



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103827296 B

(45)授权公告日 2016.11.16

(21)申请号 201280035724.9

(22)申请日 2012.07.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103827296 A

(43)申请公布日 2014.05.28

(30)优先权数据
11174660.8 2011.07.20 EP
61/509,630 2011.07.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/063045 2012.07.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/010797 EN 2013.01.24

(73)专利权人 雅培生物学有限责任公司
地址 荷兰韦斯普

(72)发明人 崔以晴 王一丁 J·萨斯

R·范特霍夫 S·沙科尔

G·J·范路耶

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.
C12N 7/02(2006.01)

(56)对比文件
W0 2010036774 A1,2010.04.01,全文.
W0 2009115917 A2,2009.09.24,全文.
US 4140762 A,1979.02.20,全文.
W0 2010036760 A1,2010.04.01,全文.
CN 101804202 A,2010.08.18,全文.
CN 101998990 A,2011.03.30,全文.
CN 101998990 A,2011.03.30,全文.
CN 101790381 A,2010.07.28,全文.

审查员 毛舒燕

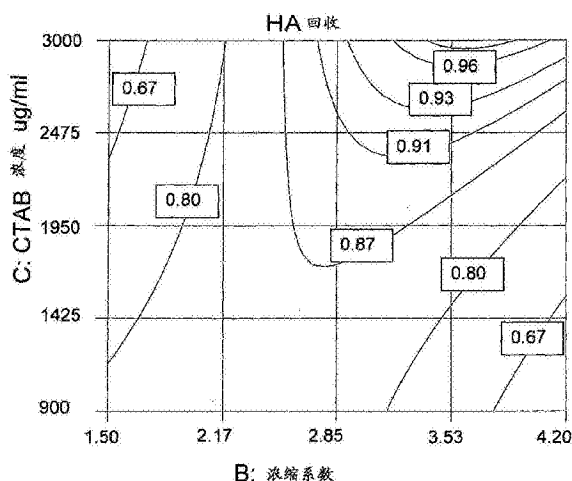
权利要求书2页 说明书19页 附图2页

(54)发明名称

用于产生病毒抗原和疫苗的方法

(57)摘要

本发明属于制药工业领域并且涉及用于产生来源于有包膜病毒的病毒抗原的方法,包括步骤:提供包含有包膜病毒的液体,澄清包含所述有包膜病毒的液体,减小获得的液体收获物的体积,增溶有包膜病毒和纯化病毒抗原。本发明还涉及所述方法用于产生疫苗制剂的用途。



1. 用于产生来源于有包膜病毒的病毒抗原的方法,以指定的顺序包括下列步骤:
 - a) 提供包含有包膜病毒的液体,
 - b) 澄清包含所述有包膜病毒的液体,从而产生包含所述有包膜病毒的液体收获物,
 - c) 减小步骤b)后获得的液体收获物的体积以获得浓缩的液体收获物,
 - d) 通过向步骤c)中获得的浓缩的液体收获物添加包含阳离子去垢剂的去垢剂或去垢剂混合物,来增溶存在于所述液体收获物中的有包膜病毒,
 - e) 将病毒核心从步骤d)后获得的组合物中分离,
 - f) 任选地从步骤e)后获得的组合物中除去阳离子去垢剂,和
g) 纯化病毒抗原,
其中在步骤c)后,紧接着进行步骤d),和其中在步骤d)之前,不进行用于特异性纯化有包膜病毒的纯化步骤。
2. 权利要求1的方法,其中在步骤g)中进行所进行的唯一层析步骤。
3. 权利要求1的方法,其中在步骤d)之前不进行密度梯度超离心和/或层析。
4. 权利要求1的方法,其中进行灭活步骤和/或病毒清除步骤。
5. 权利要求1的方法,其中步骤c)中的体积减小至少4倍。
6. 权利要求1的方法,其中阳离子去垢剂的终浓度为至少2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
7. 权利要求1的方法,其中所述阳离子去垢剂基于季铵阳离子。
8. 权利要求1的方法,其中步骤b)之后紧接着进行步骤c),之后紧接着进行步骤d)。
9. 权利要求1的方法,其中未发生去垢剂交换。
10. 权利要求1的方法,其中在步骤d)之前不添加核酸酶或其它DNA消化酶。
11. 权利要求1的方法,其中所述有包膜病毒选自有包膜RNA病毒、有包膜DNA病毒或有包膜逆转录病毒,其中有包膜RNA病毒包括黄病毒,披膜病毒,冠状病毒,丁型肝炎病毒、丝状病毒,棒状病毒,布尼亚病毒,正粘病毒,副粘病毒和沙粒病毒,并且有包膜DNA病毒包括嗜肝DNA病毒,疱疹病毒和痘病毒。
12. 权利要求11的方法,其中所述有包膜病毒是正粘病毒。
13. 权利要求12的方法,其中所述有包膜病毒是甲型、乙型或丙型流感病毒。
14. 权利要求1的方法,其中步骤a)中的液体来源于基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物或基于蛋的有包膜病毒繁殖培养物。
15. 权利要求14的方法,其中基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物包含哺乳动物细胞系的细胞。
16. 权利要求15的方法,其中将所述细胞作为贴壁细胞进行培养。
17. 权利要求14的方法,其中基于蛋的有包膜病毒繁殖培养物包括鸡蛋。
18. 权利要求1的方法,其中利用一次性生物反应器产生步骤a)中的液体。
19. 权利要求1的方法,其中通过应用选自离心、正切流动过滤和深度过滤的方法进行步骤b)。
20. 权利要求1的方法,其中通过应用选自正切流动过滤、超离心和沉淀的方法进行步骤c)。
21. 权利要求1的方法,其中通过应用选自超离心和正切流动过滤的方法进行步骤e)。

22. 权利要求1的方法,其中通过应用层析进行步骤g)。
23. 权利要求1的方法,其中所述病毒抗原是有包膜病毒的部分。
24. 权利要求23的方法,其中所述病毒抗原是病毒蛋白质。
25. 权利要求24的方法,其中所述病毒蛋白质是来自流感病毒的HA和/或NA。
26. 权利要求1的方法,包括将获得的病毒抗原配制成药物组合物的额外步骤。
27. 权利要求26的方法,其中所述药物组合物是疫苗制剂或其中间产物。
28. 权利要求1的方法,其中当参照25℃时,步骤g)包括使用具有在下列范围内的电导率的组合物:等于或大于3.0至小于5.0mS/cm。
29. 权利要求1的方法,其中当参照25℃时,步骤g)包括使用具有在下列范围内的摩尔浓度的组合物:等于或大于1.0M至等于或小于3.5M。
30. 一种用于制造包含来源于基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物的病毒抗原的疫苗制剂的方法,所述方法以指定的顺序包括下列步骤:
- i) 澄清包含所述有包膜病毒的培养液体,从而产生包含所述有包膜病毒的液体收获物,
 - ii) 减小包含从基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物获得的有包膜病毒的液体收获物的体积,从而获得浓缩的液体收获物,和
 - iii) 通过向步骤ii)中获得的浓缩的液体收获物添加包含阳离子去垢剂的去垢剂或去垢剂混合物,来增溶存在于液体收获物中的有包膜病毒,
 - iv) 将病毒核心从步骤iii)后获得的组合物中分离,和
 - v) 任选地从步骤iv)后获得的组合物中除去阳离子去垢剂,由此产生包含来源于基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物的病毒抗原的疫苗制剂,
- 其中在步骤ii)之后紧接着进行步骤iii),
- 其中存在于疫苗制剂中的宿主细胞DNA的减少为至少2.5log,并且其中在步骤iii)之前,不进行用于特异性纯化有包膜病毒的纯化步骤。

用于产生病毒抗原和疫苗的方法

发明领域

[0001] 本发明属于制药工业的领域并且涉及用于产生包含来源于有包膜病毒的病毒抗原的药物组合物的方法。

[0002] 背景领域描述

[0003] 目前,在基于蛋或基于细胞的培养系统中繁殖用于产生药物组合物例如疫苗制剂或其中间产物的病毒。独立于所使用的各系统,来自每一个培养系统的病毒抗原的加工在药物组合物例如疫苗制剂的生产中是非常重要和关键的步骤。关于基于蛋的系统,加工的主要要求是充分除去含胚卵蛋白例如卵白蛋白,关于基于细胞的系统,加工必须满足要求例如宿主细胞DNA和宿主细胞蛋白质的显著减小。此外,必需大量清除非产物病毒。

[0004] 关于病毒蛋白质的纯化,EP 1 982 727 A1公开了病毒膜蛋白的纯化方法,包括步骤:通过沉降将细胞、微载体和细胞聚集体与培养基分离,将所述沉淀物经历化学灭活,和增溶所述沉淀物,添加胆酸钠,将混合物离心,通过Amberlite处理减少去垢剂的量,以及进行亲和层析,随后洗脱靶蛋白。

[0005] US 2011/0014230A1描述了用于制备疫苗抗原的方法,基本上包括灭活纯化的病毒体,随后用去垢剂分开所述病毒体的步骤。

[0006] US 2009/0060950A1公开了用于产生病毒疫苗的方法,包括如下步骤:在细胞中繁殖病毒,在细胞上清液中收集所述病毒,灭活所述病毒,通过密度梯度超离心纯化它,和用去垢剂处理它。

[0007] US 4,327,182公开了使用膜过滤技术制备纯化的流感亚单位疫苗的方法。

[0008] US 6,048,537提及用于制备纯化的流感抗原的方法,包含浓缩、纯化和片段化的步骤。

[0009] 提及纯化法的其它文献是US 2010/0119552 A1;US 2010/0158944A1;Kalbfuss等人,2007,Biotech&Bioeng.第96卷第5号,pp932-944;Onions等人,2010,Biologicals,第38卷,pp544-551;US 2008/0118970;WO 03/097797;Goerke等人,2005,Biotechnology and Bioengineering,第91卷第1号,pp12-21;Krober等人,Chem.Eng.Technology2010,第33卷,pp941-959;和WO 2010/052214A2。

