



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104583393 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201380043618. X

(22) 申请日 2013. 06. 24

(30) 优先权数据

61/663, 218 2012. 06. 22 US

61/794, 086 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/047249 2013. 06. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/192604 EN 2013. 12. 27

(71) 申请人 武田疫苗股份有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 R·泰勒

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C12N 7/02(2006. 01)

A61K 39/125(2006. 01)

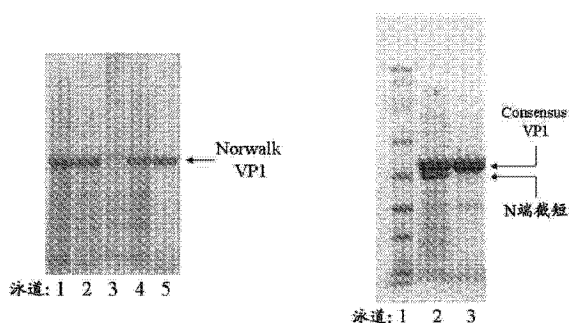
权利要求书6页 说明书23页 附图5页

(54) 发明名称

病毒样颗粒的纯化

(57) 摘要

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。



1. 一种纯化病毒样颗粒 (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 (filtrate);
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
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。
2. 权利要求 1 的方法, 其中该 VLP 至少包含 VLP 的第一亚群和第二亚群。
3. 权利要求 2 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。
4. 权利要求 3 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。
5. 权利要求 4 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。
6. 权利要求 4 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。
7. 权利要求 3 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。
8. 权利要求 1 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。
9. 权利要求 1 的方法, 其中 VLP 包含酸稳定的 VLP。
10. 权利要求 1 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。
11. 权利要求 1 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。
12. 权利要求 1 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。
13. 权利要求 12 的方法, 其中所述除去包括通过深层过滤 (depth filtration), 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。
14. 权利要求 1 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。
15. 权利要求 1 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。
16. 权利要求 1 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。
17. 一种用于纯化病毒样颗粒 (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, 其中该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。
18. 权利要求 17 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、环氧乙烷冷凝物 (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。

19. 权利要求 17 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。

20. 权利要求 17 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。

21. 权利要求 17 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。

22. 权利要求 17 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。

23. 权利要求 17 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。

24. 权利要求 17 的方法, 其中在所述纯化期间有不超过大约 50% 的 VLP 被损失。

25. 权利要求 17 的方法, 其中在所述纯化的结果使至少大约 65% 的 VLP 被回收。

26. 权利要求 17 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。

27. 权利要求 26 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。

28. 权利要求 27 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。

29. 权利要求 27 的方法, 进一步包括一个或多个额外的色谱处理。

30. 权利要求 17 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。

31. 权利要求 17 的方法, 其中裂解物、上清液或滤出液使用重组方法产生。

32. 权利要求 31 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。

33. 一种纯化病毒样颗粒 (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, 所述 VLP 至少包含 VLP 的第一亚群和第二亚群;

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;

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

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。

34. 权利要求 33 的方法, 其中该多步色谱处理的至少一个色谱处理包括:

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;

用溶剂和 / 或去污剂处理色谱材料; 和

将 VLP 的第一亚群从色谱材料洗脱。

35. 权利要求 34 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。

36. 权利要求 33 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。

37. 权利要求 33 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。

38. 权利要求 37 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。

39. 权利要求 33 的方法,其中裂解物、上清液或滤出液使用重组方法产生。

40. 权利要求 33 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。

41. 权利要求 33 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。

42. 权利要求 33 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。

43. 权利要求 33 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。

44. 权利要求 33 的方法,其中过滤处理包括深层过滤处理。

45. 权利要求 33 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。

46. 一种疫苗,其包含通过权利要求 33 的方法制备的 VLP 的第一亚群。

47. 一种用于纯化病毒样颗粒 (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;

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

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。

48. 权利要求 47 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。

49. 权利要求 47 的方法,其中至少一个深层过滤器是硅藻土深层过滤器。

50. 权利要求 48 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 /m²至大约 1000 升 /m²。

51. 权利要求 47 的方法,其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中选出的过滤容量:大约 150 升 /m²至大约 400 升 /m²。

