



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112076330 B

(45) 授权公告日 2023.06.02

(21) 申请号 202010552106.8

(22) 申请日 2011.12.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112076330 A

(43) 申请公布日 2020.12.15

(30) 优先权数据
61/428,416 2010.12.30 US

(62) 分案原申请数据
201180063351.1 2011.12.23

(73) 专利权人 法国化学与生物科技实验室
地址 法国莱尤利斯

(72) 发明人 S.科托罗

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 曹立莉

(51) Int.Cl.
A61L 2/18 (2006.01)
A01N 31/02 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)
A61L 101/34 (2006.01)

(56) 对比文件
DE 102007050165 A1, 2009.04.23

审查员 刘昱

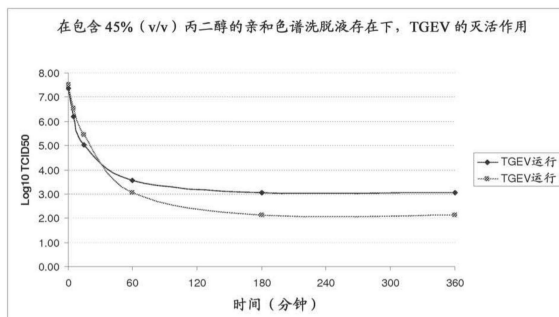
权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54) 发明名称

作为病原体灭活剂的二元醇

(57) 摘要

本发明涉及生物成分中病原体灭活的用途、方法和成分,其中将二元醇用作病原体灭活剂。



1. 一种在生物成分亲和纯化过程中的洗脱阶段使病毒灭活的方法,所述方法包括在生物成分亲和纯化过程中的洗脱阶段在15至25°C之间的温度使生物成分与包含45% (v/v) 的丙二醇的洗脱液接触至少60分钟以使病毒灭活,其中所述方法不包括用浓度为至少0.2M、至少0.01M或至少0.001M的精氨酸接触所述生物成分的步骤,其中所述生物成分是转基因动物的奶中分泌的目标转基因蛋白。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病毒是包膜病毒。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述包膜病毒选自X-MuLV、PRV、BVDV和TGEV病毒。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述方法导致病毒清除等于或高于 $4\text{Log}_{10}\text{TCID}$ (组织培养感染剂量),

其中所述TCID根据卡伯和/或斯皮尔曼-卡伯的方法确定。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述方法在7.0至8.0之间的pH下进行。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述方法在7.0至8.0之间的pH下进行。

作为病原体灭活剂的二元醇

[0001] 本申请是中国发明申请(发明名称:作为病原体灭活剂的二元醇,申请日:2011年12月23日;申请号:201180063351.1;国际申请号:PCT/IB2011/003271)的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及生物成分中病原体灭活的用途、方法以及成分。

[0003] 发明背景

[0004] 生物成分的使用对于开发和生产治疗剂(例如,重组蛋白的生产)来说是很重要的。生物成分,诸如血液成分,通过输血挽救了许多生命,例如挽救了患有血液病、大出血或经历外科手术的病人。然而,生物成分中病原体的存在产生了严重的健康危险。

[0005] 已经开发了生物成分中病原体灭活的方法。经典的病原体灭活方法包括基于热处理、溶剂和/或清洁剂处理、伽马射线、UV处理和白细胞去除(leukodepletion)的方法。然而,由于病原体的不同的敏感性以及一些方法与具体的生物成分的不相容性,所述方法的效率和有效性有所不同。

[0006] 需要新的病原体灭活方法和灭活剂。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及生物成分中病原体灭活的用途、方法、试剂以及成分。

[0009] 在一个方面中,本发明涉及二元醇作为病原体灭活剂的用途。在一些实施方式中,所述二元醇是丙二醇。

[0010] 在一个方面中,本发明涉及生物成分中病原体灭活的方法,所述方法包括用二元醇接触所述生物成分。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,所述二元醇是丙二醇。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,所述生物成分是血液成分或奶成分。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,所述病原体选自病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫以及朊病毒。在一些实施方式中,所述病毒选自X-MuLV、PRV、BVDV和TGEV病毒。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,所述方法导致病原体清除等于或高于 $4\text{Log}_{10}\text{TCID}$ (Tissue Culture Infective Dose, 组织培养感染剂量),其根据卡伯(Kärber)和/或斯皮尔曼-卡伯(Spearman-Kärber)的方法测定。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,在所述接触步骤之后,所述二元醇浓度为所述生物成分的40至50% (w/w)。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,在所述接触步骤之后,所述二元醇浓度为所述生物成分的40至50% (v/v)。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,所述方法在15至25°C的温度进行。在生物成分中病原体灭活的一些实施方式中,所述方法在pH值为7.0至8.0时进行。

[0011] 在一个方面中,本发明涉及包含二元醇的生物成分,其中所述生物成分通过这里所描述的任意方法获得。在一些实施方式中,所述二元醇浓度为40至50%。在一些实施方式中,所述生物成分是奶成分或血液成分。

附图说明

[0012] 附图构成了本说明书的一部分,且用于对本发明某些方面作进一步说明。通过参

考一个或多个这些附图,结合这里所提出的具体实施方式的详细说明,会更好理解本发明。附图仅仅是说明性的,并非实施本发明所必需。

[0013] 附图1显示了在包含45%的丙二醇的亲合色谱洗脱液中TEGV的灭活作用。

[0014] 附图2显示了在包含45%的丙二醇的亲合色谱洗脱液中BVDV的灭活作用。

[0015] 发明详述

[0016] 在一个方面中,本发明涉及二元醇作为病原体灭活剂的用途。在一个方面中,本发明涉及生物成分中灭活病原体的方法,所述方法包括用二元醇接触所述生物成分。在一个方面中,本发明涉及包含二元醇的生物成分。在一些实施方式中,所述包含二元醇的生物成分通过这里所描述的任意方法获得。

