



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111683737 A

(43)申请公布日 2020.09.18

(21)申请号 201980012067.8

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

(22)申请日 2019.02.15

代理人 秦剑 曹立莉

(30)优先权数据

62/632,165 2018.02.19 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.08.06

B01D 61/14(2006.01)

B01D 67/00(2006.01)

B01D 69/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/018216 2019.02.15

B01D 71/10(2006.01)

B01D 71/12(2006.01)

B01D 71/16(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/161199 EN 2019.08.22

B01D 71/20(2006.01)

C12N 7/02(2006.01)

A61L 2/00(2006.01)

(71)申请人 拜耳医药保健有限公司

地址 美国新泽西州

B01D 61/16(2006.01)

B01D 69/08(2006.01)

(72)发明人 S.刘 W.王 A.赫斯莱恩

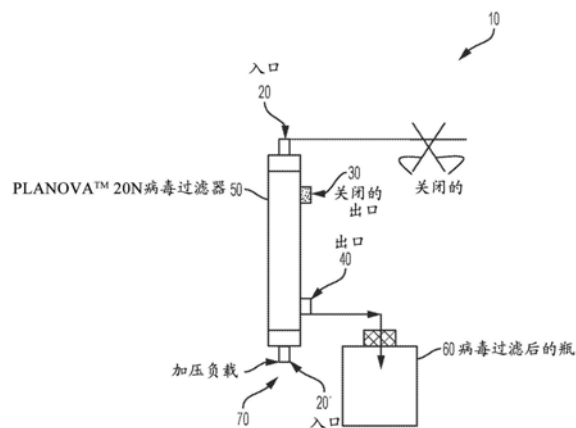
权利要求书1页 说明书9页 附图8页

(54)发明名称

修饰的滤膜和方法

(57)摘要

实施方案提供了用于分离生物产品和病毒污染物的粗溶液的修饰的滤膜。所述滤膜具有纤维素基多孔表面,以及结合至所述滤膜的纤维素基多孔表面的至少一种二价金属离子,以形成修饰的滤膜纤维素基多孔表面,其中所述修饰的纤维素基多孔表面通过截留直径大于15nm的病毒污染物同时允许直径小于15nm的生物产品通过来分离粗溶液。实施方案还提供了一种方法,该方法使用修饰的滤膜过滤生物产品和病毒污染物的粗溶液,所述方法通过将二价金属离子添加到滤膜多孔表面上形成具有孔径的尺寸在1至15nm范围内的修饰的滤膜多孔表面,并通过修饰的滤膜的多孔表面过滤生物产品和病毒污染物的粗溶液,其中所述修饰的滤膜将病毒污染物截留在多孔表面上,同时允许生物产品通过。



1. 用于分离生物产品和病毒污染物的粗溶液的修饰的滤膜,其包括:
  - (a) 具有纤维素基多孔表面的滤膜;和
  - (b) 结合到滤膜的纤维素基多孔表面上的至少一种二价金属离子,形成修饰的滤膜纤维素基多孔表面,其中所述修饰的纤维素基多孔表面通过截留直径大于15nm的病毒污染物同时允许直径小于15nm的生物产品通过来分离粗溶液。
2. 根据权利要求1所述的修饰的滤膜,其中所述二价金属离子选自 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ 。
3. 根据权利要求2所述的修饰的滤膜,其中,所述病毒污染物包括非包膜的病毒颗粒或病毒。
4. 根据权利要求3所述的修饰的滤膜,其中,所述病毒污染物包括15-25nm范围内的细小病毒或环状病毒。
5. 根据权利要求3所述的修饰的滤膜,其中,所述病毒污染物还包括选自环病毒科、腺病毒科、细小病毒科、乳多空病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科和指环病毒科的DNA病毒。
6. 根据权利要求3所述的修饰的滤膜,其中,所述病毒污染物还包括RNA病毒,该RNA病毒选自小RNA病毒科、杯状病毒科、呼肠孤病毒科、披膜病毒科、沙粒病毒科、黄病毒科、布尼亚病毒科、正粘液病毒科、副粘液病毒科、纤丝病毒科、冠状病毒科、动脉炎病毒科、肝炎病毒科和逆转录病毒科。
7. 根据权利要求1所述的修饰的滤膜,其中所述粗溶液包括蛋白质溶液。
8. 根据权利要求1所述的修饰的滤膜,其中所述二价金属离子衍生自氯化钙化合物。
9. 根据权利要求1所述的修饰的滤膜,其中,所述滤膜包括Asahi **Planova**® 20N病毒过滤器。
10. 根据权利要求1所述的修饰的滤膜,其中所述修饰的纤维素基多孔表面包括的孔径在1至30nm的范围内。
11. 根据权利要求1所述的修饰的滤膜,其中,所述纤维素基多孔表面包括的孔径在1至500nm的范围内。
12. 使用修饰的滤膜过滤生物产品和病毒污染物的粗溶液的方法,包括:
  - (a) 向滤膜多孔表面添加二价金属离子,以形成孔径尺寸为1至15nm的修饰的滤膜多孔表面;和
  - (b) 通过该修饰的滤膜的多孔表面过滤生物产品和病毒污染物的粗溶液,其中修饰的滤膜将病毒污染物截留在多孔表面上,同时允许生物产品通过。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述滤膜包括纤维素或再生纤维素材料。
14. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述滤膜包括Asahi **Planova**® 20N病毒过滤器。
15. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述粗溶液还包含选自聚山梨酯80、吐温80、吐温20、N-甲基葡糖酰胺 (MEGA) 衍生物、Triton X和衍生物的非离子型清洁剂。
16. 根据权利要求12所述的方法,其中,多孔表面包括的孔径为1至500nm。
17. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述修饰的多孔表面包括尺寸为1至15nm的孔径。

## 修饰的滤膜和方法

### 背景技术

[0001] 已经设计了各种过滤器和方法以将生物分子与杂质或污染物分离。基于尺寸排阻的过滤是一种理想的且有效的技术,用于从生物制造过程的生物反应器中清除源自哺乳动物细胞、血浆、动物/人类组织液或细胞培养液的小颗粒和病毒。当前的过滤技术可以清除各种污染物和直径超过15nm的病毒颗粒。然而,迄今为止,尚不存在有效或强大地清除小于该尺寸的颗粒和组织液的技术或过滤器。例如,小病毒和非包膜病毒(例如细小病毒和圆环病毒)很难从生物溶液中清除。这些小颗粒、病毒和痕量污染物会在生物制剂生产中引起问题,因为它们可以通过细胞培养和/或生产制造周期进行扩增。此外,当粗溶液或条件变化并且蛋白质分子大小较大且蛋白质浓度非常低时,通过病毒过滤器和方法很难获得高且一致的生物产品回收率。这些和其他问题已由本实施方案解决。

### [0002] 发明概述

[0003] 实施方案提供了修饰的滤膜,用于清除小颗粒和其他未知或未鉴定的污染物,例如存在于粗溶液中的,需要将其与目标生物产品分离的病毒。

[0004] 实施方案还提供了用于分离生物产品和病毒污染物的粗溶液的修饰的滤膜,其包括具有纤维素基多孔表面的滤膜,和至少一种二价金属离子结合在滤膜的纤维素基多孔表面上,以形成修饰的滤膜纤维素基多孔表面,其中所述修饰的纤维素基多孔表面通过截留直径大于15nm的病毒污染物同时允许直径小于15nm的生物产品通过来分离粗溶液。

[0005] 实施方式还提供了使用修饰的滤膜过滤生物产品和病毒污染物的粗溶液的方法,包括在滤膜多孔表面上加入二价金属离子以形成孔径在1至15nm范围内的修饰的滤膜多孔表面;以及通过修饰的滤膜的多孔表面过滤生物产品和病毒污染物的粗溶液,其中修饰的滤膜将病毒污染物截留在多孔表面上,同时允许生物产品通过。

[0006] 其他实施方案可任选地包括添加吐温80,以进一步增强滤膜分离的组合物和方法,并增加从粗溶液中分离的生物产品的产率。

### [0007] 附图简述

[0008] 本领域技术人员将理解,以下描述的附图仅用于说明目的。附图无意以任何方式限制本教导或权利要求的范围。

[0009] 图1显示了使用病毒滤膜(例如Planova™ 20N)的过滤系统。经由压力源(例如压缩空气或蠕动泵)将过滤器负载材料施加到再生的硝酸纤维素中空纤维膜上。滤液收集在收集容器中。