52. 权利要求 47 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。

53. 权利要求 47 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。

54. 权利要求 47 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。

55. 权利要求 47 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。

56. 权利要求 47 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。

57. 权利要求 56 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。

58. 权利要求 55 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。

59. 权利要求 58 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。

60. 权利要求 47 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。

61. 权利要求 47 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。

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。

63. 一种疫苗,包括从权利要求 62 的溶液制备的诺如病毒 VLP。

64. 权利要求 62 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。

65. 权利要求 64 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。

66. 权利要求 64 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。

67. 权利要求 64 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。

68. 权利要求 62 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。

69. 权利要求 62 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。

70. 权利要求 69 的溶液,通过如下产生:

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;

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;

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

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。

71. 权利要求 70 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。

72. 权利要求 70 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。

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。

74. 权利要求 73 的溶液,含有高达大约 100% 的具有全长 VP1 亚单位的 VLP。

75. 权利要求 73 的溶液,其中该溶液基本上没有具有截短的 VP1 亚单位的 VLP。

76. 权利要求 73 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。

77. 权利要求 76 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。

78. 权利要求 76 的溶液,其中该溶液通过如下方法从未纯化的溶液中产生:

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

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。

79. 权利要求 78 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。

80. 一种具有全长 VP1 亚单位的 VLP 的纯化群体,通过向权利要求 73 的溶液采用一种或多种色谱处理而产生。

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。

82. 权利要求 81 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。

83. 权利要求 81 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。

84. 权利要求 81 的方法,其中 VLP 从基因群 I VLP 和基因群 II VLP 中选出。

85. 权利要求 81 的方法,其中活病毒包括杆状病毒。

86. 权利要求 81 的方法,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;和

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:

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;

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,从而产生洗脱物,

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。

87. 权利要求 86 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。

88. 权利要求 86 的方法,其中 VLP 从基因群 I VLP 和基因群 II VLP 中选出。

89. 权利要求 86 的方法,其中活病毒包括杆状病毒。

90. 一种纯化的 VLP 组合物,从权利要求 86 的洗脱物中产生。

91. 一种从权利要求 86 的洗脱物中产生的疫苗。

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:

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;

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,从而产生洗脱物。

93. 权利要求 92 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。

94. 权利要求 92 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。

95. 权利要求 92 的方法,其中 VLP 从基因群 I VLP 和基因群 II VLP 中选出。

96. 权利要求 92 的方法,其中活病毒包括杆状病毒。

病毒样颗粒的纯化

[0001] 相关专利申请相互参考

[0002] 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

[0003] 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。

[0004] 发明背景

[0005] 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。

[0006] 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

[0007] 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, 并将裂解物、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。

[0008] 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%。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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))。

[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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中独立选出的过滤容量:大约 50 升/ m^2 -大约 1000 升/ 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中选出的过滤容量:大约 150 升/ m^2 -大约 400 升/ 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 附图简述

[0026] 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 $0.2\ \mu\text{m}$ 过滤之后的 VLP 生产培养物 (最终收获材料);

[0027] 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 $0.2\ \mu\text{m}$ 过滤之后的 VLP 生产培养物 (最终收获材料);

[0028] 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 $100\text{mL}/\text{min}$ 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;

[0029] 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 $80\text{mL}/\text{min}$ 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;

[0030] 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;

[0031] 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 $\sim 30\text{-}40\text{nm}$ 颗粒;

[0032] 图 4A 图解了 VLP 生产和通过离心收获流程图;和

[0033] 图 4B 图解了 VLP 生产和通过深层过滤收获流程图。

[0034] 发明详细说明书

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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合物或聚集物。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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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,和其间的的所有数值。

[0054] 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,和其间的的全部数值,被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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,和其间的的所有数值。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。

[0058] 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。

[0059] 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,但不限于,如下的一种或多种:Triton X-100、辛基酚环氧乙烷冷凝物(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 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)。

[0060] 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 / 或去污剂额外地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)。

[0061] 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。

[0062] 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 是诸如病毒基因群 I VLP, 诸如病毒基因群 II VLP, 和 / 或诸如病毒基因群 IV VLP。

[0063] 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。

[0064] 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,可以包括,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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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%，和其间的全部数值的残余污染蛋白被从裂解物、上清液或滤出液中除去。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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，但不限于，基因群 I VLP 和 / 或基因群 II VLP。

[0071] 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 10^3 倍，至少大约 10^4 倍，至少大约 10^5 倍，至少大约 10^6 倍，至少大约 10^7 倍，至少大约 10^8 倍，至少大约 10^9 倍，至少大约 10^{10} 倍，和其间的所有数值。