[0017] 在这里所描述的用途、方法和成分的一些实施方式中,所述二元醇是邻位二元醇。在一些实施方式中所述邻位二元醇是丙二醇或乙二醇。

[0018] 术语“二元醇”(或“二醇”)是指包含两个羟基基团(-OH)的化合物。术语“邻位二元醇”是指具有连接到相邻原子(例如,在相邻位置)上的两个羟基基团的二元醇。

[0019] 在一些实施方式中,用于这里所描述的方法和成分中的所述二元醇是邻位二元醇,其包括2到6个碳原子且化学式为 $R_1R_2-(C-OH)_2-R_3R_4$,其中 R_1, R_2, R_3 和 R_4 可以相同也可以不同,并且每一个或者是氢原子或者是烷基,其中 R_1, R_2, R_3 和 R_4 的组合包含最多两个碳原子。邻位二元醇的例子有丙二醇、乙二醇、1,2-丁二醇和1,2-戊二醇。

[0020] 在这里所描述的用途、方法以及成分的一些实施方式中,所述二元醇是丙二醇或乙二醇。

[0021] 所述术语“丙二醇”,也称为“1,2-二羟基丙烷”或“甲基乙二醇”,是指丙烷-1,2-二醇且具有下面所列的结构式(I)。

[0022] 所述术语“乙二醇”,也称为“1,2-二羟基乙烷”,是指乙烷-1,2-二醇以及具有下面所列的结构式(II)。



[0024] 在这里所描述的用途、方法以及成分的一些实施方式中,所述二元醇是偕二醇。偕二醇具有连接到相同碳原子上的两个羟基基团且包括1,2-甲烷二醇、1,2-乙烷二醇和1,2-丙烷二醇。在这里所描述的用途、方法以及成分的一些实施方式中,所述二元醇是二醇,其中所述羟基基团不在相同或相邻的碳原子上。这样的二元醇的例子有1,3-丁二醇、1,4-戊二醇以及1,3-苯二酚。

[0025] 在一个方面中,本发明涉及病原体灭活剂、包括这样灭活剂的成分及其用途。

[0026] 所述术语“病原体”是指能对哺乳动物(比如人类)致病的任何生物物质(例如,任何包含核酸的物质或诸如朊粒的蛋白感染粒子)。术语病原体包括单细胞和多细胞微生物,其具有单链或双链形式的DNA或RNA作为遗传物质。所述术语特别包括病毒、细菌、真菌、原生动物以及朊病毒。细菌的例子包括但不限于链球菌、埃希氏菌和杆菌类;病毒的例子包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)和其它逆转录病毒、疱疹病毒、副粘病毒、痘病毒、披膜病

毒、巨细胞病毒以及肝炎病毒 (HAV、HBV、HCV) ; 寄生虫的例子包括但不限于疟疾寄生虫 (疟原虫类) 和锥虫类寄生虫。

[0027] 在本发明的一些实施方式中, 要被灭活的所述病原体选自病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫以及朊病毒。

[0028] 在一些实施方式中, 所述病原体是病毒。

[0029] 在一些实施方式中, 所述病毒是包膜病毒或非包膜病毒。

[0030] 包膜病毒是具有类似于宿主细胞的“包膜”的病毒, 例如包括但不限于哺乳动物类或禽类白血病毒、疱疹病毒、痘病毒、嗜肝病毒、黄病毒、披膜病毒、冠状病毒、肝炎病毒、逆转录病毒、正粘病毒、副粘病毒、弹状病毒 (Rhadovirus)、布尼亚病毒、线状病毒以及呼肠孤病毒。非包膜病毒, 也称为裸病毒, 已为本领域众所周知且包括但不限于腺病毒、诺瓦克病毒 (Norovirus)、轮状病毒以及人乳头瘤病毒。

[0031] 在一些实施方式中, 所述病毒是 X-MuLV、PRV、TGEV 或 BVDV。用于表示“嗜异性鼠白血病毒相关病毒”的术语“X-MuLV”是指一种 γ 逆转录病毒。术语“PRV”是指假狂犬病病毒。用于表示“传染性胃肠炎冠状病毒”的术语“TGEV”是指一种属于冠状病毒家族的动物病毒。用于表示“牛病毒性腹泻病毒”的术语“BVDV”是出自黄病毒家族的瘟病毒。

[0032] 在一个方面中, 本发明涉及生物成分中病原体灭活的方法, 所述方法包括用二元醇接触所述生物成分。

[0033] 如这里所用, 所述术语“接触”是指使至少两个不同的成分或组分接触以使它们能够相互作用的过程。

[0034] 所述术语“生物成分”是指源自生物有机体 (包括哺乳动物) 的组合物 (或材料)。生物成分的例子包括但不限于血液成分、奶 (诸如来自转基因哺乳动物的奶)、临床样本 (诸如尿、汗、痰、粪便和脊髓液、细胞和组织提取物)、细胞培养基等等。如这里所用, 生物成分还包括能够像生物成分那样起作用的合成成分, 比如血液代用品和经过一个或多个提纯或分离步骤的成分。

