



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103492557 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201280020376. 8

(22) 申请日 2012. 04. 27

(30) 优先权数据

61/480561 2011. 04. 29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2012/000406 2012. 04. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/145837 EN 2012. 11. 01

(73) 专利权人 昂科利蒂克斯生物科技公司

地址 加拿大艾伯塔省

(72) 发明人 M. C. 科菲 A. 黑格尔曼

R. 卡帕迪亚 S. 塞尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 林毅斌 黄希贵

(51) Int. Cl.

C12N 7/02(2006. 01)

B01D 15/08(2006. 01)

C12M 3/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 100374551 C, 2008. 03. 12,

CN 101098959 A, 2008. 01. 02, 全文.

W0 2008006780 A1, 2008. 01. 17, 全文.

W0 03093463 A1, 2003. 11. 13, 全文.

Bernard G. Huyghe 等. Purification of a type-5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography. 《Human Gene Therapy》. 1995, 第 6 卷(第 11 期), 摘要, 第 1404 页左栏第 4 段-右栏倒数第 3 段, 第 1408 页左栏第 3 段.

Bernard G. Huyghe 等. Purification of a type-5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography. 《Human Gene Therapy》. 1995, 第 6 卷(第 11 期), 摘要, 第 1404 页左栏第 4 段-右栏倒数第 3 段, 第 1408 页左栏第 3 段.

宋宗明等. 柱层析法制备乙型肝炎纯化疫苗的研究. 《微生物学免疫学进展》. 2004, 第 32 卷(第 03 期), 第 9-11 页.

审查员 赵硕

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

使用凝胶渗透色谱法纯化病毒的方法

(57) 摘要

本文提供了用于使用凝胶渗透色谱法纯化病毒的洗脱缓冲液和方法。所述方法可用于例如增大病毒从凝胶渗透色谱柱上的回收率。用于所述方法中的缓冲液包括至少一种选自组氨酸或蔗糖、二价阳离子、非离子型洗涤剂 and 磷酸盐缓冲盐水的赋形剂。

1. 一种纯化病毒的方法,其包括:

使凝胶渗透色谱柱与包含病毒和液体载体的病毒制品接触,其中所述病毒保留在所述凝胶渗透色谱柱上;以及

用包含至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水的洗脱缓冲液从所述凝胶渗透色谱柱上回收所述病毒,

其中所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖,

其中当至少一种赋形剂包含蔗糖时,所述洗脱缓冲液还包含非离子型洗涤剂。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述液体载体为洗脱缓冲液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述至少一种赋形剂包含甘露糖醇或山梨糖醇中的一者或多者。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述二价阳离子为 Mg^{2+} 。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中 Mg^{2+} 以氯化镁形式存在。

6. 根据权利要求 1 的方法,其中所述磷酸盐缓冲盐水包含一种或多种磷酸盐与一种或多种氯盐的组合。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述一种或多种磷酸盐包含磷酸二钠。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法,其中所述一种或多种磷酸盐包含磷酸二氢钾。

9. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述一种或多种氯盐包含氯化钠。

10. 根据权利要求 6 或 9 所述的方法,其中所述一种或多种氯盐包含氯化钾。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述非离子型洗涤剂为聚山梨酯 80。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述洗脱缓冲液包含甘露糖醇、组氨酸、山梨糖醇、聚山梨酯 80 和 $MgCl_2$, 并且其中所述磷酸盐缓冲盐水包含磷酸二钠、磷酸二氢钾、氯化钠和氯化钾。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述洗脱缓冲液包含蔗糖、聚山梨酯 80 和 $MgCl_2$, 并且其中所述磷酸盐缓冲盐水包含磷酸二钠、磷酸二氢钾、氯化钠和氯化钾。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包括将所述病毒储存在所述洗脱缓冲液中。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述病毒为溶瘤病毒。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述病毒为非包膜病毒。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述病毒为呼肠孤病毒。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述呼肠孤病毒为哺乳动物呼肠孤病毒。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述哺乳动物呼肠孤病毒为人呼肠孤病毒。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述人呼肠孤病毒为血清 3 型病毒。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述血清 3 型病毒为 Dearing 株。

22. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述呼肠孤病毒为重组或重排呼肠孤病毒。

23. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述呼肠孤病毒为 IDAC #190907-01。

24. 一种装置,其包括:

凝胶渗透色谱柱;以及

洗脱缓冲液,

其中所述洗脱缓冲液包含至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水,并且

其中所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖,

其中当至少一种赋形剂包含蔗糖时,所述洗脱缓冲液还包含非离子型洗涤剂。

25. 根据权利要求 24 所述的装置,其中所述凝胶渗透色谱柱用所述缓冲液平衡。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的装置,其进一步包括包含病毒和液体载体的病毒制品。

27. 一种洗脱缓冲液,其包含:

至少一种赋形剂;

二价阳离子;

非离子型洗涤剂;以及

磷酸盐缓冲盐水,

其中所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖,并且

其中所述洗脱缓冲液为凝胶渗透色谱洗脱缓冲液。

28. 一种洗脱缓冲液,其包含:

蔗糖;

MgCl₂;

聚山梨酯 80;以及

磷酸盐缓冲盐水,

其中所述洗脱缓冲液为凝胶渗透色谱洗脱缓冲液。

29. 一种洗脱缓冲液,其包含:

甘露糖醇;

组氨酸;

山梨糖醇;

MgCl₂;

聚山梨酯 80;以及

磷酸盐缓冲盐水,

其中所述洗脱缓冲液为凝胶渗透色谱洗脱缓冲液。

30. 一种增大病毒从凝胶渗透色谱柱上的回收率的方法,其包括:

使凝胶渗透色谱柱与包含病毒和液体载体的病毒制品接触,其中所述病毒保留在所述凝胶渗透色谱柱上;以及

用包含至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水的洗脱缓冲液从所述凝胶渗透色谱柱上回收所述病毒,其中所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖,

其中所述病毒回收率比用磷酸盐缓冲盐水洗脱的病毒的回收率高至少约 20%,

其中当至少一种赋形剂包含蔗糖时,所述洗脱缓冲液还包含非离子型洗涤剂。

31. 权利要求 1 的方法,其中当至少一种赋形剂包含组氨酸时,所述洗脱缓冲液还包含非离子型洗涤剂。

使用凝胶渗透色谱法纯化病毒的方法

[0001] 优先权申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 4 月 29 日提交的美国临时申请第 61/480,561 号的优先权,该美国临时申请全文以引用的方式并入本文。

[0003] 背景

[0004] 病毒制造包括使用例如诸如凝胶渗透色谱法的色谱方法纯化病毒的步骤。虽然色谱方法是纯化病毒的有效方式,但是这些方法可能会导致病毒在色谱柱上遭到大量损失。因此,使用此类方法的病毒制造成本可能是相当高的。

[0005] 概述

[0006] 本文提供了用于使用凝胶渗透色谱法纯化病毒的洗脱缓冲液和方法。该方法可用于例如在病毒制造期间增大病毒从凝胶渗透色谱柱上的回收率。

[0007] 本文所描述的纯化病毒的方法包括使凝胶渗透色谱柱与包含病毒和液体载体的病毒制品接触,其中病毒保留在凝胶渗透色谱柱上,以及用包含至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水的洗脱缓冲液从凝胶渗透色谱柱上回收病毒。在这些方法中,所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖。液体载体任选地为洗脱缓冲液。任选地,所述至少一种赋形剂包含甘露糖醇或山梨糖醇中的一者或多者。二价阳离子任选地为 Mg^{2+} 。任选地, Mg^{2+} 以氯化镁形式存在。

[0008] 磷酸盐缓冲盐水可包括一种或多种磷酸盐与一种或多种氯盐的组合。任选地,所述一种或多种磷酸盐包括磷酸二钠和 / 或磷酸二氢钾。任选地,所述一种或多种氯盐包括氯化钠和 / 或氯化钾。

[0009] 洗脱缓冲液可进一步包括非离子型洗涤剂,例如,聚山梨酯 80。任选地,洗脱缓冲液包括甘露糖醇、组氨酸、山梨糖醇、聚山梨酯 80 和 $MgCl_2$, 并且磷酸盐缓冲盐水包括磷酸二钠、磷酸二氢钾、氯化钠和氯化钾。任选地,洗脱缓冲液包括蔗糖、聚山梨酯 80 和 $MgCl_2$, 并且磷酸盐缓冲盐水任选地包括磷酸二钠、磷酸二氢钾、氯化钠和氯化钾。

[0010] 包括在本文所描述的病毒制品中的病毒可以为,例如,溶瘤病毒和 / 或非包膜病毒。本文提供了病毒制品,其中病毒为呼肠孤病毒,例如哺乳动物呼肠孤病毒。哺乳动物呼肠孤病毒的实例为人呼肠孤病毒,例如血清 3 型病毒(例如, Dearing 株呼肠孤病毒)。呼肠孤病毒任选地为重组的呼肠孤病毒、重排 (reassorted) 的呼肠孤病毒,或 IDAC#190907-01。本文还描述了根据这些方法制备的纯化的病毒制剂。本文所描述的方法可进一步包括将病毒储存在洗脱缓冲液中。

[0011] 本文还提供了包括凝胶渗透色谱柱和洗脱缓冲液的装置。洗脱缓冲液包括至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水,并且所述至少一种赋形剂包括组氨酸或蔗糖。凝胶渗透色谱柱任选地用所述缓冲液平衡。任选地,所述装置进一步包括包含病毒和液体载体的病毒制品。

[0012] 本文进一步提供了纯化的病毒制剂,其包括从凝胶渗透色谱柱上洗脱的病毒及与凝胶渗透色谱介质接触的洗脱缓冲液。在一些实例中,洗脱缓冲液包含至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水,并且所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖。

[0013] 本文还提供了凝胶渗透色谱洗脱缓冲液。在一些实例中,洗脱缓冲液可包括至少一种赋形剂、二价阳离子、非离子型洗涤剂 and 磷酸盐缓冲盐水。在一些实例中,至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖,并且洗脱缓冲液为凝胶渗透色谱洗脱缓冲液。任选地,洗脱缓冲液包括蔗糖、MgCl₂、聚山梨酯 80 和磷酸盐缓冲盐水。任选地,洗脱缓冲液包括甘露糖醇、组氨酸、山梨糖醇、MgCl₂、聚山梨酯 80 和磷酸盐缓冲盐水。

[0014] 本文进一步提供了增大病毒从凝胶渗透色谱柱上的回收率的方法。所述方法包括使凝胶渗透色谱柱与包含病毒和液体载体的病毒制品接触,其中病毒保留在凝胶渗透色谱柱上,以及用包含至少一种赋形剂、二价阳离子和磷酸盐缓冲盐水的洗脱缓冲液从凝胶渗透色谱柱上回收病毒,其中所述至少一种赋形剂包含组氨酸或蔗糖。在这些方法中,病毒回收率比用磷酸盐缓冲盐水洗脱的病毒的回收率高至少约 20%。任选地,病毒回收率比用磷酸盐缓冲盐水洗脱的病毒的回收率高至少约 25%(例如,比用磷酸盐缓冲盐水洗脱的病毒的回收率高至少约 30% 或比用磷酸盐缓冲盐水洗脱的病毒的回收率高至少约 35%)。