[0010] 尽管存在上述方法,但仍然存在对用于产生病毒抗原,特别是病毒抗原制剂以及尤其是药物组合物例如疫苗的改进的方法的需要,从而存在这样的目标。具体地,存在对以相对低的生产成本产生高产物回收,不依赖于病毒株并且仅需要最少数目的步骤,同时满足对低水平宿主细胞DNA和蛋白质以及外来试剂的严格要求的生产方法的需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了下列方面、主题和优选实施方案,其各自单独地或组合地促进解决本发明的目的:

[0013] (1)用于产生来源于有包膜病毒的病毒抗原的方法,以指定的顺序包括下列步骤:

[0014] a)提供包含有包膜病毒的液体,

[0015] b)澄清包含所述有包膜病毒的液体,从而产生包含所述有包膜病毒的液体收获

物，

[0016] c)减小步骤b)后获得的液体收获物的体积以获得浓缩的液体收获物，

[0017] d)通过向步骤c)中获得的浓缩的液体收获物添加包含阳离子去垢剂或由阳离子去垢剂组成的去垢剂或去垢剂混合物，来增溶存在于液体收获物中的有包膜病毒，

[0018] e)将病毒核心从步骤d)后获得的组合物分离，

[0019] f)任选地从步骤e)后获得的组合物中除去阳离子去垢剂，

[0020] 和

[0021] g)纯化病毒抗原，

[0022] 其中在步骤c)后，紧接着进行步骤d)。

[0023] 在优选实施方案中，在步骤e)之前不进行主纯化步骤，具体地不进行用于纯化有包膜病毒的主纯化步骤，优选不进行层析。在步骤e)后，进行主纯化步骤。该主纯化步骤，在步骤e)后进行，用于纯化病毒抗原。其不用于分别纯化完整病毒或完整病毒体。关于术语“主纯化步骤”(或分别地，“主纯化方法”)的定义，参考本文中其它地方的定义。

[0024] 在其它优选实施方案中，在步骤g)中进行所进行的唯一层析步骤。

[0025] 在其它优选实施方案中，在步骤e)之前不进行密度梯度离心(例如密度梯度超离心，例如蔗糖梯度超离心)。

[0026] 在其它实施方案中，可应用另外的病毒灭活步骤，例如化学灭活步骤，和/或另外的病毒清除步骤。然而，很可能地，通过应用本发明，这样的额外病毒灭活步骤和/或额外病毒清除步骤的使用不是为了获得任何病原体的充分灭活和充分清除，即为了获得满足各自规定的灭活和清除所必需的。这是有利的，因为省略这样的额外病毒灭活和/或额外病毒清除步骤对于改进的方法有进一步贡献，例如在使施加在期望的病毒抗原上的压力减小至最小和/或缩短过程方面。然而如果进行额外病毒灭活步骤例如化学灭活和/或额外病毒清除步骤，则该步骤绝不在步骤c)与d)之间进行：如在其它地方公开的，步骤c)之后紧接步骤d)，除其它以外，这促成增加的病毒抗原的回收。在另一个方面，在步骤e)之前不进行所述额外灭活和/或额外清除步骤。在其它实施方案中，例如在步骤g)后进行所述额外灭活和/或额外清除步骤。此外，如果进行这样的额外病毒灭活步骤和/或额外病毒清除步骤，为了获得达到规定的终产物所需要和使用的化学品的浓度比为了获得达到规定的终产物常规需要和使用的化学品的浓度低。这在例如减小对病毒抗原施加的压力和化学修饰方面可以是有利的。其对于产物效力和可能的稳定性可以是进一步有益的。

[0027] 在本发明的含义内，术语“纯化病毒抗原”表示主纯化方法或主纯化步骤，例如层析或密度梯度超离心纯化法。在一个实施方案中，主纯化方法不包括选择性膜过滤。使用的层析可以是离子交换层析、疏水相互作用层析、混合模式层析、假亲和层析、亲和层析、液-液层析等。在本发明的含义内，术语“主纯化方法”或“主纯化步骤”是指作为用以纯化(最终)期望的产物的主纯化方法的方法。换句话说，主纯化方法/步骤用于特异性纯化(最终)期望的产物。在本发明中，例如，所述(最终)期望的产物是在增溶之前待纯化的但非完整的有包膜病毒的病毒抗原。不是“主纯化方法”的其它方法可实现不同的目的，例如澄清目的、浓缩目的或沉淀目的，有时伴随额外地纯化期望(最终)产物的作用。这样的并非“主纯化步骤”或“主纯化方法”的方法步骤的结果是在已进行这样的方法/步骤后期望(最终)的产物的纯化作用比当已进行“主纯化步骤/方法”时达到的纯化作用低。在已进行主纯化步骤后，

优选不进行另外的纯化步骤(例如以达到关于仍然存在于组合物中的杂质的规定)。在这方面清除和灭活步骤例如化学灭活步骤不被认为是主纯化步。根据本发明,在步骤e)之前不进行这样的“主纯化步骤/方法”。

[0028] (2)根据项目(1)的方法,其中在步骤d)之后和步骤g)之前,除去已在步骤d)中添加的去垢剂。

[0029] 在一个实施方案中,不使用层析步骤来除去去垢剂。

[0030] (3)根据项目(1)或(2)的方法,其中步骤c)中的体积减小至少4倍,优选至少5倍。

[0031] 在优选实施方案中,体积减小至少4倍,优选至少5倍,或至少9倍,更优选至少12倍,更优选至少13倍,或至少15倍,最优选至少20倍,或至少25倍。常见的最大体积减小为30、35、40或45倍。

[0032] 在一个实施方案中,在一个单步骤中进行步骤c)中的体积的减小。在本发明的含义内,表达“一个单步骤”表示仅存在一个进行的体积减小步骤,并且不重复该单体积减小步骤。

[0033] (4)根据项目(1)至(3)的任一项的方法,其中阳离子去垢剂的终浓度为至少约2000 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约2500 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约3000 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约3500 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约4000 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约4500 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约5000 $\mu\text{g/ml}$,还有优选至少约5500 $\mu\text{g/ml}$ 以及还有优选至少约6000 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0034] (5)根据前述项目的任一项的方法,其中所述阳离子去垢剂基于季铵阳离子如十六烷基三甲基溴化铵或其它烷基三甲铵盐、烷胺盐如硬脂酰醋酸胺或椰油烷基醋酸胺、苯扎氯铵和苯扎溴铵,例如苄索氯铵或甲苄索氯铵、硬脂酰胺聚氧乙烯醚或油胺聚氧乙烯醚,优选阳离子去垢剂是十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。

[0035] 在其它实施方案中,去垢剂是去垢剂的混合物,其中所述混合物包含本文中描述的阳离子去垢剂,优选CTAB和本文中描述的非离子型去垢剂,优选Tween-家族的成员,优选Tween-80,作为去垢剂。

[0036] (6)根据前述项目的任一项的方法,其中在步骤b)之后紧接步骤步骤c),之后紧接步骤d)。

[0037] 在其它实施方案中,步骤d)之后紧接步骤e)。

[0038] (7)根据前述项目的任一项的方法,其中未发生去垢剂交换。

[0039] (8)根据前述项目的任一项的方法,其中在步骤d)之前未添加核酸酶或其它DNA消化酶,优选Benzonase[®],优选在方法的任何阶段未添加核酸酶。

[0040] (9)根据前述项目的任一项的方法,其中所述有包膜病毒选自有包膜RNA病毒、有包膜DNA病毒或有包膜逆转录病毒,其中有包膜RNA病毒包括黄病毒,披膜病毒,冠状病毒,丁型肝炎病毒、丝状病毒、棒状病毒,布尼亚病毒,正粘病毒,副粘病毒和沙粒病毒,以及有包膜DNA病毒包括嗜肝DNA病毒,疱疹病毒和痘病毒,优选有包膜病毒选自有包膜RNA病毒,更优选有包膜病毒是正粘病毒,最优选流感病毒例如甲型、乙型或丙型流感病毒。

[0041] (10)根据前述项目的任一项的方法,其中步骤a)中的液体来源于基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物或基于蛋的有包膜病毒繁殖培养物。

[0042] (11)根据项目(10)的方法,其中基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物包含哺乳动物细胞系,优选动物细胞系的细胞。

[0043] (12)根据项目(10)或(11)的任一项的方法,其中哺乳动物细胞系的细胞选自Vero、PerC6、BHK、293、COS、PCK、MRC-5、MDCK、MDBK和WI-38,优选所述细胞是MDCK细胞。

[0044] (13)根据项目(10)至(12)的任一项的方法,其中将所述细胞培养为贴壁细胞。

[0045] (14)根据项目(10)的方法,其中基于蛋的有包膜病毒繁殖培养物包含鸡蛋。

[0046] (15)根据前述项目的任一项的方法,其中步骤a)中的液体通过使用一次性生物反应器来产生。

[0047] 一次性生物反应器的使用还可促成根据本发明的方法相较于常规方法的改进,例如在获得的产物自身方面,例如就质量和/或纯度而言。如果大规模例如在工业规模上进行所述方法,这是特别有益的。

[0048] (16)根据前述项目的任一项的方法,其中通过应用选自离心、正切流动过滤和深度过滤的方法进行澄清步骤b)。

[0049] 在一个实施方案中,离心的条件是例如等于或小于10000g的RCF(相对离心力),持续少于2分钟,优选等于或小于3000g的RCF,持续等于或少于2分钟,更优选等于或小于500g的RCF,持续等于或少于2分钟,更优选等于或小于300g的RCF,持续等于或少于2分钟。在本发明的含义内,“g”是指在地球表面上因重力而产生的标准加速度。