[0010] 图2显示了未修饰的病毒滤膜的多孔表面的增强部分。

[0011] 图3显示了用于二价金属离子增强的病毒过滤的方法。

[0012] 图4显示了二价金属离子纤维素基的过滤器的各种提出的机理。

[0013] 图5显示了在负载中存在CaCl<sub>2</sub>时,用病毒滤膜可增强掺入的PPV的清除。(A) 过滤缓冲液为20mM咪唑,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>,pH=6.9-7.1。(B) 过滤缓冲液为20mM咪唑,375mM NaCl,pH=6.9-7.1。A和B均在环境温度恒定压力(12-14PSI)下进行。

[0014] 图6显示,吐温80的存在和过滤温度对病毒滤膜清除掺入的PPV的影响不大。(C) 在

环境温度(15-26℃)用20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>、50ppm吐温80过滤,pH=6.9-7.1。(D)在2-8℃用20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>、50ppm吐温80过滤,pH=6.9-7.1。(E)在室温用20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>过滤,pH=6.9-7.1。(F)在2-8℃用20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>过滤,pH=6.9-7.1。

[0015] 图7显示不同的缓冲液系统的选择对病毒滤膜对掺入的PPV的清除没有显著影响。(G)在室温用20mM咪唑,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>过滤,pH=6.9-7.1。(H)在室温用20mM Tris,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>过滤,pH=6.9-7.1。(I)在室温用50mM Tris,50mM NaCl过滤,pH=6.9-7.1。(J)在室温用50mM柠檬酸,50mM NaCl过滤,pH=6.6-6.8。

[0016] 图8显示了在不同的CaCl<sub>2</sub>浓度下用病毒滤膜从掺入PPV的IgG<sub>2</sub>抗体负载中(在50mM Tris、50mM NaCl中为5.7-8.1mg/mL,pH 6.9-7.1)清除病毒作用的增强,以及EDTA螯合剂对增强作用的逆转。

[0017] 图9显示了在不同的CaCl<sub>2</sub>浓度下用病毒滤膜从掺入PPV的IgG<sub>1</sub>抗体负载中(在50mM柠檬酸、50mM NaCl中为4.9-13.1mg/mL,pH 6.6-6.8)清除病毒作用的增强,以及EGTA螯合剂对增强作用的无逆转。

[0018] 图10显示了用病毒滤膜从掺入PPV的rFV<sub>III</sub>过程中间体(在20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>、50ppm吐温80中约0.1mg/mL,pH=6.9-7.1)中完全清除PPV(至低于检测极限)。

[0019] 图11显示了当使用病毒滤膜时,吐温80对重组人因子VIII的产率一致性的改善。

[0020] 图12显示了在施加重组人因子VIII负载的情况下吐温80对病毒滤膜容量(VMax)的增强。

#### [0021] 发明详述

[0022] 本公开内容提供了用于从溶液中清除小颗粒和病毒污染物的组成物,包括修饰的滤膜。

#### [0023] 定义

[0024] 为了解释本说明书,将采用以下定义。如果以下列出的任何定义与任何其他文件(包括通过引用并入本文的任何文件)中该词的用法相冲突,除非明确指出相反的含义(例如,在最初使用该术语的文档中),否则应始终以下文中列出的定义为准来解释本说明书及其相关权利要求。

[0025] 只要适当,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。除非另有说明,或者在使用“一个或多个”显然不合适的情况下,本文中“一个”的使用表示“一个或多个”。除非另有说明,否则“或”的使用表示“和/或”。“包含”,“包括”和“含有”的使用是可互换的,而不是限制性的。术语“如”和“例如”也并非限制性的。例如,术语“包括”应表示“包括但不限于”。

[0026] 如本文所用,术语“粗溶液”或“粗负载”通常是指包含一种或多种生物材料或分子的未加工或未纯化的溶液或材料。在此溶液或材料中还可能存在一种或多种先前可能已经识别或可能尚未识别的污染物。例如,病毒可能是“粗溶液”中存在的一种污染物。还可以预期,“粗溶液”还包含可能存在或希望与目标生物产品分离的其他病原体 and 污染物。

[0027] 如本文所用,术语“约”是指所提供的单位值的+/-10%。

[0028] 如本文所用,术语“基本上”是指表现出所关注的特征或特性的总体或近似程度的

定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解,由于许多影响生物产品、化学成分和材料的测试、生产和储存的变量,并且由于用于测试、生产和储存生物产品和化学成分及材料的仪器和设备存在固有误差,生物产品和化学现象很少(如果有的话)获得或避免绝对结果。因此,术语“基本上”在本文中用于表达许多生物学和化学现象中固有的潜在完整性缺乏。

[0029] 过滤系统:

[0030] 所描述的实施方案可以多种方式修改和改变。所描述的系统绝不应限制可能的应用和实施方案的范围。参考图1,本实施方案的过滤系统10提供入口20或20',关闭的出口30,开放的出口40,滤膜例如Planova™ 20N病毒过滤器50,以及至少一个收集容器60。过滤系统10还具有加压负载入口70,在该负载入口70中,可以将粗负载加载到系统中并置于压力下以将生物产品22与污染物分离(生物产品22未在图1中示出)。

[0031] 滤膜:

[0032] 实施方案提供了一个或多个可构造或购买的滤膜50的用途。例如,滤膜50可具有包含纤维素、再生纤维素和/或硝酸纤维素基材料或组合物的多孔表面。另外,本实施方案的滤膜可以包含Asahi Planova® 20N病毒过滤器。本领域已知的其他类型的过滤器也可以与本实施方案一起使用。重要的是,滤膜50能够被修饰以有效地从需要分离、收集和/或纯化的目标生物产品22中功能性地清除具有限定尺寸和形状的污染物。此外,滤膜50必须能够结合一种或多种二价金属离子以成为如下文进一步描述的修饰的滤膜50'。

[0033] 具有包含未修饰的纳米孔径直径的多孔表面的再生的纤维素基滤膜具有相对较高的容量和低成本。再生纤维素膜的多孔表面的增强视图如图2所示。典型的多孔表面可包括形状和尺寸不同的孔径。例如,未修饰的多孔表面孔径的直径范围可以为1至500nm。其他可能的孔径也是可能的。多孔表面和孔径可以变化,并且通常不能有效地将生物产品与其他蛋白质或污染物分离。在许多情况下,过滤器孔径太大或病毒直径太小。在任一种情况下,从病毒或其他污染物中分离出生物产品22都特别困难。

[0034] 可以预期的是,本实施方案可以包括各种类型的纤维素基过滤器。纤维素是具有不确定数目的葡萄糖部分的线性多糖。通过经典的粘胶技术或铜铵法或N-甲基吗啉-N-氧化物(NMMO)法将纤维素转化为纤维素衍生物(醚和酯)和再生材料(纤维,薄膜等)。通过铜铵(cuprammonium)法生产纤维素再生材料会引入通过Cu<sup>2+</sup>桥与纤维素的羟基络合的铜氨(cuprammonia) (H<sub>2</sub>N-Cu<sup>2+</sup>-NH<sub>2</sub>)。从理论上讲,这种结构可以为钙离子提供潜在的结合位点(见图4)。

[0035] 修饰的滤膜:

[0036] 需要对滤膜进行修饰,以使其能够有效地将生物产品与污染物分离。本实施方案要求将一种或多种二价离子键合或附着到滤膜50上,以产生本实施方案的修饰的滤膜50'。可以将二价离子添加到测定溶液中,并且可以包含Cu<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>和Zn<sup>2+</sup>。本领域已知的其他类似的二价离子可用于本实施方案。

[0037] 提出的机制:

[0038] 对于本实施方案而言重要的是,修饰的滤膜50'提供了能够从粗负载溶液中将污染物从目标生物产品22分离出的功能性能力。

[0039] 通过二价金属离子(例如Ca<sup>2+</sup>离子)提高病毒截留能力的机制尚不十分清楚。一种理论认为,在纤维素再生过程中发生氧化,导致纤维素链的还原端形成羧基。通过羧基的解