[0035] 根据本发明的血液成分包括但不限于全血和血产品。所述术语“血产品”是指一或多种可以从全血中分离出来的组份, 并包括血细胞组份 (诸如红细胞或红血球、血小板、白细胞及其浓缩物)、血红蛋白 (诸如血凝因子、酶、白蛋白、血纤维蛋白溶酶原、免疫球蛋白) 以及血液流体组份 (诸如血浆、血浆级分 (fraction) 和血清)。在一些实施方式中所述血液成分为白细胞去除 (例如白细胞排除)。

[0036] 在一些实施方式中, 要处理的所述血液成分选自全血、红细胞浓缩物、血小板浓缩物、血浆和血浆的级分。

[0037] 在一些实施方式中, 所述生物成分是奶成分。在一些实施方式中, 要处理的所述奶成分来自转基因动物的奶, 所述转基因动物产生目的蛋白并分泌于所述奶中。

[0038] 在一些实施方式中, 所述方法在生物成分 (诸如奶成份) 的提纯过程 (诸如通过亲和色谱提纯) 中的洗脱液中进行。

[0039] 所述术语“病原体灭活”或“灭活病原体”, 如这里所使用, 是指抑制或阻止所述病原体的复制 (或繁殖), 和/或病原体的破坏或消除。典型地, 病原体灭活剂严重地或至少基本上妨碍了在适当的条件下病原体复制或繁殖的能力。

[0040] 确定特定的方法是否抑制或阻止了病原体复制方法已为本领域众所周知。典型

地,这样的方法包括在用病原体灭活剂处理之前确定(活性)病原体的数量以及在处理之后确定(活性)病原体数量的步骤。所述确定活性病原体数量的具体方法取决于所述病原体的性质,并且包括集落形成分析(用于确定活性细菌的数量)和感染性分析(用于确定“活性”病毒的数量)。活性病毒的数量的一项指标是组织培养有效剂量(TCID),例如其可通过卡伯和/或斯皮尔曼-卡伯方法确定。(参见例如Karber, G. (1931). Arch. J. Exper. Path. u. pharmakol., 162, 480;斯皮尔曼(1908). Brit. J. Psychol., 2:227-242)

[0041] 在一些实施方式中,本发明的方法导致病原体清除高于或等于 4Log_{10} TCID。如实施例中解释,所述病原体清除可以根据卡伯和/或斯皮尔曼-卡伯的方法计算。

[0042] 在一些实施方式中,所述生物成分,在所述接触步骤后,会包含一定量的二元醇,其足以灭活、清除或降低病原体的数量,例如,使之低于期望的水平。在一些实施方式中,在接触步骤之后所述生物成分中的二元醇浓度为所述成分的10%至75% (w/w), 15%至70% (w/w), 20%至65% (w/w), 25%至60% (w/w), 30%至60% (w/w), 35%至55% (w/w), 或40%至50% (w/w)。在一些实施方式中,在接触步骤之后所述生物成分中的二元醇浓度为所述成分的10%至75% (v/v), 15%至70% (v/v), 20%至65% (v/v), 25%至60% (v/v), 30%至60% (v/v), 35%至55% (v/v), 或40%至50% (v/v)。

[0043] 虽然并不要求,然而一般来说,期望通过将包含病原体的生物成分暴露给二元醇的时间长度的延长来提高所述病原体灭活作用。在一些实施方式中,将所述生物成分与所述二元醇持续接触一段时间,其使得病原体的清除大于或等于 4LogTCID (组织培养感染量)。

[0044] 在一些实施方式中,所述生物成分与所述二元醇接触至少10分钟,至少20分钟,至少30分钟,至少40分钟,至少50分钟,至少60分钟,至少70分钟,至少80分钟,至少90分钟,至少1200分钟,至少150分钟,至少180分钟,至少210分钟,至少240分钟,至少300分钟,至少360分钟,至少2500分钟,至少1000分钟或更多。在一些实施方式中,所述生物成分与所述二元醇接触15至360分钟,60至240分钟或90至180分钟的一段持续的时间。在一些实施方式中,在达到具体量的病原体灭活之后所述二元醇从所述生物成分移除。在一些实施方式中,在所述病原体灭活之后所述二元醇保持在所述生物成分中。

[0045] 在一些实施方式中,这里所描述的方法在10至30°C, 12至28°C或15至25°C的温度进行。

[0046] 在一些实施方式中,这里所描述的方法在pH值为4至11, 5至10, 6至9, 6.5至8.5或7至8时进行。在一些实施方式中,这里所描述的方法在pH值为约7.5时进行。在一些实施方式中,这里所描述的方法在pH值为7.5时进行。本领域普通技术人员可以根据现有文献确定对于具体生物成分来说什么样的pH值范围可以接受。

[0047] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括病毒清除步骤,诸如纳米过滤。

[0048] 在一些实施方式中,所述方法在生物成分提纯(诸如亲和色谱)过程中的洗脱阶段进行。在一些实施方式中,将所述二元醇加入到亲和洗脱缓冲液中。在一些实施方式中,亲和洗脱缓冲液包含50mM tris, 45% (w/w) 丙二醇和1.5M氯化钠,且pH值为7.5。在一些实施方式中,亲和洗脱缓冲液包含50mM tris, 45% (v/v) 丙二醇和1.5M氯化钠,且pH值为7.5。

