡(cetylpyridium), 杀藻胺, ZWITTERGENT-3-14®, CHAPS (3- [3-Cholamidopropyl]dimethylammoniol)-1- 丙磺酸盐水合物, Aldrich), Big CHAP, Deoxy Big CHAP, Triton X-100®, Triton X-114®, C12E8, 辛基-B-D-吡喃葡萄糖苷, PLURONIC-F68®, TWEEN-20®, TWEEN-80® (CALBIOCHEM® Biochemicals), Thesit®, NP-40®, Brij-58®, 辛基葡萄糖苷等。本领域技术人员清楚去污剂的浓度可以在例如大约 0.1%—5% (w/w)范围内变化。在某些实施方案中, 所述去污剂以大约 1% (w/w)的浓度存在于裂解溶液中。在本发明人的一些先导性实验中, 使用 Triton 与使用一些其它测试的去污剂(Tween 20、Tween 80、脱氧胆酸)相比产生较低粘性的溶液。在本发明的一个实施方案中, 使用的去污剂是 Triton X-100。

核酸酶

本发明应用核酸酶除去污染的即主要是宿主细胞的核酸。适用于本发明的核酸酶例如包括 Benzonase®、Pulmozyme®或者本领域通用的任何其它 DNA 酶和/或 RNA 酶。在本发明的优选实施方案中, 所述核酸酶是 Benzonase®, 其通过水解特定核苷酸之间的内部磷酸二酯键使核酸快速水解, 从而降低细胞裂解物的粘性。Benzonase®可商购自 Merck KGaA (编号 W214950)。

应用的核酸酶的浓度优选在 1—100 单位/ml 范围。

根据本发明, 所述核酸酶在细胞裂解之前使用。其可以在裂解步

骤之前几秒钟加入（或者实际上同时加入），但优选在裂解步骤之前至少 1 分钟加入到培养物中。然后将加入了核酸酶的细胞培养物在高于处理温度的温度温育，例如在大约 40℃，或者在培养温度（例如在大约 35℃—37℃）、或者在室温（大约 20℃）或者更低温度温育，在较低温度温育通常需要较长的时间达到相同的结果（见 Benzonase® 手册 Merck KGaA 编号 W 214950）。作为非限制性例子，温育可以在例如大约 37℃ 进行大约 10 分钟，之后裂解细胞。显然，核酸酶可以并优选在裂解步骤之后仍然可以主动降解核酸，在本发明的某些实施方案中，在裂解之后细胞与核酸内切酶的温育延长大约 50 分钟（导致核酸酶处理的总时间为大约 1 小时，这个时间可以更长，因为预期核酸酶仍发挥作用直至其在随后的纯化步骤中被除去）。这个时间与 WO 98/22588 公开的温育过夜的时间相比显著缩短。当然，较长的温育时间，例如 2 小时或者过夜或者更长时间温育（在 Benzonase® 手册 Merck KGaA 编号 W 214950 中，提供了温育时间直至 30 小时的数据），本发明的方法也是可能的，但这不是获得可接受的结果所必需的。很清楚在这些实施方案中使用的裂解步骤（即，将含有在其中产生的病毒的细胞进行裂解）是指应用外部因素如去污剂进行的裂解步骤（见上面“裂解宿主细胞”所述）。显然，在培养在其中腺病毒进行繁殖的细胞期间，一些细胞在没有任何外部裂解因素的情况下由于病毒而已经被裂解。因此，在优选的实施方案中，当开始核酸酶处理时，这种在没有外部因素的情况下发生的宿主细胞裂解低于 50%，优选低于 40%，更优选低于 30%，更优选低于 20%，即优选当细胞存活率分别为至少 50%、60%、70%、80% 时加入核酸酶。

尽管非优选（见上述），但可以使用在没有外部因素的情况下依赖于宿主细胞裂解的方法。包含“自发”裂解的方法已经被描述，其中不提倡使用 Benzonase（见美国专利 6,485,958）。然而，根据本发明，在培养的晚期阶段期间，即优选当病毒在其中繁殖的宿主细胞仍具有

至少 5%、优选至少 10%、更优选至少 20%存活力时(即当分别低于 95%、90%、80%的细胞裂解时),在这种系统中加入核酸酶也是有益的。预期当应用这样的步骤时将改良获得的病毒的质量。因此本发明的另一方面提供了一种从宿主细胞中纯化能裂解宿主细胞的病毒的方法,所述方法包括如下步骤: a)培养包含能裂解所述宿主细胞的病毒的宿主细胞, b) 在无外部因素裂解细胞的情况下在病毒释放进培养液之后收获病毒,其特征在于在 95%的宿主细胞被裂解之前向培养物中加入核酸酶。在某些实施方案中,在 90%、优选 80%的宿主细胞被裂解之前向培养物中加入核酸酶。在本发明这些方面中加入核酸酶的最佳时刻(即相应于被裂解的细胞的最佳百分比)依赖于加入的核酸酶的量及温育期间核酸酶的比活性的降低,这个时刻可以由本领域技术人员根据经验确定,现在本发明的发明人揭示了向培养物自身中加入核酸酶的优点。显而易见,根据本发明这个方面获得的裂解物可以应用本文所述的方法和步骤进一步纯化,如经过滤和层析纯化。

国际专利申请 WO 03/097797 描述了从细胞裂解物中纯化腺病毒颗粒的另外的方法,包括加入选择性沉淀剂以沉淀杂质 DNA。尽管在该申请中阐述了当使用其所述方法时不需要核酸酶步骤,但这一步骤还是在后期阶段被应用以得到更好的结果。本发明的方法,包括在宿主细胞裂解之前加入核酸酶的步骤,可以与在裂解后加入选择性沉淀剂组合,从而使得在过程后期加入核酸酶的步骤(如在 WO 03/097797 中所优选的)潜在多余。

国际专利申请 WO 02/070673 应用连续离心方法从宿主细胞中分离病毒:将细胞培养物在使细胞有效浓缩为粒状沉淀(pellet)的条件下进行连续离心,将粒状沉淀细胞在有效裂解细胞的条件下从离心机中排至收集容器中,从而获得裂解物。显然,这种方法的细胞裂解也在本发明“裂解宿主细胞”的范围内,因此预期这种方法应从本发明中

获益，即在进行连续离心方法之前向细胞培养物中加入核酸酶，由此改良的方法在裂解物及最终的纯化产物中产生较低量的核酸污染。

澄清(*clarification*)

在本发明优选的实施方案中，包含病毒的宿主细胞被澄清。澄清可以通过除去细胞碎片和其它杂质的过滤步骤进行。合适的滤膜可利用纤维素滤膜、再生的纤维素纤维、纤维素纤维组合无机过滤助剂(例如硅藻土，珍珠岩，煅制氧化硅)、纤维素纤维组合无机过滤助剂及有机树脂，或者其任何组合，及聚合物滤膜(例如包括但不限于尼龙、聚丙烯、聚醚砜)，以达到有效除去及可接受的回收。通常地，优选但非必需多阶段的方法。例如两阶段或三阶段的方法包括经一个流经滤膜(course filter)除去较大的沉淀物和细胞碎片，随后通过标称孔径大于 0.2 微米但小于 1 微米的第二个分级滤膜(stage filter)滤清。最佳的组合可以是沉淀物大小分布以及其它变量的函数。另外，也可以使用应用相对紧密的滤膜或者离心的单级操作进行澄清。更通常地，任何澄清方法包括无流动 (dead-end) 过滤、微滤、离心、或者过滤助剂(例如硅藻土)的主体加料与无流动或深层过滤组合 (其提供了适当澄清度的滤液，在随后的步骤中不淤塞滤膜和/或树脂)，均可用于本发明的澄清步骤中。

在一个实施方案中，使用深层过滤和膜过滤。这方面可商购的产物例如在 WO 03/097797, p. 20- 21 中提及。可以使用的滤膜可由不同的材料组成，可以孔径大小不同，并且可以组合使用。这些滤膜可以商购自一些供应商。

本发明人已经发现在本发明的方法中某些滤膜与其它滤膜相比，出乎意料地得到了更好的结果，提供更加改良的澄清(见实施例 4)。

因此，在本发明的一个优选实施方案中，组合使用 0.8 μ m 和 0.45 μ m 的滤膜，优选 Sartopore-2 滤膜，进行澄清。

超滤/渗滤

在本发明的某些实施方案中，在整个过程中对病毒悬浮液进行至少一次超滤/渗滤，例如以浓缩病毒和/或进行缓冲液更换，和/或浓缩和渗滤澄清的收获物。根据本发明的方法用于浓缩病毒的过程可包括任何过滤过程(例如超滤(UF))，其中病毒的浓度通过迫使稀释剂穿过滤膜而增加，从而稀释剂被从病毒制备物中除去，而病毒不能通过该滤膜，由此以浓缩的形式保留在病毒制备物中。UF 在例如 *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, L. Zeman and A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1996)中详细描述。一种优选的过滤方法是切向流过滤(Tangential Flow Filtration, TFF)，例如在 MILLIPORE 目录中题目为"Pharmaceutical Process Filtration Catalogue"pp. 177-202 (Bedford, Massachusetts, 1995/96)的文章中描述。TFF 广泛用于生物处理工业，用于细胞收获、澄清和产物(包括病毒)浓缩。这个系统由三个不同的工业生产液流组成：补料溶液、渗透物和渗余物。根据应用情况，可以使用不同孔径的滤膜。在本发明的一个实施方案中，渗余物是产物，如果需要可进行进一步纯化。对于这个实施方案，选择的特殊超滤膜的孔径要足够小得能保留病毒，但足够大得能有效地清除杂质。根据厂商和膜类型，对于腺病毒而言，标称分子量截断值(NMWC)在 100—1000 kDa 之间是合适的，例如具有 300 kDa 或者 500 kDa NMWC 的膜。膜的组成可以是但不限于再生纤维素、聚醚砜、聚砜或其衍生物。膜可以是扁片状或者是中空纤维。UF 通常是指使用孔径小于 0.1 μ m 的滤膜进行过滤。产物通常被保留，而体积通过渗透而减少。生物制药业中对于 TFF 最常用的两种几何结构是平板&框架以及中空纤维模块。进行超滤和微滤的中空纤维装置由 Amicon 和 Ramicon 在 1970 年代前期揭示(Cheryan, M. *Ultrafiltration Handbook*)，目前还有多家供应商，包括

Spectrum 和 A/G Technology。中空纤维模块由具有致密外层的自持纤维的阵列组成,使膜具有渗透选择性。纤维直径范围是 0.5mm—3mm。中空纤维模块的一个优势是能提供从小膜面积(ca. 16cm²)直至非常大膜面积(ca. 28m²)的滤膜,使得可以线性和简便地扩大规模。在本发明的某些优选实施方案中,中空纤维用于 TFF。据报道这些中空纤维与平面筛选膜(flat screen membrane)相比剪切较少,而病毒颗粒/感染单位(VP/IU)比率更好。在某些实施方案中,根据本发明使用 0.05μm 的中空纤维。

使用超滤膜的渗滤(DF)或者缓冲液更换是除去和更换盐、糖、从结合的物质中经非水性溶剂分离游离的物质、除去低分子量材料或者快速改变离子和/或 pH 环境的一种理想方式。微溶质通过向超滤的溶液中以与 UF 速度相同的速度加入溶剂而被最有效地除去。这样以恒定体积从溶液中洗去微量物质,纯化保留的病毒。本发明利用 DF 步骤更换裂解物的缓冲液,之后进行进一步层析或者其它纯化步骤。根据本发明的一个实施方案,通过 TFF 进行 DF 以进行缓冲液更换,其中加入缓冲液等于除去渗透物。