[0050] 在一个实施方案中,为了进行正切流动过滤,微孔过滤膜的孔径为例如至少0.2 μ m,优选至少0.45 μ m,更优选至少0.65 μ m。

[0051] 在一个实施方案中,为了进行深度过滤,使用例如0.2 μ m-7 μ m的滤器。此外,为了提高产物回收和/或防止滤器阻塞,可使用预滤器。

[0052] (17)根据前述项目的任一项的方法,其中通过应用选自正切流动过滤(TFF)、超离心和沉淀的方法来进行浓缩步骤c)。所述TFF是TFF超滤或一个步骤中的TFF超滤和透析过滤(TFF超滤/透析过滤)。

[0053] 在一个实施方案中,当正切流动过滤用于步骤c)时,超滤膜的分子量截断值可以例如等于或小于1000kDa,优选等于或小于750kDa,更优选等于或小于500kDa,更优选等于或小于300kDa,最优选100-300kDa。在优选实施方案中,超滤膜的分子量截断值不小于50kDa。

[0054] 当在步骤c)中应用正切流动过滤时,在优选实施方案中,体积减小在5-40倍的范围内,优选体积减小超过10倍,更优选体积减小超过15倍。优选,体积减小不超过30倍。这可导致后面的处理步骤的改善的结果。

[0055] 在一个实施方案中,当将超离心用于步骤c)时,超离心的条件可以是例如30.000g-200.000g,进行超过10min。当在步骤c)中应用超离心,在优选实施方案中,超离心的体积减小超过10倍,优选超过20倍,更优选超过30倍,更优选超过40倍。

[0056] 在一个实施方案中,如果通过应用沉淀进行浓缩,适当的化学品对于本领域技术人员来说是已知的,并且在各自适当的浓缩中可以例如是盐、甲醇和乙醇以及聚乙二醇。适当浓度的适当化学品沉淀产物,例如包含病毒抗原的颗粒,但对所述病毒抗原无负作用或具有最低限度的负作用。这样选择化学品,以便它们不与(最终)期望的产物例如病毒抗原反应。当在步骤c)中应用沉淀时,在优选实施方案中,体积减小超过10倍,优选超过20倍,更优选超过30倍,更优选超过40倍。

[0057] (18)根据前述项目的任一项的方法,其中在步骤d)中,以足以溶解基本上所有存

在于液体收获物中的有包膜病毒的温度和时间段进行增溶。

[0058] 一般地,足以溶解基本上所有有包膜病毒的时间段和温度可由本领域技术人员来确定。在一个实施方案中,时间段为在0℃以上,优选在2℃至30℃进行0.2h至20h,优选时间段为在2-25℃的温度,更优选2-8℃的温度进行0.5h至6.0h。

[0059] (19)根据前述项目的任一项的方法,其中,如果进行,则通过应用选自超离心和正切流动过滤的方法进行步骤e)。

[0060] 在一个实施方案中,当将超离心用于步骤e)中时,用于沉淀的超离心的条件优选是30.000g-200.000g,进行超过10min.,优选超过60.000g,进行超过30min.,更优选超过90.000g,进行超过30min.,更优选超过120.000g,进行超过30min.。

[0061] 在一个实施方案中,当将正切流动过滤用于步骤e)中时,超滤膜的分子量截断值优选超过100kDa,更优选超过300kDa。此外,膜的分子量截断值优选不大于500kD。

[0062] (20)根据前述项目的任一项的方法,其中通过应用层析进行步骤f),优选层析选自离子交换层析、疏水相互作用层析、亲和层析、混合模式层析、假亲和层析、液-液层析和大小排阻层析,更优选层析选自离子交换层析、疏水相互作用层析、假亲和层析、亲和层析和大小排阻层析。

[0063] (21)根据前述项目的任一项的方法,其中所述病毒抗原是有包膜病毒的部分,优选病毒抗原是病毒蛋白质,更优选病毒抗原是病毒蛋白质例如病毒表面蛋白。

[0064] (22)根据前述项目的任一项的方法,其中所述病毒蛋白质是来自流感病毒的病毒表面蛋白HA和/或NA。

[0065] 在其它实施方案中,病毒蛋白质是来自流感病毒的M蛋白。

[0066] (23)根据前述项目的任一项的方法,包括将获得的病毒抗原配制进药物组合物的额外步骤。

[0067] (24)根据项的方法(23),其中所述药物组合物是疫苗制剂或其中间产物,优选药物组合物是有包膜病毒疫苗,更优选药物组合物是流感病毒疫苗。

[0068] (25)根据前述项目的任一项的方法,其中当参照25℃时,步骤g)包括使用具有在等于或大于3.0至小于5.0mS/cm之间,优选等于或大于3.5至等于或小于4.7mS/cm之间的范围内,更优选在等于或大于3.6与等于或小于4.65mS/cm之间的范围内的电导率的组合物。

[0069] 在优选实施方案中,步骤g)包括层析步骤,例如离子交换层析,并且具有上述电导率的组合物是缓冲液,例如上样缓冲液和/或包含盐的平衡缓冲液,适合与各自使用的层析法组合使用。

[0070] 组合物的电导率可按照本领域技术人员已知的任何适当方法,例如通过使用电子装置例如电导仪来测量。

[0071] (26)根据前述项目的任一项的方法,其中当参照25℃时,步骤g)包括使用具有在等于或大于1.0M至等于或小于3.5M的范围内,优选在等于或大于1.0M至等于或小于3.0M的范围内,更优选在等于或大于1.5M至等于或小于3.0M的范围内,更优选在等于或大于1.5M至等于或小于2.6M的范围内的摩尔浓度的组合物。

[0072] 在优选实施方案中,步骤g)包括层析步骤,例如疏水相互作用层析,具有上述摩尔浓度的组合物是缓冲液,例如上样缓冲液和/或包含盐的平衡缓冲液,适合与各自使用的层析法组合使用。

[0073] 摩尔浓度可利用本领域技术人员已知的任何适当方法来测量。

[0074] 通过使用项目(25)和/或(26)中定义的组合物,甚至还可促成用于产生病毒抗原,特别是在病毒抗原回收方面具有改进的方法。

[0075] (27)用于制造包含从基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物产生的病毒抗原的疫苗制剂的方法的用途,所述方法以指定的顺序包括下列步骤:

[0076] i)减小包含从基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物获得的有包膜病毒的液体收获物的体积,从而获得浓缩的液体收获物,和

[0077] ii)通过向步骤i)中获得的浓缩的液体收获物添加包含阳离子去垢剂的去垢剂或去垢剂混合物,来增溶存在于液体收获物中的有包膜病毒,

[0078] 其中在步骤i)之后紧接着步骤ii),和

[0079] 其中存在于疫苗制剂中的宿主细胞DNA的减少为至少2.5log,优选至少3.0log,更优选至少3.5log,更优选至少4.0log。

[0080] 疫苗制剂中宿主细胞DNA至少2.5log的减少仅通过步骤i)和ii),最多额外进行项目(1)的步骤b)、e)、f)和/或g)的组合来实现。无论如何,其它DNA特异性步骤,特别是DNA消化酶处理步骤和DNA去除层析(亲和层析、凝胶层析等)和/或灭活步骤不是必需的或甚至根本不必进行以实现上述宿主细胞DNA的减少。如果进行其它DNA特异性步骤和/或灭活步骤,则可以以明显改进的方式(例如在加工经济方面)进行这些步骤(从而进行整个方法),例如为了实现上述宿主细胞的减少,需要使用显著更少量的DNA消化酶或灭活组合物。

[0081] 关于术语“疫苗制剂”、“病毒抗原”、“基于细胞的”、“液体收获物”、“有包膜病毒”和“去垢剂”,参考说明书。

[0082] 在优选实施方案中,在步骤i)之前,从包含有包膜病毒的液体收获物除去细胞碎片和/或微载体。

[0083] (28)根据项目(27)的用途,其中步骤i)和ii)对应于上述项目中定义的步骤c)和d)。

[0084] (29)根据项目(27)或(28)的用途,其中在步骤i)之前进行上述项目中定义的步骤a)和b)并且在步骤ii)之后进行上述项目中定义的步骤e)、f)和/或g)。

[0085] 发明详述

[0086] 现通过优选实施方案和实施例更详细地描述本发明,然而所述实施方案和实施例仅被提供来用于举例说明目的并且不应当理解为以任何方式限定本发明的范围。

[0087] 可在基于细胞或基于蛋的系统中繁殖用于生产药物组合物例如疫苗制剂或其中间产物的病毒。取决于各自使用的系统,所述药物组合物通常被分类为基于蛋或基于细胞的组合物。对于疫苗制剂或疫苗,加工的主要要求是杂质(例如在基于蛋的病毒繁殖系统的情况下,含胚胎蛋白例如卵白蛋白)的充分去除,以及非产物病毒的去除,在基于细胞的病毒繁殖系统的情况下,在加工过程中,必须满足额外要求例如宿主细胞DNA和宿主细胞蛋白质的显著减少。

[0088] 在本发明的说明书中,预料不到地发现以确定顺序进行的特定加工步骤的组合提供了相较于常规方法,例如在加工本身方面,例如简化总体加工而言和/或在获得的产物方面,例如就质量、产率和/或纯度而言具有改进的方法。通过进行根据本发明的方法,可获得所述有益的令人惊讶的作用,只要所述加工包括包含繁殖的病毒的液体收获物的体积减小

步骤,这导致所述液体收获物中病毒(也称为病毒颗粒)和其它组分的浓缩,和包括增溶步骤,所述步骤增溶存在于减小的体积的液体收获物中的病毒。具体地,并且与现有技术的加工不同,存在于根据本发明的方法中的纯化步骤仅在已完成增溶步骤后进行,此外,纯化步骤是针对病毒抗原而非针对完整病毒颗粒。因此,通过应用根据本发明的方法,可在增溶之前省略意欲用于和靶向完整病毒颗粒纯化的高产物损失、费力、费时以及成本密集的纯化步骤,而仍可获得具有满意的纯度和产率的组合物。此外,增溶步骤紧接体积减小步骤之后。不希望受任何理论束缚,假定这些步骤,即在体积减小步骤之后紧接着进行增溶步骤可促成有益作用,因为浓缩步骤c)可增加宿主细胞DNA的浓度,这继而在沉淀效率方面可以是有益的。