[0049] 在一些实施方式中,这里所描述的方法不包括用大量的十字花植物油

(cruciferous oil)或精氨酸接触所述生物成分的步骤。

[0050] 在所述接触步骤之后,如这里所用的大量的精氨酸,对应精氨酸浓度为至少0.2M,至少0.01M或至少0.001M。

[0051] 在所述接触步骤之后,如这里所用的大量的十字花植物油,对应十字花植物油的浓度为至少0.1%,至少0.01%或至少0.001%。

[0052] 在一个方面中,本发明涉及用于灭活病原体的包含二元醇的生物成分,其中所述生物成分通过用二元醇接触生物成分获得,例如通过这里所描述的任意方法。

[0053] 在一些实施方式中,所述二元醇是丙二醇或乙二醇。

[0054] 在一些实施方式中,所述生物成分中的二元醇浓度为所述成分的10%至75% (w/w), 15%至70% (w/w), 20%至65% (w/w), 25%至60% (w/w), 30%至60% (w/w), 35%至55% (w/w), 或40%至50% (w/w)。在一些实施方式中,所述生物成分中的二元醇浓度为所述成分的10%至75% (v/v), 15%至70% (v/v), 20%至65% (v/v), 25%至60% (v/v), 30%至60% (v/v), 35%至55% (v/v), 或40%至50% (v/v)。

[0055] 在一些实施方式中,所述生物成分还包含清洁剂(detergent),诸如TWEEN20或TWEEN80。在一些实施方式中,所述生物成分还包含溶剂,诸如TNBP(磷酸三-N-丁基酯(Tri-N-butyl Phosphate))。在一些实施方式中,所述生物成分在与二元醇接触之前包含清洁剂。在一些实施方式中,所述生物成分在与二元醇接触之前与清洁剂接触。在一些实施方式中,所述生物成分在与二元醇接触的同时与清洁剂接触。在一些实施方式中,所述生物成分在与二元醇接触之后与清洁剂接触。

[0056] 在一些实施方式中,所述生物成分不包含大量的精氨酸。

[0057] 在一些实施方式中,所述生物成分不包含大量的十字花植物油。

[0058] 在一些实施方式中,所述生物成分不包括大量的精氨酸或十字花植物油。

实施例

[0059] 下面的实施例描述了本发明的方法和成分的制备和实施的一些实施方式。然而,应当理解,所述实施例仅仅是为了说明的目的而并非是要限制本发明的范围。贯穿本申请所引用的全部参考(包括参考文献、授权专利、公开的专利申请以及同时待审的专利申请(co-pending patent applications))的全部内容通过引用的方式在此引入。

[0060] 材料和方法

[0061] 通过在亲和色谱洗脱液中以45% (v/v) 存在的丙二醇(PG)对两种包膜病毒(TGEV和BVDV)的灭活作用进行评估。所述洗脱液在目标转基因蛋白(transgenic protein of interest)的生产过程中产生(该目标蛋白存在于奶成分中,所述奶成分源自生产所述蛋白的转基因动物,所述蛋白是在其奶中分泌的)。

[0062] 细胞毒性,病毒干扰和淬灭(quenching)

[0063] 培养实验之前,在PG存在下测定所述初始材料(所述洗脱液)的细胞病毒、病毒干扰和淬灭参数。所述测定细胞毒性、病毒干扰和淬灭的实验在亲和色谱的洗脱试样中完成。

[0064] 细胞毒性采用表I中的条件对初始材料的细胞毒性参数进行评估:

[0065] 表I用于评估细胞毒性的试样和所测试的稀释度

接种的试样	稀释范围	细胞和 关联的病毒	接种后观察
[0066] 初始基质(洗脱液)	未稀释 到 1/243 稀释 (3 倍系列稀释)	ST(猪睾丸细胞) TGEV	第 3/6 天 (Day +3/6)
		MDBK (Madin-Darby 牛 肾细胞) BVDV	第 3/6 天

[0067] 试样基质的无毒性浓度定义为所述试样基质的第一稀释度,其对于基质中培养的细胞的细胞衣没有任何破坏。

[0068] 在所述实验中,在第3天得到的细胞毒性参数被用于确定病毒干扰条件,并在第6天确认。

[0069] 病毒干扰对照和试样淬灭同时测定所述病毒干扰和试样淬灭参数。

[0070] 对用于滴定系统的试样的病毒干扰参数进行评估。所述实验由以下组成:在试样基质(第一稀释点:无毒性基质,如上面所测定)中病毒BVDV和TGEV的稀释滴定与在培养基中的滴定相比较。由于实际的实验在T0、T5和T15分级滴定之前有15-30分钟的潜伏期,因此在确定病毒适当的稀释度之前,在4℃进行30分钟的培养期以模拟所述实验环境。

[0071] 根据表II中所示的操作条件,对具有两个滴定系统(ST和MDBK细胞)的基质的潜在的干扰进行评估。

[0072] 表II干扰的操作条件

细胞	病毒	稀释液	稀释液的稀 释范围	接种后观察
[0073] MDBK	BVDV	无毒性浓度 的初始基质 (洗脱液)	第 1 时间点: 无毒性基质 +3 个其它稀 释点(生长), 3 倍稀释	第 6 天
		培养基	未稀释	第 6 天
ST	TGEV	无毒性浓度 的初始基质 (洗脱液)	第 1 时间点: 无毒性基质 +3 个其它稀 释点(生长), 3 倍稀释	第 6 天
		培养基	未稀释	第 6 天

[0074] 如果观测到试样基质(所述洗脱液)中的滴定和培养基中的滴定之间的差异>

1.01log₁₀TCID₅₀/mL,那么由基质测定的所述病毒干扰/淬灭是显著性的。

[0075] 过程

[0076] 操作条件在20°C (±5°C),用在所述转基因蛋白提纯过程中获得的包含45% (v/v) PG的亲色洗脱液接触病毒6个小时,由此评估丙二醇 (PG) 对所述包膜病毒 (TGEV和BVDV) 的灭活动力学。所述病毒以5% (v/v) 的浓度加入试样中。对于每一种病毒,实验以一式两份进行。