可以在纯化的不同时期使用 UF/DF 浓缩和/或缓冲液更换本发明的病毒悬浮液,例如纯化裂解物和/或已经经过层析的那些进一步纯化的病毒悬浮液。

在本发明的一个实施方案中,裂解物通过 UF/DF 浓缩 5 倍,将所得浓缩的病毒悬浮液使用恒定体积的渗滤方法用 6 个渗滤体积(DFV)的包含 1 M NaCl 的缓冲液进行缓冲液更换。发现这种高盐浓度显著改良所得病毒的性质,因为许多不希望的蛋白质在这个步骤期间被去除(见实施例 2)。因此本发明的一个优选实施方案是将澄清的裂解物用包含 0.8—2.0M NaCl、例如大约 1 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液更换。本领域技术人员明白盐的阴离子和阳离子均可以改变。

在将所述病毒悬浮液进行阴离子交换层析之前，可以用包含 0.4 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的缓冲液进行缓冲液更换。在一个实施方案中，这可以通过恒定体积渗滤方法，使用 4 个 DFV 的希望缓冲液而实现。

进一步纯化

根据本发明的优选实施方案，已经通过本发明的方法获得的病毒悬浮液优选在裂解物澄清之后例如通过本领域技术人员熟知的方法进行进一步纯化。这可以例如通过密度梯度离心方法而实现，如 WO 98/22588, p. 59-61 所论述。

然而，优选进一步纯化应使用至少一个层析步骤，例如 WO 98/22588, p. 61-70 所论述。已经描述了进一步纯化病毒的许多方法，其中包括层析步骤。本领域技术人员知道这些方法，并且可以改变应用层析步骤的实际方式以优化本发明的方法。

例如可以通过组合阴离子交换和阳离子交换层析步骤纯化某些病毒，见美国专利 6,008, 036 所论述。

也可以应用羟磷灰石介质纯化腺病毒，见 WO 02/44348 所论述。

也可以使用反向吸附步骤，例如 WO 03/097797, p. 26 所描述。

对于腺病毒纯化，优选使用至少一个阴离子交换层析步骤。在阴离子交换层析步骤之后，所述病毒可以是足够纯的。然而在某些实施方案中，进一步进行大小排阻层析步骤以增加纯化过程的强度。这个步骤可以在阴离子交换层析步骤之前或之后进行。显然，也可以将其它纯化步骤与阴离子交换层析步骤适当地组合。

阴离子交换层析在纯化腺病毒中的应用已经充分描述，这方面因此为本领域技术人员所已知。已经应用了许多不同的层析基质纯化腺病毒并且是合适的，本领域技术人员可易于发现纯化该病毒的最佳阴离子交换材料，例如如下文献的指导。

美国专利 5,837,520 (也见于 Huyghe et al. , 1995, Human Gene Therapy 6: 1403-1416)描述了一种纯化腺病毒的方法, 其中将宿主细胞裂解物用核酸酶处理, 随后进行阴离子交换和金属离子亲和层析。

美国专利 6,485,958 描述了使用强阴离子交换层析方法纯化重组腺病毒。

阴离子交换层析已经与流化床层析柱(fluidized bed column)一起应用以纯化腺病毒颗粒, 见 WO 00/50573 所述。

另外, 纯化腺病毒颗粒的膨胀床(expanded bed)阴离子交换层析及进行阴离子交换层析的某些层析树脂已经在美国专利 6,586, 226 中描述。

除了阴离子交换层析柱之外, 阴离子交换膜层析产品如 Pall (例如 Mustang™系列)和 Sartorius (例如 Sartobind 系列)生产的那些产品也是合适的。关于这些滤膜的应用及其在腺病毒纯化中的优点见例如 WO 03/078592 所述。

显然, 这些滤膜的应用也在本文所用术语“阴离子交换层析”的范围内。

美国专利 6,537,793 描述了使用离子交换层析从宿主细胞中纯化腺病毒的方法, 特别教导优选使用 Q Sepharose XL 类型层析支持物。在本发明的一个实施方案中, 腺病毒使用 Q Sepharose XL 层析柱进一步纯化。

如上所述, 所述方法可进一步适当地应用大小排阻层析步骤。

国际申请 WO 97/08298 描述了使用某些层析基质以防止对病毒的损害的腺病毒纯化方法, 包括阴离子交换和大小排阻步骤。

美国专利 6,261,823 描述了一种纯化腺病毒的方法, 其中将腺病毒制备物进行阴离子交换层析, 随后进行大小排阻层析。在大小排阻步骤中, 可以从低分子量的杂质中进行病毒颗粒的组分离。根据本发明的某些实施方案, 将大约 15—30%、优选大约 20%的柱体积加样

于大小排阻层析柱中(大小排阻层析的组分离模式)。因此,在本发明的一个优选实施方案中,根据本发明的方法制备的腺病毒悬浮液使用阴离子交换层析步骤和大小排阻层析步骤进一步纯化。

WO 03/078592 描述了使用高通量阴离子交换滤膜(即含有阴离子交换基团的带电滤膜)进行腺病毒(Ad5)纯化。如下描述了这种带电滤膜与阴离子交换层析柱相比的优势: (i)较快的流速; (ii)较高的结合容量; (iii)较高的病毒回收程度; (iv)对于临床应用不需要包装或者清洁确认; (v)当使用一次性滤筒时无有效期或者贮存问题。如上所述,这种阴离子交换滤膜的使用是本发明的一个实施方案,并且是被认为包括在本发明的“阴离子交换层析”范围内的一个实施方案。然而,除了是柱层析的等价物之外,本发明人还令人惊讶地发现使用阴离子交换滤膜与使用阴离子交换层析柱相比纯化腺病毒血清型 35 (Ad35)的一个优点: 未掺入腺病毒颗粒中的某些腺病毒蛋白质通过使用阴离子交换滤膜而不是通过阴离子交换层析柱而从腺病毒颗粒中分离出。这些游离的腺病毒蛋白质先前在重组腺病毒颗粒制备物中未被发现,并且通常检测不到,但是现在可以使用如下步骤而除去: 将包含游离腺病毒蛋白质的重组腺病毒制备物用含有阴离子交换基团的带电滤膜进行过滤。使用带电滤膜的这种效果在 WO 03/078592 中未注意到。另外, WO 03/078592 未公开应用阴离子交换滤膜纯化 Ad35 或者 B 亚群的其它腺病毒颗粒。本发明因此提供了一种从重组腺病毒制备物中除去游离腺病毒蛋白质的方法,包括如下步骤: 将包含游离腺病毒蛋白质的重组腺病毒制备物用含有阴离子交换基团的带电滤膜进行过滤。不希望受理论的约束,但确信 B 亚群的重组腺病毒颗粒可能的较低稳定性(见例如 WO 2004/001032)产生迄今未被检测到的似乎未掺入腺病毒颗粒中的游离腺病毒蛋白质。因此,本发明的这种特殊方法可以特别有益于纯化 B 亚群的重组腺病毒,如 Ad35、Ad11 等等。然而,这种方法也可以改良更稳定的基于 Ad5 或 Ad2 的腺病毒的纯

化。本发明提供了使用阴离子交换滤膜从重组腺病毒制备物中除去游离的（即未掺入病毒颗粒中的）腺病毒蛋白质。优选地，所述重组腺病毒制备物包含重组 B 亚群腺病毒，如重组 Ad35。本发明还提供了一种纯化重组的 B 亚群腺病毒颗粒如 Ad35 颗粒的方法，所述方法包括将重组 B 亚群如 Ad35 颗粒用阴离子交换滤膜进行纯化步骤。适用于本发明这些方法中的阴离子交换滤膜为本领域所已知并且可商购（见 WO 03/078592, 段落[40]-[41]），例如可购自 Pall（例如 Mustang™ 系列）和 Sartorius（例如 Sartobind 系列）。

缓冲液

根据本发明，在病毒纯化期间可使用许多种缓冲液。在本发明的一些实施方案中，用于 UF/DF 和阴离子交换层析的缓冲液通常含有 0.4—1.0 M NaCl/50 mM TRIS pH 7.5，其中 NaCl 的浓度根据进行的步骤而定。在某些优选的实施方案中，在澄清之后使用的缓冲液不含去污剂、氯化镁和蔗糖。这些添加剂的缺乏使得这些缓冲液与已知已确立的方案中使用的那些缓冲液不同。然而无论如何，当应用本发明的方法时，获得了纯化的和基本上未聚集的腺病毒。使用不含这些添加剂的缓冲液的优点是较易于制备、较廉价、并且不需要检验这些添加剂的去除情况。

在本发明的一个实施方案中，将腺病毒在组分离期间及最后的贮存期间用缓冲液进行缓冲液更换，所述缓冲液也用于 Adenovirus World Standard (Hoganson et al, Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March 2002, p. 43-48): 20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, 2.5%甘油。

显然，可以使用许多其它缓冲液，适合纯化的（腺）病毒制备物贮存及药物学给药的配方的一些实例可例如见欧洲专利 No. 0853660 和国际专利申请 WO 99/41416、WO 99/12568、WO 00/29024、WO

01/66137、WO 03/049763 所述。

具有特异性插入体的载体

在本领域，通常认为转基因自身与纯化方法无关。然而，如本文所示，转基因在特定情况中可通过其在宿主细胞或病毒中的表达影响病毒的性质或者可对纯化病毒的过程有影响。

本发明人发现的一种这样的非限制性的特殊情况是其中所述转基因是埃博拉病毒核蛋白。使用标准的纯化方法纯化含有埃博拉病毒核蛋白基因的腺病毒载体导致表达的埃博拉病毒核蛋白的共纯化。未观察到一些其它转基因表达的蛋白质的共纯化(例如未观察到与埃博拉病毒糖蛋白 dTM (Sudan)、埃博拉病毒糖蛋白 dTM (Zaire)、麻疹血凝素蛋白(MV-H)的共纯化)。这提示埃博拉病毒核蛋白与腺病毒之间的特异性相互作用，这种作用似乎依赖于埃博拉病毒核蛋白的特性。预期其它核酸结合蛋白具有相似的特性，并预期与腺病毒相互作用导致共纯化。对于具有这种转基因包括核酸结合蛋白如核蛋白如埃博拉病毒核蛋白的腺病毒，将缓冲液更换为盐浓度高于 1 M NaCl 及使用例如 2—5 M NaCl 缓冲液以改良终产物质量是有益的(见实施例 3)。缓冲液更换可适当地通过 TFF 进行。或者，可以使用其它缓冲液更换方法，例如通过添加固体材料或者浓缩的溶液，盐可以直接逐步加入病毒悬浮液中。本发明的这个方面与本发明的其它方面组合是有益的，例如与在细胞裂解之前加入核酸酶组合，但不限于此。本文描述了使用这种高盐缓冲液出乎意料地未导致聚集问题，也未导致纯化的病毒颗粒的感染性或完整性显著劣化。在本发明的这个方面中，缓冲液更换步骤优选在病毒从阴离子交换层析中洗脱之后进行，优选在进一步纯化步骤之前进行，这种进一步纯化步骤例如是以组分离模式进行的大小排阻步骤。这一最后步骤可用于滤清病毒悬浮液，即除去在阴离子交换后可能仍存在的少量杂质，也可以用于直接在组分离柱上