[0015] 一个或多个方面的细节在下面的描述中示出。根据该描述和权利要求书,其他特征、目的和优点将是明显的。

[0016] 详述

[0017] 本文描述了用于使用凝胶渗透色谱法纯化病毒的洗脱缓冲液和方法。凝胶渗透色谱法(即,凝胶过滤或尺寸排阻色谱法)是用于将混合物的组分根据它们的尺寸分离的扩散控制过程。本文所描述的凝胶渗透色谱洗脱缓冲液可用于,例如增大在病毒制造期间病毒从凝胶渗透色谱柱上的回收率。本文所描述的洗脱缓冲液包括一种或多种赋形剂、二价阳离子、非离子型洗涤剂 and 磷酸盐缓冲盐水。

[0018] 本文所提供的洗脱缓冲液包括至少一种赋形剂(例如,一种、两种、三种、四种或更多种赋形剂)。用于洗脱缓冲液中的赋形剂包括但不限于,糖和氨基酸。用于本文所描述的洗脱缓冲液中的合适糖的实例包括蔗糖。用于本文所描述的洗脱缓冲液中的合适氨基酸的实例包括组氨酸。任选地,本文所描述的洗脱缓冲液包括组氨酸或蔗糖中的至少一者。

[0019] 用于本文所描述的洗脱缓冲液中的合适糖包括,例如,单糖和二糖。在一些实例中,洗脱缓冲液包括蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇,或这些的组合。合适糖的进一步实例包括乳糖、右旋糖、果糖、葡萄糖和麦芽糖。任选地,洗脱缓冲液基本上不含海藻糖。基本上不含意指洗脱缓冲液可包括少于 0.1%、少于 0.01%、少于 0.001%、少于 0.0001%,或 0% 的海藻糖,以洗脱缓冲液的重量为基准。在一些实例中,洗脱缓冲液基本上不含除蔗糖以外的糖(即,洗脱缓冲液基本上不含非-蔗糖多元醇)。

[0020] 用于洗脱缓冲液中的糖可包括一种糖,或两种或更多种糖的组合。例如,洗脱缓冲液可包括蔗糖作为缓冲液中存在的糖。任选地,洗脱缓冲液可包括甘露糖醇或山梨糖醇中的一者或多者(例如,甘露糖醇与山梨糖醇的组合)作为缓冲液中存在的一种(多种)糖。洗脱缓冲液中存在的一种(多种)糖的总浓度可为 10 重量%或更少,以洗脱缓冲液重量为基准。例如,以洗脱缓冲液重量为基准,糖的总浓度可低于 7.5 重量%(例如,低于 7.4 重量%、低于 7.3 重量%、低于 7.2 重量%、低于 7.1 重量%、低于 7 重量%、低于 6 重量%、低于 5 重量%、低于 4 重量%、低于 3 重量%、低于 2 重量%,或低于 1 重量%,以洗脱缓冲液的重量为基准)。例如,以洗脱缓冲液的重量为基准,蔗糖可以以范围从 0.1 重量%至 5 重量%、从 1 重量%至 4.5 重量%、从 2 重量%至 4 重量%的浓度(例如,3 重量%),或所列举范围内的

任何量存在于洗脱缓冲液中。任选地,以洗脱缓冲液的重量为基准,甘露糖醇和山梨糖醇可以以低于 7.5% (例如,7%) 的组合浓度包括在洗脱缓冲液中。例如,以洗脱缓冲液的重量为基准,甘露糖醇可以以范围从 0.01% 至 7.4% (例如,从 0.1% 至 7%、从 1% 至 6%、从 2% 至 5%, 或从 3% 至 4%) 的浓度包括在其中,而山梨糖醇可以以范围从 0.01% 至 7.4% (例如,从 0.1% 至 7%、从 1% 至 6%、从 2% 至 5%, 或从 3% 至 4%) 的浓度包括在其中,使得糖的组合浓度低于 7.5%。

[0021] 氨基酸也可包括在本文所描述的洗脱缓冲液中。合适的氨基酸包括,例如,组氨酸、精氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、谷氨酸,或这些的混合物。以洗脱缓冲液重量为基准,一种或多种氨基酸可以以 5% 或更低的浓度存在于洗脱缓冲液中。例如,氨基酸浓度可为 4.5% 或更低、4.0% 或更低、3.5% 或更低、3.0% 或更低、2.5% 或更低、2.0% 或更低、1.5% 或更低、1.0% 或更低,或 0.5% 或更低。

[0022] 如本文所描述,二价阳离子也包括在本文所描述的洗脱缓冲液中。用于洗脱缓冲液中的合适的二价阳离子包括镁阳离子(即, Mg^{2+})。可将 Mg^{2+} 与阴离子组合以诸如 $MgCl_2$ 的盐形式引入到洗脱缓冲液中。在一些实例中,二价阳离子引入盐可为水合物(即,将二价阳离子引入到缓冲液中的盐可含有与金属中心结合或与络合物一起结晶的水分子)。水合物可为,例如,一水合物、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。例如,可将 Mg^{2+} 以 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 形式引入到洗脱缓冲液中。任选地,洗脱缓冲液基本上不含 Zn^{2+} 。二价阳离子可以以范围从 0.01mM 至 5mM 的浓度存在于洗脱缓冲液中。例如, Mg^{2+} 可以以范围从 0.1mM 至 4.5mM、0.5mM 至 4mM、1mM 至 3mM 的浓度(例如,2mM),或所列举范围内的任何浓度以 $MgCl_2$ 或 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 形式存在于病毒制剂中。任选地,排除磷酸盐缓冲盐水组分,洗脱缓冲液中的赋形剂可基本上不含一价阳离子盐,例如,含有钠 (Na^+)、锂 (Li^+)、钾 (K^+) 和铵 (NH_4^+) 的盐。