离,再生纤维素纤维可以充当弱阴离子交换剂,因此所有类型的再生纤维素纤维(如莱赛尔(lyocell)纤维、粘胶纤维和莫代尔纤维(modal fiber))都显示独特的结合 $\text{Ca}^{2+}$ 离子的能力。一种可能性是 $\text{Ca}^{2+}$ 离子与羧基的结合可能明显“缩小”纤维素膜上的孔,并使病毒更难以通过。我们进一步提出,其他二价离子(例如 $\text{Cu}^{2+}$ )对于再生纤维素膜可能具有类似的增强病毒清除的效果,尤其是当使用铜铵法进行再生时,纤维素中仍存在少量的残留 $\text{Cu}^{2+}$ 。一些提出的机制表明病毒污染物中的Asp或Glu残基与修饰的滤膜结合,如图4所示。二价金属离子,即 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Ca}^{2+}$ 与再生的多孔纤维素膜中的羟基以及病毒污染物中Asp或Glu的羧基相互作用,导致病毒与滤膜结合。在生物溶液的过滤试验中,当使用再生纤维素过滤器时,单独的尺寸排阻通常会对细小病毒产生约3-5LRF。一旦使用一定水平的二价金属离子,就可以实现额外的2-4LRF和/或完全清除PPV。

[0040] 如上所述的修饰的滤膜50'可以包括纤维素或再生的纤维素基多孔表面。在未修饰的形式中,滤膜的孔通常可以具有1-500nm范围内的孔直径。滤膜一旦被修饰,就可以改变其孔径。修饰后的孔径可能在1至15nm的范围内。应当理解,这些仅仅是一些一般的估计,并且其他可能性和尺寸在本实施方案的范围内。

[0041] 病毒污染物和小颗粒:

[0042] 此外,还可以预期的是,本实施方案的修饰的滤膜50'可以用于从污染物中分离出许多不同类型的生物产品。污染物可以包括任意数量的已知或未知的生物材料、小颗粒和/或病原体。例如,病毒呈现出一种特别困难的污染物类型,需要将其与生物产品小心分离。与本实施方案有关的各种类型的病毒可以是DNA和/或RNA病毒。例如,病毒污染物可包括选自环病毒科、腺病毒科、细小病毒科、乳多空病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科(Poxiviridae)和指环病毒科的DNA病毒。

[0043] 此外,病毒污染物还可以包括RNA病毒,该RNA病毒选自小RNA病毒科、杯状病毒科、呼肠孤病毒科、披膜病毒科、沙粒病毒科、黄病毒科、布尼亚病毒科、正粘液病毒科、副粘液病毒科、纤丝病毒科、冠状病毒科、动脉炎病毒科、肝炎病毒科(Hepeviridase)和逆转录病毒科。

[0044] 其他可能的病毒污染物也是本领域中预期和已知的。本列表绝不应限制本实施方案的范围。

[0045] 生物产品:

[0046] 本实施方案和修饰的滤膜50'可以用于从生物产品22中分离各种污染物。可以分离的生物产品22可以包括抗体、蛋白质、肽、配体和受体。可以从病毒污染物中分离出各种类型的抗体类别。例如,本实施方案对于IgG<sub>1</sub>和/或IgG<sub>2</sub>抗体负载是有效的。此外,某些蛋白质和蛋白质片段可包括因子VIII和相关的片段和/或截短或缺失的蛋白质和部分。

[0047] 过滤方法:

[0048] 上文中已经描述了过滤系统10和滤膜50以及修饰的滤膜50'的组成,此处是为了描述如何将本发明的实施方案用于从目标生物产品22中分离污染物。参考图3,现在将进一步描述本实施方案的方法。本实施方案的方法首先是制备要加载到过滤系统10中的粗负载溶液12(未示出)。粗负载溶液12包含具有一种或多种污染物的目标生物产品22。污染物可以是其他蛋白质或生物材料和/或病毒。还存在于粗负载溶液12中的是测定缓冲液,其可以包含吐温80或一种或多种其他赋形剂、以及至少一种二价金属离子,例如 $\text{Ca}^{2+}$ 。

[0049] 粗负载溶液12被加载在入口或进入口70处,在该处其可以处于压力下并暂时存储在收集室14中。然后将粗负载溶液12置于高压下并穿过第一连接管16直到其接触滤膜50。存在于粗负载溶液和测定缓冲液中的任何二价金属离子结合至滤膜50的多孔表面,从而将其变为修饰的滤膜50'。然后将病毒或污染物结合到修饰的滤膜50'上,同时目标生物产品22可以穿过第二连接管18进入收集容器60。然后可以从收集容器60收集目标最终生物产品22。

## 实施例

[0050] 实施例1-过滤缓冲液

[0051] 为了实现完全的病毒截留,生物溶液包含中性pH缓冲剂、氯化钠、至少一种二价金属离子,即Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>。其他成分(例如非离子型清洁剂)可能有助于过滤过程和病毒污染物的清除。以下缓冲液通常用于过滤缓冲液基质评估。也可以使用本领域已知的其他缓冲液。

[0052] 20mM咪唑,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>,pH=6.9-7.1;

[0053] 20mM咪唑,375mM NaCl,pH=6.9-7.1;

[0054] 20mM咪唑,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>、50ppm吐温80,pH=6.9-7.1;

[0055] 20mM Tris,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>,pH=6.9-7.1;

[0056] 50mM Tris,50mM NaCl,pH=6.9-7.1;

[0057] 50mM柠檬酸,50mM NaCl,pH=6.6-6.8。

[0058] 过滤缓冲液可以是制备的或购买的。所有化学品(例如咪唑、Tris、柠檬酸、氯化钠、氯化钙、吐温80、EDTA和EGTA)均购自Fisher Scientific。每种缓冲液的制备是在环境温度下进行的,方法是使用天平或量筒量取适量的每种组分,在500mL或1000mL容器中将所有成分溶解并混合于纯净水中,溶液体积接近制备目标。用pH计测量缓冲液的pH,并使用HCl或NaOH溶液调节至目标pH范围。通过加入纯净水使最终的缓冲液达到目标体积。还用导电仪测量每种制备的缓冲液的电导率。使用前,将每种制备的缓冲液通过0.22μm过滤器过滤。

[0059] 实施例2-IgG<sub>1</sub>过滤负载材料

[0060] 50mM柠檬酸、50mM NaCl,pH 6.6-6.8中的4.9-13.1mg/mL重组人IgG<sub>1</sub>。该材料从拜耳制造工厂获得。它是一种过程中间体样品,即来自纯化过程中阳离子交换柱步骤的洗脱物。

[0061] 实施例3-IgG<sub>2</sub>过滤负载材料

[0062] 在其他地方获得50mM Tris、50mM NaCl,pH 6.9-7.1中的5.7-8.1mg/mL重组IgG<sub>2</sub>。它是一种过程中间体样品,即来自纯化过程中阴离子交换膜吸附器步骤的流过物(flow through)。

[0063] 实施例4-重组FVIII负载材料

[0064] 20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>、0-100ppm吐温80,pH=6.9-7.1中的0.1mg/mL重组人因子FVIII(rFVIII)。该材料在其他地方获得。它是一种过程中间体样品,即来自纯化过程中阳离子交换柱步骤的洗脱物。

[0065] 实施例5-病毒原种

[0066] PPV (NADL-2菌株,ATCC#VR-742)原种购自BioReliance (Rockville,MD)。在使用

前,使用50%组织培养物感染剂量(TCID<sub>50</sub>)测定法确认了供应商认证的病毒滴度(titer)。用于掺加病毒过滤器用的负载材料的病毒原种约为10log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL。

[0067] 实施例6-细胞系和培养基

[0068] PK13(ATCC#CRL-6489)细胞系购自ATCC。Dulbecco的改良Eagle培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)和青霉素/链霉素(例如100x)购自Fisher Scientific。通过在无菌容器中混合适当体积的组分,然后通过0.22μm过滤器过滤,来制备用于PK13细胞培养和PPV TCID<sub>50</sub>测定的培养生长培养基和2X测定培养基。最终制备的生长培养基是DMEM,10%FBS,100μg/mL青霉素/链霉素。最终制备的2X测定培养基为DMEM,4%FBS,200μg/mL青霉素/链霉素。

[0069] 测定实施例

[0070] 实施例1-过滤过程

[0071] 通过病毒滤膜的过滤过程是通过压缩空气或设置为恒定压力的蠕动泵(例如Scilog FilterTec泵)驱动的(见图1)。在使用之前,使用本领域已知的气泡点法测试过滤器的膜完整性。用水冲洗病毒过滤器,并用适当的病毒过滤缓冲液平衡。

[0072] 然后将生物负载材料以12至14PSI的恒定压力施加到未经修饰的病毒过滤器上。加载完成后,进一步向过滤器追加(chase with)病毒过滤缓冲液。收集来自追加液(chase)的流出物,并将其与负载步骤的滤液合并。