进行缓冲液更换。或者，代替大小排阻层析，进一步纯化步骤可包括通过亲水性滤膜过滤包含高浓度盐的病毒悬浮液，所述滤膜例如是 Durapore PVDF 滤膜(例如 Millipore 的 Millipac)或者 Sartopore 2 滤膜。所述滤膜优选孔径为 $1.2\mu\text{m}$ ，更优选孔径更小例如 $1.0\mu\text{m}$ ，更优选孔径更小例如为 $0.8\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ 或者 $0.22\mu\text{m}$ 。出乎意料地发现埃博拉病毒的核蛋白(NP)在这些条件下通过被滤膜滞留而从重组腺病毒中分离，而 NP（分子量为大约 100 kD）预期与腺病毒一起通过滤膜孔。使用这些滤膜提供了从病毒中分离核蛋白的快速方案，这种方法不需要在高盐浓度中延长温育时间，同时可以从病毒中完全除去核蛋白(图 9)。当然，在这种过滤步骤后仍可以应用大小排阻层析步骤，以除去其它少量污染物和/或进行缓冲液更换。

使用高盐除去 DNA 结合蛋白是本发明的一方面，预期可用于除了腺病毒之外的其它病毒。在这种情况下可以应用另一个柱层析步骤代替阴离子交换层析。重要的因素似乎是要在应用高盐步骤之前充分除去污染物，当然这种除去可以通过除了阴离子交换层析之外的其它方式进行，对于重组腺病毒也如此。

因此，本发明进一步提供了一种生产包含编码核酸结合蛋白的核酸序列的病毒的方法，所述方法包括如下步骤：a)培养已经感染了病毒的宿主细胞；b)将所述宿主细胞的培养物和其中产生的所述病毒进行宿主细胞的裂解，提供包含所述病毒的裂解物；c)将病毒进行阴离子交换层析，其特征在于在阴离子交换层析后将含有病毒的混合物用包含至少 1 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液进行缓冲液更换。优选地，将病毒使用至少一个包含亲水性滤膜过滤的步骤和/或使用至少一个包含大小排阻层析的步骤而进一步纯化。对于这些实施方案，将包含至少 1 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液称作“高盐”溶液。显然，本领域技术人员已知阴离子和阳离子均可以被改变，只要提供足够的离子强度而无沉淀或者其它不希

望的副作用如病毒失活即可，因为所述方法很可能依赖于破坏 DNA 结合蛋白与纯化的病毒之间的离子相互作用。例如，NaCl 可以部分或全部由其它的盐代替，例如由 KCl、磷酸钠、CsCl、LiCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、NaBr、NaI、KBr、KI、 KNO_3 、 NaHCO_3 、 KHSO_4 等等代替。本发明实施例中使用的 5× 稀释的缓冲液(包含 5 M NaCl)电导率为 78—79 mS/cm。根据本发明，现在可以例如容易地对含有其它盐并具有相似或更高电导率的缓冲液进行测试，以测试其从部分纯化的病毒中除去 DNA 结合蛋白的适合性。预期这个实施方案直至饱和的 NaCl 浓度(即大约 6 M NaCl) 都将是有用的，但因为一些实际的原因优选使用不饱和的缓冲液，例如 5 M NaCl。优选地，所述溶液包含至少 1.5 M NaCl，或者提供相等离子强度的另一种盐。更优选地，所述溶液包含至少 2 M NaCl，或者提供相等离子强度的另一种盐。更优选地，所述溶液包含至少 3 M NaCl，或者提供相等离子强度的另一种盐。更优选地，所述溶液包含至少 4 M NaCl，或者提供相等离子强度的另一种盐。更优选地，所述溶液包含至少 5 M NaCl，或者提供相等离子强度的另一种盐。包含病毒的高盐溶液可温育一定时间，优选至少 1 小时，更优选至少 2 小时。一般地，实施例示出当温育时间更长、至少直至过夜温育时，从病毒中纯化的 DNA 结合蛋白增多。另外，较高的离子强度看起来改良纯化。因此，可以想像即使在 1 M 或者 1.5 M NaCl 的离子强度和延长的温育时间例如至少 2 天或 1 周的情况下，也可以从病毒中纯化 DNA 结合蛋白。这可以通过本发明所述的实验常规检测。在包含 5 M NaCl 的缓冲液中过夜温育表达埃博拉病毒核蛋白的重组腺病毒从病毒中除去了污染性的核蛋白至低于检测限，因此这是本发明的一个优选实施方案。在优选的实施方案中，所述病毒是一种重组腺病毒。在某些实施方案中，所述核酸结合蛋白是病毒的核蛋白。在某些实施方案中，所述核酸结合蛋白是埃博拉病毒核蛋白。在优选的实施方案中，缓冲液更换步骤在阴离子交换层析

之后及过滤和/或大小排阻层析步骤之前进行。进一步优选包括用核酸酶处理裂解物，其中根据本发明的其它方面优选在细胞裂解完成之前向细胞培养物中加入核酸酶。代替高盐，或者除了高盐之外，可以加入去污剂以从污染性的 DNA 结合蛋白中纯化病毒。在一个实验中，本发明人示出加入 1% Tween 20 在表达埃博拉病毒核蛋白的重组腺病毒中显著降低污染性的核蛋白。当然，也可以适当地测试其它去污剂，浓度可以变化（例如在大约 0.2%—5%之间），以发现根据本发明从重组病毒制备物中除去 DNA 结合蛋白的最佳条件。在这个方面，优选加入至少 1%的去污剂。然而，本发明人的第一个实验表明高盐温育具有更高的再现性，并因此是优选的。

重组腺病毒的批次

一方面，本发明提供了包含选自如下一组的转基因的重组腺病毒批次：埃博拉病毒核蛋白、埃博拉病毒糖蛋白、恶性疟原虫环孢子基因、麻疹病毒血凝素，所述批次的特征在于每 $1E11$ 病毒颗粒含有少于 0.1 ng 宿主细胞 DNA。当然，这些转基因与天然发现的野生型序列（包括所有分离株或亚型）相比任选可含有缺失、添加和/或突变，这些转基因在本发明的范围内。显然，如果不是审批目的所需的，对于对对象进行给药，提供这种具有低剂量污染性宿主细胞 DNA 的批次是有益的。在优选的方面，所述批次特征在于每 10^{11} 个病毒颗粒含有少于 0.08 ng、优选少于 0.06 ng、更优选少于 0.04 ng 宿主细胞 DNA。

实施例

如下实施例是为了通过本发明的某些实施方案进一步例证本发明，而无限制本发明范围之意。

实施例1：向细胞培养物中而非向宿主细胞裂解物中加入核酸酶改良病毒纯化方法

在这个实施例中，示出在细胞裂解之前向细胞培养物中加入核酸酶减少最终纯化的产物中残留的宿主细胞 DNA 的量。

在实验 1 和实验 2 中，将 10 升 PERC.6[®]细胞培养物在感染腺病毒载体后 2.5 天用 1% Triton X-100[®] (Sigma)裂解。在裂解后 30 分钟，加入 Benzonase[®](Merck KGaA, 50 单位/ml)和 MgCl₂ (2mM)。再过 30 分钟后，将 Triton X-100[®]/Benzonase[®] (T/B)收获物通过过滤澄清。这是根据本领域已知的方法进行的实验。

在实验 3—8 中，将 Benzonase[®] (50 U/ml)和 MgCl₂ (2mM)加入 10 升 PERC.6 细胞培养物中(感染后 2.5 天)，温育 10 分钟后将细胞用 1% Triton X-100[®] 裂解。再温育 50 分钟后，通过过滤澄清 Benzonase[®]/Triton X-100[®] (B/T)收获物。

这两种方法的不同之处在于核酸酶(Benzonase[®])和去污剂(TritonX-100[®])加入的顺序：传统上首先裂解细胞，随后加入核酸酶(在此称作 T/B 收获物)，而在本发明的方法中，首先加入核酸酶，随后使细胞裂解(在此称作 B/T 收获物)。见图 1 所示。

然后将样品进一步纯化。通过深层过滤(0.5 μ m Clarigard 滤膜, Millipore)进行澄清，随后经过 0.8/0.45 μ m Sartopore 2 (Sartorius)滤膜进一步澄清。将澄清物经过 0.05 μ m 中空纤维(Spectrum)浓缩 5 倍，随用 6 体积的 1.0 M NaCl/50 mM TRIS pH 7.5 和 4 体积的 0.4 M NaCl/50 mM Tris pH 7.5 渗滤。将经渗滤的渗余物加样于 Sepharose Q-XL (Amersham)柱上，用 0.55 M NaCl/50 mM TRIS pH 7.5 洗脱病毒级分。将此级分进一步纯化并用 Sepharose 4 FF (Amersham)柱进行缓冲液更换。将产生的纯化产物使用中空纤维(0.05 μ m 孔径, Spectrum)浓缩至希望的浓度，经 0.22 μ m 滤膜过滤并等份。通过 Q-PCR 分析纯化的产物样品中残留的宿主细胞 DNA。

T/B 处理导致在进一步后续处理之后 DNA 含量减少,可以正好符合对终产物(filled and finished material)的要求。活体病毒配制品中残留的宿主细胞 DNA 的规定量是< 10 ng/剂 (假定一剂含有 1E11 病毒颗粒)。

如表 1 所示,颠倒 TritonX-100®和 Benzonase®步骤显著减少了纯化产物中残余的宿主细胞 DNA 的量:在主动裂解细胞之前加入核酸酶可以使残余宿主细胞 DNA 的量减少 10—40 倍,直至小于 0.1ng/μl 病毒颗粒。

另外,从 SDS-PAGE 分析 (图 2) 中显然可见通过深层过滤和膜过滤 B/T 收获物,在澄清期间除去了许多宿主细胞蛋白质,其中包括显著量的组蛋白(在凝胶上分子量为大约 10—20 kD,通过质谱分析证实),而这些蛋白质显然仍存在于澄清的 T/B 收获物中。

因此,本发明的方法明显优于现有技术已知的那些方法。不希望受理论约束,对于实验 1 和 2(T/B)与实验 3—8 (B/T)之间差别的解释可包括:

1. 通过加入 Benzonase®,由于病毒的产生而从裂解的细胞中释放出的 DNA 可能已经被消化。只要 DNA 从 Triton 裂解的细胞中一释出,存在的 Benzonase®立即消化该 DNA,从而防止大的 DNA 聚集体形成。未聚集的 DNA 的消化可能比大的 DNA 聚集体的消化效率更高。

2. Benzonase®的总温育时间增加 30 分钟,导致更有效的消化(见 Benzonase 手册 Merck KGaA 编号 W 214950)。

3. 当 DNA 在释出后立即被消化时,可能形成较大的组蛋白复合物,这些较大的颗粒通过澄清滤膜滞留。在澄清期间组蛋白-DNA 复合物的滞留可能也有助于减少残留的宿主细胞 DNA。

一些阴离子交换树脂已经被测试,例如 QAE 550C 和 Super Q 650M (购自 Tosoh), Q Sepharose HP, ANX Sepharose 4FF, DEAE

Sepharose, Q Sepharose XL, Q Sepharose Big Bead 和 Q Sepharose FF (购自 Amersham)。尽管所有这些树脂均适于纯化重组腺病毒,但我们发现基于从宿主细胞蛋白质和宿主细胞 DNA 中分离病毒和流动特性, Q Sepharose XL 最适合我们的目的。

一些大小排阻树脂被测试,例如 Sephacryl S300, Sephacryl S500 Sepharose 4FF 和 Sepharose 6 FF (均购自 Amersham)。尽管所有这些树脂均适于纯化重组腺病毒,但我们发现基于从宿主细胞蛋白质和 DNA 中分离病毒的能力, Sepharose 4 FF 最适于我们的目的。