[0072] 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 10^2 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 10^3 倍，至少大约 10^4 倍，至少大约 10^5 倍，至少大约 10^6 倍，至少大约 10^7 倍，至少大约 10^8 倍，至少大约 10^9 倍，至少大约 10^{10} 倍，至少大约 10^{11} 倍，至少大约 10^{12} 倍，至少大约 10^{13} 倍，至少大约 10^{14} 倍，至少大约 10^{15} 倍，至少大约 10^{16} 倍，和其间的所有数值。

[0073] 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 10^2 倍,至少大约 10^3 倍,至少大约 10^4 倍,至少大约 10^5 倍,至少大约 10^6 倍,至少大约 10^7 倍,至少大约 10^8 倍,至少大约 10^9 倍,至少大约 10^{10} 倍,和其间的的所有数值。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。可以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。

[0078] 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,和其间的的所有数值。

[0079] 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。

[0080] 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 / m^2 , 大约 100 升 / m^2 , 大约 200 升 / m^2 , 大约 300 升 / m^2 , 大约 400 升 / m^2 , 大约 500 升 / m^2 , 大约 600 升 / m^2 , 大约 700 升 / m^2 , 大约 800 升 / m^2 , 大约 900 升 / m^2 , 大约 1000 升 / m^2 , 和其间的的所有数值。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 / m^2 , 大约 200 升 / m^2 , 大约 250 升 / m^2 , 大约 300 升 / m^2 , 大约 350 升 / m^2 , 大约 400 升 / 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 在一些实施方案中,诸如病毒 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,疫苗能够从包含诸如病毒 VLP 的溶液中制备。

[0089] 在一些实施方案中,本发明的方面进一步可操作于提供具有 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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)。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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 et al. 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 (Baldrige et al. 2000; Yang et al. 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 et al., 2002; Baldrige et al. 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感病原体的非特异性免疫应答,所述传染病原体包括革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌、病毒和寄生虫 (Baldrige et al. 2004; Persing et al. 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。

[0098] 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 0689454B1 (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。

[0099] 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。

[0100] 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%。

[0101] 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、甘氨酸、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。

[0102] 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。

[0103] 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。使用诸如病毒作为无包膜病毒的非限制性实例,诸如病毒疫苗可以被制备成 10mg 干粉,含有一种或多种诸如病毒基因群抗原(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 μ g MPL(0.1-5% w/w 范围),和大约 100 μ g 诺如病毒抗原(0.05-5% w/w 范围)。

[0104] 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,诺如病毒抗原可以被制备成每 10mg 干粉制剂含大约 5 μ g,大约 15 μ g,和大约 50 μ 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 μ g,大约 30 μ g,和大约 100 μ g(0.1, 0.3 和 1.0% w/w),用于施加到一个鼻孔中。制剂可以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(booster 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以是 1 μ g-100mg,优选地 1-500 μ g,更优选地 5-200 μ g,最典型地 10-100 μ g。每个剂量施加的总诺如病毒抗原可以是大约 10 μ g,大约 30 μ g,或大约 100 μ 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 μ m。平均颗粒尺寸范围是直径为 10-500 μ m。

[0105] 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 $+34^{\circ}\text{C}$,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。

[0106] 为了产生期望百分比的聚集,蔗糖与壳聚糖的合适比值可以根据指导加以确定。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。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用大量基于病毒的表达系统。此外,可以选择宿主细胞株,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。可以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,可以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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 此外,某些事件在可能的情况下可以在平行的处理中被同时执行,也可以被顺次

执行。

实施例

[0113] Sf9 培养

[0114] Sf9 昆虫细胞的常规培养在烧瓶中在 27℃ 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 (T4Cellometer, Nexcelom Bioscience) 执行。

[0115] 重组杆状病毒

[0116] 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℃。用于 VLP 生产的冷冻杆状病毒的扩增如上所述地执行。

[0117] VLP 生产

[0118] 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-900II 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感染后 4-6 天收获,这取决于活细胞的密度。

[0119] 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感染。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感染,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)。

[0120] 生物反应器收获

[0121] 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 ≤ 24 h,或者保存于 4℃ ≤ 1 周。

[0122] 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 和美国实用新型申请 (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。

[0123] 阳离子交换捕获色谱

[0124] 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 ($\leq 1.5\text{g}$ 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 $<200\text{mAU}$ 。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 $100\text{mL}/\text{min}$ 的速度清洗囊室,直至 $A_{280}<50\text{mAU}$ 。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。

