

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790250 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.05.31

(51) Int. Cl. C12N 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.07.21

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ПОЛИОВИРУСА ИЗ КУЛЬТУР КЛЕТОК

(31) 14178392.8; 14178399.3

(32) 2014.07.24

(33) EP

(86) PCT/EP2015/066638

(87) WO 2016/012445 2016.01.28

(88) 2016.03.31

(71) Заявитель:

ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)

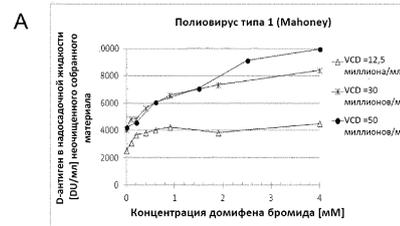
(72) Изобретатель:

Сегерс Марикен, Кюнгах Нфор
Беклей, Алази Ферас Нахми, Де Вохт
Марсел Лео (NL)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам выделения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток с использованием детергента после стадии очистки.



A1

201790250

201790250

A1

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ПОЛИОВИРУСА ИЗ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Настоящее изобретение относится к области получения вируса. В частности, в нем описываются улучшенные способы выделения частиц полиовируса из суспензии клеток.

Предпосылки изобретения

Недавние разработки в области получения вакцин создали потребность в крупномасштабном производстве. Для того, чтобы обеспечить человечество достаточными количествами (рекомбинантных) вакцин для борьбы с инфекционными заболеваниями, такими как полиомиелит, требуются надежные способы, характеризующиеся высоким выходом.

Полиовирусы являются представителями рода Enterovirus семейства Picornaviridae. Полиовирусы являются мелкими, безоболочечными вирусами с капсидами, окружающими геном, представленный однонитевой РНК в виде положительной смысловой цепи. Существует три типа полиовирусов: типы 1, 2 и 3. Инфицирование полиовирусом восприимчивых индивидуумов может приводить к паралитическому полиомиелиту. Полиомиелит является высококонтагиозным. Со временем были разработаны две разные вакцины против полиомиелита, инактивированная вакцина Солка против полиомиелита (IPV) и живая аттенуированная пероральная вакцина Сэбина против полиомиелита (OPV). Обе вакцины являются безопасными и эффективными. Каждая из них имеет свои конкретные преимущества и недостатки, и каждая играет важную роль в контроле полиомиелита. Для обзора полиовирусов и вакцин против полиомиелита см., например, публикацию Kew et al, 2005.

Системы культивирования и выделения для получения массы полиовирусного материала, который можно использовать в вакцине, в частности, для IPV, являются одним из факторов относительно высокой стоимости.

Таким образом, в уровне техники остается необходимость в эффективных системах культивирования и выделения для получения полиовируса для применения в вакцинах, в частности, остается необходимость в способах выделения полиовирусов с высокими показателями выхода.

В типичных способах получения полиовируса клетки выращивают в специальной среде, а затем полиовирус приводят в контакт с клетками, чтобы позволить вирусу инфицировать указанные клетки и размножиться. После размножения полиовируса в указанных клетках, вирус или его компоненты собирают в составе культуры клеток.

В одном предпочтительном, применяемом в настоящее время способе получения IPV, используют субстрат-зависимые, полученные от обезьян клетки VERO, которые выращивают на микроносителях и культивируют в средах дополненных сывороткой крови.

Образовавшийся вирус, вышедший в среду для культивирования клеток, можно отделить от клеточной биомассы с помощью общепринятых способов, таких как глубинная фильтрация, центрифугирование. В таком случае фильтрация или центрифугирование представляет собой стадию сбора материала. Фильтрованный собранный материал, как правило, подвергают ультрафильтрации для концентрирования вирусной суспензии, а затем полиовирус можно выделить с помощью, например, гелефильтрационной и/или ионообменной хроматографии. Способы сбора и выделения полиовируса или вирусных компонентов и получение на их основе вакцин, используют в данной области в течение уже многих десятилетий и, соответственно, они хорошо известны и были подробно описаны, например, в публикациях Van Wezel et al, 1978; Montagnon et al, 1984; и в патентных документах WO 2007/007344 и US 4525349, при этом все включены в данный документ посредством ссылки. Полученную концентрированную суспензию вируса можно необязательно разводить, а для получения IPV, полиовирус в суспензии будет инактивирован с помощью общепринятых способов.

Показатели продуктивности используемых в настоящее время способов получения полиовируса являются недостаточными для ускорения получения объемов IPV, необходимых для ликвидации полиомиелита в мировом масштабе. Следовательно, существует ограничение в глобальной возможности получения. Кроме того, используемые в настоящее время способы получения из-за их низкой продуктивности характеризуются высокими расходами на одну технологическую операцию из-за занимаемой объектом большой площади и, соответственно, высоким расходом среды и буфера

вместе с высоким (биологически активным) образованием отходов. Помимо затрат, связанных со способом получения вакцины, проведение контроля партии продукта и затраты на выпуск также изменяются с продуктивностью, т. е. высокопродуктивные партии обеспечивают значительное снижение затрат на дозу вакцины.

Одним из способов улучшения показателей выхода при получении полиовируса является улучшение предшествующего способа получения. Способы получения полиовируса с высокими показателями выхода были достигнуты путем повышения плотности клеток в производственных культурах (см., например, WO 2011/06823), которые, тем не менее, могут подвергаться дополнительным изменениям в ходе последующей обработки. До этих пор не существовало разработок в области способов выделения полиовируса как для культур с более низкой плотностью, так и для культур с высокой плотностью.

Таким образом, в промышленности существует необходимость в улучшении способов дальнейшей обработки для дальнейшего повышения показателей выхода в способах выделения полиовируса.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к улучшенным способам выделения частиц полиовируса из неочищенного собранного материала клеток, и эти способы также являются подходящими для собранного материала клеток с высокой плотностью. В определенных иллюстративных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут, например, характеризоваться общим выходом продукта, варьирующим в диапазоне 15-25, 6-12 и 10-16 доз IPV/мл культуры вируса, после инактивации формальдегидом полиовируса типа 1, 2 и 3, соответственно. Это более высокий объемный выход, чем в способах, известных до настоящего времени. Действительно, Kreeftenberg et al. (2006) оценили показатели общего выхода для стандартных способов получения IPV с использованием платформы на основе клеток VERO, которые составляют 0,64, 1,04 и 0,34 дозы/мл культуры вируса, исходя из соотношения 40:8:32 единиц D-антигена/доза полиовируса типа 1-3, соответственно, и принимая во внимание общее извлечение D-антигена после инактивации, составляющее 40%. Указанное значимое увеличение продуктивности

приведет к явному уменьшению занимаемой объектом площади с последующим уменьшением производственных затрат с обеспечением максимальной производственной мощности, необходимой для удовлетворения мирового спроса на дозы IPV.

Дальнейшая обработка суспензий с высокой плотностью клеток с использованием известных способов обычно требует множества стадий. Первая стадия фильтрации будет включать в себя последовательную фильтрацию для удаления цельных клеток, после чего осуществляют фильтрацию через ряд мембранных фильтров меньшего размера для удаления остаточного клеточного дебриса и для осаждения материала. Затем после стадии концентрирования необходимо провести две или более стадии селективной хроматографии с достижением в достаточной степени выделения полиовируса в соответствии с требованиями нормативных документов (WHO/EP).

Авторы настоящего изобретения выявили и раскрыли в данном документе, что непосредственно после размножения полиовируса в культуре клеток, полученный неочищенный собранный материал культуры клеток, содержащий полиовирус, можно обрабатывать детергентом, предпочтительно выбранным из группы катионных детергентов, анионных детергентов, неионогенных детергентов и цвиттерионных детергентов, для улучшения высвобождения полиовируса в собираемую суспензию. Полученные таким образом показатели общего выхода после выделения были беспрецедентными. Действительно, в определенных вариантах осуществления способа по настоящему изобретению достигаются показатели выхода 6-25 доз IPV/мл клеточной суспензии по сравнению с показателями выхода при использовании стандартных платформ на основе клеток Vero, составляющими 0,3-1 доза IPV/мл клеточной суспензии, полученной с использованием ранее раскрытых способов.

Настоящее изобретение предусматривает способ выделения полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток, при этом указанный способ предусматривает стадии а) добавления детергента к неочищенному собранному материалу культуры клеток и б) очистки указанного собранного материала

культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса.

Настоящее изобретение также предусматривает способ улучшения высвобождения полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток, при этом указанный способ предусматривает стадии а) добавления детергента к неочищенному собранному материалу культуры клеток и б) очистки указанного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса.

Результатом стадии очистки является очищенный собранный материал, в котором в значительной степени снижена концентрация ДНК клетки-хозяина и клеточного дебриса по сравнению с неочищенным собранным материалов культуры клеток.

Неожиданно, после очистки, стадию высокоселективного катионообменного захвата с последующим разделением по размерам на основе стадии доочистки, т. е. гель-фильтрационной хроматографии или стадии процесса диафильтрации, можно было адаптировать для удаления высоких уровней примесей в виде белка клетки-хозяина (НСР) из очищенного собранного материала.

Таким образом, настоящее изобретение также предусматривает способ выделения полиовируса из культуры клеток, при этом указанный способ предусматривает стадии а) добавления детергента к культуре клеток; б) очистки указанной культуры клеток, содержащей полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса; и с) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии б), посредством стадии захвата с получением суспензии, содержащей полиовирус. Предпочтительно указанная стадия захвата представляет собой стадию катионообменной хроматографии.

В предпочтительном варианте осуществления полиовирус, полученный на стадии с) предыдущих способов, дополнительно отделяют от суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрации. Предпочтительно указанную гель-фильтрацию осуществляют посредством гель-фильтрационной хроматографии.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение также предусматривает способ выделения полиовируса из культуры клеток, при этом указанный способ предусматривает стадии а) добавления детергента к культуре клеток; б) очистки указанного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса; с) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии б), посредством стадии катионообменной хроматографии с получением суспензии, содержащей полиовирус; и д) дополнительного выделения полиовируса из суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрационной хроматографии.

Детергент, используемый в настоящем изобретении, предпочтительно выбран из группы катионных детергентов, анионных детергентов, неионогенных детергентов и цвиттерионных детергентов. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный детергент представляет собой катионный детергент, при этом указанный катионный детергент предпочтительно выбран из группы гексадецилтриметиламмония бромида (СТАВ), гексадецилпиридиний хлорида (СРС), бензетония хлорида (ВТС) и домифена бромида (DB). В более предпочтительном варианте осуществления указанный детергент представляет собой домифена бромид (DB).

В еще одном варианте осуществления указанный предпочтительный детергент представляет собой анионный детергент.

Предпочтительно указанный анионный детергент выбран из группы гидрата тауродезоксихолата натрия (STN) и додецилсульфата натрия (SDS).

В еще одном варианте осуществления указанный предпочтительный детергент представляет собой неионогенный детергент. Предпочтительно указанный неионогенный детергент выбран из группы 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоля (Triton® X-100) и децил- β -D-1-тиомальтопиранозида (DTP).

В другом варианте осуществления указанный предпочтительный детергент представляет собой цвиттерионный детергент. Предпочтительно, указанный цвиттерионный детергент выбран из группы 3-(N,N-диметилмиристиламмоний)пропансульфоната (SB3-14), 3-[(3-холамидпропил) диметиламмоний]-1-пропансульфоната (CHAPS).

Настоящее изобретение также предусматривает использование детергента для улучшения высвобождения полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 (А, В и С). Высвобождение D-антигена из неочищенных собранных материалов культуры клеток, содержащего полиовирус, в результате обработки детергентом (домифеном бромидом). Несколько образцов собранного материала с определенными значениями плотности клеток, каждый из которых содержал разные штаммы полиовируса (Mahoney, MEF-1 или Saukett), обрабатывали детергентом, а затем центрифугировали. Концентрация D-антигена в надосадочной жидкости раскрыта в виде зависимости от концентрации детергента.

Фиг. 2 (А, В и С). Осаждение ДНК клетки-хозяина в неочищенных собранных материалах культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки детергентом (домифеном бромидом). Несколько образцов собранного материала с определенными значениями плотности клеток, каждый из которых содержал разные штаммы полиовируса (Mahoney, MEF-1 или Saukett), обрабатывали детергентом, а затем центрифугировали. Концентрация ДНК клетки-хозяина в надосадочной жидкости раскрыта в виде зависимости от концентрации детергента.

Фиг. 3. Соотношение концентрация D-антигена в надосадочной жидкости/концентрация D-антигена в неочищенном материале до и после обработки детергентом. Соотношения измеряли для нескольких образцов собранного материала с отличающимися показателями плотности клеток, которые содержали разные штаммы полиовируса (Mahoney, MEF-1 или Saukett).

Фиг. 4. Схема технологического процесса выделения полиовируса.

Фиг. 5. Определение характеристик продукта с помощью SDS-PAGE для штаммов полиовируса (А) Mahoney, (В) МЕF-1, (С) Saukett. 1=маркер, 2=контроль пригодности системы, 3=элюат СЕХ, 4=элюат SEC.

Фиг. 6 (А). Высвобождение D-антигена из неочищенных собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки разными катионными детергентами: СТАВ, СРС и ВТС, соответственно.

Фиг. 6 (В). Осаждение ДНК клетки-хозяина в неочищенных собранных материалах культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки разными катионными детергентами: СТАВ, СРС и ВТС, соответственно.

Фиг. 7 (А, В и С). Высвобождение D-антигена в неочищенных собранных материалах культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки разными типами детергентов (анионными, цвиттерионными и неионогенными детергентами).

Фиг. 8 (А, В и С). Осаждение ДНК клетки-хозяина в неочищенных собранных материалах культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки разными типами детергентов (анионными, цвиттерионными и неионогенными детергентами).

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к улучшенным способам выделения частиц полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус. Неочищенный собранный материал культуры клеток, определенный в настоящем изобретении, получают сразу после культивирования клеток. Материал называют неочищенным, поскольку его не обрабатывали и не очищали каким-либо способом перед обработкой детергентом. В отличие от надосадочной жидкости собранного материала культуры клеток, неочищенный собранный материал культуры клеток содержит клетки и клеточный дебрис вместе с частицами полиовируса.

В ранее раскрытых способах выделения полиовируса, например, согласно Henderson et al., очищенный собранный материал подвергают обработке в отличие от неочищенного собранного материала культуры клеток, что описано в настоящей заявке. Различие заключается в том, что собранный материал согласно

Henderson et al. уже прошел стадию очистки, в ходе которой собранный материал центрифугировали с удалением клеточного дебриса. Согласно Henderson, катионный детергент не добавляли к неочищенному собранному материалу культуры клеток, вместо этого его добавляли к очищенному собранному материалу, из которого клеточный дебрис был предварительно удален.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению частицы полиовируса выделяют из образцов неочищенного собранного материала клеток с высокой плотностью клеток, что дает высокие показатели выхода выделенного полиовируса. Такой неочищенный собранный материал культуры клеток с высокой плотностью клеток получают при культивировании клеток до высоких показателей плотности клеток. Такое культивирование, например, можно осуществлять с использованием режима периодических культур, периодических культур с подпиткой или перфузии. Способы культивирования клеток до высоких показателей плотности клеток известны специалистам в данной области. Конкретные способы получения культур с высокой плотностью клеток раскрыты, например, в WO2004/099396, WO2005/095578, WO2008/006494.

Согласно настоящему изобретению неочищенный собранный материал культуры клеток с высокой плотностью клеток содержит от приблизительно 5×10^6 до 150×10^6 клеток/мл, например, от приблизительно 8×10^6 до 120×10^6 клеток/мл, например, от приблизительно 12×10^6 до 100×10^6 клеток/мл, например, от приблизительно 20×10^6 до 80×10^6 клеток/мл, например, от приблизительно 10×10^6 до 60×10^6 клеток/мл.