基于这些及其它结果(见下文),本发明的一个优选方法示于图 4。

实施例 2: 用高盐缓冲液进行缓冲液更换改良病毒处理

将 PER. C6 细胞在 10 L 生物反应器中生长并用 Ad5.Adapt.MV-H (用麻疹病毒血凝素作为转基因,在 WO 2004/037294 中描述)感染。感染后 2.5 天,将细胞用 1% Triton® X-100 裂解,30 分钟后加入 Benzonase® (50 单位/ml)和 $MgCl_2$ 并再温育 30 分钟。将收获物经过 0.5 μ m Clarigard 滤膜及随后经过 Millistak DE 30/60 滤膜(Millipore)过滤澄清。将澄清的收获物用等体积的 0.6 M NaCl/50 mM HEPES pH 7.5 稀释,导致终浓度为 0.3 M NaCl,将稀释的澄清收获物用 500 kD flatscreen cassette (Biomax500, Pellicon 2 module Millipore)浓缩 4 倍,随后用 2 个渗滤体积(DFV)的 0.3 M NaCl/50 mM HEPES pH 7.5; 2 个 DFV 的 0.6 M NaCl/50 mM HEPES pH 7.5; 2 个 DFV 的 1.0 M NaCl/50 mM HEPES pH 7.5 及 3 个 DFV 的 0.3 M NaCl/50 mM HEPES pH 7.5 渗滤。测定产生的渗透物的电导率,并通过 SDS-PAGE 分析样品(图 3)。数据示出当渗透物(及因此的渗余物)的盐浓度在 0.55 和 0.85 M NaCl 范围或更高时,组蛋白(在凝胶上分子量为大约 10–20 kD,通过质谱分析证实)穿过滤膜孔。

一种可能的解释是在这些盐条件下静电相互作用被破坏,导致组

蛋白从复合物中释出, 穿过 500 kD 孔。从这个实验中推断在 UF/DF 步骤期间导入高盐缓冲液可以更有效地除去宿主细胞蛋白质, 特别是组蛋白。

尽管在这个实施例中首先使细胞裂解, 随后用核酸酶处理(T/B), 但预期针对高盐强度(高于 0.55 M NaCl, 例如 1 M NaCl)的缓冲液进行渗滤在本发明的方法中也是有益的, 其中在细胞裂解之前向其中加入核酸酶(B/T, 见实施例 1), 尽管在 B/T 方法中已经只有少量组蛋白污染(见图 2)。

因此, 在本发明的一个优选实施方案中, 澄清的裂解物用包含 0.8—2.0 M NaCl、优选大约 1 M NaCl 或者提供相等离子强度的另一种盐的溶液更换(见实施例 1 和图 4)。

实施例 3: 从重组病毒制备物中除去污染的核蛋白

具有埃博拉病毒核蛋白作为转基因的重组腺病毒的产生如实施例 5 所描述。在这个实施例中描述了这种病毒的纯化。

实验 3.1

Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 使用所述方案纯化(见实施例 1, 图 4)。这种方法导致表达的埃博拉病毒核蛋白(NP)转基因与病毒的共纯化。将终产物(filled and finished product)用含有 5 M NaCl (终浓度为 2.5 M) 或者 2% Tween 20 (终浓度为 1%)的缓冲液以 1:2 稀释, 在室温温育 1 小时, 之后加样于 Sepharose 4 FF 柱上。对空的(void)和滞留级分通过 SDS-PAGE 分析。结果(图 5)示出空的级分含有不含污染性完整 NP 的 5 型腺病毒。

迄今为止, 用高盐获得的结果看起来可再现, 而用去污剂的则不能再现, 因此优选高盐。然而对于去污剂的最佳条件可以通过改变使用的去污剂及其浓度而测试。

结论: Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 载体可以从埃博拉病毒核蛋白中

纯化,所述纯化通过在含有 2.5 M NaCl 或者 1% Tween、优选 2.5 M NaCl 的缓冲液中温育,随后在 4 FF sepharose 上分离而实现。

实验 3.2

Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 使用所述方案纯化(见实施例 1, 图 4)。终产物使用 10 kD 膜用含有 1、2、3 或者 5 M NaCl 的 50 mM TRIS 缓冲液 pH 7.5 透析。将 Ad5.Ebo.NP 在这些缓冲液中温育 2 小时或者过夜,之后加样于 Sepharose 4 FF 柱上。对空的和滞留的级分通过 SDS-PAGE 分析。结果示出空的级分含有明显较少 NP 的 5 型腺病毒。如表 2 所示, NP 除去的量与盐浓度和温育时间相关。

结论:通过在含有 2—5 M NaCl 的缓冲液中温育,随后在 4 FF sepharose 上分离, Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 载体可以从埃博拉病毒核蛋白中纯化。在 4 FF 柱分离之前较长的温育时间和较高的盐浓度产生较高纯度的 Ad5.Ebo.NP 载体(除去更多的核蛋白)。

使用相同的方法,以较长时间温育(例如 2 天, 1 周)对 1 M 和 1.5 M NaCl 浓度进行测试,以发现在这些盐强度下进行较长时间温育是否可以满足纯化需要。

实验 3.3

这个实验示于图 6。

将 PERC.6 细胞在 10L 生物反应器中生长并用 Ad5.dE3x.Adapt.Ebo.NP 感染。感染后 2.5 天,向细胞培养物中加入 Benzonase®(50 单位/ml)和 $MgCl_2$, 10 分钟后将细胞用 1% Triton® X-100 裂解,再温育 50 分钟。将收获物经过 0.5 μ m Clarigard 滤膜澄清,随后经过 Sartopore 2 滤膜(0.8/0.45 μ m, Sartorius)澄清。

将澄清的收获物分成两部分。一部分使用 0.5 μ m 中空纤维 (Spectrum)浓缩 5 倍并用含有 5 M NaCl/50 mM Tris pH 7.5 的缓冲液渗

滤。这样导致跨膜压力(TMP)增加和渗透物流量减少,同时渗余物看起来变为白色而透明度降低,表明蛋白质沉淀。

将澄清的收获物的第二部分使用 0.5 μ m 中空纤维(Spectrum)浓缩 5 倍,并用 6 DFV 的 1.0M NaCl/50 mM TRIS pH 7.5 及随后用 4 DFV 的 0.4 M NaCl/50 mM TRIS pH 7.5 渗滤。最终的渗余物经过 Sepharose Q-XL 柱(Amersham)纯化。

将 Q-XL 洗脱物也分成两部分。将一部分以组分离模式(加样 20 %柱体积)经过大小排阻柱(Sepharose 4 FF)进一步纯化并用 25 mM NaCl/20 mM TRIS/2.5%甘油(配制缓冲液)进行缓冲液更换,这样产生图 6 所示产物 A。将另一部分使用 0.05 μ m 中空纤维(Spectrum)用 6 DFV 的 5 M NaCl/50 mM TRIS pH 7.5 渗滤,这被进一步称作高盐病毒级分。

尽管中空纤维的孔径(0.05 μ m, 大约 800 kD)足够大,可以通过 100 kD 核蛋白,但在渗透物中无核蛋白可被检测到,并且在渗余物中核蛋白的量未见减少。可能是一或多个 TFF 参数的调节(例如剪切增加)可以改良核蛋白的纯化。我们进一步使用大小排阻(组分离)方法实现这个目标。

将高盐病毒级分再次分成两部分,一部分经过大小排阻(组分离)柱直接纯化并用配制缓冲液进行缓冲液更换(图 6 中产物 B),而第二部分在室温贮存过夜,之后经过大小排阻(组分离)柱纯化和进行缓冲液更换(图 6 中产物 C)。

对这三个纯化的产物进行分析以确定纯度、感染性、产量、聚集和转基因表达。

SDS-PAGE 和 Western 分析示于图 7,示出完整的核蛋白以及 NP 降解产物(通过质谱分析证实是 NP 降解产物)分别从产物 A、B 和 C 中逐步增加地被除去。

反向分析(RP-HPLC)(图 8)示出完整核蛋白以及 NP 降解产物(在

39 分钟洗脱) 的量通过进行高盐渗滤步骤从大约 50% (产物 A)降低至< 5% (产物 B), 在 5 M NaCl 中室温贮存过夜后甚至低于检测限度 1% (产物 C)。

使用这两种分析方法均未观测到对病毒蛋白的作用。转基因表达示出, 感染性未受影响及无聚集发生(对于所有这三个产物 A、B 和 C)。显然, 重组病毒在高盐中甚至温育过夜也不导致病毒质量的明显降低。

代替使用或者除了使用延长温育时间的高盐和随后的大小排阻层析之外, 将用 5M NaCl 缓冲液更换的病毒悬浮液直接使用 0.45 μ m 亲水性滤膜(Millipac 20)过滤。出乎意料地, 这样导致 NP 完全从病毒中除去(图 9)。使用不同孔径(例如 1.2、1.0、0.8、0.22 μ m)的滤膜重复这个实验以确定可能的孔径范围。对 0.8/0.45 μ m Sartopore-2 组合也进行了测试。这个过滤步骤可适当地与随后的大小排阻层析步骤组合, 并且在高盐溶液中可能需要较短的病毒温育时间, 使得处理时间可能缩短。

结论: 1. 用 5 M NaCl 对澄清的收获物进行渗滤是不可能的, 可能是因为发生宿主细胞蛋白质沉淀。2. 高度纯化的 Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 在 5 M NaCl 中温育, 随后在 Sepharose 4 FF 上分离或者通过亲水性滤膜过滤导致 Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 从埃博拉病毒核蛋白中纯化。3. 使得温育步骤从 2 小时延长至过夜导致残留的核蛋白从< 5%进一步减少至< 1%。通过亲水性滤膜的过滤可减少需要的温育时间而获得相同的结果。

因此, 可以通过在至少 2M NaCl、优选至少 3M NaCl、更优选 5M NaCl 中温育而从表达核酸结合蛋白如核蛋白, 例如埃博拉病毒核蛋白的重组病毒中除去这些蛋白质, 从而纯化成批的这种病毒。

实施例 4: 测试用于澄清的不同滤膜

将 PER. C6 细胞在 10L 生物反应器中生长,并在独立实验中用不同的重组腺病毒感染。在感染后 2.5 天,将细胞用 1% Triton® X-100 裂解,30 分钟后加入 Benzonase®(50 单位/ml)和 $MgCl_2$ 并再温育 30 分钟。将收获物用于澄清实验。

深层滤膜例如 Clarigard 和 Polygard 滤膜具有高度回收(>90%)及良好的除去细胞碎片能力(显微镜分析),发现其可适合用作初始的澄清滤膜。然而,过滤物看起来仍然是乳白色的。

发现 Millistak DE 30/60 和 CE50 不太适合用于过滤 T/B 收获物,因为会丧失病毒(20—45%)。在后来的级分中,产量增加但乳白色的渗余物降低,表明达到过滤容量。

对一些滤膜进行测试以进一步澄清通过 Clarigard 过滤产生的过滤物;例如 Milligard 0.5 μm 、1.2 μm 和 1.2/0.22 μm , Durapore 0.22 和 0.65 μm , Lifegard 1.0 和 2.0 μm (全部 Millipore) 和 Sartopore-2 0.8/0.45 μm (Sartorius)。Sartopore 2 滤膜在这些测试的滤膜中是唯一具有乳白色物良好滞留、高容量(> 20 ml/cm²)以及高病毒产量(> 95%)的滤膜。

将澄清的收获物使用平板筛(flatscreen)或者中空纤维模块浓缩和渗滤。测试一些滤膜过滤终渗余物的情况,优选 0.45 μm 孔径,以使得终渗余物适于层析,所述滤膜例如: Millipack 20, Lifegard 1.0 μm , Polygard 0.6 μm , Intercept Q、Milligard 1.2/0.5 μm 。同样, Sartopore 2 滤膜是测试的那些滤膜中唯一具有乳白色物良好滞留、高容量以及高病毒产量(> 95%)的滤膜。