[0073] 在每个过滤运行中,通过分析天平测量负载量和滤液量。还记录了每个步骤(加载和追加)的持续时间,以评估平均流速。

[0074] 实施例2-病毒滴定

[0075] 使用终点稀释测定法,即TCID<sub>50</sub>测定法,进行PPV滴定。将PK13细胞以每孔2000-4000个细胞的密度接种在96孔板中,并根据安全实验室标准操作程序,在37℃和4-6%CO<sub>2</sub>的潮湿培养箱中温育过夜。将试验样品和阳性对照样品在DMEM培养基中连续稀释(例如1:3.2连续稀释)。将每种稀释水平接种到接种的PK13细胞的8孔的相应列上(除去废培养基,每孔接种100μL接种物),并使其在上述培养箱中感染细胞1.5-2.5小时。最后,将100μL的2X测定培养基添加到每个孔中,并将测定板放回培养箱中,以持续感染并发展细胞病变效应(CPE)6-7天。对与每个样品稀释水平相对应的每个孔进行CPE评分,并使用在受控Microsoft Excel工作表中实施的Spearman **Kärber**公式计算病毒滴度。

[0076] 实施例3-rFVIII活性的显色测定

[0077] 使用**COATEST®FVIII**试剂盒(DiaPharma目录号824094)通过显色测定法确定rFVIII活性。根据欧洲药典6.0第2.7.4节(人类凝血因子VIII的测定),FVIII标准曲线稀释水平为1-10mIU/mL。使用的FVIII标准和对照是符合世界卫生组织(WHO)FVIII标准要求的拜耳内部产品。适当稀释测定样品,以使最终FVIII浓度与根据初始估算的1-10mIU/mL的范围重叠。显色反应和吸光度读数根据测定试剂盒说明书和标准实验室程序中所述的程序进行。从上述线性回归拟合标准曲线计算出测定样品的rFVIII活性。如果测定样品中FVIII活性的初始估算未能产生与校准曲线的1-10mIU/mL范围重叠的样品稀释水平,则重复该测定。

[0078] 实施例4-病毒掺入的缓冲液的过滤

[0079] 如上所述,通过将PPV测试病毒(例如1:100掺入比)掺入到目标缓冲液中来制备过滤负载。将目标负载量在12-14psi恒压下施加到病毒滤膜上,并收集滤液(图1)。通过PPV



TCID<sub>50</sub>测定确定掺入负载样品和滤液样品中的病毒滴度。Log<sub>10</sub>折减系数(LRF)是病毒清除能力的衡量指标,计算为加载到过滤器上的总病毒感染性与滤液(filtrate)中总病毒感染性之间的log<sub>10</sub>差异。

[0080] 图5显示,负载中的二价Ca<sup>2+</sup>离子(43mM CaCl<sub>2</sub>)显著增强了再生纤维素病毒滤膜对PPV的清除。滤液中的病毒滴度低于含有Ca<sup>2+</sup>的检测的测试极限(图(panel)A),表明与负载中不含Ca<sup>2+</sup>相比,PPV清除率有至少两个log<sub>10</sub>的改进(图B)。

[0081] 图6显示,通过Ca<sup>2+</sup>离子导致的病毒清除效果的增强不受吐温80(0相对于50ppm)的存在和过滤温度(环境温度相对于2-8°C)的影响。来自所有四个过滤运行的滤液中的病毒滴度均低于检测的测试极限。图E中显示的较高范围归因于使用大样品量的TCID<sub>50</sub>测定的改善的检测极限。

[0082] 图7显示,不同缓冲液系统(20mM咪唑相对于20mM Tris,或50mM Tris相对于50mM 柠檬酸)对Ca<sup>2+</sup>导致的病毒清除效果的增强没有影响。使用Ca<sup>2+</sup>时,滤液中的病毒滴度低于在咪唑(图G)或Tris(图H)缓冲液中检测的测试极限。在没有Ca<sup>2+</sup>的情况下,在两种缓冲液(图I和J)中都检测了滤液中的病毒滴度,表明通过Ca<sup>2+</sup>离子至少有≥1000-10000倍或3-4log<sub>10</sub>折减系数(LRF)的病毒清除率提高。

[0083] 实施例5-病毒掺入的IgG<sub>2</sub>负载的过滤

[0084] 通过将PPV测试病毒(例如1:100掺入比例)掺入纯化过程中间体样品的5.7-8.1mg/mL IgG<sub>2</sub>单克隆抗体溶液中来制备负载。将负载以12-14psi的恒定压力施加到病毒滤膜上,并收集滤液(图1)。通过PPV TCID<sub>50</sub>测定确定掺入的负载样品和滤液样品中的病毒滴度。LRF计算为加载到过滤器上的总病毒感染性与滤液中总病毒感染性之间的log<sub>10</sub>差异。

[0085] 图8显示了在5.0、19.7和38.8mM浓度下Ca<sup>2+</sup>离子导致的PPV清除率的提高,并且在负载中添加45.4mM EDTA螯合剂可有效逆转这种提高。Ca<sup>2+</sup>离子在5mM时已达到最大效果,并在整个测试的Ca<sup>2+</sup>浓度范围内达到稳定水平的病毒清除率的提高。通过加入EDTA作为Ca<sup>2+</sup>的螯合剂,不再观察到病毒清除增强作用,这表明观察到的增强作用特别是由于Ca<sup>2+</sup>的存在。

[0086] 实施例6-病毒掺入的IgG<sub>1</sub>负载的过滤

[0087] 通过将PPV(例如1:100掺入比)掺入纯化过程中间体样品的4.9-13.1mg/mL IgG<sub>1</sub>单克隆抗体溶液中来制备负载。将负载以12-14psi的恒定压力施加到病毒滤膜上,并收集滤液(图1)。通过PPV TCID<sub>50</sub>测定确定掺入的负载样品和滤液样品中的病毒滴度。LRF计算为加载到过滤器上的总病毒感染性与滤液中总病毒感染性之间的log<sub>10</sub>差异。

[0088] 图9显示了Ca<sup>2+</sup>离子在1.0、4.8和10.0mM浓度水平下导致PPV清除率的提高,并且在负载中添加12.0mM EGTA螯合剂并没有明显逆转这种提高(可能是由于EGTA与钙离子的弱结合)。Ca<sup>2+</sup>在1mM处达到最大效果,并在测试的Ca<sup>2+</sup>浓度范围内达到稳定水平的病毒清除率的提高,表明通过Ca<sup>2+</sup>有2-3log<sub>10</sub>病毒清除率提高。EGTA(不是EDTA)的添加(EGTA是Mg<sup>2+</sup>的特定螯合剂而不是Ca<sup>2+</sup>的特定螯合剂),并没有完全地显著逆转病毒清除率的提高,重申了这种增强作用是由Ca<sup>2+</sup>离子特异性地实现的。

[0089] 实施例7-rFVIII负载的过滤

[0090] 调整Bayer rFVIII过程中间体的未掺入的病毒过滤负载样品,使其包含各种浓度的吐温80(0-100ppm),并在12-14psi恒压下将其施加到病毒滤膜,并收集滤液(图1)。负载

样品和滤液样品均进行显色测定以确定FVⅢ活性。rFVⅢ的产率计算为滤液中FVⅢ总活性与负载中FVⅢ总活性的百分比(见表1)。

[0091] 表1. 在存在CaCl<sub>2</sub>的情况下,使用再生纤维素过滤器从重组人因子VⅢ过程中间体中清除病毒

产物	MW (kDa)	表观 尺寸 (nm)	模型病毒的对数折减系数 (LRF)			
			PPV	Reo 3	X-MuLV	PRV
			15-24	60-80	80-100	120-200
rFVⅢ-WT	300	14	≥6.13±0.15	≥5.97±0.15	≥5.12±0.16	≥6.38±0.19
rFVⅢ-BDD	224	NT	≥ 8.03±0.28	≥	≥	≥
[0093]				5.82±0.32	5.92±0.25	4.30±0.62

[0094] 表中的LRF值是每种工艺条件的三个重复试验(N=3)的平均值。rFVⅢ-WT:重组人因子VⅢ(rFVⅢ)野生型,且rFVⅢ-BDD:FVⅢ的rFVⅢ结合域缺失(BDD)亚分子。NT:未测量rFVⅢ-BDD的直径,但其大小与rFVⅢ-WT近似。