[0023] 洗涤剂也可包括在本文所描述的洗脱缓冲液中。洗涤剂是指具有亲水性部分与疏水性部分的组合的物质。用于本文所描述的洗脱缓冲液中的合适洗涤剂包括离子型和非离子型洗涤剂。在一些实例中,聚山梨酯 80 任选地以非离子型洗涤剂形式包括在洗脱缓冲液中。以洗脱缓冲液重量为基准,一种或多种洗涤剂可以任选地以低于 1 重量 % 的量存在于洗脱缓冲液中。例如,一种(多种)洗涤剂可以以低于 0.5 重量 %、低于 0.1 重量 %,或低于 0.05 重量 % (例如,0.01 重量 %) 的量存在于洗脱缓冲液中。

[0024] 任选地,洗脱缓冲液基本上不含羧酸盐。羧酸盐的实例包括琥珀酸盐和柠檬酸盐。

[0025] 如上所描述,本文提供的洗脱缓冲液进一步包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)。磷酸盐缓冲盐水可包括,例如,一种或多种磷酸盐、一种或多种氯盐,或这些的组合。任选地,所述一种或多种磷酸盐包括磷酸二钠和 / 或磷酸二氢钾。用于洗脱缓冲液中的合适氯盐的实例包括氯化钠和 / 或氯化钾。用于制备磷酸盐缓冲盐水的盐任选地为水合物。如上所描述,水合物可为,例如,一水合物、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。例如,用于制备磷酸盐缓冲盐水的磷酸二钠可为磷酸二钠七水合物(即, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)。

[0026] 用来制备用于洗脱缓冲液中的磷酸盐缓冲盐水的盐的示例性组合包括磷酸二钠七水合物(即, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)、磷酸二氢钾(即, KH_2PO_4)、氯化钠(即, $NaCl$), 和氯化钾(即, KCl)。任选地, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 可以以足以在磷酸盐缓冲盐水中提供从 5mM 至 15mM 的浓度或其间任何量的 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 的量使用。例如, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 可以以足以提供从 7.5mM 至

12.5mM 或从 9mM 至 11mM 的浓度(例如, 10.14mM), 或其间任何量的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的量使用。任选地, KH_2PO_4 可以以足以在磷酸盐缓冲盐水中提供从 0.5mM 至 5mM 的浓度, 或其间任何量的 KH_2PO_4 的量使用。例如, KH_2PO_4 可以以足以提供从 1.0mM 至 3.0mM 或从 1.5mM 至 2.0mM 的浓度(例如, 1.76mM), 或其间任何量的 KH_2PO_4 的量使用。任选地, NaCl 可以以足以在磷酸盐缓冲盐水中提供从 75mM 至 200mM 的浓度或其间任何量的 NaCl 的量使用。例如, NaCl 可以以足以提供从 100mM 至 175mM 或从 125mM 至 150mM 的浓度(例如, 137mM) 或其间任何量的 NaCl 的量使用。任选地, KCl 可以以足以在磷酸盐缓冲盐水中提供从 0.5mM 至 5mM 的浓度或其间任何量的 KCl 的量使用。例如, KCl 可以以足以提供从 1.0mM 至 4.0mM 或从 1.5mM 至 3.0mM 的浓度(例如, 2.68mM) 或其间任何量的 KCl 的量使用。

[0027] 用于形成如本文所描述的洗脱缓冲液的赋形剂、二价阳离子、洗涤剂 and 磷酸盐缓冲盐水的示例性组合包括甘露糖醇、组氨酸、山梨糖醇、 MgCl_2 、聚山梨酯 80 和磷酸盐缓冲盐水。以洗脱缓冲液重量为基准, 山梨糖醇可以以低于 3% 的浓度存在。例如, 山梨糖醇可以以低于 2.9%、低于 2.8%、低于 2.7%、低于 2.6%、低于 2.5%、低于 2.4%、低于 2.3%、低于 2.2%、低于 2.1%、低于 2%、低于 1.9%、低于 1.8%、低于 1.7%、低于 1.6%、低于 1.5%、低于 1.4%、低于 1.3%、低于 1.2%、低于 1.1%, 或低于 1% 的浓度存在。在一些实例中, 以洗脱缓冲液重量为基准, 甘露糖醇与山梨糖醇的组合浓度低于 10%。例如, 甘露糖醇的浓度可为 3%, 而组氨酸的浓度可为 2% 从而提供 5% 的组合浓度。聚山梨酯 80 可以以按洗脱缓冲液重量计低于 0.1% 的量(例如, 0.01%) 存在。在一些实例中, 磷酸盐缓冲盐水可包含磷酸二钠、磷酸二氢钾、氯化钠和氯化钾。进一步地, 洗脱缓冲液可基本上不含一价阳离子盐、 Zn^{2+} , 和 / 或海藻糖。

[0028] 另一种合适的洗脱缓冲液包括蔗糖、 MgCl_2 、聚山梨酯 80 和磷酸盐缓冲盐水。任选地, 以洗脱缓冲液重量为基准, 蔗糖以低于 5% 的浓度存在。例如, 以洗脱缓冲液重量为基准, 蔗糖可以以 4.5% 或更低、4% 或更低、3.5% 或更低、3% 或更低、2.5% 或更低, 或 2% 或更低的浓度存在。在这些实例中, 磷酸盐缓冲盐水可包含磷酸二钠、磷酸二氢钾、氯化钠和氯化钾。此外, 洗脱缓冲液可基本上不含一价阳离子盐、非-蔗糖多元醇, 和羧酸盐(例如, 琥珀酸盐和柠檬酸盐)。