尽管这些实验使用 T/B 收获物进行,但随后的实验证实上述结果也同样产生于根据本发明的 B/T 收获物,因此使用本发明的方法, Sartopore 2 滤膜提供非常好的结果。

因此,对于本发明方法中的澄清步骤,优选使用 0.8 μm 和 0.45 μm 滤膜的组合,优选使用 Sartopore 2 滤膜。

实施例5：不同的重组腺病毒的产生和纯化

使用本发明的方法纯化各种重组腺病毒。这些病毒可例如根据本领域已知的方法，通过在包装细胞中基因组的左侧端部分（有时称作“衔接子质粒(adapter-plasmid)”，用于方便地克隆转基因）和右侧端部分的同源重组而产生，例如 EP 0955373、WO 03/104467 和 WO 2004/001032 所述。病毒可以在本领域已知的包装细胞中增殖，这些包装细胞例如为 293 细胞、PER.C6™ 细胞(例如在 ECACC 中以保藏号 96022940 保藏的细胞，见美国专利 5,994,128 所述)或者表达 Ad35 的 E1B 55K 蛋白的 PER.E1B55K 细胞(见美国专利 6,492,169 所述)。根据本发明的方法纯化的重组腺病毒的构建在这个实施例中描述。

具有埃博拉病毒转基因的腺病毒

pAdapt.Ebola NP 的产生

使用正向引物 6401 5' GCA CCG GTG CCG CCA TGG ATT CTC GTC CTC A 3' (SEQ. ID. NO. 1)和反向引物 6401 5' GCG CTA GCT CAC TGA TGA TGT TGC AG 3' (SEQ. ID. NO. 2)，将编码埃博拉病毒 Zaire 亚型核蛋白的基因通过聚合酶链反应扩增，以导入限制性核酸内切酶识别位点和最佳翻译起始的共有序列(Kozak M, 1987, At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol. 20: 947-950)，以在 pAdApt™中定向克隆(见 EP 0955373)。PCR 反应在 Biometra T1 或 T3 热循环仪中进行，使用 10μm 每种引物、0.75μl VRC6401 的微量制备的 DNA(见 WO 03/028632)、1.5 单位 *Pwo* DNA 聚合酶、5μl 10×PCR 缓冲液、0.5μl 20 mM dNTP，在如下条件下进行反应：1个循环：5' 94℃、1' 50℃、4' 72℃；5个循环：1' 94℃、1' 50℃、4' 72℃；20个循环：1' 94℃、1' 62℃、4' 72℃；1个循环：1' 94℃、1' 62℃、10' 72℃。随后将正确

大小的 PCR 产物用 *PinA* I(*Age* I 的同切点酶)消化, 连接进用 *PinA* I 和 *Hpa* I 消化的 pAdApt™载体中。在将片段在室温连接 2 小时后, 将 50%的混合物通过热激转化方法转化至大肠杆菌 DH5α T1R 细胞, 并铺板于补加了 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。挑取 20 个菌落并在补加了氨苄青霉素的 LB 中在 37℃ 生长过夜。微量制备的 DNA 使用 Qiagen miniprep Spin 试剂盒根据厂商指导进行提取。在用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行限制酶分析之后, 选择正确的克隆, 通过 DNA 序列分析进一步检测。

pAdapt.Ebola GP(Z)的产生

使用正向引物 6001(5' CCC AAG CTT GCC GCC ATG GGC GTT ACA GG 3') (SEQ. ID. NO.3)和反向引物 6001(5' GGC TCT AGA TTA CTAAAA GAC AAA TTT GC 3') (SEQ. ID. NO. 4), 将编码埃博拉病毒 Zaire 亚型全长糖蛋白的基因通过 PCR 扩增。PCR 反应在 Biometra T1 或 T3 热循环仪中进行, 使用 10μM 每种引物、100 ng 和 25 ng VRC6001 的 DNA (见 WO 03/028632)、1.5 单位 *Pwo* DNA 聚合酶、5μl 10×PCR 缓冲液、0.5μl 20 mM dNTP, 在如下条件下进行反应: 1 个循环: 5' 94℃、1' 55℃、4' 72℃; 5 个循环: 1' 94℃、1' 55℃、4' 72℃; 20 个循环: 1' 94℃、1' 64℃、4' 72℃; 1 个循环: 1' 94℃、1' 64℃、10' 72℃。随后将正确大小的 PCR 产物用 *Hind* III 和 *Xba* I 消化, 连接进同样消化的 pAdApt™载体中。在室温将片段连接 2 小时后, 将 50%的混合物通过热激转化方法转化至大肠杆菌 DH5α T1R 细胞, 并铺板于补加 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。挑取菌落并在 37℃ 在补加氨苄青霉素的 LB 平板上生长过夜。微量制备的 DNA 使用 Qiagen miniprep Spin 试剂盒根据厂商指导进行提取。在用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行限制酶分析后, 选择正确的克隆并通过 DNA 序列分析进一步检测。

pAdapt.Ebola GPdTM (Z) 和 pAdapt.Ebola GPdTM (S) 的产生

如上述相似地将编码缺失 C 末端 29 个氨基酸的长跨膜结构域的埃博拉病毒 Zaire 亚型和 Sudan/Gulu 糖蛋白的密码子优化的序列(分别为 GPdTM (Z)和 GPdTM (S), 也见 WO 03/028632 所述)克隆进 pAdapt 中。

具有埃博拉病毒转基因的重组腺病毒的产生

将具有不同插入体的 pAdapt 质粒(pAdapt.Ebola NP、pAdapt.Ebola GP (Z)、pAdapt.Ebola GPdTM (S)、pAdapt.Ebola GPdTM (Z)), 用于通过与包含腺病毒 5 型基因组的剩余部分的质粒(质粒 pWE/Ad.AflII-rITRsp Δ E3, 其是在 E3 区域(XbaI 区域)具有 1878 bp 缺失的 pWE/Ad.AflII-rITRsp (见 EP 0955373), 其用于腺病毒基因组的右端)根据熟知的方法(例如 EP 0955373 所述方法)进行同源重组形成重组腺病毒, 产生分别称作 Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP、Ad5dE3x.Adapt.Ebo.GP(Z)、Ad5dE3x.Adapt.Ebo.GPdTM(S) 和 Ad5dE3x.Adapt.Ebo.GPdTM (Z)的病毒。当然, 所述转基因可以相似地克隆进不同血清型的腺病毒载体中, 如克隆进 Ad35 中, 产生衍生自那些血清型的重组腺病毒(见例如 WO 00/70071 所述)。

具有疟原虫转基因的腺病毒

pAdapt.CS.PFalc 和 pAdapt535.CS.Pfalc 的产生

如 WO 2004/055187 所述, 合成恶性疟原虫的密码子优化的环孢子孢子(CS)基因并克隆进 pCR-script (Stratagene)中, 产生克隆 02-659。将 CS 基因克隆进 pAdapt 和 pAdapt535(见 WO2004/001032)中, 以分别产生重组 Ad5 和重组 Ad35 载体。将克隆 02-659 和两种 pAdapt 载体均用 *Hind* III 和 *Bam*HI 消化并连接。在室温将片段连接 2 小时后,

将 50%的混合物通过热激转化方法转化至大肠杆菌 DH5 α T1R 细胞,铺板于补加了 50 μ g/ml 氨苄青霉素 LB 琼脂上。挑取菌落并在补加氨苄青霉素的 LB 中在 37 $^{\circ}$ C 生长。微量制备的 DNA 使用 Qiagen miniprep Spin 试剂盒进行提取。在用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行限制酶分析后,选择正确的克隆并通过 DNA 序列分析进一步检测。

如下产生具有恶性疟原虫 CS 基因的重组腺病毒血清型 5 (见例如 EP 0955373 所述,也见于 WO 2004/055187 所述)。将 pAdapt.CS.Pfalc 用 *Pac*I 限制酶消化以释放 Ad 基因组的左端部分。含有 Ad5 基因组右端部分的质粒 pWE/Ad.AflII-rITRsp Δ E3 在 E3 区域缺失 1878 bp (*Xba*I 缺失),并且也用 *Pac*I 消化。将消化的构建体共转染进如在 ECACC 中以保藏号 96022940 保藏的 PER.C6 细胞中。基于重叠序列的同源重组,形成称作 Ad5 Δ E3.CS.Pfalc 的重组病毒。

相似地产生具有恶性疟原虫 CS 基因的重组腺病毒血清型 35,但是现在 *Pac*I 消化的 pAdapt535.CS.Pfalc 用作病毒基因组的左端,NotI-消化的 pWE.Ad35.pIX-rITR Δ E3 (见 WO 2004/001032)用作病毒基因组的右端,将这两个载体均转染进 PER-E1B55K 生产细胞 (具有衍生自 Ad35 的 E1B-55K 序列;细胞已经在美国专利 6,492,169 中描述)中。基于重叠序列的同源重组,形成称作 Ad35 Δ E3.CS.Pfalc 的重组病毒。当然,也可以将 Ad35 病毒主干(backbone)中的 E4-orf6 蛋白改变为 Ad5 的 E4-orf6,以使得这种病毒可以在表达 Ad5 的 E1B 蛋白的包装细胞如 PER.C6 或者 293 细胞上繁殖(见 WO 03/104467)。

Ad5 Δ E3.CS.Pfalc 和 Ad35 Δ E3.CS.Pfalc 根据本发明的方法纯化。

另外,基于具有 Ad35 主干的 pAdapt535.CS.Pfalc,构建了具有 CS 基因的 Ad35 载体,其在 E3 中有缺失并另外包含 Ad5 的 E4-orf6,这个载体进一步称作 Ad35.CS。

将一些腺病毒载体在 2–20L 规模用所述方法纯化(实施例 1,图 4): Ad5 Δ E3x.Adapt.Ebo.GPdTM(Z)、Ad5 Δ E3x.Adapt.Ebo.GPdTM(S)、

Ad5dE3x.Adapt.Ebo.NP 和 Ad5dE3x.Adapt.Empty。对终产物(Filled and Finished, F&F)通过反向和 SDS-PAGE 分析纯度,发现被纯化为接近同质(homogeneity)(除了在具有埃博拉病毒核蛋白作为转基因的载体制备物中存在埃博拉病毒核蛋白之外)。残留的宿主细胞 DNA 的量通过 Q-PCR 测定,并且低于 100 pg DNA/1E11 VP (如表 1 所示)。

通过在 320 和 260 nm 测定光密度及通过圆盘离心而测定聚集。无一批次示出聚集。在所有批次中均通过低于 10 的 VP/IU 比率示出潜力,在 A549 细胞中示出转基因表达。

根据规模,最终产量范围是 20—50%: 2L: 24—26% (n=2); 10 L: 30—37% (n=3); 20L: 46%(n=1)。

实施例 6: 使用阴离子交换层析与使用带电滤膜纯化 Ad35

将 PER. C6 细胞在搅拌罐中生长至细胞密度为大约 1 百万个细胞/ml。用 Ad35.CS 载体感染细胞, MOI 为 40。在病毒产生 4 天后,将感染的细胞培养物如实施例 1 所述用 Benzonase 和 Triton X-100 处理(B/T 方法)。如实施例 1 所述澄清 B/T 收获物。将澄清的收获物通过 TFF 浓缩 5 倍(使用 0.05 μ m 中空纤维),随后用 10 个渗滤体积的 0.1 M NaCl、0.05% PS80、50 mM Tris pH 7.5 渗滤。将浓缩和渗滤的渗余物经 0.45 μ m 滤膜过滤,加样于捕获柱或滤膜上。作为一个捕获步骤,测试 Q-XL 柱(3 ml 柱, 15 cm 柱床高度)或者 Sartobind 75 滤膜(含有阴离子基团的带电滤膜, Sartorius)。将结合的成分在基于 TRIS 的缓冲液中以 0—1 M NaCl 梯度洗脱。带电滤膜的洗脱模式示出在梯度开始处的一个额外峰,其与 Ad35 峰分离。与 Q-XL 树脂、0.39 M NaCl (从 0.19 开始,以 0.53 M NaCl 结束)相比,Ad35 病毒峰在较高盐浓度 0.44 M NaCl (从 0.41 开始,以 0.49 M NaCl 结束)以更尖锐的峰洗脱自带电滤膜。将洗脱级分通过 SDS-PAGE、HPLC-AEX、圆盘离心和 TCID₅₀ 分析。