В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению плотность клеток в указанном неочищенном собранном материале культуры клеток варьирует от приблизительно 10×10^6 до 50×10^6 клеток/мл, например, составляет по меньшей мере приблизительно 15×10^6 клеток/мл, например, по меньшей мере приблизительно 20×10^6 клеток/мл, например, по меньшей мере приблизительно 25×10^6 , например, не более приблизительно 30×10^6

клеток/мл, например, не более приблизительно 35×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 40×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 45×10^6 клеток/мл.

Однако способы в соответствии с настоящим изобретением также подходят для собранного материала культур клеток с более низкими показателями плотности клеток, например, составляющей от приблизительно $0,5 \times 10^6$ до 10×10^6 клеток/мл, например, от приблизительно 1×10^6 до 5×10^6 клеток/мл.

Как правило, культуры клеток инфицируют частицами полиовируса с тем, чтобы предоставить возможность указанному полиовирусу размножиться в клетках. В связи с этим неочищенный собранный материал культур клеток, который содержит высокие концентрации полиовируса, получают в одном биореакторе. Способы инфицирования клеточных культур известны специалистам в данной области. Конкретные способы получения культур с высокой плотностью клеток и высокой концентрацией вирусов раскрыты в, например, W02011/006823. В данном ссылочном документе описаны способы получения больших количеств рекомбинантного полиовируса. Настоящие способы основаны на способности инфицировать культуры с высокой плотностью клеток с сохранением высокого показателя продуктивности полиовируса на клетку. В связи с этим, предложен способ получения неочищенного собранного материала культуры клеток с высокой плотностью клеток и высокими концентрациями полиовируса в одном биореакторе. Типичные показатели выхода в соответствии с настоящими способами для рекомбинантного полиовируса дикого типа, инфицированного при плотности клеток, например, 12,5 миллиона/мл, и сбора материала через 22-24 ч. после инфицирования находятся в диапазоне от $5,0 \times 10^9$ до $3,2 \times 10^{10}$ TCID₅₀/мл.

После того, как полиовирусы размножились в культуре клеток, уничтожив большую часть клеток (лизис), частицы полиовируса в соответствии с настоящим изобретением выделяют из неочищенного собранного материала культуры клеток.

В настоящее время описаны способы получения полиовируса, которые полностью основаны на аутологичном высвобождении

полиовируса из клеток в культуральную среду, что является очень эффективным способом для полиовирусов. Неожиданно авторы настоящего изобретения выявили, что значительного выхода можно было достичь в том случае, если культуру клеток (которая уже содержит высвободившийся полиовирус, клеточный дебрис, ДНК клетки-хозяина и белки клетки-хозяина) обрабатывали детергентом, предпочтительно выбранным из группы катионных детергентов, анионных детергентов, неионогенных детергентов и цвиттерионных детергентов. Кроме того, результатом данной стадии является очищенный собранный материал с большей степенью чистоты и со значительно сниженной концентрацией ДНК и белка клетки-хозяина.

Анализы, используемые для количественного определения ДНК клетки-хозяина, белков клетки-хозяина и частиц полиовируса в ходе осуществления способа

Остаточную ДНК клетки-хозяина можно определить с помощью количественной ПЦР в реальном времени, используя количественную ПЦР в реальном времени с зондом Taqman. Праймеры и зонд сконструированы для 18S рибосомальной ДНК. Количества ДНК в образце определяют путем сравнения с калибровочной кривой, построенной по известному количеству ДНК, которая получена с ДНК клетки-производителя. Исходную ДНК для калибровочной кривой расщепляют с помощью рестриктазы Aра I для имитации расщепленной и частичной деградированной ДНК.

Образцы ДНК выделяют путем обработки дезоксиголевой кислотой и протеиназой K. Реакции ПЦР в реальном времени проводят с использованием системы Fast Real Time PCR (ABI Prism 7500). Значения количества ДНК получают из дублирующих измерений образцов.

Концентрацию остаточных белков клетки-хозяина (НСР) определяли посредством твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора (Cugnus Technologies, F530), специфичного к НСР. Концентрации определяют по отношению к калибровочной кривой образцов, входящих в состав набора. Диапазон анализа составил 25–200 нг/мл.

Основой вакцины против полиомиелита является живой вирус или инактивированный вирус. Они содержат D-антиген полиовируса,

который представляет собой важный протективный антиген. Показатели выхода вируса можно измерить с помощью стандартных методик титрования вируса, в то время как определение концентрации D-антигена для полиовируса штаммов Mahoney, MEF-1 и Saukett в качестве показателя эффективности можно выполнить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа для выявления D-антигена (ELISA). Анализ основан на связывании D-антигена с серотип-специфическими антителами, к которым добавляют смесь реагента пероксидазы. Затем пероксидазную активность количественно определяют по оптической плотности. Концентрации D-антигена определяют по отношению к международному стандарту IPV Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM), см. Fuchs et al. Диапазон анализа составил 40-160 DU/мл для Mahoney, 8-32 DU/мл для MEF-1 и 32-128 DU/мл для Saukett.

Иммуногенность можно определить, например, путем *in vivo* тестирования на животных. Эффективность можно определить с помощью ELISA для выявления D-антигена и с помощью анализа нейтрализации полиовируса в культуре клеток с использованием сывороток крови от предварительно иммунизированных крыс.

Повышенное высвобождение D-антигена и селективное осаждение ДНК клетки-хозяина

Выявили, что результатом добавления детергента к неочищенному собранному материалу культуры клеток, содержащему полиовирус, является значительное увеличение концентрации D-антигена в жидкой фазе собранного материала. В то же время это приводит к осаждению ДНК клетки-хозяина. В качестве примера в данном документе результатом данной стадии осаждения является повышение на приблизительно 100% высвобождения D-антигена из неочищенного собранного материала клеток в жидкую фазу, что приводит к уменьшению концентрации ДНК клетки-хозяина по меньшей мере на приблизительно 5 log₁₀ после очистки.

Следовательно, в настоящем изобретении предусмотрен способ, подходящий для выделения частиц полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток, а также подходящий для собранного материала культуры с высокой плотностью клеток.

Детергенты, которые могут быть применимы в практическом осуществлении настоящего изобретения, включают без ограничения катионные детергенты, анионные детергенты, неионогенные детергенты и цвиттерионные детергенты.

В предпочтительном варианте осуществления детергентами, которые могут быть применимы в практическом осуществлении настоящего изобретения, являются катионные детергенты, которые включают без ограничения сополимеры амина, соединения четвертичного аммония, такие как, например, домифена бромид (DB), гексадецилтриметиламмония бромид (СТАВ), гексадецилпиридиния хлорид (СРС) и бензетония хлорид (ВТС), и любые соответствующие их смеси. Более конкретно, многие формы полиэтиленimina (PEI) продемонстрировали свою эффективность в нейтрализации избытка заряда аниона (примеси ДНК). Соответствующие катионные детергенты для использования в настоящем изобретении включают без ограничения следующие классы и примеры коммерчески доступных продуктов: моноалкилтриметиламмониевые соли (примеры коммерчески доступных продуктов включают цетилтриметиламмония хлорид или бромид в виде СТАВ, тетрадецилтриметиламмония бромид или хлорид (ТТА), алкилтриметиламмония хлорид, алкиларилтриметиламмония хлорид, додецилтриметиламмония бромид или хлорид, додецилдиметил-2-феноксиэтиламмония бромид, гексадециламин: хлоридная или бромидная соль, додециламиновая или хлоридная соль, и цетилдиметилэтиламмония бромид или хлорид), моноалкилдиметилбензиламмония хлорид (примеры включают алкилдиметилбензиламмония хлорид и бензетония хлорид в виде ВТС), диалкилдиметиламмониевые соли (коммерческие продукты включают домифена бромид (DB), галогениды дидецилдиметиламмония и октилдодецилдиметиламмония хлорид или бромид), гетероароматические аммониевые соли (коммерческие продукты включают галогениды цетилпиридиния (СРС или бромидная соль и гексадецилпиридиния бромид или хлорид), цис-изомер 1-[3-хлораллил]-3,5,7-триаза-1-азониаадамантана, алкил-изохинолиния бромид и алкилдиметилнафтил-метиламмония хлорид (ВТС 1110), соли многозамещенного четверичного аммония (коммерчески доступные

продукты включают без ограничения алкилдиметилбензиламмония сахаринат и алкилдиметилбензиламмония циклогексилсульфамат), соли бис-четверичного аммония (примеры продукта включают 1,10-бис(2-метил-4-аминохинолиний-хлорид)-декан, 1,6-бис[1-метил-3-(2,2,6-триметилциклогексил)-пропилдиметиламмоний хлорид]гексан или триклобизония хлорид и соединения бис-четверичного аммония, обозначенного как CDQ в Buckman Brochures) и полимерные соли четверичного аммония (включает полиионены, такие как поли[оксиэтилен(диметилимино)этилен(диметилимино)-этилендихлорид], поли[N-3-диметиламмоний)пропил]N-[3-этиленоксиэтилендиметиламмоний)пропил]мочевины дихлорид и альфа-4-[1-трис(2-гидроксиэтил)аммония хлорид]).

Специалисту будет понятно, что они представляют собой примеры катионных детергентов, и исходя из раскрытия по настоящему изобретению, понятно, что они также будут подходящими для настоящего изобретения.

В еще более предпочтительном варианте осуществления диалкилдиметиламмония хлорид, такой как домифена бромид (DB), используют в настоящем изобретении. Хотя большое число потенциальных катионных детергентов можно использовать для практического осуществления настоящего изобретения, домифена бромид представляет особый интерес в первую очередь из-за своей доступности в качестве сырьевого материала, соответствующего GMP, использования в настоящее время в других продуктах, предназначенных для использования в медицине. Более конкретно, поскольку домифена бромид широко используют в качестве активного ингредиента в продуктах для гигиены ротовой полости, а также в качестве кремов с антибиотиком для местного применения, данное вещество получают в больших количествах и выпускают в условиях cGMP.

В другом предпочтительном варианте осуществления детергенты, которые могут быть применимы в практическом осуществлении настоящего изобретения, представляют собой анионные детергенты, которые включают без ограничения алкилсульфонаты, такие как гидрат тауродезоксихолата натрия (STH), натриевая соль 1-октансульфоновой кислоты, 1-

декансульфонат натрия, 1-гептансульфонат натрия и гексансульфонат натрия; и алкилсульфонаты, такие как додецилсульфат натрия (SDS), додецилсульфат лития и октилсульфат натрия и любые соответствующие их смеси.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления детергенты, которые могут быть применимы в практическом осуществлении настоящего изобретения, представляют собой цвиттерионные детергенты, которые включают без ограничения 3-(N,N-диметилмиристиламмонио)пропансульфонат (SB3-14), 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-1-пропансульфонат (CHAPS), 3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]-2-гидрокси-1-пропансульфонат (CHAPSO), 3-(N,N-диметилоктиламмонио)пропансульфонат в виде внутренней соли (SB3-8), 3-[N,N-диметил(3-пальмитоиламинопропил)аммоний]-пропансульфонат, 3-(N,N-диметилоктадециламмонио)пропансульфонат (SB3-18), аминосульфобетаин-14; 3-[N,N-диметил(3-миристоиламинопропил)аммонио]пропансульфонат (ASB-14) и N,N-диметилдодециламин N-оксид (DDAO) и любые соответствующие их смеси. В другом предпочтительном варианте осуществления детергенты, которые могут быть применимы в практическом осуществлении настоящего изобретения, представляют собой неионогенные детергенты, которые включают без ограничения простые поли(оксиэтилен)овые эфиры, такие как 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль (Triton® X-100), простой гексадециловый эфир полиэтиленгликоля (Brij® 58), полиэтиленгликоль сорбитан моноолеат (Tween®80), (1,1,3,3-тетраметилбутил)енил-полиэтиленгликоль (Triton® X-114), полиоксиэтиленсорбитан монолаурат (Tween®20), простой додециловый эфир полиэтиленгликоля (Thesit®); гликозидные детергенты, такие как децил- β -D-1-тиомальтопиранозид (DTP), 6-циклогексилгексил- β -D-мальтозид (Cymal-6), децил- β -D-1-тиоглюкопиранозид, n-додецил- β -D-мальтозид (DDM), октил- β -D-глюкопиранозид (OGP), октил- β -D-1-тиоглюкопиранозид; желчные кислоты, такие как N,N-бис[3-(D-глюконамид)

пропил]дезоксихоламид (дезоксиг-ВигСНАР) и любые соответствующие их смеси.

Соответствующая концентрация детергента для обработки суспензии, содержащей полиовирус, с высокой плотностью клеток, составляющей от 10×10^6 до 150×10^6 клеток/мл, варьирует от приблизительно 1 мМ до 12 мМ. Соответствующая концентрация DB для обработки суспензии, содержащей полиовирус, с высокой плотностью клеток, составляющей от 10×10^6 до 50×10^6 клеток/мл, варьирует от приблизительно 1 мМ до 4 мМ. Соответствующая концентрация DB для обработки собранного материала в виде суспензии, содержащей полиовирус, с высокой плотностью клеток, составляющей от 10×10^6 до 30×10^6 клеток/мл, варьирует от приблизительно 1 мМ до 3 мМ.

Данные концентрации будут находиться в пределах компетенции специалиста в данной области при тестировании потенциальных заменителей детергентов, раскрытых в данном документе, для определения соединения, которое эффективно увеличивает высвобождение полиовируса из клеток, в то же время оно может дополнительно осаждать молекулы нуклеиновой кислоты и прочий клеточный дебрис отдельно от частиц полиовируса, при этом в качестве примера такого соединения в данном документе приведены гексадецилтриметиламмония бромид (СТАВ), гексадецилпиридиния хлорид (СРС), бензетония хлорид (ВТС) и домифена бромид (DB), и одновременно эффективно осаждает молекулы нуклеиновой кислоты и прочий клеточный дебрис отдельно от частиц полиовируса.

Таким образом, настоящее изобретение частично относится к способам выделения частиц полиовируса из суспензии с высокой плотностью клеток с одновременным улучшением извлечения вируса. Указанные способы улучшают высвобождение частиц полиовируса и в то же время вызывают селективное осаждение молекул нуклеиновой кислоты клетки-хозяина отдельно от частиц полиовируса при добавлении детергента к неочищенному собранному материалу культуры клеток.

Способы очистки

Неочищенный собранный материал культуры клеток, обработанный детергентом, затем подвергают очистке с удалением цельных клеток, осажденной ДНК клетки-хозяина, клеточного дебриса и других примесей. Указанную очистку можно проводить с помощью глубинной фильтрации. Также возможным является центрифугирование с доочисткой посредством глубинной фильтрации или без нее. Таким образом, очистку собранного материала, обработанного детергентом, можно выполнять с применением только центрифугирования или центрифугирования вместе со стадией доочистки, такой как глубинная фильтрация.