[0089] 令人惊讶地,并且与用于产生药物组合物例如包含病毒抗原的疫苗的常规方法不同,根据本发明的方法代表允许相较于常规方法,获得增加的产物回收,然而同时仅需要减少数目的加工步骤的改进的稳固的方法。该减少的数目的需要的加工步骤进一步促成方法的增强的稳固性,以及降低产生疫苗组合物常规所需的生产成本和时间。这在病毒感染例如流感的大范围流行或季节性爆发的情况下是特别有用的,因为存在对大范围流行或季节性疫苗的快速生产和至市场的释放的需要,以及当使用已知非常耗时的用于病毒繁殖的基于蛋的培养系统生产疫苗时更加有用。

[0090] 此外,随着用于药物组合物的加工步骤的数目减少,对存在的病毒和病毒抗原施加的压力减小,这可导致终产物(例如疫苗)及其中间产物的效力和稳定性的改善。

[0091] 此外,通过应用根据本发明的方法,尽管相较于常规方法减少了加工步骤的数目,但可产生关于蛋白质和DNA污染的最大耐受量达到具体管理要求的疫苗制剂。例如,对于流感疫苗制剂,目前(2011)耐受的污染的最大量为120 μ g非血细胞凝集素(HA)蛋白/剂和10ng的DNA/剂(在这样的参照中,1剂对应于500 μ l疫苗制剂)。根据本发明的方法的其它有利方面是可不依赖于在基于细胞或基于蛋的系统中繁殖的病毒而应用它。因此,例如,如果将基于细胞的系统用于病毒繁殖,根据本发明的方法提供了显著减少的宿主细胞DNA污染物,以及如果将基于蛋的系统用于病毒繁殖,则本方法提供了减少的因蛋培养而产生的污染物。

[0092] 由于产生的病毒抗原的回收增加,因此每生产批次可制备增加数目的疫苗剂数。在疫苗制剂的高度需求的情况下,这可以例如是特别有益的,正如例如在季节性流感爆发的情况下一样。

[0093] 典型和有益的疫苗为:疫苗是流感疫苗,特别是亚单位疫苗。

[0094] 此外,根据本发明的方法可应对病毒株系的变异,这意味着所述方法不太依赖于株系。当使用显示基因组的不断漂移和移位的病毒例如流感病毒时,这是特别有用的。

[0095] 总之,根据本发明的方法可提供例如在稳固性、产物回收、生产时间和成本以及存在于终产物或其中间产物中的污染物方面具有显著改进的方法。

[0096] 因此,在一个方面,本发明涉及用于产生来源于有包膜病毒的病毒抗原的方法,所述方法以这样的顺序包括下列步骤:

[0097] a)提供包含有包膜病毒的液体,

[0098] b)澄清包含所述有包膜病毒的液体,从而产生包含所述有包膜病毒的液体收获物,

[0099] c)减小步骤b)后获得的液体收获物的体积以获得浓缩的液体收获物,

[0100] d)通过向步骤c)中获得的浓缩的液体收获物添加包含阳离子去垢剂的去垢剂或去垢剂混合物,来增溶存在于液体收获物中的有包膜病毒,

[0101] e)将病毒核心从步骤d)后获得的组合物分离,

[0102] f)任选地从步骤e)后获得的组合物中除去阳离子去垢剂,

[0103] 和

[0104] g)纯化病毒抗原,

[0105] 其中在步骤c)后,紧接着进行步骤d)。

[0106] 病毒抗原来源于有包膜病毒。这些有包膜病毒可以是任何有包膜DNA或RNA病毒,具有单链或双链基因组,有义或反义的,连续或分断的。例如,病毒选自有包膜RNA病毒、有包膜DNA病毒或逆转录病毒,其中有包膜RNA病毒的组包括黄病毒、披膜病毒,冠状病毒,丁型肝炎病毒、丝状病毒,棒状病毒,布尼亚病毒,正粘病毒,副粘病毒和沙粒病毒,并且其中有包膜DNA病毒的组包括嗜肝DNA病毒,疱疹病毒和痘病毒。在优选实施方案中,病毒选自有包膜RNA病毒,包括丁型肝炎病毒、正粘病毒和副粘病毒,特别优选地,有包膜RNA病毒是正粘病毒例如甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒。

[0107] 在根据本发明的步骤a)中,提供了包含上述有包膜病毒的液体。该液体来源于基于细胞的病毒繁殖培养或基于蛋的病毒繁殖培养。正如对于本领域技术人员来说是已知的,例如可在基于细胞的培养系统中或在基于蛋的培养系统中繁殖上述有包膜病毒。用于生长病毒例如流感病毒的适当细胞系通常是哺乳动物来源的,因此代表哺乳动物细胞系,优选动物细胞系。适当的动物细胞系对于本领域技术人员来说是已知的并且可包括仓鼠、牛、灵长类动物(包括人和猴)和狗来源的细胞系。在某些实施方案中,哺乳动物细胞系的细胞选自Vero、PerC6、BHK、293、COS、PCK、MRC-5、MDCK、MDBK和WI-38,优选细胞是MDCK细胞。可按照本领域技术人员已知的任何适当方法在细胞上生长病毒。例如,可在贴壁细胞培养物或在悬浮细胞培养物中生长病毒。在一个实施方案中,在微载体上生长细胞。在其它实施方案中,还可使细胞适合悬浮生长。对于基于细胞的培养系统,可使用任何适当的培养基。在优选实施方案中,在无血清和/或无蛋白质培养基中培养细胞。对于基于细胞的病毒繁殖,通常地,分别将病毒或活病毒制剂接种至其中繁殖它的细胞培养物中。可以分批法,或补料分批法,或灌注法进行病毒繁殖。在25-37℃进行2-5天后,通常终止病毒繁殖。可将病毒繁殖生物反应器中包含的含病毒液体直接注入其纯化方法,或转移至单独的容器中。随后将所述单独的容器中的含病毒液体注入疫苗纯化方法。

[0108] 或者,可在基于蛋的系统中繁殖病毒。在基于蛋的制造中,通常将工作种子病毒注射进入含胚鸡蛋。病毒开始在鸡蛋的尿囊液(蛋清)中繁殖以增加病毒的量。在2-3天的孵育后,将蛋冷却至2-8℃,使用人工或自动化真空收获系统收获和获得各个蛋的尿囊液。收集的含病毒尿囊液是包含病毒的基于蛋的液体,并且在随后的纯化方法中进行进一步加工。

[0109] 取决于用于病毒繁殖的培养系统,包含繁殖的病毒颗粒的液体可包含不同的污染物。例如,存在于基于蛋的培养物中的潜在污染物是基于蛋的蛋白质例如卵白蛋白或抗生素,而存在于基于细胞的培养物中的典型的污染是残留的宿主细胞DNA。有利地,根据本发明的方法不限于用于病毒繁殖的系统;相反地,当使用含有在基于细胞的培养系统以及同样地基于蛋的培养系统中繁殖的病毒的液体时,可获得有益作用。

[0110] 可通过使用一次性生物反应器来在步骤a)中产生液体。通过使用这样的一次性生

物反应器,例如可以例如在质量和/或纯度方面改善获得的产物本身。当大规模,例如以工业规模进行所述方法时,这是特别有益的。

[0111] 将包含有包膜病毒的液体经历澄清步骤。对包含病毒颗粒的液体,然而不对沉积或沉淀的物质进行澄清步骤。在本发明的含义内,该澄清步骤的目的是从液体除去颗粒物,例如细胞碎片、蛋白质杂质和/或用于生长细胞的支持物,例如微载体。在本发明的含义内,澄清步骤例如从液体除去颗粒物,但保留超过80%的有包膜病毒的病毒抗原。蛋白质杂质可以例如是尿囊素、胶原和/或白蛋白例如卵白蛋白。为了进行澄清,可使用对于本领域技术人员来说是已知的任何适当装置或方法。具体地,可应用正切流动过滤(TFF)、深度过滤或离心。因此,以这样的方式选择各自应用的澄清装置(TFF、深度过滤、离心)的每一个的设置,以实现上文中指定的目的。一般而言,鉴于该目的,每一个各自装置的所述设置对于本领域技术人员来说是已知的。在根据本发明的优选实施方案中,当应用离心时,可使用等于或小于10000g的离心力进行等于或少于2分钟(min.)的时间。在该离心步骤中应用更小的离心力,例如等于或小于1000g,优选,等于或小于500g,更优选等于或小于300g,进行等于或少于2分钟,甚至更促成本发明的有益作用,例如其可促成病毒抗原的进一步增加的回收。关于应用离心时的其它参数以及关于正切流动过滤或深度过滤的参数,参考本说明书的其它地方。

[0112] 在本发明的含义内,获得的澄清的液体称国“液体收获物”。

[0113] 根据本发明的方法的至关重要方面是减小包含繁殖的病毒颗粒的澄清液体的体积,随后紧接着进行存在于体积减小的浓缩的液体收获物中的病毒颗粒的增溶/去垢剂处理步骤。已令人惊讶地发现进行该体积减小、紧接着利用本文中其它地方描述的去垢剂处理病毒颗粒,导致提高的回收,从而导致提高的病毒抗原产率。此外,已令人惊讶地发现,如果已利用基于细胞的系统进行病毒繁殖,则可获得预料不到的增加的宿主细胞DNA的减少。