[0125] 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)。

[0126] 羟基磷灰石 (HA) 捕获色谱

[0127] 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 ($\leq 250\text{mg}$ 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 $<200\text{mAU}$ 。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 $70\text{mL}/\text{min}$ 的速度清洗囊室,直至 $A_{280}<50\text{mAU}$ 。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。

[0128] 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)。

[0129] VLP 表征

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 结果

[0133] 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。

[0134] 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 ($\sim 10^7$ – $10^8\text{pfu}/\text{mL}$),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, 在诸如病毒 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)。

[0135] 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
[0136]

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

[0137] 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诸如病毒 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。

[0138] 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。

[0139] 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-MuLV) 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。

[0140] 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
[0141]

处理步骤	Norwalk VLP处理 (log10减少)		Consensus VLP处理 (log10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

[0142] 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)。

[0143] 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 (assembly) 一致 (图 3B)。

[0144] 通过溶剂 / 去污剂处理的病毒失活 / 清除

[0145] 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。

[0146] 表 3. 通过溶剂 / 去污剂处理使病毒失活 / 清除

[0147]

一致的VLP处理步骤	模式病毒(log ₁₀ 减少)	
	A-MuLV ¹	AcNPV ²
阳离子交换	1.18	0.59
阳离子交换(S/D处理)	>6.96	>4.96

[0148] ¹双嗜性鼠白血病病毒

[0149] ²杆状病毒

[0150] 通过低 pH 和溶剂 / 去污剂处理的病毒失活 / 清除

[0151] 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 (~10⁸pfu/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。

[0152] 表 4. 通过低 pH 和溶剂 / 去污剂处理使病毒失活 / 清除

[0153]

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

[0154] 通过低 pH 处理除去 VP1 蛋白裂解片段

[0155] 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。

[0156] 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 VP1N 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。

[0157] 表 5. 通过低 pH 处理除去 Consensus VP1 蛋白裂解片段

[0158]

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

[0159] ¹显示了 5 份单独的 Consensus VLP 的结果

[0160] 通过柱上溶剂 / 去污剂处理清除宿主细胞蛋白

[0161] 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。

[0162] 表 6. 通过柱上溶剂 / 去污剂处理纯化 Norwalk 和 Consensus VLP

[0163]

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

[0164] 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

[0165] 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,从而不必需要清洁确认 (cleaning validation)。

[0166] 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:

[0167] Norwalk 和 Consensus VLP 生产培养物在摇瓶或搅拌罐生物反应器中产生。

[0168] 生产培养物的收获通过:低速离心和 0.2 μm 过滤;低 pH 处理,随后进行低速离心和 0.2 μm 过滤;低 pH 处理,随后进行深层过滤和 0.2 μm 过滤。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] 表 7. 通过低 pH 处理和深层过滤的核酸清除

[0172]

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

[0173] ¹收获的级分通过离心 /0.2 μm 过滤（无 pH 处理）澄清

[0174] ²收获的级分通过 pH 处理和离心 /0.2 μm 过滤

[0175] ³收获的级分通过 pH 处理和 Millistak+D0HC 深层过滤 /0.2 μm 过滤

[0176] 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/m², 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。

[0177] 表 8. 深层过滤容量和 VLP 回收

[0178]