При выборе фильтра или схемы фильтра предпочтительно обеспечить надежное функционирование способа, если в ходе вышестоящих процессов происходили изменения или колебания. Поддержание равновесия между надлежащей эффективностью очистки и стадией выходов можно проанализировать в ходе испытания разнообразных типов фильтров с разными внутренними наполнителями. В качестве подходящих фильтров можно использовать целлюлозные фильтры, волокна регенерированной целлюлозы, целлюлозные волокна в комбинации с неорганическими вспомогательными фильтрующими средами (например, с диатомитовой землей, перлитом, пирогенным диоксидом кремния), целлюлозные волокна в комбинации с неорганическими вспомогательными средствами и органическими смолами или любые их комбинации, а также полимерные фильтры (примеры включают без ограничения нейлон, полипропилен, полиэфирсульфон) для достижения эффективного удаления и надлежащего извлечения вируса. Как правило, многостадийный способ предпочтителен, но не является необходимым. Иллюстративный двух- или трехстадийный способ будет предусматривать фильтр (фильтры) грубой очистки для удаления крупного осадка и клеточного дебриса с последующей второй стадией доочистки фильтром(фильтрами) с номинальным размером пор более 0,2 мкм, но менее 1 мкм. Оптимальная комбинация будет выражена в виде зависимости от распределения осадка по размеру, а также других переменных. Кроме того, отдельные стадии технологических операций, в которых используют относительно плотный фильтр или центрифугирование, могут также давать продукт

хорошего качества. В целом любой подход по очистке, включающий тупиковую фильтрацию, микрофильтрацию, центрифугирование или добавление вспомогательных фильтрующих сред (например, диатомитовой земли) в комбинации с тупиковой или глубинной фильтрацией, которые обеспечивают фильтрат подходящей чистоты без засорения мембраны и/или смолы на следующей стадии, будут приемлемыми на практике в рамках настоящего изобретения. Глубинная фильтрация является надежным способом первичной очистки по настоящему изобретению.

В другом предпочтительном варианте осуществления в соответствии с настоящим изобретением встроенную в технологическую линию анионообменную мембрану можно встроить в ряд очищающих фильтров для дополнительного удаления остаточного уровня ДНК или отрицательно заряженных примесей, таких как белки клетки-хозяина, без потери полиовируса в физиологических условиях. Такие высокоэффективные мембраны с большими порами (>3 мкм) хорошо известны для эффективного удаления отрицательно заряженных контаминантов, таких как остаточная ДНК, белки клетки-хозяина и/или занесенные вирусы, например, в области получения моноклональных антител. Подходящими мембранами, среди прочих, являются сильные анионообменные мембраны с положительно заряженным лигандом, как правило, соединением четверичного аммония, привитым к, например, сшитой целлюлозной матрице. Неожиданно выявили, что несмотря на то, что обычно вирусы связываются с такими мембранами в физиологических условиях (рН 7-8, проводимость 15-18 мСм/см), полиовирус с несколько более высокой изоэлектрической точкой проходит через такие мембраны, что делает их подходящим вариантом для удаления отрицательно заряженных примесей. В определенных вариантах осуществления можно использовать гранулы на основе хроматографических смол, но из-за преобладающих сильных конвекционных потоков мембраны являются предпочтительным выбором.

Результатом комбинации обработки детергентом со стадией очистки является уменьшение концентрации ДНК клетки-хозяина по меньшей мере на $4 \log_{10}$, предпочтительно по меньшей мере на $5 \log_{10}$ или еще более предпочтительно по меньшей мере на $5,5 \log_{10}$. Результирующее давление, образующееся поперек всей фильтрующей

установки, остается на уровне ниже 0,8 бар, являясь для специалистов в данной области показателем того, что типы фильтров были надлежащим образом выбраны и распределены по размерам.

В предпочтительном варианте осуществления анионообменную мембрану можно встраивать в ряд фильтров для очистки, устраняя необходимость в отдельной стадии анионного обмена, которая присутствует во всех известных в настоящее время способах получения полиовируса.

В предпочтительных вариантах осуществления по настоящему изобретению, собранные частицы вируса обрабатывают с помощью последовательного многостадийного способа очистки, который включает (в следующем порядке): глубинную фильтрацию посредством заряженного фильтрующего элемента (например, фильтра Millipore Millistak DОНС), двойной мембранный фильтр 0,8 мкм/0,45 мкм (например, Sartopore 2), сильную анионообменную адсорбирующую мембрану (например, Sartorius Single Sep Q) и стерильную фильтрацию посредством микропористой мембраны с относительно маленьким размером пор (например, фильтрующие элементы, 0,22 мкм).

Стадии дополнительного выделения

После очистки концентрирование очищенной суспензии с частицами вируса может считаться дополнительной стадией в способе в соответствии с настоящим изобретением, но никоим образом не является обязательным. Концентрирование суспензии частиц вируса можно осуществлять путем ультрафильтрации. Суспензию можно концентрировать в 5-20 раз (причем допускается обработка нуклеазой, что упомянуто в данном документе ниже). Конкретная выбранная мембрана для ультрафильтрации будет иметь маленький размер, достаточный для того, чтобы удерживать частицы вируса, но при этом и большой размер, достаточный для того, чтобы эффективно очищать от примесей. В зависимости от производителя и типа мембраны подходящим могут быть номинальные значения отсека по молекулярной массе от 10 до 1000 кДа. Выбор размера отсека по молекулярной массе продиктован компромиссом между показателем выхода и очисткой от примесей. Ультрафильтрация с использованием режима с тангенциальным потоком является предпочтительной. В указанном режиме стадию

можно контролировать путем регулирования фиксированного поперечного потока с контролем обратного фильтрационного давления по ретентату или без него, регулирования фиксированного трансмембранного давления или настройки как поперечного потока, так и удельной производительности мембраны.

Другая стадия способа, которую можно включить в данную стадию способа, но которая никоим образом не является обязательной, представляет собой последовательное проведение стадии способа замены буфера посредством диафильтрации. Диафильтрацию или замену буфера с использованием модулей для ультрафильтрации применяют для удаления или замены солей, сахаров и им подобных. Специалист в данной области знает, при каких условиях следует проводить замену буфера и какие буферы являются подходящими для данной стадии.

Обработку нуклеазой можно рассматривать для включения в способ на данной стадии способа, но она никоим образом не является обязательной. Обработка нуклеазой может включать использование нуклеаз широкого спектра действия, например, BENZONASE™, ДНКзу, РНазу или любую их комбинацию. Часто используют нуклеазу или смесь ферментов с РНКазной и ДНКазной активностью. Стадия обработки нуклеазой может предусматриваться в любых точках способа, при условии, что содержание остаточной нуклеазы в конечном продукте является приемлемым для применения. Обработку нуклеазой можно проводить только после отдельной стадии очистки или стадии очистки и концентрации, но перед стадией дополнительного выделения, такой как стадия захвата или стадия доочистки.

Дополнительный модуль для технологической операции, который можно использовать для уменьшения примесей, может представлять собой, например, модуль для хроматографии, но он никоим образом не является обязательным. Можно использовать модуль для хроматографии, состоящий из хроматографических сред в разных форматах, таких как смолы, мембранные адсорберы и монолиты. Технологической операцией (технологическими операциями) в модуле для хроматографии можно управлять либо в положительном или в отрицательном режиме (пояснены ниже). В определенных вариантах

осуществления по настоящему изобретению подаваемую суспензию частиц вируса в модуль (модули) для хроматографии можно скорректировать в отношении определенных условий подаваемого материала, таких как, например, pH и/или ионная сила раствора. В ходе указанной стадии частицы вируса дополнительно выделяют путем отделения частиц вируса от остаточных примесей, таких как, например, нуклеиновые кислоты клетки-хозяина и белки клетки-хозяина. Выделения частиц вируса в ходе указанной стадии можно достигнуть путем, например, аффинной хроматографии, анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, гель-фильтрационной хроматографии, хроматографии с обращенной фазой, гидрофобной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом/или хроматографии на гидроксипатите, используемой либо в виде отдельной стадии способа, либо в комбинации с несколькими стадиями способа.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, где используют технологическую операцию (технологические операции) с модулем для хроматографии, частицы вируса можно выделять путем их отделения от остаточных примесей, содержащихся в суспензии частиц вируса. Частицы вируса можно отделять либо путем связывания частиц вируса в определенных условиях с хроматографическими средами, тогда как некоторые, если не большая часть примесей, не связываются с хроматографическими средами. Иным словами, частицы вируса можно отделять путем связывания некоторых, если не большей части примесей с хроматографическими средами, оставляя большую часть частиц вируса несвязанными с хроматографическими средами. Указанные выше режимы технологических операций известны в данной области как режим положительного связывания и режим отрицательного связывания, соответственно.

Также возможным является управление определенной технологической операцией (технологическими операциями) в модуле для хроматографии без какого-либо связывающего взаимодействия, что зависит от используемых хроматографических сред. Иллюстративными хроматографическими средами могут быть без ограничения среды для гель-фильтрационной хроматографии

(например, Sepharose™ 6FF). Специалист в данной области знает, как определить требуемые условия для отделения частиц вируса от примесей. Примеры последовательного использования разных технологических операций для получения высокоочищенных растворов полиовируса, как указано выше, описаны в литературе, например, в Bakker et al., 2011 и Thomassen et al., 2013.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению технологическую операцию (технологические операции) с использованием модуля для хроматографии можно использовать в качестве стадии захвата, которая, по сути, представляет собой комбинацию стадии концентрирования и выделения, в связи с чем устраняется необходимость в отдельной стадии концентрирования, описанной ранее (например, стадии ультрафильтрации). Хроматографические среды в разных форматах можно использовать на указанных стадиях. Примерами форматов хроматографических сред являются анионообменные смолы, мембранные адсорберы и монолиты. Специалист в данной области может легко определить оптимальный формат хроматографических сред для использования в конкретной стадии способа.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, где технологическую операцию (технологические операции) с модулем для хроматографии используют в качестве стадии (стадий) захвата, частицы вируса можно выделить путем их отделения от остаточных примесей, содержащихся в суспензии частиц вируса. Частицы вируса можно отделить путем связывания частиц вируса в определенных условиях с хроматографическими средами, тогда как некоторые примеси, если не большая их часть, не связываются с хроматографическими средами.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, где технологическую операцию (технологические операции) с модулем для хроматографии используют в качестве стадии (стадий) захвата, суспензия частиц вируса, также называемая подаваемым материалом, требует коррекции определенных условий для оптимального отделения от примесей. Иллюстративные условия для подаваемого материала, подлежащие корректированию, представляют

собой, например, значение рН и ионную силу суспензии частиц вируса. Частицы вируса можно дополнительно выделять с помощью последующей стадии элюирования, которую можно проводить путем, например, изменения значения рН и/или ионной силы жидкой фазы хроматографической среды.

В конкретном варианте осуществления по настоящему изобретению среду для катионообменной хроматографии используют в стадии захвата. Условия для подаваемого материала можно корректировать путем добавления кислот или оснований (например, лимонной кислоты, NaOH) до достижения необходимого значения рН и путем добавления солевых растворов или деионизированной воды (например, NaCl или MilliQ) до достижения необходимой ионной силы. В качестве руководства и конечно без ограничения, значение рН можно потенциально варьировать от приблизительно 4,5 до 7,0, ионную силу можно потенциально варьировать от приблизительно 10 мСм/см до 25 мСм/см. Стадию дополнительной очистки (например, фильтрации с размером фильтров 0,45 мкм или 0,22 мкм) после корректировки условий для подаваемого материала можно рассматривать для включения в способ для уменьшения нагрузки на следующей стадии хроматографии, но она никоим образом не является обязательной. Специалист в данной области может легко определить, какие растворы и фильтрующие модули используют для конкретной стадии способа.

В конкретном варианте осуществления по настоящему изобретению, где используют технологическую операцию (технологические операции) с модулем для хроматографии в качестве стадии (стадий) захвата, и где частицы вируса избирательно связываются с сильными средами для катионообменной хроматографии для отделения, дополнительное выделение частиц вируса проводят с помощью последующего селективного элюирования частиц вируса путем изменения условий для жидкой фазы в пределах технологической операции в модуле. В качестве руководства и конечно без ограничения, элюирование частиц вируса можно проводить путем изменения значения рН жидкой фазы от кислых значений рН до основных значений рН (например, в диапазоне рН 4–10). В качестве руководства и конечно без ограничения,

элюирование частиц вируса можно также проводить путем изменения ионной силы жидкой фазы от пониженной до повышенной ионной силы (например, в диапазоне от 10 мСм/см до 35 мСм/см).

В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению в суспензии частиц полиовируса, также называемой подаваемым материалом, корректируют рН до кислых значений, варьирующих в диапазоне от 4,4 до 5,6, а значение ионной силы корректируют в диапазоне, варьирующем от 14 мСм/см до 22 мСм/см. Как следствие, скорректированный подаваемый материал загружают в мембранный адсорбер для катионообменной хроматографии (например, Sartobind S), где вирус селективно связывается с мембраной. Частицы вируса дополнительно выделяют из примесей после стадии элюирования путем повышения ионной силы элюирующего буфера, варьирующей в диапазоне от 25 мСм/см до 40 мСм/см, в то время как значение рН сохраняется постоянным в диапазоне 4,4-5,6. Элюированную суспензию с частицами вируса затем можно фильтровать через, например, 0,22 мкм фильтрующий модуль для уменьшения биологической нагрузки и осаждающих средств.

В соответствии с настоящим изобретением, если это необходимо для достижения определенной степени выделения продукта, дополнительную стадию выделения, называемую стадией "доочистки", можно включить в способ. Стадия "доочистки" никоим образом не является обязательной для полного выделения в последовательном способе, но является предпочтительной стадией способа для достижения надежного полного выделения в последовательности способа.

В ходе указанной стадии из суспензии частиц вируса необходимо удалять следовые количества примесей, таких как, например, без ограничения нуклеиновые кислоты клетки-хозяина (например, ДНК) и белки клетки-хозяина. Стадию "доочистки" можно проводить посредством, но без ограничения, аффинной хроматографии, анионообменной хроматографии, гель-фильтрационной хроматографии, хроматографии с обращенной фазой, гидрофобной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом, хроматографии на гидроксипатите и/или ультрафильтрации, используемой либо в виде отдельной стадии способа, либо в комбинации с несколькими стадиями

способа. В ходе указанной стадии замену буфера в суспензии вируса можно рассматривать для включения в последовательность способа, но она никоим образом не является обязательной.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, где используют технологическую операцию (технологические операции) с модулем для хроматографии в качестве стадии (стадий) доочистки, можно использовать хроматографические среды в разных форматах, таких как, например, смолы, мембранные адсорберы и монолиты. Технологической операцией (технологическими операциями) в модуле для хроматографии можно управлять либо в положительном или в отрицательном режиме. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению подаваемую суспензию частиц вируса на стадию (стадии) доочистки можно скорректировать в отношении определенных условий подаваемого материала, таких как, например, pH и/или ионная сила раствора. Частицы вируса можно выделять с помощью последующей стадии элюирования, которую можно выполнять путем, например, изменения значения pH и/или ионной силы жидкой фазы хроматографической среды.

В конкретных вариантах осуществления по настоящему изобретению выделение частиц вируса можно также проводить с использованием различий по размерам частиц вируса и примесей. Иллюстративными стадиями способа могут быть гель-фильтрационная хроматография и/или ультрафильтрация.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения стадию (стадии) доочистки можно, в дополнение к выделению частиц вируса, использовать в качестве стадий замены буфера. Иллюстративными стадиями способа могут быть без ограничения гель-фильтрационная хроматография и/или ультрафильтрация.

В конкретном варианте осуществления по настоящему изобретению, где включены стадии ультрафильтрации/диафильтрации, можно проводить удаление остаточных примесей (например, белков клетки-хозяина, нуклеиновых кислот клетки-хозяина), а также замену буфера на требуемый буфер (например, буфера для составления). Ультрафильтрация с тангенциальным потоком является применимой в удалении остаточных количеств белка и нуклеиновых кислот и для

осуществления перемещения частиц вируса в буфер для составления. Выбранная мембрана для ультрафильтрации будет иметь достаточно маленький размер для того, чтобы удерживать частицы вируса, но достаточно большой для того, чтобы эффективно очистить от примесей. В зависимости от производителя и типа мембраны подходящими могут быть номинальные значения отсечения по молекулярной массе от 100 до 1000 кДа.