[0029] 本文所描述的洗脱缓冲液可作用于在例如病毒制造期间纯化病毒的凝胶渗透色谱洗脱缓冲液。如本文所描述的纯化病毒的方法包括使凝胶渗透色谱柱与包括病毒和液体载体的病毒制品接触。

[0030] 用于本文所描述的病毒制品中的病毒包括包膜和非包膜病毒。包膜和非包膜病毒可为 DNA 病毒、RNA 病毒, 或逆转录病毒。任选地, 用于本文所描述的病毒制品中的病毒为非包膜病毒。非包膜病毒包括, 例如, 属于以下病毒科家族的病毒: 腺病毒科 (Adenoviridae) (例如, 腺病毒)、小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) (例如, 脊髓灰质炎病毒 (polio virus))、呼肠孤病毒科 (例如, 呼肠孤病毒)、乳头瘤病毒科 (Papillomaviridae) (例如, 乳头瘤病毒)、多瘤病毒科 (Polyomaviridae) (例如, 多瘤病毒)、细小病毒科 (Parvoviridae) (例如, 大鼠细小病毒 (Kilham rat virus)), 和虹彩病毒科 (Iridoviridae) (例如, 大蚊虹彩病毒 (tipula iridescent virus))。

[0031] 任选地, 所述病毒为溶瘤病毒。用于本文所描述的病毒制品和方法中的合适病毒包括但不限于, 肌尾噬菌体科 (myoviridae)、长尾噬菌体科 (siphoviridae)、短尾噬菌

体科 (podoviridae)、复层噬菌体科 (tequiviridae)、覆盖噬菌体科 (corticoviridae)、芽生噬菌体科 (plasmaviridae)、脂毛噬菌体科 (lipothrixviridae)、微小纺锤形噬菌体科 (fuselloviridae)、痘病毒科 (poxviridae)、虹彩病毒科、藻类去氧核糖核酸病毒科 (phycodnaviridae)、杆状病毒科 (baculoviridae)、疱疹病毒科 (herpesviridae)、腺病毒科、乳多泡病毒科 (papovaviridae)、多脱氧核糖核酸病毒科 (polydnviridae)、丝状噬菌体科 (inoviridae)、微小噬菌体科 (microviridae)、联体病毒科 (geminiviridae)、圆环病毒科 (circoviridae)、细小病毒科、肝病毒科 (hepadnaviridae)、逆转录病毒科 (retroviridae)、囊状噬菌科 (cystoviridae)、呼肠孤病毒科、双核糖核酸病毒科 (birnaviridae)、副粘病毒科 (paramyxoviridae)、弹状病毒科 (rhabdoviridae)、丝状病毒科 (filoviridae)、正粘病毒科 (orthomyxoviridae)、布尼亚病毒科 (bunyaviridae)、砂粒病毒科 (arenaviridae)、光滑病毒科 (leviviridae)、小核糖核酸病毒科 (picornaviridae)、随伴病毒科 (sequiviridae)、豇豆镶嵌病毒科 (comoviridae)、马铃薯 Y 病毒科 (potyviridae)、杯状病毒科 (caliciviridae)、星状病毒科 (astroviridae)、野田病毒科 (nodaviridae)、四病毒科 (tetraviridae)、番茄丛矮病毒科 (tombusviridae)、冠状病毒科 (coronaviridae)、黄病毒科 (flaviviridae)、披膜病毒科 (togaviridae)、杆菌状核糖核酸病毒科 (barnaviridae) 和波纳病毒科 (bornaviridae) 病毒。

[0032] 病毒制品任选地包括呼肠孤病毒。如本文所使用的,呼肠孤病毒是指划分到呼肠孤病毒属内的任何病毒,包括天然存在和重组的呼肠孤病毒。呼肠孤病毒是具有双链的分节段的 RNA 基因组的病毒。该病毒粒子的直径为 60–80nm,并且具有双层二十面体同心衣壳。该基因组由分 10–12 个离散节段的双链 RNA 组成,总基因组大小为 16–27 千碱基对 (kbp)。各个 RNA 节段大小不同。已从许多物种中发现三种不同但相关的类型的呼肠孤病毒。所有这三种类型都共享共同的补体结合抗原。人呼肠孤病毒由以下三种血清型组成: 1 型 (Lang 株, T1L)、2 型 (Jones 株, T2J), 和 3 型 (Dearing 株, T3D 或 Abney 株, T3A)。

[0033] 如上所描述,呼肠孤病毒可为重组呼肠孤病毒,其可以是天然存在或非天然存在的。当呼肠孤病毒可从自然中的来源分离出来并且没有被人们在实验室中有意修饰时,它被描述成天然存在的。例如,呼肠孤病毒可来自野外来源 (field source) (即,来自自己感染呼肠孤病毒的人)。也可以针对增强的活性 (例如,溶瘤活性) 选择或诱变呼肠孤病毒。具体呼肠孤病毒的实例可见于例如美国专利第 7,803,385 号或美国专利申请公布第 2008/0292594 号。

[0034] 呼肠孤病毒可被修饰,但仍然能够裂解性地感染具有活性 ras 途径的哺乳动物细胞。在将呼肠孤病毒施用至增生细胞之前,可对它进行化学或生物化学预处理 (例如,用蛋白酶,例如糜蛋白酶或胰蛋白酶处理)。蛋白酶预处理除去了该病毒的外壳或衣壳,并且可增加病毒的感染力。可将呼肠孤病毒包裹在脂质体或胶束中 (Chandran 和 Nibert, Journal of Virology, 72(1):467–75(1998))。例如,可在形成胶束浓度的硫酸烷基酯洗涤剂的存在下用糜蛋白酶处理病毒粒子从而产生新感染型亚病毒颗粒 (ISVP)。