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

[0179] N/A- 不可获得

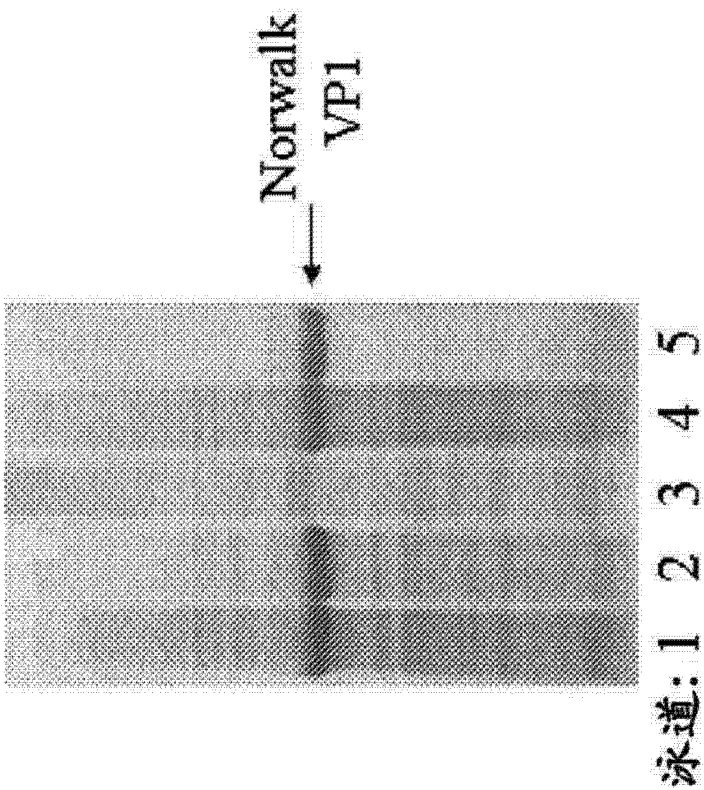