В предпочтительных вариантах осуществления по настоящему изобретению частицы вируса можно отделять от остаточных примесей посредством гель-фильтрационной хроматографии (например, Sepharose™ 6FF) с одновременной заменой буфера на буфер для составления. Необходимых уровней чистоты частиц вируса, а также качества буфера для замены можно достигнуть путем изменения нескольких показателей для модуля гель-фильтрационной хроматографии. Специалист в данной области может определить оптимальные условия эксплуатации для достижения необходимой чистоты и необходимых технологических показателей.

Особенно предпочтительный способ получения выделенного полиовируса из культуры клеток в соответствии с настоящим изобретением предусматривает стадии а) добавления детергента к культуре клеток; б) очистки указанной культуры клеток, содержащей полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса; в) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии б), посредством катионообменной хроматографии с получением суспензии, содержащей полиовирус; и д) дополнительного выделения полиовируса из суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрационной хроматографии.

Стадию стерилизующей фильтрации можно включить в конце способа для уменьшения биологической нагрузки, при этом такая стадия никоим образом не является обязательной. Продукт можно фильтровать через 0,22 мкм мембрану из модифицированного поливинилиденфторида (PVDF) (например, Millipore Millipak).

Масштаб систем на основе культур клеток и систем последующей переработки

Способы по настоящему изобретению являются масштабируемыми. Культуры клеток, для которых можно использовать настоящее изобретение, варьирует от мелкомасштабных культур (например, циклы с объемом 1-10 литров) до среднemasштабных культур (например, циклы с объемом 20-1000 л), и до коммерческого крупномасштабного получения включительно, как, например, производственные циклы с объемом от 1000 до 50000 л. Начальные стадии способа, такие как глубинная фильтрацию, сводят к масштабу объема культуры, в то время как стадии катионообменной хроматографии или альтернативной стадии захвата и последующие стадии сводят к масштабу количества частиц полиовируса. Таким образом, размер партии на последних стадиях будет основываться на производительности биореактора, приблизительно составляющей по меньшей мере от 5×10^9 TCID₅₀/мл до приблизительно 1×10^{11} TCID₅₀/мл. Такие высокие показатели выхода полиовируса можно, например, получить путем инфицирования культур с высокой плотностью клеток (как описано, например, в WO2011/006823). С помощью настоящего изобретения становится возможной дополнительное выделение суспензий с высокой плотностью клеток, содержащей частицы полиовируса в высоких концентрациях. Возможность обработки этих суспензий, которые содержат большие количества клеточного детрита и примесей клетки-хозяина, позволяет выделять большие количества частиц полиовируса на объем суспензии. Преимущество настоящего изобретения заключается в обеспечении способа обработки партий культур клеток с высокими значениями плотности клеток, содержащих частицы полиовируса в высокой концентрации, за счет чего обеспечивается возможность достижения очень высоких показателей выхода вирусов на обработанный объем. Способ по настоящему изобретению, хотя и является применимым для клеточных культур в крупном масштабе, позволит проводить культивирование клеток и в меньшем масштабе, но в то же время до более высоких показателей плотности клеток и с по-прежнему высокими показателями выхода полиовируса, который можно будет дополнительно эффективно обработать. Настоящий способ предоставляет возможность обработки партий с высокой

концентрацией полиовируса, что окажет значительное влияние на всю промышленность, связанную с выделением полиовируса.

Полиовирус и клетки-продуценты

Вакцина против полиомиелита может быть моновалентной, содержащей один тип полиовируса (тип 1, 2 или 3) или бивалентной (содержащей два типа полиовируса, например, типы 1 и 2, 1 и 3 или 2 и 3) или трехвалентной (содержащей три типа полиовируса, например, типы 1, 2 и 3).

Существует возможность получения IPV из полиовирусов дикого типа. В качестве альтернативы, IPV можно получить из авирулентного живого полиовируса, например, из штаммов Sabin, что в дальнейшем снизит риск повторного внесения полиовируса дикого типа в ходе получения IPV (см., например, WO2007/007344 и Doi et al, 2001). Настоящее изобретение является подходящим для выделения полиовируса дикого типа (типов 1, 2 и 3, например, типа 1 штамма Mahoney, типа 2 штамма MEF-1 или типа 3 штамма Saukett), а также авирулентных типов полиовируса (например, штаммов Sabin). Способы в соответствии с настоящим изобретением, используемые для получения IPV, могут служить для снижения себестоимости до такой степени, что IPV может стать доступной для менее и наименее развитых стран. Несмотря на то, что в целом OPV дешевле, чем IPV при получении в соответствии с традиционными способами, высокоэффективные способы по настоящему изобретению могут еще больше снизить себестоимость основного материала для OPV и, следовательно, также снизить себестоимость вакцины.

Обычно каждый из штаммов полиовируса культивируют в отдельной партии, и если, например, получают трехвалентную вакцину, содержащую три типа полиовируса, вирусы (инактивированные в случае IPV) смешивают и составляют для получения отдельных доз. В определенных вариантах осуществления, например, доза готовой вакцины (например, 0,5 мл), к примеру, может содержать 40 единиц D-антигена (DU) типа 1, полиовируса, 8 DU полиовируса типа 2 и 32 DU полиовируса типа 3, определенных путем сравнения с эталонными препаратами.

Способ в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для собранного материала культуры клеток от разных типов клеток. Одним типом клеток, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, являются клетки PER.C6, которые являются иммортализованными клетками, а также известными из уровня техники как стабильные линии клеток, и, таким образом, имеющие потенциал для бесконечной продолжительности жизни (см., например, Barrett et al, 2009). Под клетками PER.C6 для целей настоящей заявки будут подразумеваться клетки, депонированные как ЕСАСС № 9602240 29 февраля 1996. Специалисту в данной области будет понятно, что данное определение будет включать клетки более раннего или более позднего пассажа, или происходящие от более раннего или более позднего пассажа таких депонированных клеток. Клетки PER.C6 описаны в патенте США № 5994128 и в публикации (Fallaux et al, 1998). Такие клетки являются очень подходящими для получения полиовируса с тем, чтобы получать полиовирусные вакцины на основе клеток, поскольку их можно инфицировать и размножить вирус с высокой эффективностью, как, например, описано в WO2011/006823. В данном документе продемонстрировано, что такие клетки являются весьма подходящими для получения высоких уровней полиовируса в бессывороточных суспензионных культурах.

Поскольку остальные типы клеток можно использовать для размножения полиовирусов, способы по настоящему изобретению также является применимыми по отношению к способу с использованием собранного материала неочищенных клеток, содержащих полиовирус, включая другие типы клеток. В качестве примера, в данном документе собранный материал клеток Vero и клеток MRC-5 обрабатывали с помощью способов по настоящему изобретению.

Для крупномасштабного получения инактивированных вакцин против полиомиелита, полиовирус обычно размножают в адгезивных клетках Vero, которые получены от обезьян. Клетки Vero, которые культивируют на микроносителях, широко используют для получения вакцин, в том числе инактивированных, а также живых аттенуированных вакцин против полиомиелита, и к настоящему

времени они представляют собой стабильные линии клеток, наиболее широко признанные регулирующими органами по получению вирусных вакцин, причем ожидается рост использования таких клеток для получения вакцин экспертами в данной области (Barrett et al, 2009). Крупномасштабная культура клеток Vero на микроносителе для инактивированной вакцины против полиомиелита описана у Montagnon et al, 1982 и 1984. Способ крупномасштабного получения вакцины против полиомиелита с использованием клеток Vero и получаемая в результате вакцина, также описаны в патенте США № 4525349.

Получение высоких титров полиовируса (Sabin тип 1) (почти 2×10^9 TCID₅₀/мл) было достигнуто на клетках Vero, культивируемых на микроносителях в среде, содержащей сыворотку, перед продуктивной фазой вируса, которая происходила в бессывороточной среде (Merten et al, 1997). Принимая во внимание недостатки использования сыворотки, авторы определили, что требуется абсолютно бессывороточный способ. В бессывороточных условиях авторы способны получить титр полученного полиовируса, составляющий $6,3 \times 10^8$ TCID₅₀/мл. Титры полученного полиовируса, достигнутые с помощью способа по настоящему изобретению на клетках PER.C6, варьировали в диапазоне от $5,0 \times 10^9$ до $3,2 \times 10^{10}$ TCID₅₀/мл (при плотности клеток при инфицировании 12,5 миллиона/мл).

Альтернативные традиционным клеточные платформы, обычно используемые для получения вакцин в целом для получения IPV, в частности, представляют собой клетки фибробластов легких эмбриона человека (клетки MRC-5), предложенные J.V.Jacobs, 1966. Сравнительное изучение линии клеток-хозяина (Vlecken et al, 2013) продемонстрировало, что адгезивные линии клеток MRC-5 и VERO являются наилучшими продуцентами среди широкого ряда клеток-хозяев, что делает их подходящими кандидатами для получения вирусной вакцины. С использованием культур, прикрепляющихся к поверхности культурального флакона, полученные титры вируса составили $(0,7-2,6) \times 10^6$ TCID₅₀/мл и $(1,4-5,8) \times 10^6$ TCID₅₀/мл на культурах клеток MRC-5 и Vero, соответственно.

Способы выделения по настоящему изобретению являются подходящими для размножения полиовируса в любом типе клеток, восприимчивого к размножению полиовируса, т. е. способы по настоящему изобретению не зависят от типа клеток, используемого для выращивания полиовируса.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется в приведенных далее примерах. Данные примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для пояснения настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Повышение показателей выхода полиовируса в ходе выделения полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, при добавлении катионного детергента

Клетки линии клеток PER.C6 выращивали в бессывороточной культуральной среде в

10 л биореакторе, эксплуатируемом в перфузионном режиме, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл (жк/мл). Перед инфицированием полиовирусом 1 типа (Mahoney), 2 типа (MEF-1) или 3 типа (Saukett) культуру разбавляли свежей культуральной средой до достижения плотности жизнеспособных клеток, варьирующей в диапазоне от $12,5 \times 10^6$ до 50×10^6 жк/мл. Способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при 35°C , при множественности заражения равной 1. В ходе сбора материала, через 20–24 часа после инфицирования, отбирали образец 50 мл, который затем распределяли в 11 аликвот по 4 мл.

Для определения эффекта детергента в отношении собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, проводили эксперимент с титрованием с домифеном бромидом (DB). Определенное количество исходного раствора DB добавляли к аликвотам образцов при предварительно определенной концентрации DB (от 0 до 4 ммоль). Образцы перемешивали и инкубировали в течение одного часа при 35°C . Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 3000 г с осаждением преципитированной ДНК.

Образцы надосадочной жидкости анализировали в отношении количества вируса с помощью ELISA для выявления D-антигена и для определения ДНК клетки-хозяина с помощью количественной ПЦР (Q-PCR).

На фиг. 1 (А, В и С) показано, что D-антиген высвобождается из собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки детергентом (DB). Несколько образцов собранного материала с определенными значениями плотности клеток, каждый из которых содержал разные штаммы полиовируса (Mahoney, MEF-1 или Saukett), обрабатывали детергентом, а затем центрифугировали. Концентрация D-антигена в надосадочной жидкости с поправкой на добавление разведенного детергента приведена в виде зависимости от концентрации детергента. На фиг.1 показано, что после добавления детергента (DB), титр вируса значительно повышался по сравнению с титром вируса перед добавлением детергента (DB). Для каждого штамма и для каждой плотности жизнеспособных клеток можно было наблюдать такую же картину, т. е. повышение концентрации детергента (DB) приводило к повышению высвобождения вируса из неочищенного собранного материала клеток в жидкую фазу.

На фиг. 2 (А, В и С) показано осаждение ДНК клетки-хозяина в неочищенном собранном материале культуры клеток, содержащем полиовирус, как результат обработки детергентом (домифеном бромидом). В показатели концентрации на оси у вносили поправку с учетом фактора разведения детергента. В отношении каждого штамма и каждой плотности жизнеспособных клеток ДНК клетки-хозяина осаждали из неочищенного собранного материала культуры клеток. На фиг.2 отчетливо показано, что эффективная очистка от ДНК происходила в аликвотах с концентрациями детергента (DB) выше 1,3 ммоль.

При этом минимальную концентрацию DB можно определить для каждой отдельной кривой (фиг. 1 и 2), для которой определяли уровень плато D-антигена и в то же время получали максимальную очистку от ДНК. Это минимальное количество детергента увеличивают с плотностью клеток для адаптации к повышенным

количествам клеток и к увеличенному уровню растворимой в сыворотке ДНК клетки-хозяина.

Поскольку повышение детергента не приводило к осаждению полиовируса, специалист в данной области сможет экстраполировать такие результаты на суспензии клеток, содержащие полиовирус, с еще более высокими значениями плотности клеток, например, приблизительно 70×10^6 клеток/мл, например, приблизительно 90×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 120×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 150×10^6 клеток/мл. Специалист сделает заключение, что полиовирус из таких неочищенных собранных материалов культуры клеток с высокой плотностью клеток можно выделить с помощью способов по настоящему изобретению.

Пример 2. Эффективность обработки детергентом в отношении высвобождения полиовируса из неочищенного собранного материала культуры клеток VERO и MRC5

Обработка неочищенного собранного материала полиовируса, полученного из адгезивной культуры клеток VERO

Клетки Vero предварительно культивировали в культуральных флаконах T-175 и их масштаб увеличивали для посева в 1 л флакон с мешалкой Cytodex 3 при 30×10^3 клеток/см² в среде для перемешивания VERO (MEM+10%FBS+6 ммоль глутамина+4,6 г/л глюкозы) и 5 г/л микроносителей Cytodex3. Клетки инкубировали при 37 С, 5% CO₂ и перемешивали при 60 об./мин. в первые 24 ч. и при 90 об./мин. в течение следующих дней. На 3 день после посева (на микроносители) клетки промывали подогретым PBS и проводили замену среды на среду для инфицирования (MEM+4 ммоль глутамина). Размноженную культуру клеток со свежей средой распределяли в 50 мл колбы с мешалкой, содержащими 20 мл культуры клеток, высеянной при 1×10^6 клеток/мл. В колбах с мешалками клетки инфицировали каждым из трех штаммов вируса (Mahoney, MEF-1, Saukett) при MOI 1. Инфицирование проводили при 35°С, 170 об./мин., 5% CO₂, и вирус собирали через 72 часа после инфицирования. Для определения эффекта детергента в отношении неочищенных собранных материалов адгезивных клеток VERO, содержащих полиовирус, исходный раствор DB добавляли к

собранному материалу в конечной концентрации 1,6 ммоль. Для данного эксперимента использовали исходный раствор DB (1,05% масса/объем, 40 ммоль NaCl). Образцы перемешивали и инкубировали в течение одного часа при 35°C. Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 3000 г с осаждением преципитированной ДНК. Образцы надосадочной жидкости анализировали для количественного определения вирусов с помощью ELISA для выявления D-антигена и для определения ДНК клетки-хозяина с помощью Q-PCR.

Обработка неочищенного собранного материала полиовируса, полученного из адгезивной культуры клеток MRC5

Клетки MRC-5 культивировали в BME+10% FBS (nHI)+4 ммоль глутамина и инкубировали при 37°C и 10% CO₂ в культуральном флаконе T75. Каждые 3-4 дня, когда конфлюентность культур составляла примерно 80-90%, проводили пассажирование культур MRC-5 и их размножали в культуральных флаконах T-175. Когда клетки достигали плотности приблизительно 80-90% (день 4), клетки промывали с использованием PBS и проводили замену среды на BME+4 ммоль глутамина. В культуральных флаконах T-175 клетки инфицировали каждым из трех штаммов вируса (Mahoney, MEF-1, Saukett) при MOI 1 в общем объеме 25 мл на колбу. Инфицирование проводили при 35°C, 10% CO₂, и вирус собирали через 72 часа после инфицирования. Для определения эффекта детергента в отношении неочищенных собранных материалов адгезивных клеток MRC5, содержащих полиовирус, исходный раствор DB добавляли к собранному материалу в конечной концентрации 0,6 ммоль. Образцы перемешивали и инкубировали в течение одного часа при 35°C. Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 3000 г с осаждением преципитированной ДНК. Образцы надосадочной жидкости анализировали для количественного определения вирусов с помощью ELISA для выявления D-антигена и для определения ДНК клетки-хозяина с помощью Q-PCR.