[0095] 病毒过滤负载溶液,其中在20mM咪唑、300mM NaCl、43mM CaCl<sub>2</sub>、50ppm吐温80,pH=6.9-7.1中制备了包含重组野生型(wt)人因子VⅢ(rFVⅢ-WT)或重组人因子VⅢ结合域缺失(BDD)(rFVⅢ-BDD)分子的过程中间体。首先分别将猪细小病毒(PPV)、Reo 3病毒(Reo 3)、异嗜性鼠白血病毒(X-MuLV)或猪伪狂犬病病毒(PRV)掺入负载样品,然后分别通过0.45μm过滤器(Corning目录号430320或类似产品)的预过滤器进行过滤。使用的铜氨再生病毒过滤器为Planova® 20N(0.001m<sup>2</sup>),Asahi Kasei Medical Co.,目录号20NZ-001(9-1,Kanda Mitoshiro-cho,Chiyoda-ku,Tokyo,101-8482Japan)。首先用样品缓冲液冲洗病毒过滤器,并进行单独测试以确保各自是完整的。通过Planova® 20N(0.001m<sup>2</sup>)病毒过滤器过滤每种病毒掺入的样品。通过为每种病毒专门设计的TCID<sub>50</sub>测定法确定每种病毒掺入的负载和滤液中的病毒滴度。通过从每次过滤实验的负载滴度中减去滤液中的病毒滴度来计算病毒清除结果,即对数折减系数(LRF)。对于每种掺入的病毒,进行三个单独的实验。对每种模型病毒使用三个实验结果计算出具有95%置信区间的平均值。结果表明,当负载溶液含有CaCl<sub>2</sub>时,使用感染性测定的再生的纤维素病毒过滤器(≈20 nm孔径)将所有四种模型病毒去除到检测极限(完全去除)。完全去除不取决于病毒的形态、尺寸,也不取决于全长(rFVⅢ-wt)或BDD重组rFVⅢ(请参见表1)。

[0096] 图10显示了通过病毒滤膜从掺入的rFVⅢ过程中间体(在20mM咪唑,300mM NaCl,43mM CaCl<sub>2</sub>,50ppm吐温80,pH=6.9-7.1中约为0.1mg/mL)中完全清除PPV(至低于检测极限)。

[0097] 通过将PPV(例如1:50掺入比)掺入从BayerrFVⅢ制造活动过程中获得的rFVⅢ病毒过滤负载样品溶液中来制备病毒掺入的负载。将负载在12-16psi恒压下施加到病毒滤膜上,并收集滤液(图1)。通过PPV TCID<sub>50</sub>测定确定掺入的负载样品和滤液样品中的病毒滴度。LRF计算为加载到过滤器上的总病毒感染性与滤液中总病毒感染性之间的log<sub>10</sub>差异。

[0098] 图10显示了两种Bayer rFVIII产品的完全PPV清除结果(低于TCID<sub>50</sub>测定的检测极限)。图X是使用含有全长rFVIII蛋白的负载材料进行的三次重复过滤运行的平均清除率结果。图Y是使用含有B结构域缺失的rFVIII蛋白的负载材料进行六次重复过滤运行的平均结果。两种负载材料在含43mM CaCl<sub>2</sub>的缓冲液(与图3中图A所示相同的缓冲液系统)中均含有约0.1mg/mL rFVIII。在图X中观察到的相对较低的LRF范围是由于在相应的过滤研究中使用了相对较低滴度的PPV原种病毒。这些结果与观察结果一致,即负载中Ca<sup>2+</sup>离子的存在显著增强了滤膜的病毒清除率。

[0099] 使用再生纤维素中空纤维膜过滤器分离重组FVIII产品,具有优异的病毒去除效果和其他生物产品生产能力。在开发和优化过程中,意外发现了修饰的病毒滤膜和过滤器。此外,还发现二价金属离子,例如钙离子(Ca<sup>2+</sup>)可以大大增强再生纤维素基病毒过滤器(Asahi Kasei Bioprocess, Inc.生产的Planova™ 20N)的细小病毒清除能力。修饰的滤膜和多孔表面对蛋白质和抗体的粗负载均有效。在我们的研究中,使用猪细小病毒(PPV)评估修饰的病毒滤膜对病毒污染物的清除,因为细小病毒是一种小型无包膜病毒,代表难以清除的病毒。

[0100] 猪细小病毒是细小病毒科中的一种非包膜单链DNA病毒。该病毒通常被选作非特异性模型病毒,用于评估生物制造工艺步骤的病毒清除率,因为它对极端化学和物理环境具有很高的耐受性。PPV病毒颗粒非常小(15-24nm),这使得其很难通过基于尺寸排阻的病毒过滤来去除。

[0101] 图11显示,存在25-100ppm的吐温80对应于始终如一的高收率(94-104%),而没有吐温80则收率的一致性较低(63-102%)。

[0102] 图12显示,在存在25-100ppm吐温80的条件下,病毒滤膜的容量(V<sub>Max</sub>)(256-1250M/L<sup>2</sup>)相比在不存在吐温80的条件下(147-270L/M<sup>2</sup>)更高。