[0077] 材料所述初始材料是亲和色洗脱液。所述初始材料掺入 (spiked) 5% (v/v) 的病毒。

[0078] 表III (TGEV) 和表IV (BVDV) 中描述了在所述分析中TGEV和BVDV病毒悬浮液的条件。

[0079] 表III. TGEV掺入物

[0080] 使用的病毒	TGEV (澄清的上清液)
介质	细胞培养基ST
等份	5 × 5mL, 4 × 1mL, 81 × 80μL
滴度	8.53log ₁₀ TCID ₅₀ /mL ± 0.5log ₁₀
储藏	< -65°C

[0081] 表IV. BVDV掺入物

[0082] 使用的病毒	BVDV (澄清的上清液)
介质	细胞培养基MDBK
等份	10 × 3mL, 1 × 11mL, 81 × 0.2mL
滴度	6.08log ₁₀ TCID ₅₀ /mL ± 0.5log ₁₀
储藏	< -65°C

[0083] 在中和 (neutralization) 步骤过程中,使用各自的细胞培养基 (对于ST和MDBK)。以细胞毒性、病毒干扰和基质淬灭的分析中确定的浓度进行所述中和。

[0084] 分析

[0085] 将烧杯置于20°C ± 5°C的加热装置中。将所述烧杯置于磁性搅拌器上,并在处理前保持在20°C ± 5°C的温度。

[0086] 对于每一个分析,等份的初始材料 (20mL) 在20°C ± 5°C的水浴中解冻。解冻之后,检查温度。

[0087] 每等份 (≥1mL) 的病毒悬浮液在环境温度解冻。将约0.1mL的等份储藏于低于-65°C的温度。所述病毒悬浮液用于形成包含5%病毒的所述初始材料试样。

[0088] 处理过程由以下组成:将1mL (5%) 的病毒悬浮液掺入包含45% PG的19mL基质中 (从所述亲和色洗脱液中获得该基质)。

[0089] 在快速均化和检查所述混合物温度后,取等分试样 (1mL) 并用培养基 (ST细胞培养基或MDBK细胞培养基,取决于所采用的细胞系) 淬灭等份试样 (1mL)。细胞培养基的加入体积取决于在细胞毒性、干扰和病毒淬灭研究中获得的数据。所述试样构成“T0”。

[0090] 以和所述“T0”试样相同的方式,在20°C ± 5°C培养所述掺入病毒的材料 (其包含45% (v/v) PG) 6小时,在培养期 (T=5分钟, T=15分钟, T=60分钟, T=180分钟, T=360分钟) 后提取 (并立即稀释) 1mL的等份试样。

[0091] 表V中总结了在洗脱基质“FVII select” (含45%PG) 的不同的培养分析中收集的所述试样。

[0092] 表V: 在实验中所收集试样的命名

级分	TGEV 处理		BVDV 处理	
	分析 A	分析 B	分析 A	分析 B
掺入	掺入 A TEGV	掺入 B TEGV	掺入 A BVDV	掺入 B BVDV
培养 T=0 分钟	T0A TGEV	T0B TGEV	T0A BVDV	T0B BVDV
[0093] 培养 T=5 分钟	T5A TGEV	T5B TGEV	T5A BVDV	T5B BVDV
培养 T=15 分钟	T15A TGEV	T15B TGEV	T15A BVDV	T15B BVDV
培养 T=60 分钟	T60A TGEV	T60B TGEV	T60A BVDV	T60B BVDV
培养 T=180 分钟	T180A TGEV	T180B TGEV	T180A BVDV	T180B BVDV
培养 T=360 分钟	T360A TGEV	T360B TGEV	T360A BVDV	T360B BVDV

[0094] 在滴定后, 在低于-65°C 的温度储藏所述试样。此外, 通过以无毒性和无干扰浓度稀释的基质与所述TGEV和BVDV病毒的掺合, 可以产生具有低、中和高病毒载量的对照。

[0095] 如果满足下面的条件, 可以认为包含45%PG的所述基质的培养实验是成功的:

[0096] • 20°C ± 5°C 的温度且6小时的培养期,

[0097] • 按计划提取了等份试样。

[0098] 过程中试样的滴定

[0099] 同一天中, 完成上面描述的分析过程中所产生的试样的滴定。

[0100] 滴定方案根据TGEV的L-50研究和BVDV的L-319研究, 进行表III中所示的试样的病毒的滴定。

[0101] 滴定通过三个步骤完成: 96孔板的接种, 以标准滴定或LVP (Large Volume Plating, 大体积平板接种) 感染该板, 并确定滴度。

[0102] 表VI中描述了用于每种病毒的滴定的96孔板的接种条件。

[0103] 表VI. 用于BVDV和TGEV的滴定的96孔板接种条件

接种特征	BVDV	TGEV
载体	96 孔板	
细胞	MDBK	ST
细胞数量/孔	1000	3000
细胞体积/孔	100µL	
培养基	DMEM+2%HS+P/S+ NEAA	OptiMEM+5%SVF+P/S +NEAA+丙酮酸钠
板的培养期	18 小时±6 小时(过夜)	

[0105] 对于每种病毒:

[0106] • 首先通过标准方案滴定通过第一运行 (run) (表V) 获得的试样,

[0107] • 对第一运行获得的级分(其中用标准方案没有检测到病毒)进行大体积平板接种(LVP)分析,类似于通过第二运行获得的试样。

[0108] • 如果在标准方案中没有发现病毒,使用LVP对所述第一试样和最后的试样(接种后6小时收集的试样)进行细微滴定(minimally titrated)。