Таблица 1. Концентрация D-антигена в надосадочной жидкости собранного материала культуры клеток [DU/мл]

	Адгезивная культура клеток Vero, выращенная на микроносителях	Адгезивная культура клеток MRC-5, выращенная в культуральных флаконах T-175
--	---	---

Концентрация DB	0 mM	1,6 mM	0 mM	0,6 mM
Тип 1 (Mahoney)	153	160	30	36
Тип 2 (MEF-1)	19	34	8	13
Тип 3 (Saukett)	106	119	11	16

В таблице 1 показана концентрация D-антигена при обработке DB, при этом концентрации DB составляла 1,6 ммоль для собранного материала клеток VERO с полиовирусом и 0,6 ммоль для собранного материала клеток MRC-5 с полиовирусом. В значения концентрации D-антигена в таблице внесены поправки с учетом разбавления, обусловленного добавлением детергента.

Результаты показывают, что добавление детергента (DB), вызывает дополнительное высвобождение вируса в жидкую фазу собранного материала культуры клеток VERO и MRC5, тогда как ДНК осаждается отдельно от вируса. Действительно, очистка от ДНК при 1,6 ммоль DB составляла более $2 \log_{10}$ в культуре клеток VERO. Очистка от ДНК при 0,6 ммоль DB составляла более чем $3 \log_{10}$ в культуре клеток MRC5 (данные не показаны). Это показывает, что настоящее изобретение является подходящим для разных типов клеток, используемых для получения полиовируса.

Пример 3. Влияние обработки детергентом на высвобождение полиовируса и очистку от ДНК в биореакторе перед очисткой от клеток

Клетки PER.C6 выращивали в бессывороточной культуральной среде в 10 л стеклянном биореакторе, который эксплуатировали в перфузионном режиме, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жк/мл. Перед инфицированием полиовирусом 1 типа (Mahoney), 2 типа (MEF-1) или 3 типа (Saukett) культуру разбавляли свежей культуральной средой до достижения плотности жизнеспособных клеток $12,5 \times 10^6$ жк/мл. Способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при 35°C, при множественности заражения равной 1. В ходе сбора материала через 20-24 часа после инфицирования исходный раствор домифена бромид (DB) добавляли в течение 30 минут при перемешивании с достижением конечной концентрации DB, составляющей 2,2 ммоль DB. После добавления детергента продолжали инкубацию в биореакторе в течение одного часа при 35°C при постоянном перемешивании.

Образцы неочищенного собранного материала клеток (без обработки с использованием DB и после обработки с использованием DB) центрифугировали (3000 g, 5 минут) для осаждения клеток. Проводили анализ неочищенных образцов (не подвергнутых центрифугированию перед обработкой с использованием DB и, следовательно, содержащих клетки) и образцов надосадочной жидкости для количественного определения полиовируса и ДНК клетки-хозяина с использованием ELISA для выявления D-антигена и Q-PCR, соответственно.

Результаты, изображенные на фиг. 3, показывают, что во всех циклах (для всех трех штаммов) обработка детергентом приводила к двукратному увеличению высвобождения D-антигена из неочищенного собранного материала полиовируса в жидкую фазу. Кроме того, ДНК эффективно осаждалась при обработке с использованием DB. Во всех циклах очистка от ДНК в отношении неочищенного собранного материала составляла более чем 5 log после обработки детергентом, в отличие от 2 log перед обработкой детергентом (данные не показаны). Это демонстрирует, что настоящее изобретение можно также использовать в масштабе биореактора.

Добавление детергента использовали ранее для удаления ДНК клетки-хозяина в области способов выделения аденовирусов, раскрытых в, например, US7326555 и WO2011/045378. Однако селективное осаждение ДНК не было раскрыто до настоящего времени в области выделения полиовируса. Полиовирусы и аденовирусы очень отличаются друг от друга. Фактически, геном полиовируса представлен однонитевой РНК, заключенной в белковый капсид, при этом диаметр частицы вируса составляет приблизительно 30 нанометров. В противоположность этому, аденовирусы представлены большими безоболочечными вирусами, диаметром приблизительно 90-100 нм. Белковый капсид аденовируса содержит двухнитевую спираль ДНК и несет нитевидные выпячивания или шиловидные отростки, способствующие прикреплению к клетке-хозяину, и которые отсутствуют у полиовирусов. Изоэлектрическая точка для аденовирусов соответствует приблизительно рН 5,5, означая, что вирус является отрицательно заряженным при физиологических условиях. Обзорная статья о изоэлектрической точке для

полиовируса свидетельствует о том, что ее величина выше, чем для аденовирусов, соответствуя рН 5,8–7,5 (Thomassen et al, 2013). Поскольку размер и заряд являются решающими факторами в способах хроматографии и осаждения, нельзя было предвидеть, что обработка детергентом будет оказывать такой же эффект в отношении неочищенного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, который она оказывает на неочищенный собранный материал культуры клеток, содержащий аденовирус.

Более того, неожиданный эффект обработки детергентом в отношении высвобождения частиц вируса из неочищенного собранного материала культуры клеток в жидкую фазу собранного материала не наблюдали при использовании способов для очистки аденовирусов. Таким образом, такой неожиданный эффект не мог быть предусмотрен на основе ранее используемых способов выделения вирусов.

Пример 4. Способ выделения полиовируса с обработкой детергентом и без нее, а также влияние на извлечение D-антигена и очистку от ДНК

Клетки PER.C6 выращивали в бессывороточной культуральной среде в 10 л биореакторе, который эксплуатировали в перфузионном режиме, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жк/мл. Перед инфицированием полиовирусом серотипа 1 (Mahoney) или серотипа 3 (Saukett) культуру разбавляли свежей культуральной средой до достижения плотности жизнеспособных клеток 11×10^6 жк/мл и $9,5 \times 10^6$ жк/мл, соответственно. Способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при 35°C , при множественности заражения равной 1. В ходе выращивания, через 22 часа после инфицирования, из биореактора отбирали два общих образца по 1,5 л и переносили в 2 л колбы. Одну колбу брали для проведения прямой фильтрации, другие обрабатывали детергентом (DB), а затем подвергали фильтрации.

Обработку с помощью DB проводили в 2 л колбе при комнатной температуре. Исходный раствор DB добавляли с помощью пипетки в виде 30 равных частей в течение 30 минут при перемешивании с достижением конечной концентрации DB, составляющей 2,1 ммоль. После добавления детергента колбу оставляли для инкубации в

течение двух часов при перемешивании. Очистку клеток проводили путем пропускания неочищенного собранного материала или собранного материала, обработанного DB, через последовательность фильтров, т. е. через положительно заряженный фильтр для глубинной фильтрации (Millipore Millstak+HC POD D0HC) с распределением размера пор 4-8/0,6-1,5 мкм, с последующим пропусканием через два последовательно расположенных полиэфирсульфоновых (PES) мембранных фильтра с уменьшенными размерами пор 0,8/0,45 мкм (Sartorius, Sartopore 2) и 0,22 мкм (Millipore, Millipak). В ходе фильтрации первый полученный фильтрат удаляли, а следующий фильтрат собирали в колбу для продукта до тех пор, пока колба с подаваемым на фильтрацию материалом не становилась пустой. Извлечение вируса проводили путем добавления в 1 системного объема PBS к собранному фильтрату. Очищенный собранный материал анализировали в отношении количества вирусов, ДНК клетки-хозяина и HCP с использованием ELISA для выявления D-антигена, Q-PCR и ELISA, специфичной к белкам клетки-хозяина, соответственно. Влияние обработки с помощью DB на производительность способа сбора материала приведено в таблице 2. Извлечение рассчитывали по отношению ко всему образцу питательного бульона, полученному из неочищенного собранного материала в ходе выращивания.

В соответствии с предыдущими примерами извлечение D-антигена после обработки с помощью детергента (домифена бромид) значительно увеличивалось по сравнению со способом без домифена бромид. Вследствие этого объемная продуктивность данного способа значительно увеличивалась. Фактически, концентрация D-антигена в очищенном собранном материале удваивалась после обработки детергентом (DB).

Более того, при использовании стадии обработки детергентом наблюдали очистку от HC-DNA (ДНК клетки хозяина), которая в соответствии с настоящими результатами была описана в предыдущих примерах. В соответствии с таблицей 2 обработка собранного неочищенного материала клеток, содержащего полиовирусы, с помощью детергента (DB) способствует очистке от ДНК в 1000 раз.

Кроме того, она демонстрирует, что белки клетки-хозяина (НСП) были частично удалены после использования детергента.

Таблица 2. Очистка 1,5 л неочищенного собранного материала с вирусом с (+) и без (-) обработки с помощью DB для двух штаммов вирусов

Штамм	Mahoney		Saukett	
	11		9,5	
Плотность жизнеспособных клеток при инфицировании				
Обработка с помощью DB	-	+	-	+
Очищенный собранный материал				
Концентрация D-антигена (DU/мл)	1439	2977	510	1195
Концентрация НС-DNA (пг/мл)	1731	<0,4	702	<0,4
Концентрация НСП (мкг/мл)	79	52	76	55
Извлечение D-антигена из собранного материала (%)	57	110	52	122
Log удаления ДНК	1,9	>5,5	2,1	>5,3
Удаление НСП (%)	25	54	38	55

Пример 5. Обработка с помощью DB, как часть получения лекарственного вещества в способе получения инактивированной вакцины против полиомиелита (IPV)

В данном примере продемонстрировано выделение серотипов полиовируса дикого типа (Mahoney, MEF-1 и Saukett) из неочищенного собранного материала культуры клеток в масштабе 20 л. Включенные последующие стадии способа изображены на фигуре 3.

Клетки PER.C6 выращивали в бессывороточной культуральной среде в 10 л биореакторе, который эксплуатировали в перфузионном режиме, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жк/мл. Перед инфицированием полиовирусом серотипа 1 (Mahoney), серотипа 2 (MEF-1) или серотипа 3 (Saukett), культуру распределяли по трем биореакторам и разбавляли с помощью свежей культуральной среды до достижения плотности жизнеспособных клеток 12×10^6 жк/мл, 11×10^6 жк/мл и 13×10^6 жк/мл, соответственно. Способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при 35°C, при множественности заражения равной 1.

В ходе сбора материала через 23 часа после инфицирования исходный раствор (DB) добавляли в биореакторы в течение периода 30 мин. с достижением конечной концентрации DB равной 2,2 ммоль

DB. После добавления детергента собранный материал, обработанный с помощью DB, перемешивали в течение 60 мин. Затем очистку проводили путем пропускания собранного материала, обработанного с помощью DB, через последовательность фильтров, т. е. два параллельных фильтра 8-4/1,5-0,6 мкм Millistak DONC POD, после которых пропускали через фильтр 0,8/0,45 мкм Sartopore 2, фильтр Single Sep Q и, наконец, фильтр 0,22 мкм Millipak.

Очищенный собранный материал после двух фильтраций объединяли, окисляли до значения pH 5,0 и разбавляли до достижения проводимости 11 мСм/см, и фильтровали через фильтр Sartorius Sartopore 0,8/0,45 мкм перед загрузкой на мембрану Sartorius Sartobind S. Вирус снимали с мембраны посредством стадии элюирования с использованием PBS. На конечной стадии фракцию с вирусом для катионного обмена (СЕХ) загружали в колонку, заполненную смолой для гель-фильтрационной хроматографии Sepharose 6FF с диапазоном фракционирования 10-4000 кДа. В ходе изократического элюирования остаточные НСР отделяли от пула фракции с вирусом, а также полностью заменяли матрицу с полиовирусом на фосфатно-солевой буфер, содержащий NaCl.

После выделения раствор с выделенным вирусом дополнительно разбавляли с помощью элюирующего буфера для SEC до предварительно заданной оптической плотности в единицах оптической плотности (OD 260 нм), затем добавляли M199 и глицин (конечная концентрация 5 г/л), и жидкость фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм перед инаktivацией формальдегидом.

Инаktivацию проводили с использованием 0,025% формалина в течение 13 дней (с фильтрацией через фильтр 0,22 мкм) при 37°C в соответствии с требованиями Всемирной организации здравоохранения (WHO) и Европейской фармакопеи (EP).

В описанном выше способе целевой продукт, промежуточные продукты, неочищенный собранный материал, очищенный собранный материал, элюат SEC и инаktivированный полиовирус (IPV) анализировали в отношении количества вирусов, ДНК клетки-хозяина

и общего белка (TP) с использованием ELISA для выявления D-антигена, Q-PCR и анализа по Брэдфорду, соответственно.

Результаты и обсуждение

В **таблице 3** обобщены характеристики качества и показатели выхода выделенного полиовируса для каждого серотипа. Концентрация остаточного специфического белка и ДНК соответствуют нормативным требованиям (WHO/EP). Кроме того, коэффициент поглощения OD260/OD280 является показателем высокой степени выделения вируса (Westdijk et al., 2011). В конечном итоге, гели SDS-PAGE для разных серотипов демонстрируют четыре крупные полосы белков, соответствующие поверхностным белкам полиовируса (фигура 5). Следовательно, способ выделения, описанный в данном документе, является надежным для выделения всех трех серотипов, независимо от различий поверхностных свойств серотипов и титров вируса при сборе материала.

Таблица 3. Характеристики качества моновалентного инактивированного полиовируса и выделенного полиовируса (элюат SEC) для способа получения моновалентного инактивированного полиовируса

Серотипы	Моновалентный инактивированный полиовирус			Элюат SEC	
	D-антиген (DU/мл)	TP/DU (мкг/DU)	HC-DNA (пг/DU)	OD260/OD280 (-)	Чистота согласно SDS-PAGE
Mahoney	2014	0,008	< 0,2	1,67	VP1, VP2, VP3 и VP4 представлены крупными полосами (см. фигуру 5)
MEF-1	343	0,037	< 1,2	1,75	
Saukett	1201	0,012	< 0,3	1,71	

Технологические показатели оценивают на основании очистки от примесей клетки-хозяина, ДНК и НСР, а также выходов на стадии для различных этапов получения. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Технологические показатели способа получения моновалентного инактивированного полиовируса

Этап способа	Извлечение D-антигена [%]			Удаление НСР [%]			Log удаления ДНК		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Сбор	86	77	101	40	51	42	>5,6	>5,6	>5,5
Выделение	42	39	56	>99,9	>99,9	>99,9	*	*	*
Инактивация	89	77	82	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет

ия				дан- ных	дан- ных	дан- ных	дан- ных	дан- ных	данных
Итого	32	23	46	>99,9	>99,9	>99,9	>5,6	>5,6	>5,5

*Удаление не может быть определено, поскольку подаваемая смесь была уже ниже определяемого уровня

Для всех трех серотипов уровни остаточной НС-DNA после стадии очистки находятся ниже предела количественного определения. В таблице 5 показан общий уровень продуктивности полиовируса, выраженный в эквивалентной дозе/мл культуры клеток. Такой расчет основан на соотношении 40:8:32 единиц D-антигена/доза полиовируса типа 1-3. Сравнение конечной продуктивности после инактивации демонстрирует, что данный способ превосходит современный распространенный в мире способ получения IPV с использованием платформы на основе клеток VERO с выходами 0,64, 1,04 и 0,34 дозы/мл культуры вируса для типов 1-3, соответственно (Kreeftenberg, 2007). Следовательно, можно сделать заключение, что несмотря на исходно высокий уровень содержания примесей в подаваемом материале, полученном из собранного материала с высокой плотностью клеток, разработанный способ с высокими степенями разделения и выделения обеспечивает непревзойденно высокие уровни продуктивности для крупномасштабного получения моновалентного инактивированного полиовируса, как неотъемлемой составляющей получения вакцины IPV.