[0035] 呼肠孤病毒可为由来自两种或更多种遗传上不同的呼肠孤病毒的基因组区段重组或重排产生的重组或重排呼肠孤病毒。呼肠孤病毒基因组区段的重组 / 重排可在宿主生物体受到至少两种遗传上不同的呼肠孤病毒感染之后在自然界中发生。重组病毒粒子也可在细胞培养物中产生,例如,通过用遗传上不同的呼肠孤病毒共感染允许宿主细胞来产生。

因此,用于本文所描述的制剂中的重组呼肠孤病毒可由来自两种或更多种遗传上不同的呼肠孤病毒的基因组区段重排产生,所述的遗传上不同的呼肠孤病毒包括但不限于,人呼肠孤病毒,例如 1 型(例如,Lang 株)、2 型(例如,Jones 株)和 3 型(例如,Dearing 株或 Abney 株),非人哺乳动物呼肠孤病毒,或鸟类呼肠孤病毒。在一些实例中,重组呼肠孤病毒可由来自两种或更多种遗传上不同的呼肠孤病毒的基因组区段重排产生,其中至少一种亲本病毒经受遗传工程改造,包含一种或多种化学合成的基因组区段,已经用化学或物理诱变剂处理,或者本身是重组事件的结果。重组呼肠孤病毒可例如在化学诱变剂或物理诱变剂的存在下经受重组,所述化学诱变剂包括但不限于硫酸二甲酯和溴化乙锭,所述物理诱变剂包括但不限于紫外线和其他形式的辐射。

[0036] 合适的重组呼肠孤病毒的其他实例包括在一个或多个基因组区段中包含缺失或重复的那些、包含作为与宿主细胞基因组重组的结果的额外遗传信息的那些,或包含合成基因的那些。也可通过将突变的外壳蛋白,例如 $\sigma 3$ 掺入到病毒粒子外衣壳中来修饰呼肠孤病毒。所述蛋白质可通过替代、掺入或缺失来突变。替代包括插入不同的氨基酸来代替天然氨基酸。插入包括将额外的氨基酸残基插入到蛋白质中的一个或多个位置处。缺失包括一种或多种氨基酸残基在蛋白质中的缺失。此类缺失可通过本领域中已知的方法产生。例如,编码其中一种外壳蛋白的基因的寡核苷酸定点诱变可导致产生所需的突变外壳蛋白。在一个实施方案中,呼肠孤病毒为 IDAC#190907-01。

[0037] 用于本文所描述的病毒制品中的病毒可以已经受一个或多个预先纯化步骤。可在执行本文所描述的凝胶渗透色谱方法之前,例如,根据美国专利第 6,808,916 号、第 7,186,542 号、第 7,223,585 号和第 7,901,921 及美国专利申请公布第 2007/0269856 号中所描述的方法纯化病毒,所述美国专利及美国专利申请公布的全文以引用的方式并入本文。例如,可使用以下技术将病毒与其他粒子分离:密度梯度离心法、超滤、渗滤、离子交换色谱法、高效液相色谱法,或这些的组合。

[0038] 本文所描述的病毒制品进一步包括液体载体。合适的液体载体可为水性或非水性载体。合适的非水性载体的实例包括丙二醇、聚乙二醇,和油类,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油、橄榄油等。诸如油酸乙酯的有机酯也是合适的非水性载体。水性载体包括水、乙醇、甘油、乙醇/水溶液、乳状液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。也可采用盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液作为液体载体。如果需要,所述制品也可含有润湿剂或乳化剂、润滑剂、助流剂、润肤剂、保湿剂、增稠剂、调味剂、防腐剂,或 pH 缓冲液。除了包括在洗脱缓冲液中的磷酸盐缓冲盐水之外,还可包括 pH 缓冲液以控制病毒制品的 pH。在一些实例中,包括该缓冲液以维持病毒制品的 pH 在 5 与 8.5 之间。例如,可包括该缓冲液以维持病毒制剂的 pH 在 6.8 与 8.0 之间或在 7.0 与 7.8 之间(例如,7.4)。合适的缓冲液的实例包括诸如 0.05M 磷酸盐缓冲液的磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、苯甲酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液、马来酸盐缓冲液,和酒石酸盐缓冲液。可使用缓冲载体,如汉克斯氏溶液(Hanks's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液、5% 人血清白蛋白、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液(lactated Ringer's)和不挥发油、聚乙二醇、聚乙基吡咯烷酮或卵磷脂。也可使用单乙醇胺、二乙醇胺,氨丁三醇,和甘氨酸溶液作为合适的缓冲液。也可使用脂质体和非水性媒介物,例如不挥发油作为载体。合适载体的进一步实例描述

于 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第 21 版), David B. Troy 编著, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 中。在一些实例中,在本文所描述的病毒制品或洗脱缓冲液中不使用 Tris 缓冲液。

[0039] 通过组合病毒与液体载体来制备病毒制品。在一些实例中,提供合适量的病毒来制备滴度范围从 1×10^5 至 1×10^{14} 病毒粒子 / 每毫升 (VP/mL) 的病毒制品。可选地,可将液体载体加入到感染病毒的细胞培养物中。如本文所使用的细胞培养物是指如在培养条件下发现的所培养的细胞的群体(例如,感染病毒的细胞和培养基)。此外,可用液体载体稀释感染病毒的细胞的溶液或悬浮液来生产病毒制品。

[0040] 任选地,病毒制品的液体载体为如本文所描述的洗脱缓冲液。在液体载体不同于洗脱缓冲液的实施方案中,可在凝胶渗透色谱方法中直接使用病毒制品。可选地,可执行缓冲液更换来提供用洗脱缓冲液作为液体载体的病毒制品。缓冲液更换可根据本领域技术人员已知的方法执行。例如,缓冲液更换可使用过滤方法执行。