图 1A

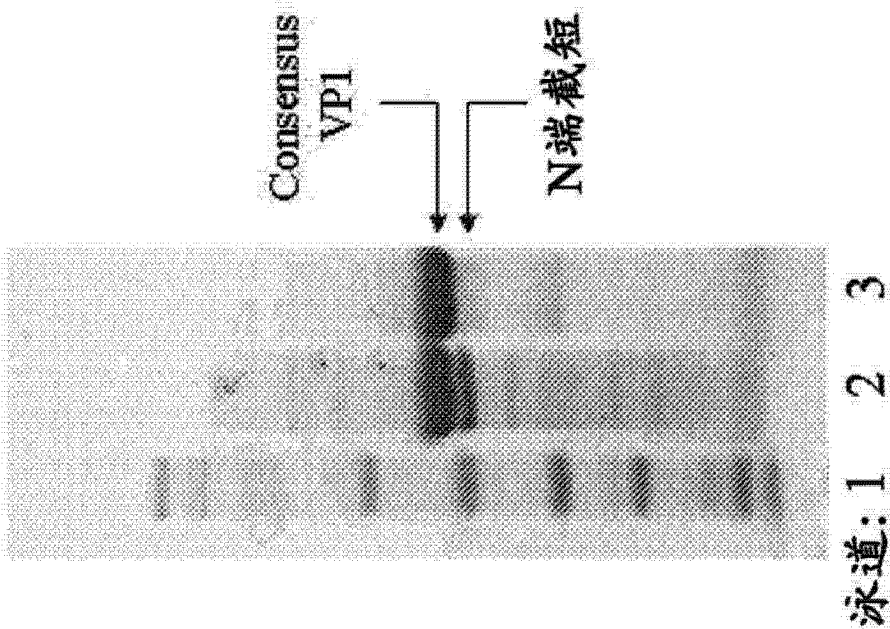


图 1B

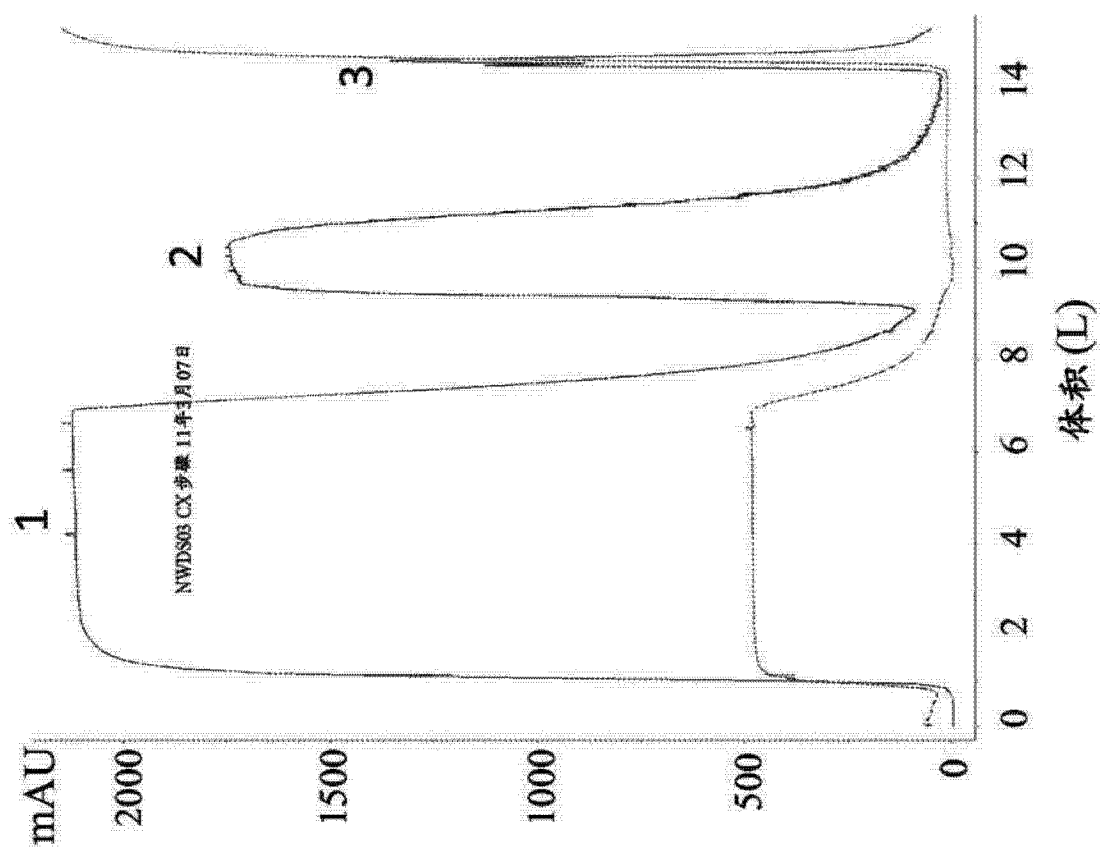


图 2A