Таблица 5. Продуктивность способа получения моновалентного инактивированного полиовируса в масштабе 20 л

(# эквивалентные дозы/мл культуры клеток)

Промежуточный продукт	Тип 1 (Mahoney)	Тип 2 (MEF-1)	Тип 3 (Saukett)
Неочищенный собранный материал	69	37	29
Очищенный собранный материал	53	32	29
Выделенный собранный материал	22	12	16
Материал с инактивированным полиовирусом	20	9,4	13

Пример 6. Повышение показателей выхода полиовируса, выделенного из неочищенного собранного материала культуры клеток, при добавлении различных катионных детергентов

Клетки PER.C6® выращивали в бессывороточной культуральной среде в 10 л биореакторе, который эксплуатировали в режиме

перфузии, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жк/мл. Перед инфицированием полиовирусом типа 2 (MEF-1) культуру разбавляли с помощью свежей культуральной среды до достижения плотности жизнеспособных клеток приблизительно $12,5 \times 10^6$ жк/мл. Способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при 35°C , при множественности заражения равной 1. В ходе сбора материала, через 20–24 часа после инфицирования, отбирали образец 120 мл, который затем распределяли в 18 аликвот по 5 мл.

Для определения эффекта детергента в отношении неочищенных собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, проводили эксперимент с титрованием с несколькими катионными детергентами: гексадецилтриметиламмония бромидом (СТАВ), гексадецилпиридиния хлоридом (СРС) и бензетония хлоридом (ВТС). Фиксированное количество исходных растворов СТАВ, СРС и ВТС (69, 70, 56 ммоль, соответственно, причем все включали 40 ммоль NaCl) добавляли к аликвотам собранного материала при предварительно определенной концентрации детергента (от 0 до 4 ммоль). Образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение одного часа при 35°C . Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 3000 g с осаждением преципитированной ДНК. Образцы надосадочной жидкости анализировали для количественного определения вирусов с помощью ELISA для выявления D-антигена и для определения ДНК клетки-хозяина с помощью Q-PCR.

На фиг. 6 (А) показано высвобождение D-антигена из неочищенных собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки разными катионными детергентами: СТАВ, СРС и ВТС, соответственно. Концентрации D-антигена в надосадочной жидкости с поправкой на добавление разведенного детергента приведены в виде зависимости от концентрации детергента. На фиг. 6 (А) раскрыто, что после добавления детергента (СТАВ, СРС и ВТС), титр вируса значительно повышается по сравнению с таковым перед добавлением детергента (СТАВ, СРС и ВТС). Для каждого катионного детергента можно наблюдать ту же картину, т. е. повышение концентрации детергента

(СТАВ, СРС и ВТС) приводило к повышению высвобождения вирусов из неочищенного собранного материала клеток в жидкую фазу.

На фиг. 6 (В) показано осаждение ДНК клетки-хозяина в неочищенных собранных материалах культуры клеток, содержащем полиовирус, в результате обработки детергентом (СТАВ, СРС и ВТС). В показатели концентрации на оси у вносили поправку с учетом фактора разведения детергента. Для каждого катионного детергента может наблюдаться такая же картина, т. е. происходит осаждение ДНК клетки-хозяина из неочищенного собранного материала культуры клеток. На фиг. 6 (В) отчетливо показано, что эффективная очистка от ДНК происходила в аликвотах с концентрациями детергента (СТАВ, СРС или ВТС) выше 0,5 ммоль.

Поскольку повышение детергента не приводило к осаждению полиовируса, специалист в данной области сможет экстраполировать такие результаты на суспензии клеток, содержащие полиовирус, с еще более высокими значениями плотности клеток, например, приблизительно 70×10^6 клеток/мл, например, приблизительно 90×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 120×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 150×10^6 клеток/мл. Специалист сделает заключение, что полиовирус из таких неочищенных собранных материалов культуры клеток с высокой плотностью клеток можно выделить с помощью способов по настоящему изобретению.

Пример 7. Повышение показателей выхода полиовируса, выделенного из неочищенного собранного материала культуры клеток, при добавлении разных типов детергентов (анионных, цвиттерионных и ионогенных)

Клетки PER.C6[®] выращивали в бессывороточной культуральной среде в 10 л биореакторе, который эксплуатировали в режиме перфузии, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жк/мл. Перед инфицированием полиовирусом типа 2 (MEF-1) культуру разбавляли с помощью свежей культуральной среды до достижения плотности жизнеспособных клеток приблизительно $12,5 \times 10^6$ жк/мл. Способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при 35°C, при множественности заражения равной 1. В ходе сбора материала, через 20–24 часа после инфицирования, отбирали

образец 240 мл, который затем распределяли в 42 аликвоты по 5 мл.

Для определения эффекта детергента в отношении собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, проводили эксперимент с титрованием с несколькими разными типами детергентов. Анионные детергенты (гидрат тауродезоксихолата натрия (STH) и додецилсульфат натрия (SDS)), цвиттерионные детергенты (3-(N,N-диметилмиристиламмоний)пропансульфонат (SB3-14) и 3-[(3-холамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS)) и неионогенные детергенты (4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль (Triton® X-100) и децил- β -D-1-тиомальтопиранозид (DTP)) использовали как иллюстративные детергенты для их класса детергентов. Фиксированное количество исходных растворов детергентов добавляли к аликвотам собранного материала при предварительно определенной концентрации детергента. Предварительно определенная концентрация детергента для анионных детергентов (STH и SDS), цвиттерионных детергентов (SB3-14 и CHAPS) и для неионогенных детергентов (Triton® X-100 и DTP) составляла от 0 до 4 ммоль. Образцы всех типов детергентов (анионных, цвиттерионных, неионогенных) тщательно перемешивали и инкубировали в течение одного часа при 35°C. Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 3000 g с осаждением преципитированной ДНК. Образцы надосадочной жидкости анализировали для количественного определения вирусов с помощью ELISA для выявления D-антигена и для определения ДНК клетки-хозяина с помощью Q-PCR.

На фиг.7 (А, В, и С) показано высвобождение D-антигена из неочищенных собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки разными типами детергентов: анионными детергентами (STH и SDS), цвиттерионными детергентами (SB3-14 и CHAPS) и неионогенными детергентами (Triton® X-100 и DTP), соответственно. Концентрации D-антигена в надосадочной жидкости с поправкой на добавление разведенного детергента приведены в виде зависимости от концентрации детергента. На фиг.7 (А, В и С) раскрыто, что после добавления детергента (STH,

SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 и DTP), титр вируса значительно повышается по сравнению с таковым перед добавлением детергента (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 и DTP). Для каждого типа детергента (анионного, цвиттерионного или неионогенного) может наблюдаться такая же картина, т. е. повышение концентрации детергента (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 и DTP) приводит к повышению высвобождения вируса из неочищенного собранного материала клеток в жидкую фазу. На фиг. 8 (А, В и С) показано высвобождение ДНК клетки-хозяина из неочищенных собранных материалов культуры клеток, содержащих полиовирус, в результате обработки детергентом (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 и DTP). В показатели концентрации на оси у вносили поправку с учетом фактора разведения детергента. Для каждого типа детергента (анионного, цвиттерионного или неионогенного) может наблюдаться такая же картина, т. е. повышение концентрации детергента (STH, SDS, SB3-14, CHAPS, Triton® X-100 и DTP) приводит к повышению высвобождения ДНК клетки-хозяина из неочищенного собранного материала клеток в жидкую фазу.

Поскольку повышение концентрации типов детергентов (анионного, цвиттерионного или неионогенного) не приводит к осаждению полиовируса, специалист в данной области сможет экстраполировать такие результаты на суспензии клеток, содержащие полиовирус, с еще более высокой плотностью клеток, например, приблизительно 70×10^6 клеток/мл, например, приблизительно 90×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 120×10^6 клеток/мл, например, не более приблизительно 150×10^6 клеток/мл. Специалист сделает заключение, что полиовирус из таких неочищенных собранных материалов культуры клеток с высокой плотностью клеток можно выделить с помощью способов по настоящему изобретению.

Пример 8. Обработка с помощью DB и очистка как часть последовательности выделения Sabin IPV

В данном примере описано использование способа сбора материала (обработка с помощью DB с последующей очисткой клеток), как части способа выделения серотипов аттенуированного полиовируса (Sabin типа 1, Sabin типа 2 и Sabin типа 3) из неочищенных собранных материалов культуры клеток.

Клетки линии клеток PER.C6® выращивали в бессывороточной культуральной среде для культивирования в 10 л биореакторе, который эксплуатировали в режиме перфузии, до достижения плотности клеток примерно 50×10^6 жк/мл. Перед инфицированием полиовирусом серотипа 1 (Sabin типа 1), серотипа 2 (Sabin типа 2) или серотипа 3 (Sabin типа 3), культуру разбавляли с помощью свежей культуральной среды до достижения плотности жизнеспособных клеток $12,5 \times 10^6$ жк/мл и 25×10^6 жк/мл. Множественность заражения, составляющую 1 и 0,1, использовали для $12,5 \times 10^6$ жк/мл и 25×10^6 жк/мл культур клеток, соответственно. В обоих случаях способ инфицирования партии проводили в 10 л биореакторах при $32,5^\circ\text{C}$.

В ходе сбора материала (через 48 часов после инфицирования посредством Sabin типа 1 или Sabin типа 3 и через 72 часа после инфицирования посредством Sabin типа 2) исходный раствор DB добавляли в биореакторы в течение периода 30 мин. с достижением конечной концентрации DB равной 2,2 ммоль DB. После добавления детергента собранный материал, обработанный с помощью DB (~11 л), перемешивали в течение 60 мин. В конечном итоге, собранный материал, обработанный с помощью DB, очищали и выделяли аналогично описанному для Salk IPV на фигуре 4 и в примере 5.

В таблице 6 показано общее извлечение D-антигена и удаление HC-DNA на стадии обработки с помощью DB с дальнейшей последовательной фильтрацией. В таблице 7 обобщены характеристики качества выделенного полиовируса Sabin.

Таблица 6. Извлечение D-антигена и концентрация HC-DNA после обработки с помощью DB и стадии очистки от клеток

Серотипы	VCDAI ($\times 10^6$ жк/мл)	Извлечение D-антигена (%)	HC-DNA (нг/мл)
Sabin тип 2	12,5	126	<0,4

Sabin тип 3	12,5	105	<0,4
Sabin тип 1	25	83	<0,4
Sabin тип 2	25	76	<0,4
Sabin тип 3	25	85	<0,4

Таблица 7. Характеристика выделенного полиовируса Sabin перед инактивацией

Серотипы	VCDAI (x 10 ⁶ жк/мл)	TP/DU (мкг/DU)	HC-DNA (пг/DU)	OD260/OD280 (-)
Sabin тип 2	12,5	0,040	<1,3	1,72
Sabin тип 3	12,5	0,004	<0,2	1,63
Sabin тип 1	25	0,009	<0,3	1,74
Sabin тип 2	25	0,03	<1,1	1,67
Sabin тип 3	25	-*	<0,3	1,84

*Не доступны из-за одного или нескольких отсутствующих данных.

Результаты для способа получения полиовируса Sabin демонстрируют значительную идентичность с результатами, полученными для штаммов дикого типа. Также для штаммов полиовируса Sabin в ходе объединенного способа обработки с помощью ДВ и очистки собранного материала достигали высокого процента извлечения вируса с полным удалением HC-DNA (таблица 6). В таблице 7 продемонстрировано, что собранные материалы полиовируса Sabin, выращенного на культуре клеток PER.C6[®], можно в достаточной степени выделить с использованием способа сбора и выделения, описанного в настоящем изобретении. Концентрация остаточного специфического белка и ДНК соответствуют нормативным требованиям (WHO/EP). Кроме того, коэффициент поглощения OD260/OD280 является показателем высокой степени выделения вируса (Westdijk et al., 2011). Общая чистота является такой же, как и чистота, достигнутая для штаммов полиовируса дикого типа (см. таблица 3 в примере 5).

Данные результаты являются весьма перспективными, особенно если учесть, что два типа вирусов, дикий тип и штаммы Sabin, различаются по суммарной поверхности заряда (Thomassen et al., 2013). Это опять же демонстрирует надежность разработанного универсального высокопродуктивного способа получения вакцины против полиомиелита.

Ссылочный материал

Bakker WAM, Thomassen YE, van 't Oever AG, Westdijk J, van Oijen

MGCT, Sundermann LC, van 't Veld P, Sleeman E, van Nimwegen FW, Hamidi A, Kersten GFA, van den Heuvel N, Hendriks JT, van der Pol LA. Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine* 2011; 29(41):7188-96

Cortin V, Thibault J, Jacob D, Garnier A. High-Titer Poliovirus Vector Production in 293S Cell Perfusion Culture. *Biotechnol. Prog.* 2004.

European Pharmacopoeia 7.0, Poliomyelitis vaccine (inactivated). 04/2010:0214

Fuchs F, Minor P, Daas A, Milne C. Establishment of European Pharmacopoeia BRP batch 2 for inactivated poliomyelitis vaccine for in vitro D-antigen assay. *Pharmeuropa Bio* 2003-1, 23-50, 2003.

Goerke A, To B, Lee A, Sagar S, Konz K. Development of a Novel Poliovirus Purification Process Utilizing Selective Precipitation of Cellular DNA. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 91, No. 1, July 5, 2005.

Henderson M, Wallis C, Melnick J. Concentration and purification of enteroviruses by membrane chromatography. *Applied and environmental microbiology*, Nov. 1976, p.689-693.

Kreeftenberg H, van der Velden T, Kersten G, van der Heuvel N, de Bruijn M. Technology transfer of Sabin-IPV to new developing country markets. *Biologicals* 2006; 34(2):155-8

Sanders BA, Edo-Matas D, Custers JHHV, Koldijk MH, Klaren V, Turk M, Luitjens A, Bakker WAM, UytdeHaag F, Goudsmit J, Lewis JA, Schuitemaker H, PER.C6 cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: a potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine* 2013; 31(5):850-6

Thomassen YE, van 't Oever AG, Vinke M, Spiekstra A, Wijffels RH, van der Pol LA, Bakker WAM. Scale down of the

inactivated polio production process. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 110 (5):1354-1365, May 2013.

Thomassen YE, van Eikenhorst G, van der Pol LA, Bakker WAM. Isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Anal. Chem.* 85:6089-6094 (2013).

Vlecken DHW, Pelgrim RPM, Ruminski S, Bakker WAM, van der Pol LA. Comparison of initial feasibility of host cell lines for viral vaccine production *Journal of Virological Methods* 2013 193 (2): 278-283

Westdijk J, Brugmans D, Martin J, van't Oever A, Bakker WAM, Levels L, Kersten, G. Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: Proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. *Vaccine* 2011; 29: 3390-3397

WHO technical report Series, No. 910, 2002. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated).

Yuk IHY, Olsen MM, Geyer S, Forestell SP. Perfusion Cultures of Human Tumor Cells: A Scalable Production Platform for Oncolytic Adenoviral Vectors. *Biotechnol. Bioengin.* 86: 637-641 (2004).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к сырому собранному материалу культуры клеток;

б) очистки указанного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса.

2. Способ улучшения высвобождения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к сырому собранному материалу культуры клеток;

б) очистки указанного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса.

3. Способ выделения полиовируса из культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к культуре клеток;

б) очистки указанной культуры клеток, содержащей полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса; и

с) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии б), посредством стадии захвата с получением суспензии, содержащей полиовирус.

4. Способ выделения полиовируса из культуры клеток по п. 3, где указанная стадия захвата представляет собой стадию катионообменной хроматографии.