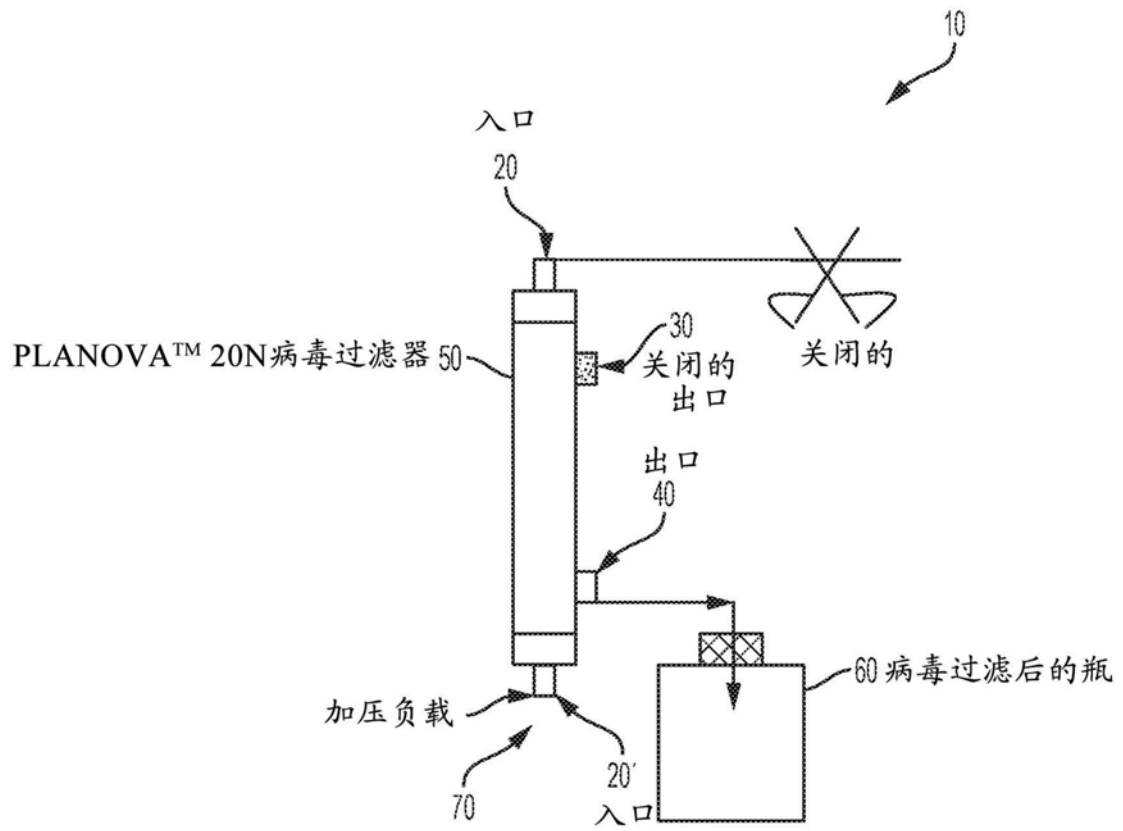


图1

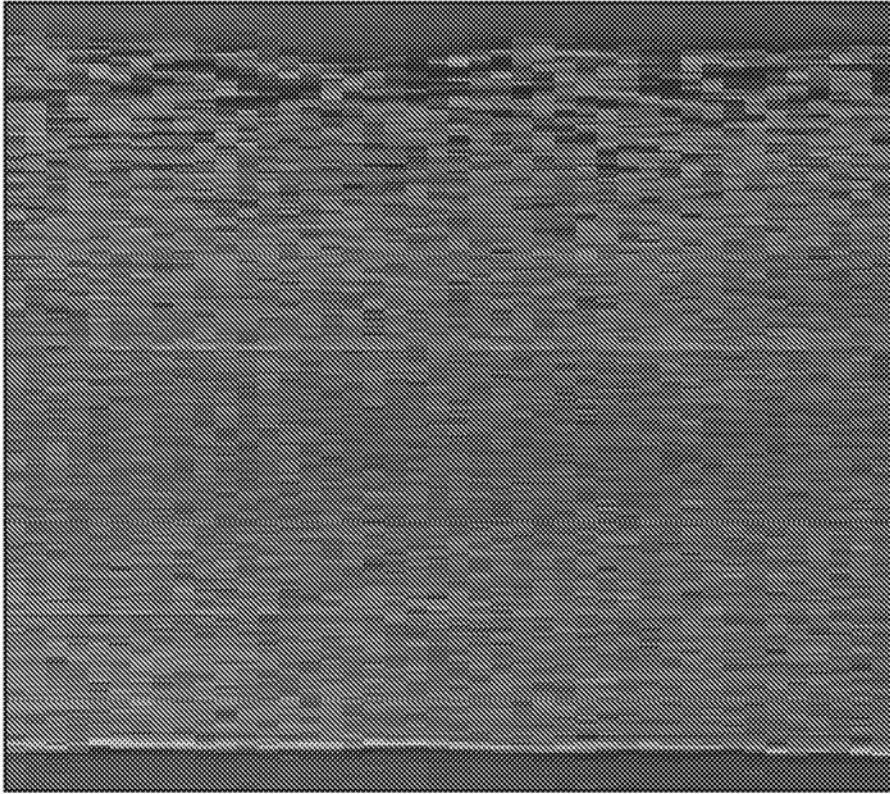


图2

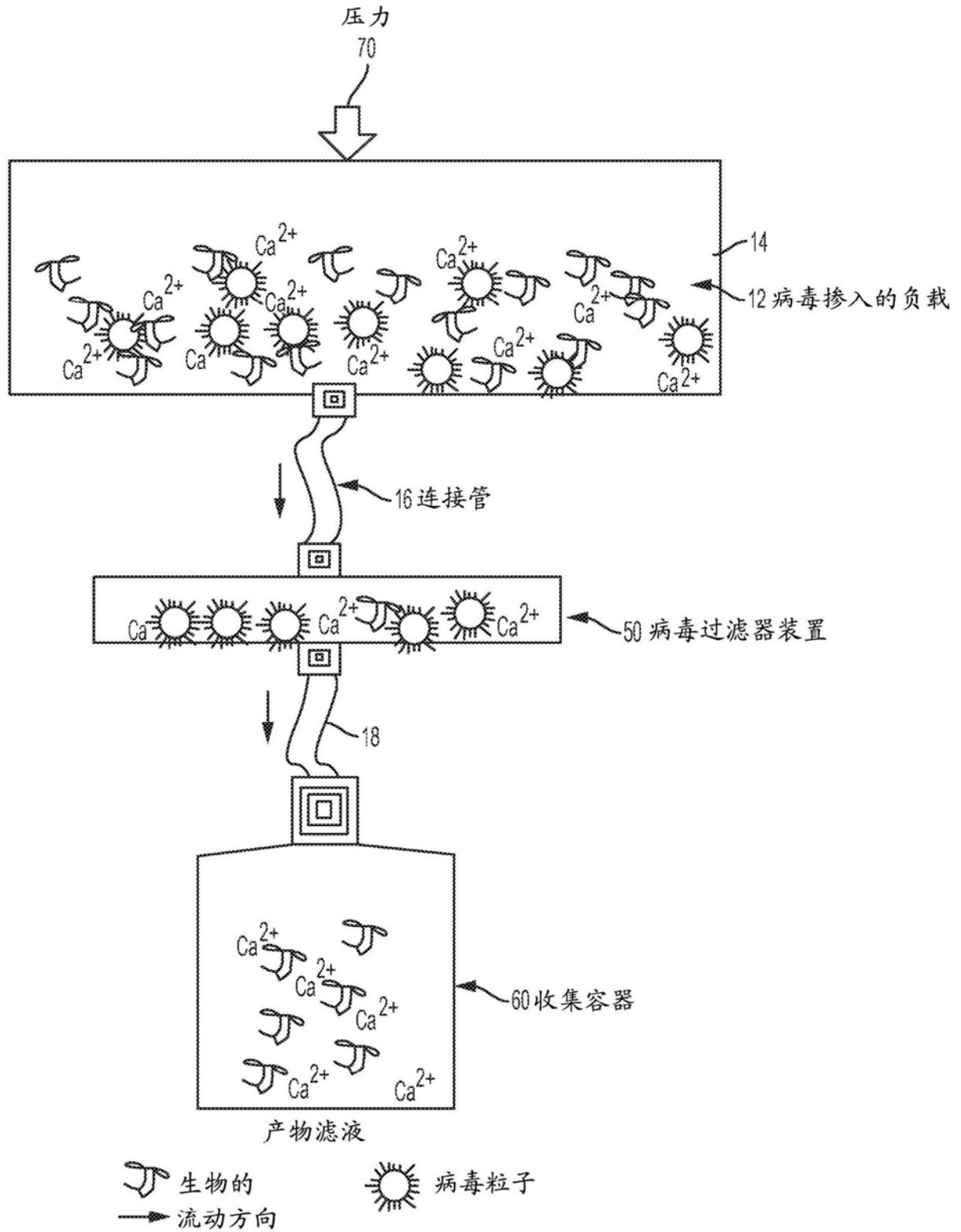


图3

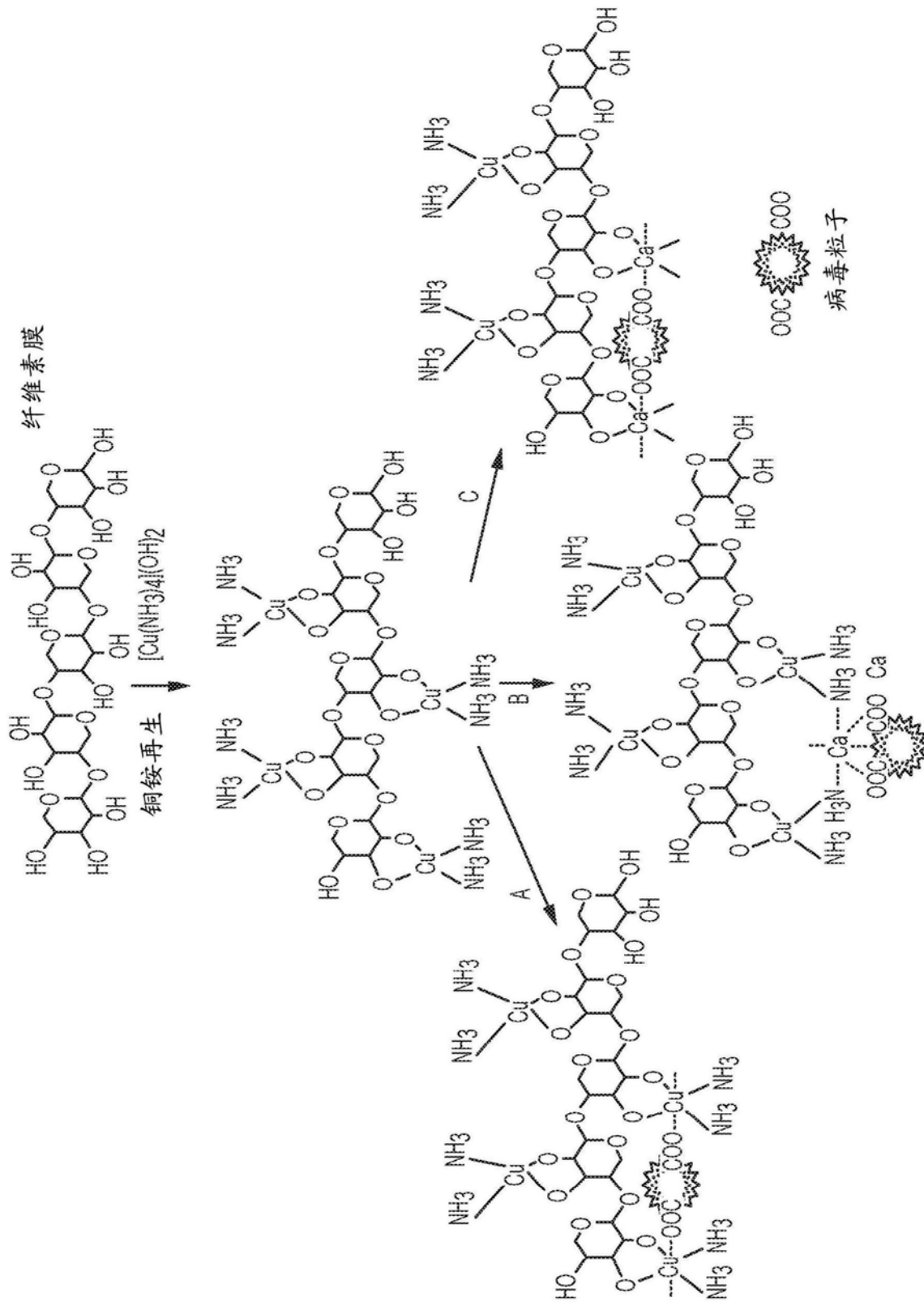


图4