[0041] 如上所讨论,纯化病毒的方法包括使凝胶渗透色谱柱与如本文所描述的病毒制品接触。纯化病毒的方法可使用包括凝胶渗透色谱柱和如本文所描述的洗脱缓冲液的装置执行。用于本文所描述的方法中并包括在本文所描述的装置中的凝胶渗透色谱柱可商购获得。例如,凝胶渗透色谱柱可为可从 GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) 商购获得的 BPG 柱、可从 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) 商购获得的 XK16/70 柱,或其他等效物。用于凝胶渗透色谱柱中的合适树脂的实例包括都可从 GE Healthcare 商购获得的 SEPHAROSE 4 Fast Flow 树脂和 SEPHAROSE CL-4B 树脂,或其他等效物。合适的凝胶渗透色谱柱的进一步实例包括都可从 GE Healthcare 商购获得的 SUPERDEX 柱(例如, SUPERDEX-200 柱)和 SEPHAROSE 柱(例如, SEPHAROSE 4FF 树脂柱),或其他等效物。任选地,在使凝胶渗透色谱柱与病毒制品接触之前,用缓冲液平衡该柱。接触凝胶渗透色谱柱包括,例如,手动加载制品到柱上或使用自动化系统加载制品到柱上。在加载后病毒保留在凝胶渗透色谱柱上,随后通过使如本文所描述的洗脱缓冲液流过柱来从柱上回收病毒。可使用例如紫外检测器或通过测量洗脱剂的电导率或折射率来检测病毒洗脱。

[0042] 与使用其他洗脱缓冲液获得的病毒的回收率相比较,本文所描述的方法使用本文所描述的洗脱缓冲液提供了增大的病毒从凝胶渗透色谱柱上的回收率。在一些实例中,使用本文所描述的洗脱缓冲液时的病毒回收率比利用单独磷酸盐缓冲盐水(即,不含赋形剂、二价阳离子和任选的洗涤剂的磷酸盐缓冲盐水)洗脱的病毒的回收率高至少约 20%。例如,该病毒回收率比利用单独磷酸盐缓冲盐水洗脱的病毒的回收率高至少约 25%、至少约 30%,或至少约 35%。

[0043] 本文所描述的方法提供了纯化的病毒制剂。纯化的病毒制剂包括从凝胶渗透色谱柱洗脱的病毒和已与凝胶渗透色谱介质接触的洗脱缓冲液。洗脱的病毒可为纯化的病毒。如本文所使用的纯化的病毒是指已与天然伴随它们的细胞成分分离的病毒。通常,当至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%,或至少 99% 干重的病毒不含天然伴随它们的蛋白质和其他细胞成分时,它们被认为是纯的。

[0044] 任选地,本文所描述的纯化病毒制剂可储存在已与凝胶渗透色谱介质接触的洗脱缓冲液中一段时间。例如,在含有纯化的病毒和洗脱缓冲液的纯化的病毒制剂从凝胶渗透色谱柱洗脱后,该纯化的病毒制剂可储存多达 12 个月(包括,例如,1 天、1 周、1 个月、3 个

月、6个月、9个月或12个月)。在一些实例中,纯化的病毒制剂在储存期间保留病毒感染力。纯化的病毒制剂可储存在约环境温度或低于环境温度的温度下。如本文所使用的环境温度是指介于约10℃与约30℃之间的温度。

[0045] 贯穿本申请,提到了多篇出版物。这些出版物的全部公开内容据此以引用的方式并入到本申请中。

[0046] 已描述许多方面。尽管如此,但仍应理解可作出各种修改。此外,当描述一个特征或步骤时,它可与本文的任何其他特征或步骤组合,即使没有明确陈述该组合。因此,其他方面在权利要求书的范围内。

[0047] 实施例

[0048] 实施例1:材料

[0049] 除非另外指出,否则用于制备洗脱缓冲液的材料都获自Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)。通过将50.06克Milli-Q级水和1.03克Tween80储液组合在一起制备1%Tween80在Milli-Q级水中的工作液。在混合组分之后,再加入Milli-Q级水以获得100g溶液。通过将80.61克Milli-Q级水和2.04克 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 组合在一起制备100mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作液。在混合组分之后,再加入Milli-Q级水以获得100g溶液。

[0050] 实施例2:洗脱缓冲液1

[0051] 根据以下程序制备洗脱缓冲液1。将Milli-Q级水(1.0kg)和L-组氨酸(32.0g)组合在一起并在室温下搅拌10分钟。然后将混合物加热至 $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 以将L-组氨酸完全溶解于水中。然后移除热源,并将以下组分加入到混合物中:D-甘露糖醇(48.02g)、1%Tween80工作液(16.02g)、D-山梨糖醇(32.03g)、100mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作液(32.0g)、 KH_2PO_4 (0.38g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.36g)、KCl(0.32g)和NaCl(12.80g)。充分混合该组分,并再加入Milli-Q级水以获得1.6kg缓冲液。

[0052] 在制备缓冲液的当天,使用校准的pH计测得缓冲液的pH为7.52。然后通过Millipore过滤系统用0.45 μm HA膜(Millipore;Billerica, MA)过滤洗脱缓冲液,并在室温下脱气30分钟从而形成洗脱缓冲液1。

[0053] 实施例3:洗脱缓冲液2

[0054] 根据以下程序制备洗脱缓冲液2。将Milli-Q级水(1.0kg)、蔗糖(64.0g)、Tween80(0.81g)、100mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作液(32.0g)、 KH_2PO_4 (0.38g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.35g)、KCl(0.32g),和NaCl(12.80g)组合在一起。充分混合该组分,并再加入Milli-Q级水以获得1.6kg缓冲液。