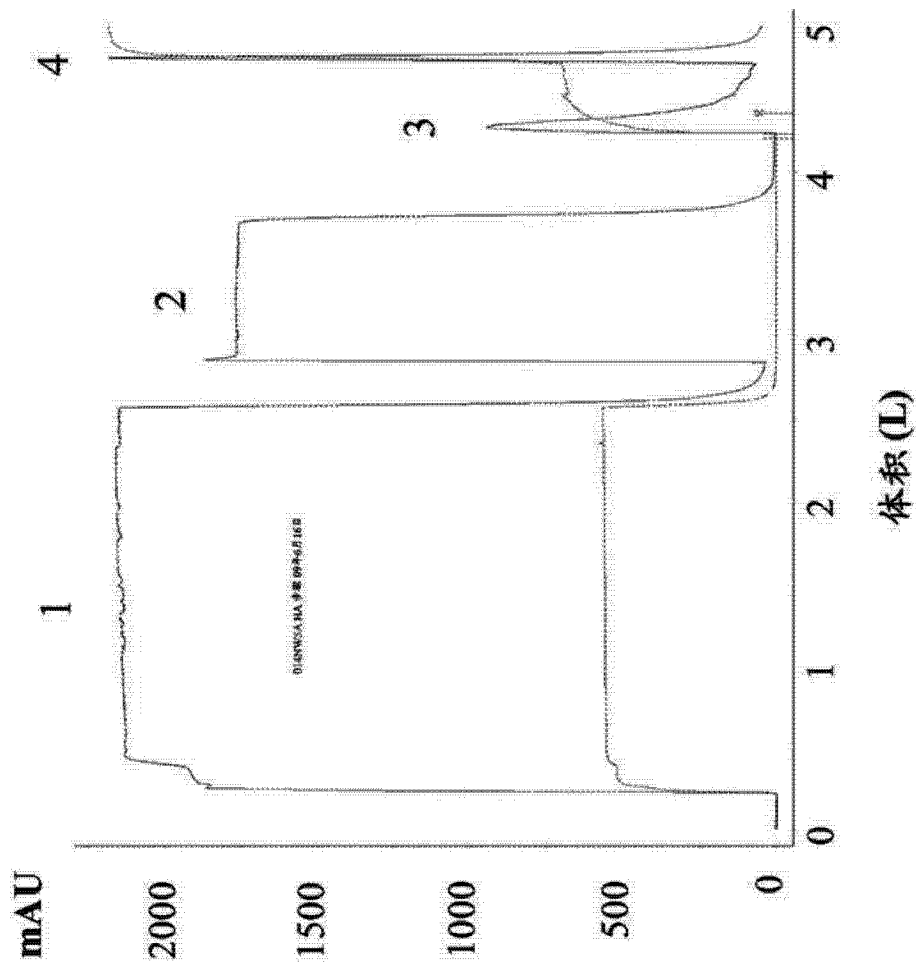


图 2B

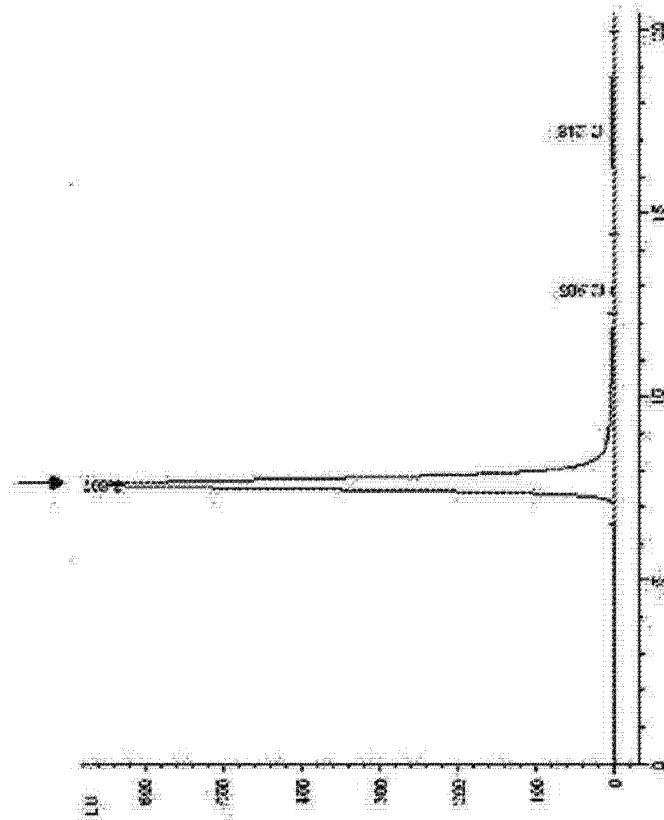


图 3A

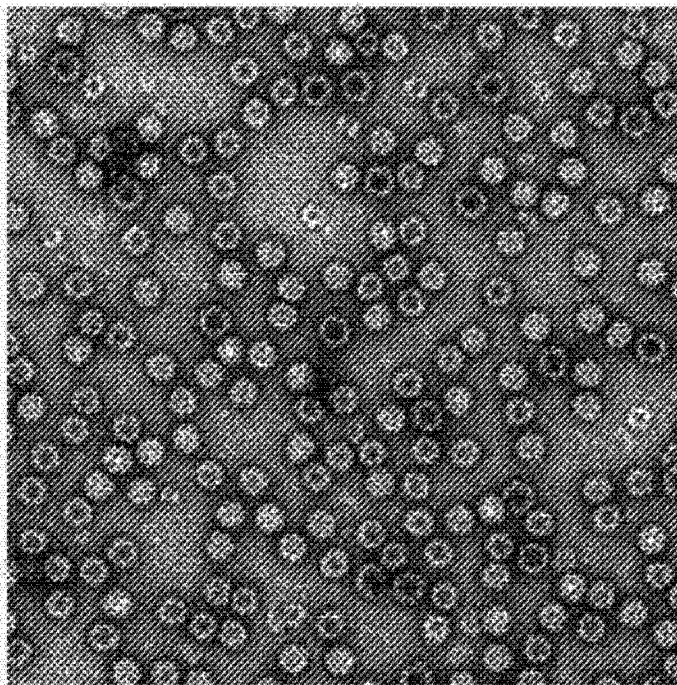