5. Способ выделения полиовируса из культуры клеток по п. 3 или п. 4, где полиовирус, полученный на стадии с), дополнительно отделяют от суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрации.

6. Способ выделения полиовируса из культуры клеток по п. 5, где указанную гель-фильтрацию осуществляют посредством гель-фильтрационной хроматографии.

7. Способ очистки полиовируса из культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к культуре клеток;

б) очистки указанной культуры клеток, содержащей полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса;

с) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии б), посредством стадии катионообменной хроматографии с получением суспензии, содержащей полиовирус;

д) дополнительной очистки с отделением полиовируса от суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрационной хроматографии.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанный детергент выбран из группы катионных детергентов, анионных детергентов, неионогенных детергентов и цвиттерионных детергентов.

9. Способ по п. 8, где указанный детергент представляет собой катионный детергент.

10. Способ по п. 9, где указанный катионный детергент выбран из группы гексадецилтриметиламмония бромида (СТАВ), гексадецилпиридиния хлорида (СРС), бензетония хлорида (ВТС) и домифена бромида (DB).

11. Способ по п. 10, где катионный детергент представляет собой домифена бромид (DB).

12. Способ по п. 8, где указанный детергент представляет собой анионный детергент.

13. Способ по п. 12, где указанный анионный детергент выбран из группы гидрата тауродезоксихолата натрия (СТН) и додецилсульфата натрия (SDS).

14. Способ по п. 8, где детергент представляет собой неионогенный детергент.

15. Способ по п. 14, где указанный неионогенный детергент выбран из группы 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоля (Triton® X-100) и децил-β-D-1-тиомальтопиранозида (DTP).

16. Способ по п. 8, где детергент представляет собой цвиттерионный детергент.

17. Способ по п. 16, где указанный цвиттерионный детергент выбран из группы 3-(N,N-диметилмиристиламмоний)пропансульфоната (SB3-14), 3-[(3-холамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфоната (CHAPS).

18. Применение детергента для улучшения высвобождения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток.

По доверенности

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Способ очистки полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к сырому собранному материалу культуры клеток;

б) очистки указанного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса.

2. Способ улучшения высвобождения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к сырому собранному материалу культуры клеток;

б) очистки указанного собранного материала культуры клеток, содержащего полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса.

3. Способ выделения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток, включающий стадии

а) добавления детергента к сырому собранному материалу культуры клеток;

б) очистки указанной культуры клеток, содержащей полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами полиовируса; и

с) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии б), посредством стадии захвата с получением суспензии, содержащей полиовирус.

4. Способ выделения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток по п. 3, где указанная стадия захвата представляет собой стадию катионообменной хроматографии.

5. Способ выделения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток по п. 3 или п. 4, где полиовирус, полученный на стадии с), дополнительно отделяют от суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрации.

6. Способ выделения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток по п. 5, где указанную гель-фильтрацию осуществляют посредством гель-фильтрационной хроматографии.

7. Способ выделения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток, включающий стадии

- a) добавления детергента к культуре клеток;
- b) очистки указанной культуры клеток, содержащей полиовирус, с получением очищенного собранного материала с частицами вируса;
- c) воздействия на очищенный собранный материал, полученный на стадии b), посредством стадии катионообменной хроматографии с получением суспензии, содержащей полиовирус;
- d) дополнительной очистки с отделением полиовируса от суспензии, содержащей полиовирус, посредством гель-фильтрационной хроматографии.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанный детергент выбран из группы катионных детергентов, анионных детергентов, неионогенных детергентов и цвиттерионных детергентов.

9. Способ по п. 8, где указанный детергент представляет собой катионный детергент.

10. Способ по п. 9, где указанный катионный детергент выбран из группы гексадецилтриметиламмония бромида (СТАВ), гексадецилпиридиния хлорида (СРС), бензетония хлорида (ВТС) и домифена бромида (DB).

11. Способ по п. 10, где катионный детергент представляет собой домифена бромид (DB).

12. Способ по п. 8, где указанный детергент представляет собой анионный детергент.

13. Способ по п. 12, где указанный анионный детергент выбран из группы гидрата тауродезоксихолата натрия (СТН) и додецилсульфата натрия (SDS).

14. Способ по п. 8, где детергент представляет собой неионогенный детергент.

15. Способ по п. 14, где указанный неионогенный детергент выбран из группы 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоля (Triton® X-100) и децил- β -D-1-тиомальтопиранозида (DTP).

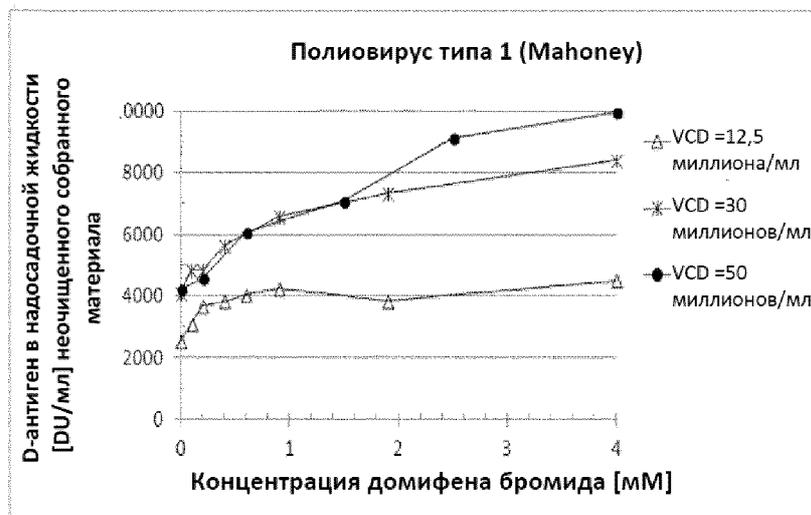
16. Способ по п. 8, где детергент представляет собой цвиттерионный детергент.

17. Способ по п. 16, где указанный цвиттерионный детергент выбран из группы 3-(N,N-диметилмиристиламмоний)пропансульфоната (SB3-14),
3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфоната (CHAPS).

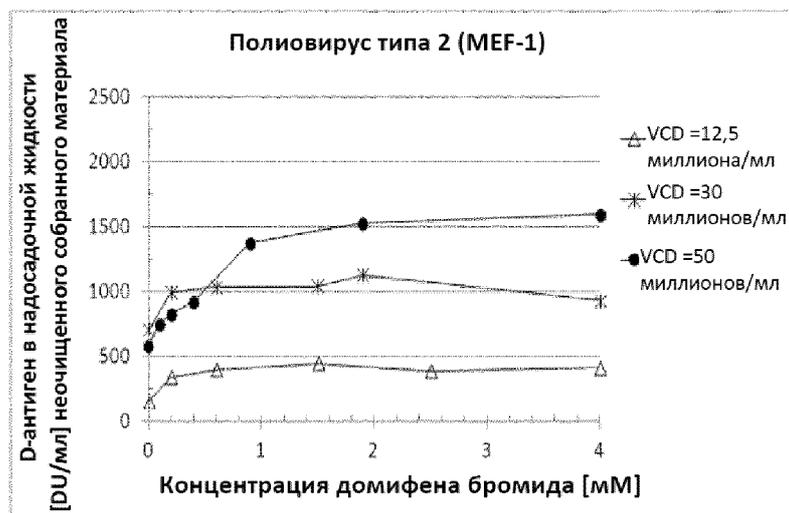
18. Применение детергента для улучшения высвобождения полиовируса из сырого собранного материала культуры клеток.