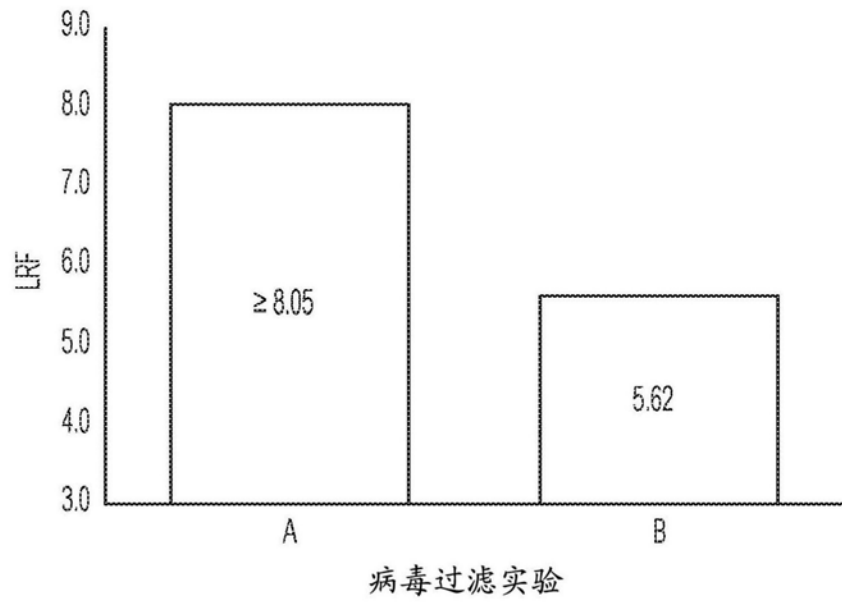


图5

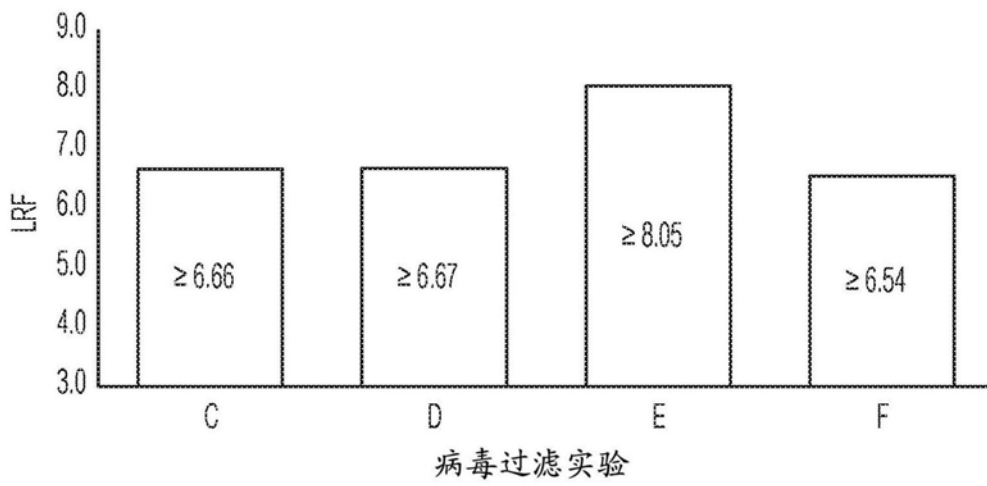


图6



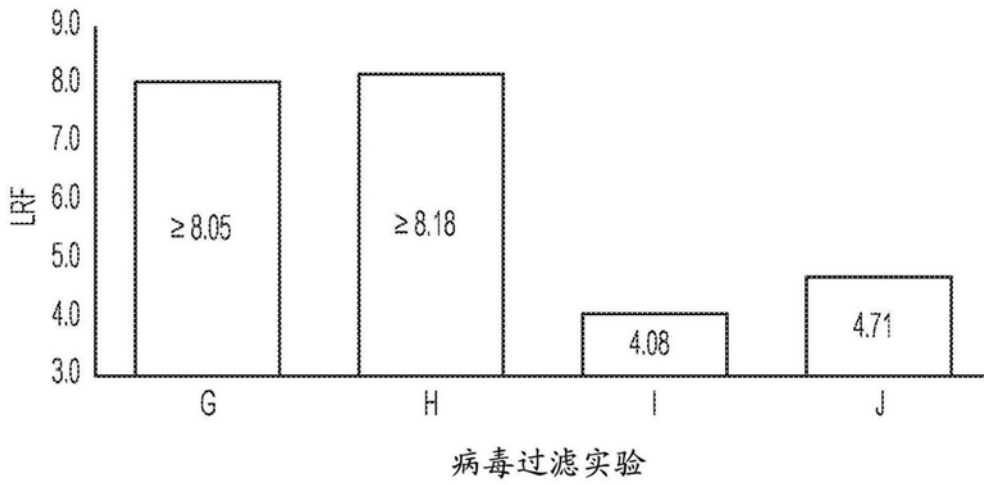


图7

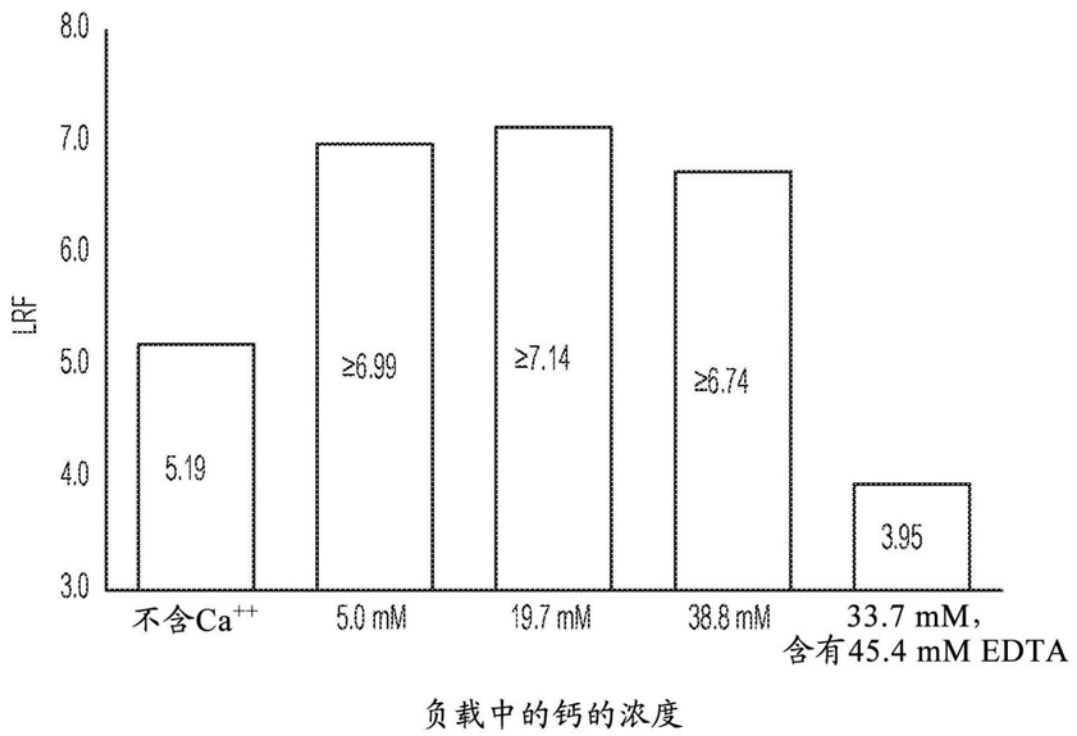


图8