当通过 HPLC-AEX 层析和圆盘离心分析时，额外峰未表现是完整的 Ad35 病毒颗粒(图 11)。对层析级分进行 SDS-PAGE 分析示出如下结果(图 12)：在两种实验中均未观测到蛋白质或者观测到极低量蛋白质。带电滤膜层析的额外峰示出一些但非全部的 Ad35 蛋白质。在额外峰中，病毒蛋白质 IIIa、V、VI 和 VII 看起来不见了，而病毒蛋白质 II、III、IV 和 52.55k 存在。

从这些分析中可以推断带电滤膜可以从完整的病毒颗粒中分离出病毒蛋白质，而 Q-XL sepharose 不能。如果未发生分离，则很可能不能被如 RP-HPLC 或 SDS-PAGE 等评估纯度的测定检测到，因为在额外峰中存在的所有蛋白质也均存在于完整的病毒粒中。

表 1: 通过将 T/B 颠倒为 B/T 收获方法, 在纯化的产物样品中残余宿主细胞 DNA 的量的减少。收获物在 2-20L 规模纯化。详细描述参见实施例 1。

实验	载体	收获方法	宿主细胞 DNA ng/ml	VP/ml HPLC-AEX	ng HC DNA/ 1E11 VP
1	Ad5.MV-H	T/B	0.41	5.40E+10	0.78
2	Ad5dE3x.Adapt.Ebo .GPdTM (Z)	T/B	4.31	5.25E+11	0.82
3	Ad5dE3x.Adapt.Ebo .NP	B/T	0.46	7.80E+11	0.06
4	Ad5dE3x.Adapt.Ebo .NP	B/T	0.44	6.80E+11	0.07
5	Ad5dE3x.Adapt.Emp ty	B/T	0.40	8.90E+11	0.04
6	Ad5dE3x.Adapt.Ebo .NP	B/T	0.25	4.66E+11	0.05
7	Ad5dE3x.Adapt.Ebo .GPdTM (S)	B/T	0.55	6.60E+11	0.08
8	Ad5dE3x.Adapt.Ebo .GPdTM (Z)	B/T	0.15	6.60E+11	0.02
9	Ad353.CS	B/T	0.62	5.15E+11	0.12

表 2: 在不同离子强度下和不同温育时间后的 NP 清除。详细描述参见实施例 3。

	2 小时	过夜
1 M NaCl	-	-
2 M NaCl	-	+
3 M NaCl	+/-	+
5 M NaCl	+	++

序列表

<110>	克鲁塞尔荷兰公司	
<120>	病毒纯化方法	
<130>	0100 WO 00 ORD	
<160>	4	
<170>	PatentIn version 3.2	
<210>	1	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer forward 6401	
<400>	1	
	gcaccggtgc cgccatggat tctcgtcctc a	31
<210>	2	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer reverse 6401	
<400>	2	
	gcgctagctc actgatgatg ttgcag	26
<210>	3	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer forward 6001	
<400>	3	
	cccaagcttg ccgcatggg cgttacagg	29
<210>	4	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	primer reverse 6001	
<400>	4	
	ggctctagat tactaaaaga caaatttgc	29

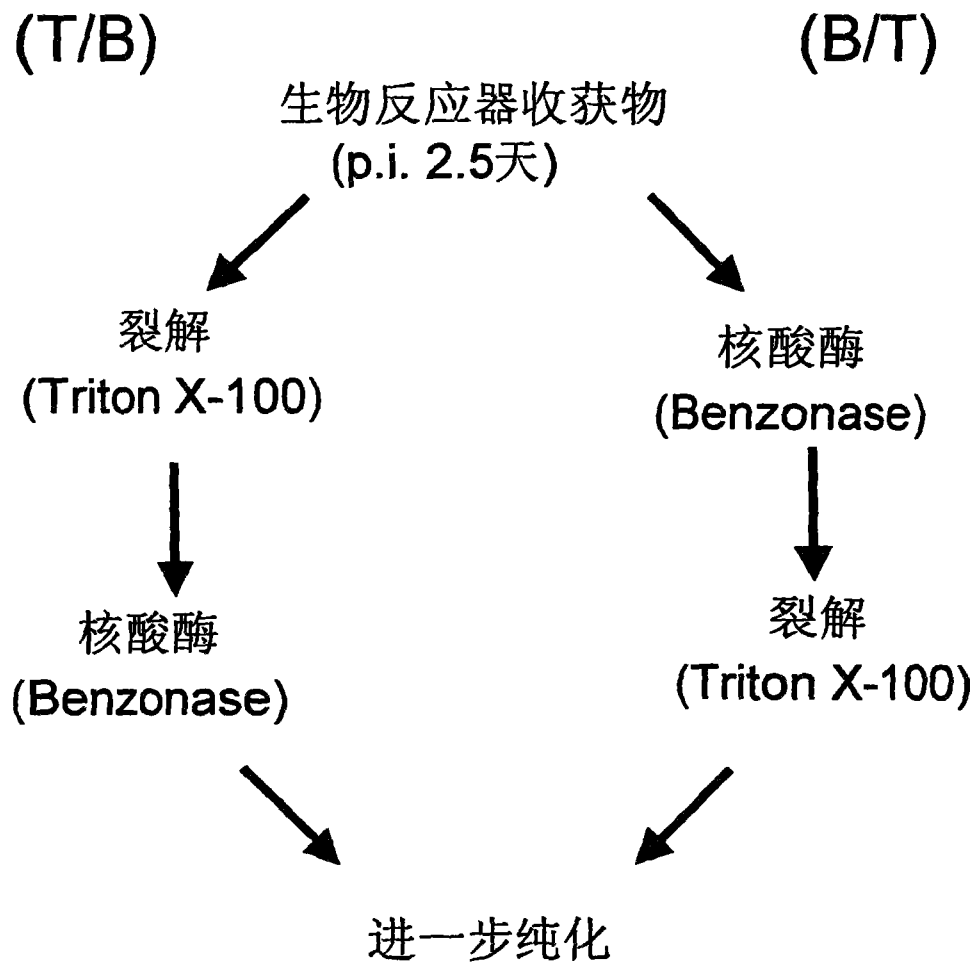


图1

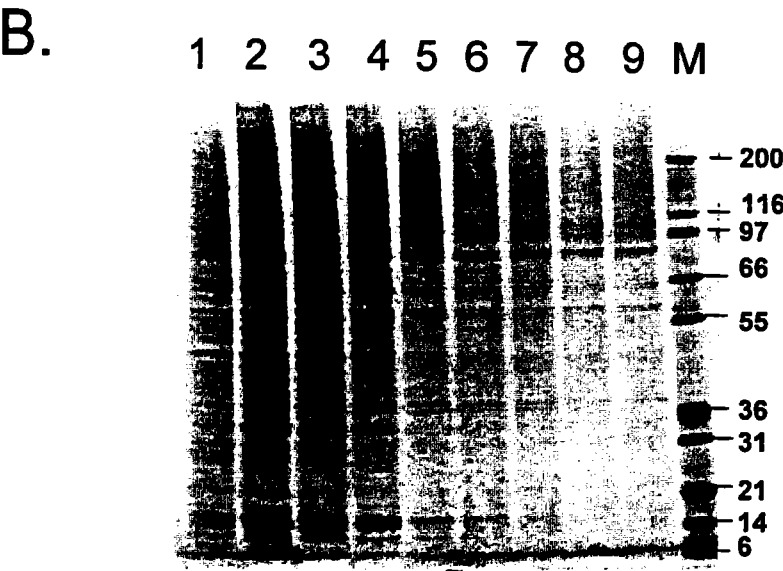
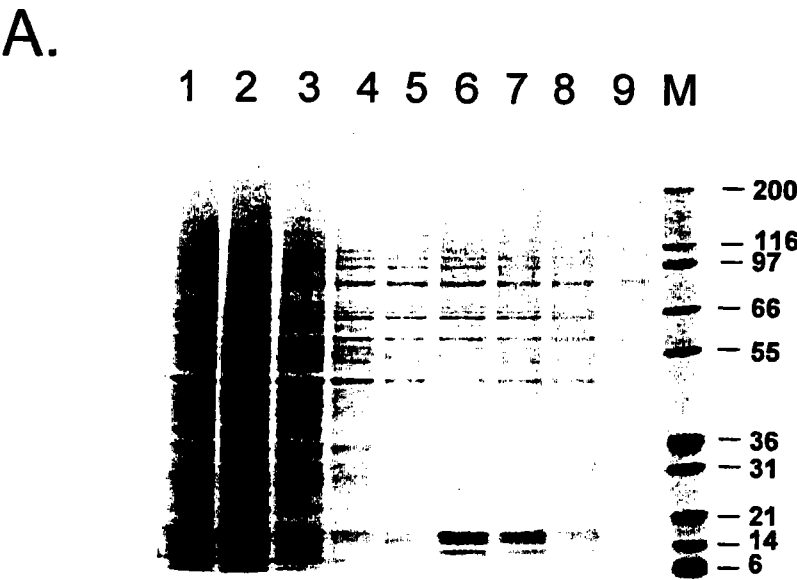