[0114] 在本发明的含义内,术语“紧接着”表示例如在步骤c)与d)之间不进行处理步骤或特定的主动纯化步骤。这意味着在步骤c)与d)之间不对液体收获物进行处理步骤,例如不进行灭活或纯化步骤。这还可意味着在步骤c)与d)之间不从液体收获物获得其它试剂,或将其它试剂添加至液体收获物。在另一个方面,在步骤b)之后紧接着进行步骤c),随后紧接着进行步骤d)。这还可在例如简化方面,或时效性和成本降低方面促成本发明的方法的增强,同时仍然保持高产物(病毒抗原)回收、产率和/或纯度。

[0115] 灭活导致病毒的感染性的去除,并且通常通过利用有效量的一种或多种下列化学手段处理病毒来进行:去垢剂、甲醛、 β -丙内酯、亚甲蓝、补骨脂素、羧基富勒烯(C60)、二元乙胺、乙酰乙烯亚胺或其组合。其它灭活方法对于本领域技术人员是已知的并且包括例如利用物理手段例如 γ 辐照和/或UV光处理病毒。

[0116] 在本发明的某些实施方案中,不进行通过利用与用于增溶有包膜病毒(步骤d))的相同的去垢剂进行的灭活。

[0117] 在根据本发明的其它实施方案中,在步骤d)之前,不进行灭活,特别地不进行包括利用甲醛、 β -丙内酯和/或UV光(例如UV-C),优选利用甲醛和/或 β -丙内酯处理病毒的灭活。在另一个方面,可能在增溶有包膜病毒的步骤之后,即在步骤d)之后,对病毒应用灭活步骤。在其它方面,在步骤a)至f)的过程中根本不进行灭活步骤。这可进一步促成根据本发明的方法例如在成本和/或工作方面的增强。有时,如果已在基于细胞的系统上进行病毒繁

殖,则 β -丙内酯也用于灭活可存在的残留的宿主细胞DNA。然而, β -丙内酯是不仅烷化DNA而且还烷化产物抗原(病毒抗原)的烷化剂,从而可能例如在所述抗原的稳定性和/或免疫原性方面负面地影响质量。因此,根据本发明的方法的有利方面是:令人惊讶地,尽管省略了灭活剂例如 β -丙内酯,但仍然可符合终产物(例如疫苗制剂)中最大允许宿主细胞DNA杂质的限度。

[0118] 步骤c)中的液体收获物的浓度可通过适当的方法实现。所述方法用于减小液体收获物的体积。该步骤的目的不是特异性纯化病毒颗粒,即,该步骤不是主纯化步骤。相反地,该步骤的目的在于减小包含有包膜病毒颗粒的液体收获物的体积以获得浓缩的液体收获物。

[0119] 在减小体积的步骤中,可能会发生小的杂质与液体病毒收获物分离。小的杂质是任何物质例如分子、颗粒或培养基组分,具有小于有包膜病毒的尺寸的尺寸,优选小于约1000kDa,更优选小于约500kDa,更优选小于约300kDa。小的杂质的这种分离,如果其发生的话,仅基于分离的杂质的尺寸,而不是基于杂质的密度。当进行包括梯度的纯化法例如梯度离心时,不仅基于所述杂质的尺寸而且还基于所述杂质的密度的杂质的分离发生。梯度离心的实例是蔗糖梯度超离心。减小体积的步骤例如促进获得改善的病毒抗原回收和/或改善的宿主细胞DNA的去除。

[0120] 在优选实施方案中,体积可通过应用TFF超滤或一个步骤中的TFF超滤和透析过滤(TFF超滤/透析过滤)、超离心或沉淀来减小,优选使用TFF超滤以减小体积。因此,以这样的方式选择各自应用的浓缩装置(TFF、TFF超离心/透析过滤、超离心或沉淀)的每一个的设置,以便上文中指定的目的,即减小体积和浓缩病毒颗粒得到实现。在根据本发明的优选实施方案中,通过应用TFF超滤/透析过滤,使用具有50kDa-1000kDa截断值的膜,优选具有100kDa-300kDa截断值、优选不小于50kDa的膜来实现体积减小。

[0121] 在一个实施方案中,当将超离心用于减小体积时,超离心的条件可以例如是30.000g-200.000g的RCF,进行超过10min。

[0122] 在一个实施方案中,如果通过应用沉淀进行浓缩,则适当的化学品对于本领域技术人员来说是已知的并且可以例如是以各自适当的浓度存在的盐、甲醇和乙醇和聚乙二醇。适当浓度的适当化学品沉淀产物,例如包含病毒抗原的颗粒,但对所述病毒抗原无负作用或具有最低限度的负作用。这样选择化学品,以便它们不与期望的抗原例如病毒抗原反应并且不改变期望的抗原的免疫原性。

[0123] 也优选地,在步骤c)中不使用密度梯度离心法例如蔗糖梯度超离心进行减小体积的步骤。梯度超离心是需要高水平的维护的高费用和费力的方法步骤,并且操作昂贵。因此,通过省略梯度超离心步骤,可以例如在减小的生产成本和劳力方面增强所述方法。

[0124] 在一个实施方案中,使体积减小至少4倍,优选至少5倍,或至少9倍,优选至少12倍,优选至少13倍,或至少15倍,优选至少20倍,或至少25倍。常见的最大体积减小为30、35、40或45倍。在本发明中已发现,按本文中指定的倍数减小体积,特别地与以下文中指定的浓度存在的去垢剂组合,进一步促成了病毒抗原回收的增加。此外,如果将基于细胞的系统用于病毒繁殖,则可预料之外地实现增加的宿主细胞DNA的减少,例如至少2.5log的减少。

[0125] 将该减小的浓缩的包含有包膜病毒颗粒的体积直接经历增溶步骤。病毒抗原可以以不同的形式例如以大颗粒(以聚集体的形式存在和/或附着至细胞和细胞碎片)、丝状形

式病毒、完整和游离的球形病毒颗粒、病毒碎片和未与病毒缔合的疏松病毒抗原的形式存在。进行增溶步骤以使病毒抗原从不同结构释放。

[0126] 通过向步骤c)后获得的液体收获物添加包含阳离子去垢剂或由其组成的去垢剂或去垢剂混合物来增溶存在于液体收获物中的有包膜病毒。阳离子去垢剂对于本领域技术人员来说是已知的,其例如基于季铵阳离子如十六烷基三甲基溴化铵或其它烷基三甲铵盐、烷胺盐如硬脂酰醋酸胺或椰油烷基醋酸胺、苯扎氯铵和苯扎溴铵,例如苄索氯铵或甲苄索氯铵、硬脂酰胺聚氧乙烯醚或油胺聚氧乙烯醚,其中CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)是优选的。更优选,使用至少两种去垢剂的混合物。优选,去垢剂的混合物包含阳离子和非阳离子去垢剂或由其组成。优选地,去垢剂混合物包含阳离子去垢剂优选CTAB和非离子型去垢剂或由所述两类去垢剂组成,所述非离子型去垢剂是例如烷基聚乙醚氧化物、烷基聚糖苷,包括:辛基糖苷和癸基麦芽糖苷例如nonidet P10或nonidetP40表面活性剂、MEGA-8、-9或-10、Triton X100及相关去垢剂或聚山梨醇酯类例如Tween家族的去垢剂,如Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、AP0-10、AP0-12、C8E6、C10E6、C12E6、C12E8、C12E9、C12E10、C16E12、C16E21、庚烷-1,2,3-三元醇、lubrol PX、genapol家族,正-十二烷基-b-D-吡喃葡萄糖苷、thesit、pluronic家族等;优选使用聚山梨醇酯例如聚山梨醇酯80。

[0127] 在本发明的优选实施方案中,以预混合物(其意指它们存在于混合物中)的形式添加多种去垢剂,或分别地(但同时地或一种紧接另一种地)添加它们。优选地不进行其中在添加第二去垢剂之前除去第一去垢剂的去垢剂交换。

[0128] 阳离子去垢剂,优选CTAB的总量,即终浓度是高的,这表示高于通常用于增溶目的的最终量。因此,终浓度为至少约2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约3500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约4500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约5500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以及还有优选至少约6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。阳离子去垢剂的可能最大量为约8000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选约7000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选约6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。特别优选范围为约4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,约4500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约6000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,约4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,约4500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0129] 非离子型去垢剂优选聚山梨醇酯的总量即终浓度为至少约300 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约800 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约900 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约1400 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选至少约1800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。非离子型去垢剂的优选最大量为约4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选约3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,还有优选约2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。特别优选范围为约300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,约300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约1100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,约900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,约900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -约1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0130] 在其它实施方案中,在至少5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度的阳离子去垢剂存在的情况下,液体病毒收获物减小至少20倍,或在至少4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度的阳离子去垢剂存在的情况下,收获物减小至少15倍,或在至少2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度的阳离子去垢剂存在的情况下,收获物减小至少10倍。

[0131] 通过应用这些条件,可获得关于产物回收的特别有益的结果。此外,如果将基于细胞的系统用于病毒繁殖,除增加的产物回收外,可获得增加的宿主细胞DNA杂质的减少。

[0132] 在适合于实现基本上所有、优选所有存在于浓缩的液体收获物中的病毒颗粒的增溶的条件下进行增溶。在优选实施方案中,通过在0 $^{\circ}\text{C}$ 以上、优选在2 $^{\circ}\text{C}$ 至30 $^{\circ}\text{C}$ 的温度温育浓

缩的病毒收获物0.2h至20h,优选在2-25℃的温度,更优选2-8℃的温度温育0.5h至6.0h来进行增溶。

[0133] 当使用基于细胞的系统进行病毒繁殖时,优选在步骤d)之前,或在步骤a)至f)的所有步骤中不添加核酸酶,例如DNA酶,例如Benzonase®。在现有技术中,利用核酸酶,和/或利用β-丙内酯(BPL),和/或利用区带超离心和/或通过进行层析步骤处理包含病毒的液体或液体收获物,以降解和/或除去宿主细胞的核酸,从而使宿主细胞DNA杂质减少至最少。例如,对于基于流感的纯化方法,通常必须使宿主细胞DNA减少超过4log,以达到管理规定。现已令人惊讶地发现,通过应用本发明的方法,可以甚至在核酸酶处理例如Benzonase®处理不存在的情况下,实现达到管理规定的宿主细胞DNA的充分高的减少。这在成本效应和时间方面显著地增强了该方法。此外,BPL处理不是需要的并且可限定于期望的事例,如果有的话。在某些实施方案中,在步骤d)之前不进行BPL处理,在某些实施方案中,根本不进行BPL处理。