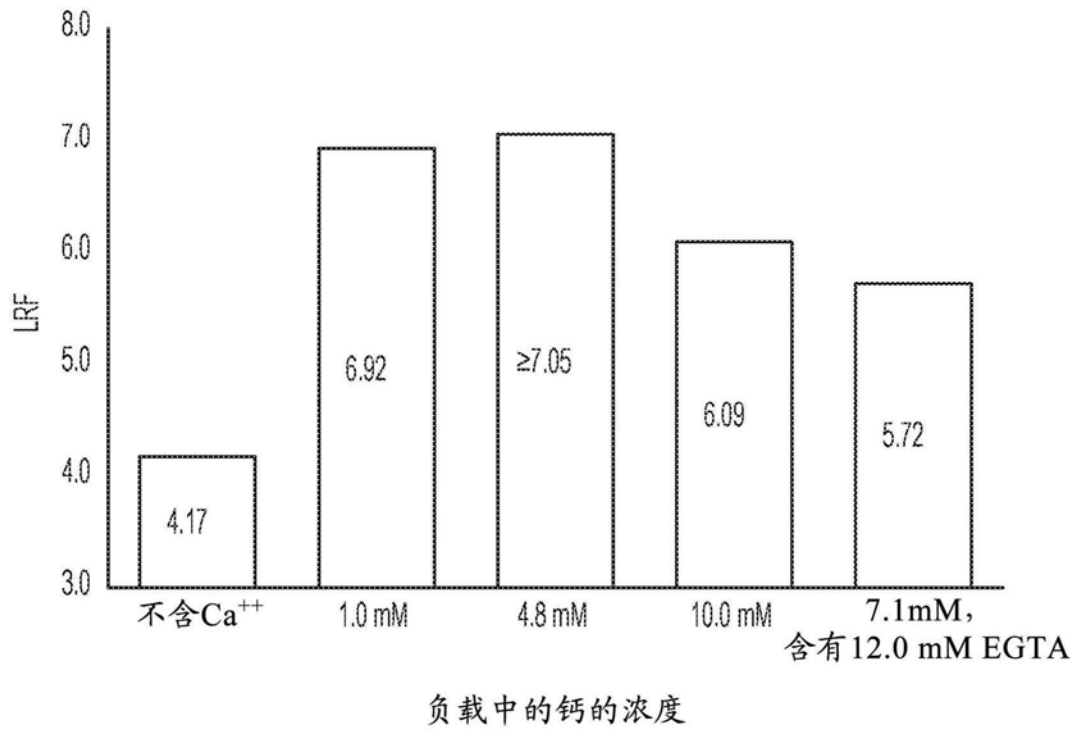


图9

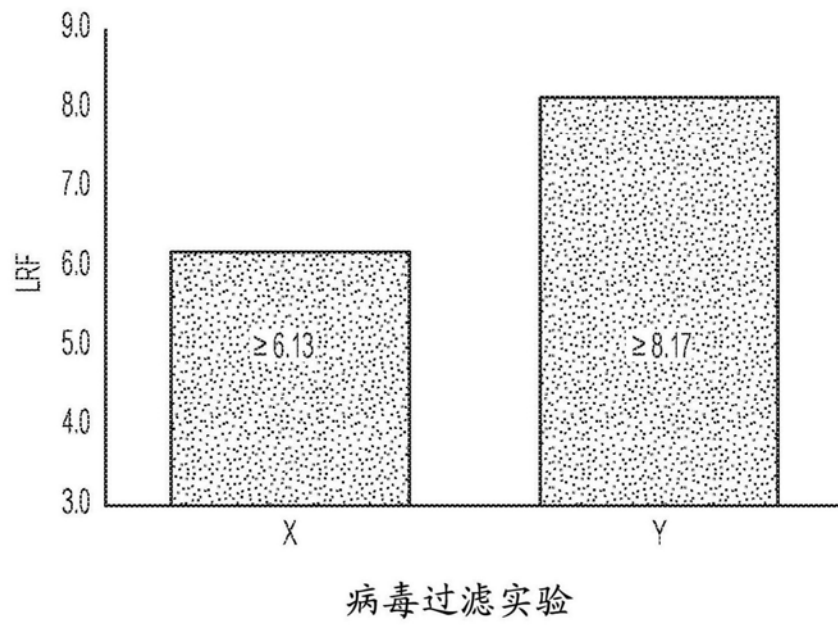


图10

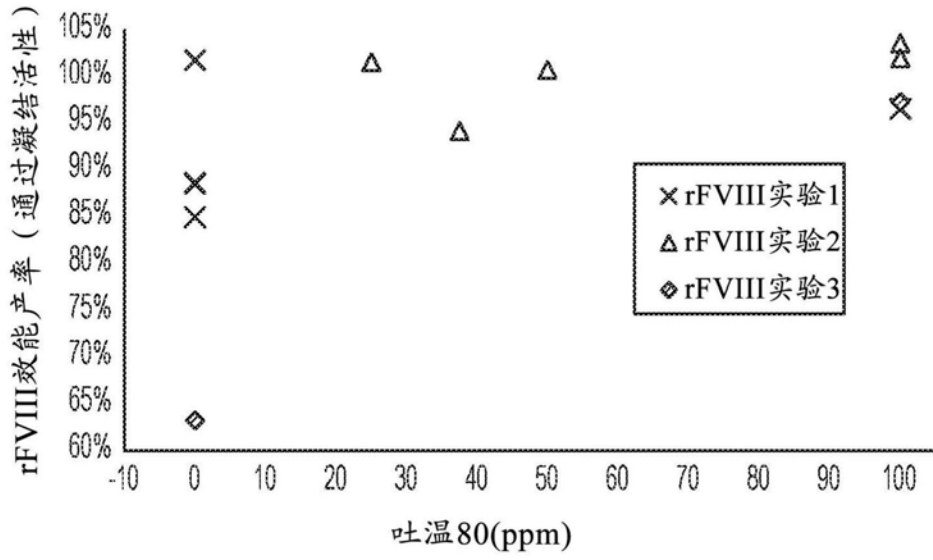


图11

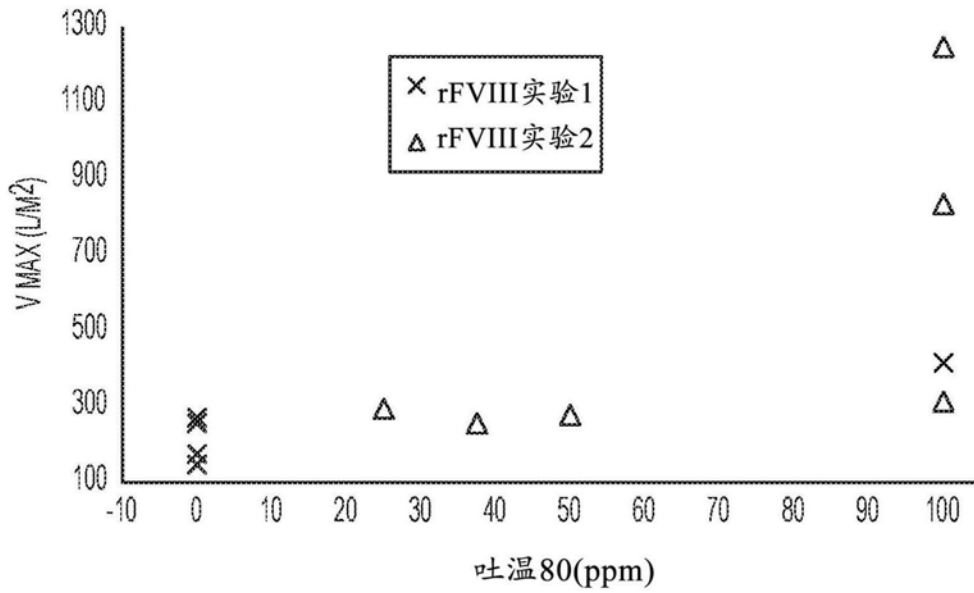


图12