[0109] 在所述处理实验之后,立即进行所述滴定,无需冷冻所述试样。

[0110] 标准滴定 去除所述培养上清液,并用20 μ L待滴定试样代替。

[0111] 在37 $^{\circ}$ C培养一小时之后,将130 μ L的培养基加入到每个孔中。病毒繁殖导致所述细胞衣全部或部分破坏。

[0112] 为了能够根据卡伯和/或斯皮尔曼-卡伯方法进行统计分析,对于每个稀释度平行进行12份感染(参见例如“Virology Labfax”,第5章,Bios Publishers(plus Academic Press(US)),或Blackwell non-US,1993;Karber,G.(1931).Arch.J.Exper.Path.u.pharmakol.,162,480;斯皮尔曼(1908).Brit.J.Psychol.,2:227-242)。

[0113] LVP滴定 将病毒滴定方法“大体积平板接种”重复“n”次,使测试试样体积增加,并因此提高了检测限。除了仅仅使用置于一个或多个96孔板的所有孔中的同一稀释度的试样来完成所述分析之外,所述方案与标准滴定相同。根据斯皮尔曼-卡伯方法完成所述统计分析。

[0114] 对照与试样滴定的平行地,进行下面的对照:

[0115] • 对每个滴定系列使用阴性对照。所述对照由以下组成:在滴定系列中所用的培养基,在试样滴定所用的条件下滴定。

[0116] • 对每个滴定系列还使用阳性对照。在这项研究中,将BVDB和TGEV用作阳性对照。这些阳性对照的滴度是 $6.08\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 和 $6.41\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL} \pm 0.5\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

[0117] 滴定分析的有效性如果具备以下条件,则认为滴定分析是有效的:

[0118] • 在阴性对照下没有观察到细胞衣的破坏。

[0119] • 试样滴定显示,对于至少三个连续的稀释度,阳性孔的比例为0至100%。

[0120] • 至少对于试样的最终稀释度,确认阳性孔比例等于0%。

[0121] 滴度的计算,载荷以及减缩因子在六天的培养期之后(对每种病毒),对于每个稀释度的每个孔,定量测定细胞衣全部或部分破坏的细胞的数量(用40倍和/或100倍的显微镜)。根据卡伯公式确定每个孔中的病毒滴度,以 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 表示(数值表示为 \log_{10})。

[0122] 根据所述卡伯方法计算病毒悬浮液的滴度。病毒的滴定以 $\pm 0.5\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的不确定度给出,并用下面公式计算:

$$[0123] \quad \text{IC}_{(\alpha=5\%)} = 1.96 \times \sqrt{\frac{\sum (p_i x q_i)}{(n-1)}}$$

[0124] 其中: p_i 是在稀释度*i*下阳性孔的比例

[0125] q_i 是在稀释度*i*下阴性孔的比例

[0126] 然而,如果病毒仅仅是在试样的第一测试稀释度中观察到,且其感染率低于100%,则根据斯皮尔曼-卡伯方法的公式计算病毒的对数浓度,以 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 表示:

$$[0127] \quad \text{Log}_{10} C = \text{log}_{10} \left[\frac{\log_e \left(\frac{n}{n-r} \right)}{v \cdot \log_e (2)} \right]$$

[0128] 其中C是以TCID₅₀/mL表示的病毒浓度，

[0129] v是每孔的接种物体积

[0130] n是每稀释度接种孔的数量

[0131] r是被感染的孔的数量。

[0132] 采用以十进制数值表示的滴度和病毒载量，用所述滴度和试样体积根据下面的公式计算试样中的总病毒载量：

[0133] 总病毒载量 = 滴度 × 试样体积 (mL)

[0134] 与“T0”试样中的病毒载量相比，计算减缩因子 (Reduction Factor, RF)。

[0135] $RF = (\text{“T0”中总病毒载量}) / (\text{在后一时刻提取的试样中总病毒载量})$

[0136] 结果

[0137] 亲和色谱洗脱液 (存在45%的PG) 中的TGEV研究

[0138] 在表VIII中描述结果，并在图1中进行阐明。

[0139] 表VIII

[0140]

时间点 试样	体积 (ml)	滴度 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	校正 (细胞 毒性)	log ₁₀ TCID ₅₀	减缩因 子(log)	清除因 子(log)	滴定
TGEV-第 1 运行							
掺入	1	7.45	N/A	7.45	NA	NA	标准
T=0 负 载试样	20	5.12	9	7.38	NA	0.07	标准
T=5	20	3.95	9	6.21	1.17	1.24	标准
T=15	20	2.78	9	5.04	2.34	2.41	标准
T=60	20	1.32	9	3.58	3.8	3.87	标准
T=180	20	0.8	9	3.06	4.32	4.39	标准
T=360	20	<0.8	9	<3.06	>4.32	>4.39	标准
TGEV-第 2 运行							
掺入	1	7.62	N/A	7.62	NA	NA	标准
T=0 负 载试样	20	5.28	9	7.54	NA	0.08	标准
T=5	20	4.28	9	6.54	1	1.08	标准
T=15	20	3.2	9	5.46	2.08	2.16	标准
T=60	20	0.8	9	3.06	4.48	4.56	标准
T=180	20	-0.12	9	2.14	5.4	5.48	1LVP(96 孔)
T=360	20	<-0.12	9	<2.14	>5.40	>5.48	1LVP(96 孔)