图3

**图4**

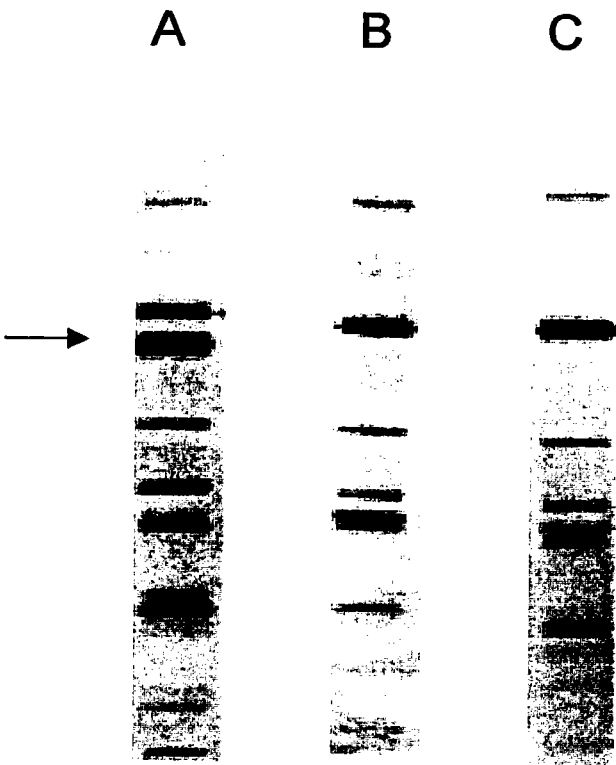


图5

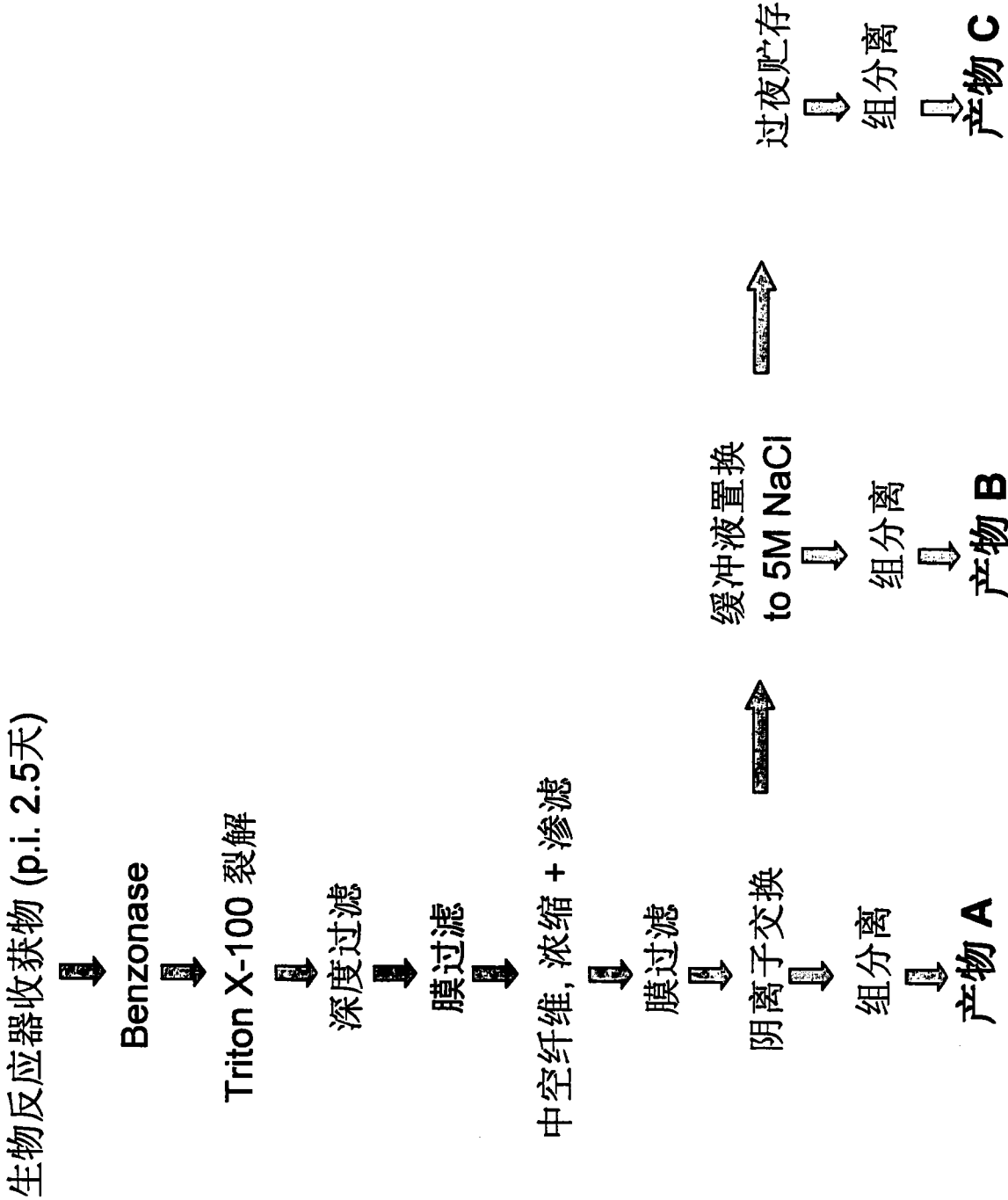


图6

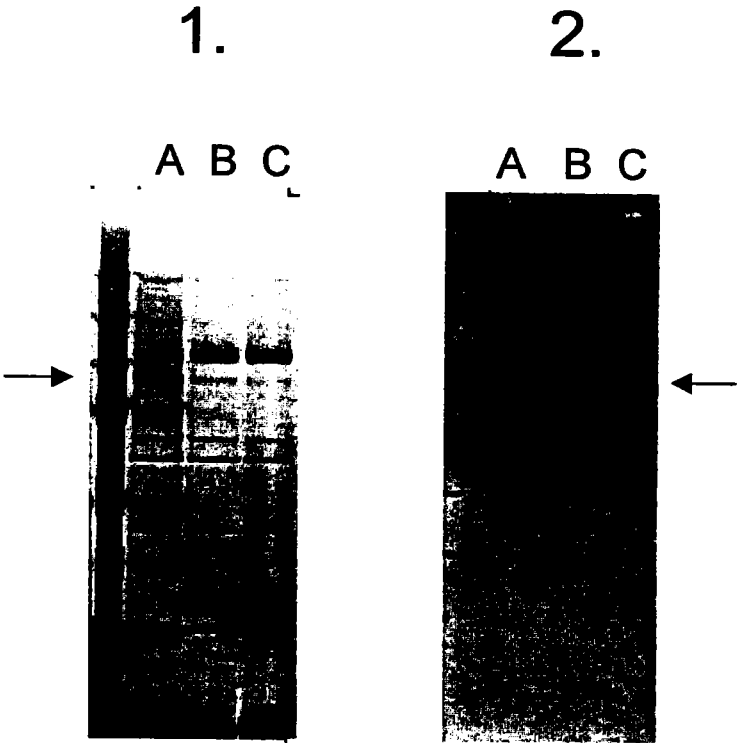


图7

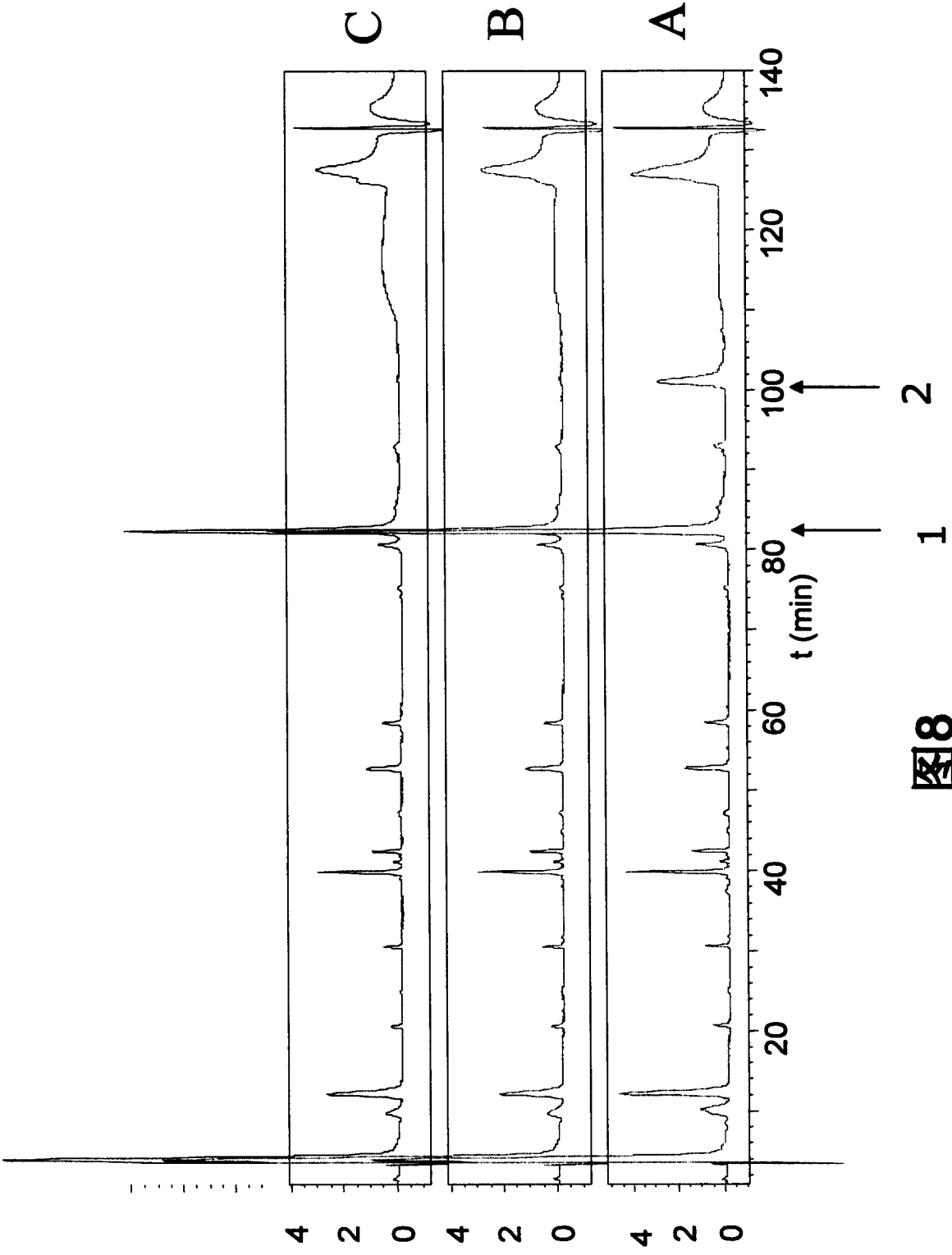