图 3B

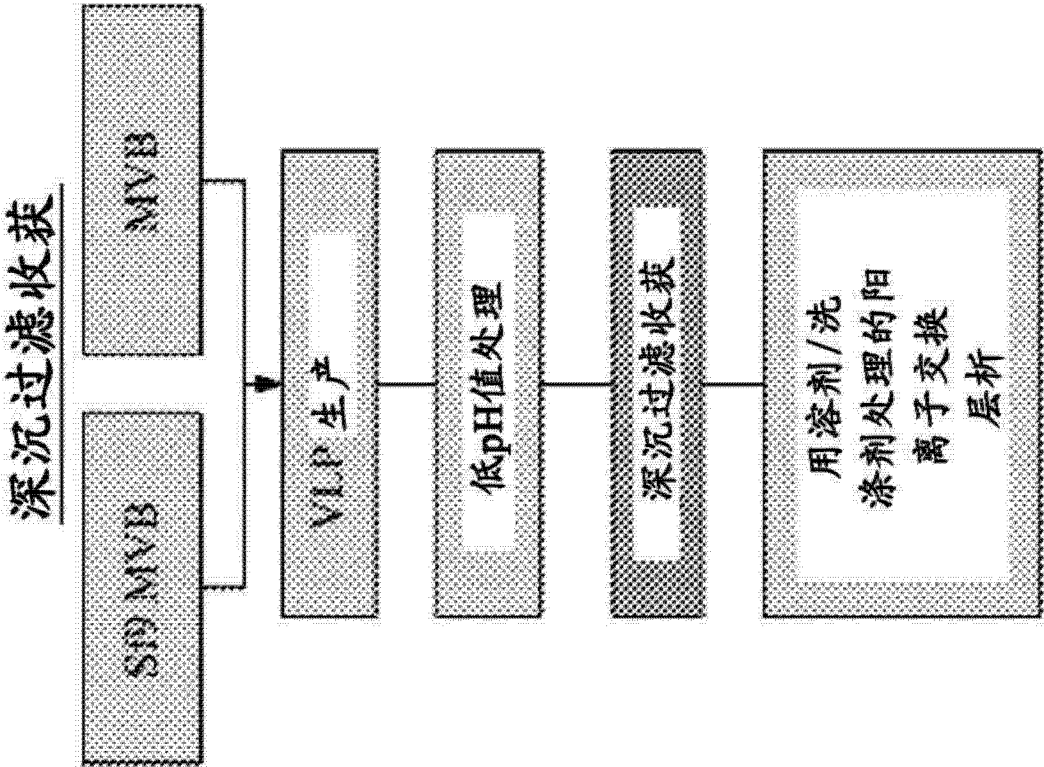


图4B

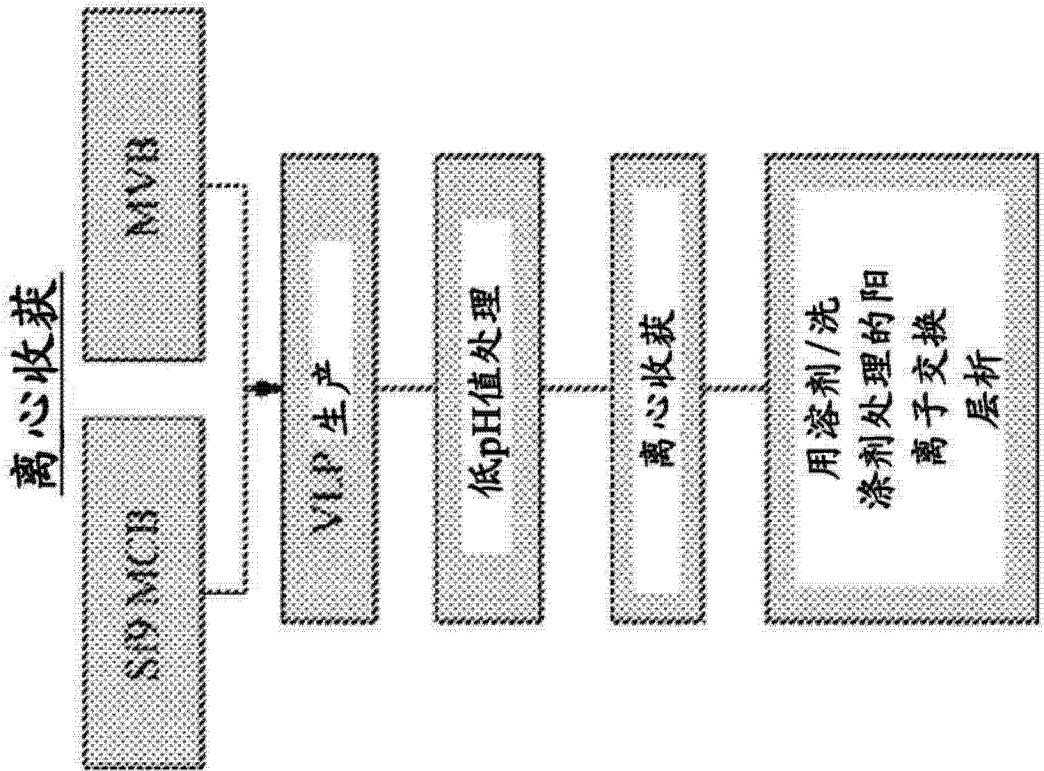


图4A