[0141] 亲和色谱洗脱液(存在45%的PG)中的BVDV研究

[0142] 在表IX中描述所述结果,并在图2中进行阐明。

[0143] 表IX

时间点 试样	体积 (ml)	滴度 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	校正 (细胞 毒性)	log ₁₀ TCID ₅₀	减缩因 子(log)	清除因 子(log)	滴定
BVDV-第 1 运行							
掺入	1	6.28	NA	6.28	NA	NA	标准
T=0 负 载试样	20	3.12	27	5.85	NA	0.43	标准
T=5	20	1.9	27	4.63	1.22	1.65	标准
T=15	20	2.25	27	4.98	0.87	1.3	标准
T=60	20	2.25	27	4.98	0.87	1.3	标准
T=180	20	2.25	27	4.98	0.87	1.3	标准
T=360	20	0.8	27	3.53	>4.32	2.75	标准
BVDV-第 2 运行							
掺入	1	6.2	NA	6.20	NA	NA	标准
T=0 负 载试样	20	3.03	27	5.76	NA	0.44	标准
T=5	20	1.59	27	4.32	1.44	1.88	标准
T=15	20	1.32	27	4.05	1.71	2.15	标准
T=60	20	1.59	27	4.32	1.44	1.88	标准
T=180	20	<0.8	27	<3.53	>2.23	>2.67	标准
T=360	20	<-0.12	27	<2.61	>3.15	>3.59	1 LVP

[0145] 亲和色谱洗脱液(存在45%的PG)的X-MuLV和PRV研究

[0146] 使用X-MuLV和PRV病毒对具有45%PG的亲和色谱洗脱液进行相似的研究,且包括标准误差的确定。

[0147] 表X和XI描述了结果。

[0148] 表X.X-MuLV研究

试样	滴度(TCID ₅₀ /ml)	体积(ml)	体积校正	病毒载量(log ₁₀)
掺入阳性对照	8.03±0.36	-	-	-
理论载量(5%掺入)	6.71±0.36	20	-	8.01±0.36
对照T=0h(w/o SD)	4.80±0.42	20	10	7.10±0.42
对照T=6h(w/o SD)	0.59±0.91	20	10	2.89±0.91
T=0h(+SD)	≤0.78*	20	100	≤4.08
T=1h(+SD)	≤0.78*	20	100	≤4.08
T=3h(+SD)	≤0.78*	20	100	≤4.08
T=6h(+SD)(标准滴定)	≤0.78*	20	100	≤4.08

T=6h (+SD) (LVP)	$\leq -1.13^*$	20	100	≤ 2.17
T=6h (+SD) (LVP+ST)	$\leq -1.13^*$	20	100	≤ 2.17

[0150] 表XI.PRV研究

试样	滴度(TCID ₅₀ /ml)	体积(ml)	体积校正	病毒载量(log ₁₀)
掺入阳性对照	8.64±0.32	-	-	-
理论载量(5%掺入)	7.32±0.32	20	-	8.62±0.32
对照T=0h(w/o SD)	2.17±0.30	20	10	4.47±0.30
对照T=6h(w/o SD)	$\leq 0.78^*$	20	10	≤ 3.08
T=0h(+SD)	$\leq 1.48^*$	20	10	≤ 3.78
T=1h(+SD)	$\leq 1.48^*$	20	10	≤ 3.78
T=3h(+SD)	$\leq 1.48^*$	20	10	≤ 3.78
T=6h(+SD)(标准滴定)	$\leq 1.48^*$	20	10	≤ 3.78
T=6h(+SD)(LVP)	**	20	10	NA

[0152] 可以认为,前述说明书足以使本领域技术人员实施本发明。本发明不限于所提供的实施例的范围,所述实施例仅仅是为了说明本发明的在一个方面中,且其它的功能等同的实施方式也在本发明的范围之内。除了本文所示和描述的之外,从前面的描述来看,本发明的各种修饰对于本领域技术人员来说是明显的,且落在附随的权利要求的范围之内。本发明的优点和客体不必包含于本发明的每个实施方式中。

[0153] 本申请包括以下实施方案:

[0154] 1. 二元醇作为病原体灭活剂的用途。

[0155] 2. 实施方案1的用途,其中所述二元醇是丙二醇。

[0156] 3. 生物成分中病原体灭活的方法,所述方法包括用二元醇接触所述生物成分。

[0157] 4. 实施方案3的方法,其中所述二元醇是丙二醇。

[0158] 5. 实施方案3或4的方法,其中所述生物成分是血液成分或奶成分。

[0159] 6. 实施方案3-5中任一项的方法,其中病原体选自病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫以及朊病毒。