[0055] 在制备缓冲液的当天,使用校准的pH计测得缓冲液的pH为7.40。然后通过Millipore过滤系统用0.45 μm HA膜(Millipore;Billerica, MA)过滤洗脱缓冲液,并在室温下脱气30分钟从而形成洗脱缓冲液2。

[0056] 实施例4:洗脱缓冲液1-2x

[0057] 根据以下程序制备的洗脱缓冲液1是实施例2中所示制剂的两倍浓缩制剂。将Milli-Q级水(61.78g)和L-组氨酸(4.00g)组合在一起并在室温下搅拌10分钟。然后将混合物加热至 40°C 并保持27分钟以将L-组氨酸完全溶解于水中。然后移除热源并将以下组分加入到混合物中:D-甘露糖醇(6.00g)、1%Tween80工作液(2.02g)、D-山梨糖醇(4.00g)、100mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作液(4.01g)、 KH_2PO_4 (0.024g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27g)、

KCl (0.021g), 和 NaCl (0.81g)。充分混合该组分并再加入 Milli-Q 级水以获得 100g 缓冲液。

[0058] 在制备缓冲液的当天, 使用校准的 pH 计测得缓冲液的 pH 为 7.59。然后通过 150mL Corning 过滤系统用 0.45 μ m 醋酸纤维素膜 (Corning Incorporated; Corning, NY) 过滤洗脱缓冲液, 从而形成洗脱缓冲液 1-2x。

[0059] 实施例 5: 洗脱缓冲液 2-2x

[0060] 根据以下程序制备的洗脱缓冲液 2 是实施例 3 中所示制剂的两倍浓缩制剂。将 Milli-Q 级水 (60.0g)、蔗糖 (8.00g)、1%Tween80 工作液 (10.0g)、100mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 工作液 (4.01g)、 KH_2PO_4 (0.024g)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27g)、KCl (0.021g), 和 NaCl (0.80g) 组合在一起。充分混合该组分并再加入 Milli-Q 级水以获得 100g 缓冲液。

[0061] 在制备缓冲液的当天, 使用校准的 pH 计测得缓冲液的 pH 为 7.28。然后通过 150mL Corning 过滤系统用 0.45 μ m 醋酸纤维素膜 (Corning Incorporated; Corning, NY) 过滤洗脱缓冲液, 从而形成洗脱缓冲液 2-2x。

[0062] 实施例 6 : 病毒制品

[0063] 通过在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中提供 2.76×10^{14} 个呼肠孤病毒粒子来制备对照病毒制品 (对照制品)。通过在洗脱缓冲液 1 中提供 2.76×10^{14} 个呼肠孤病毒粒子来制备病毒制品 1。通过在洗脱缓冲液 2 中提供 2.76×10^{14} 个呼肠孤病毒粒子来制备病毒制品 2。

[0064] 实施例 7 : 在凝胶渗透色谱后的病毒回收率

[0065] 将实施例 6 中制备的病毒制品 (对照制品、病毒制品 1 和病毒制品 2) 中的每一种单独地加载到凝胶渗透色谱柱上。分别用 PBS、缓冲液制剂 1 和缓冲液制剂 2 洗脱对照制品、病毒制品 1 和病毒制品 2。来自独立实验的平均数据在表 1 和 2 中给出。

[0066] 表 1

病毒制品	洗脱缓冲液	GPC前的总病毒 粒子数	GPC后的总病毒粒 子数	步骤回收率%
对照制剂	PBS	2.76×10^{14}	2.07×10^{14}	75%
病毒制品1	洗脱缓冲液1	2.76×10^{14}	2.96×10^{14}	107%
病毒制品2	洗脱缓冲液2	2.76×10^{14}	3.05×10^{14}	111%

[0068] 表 2

[0069]

病毒制品	洗脱缓冲液	GPC前的总病毒 粒子数	GPC后的总病毒 粒子数	步骤回收率%
对照制剂	PBS	2.51×10^{16}	1.70×10^{16}	68%
对照制剂	PBS	1.31×10^{16}	9.58×10^{15}	73%
病毒制品1	洗脱缓冲液1	1.57×10^{16}	1.42×10^{16}	90%
病毒制品1	洗脱缓冲液1	4.29×10^{16}	4.13×10^{16}	96%
病毒制品1	洗脱缓冲液1	3.28×10^{16}	3.48×10^{16}	106%

[0070] 如表1中所示,与单独PBS的使用相比较,在凝胶渗透柱上洗脱缓冲液1与呼肠孤病毒的一起使用使得病毒回收率从75%增大至107%。表2表明,与单独PBS的使用相比较,使用洗脱缓冲液1时病毒回收率一致地增大。进一步地,与单独PBS的使用相比较,在凝胶渗透柱上洗脱缓冲液2与呼肠孤病毒的一起使用使得病毒回收率从75%增大至111%(参见表1)。因而,与将PBS与呼肠孤病毒一起使用的情况相比较,在呼肠孤病毒中加入洗脱缓冲液1和2导致滴度提高大约32%和36%。

[0071] 所附权利要求书的组合物和方法的范围不受本文所描述的具体组合物和方法限制,本文所描述的具体组合物和方法旨在用作权利要求书的几个方面的例证,功能上等价的任何组合物和方法都在本公开的范围。除了本文所示出和描述的那些之外,所述组合物和方法的各种修改也意欲落在所附权利要求书的范围内。进一步地,虽然仅具体地描述了某些代表性组合物、方法及这些组合物和方法的方面,但是即使没有明确列举其他组合物和方法及所述组合物和方法的各种特征的组合,它们也意欲落在所附权利要求书的范围内。因而,本文可能明确地提及了步骤、要素、组分或成分的组合;但是所有其他的步骤、要素、组分和成分的组合也包括在本发明中,尽管并没有对它们进行明确陈述。