图8

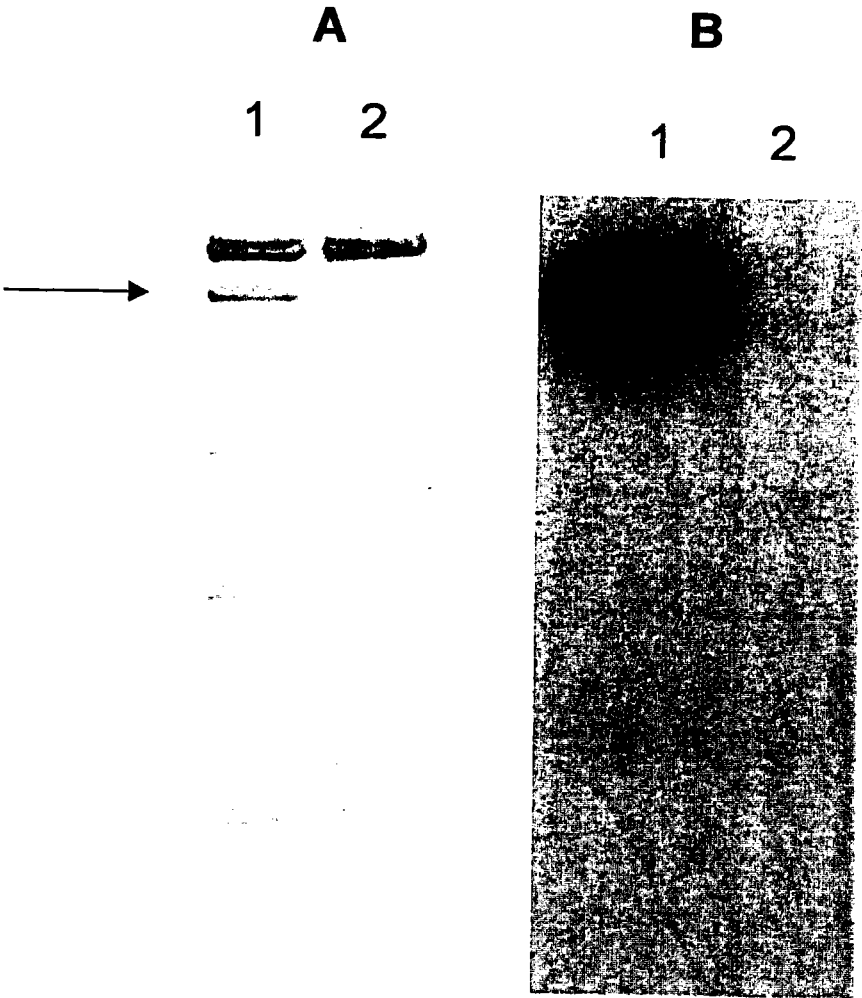


图9

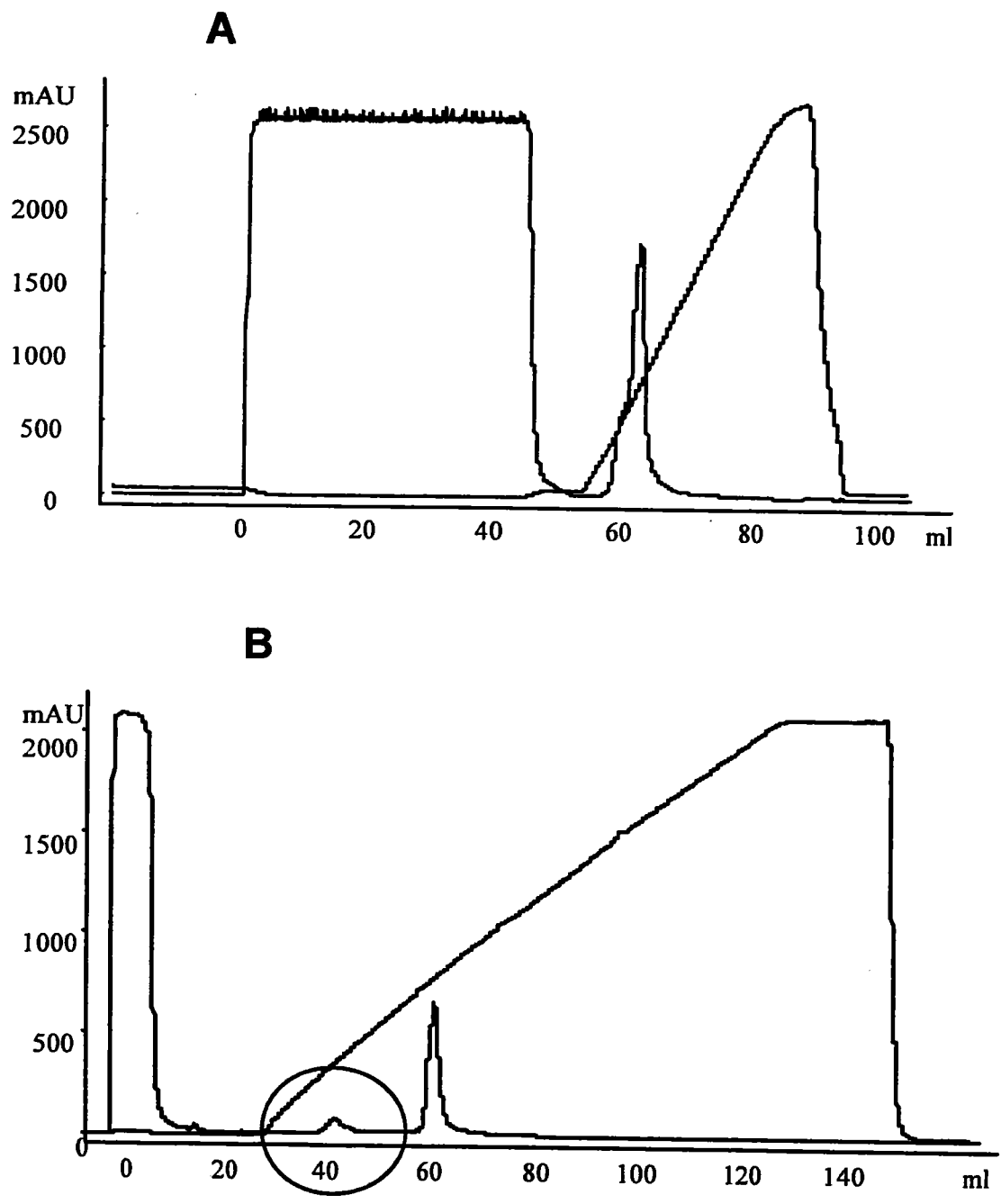


图10

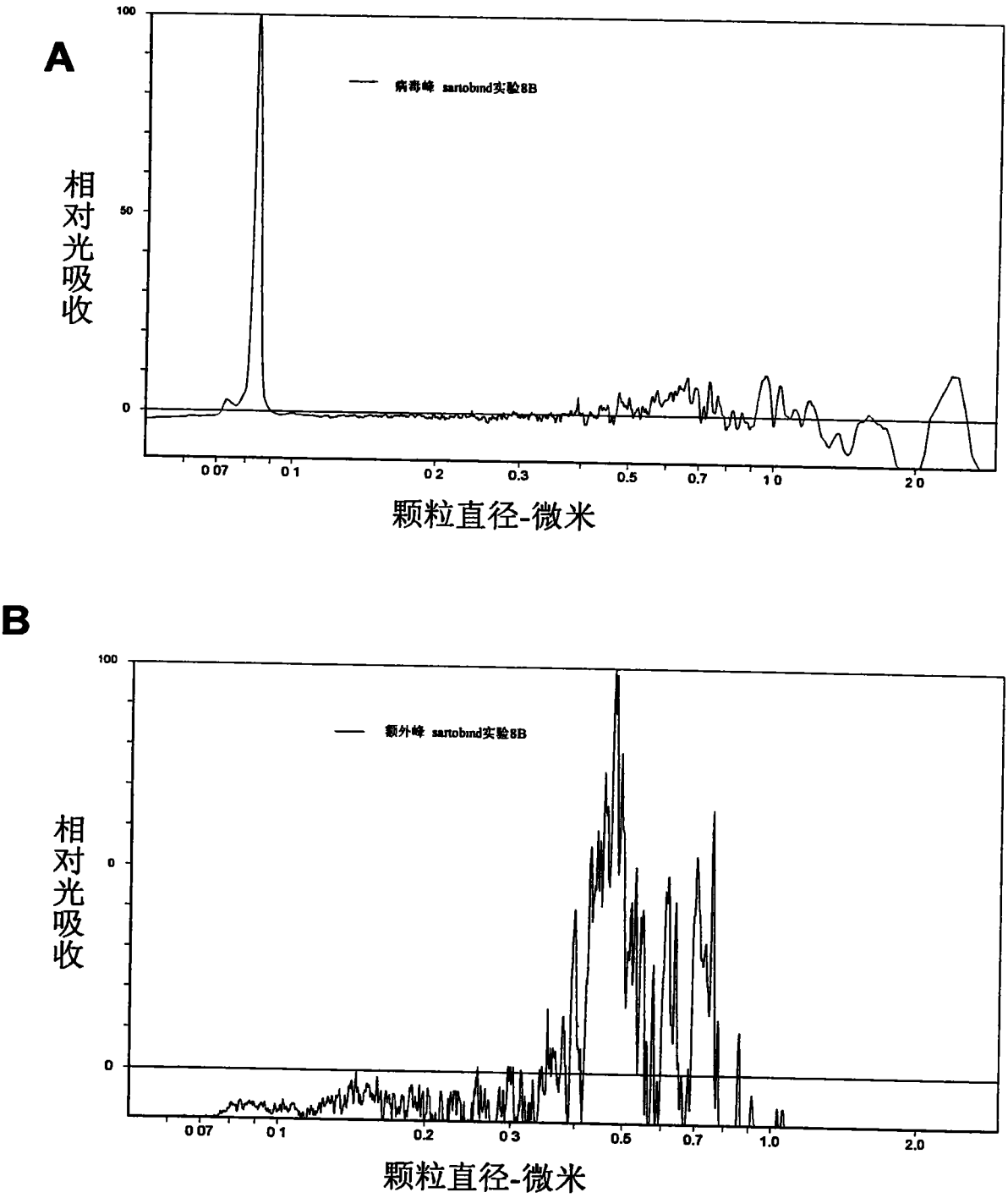


图11

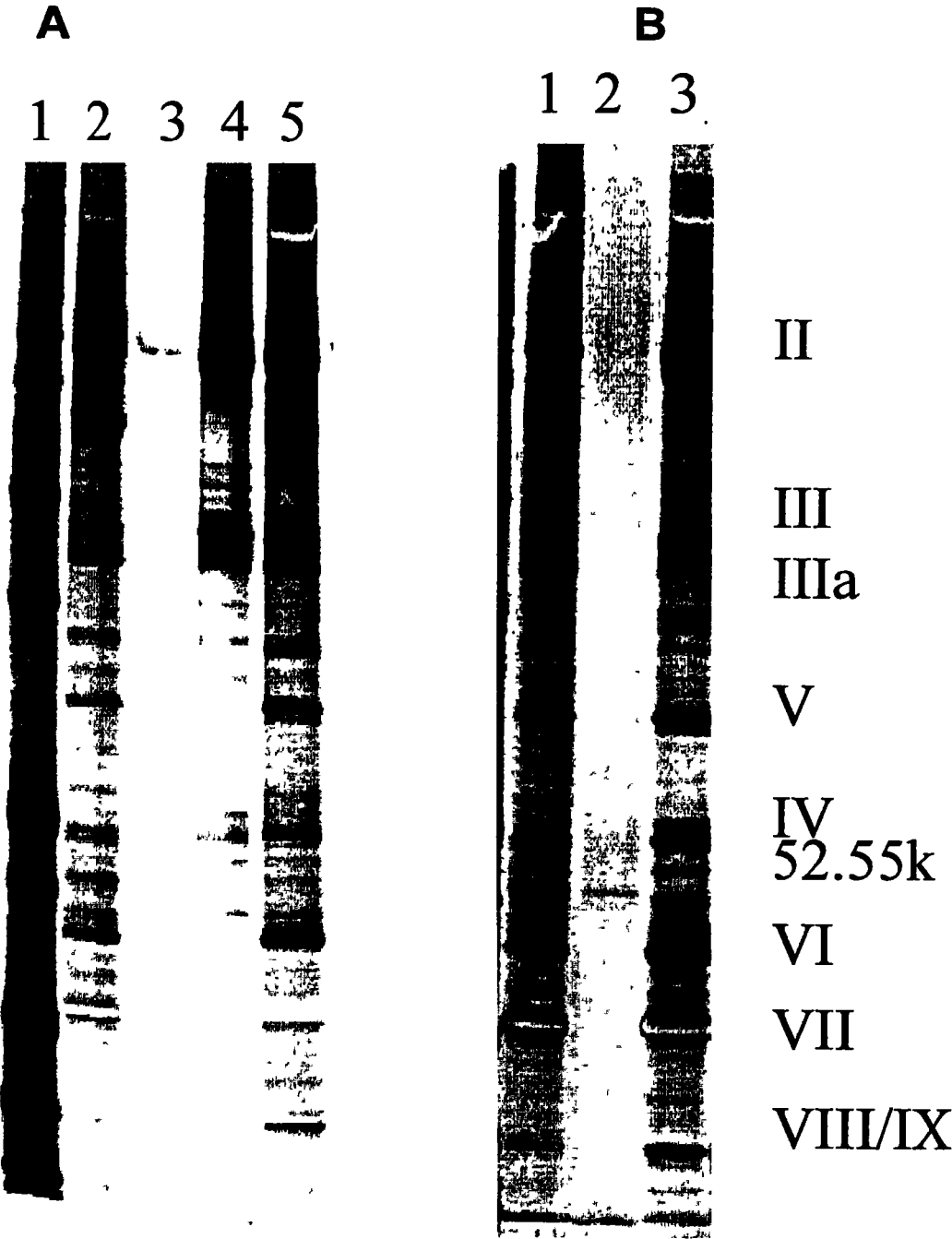


图12