[0160] 7. 实施方案6的方法,其中所述病毒选自X-MuLV、PRV、BVDV和TGEV病毒。

[0161] 8. 实施方案3-7中任一项的方法,其中所述方法导致病原体清除等于或高于4Log₁₀TCID(组织培养感染剂量),

[0162] 其中所述TCID根据卡伯和/或斯皮尔曼-卡伯的方法确定。

[0163] 9. 实施方案3-8中任一项的方法,其中在接触步骤之后二元醇的浓度为所述生物成分的40至50%(v/v)。

[0164] 10. 实施方案3-9中任一项的方法,其中所述方法在15至25℃的温度进行。

[0165] 11. 实施方案3-10中任一项的方法,其中所述方法在pH值为7.0至8.0时进行。

[0166] 12. 包含二元醇的生物成分,其通过实施方案3-11的任一方法获得。

[0167] 13. 实施方案12的生物成分,其中所述二元醇浓度为40至50%(v/v)。

[0168] 14. 实施方案12或13的生物成分,其中所述二元醇是丙二醇。

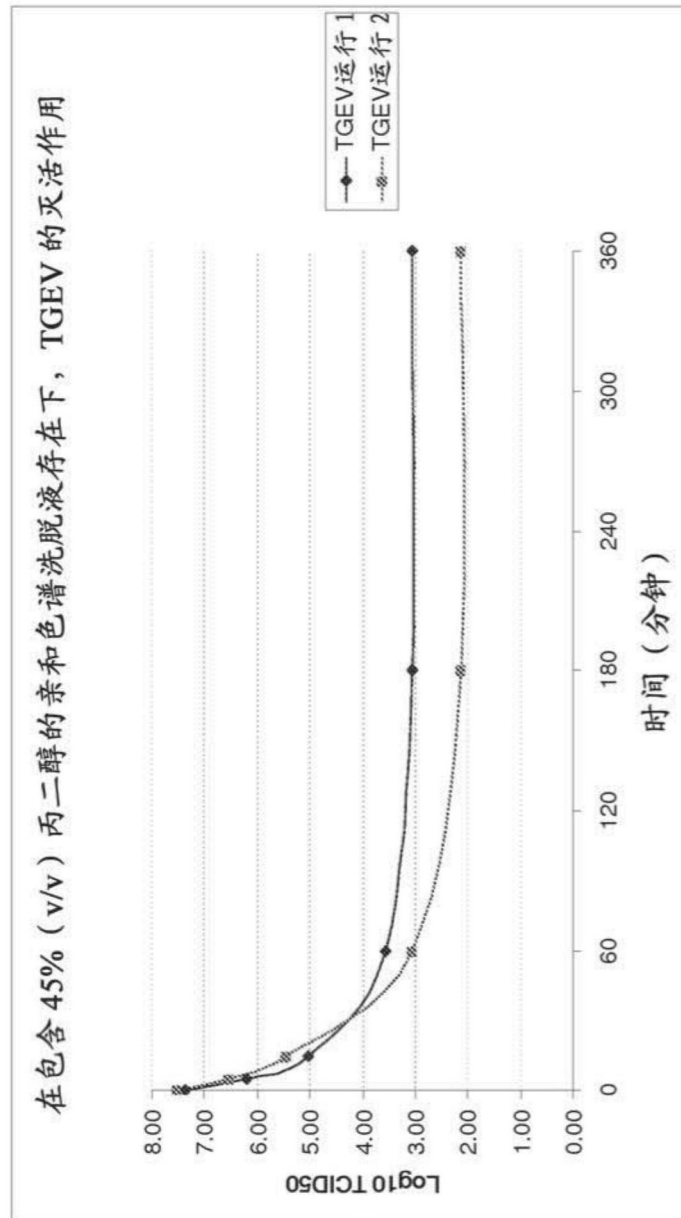


图1

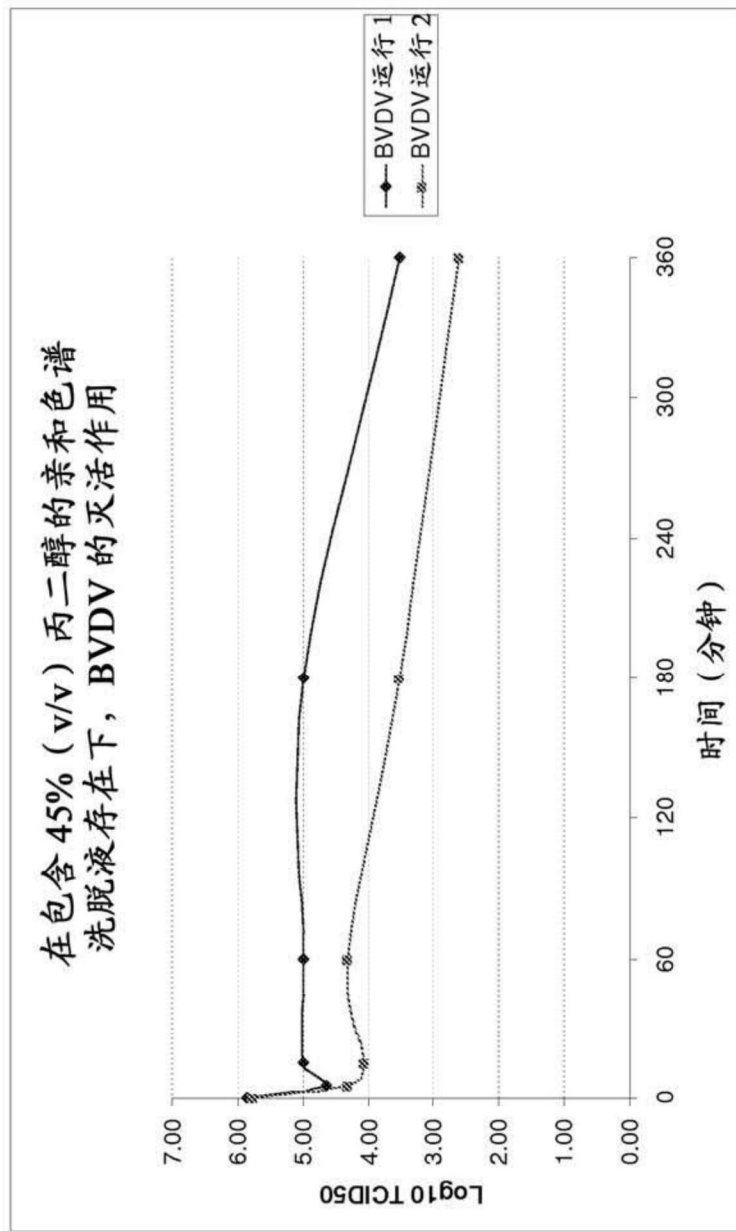


图2