[0134] 在步骤d)后,可进行分离于步骤d)后从组合物获得的病毒核心的步骤e)。可通过导致所述期望的分离的任何适当的方法进行病毒核心的分离。

[0135] 在本发明的实施方案中,通过沉淀出病毒核心,例如通过超离心(然而在优选实施方案中,不通过密度梯度超离心)进行该分离步骤。病毒表面蛋白例如流感病毒(表面)蛋白例如HA、NA(神经氨酸酶)或M蛋白保留在上清液中,并且可将其经历进一步处理步骤以最终获得亚单位病毒疫苗。例如,被选择来沉淀出病毒核心的离心条件对于本领域技术人员来说是已知的。例如,超离心可以是以分批法或以连续法进行的,并且使用的超离心条件是在适当的温度,例如在2-25℃,更优选在2-8℃从30.000g、进行超过10分钟(min.)至200.000g、进行超过10min.。在一个实施方案中,用于沉淀出获得的病毒核心的超离心条件是在2-8℃的温度范围内以100.000g进行30min.。

[0136] 在其它实施方案中,可在步骤d)之后和步骤g)之前除去来源于步骤d)的去垢剂。该去垢剂去除可通过适合于该目的的任何方法,例如通过Amberlite处理或TFF来进行。当使用Amberlite处理时,并且在已进行步骤e)后,在优选实施方案中,以约100:1的Amberlite质量对阳离子去垢剂质量的比率将Amberlite添加至在已沉淀出病毒核心后收集的上清液,在适当的温度例如在2-8℃的范围内的温度温育适当的时间,例如8至24小时,适当地为16小时。随后,通过本领域技术人员已知的任何适当的方法,例如通过使用常规流动过滤/死端式过滤(dead end filtration)、筛子或TFF除去Amberlite。当使用过滤器时,应当以这样的方式选择:使得其能够保留大于5μm或大于7μm的颗粒。此外,可通过使用筛子除去Amberlite。适当的筛子的开口在30-200μm的范围内,优选小于150μm,更优选小于100μm,更优选约50μm。在一个实施方案中,为了去垢剂的去除,不使用层析。

[0137] 最后,在分别代表主纯化步骤或主纯化方法的步骤g)中,纯化病毒抗原。在本发明的含义内,术语“病毒抗原”表示病毒、优选有包膜病毒的部分,其可诱导受试者的抗所述抗原的免疫应答。优选地,病毒抗原是病毒蛋白质。优选,病毒膜蛋白是膜蛋白例如HA、NA或M蛋白,优选病毒膜蛋白是HA和/或NA。

[0138] 病毒抗原的纯化可通过适合从在步骤e)后获得的组合物特异性纯化出病毒抗原的任何方法来进行,或如果已进行了步骤f),则在步骤f)后进行。优选地纯化法是这样的纯化方法诸如层析法,例如离子交换层析、疏水相互作用层析、假亲和层析、亲和层析、大小排

阻层析、液-液层析等。在一个实施方案中,优选纯化法是离子交换层析和疏水相互作用层析。

[0139] 本发明的方法可用作制备病毒疫苗制剂,优选病毒疫苗,更优选流感病毒疫苗例如亚单位疫苗的总的生产方法的部分。

[0140] 本发明还涉及根据本发明的方法,其中所述方法用于疫苗生产,优选用于流感疫苗生产。产生的疫苗可以是亚单位疫苗。

[0141] 本发明还涉及本文中描述的方法,所述方法还包括将获得的纯化的病毒抗原配制成药物组合物的额外步骤,其中优选地,药物组合物是疫苗制剂或其中间产物。在特别优选的实施方案中,药物组合物是流感疫苗。该额外步骤是为了获得药物组合可能必须进行的步骤。这样的步骤可以是例如是病毒灭活步骤例如辐照步骤,例如UVC辐照步骤。一般地,这样的步骤确保病毒抗原被灭活并且不含活性污染性病毒。为了使微生物的污染减少至最低限度,例如可能必须进行生物负荷量减少过滤。此外,例如如果必须将病毒抗原配制成病毒疫苗,可能必须以一定的浓度添加佐剂。其它额外步骤可以是其它病毒抗原例如来源于另一个病毒株的病毒抗原的添加。其它额外步骤可以是缓冲液的添加和/或防腐剂的包含。其它额外步骤可以是清除步骤,或无菌过滤步骤。

[0142] 在本发明的含义内,术语“药物组合物”表示可用于身体中或身体上以预防、诊断、缓解、治疗或治愈人或动物的疾病的组合物。优选,这样的药物组合物是疫苗制剂或其中间产物,更优选有包膜病毒疫苗制剂例如流感病毒疫苗制剂,包括例如季节性、大范围流行性或流行性流感病毒疫苗制剂。大范围流行性或流行性流感病毒疫苗制剂的实例是禽、人或猪流感病毒疫苗制剂。

[0143] 本发明还涉及用于制备包含来源于基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物的病毒抗原的疫苗制剂的方法的使用,所述方法以指定的顺序包括下列步骤:

[0144] i)减小包含从基于细胞的有包膜病毒繁殖培养物获得的有包膜病毒的液体收获物的体积,从而获得浓缩的液体收获物,和

[0145] ii)通过向步骤a)中获得的浓缩的液体收获物中添加包含阳离子去垢剂的去垢剂或去垢剂混合物增溶存在于液体收获物中的有包膜病毒,

[0146] 其中在步骤i)之后紧接着进行步骤ii),和

[0147] 其中存在于疫苗制剂中的宿主细胞DNA的减少为至少2.5log,优选至少3.0log,更优选至少3.5log。

[0148] 关于术语“疫苗制剂”、“病毒抗原”、“基于细胞的”、“液体收获物”、“有包膜病毒”和“去垢剂”,参考说明书。

[0149] 令人惊讶地,通过在疫苗制剂的制备中使用上述方法,可显著地减少宿主细胞DNA污染。

[0150] 在优选实施方案中,步骤i)和ii)对应于在整个说明书中定义的步骤c)和d)。

[0151] 在其它实施方案中,在步骤i)之前,进行如整个说明书中定义的步骤a)和b),在步骤ii)之后,进行如整个说明书中定义的步骤e)和f)。

[0152] 附图概述

[0153] 图1:该图显示CTAB的浓度和总的浓缩系数即在添加去垢剂CTAB后收获物的终浓度对主要表面抗原HA的回收的作用。图1表示许多结果和图表的实例。

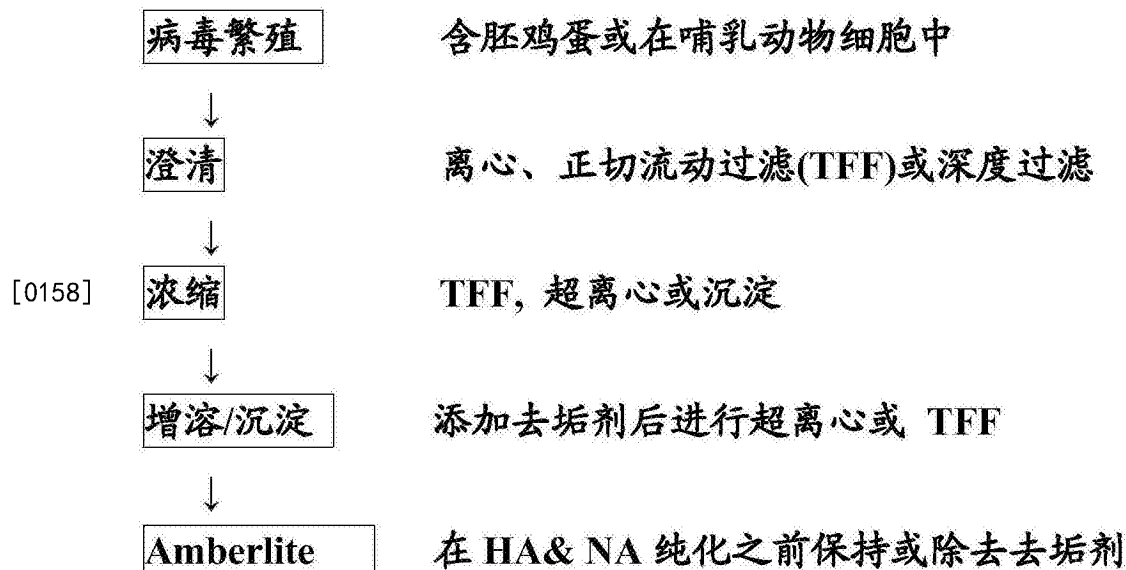
[0154] 图2:该图显示CTAB的浓度和总的浓缩系数即在添加去垢剂CTAB后收获物的终浓度对DNA减少的作用。图2表示许多结果和图表的实例。

实施例

[0155] 实施例1

[0156] 本实施例显示如何将流感病毒收获物加工成具有最小产物损失和宿主细胞DNA超过3个对数减少的病毒表面抗原血细胞凝集素(HA)和神经氨酸酶(NA)的部分纯化的中间产物。通过使用层析进一步纯化获得的中间产物。

[0157] 按下列工作流程提供方法步骤的一般概述:



[0159] 在MDCK细胞中繁殖流感病毒。通过以3220g离心8min澄清收获物。通过TFF,使用100KD-300kD的盒将澄清的收获物浓缩约4-13.7倍。在2-8℃使用2400-3000μg/ml的CTAB和600-90μg/ml Tween-80增溶澄清的浓缩的收获物。在2-8℃以100,000g将澄清的浓缩的和增溶的收获物离心30分钟。收集上清液。以100:1的Amberlite质量对CTAB质量比率将Amberlite添加至收集的上清液。在于2-8℃温育16h后,通过将悬浮液通过5μm滤器除去添加的Amberlite。滤出液是病毒表面抗原血细胞凝集素(HA)和神经氨酸酶(NA)的部分纯化的中间产物。通过单向辐射免疫扩散(SRD)测量HA,通过定量实时聚合酶链式反应(qPCR)测量DNA。

[0160] 结果示于下面:

[0161] 通过A/Uruguay X-175C回收HA,以3220g进行8min来澄清,使用300kDa的盒浓缩10倍,增溶于900μg/ml的Tween-80和3000μg/ml的CTAB中,以100,000g离心30min,用Amberlite处理收获物。在针对增溶过程中引入的稀释校正后,总的浓缩系数为4x:

[0162]

样品	HA [$\mu\text{g/ml}$]	总的 HA 回收[%]
收获物	32	
澄清的、10 倍浓缩的、增溶的、离心的、Amberlite 处理的收获物的滤出液。总的浓缩系数是 4	120	92%

[0163] 通过B/Malaysia/2506/2004WT回收HA,以300g进行2min来澄清,使用100kDa的盒浓缩4倍,增溶于600 $\mu\text{g/ml}$ 的Tween-80和2400 $\mu\text{g/ml}$ 的CTAB中,以100.000g离心30min,用Amberlite处理收获物。在针对增溶过程中引入的稀释校正后,总的浓缩系数为1.8x:

[0164]

样品	HA [$\mu\text{g/ml}$]	总的 HA 回收 [%]
收获物	25	100%
澄清和 4 倍浓缩的(100 kDa)收获物	93.5	94%
澄清的、浓缩的、增溶的、离心的、Amberlite 处理的收获物的滤出液。总的浓缩系数是 1.8x	42	93%

[0165] 通过A/California X-179A回收HA,以300g进行2min来澄清,使用100kDa的盒浓缩13.7倍,增溶于900 $\mu\text{g/ml}$ Tween-80和3000 $\mu\text{g/ml}$ CTAB中,以100.000g离心30min,用Amberlite处理收获物。在针对增溶过程中引入的稀释校正后,总的浓缩系数为4.8x:

[0166]

样品	HA [$\mu\text{g/ml}$]	总的 HA 回收 [%]	DNA [ng/ml]	DNA Log 减少
收获物	25	100%	72513	0
澄清的浓缩 13.7 倍的(100KD)收获物	292	85%	42187	1.4
澄清的、浓缩的、增溶的、离心的、Amberlite 处理的收获物的滤出	112	93%	53	3.8

[0167]

液。总的浓缩系数是 4.8x				
----------------	--	--	--	--

[0168] 实施例2

[0169] 实施例2显示澄清的、浓缩的、增溶的、Amberlite处理的收获物滤出液的HA和NA抗原可通过离子交换层析来充分纯化,以便其总蛋白质(TP)/100 μ g HA低于240 μ g/100 μ g HA并且其宿主细胞DNA少于20ng/100 μ g HA。将NA抗原与HA抗原一起共纯化。

[0170] 在MDCK细胞中繁殖流感病毒。通过以300g离心2min或以3220g离心8min澄清收获物。通过TFF,使用300kD的盒将澄清的收获物浓缩约10倍。在2-8 $^{\circ}$ C使用3000 μ g/ml的CTAB和900 μ g/ml Tween-80增溶澄清的浓缩的收获物。在2-8 $^{\circ}$ C将澄清的、浓缩的和增溶的收获物以100.000g离心30分钟。收集上清液。以100:1的Amberlite质量对CTAB质量比率将Amberlite添加至收集的上清液。在于2-8 $^{\circ}$ C温育16h后,通过将悬浮液通过5 μ m深度过滤器除去添加的Amberlite。在加载至Capto[®]Q层析柱上之前,条件化滤出液。在用上样缓冲液洗涤后,洗脱HA和NA抗原。流过,洗涤,和分级分离洗脱物。基于UV信号,就HA-SRD、NA、DNA、总蛋白质分析选择几个级分。结果示于下面:

[0171] Capto Q

[0172]

株系	上样和平衡 缓冲液的导 电率	上样和平衡 缓冲液的 pH	收集的洗 脱级分的 HA回收	总的蛋白 质 μ g/100 μ g HA	DNA ng/ 100 μ g HA	NA
A/California X-179A	6	8	45%	104	4	未测量的
A/Uruguay X-175C	5	7.3	55%	208		未测量的
A/California X-179A	4.65	8	92%	225	≥ 1	存在
A/California X-179A	3.6	8	91%	189	≥ 1	存在
A/California X-179A	3.9	8	85%	189	≥ 1	存在

[0173] 如所看到的,A/California的HA回收受到电导率影响。当电导率在3.6-4.65mS/cm的范围内时,HA回收为85%-92%。考虑到层析步骤的负荷的制备的HA回收率、澄清、浓缩、增溶和Amberlite处理步骤,对于A/California,HA的总回收率可以为约80%。将NA与HA抗原一起共纯化。宿主细胞DNA和TP的含量满足它们的规格。

[0174] 对于A/Uruguay,当电导率在pH7.3为5mS/cm时,HA回收率为55%。考虑到层析步骤的负荷的制备的HA回收率、澄清、浓缩、增溶和Amberlite处理步骤,对于A/Uruguay,HA的总回收率可以为约50%。不测量NA抗原。TP的含量满足其规格。未测量宿主细胞DNA。通过如A/California降低电导率,预期A/Uruguay的HA回收率也会增加。

[0175] 实施例3

[0176] 实施例3显示,澄清的、浓缩的、增溶的、Amberlite处理的收获物的滤出液的HA和NA抗原可通过疏水相互作用层析来充分纯化,以便其总蛋白质/100 μ g HA低于240 μ g/ml并且其宿主细胞DNA含量少于20ng/100 μ g HA。将NA抗原与HA抗原一起共纯化。

[0177] 澄清的、浓缩的、增溶的、Amberlite处理的收获物的制备与实施例2制备方法相同。条件化滤出液,随后加载至疏水相互作用层析(HIC)柱上。在用上样缓冲液洗涤后,洗脱HA和NA抗原。流过,洗涤,和分级分离洗脱物。基于UV信号,就HA-SRD、NA、DNA、总蛋白质分析选择几个级份。结果示于下面:

[0178] HIC

[0179]

菌株	上样和平衡 缓冲液的盐 浓度	上样和平衡 缓冲液的 pH	收集的洗 脱级分的 HA 回收	总的蛋白 质 $\mu\text{g}/100$ $\mu\text{g HA}$	DNA ng/ 100 μg HA	NA
A/California X-179A	2.3M	7.4	68%	152	19	存在
A/Uruguay X-175C	2.6M	7.4	91%	88	15	存在
B/Malaysia	1.5M	7.4	73%	202	8	存在
B/Malaysia	1.7M	7.4	68%	118	15	存在
B/Malaysia	2.0M	7.4	71%	180	9	存在

[0180] 如所看到的,疏水相互作用层析的A/California的HA回收在测试条件下为68%-91%。盐浓度影响HA回收率。考虑到层析步骤的负荷的制备的HA回收率、澄清、浓缩、增溶和Amberlite处理步骤,对于A/California,HA的总回收率可以为60-80%。将NA与HA抗原一起共纯化。宿主细胞DNA和TP的含量满足它们的规格。

[0181] 对于B/Malaysia,当使用的盐浓度在pH7.4为1.5-2.0M时,HA回收为约70%。考虑到层析步骤的负荷的制备的HA回收、澄清、浓缩、增溶和Amberlite处理步骤,对于B/Malaysia,HA的总回收为60%。将NA抗原与HA抗原一起共纯化。宿主细胞DNA和TP的含量满足其规格。

[0182] 实施例4

[0183] 方法和材料

[0184] 在MDCK细胞中繁殖流感病毒。通过以300g离心2min或以3220g离心8min澄清收获物。通过TFF,使用100-300kDa的盒将澄清的收获物浓缩不同的倍数。在2-8℃使用600-3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CTAB和300-900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tween-80增溶澄清的浓缩的收获物。在2-8℃将澄清的、浓缩的和增溶的收获物以100,000g离心30分钟。收集上清液。以100:1的Amberlite质量对CTAB质量比率将Amberlite添加至收集的上清液。在于2-8℃温育16h后,通过将悬浮液通过5 μm 深度过滤器除去添加的Amberlite。测量滤出液的HA-SRD(单向辐射免疫扩散测定),进行NA、DNA和总蛋白质分析。

[0185] 实施例4.1

[0186] 本实施例显示高浓缩因子与高浓度的阳离子去垢剂的组合对于抗原的回收和宿主细胞DNA的去除是优选的。使用的株系是B/Brisbane。在澄清和浓缩后,在不同的条件下在去垢剂存在的情况下温育收获物。去垢剂的浓度、温育时间和浓缩系数是可变化的。CTAB的浓度和浓缩系数对主要表面抗原HA的回收和DNA的减少的作用示于图1和图2中。如可看

到的,阳离子去垢剂的浓度和浓缩系数的增加有益于产物的回收(图1)和宿主细胞DNA的减少(图2)。

[0187] 实施例4.2

[0188] 本实施例显示B/Florida/4/2006的高产物回收率和宿主细胞DNA的显著减少都可通过使用3000 μ g/ml的CTAB和900 μ g/ml的Tween-80,随后以100.000g离心30min分钟来实现。

[0189]

样品和描述	DNA [ng/ml]	DNA 的 对数减少	SRD [μ g/ml]	HA 的回 收	注释
澄清的浓缩 8.4 倍的收获物	26349		42		
在 3000 μ g/ml CTAB & 900 μ g/ml Tween 80 中增溶的, 离心的和 Amberlite 处理的	1	4.0	23	$\geq 95\%$	稀释 2.5 倍的

[0190] 实施例4.3

[0191] 本实施例显示A/Wisconsin的高产物回收率和宿主细胞DNA的显著减少都可通过使用3000 μ g/ml的CTAB和900 μ g/ml的Tween-80,随后以100.000g离心30min分钟来实现。

[0192]

样品和描述	DNA [ng/ml]	DNA 的 对数减少	SRD [μ g/ml]	HA 的 回收	注释
澄清的浓缩 8.4 倍的收获物	32895		258		
在 3000 μ g/ml CTAB & 900 μ g/ml Tween 80 中增溶的, 离心的和 Amberlite 处理的	2	3.8	97	94%	稀释 2.5 倍的

[0193] 实施例4.4

[0194] 本实施例显示A/Victoria的高产物回收率和宿主细胞DNA的显著减少都可通过使用3000 μ g/ml的CTAB和900 μ g/ml的Tween-80,随后以100.000g离心30min分钟来实现。

[0195]

样品和描述	DNA [ng/ml]	DNA 的 对数减少	SRD [μ g/ml]	HA 的回 收	注释
澄清的浓缩 10.2 倍的收获物	37417		185		
在 3000 μ g/ml CTAB & 900 μ g/ml Tween 80 中增溶的, 离心的和	5	3.5	87	$\geq 95\%$	稀释 2.5 倍的

[0196]

Amberlite 处理的					
---------------	--	--	--	--	--

[0197] 实施例4.5

[0198] 本实施例显示A/California的高产物回收率和宿主细胞DNA的显著减少都可通过使用3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的CTAB和900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Tween-80,随后以100.000g离心30min分钟来实现。

[0199]

样品和描述	DNA [ng/ml]	DNA 的 对数减少	SRD [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	HA 的 回收	注释
澄清的浓缩 13.7 倍的收获物	42187		292		
在 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CTAB & 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tween 80 中增溶的, 离心的和 Amberlite 处理的	53	2.5	112	96%	稀释 2.5 倍的

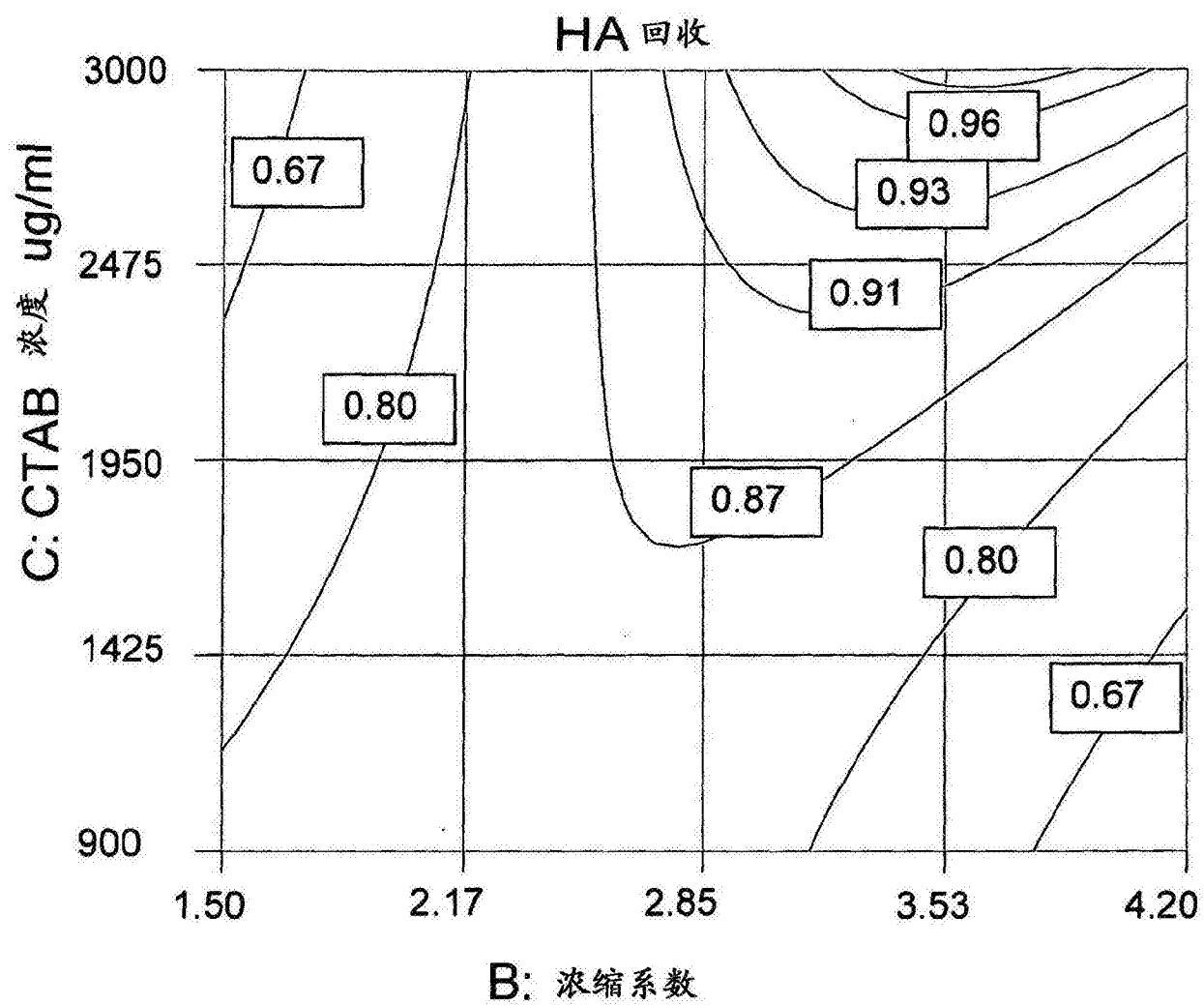


图1

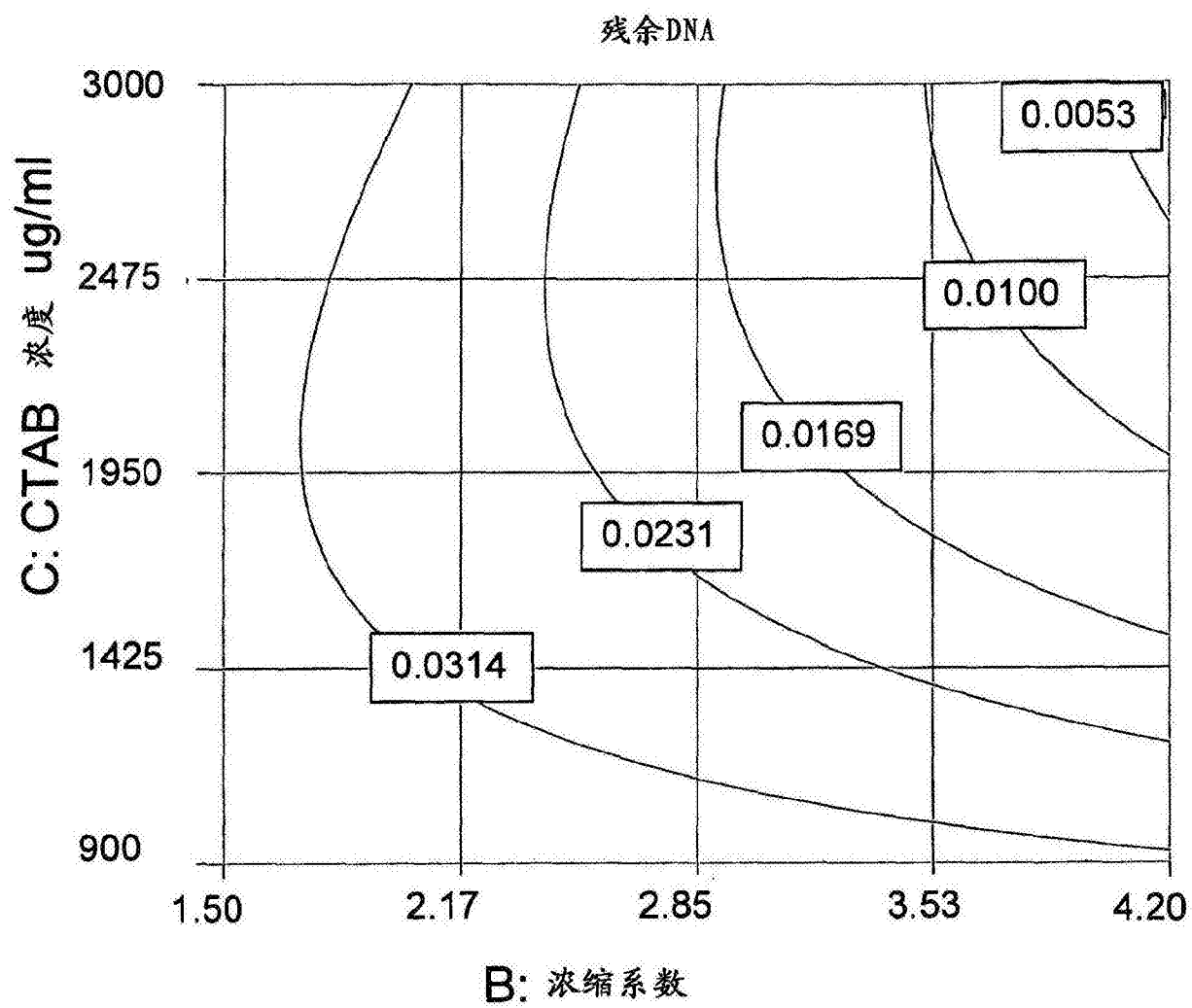


图2