По доверенности

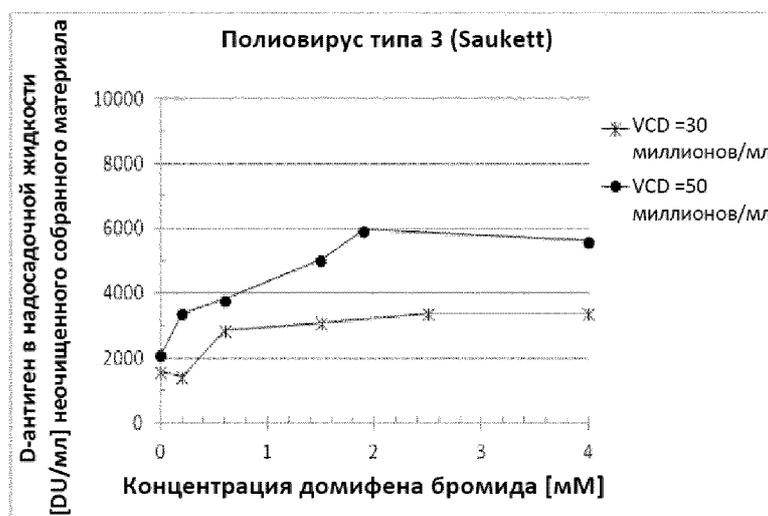
A



B

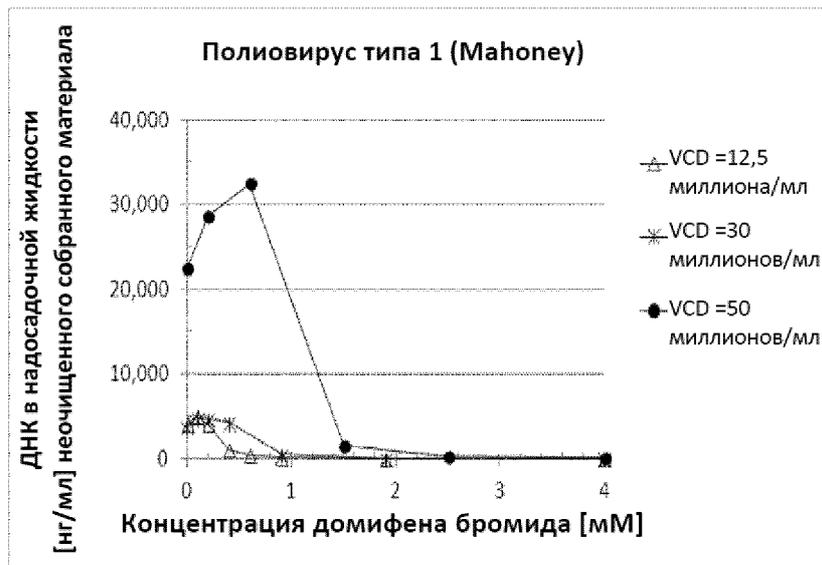


C

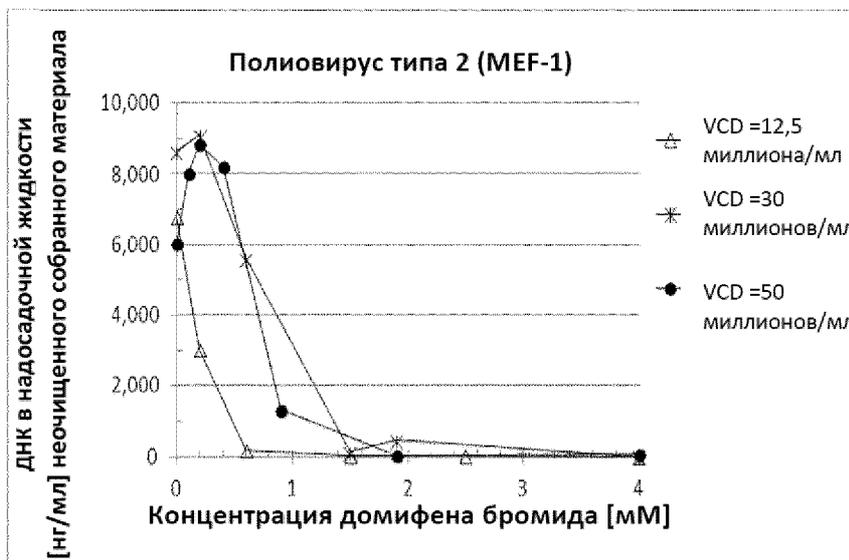


ФИГ. 1

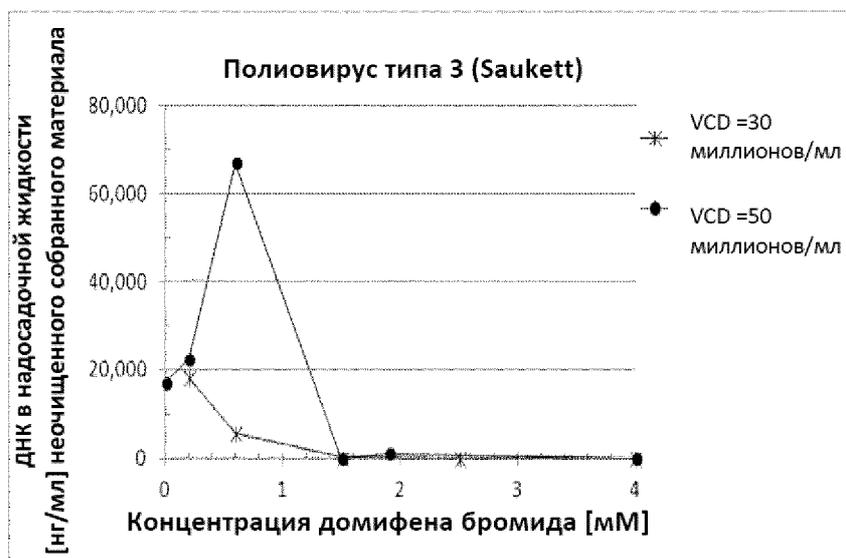
А



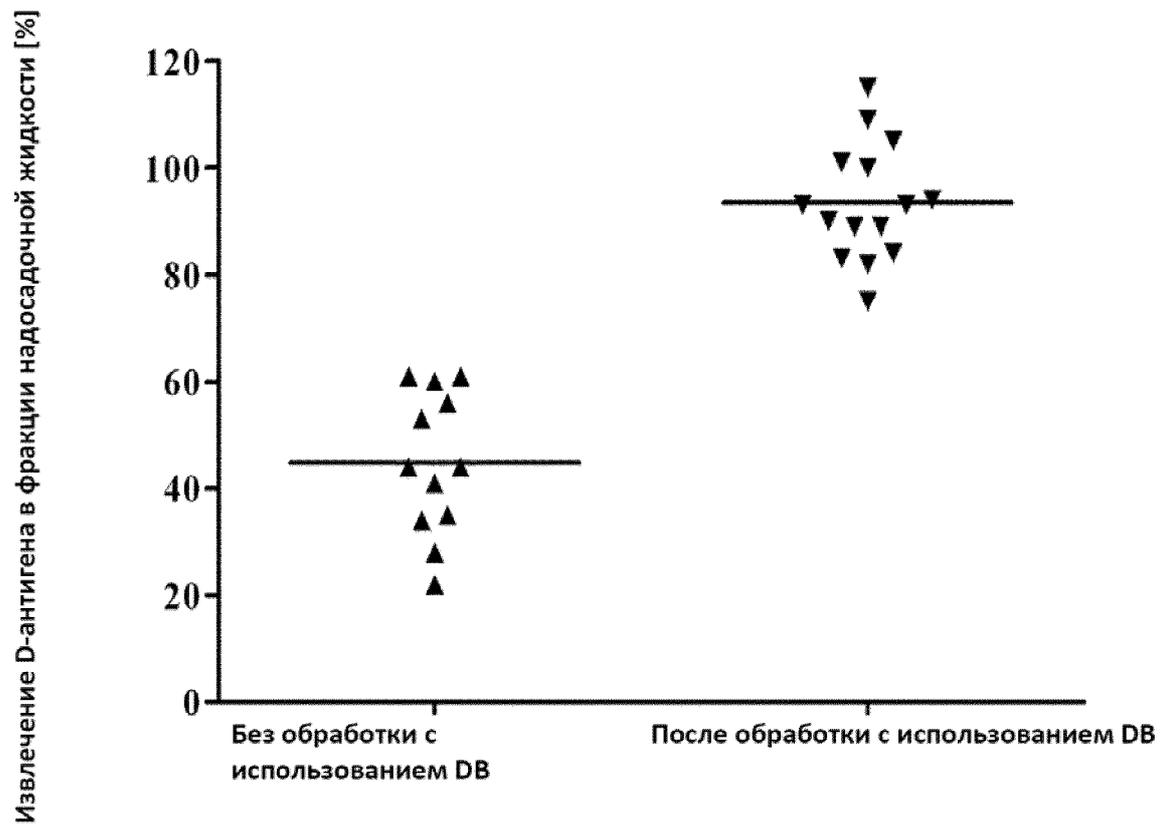
В



С



ФИГ. 2



ФИГ. 3

4/8

Необработанный
собранный материал
после инфицирования
вирусом



Обработка
с использованием
DB



Очистка



СЭХ захват

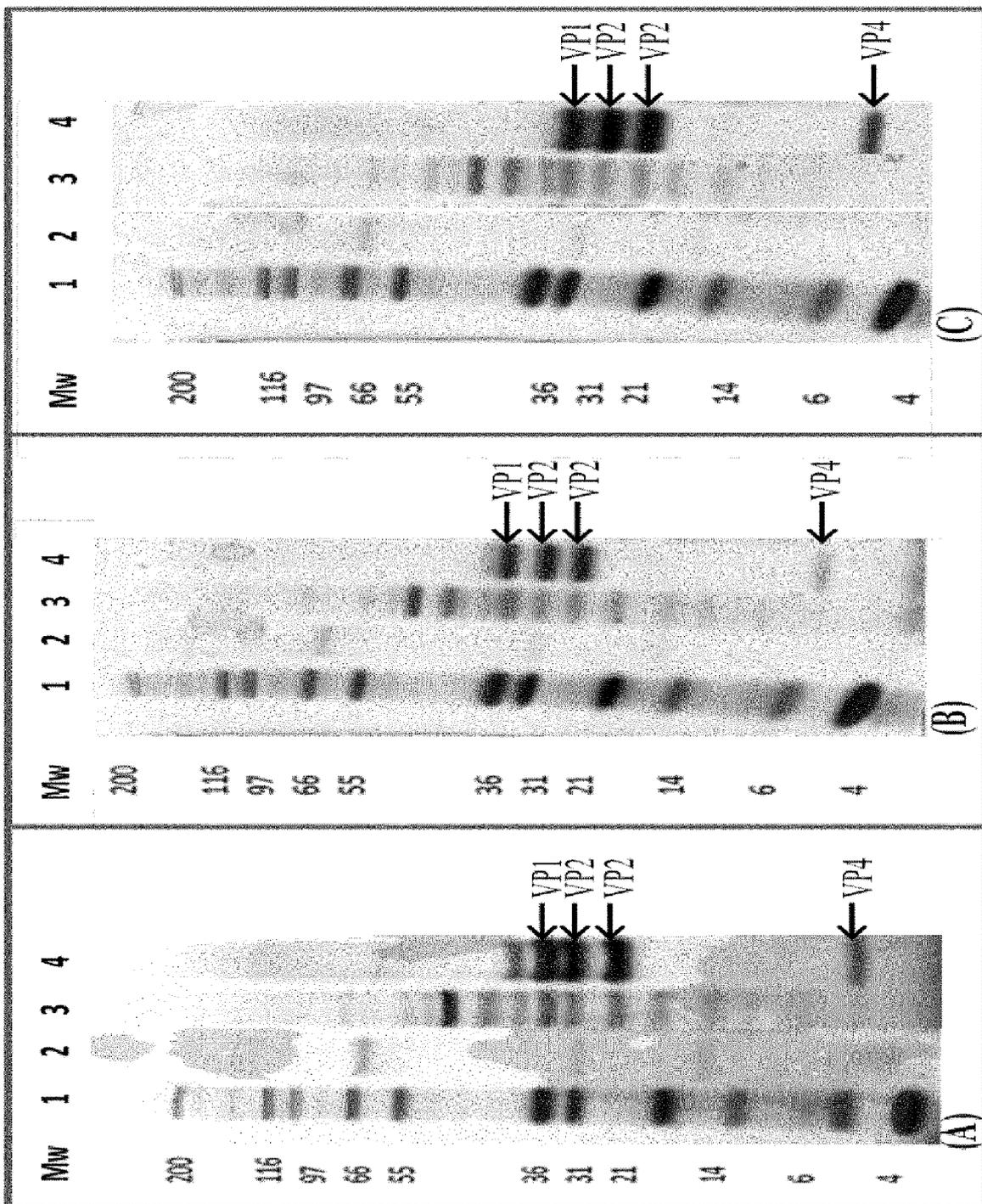


СЭХ доочистка



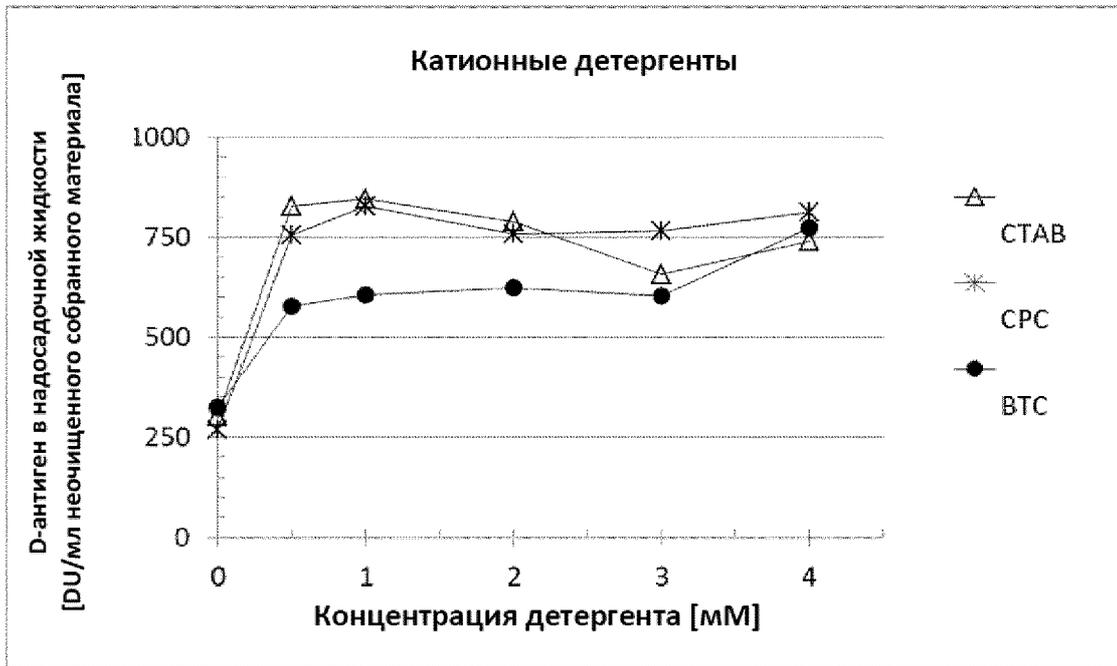
Раствор с выделенным
вирусом перед
инактивацией

ФИГ. 4

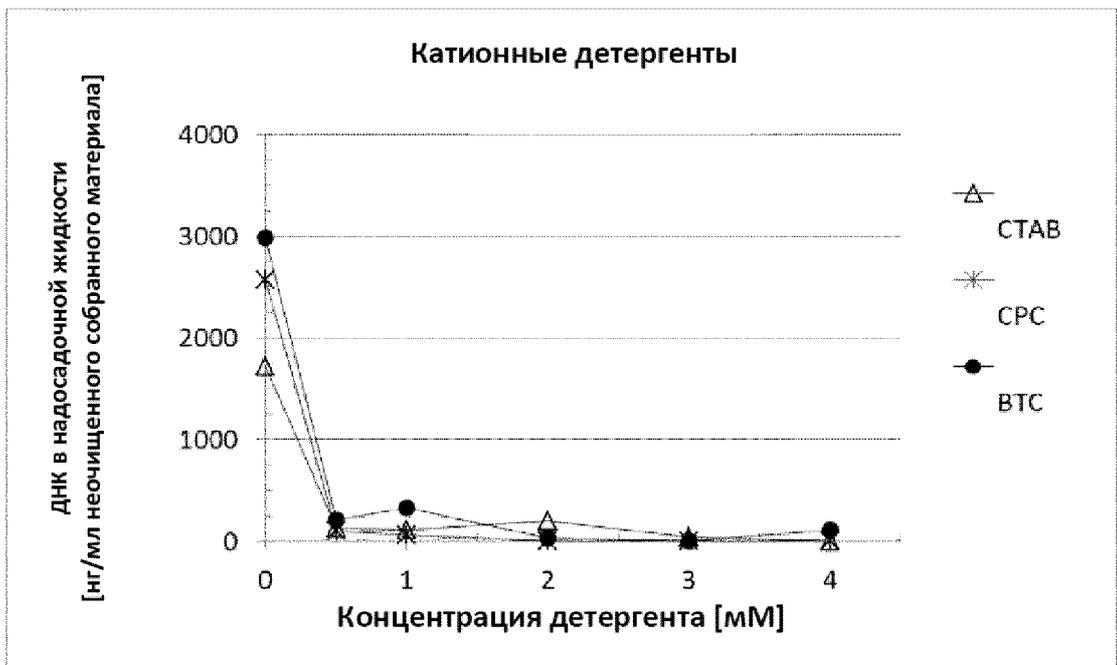


ФИГ. 5

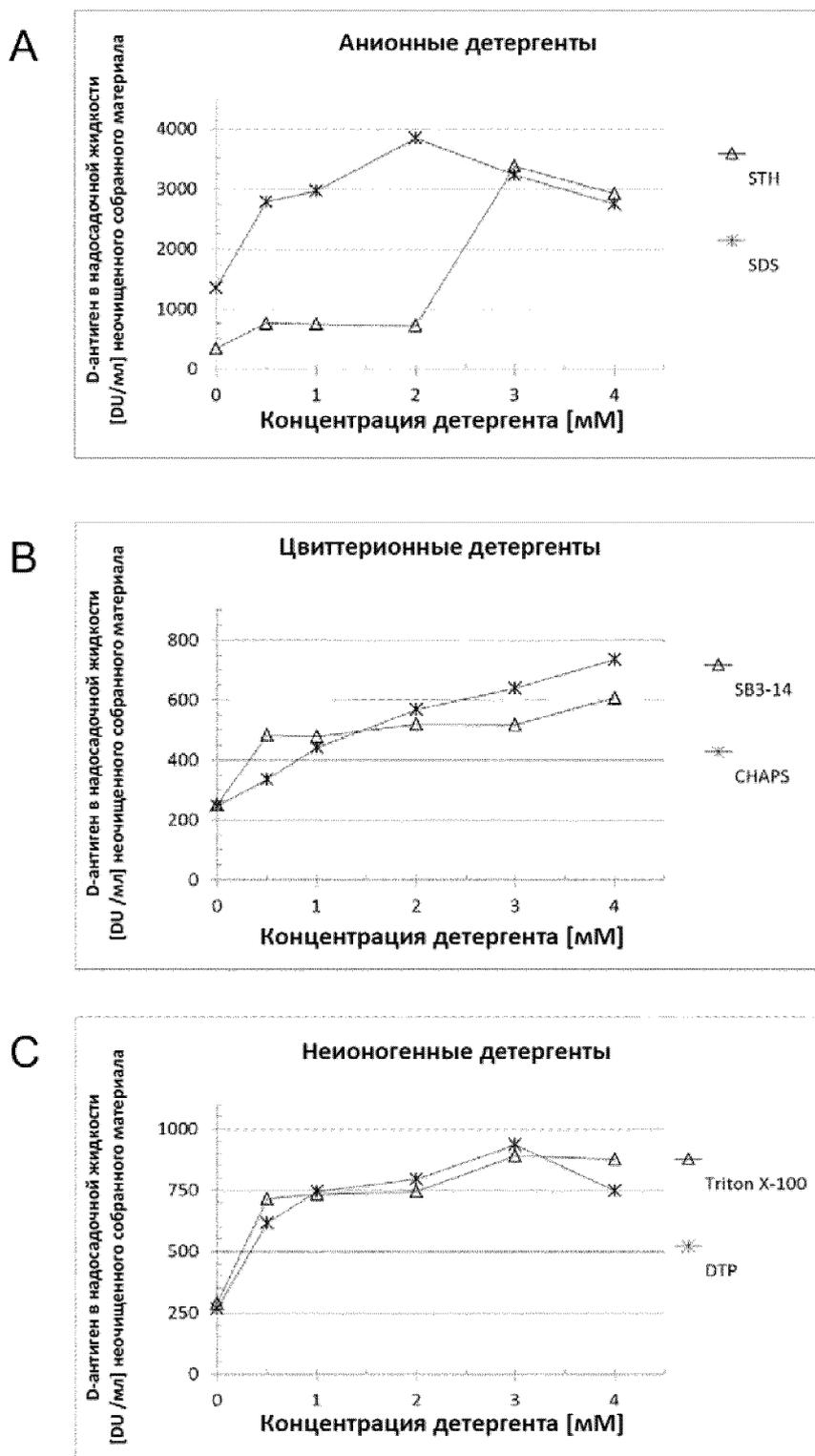
A



B

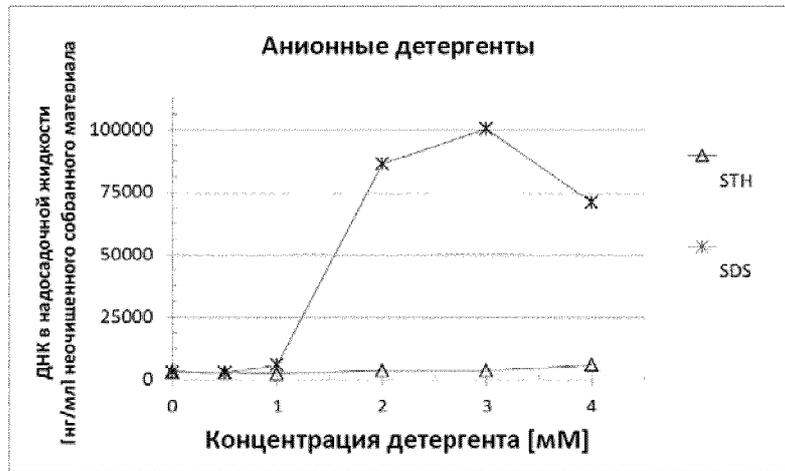


ФИГ. 6

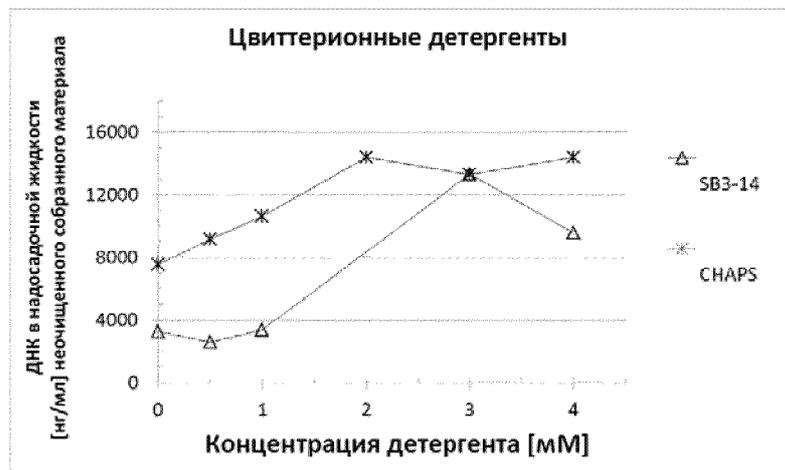


ФИГ. 7

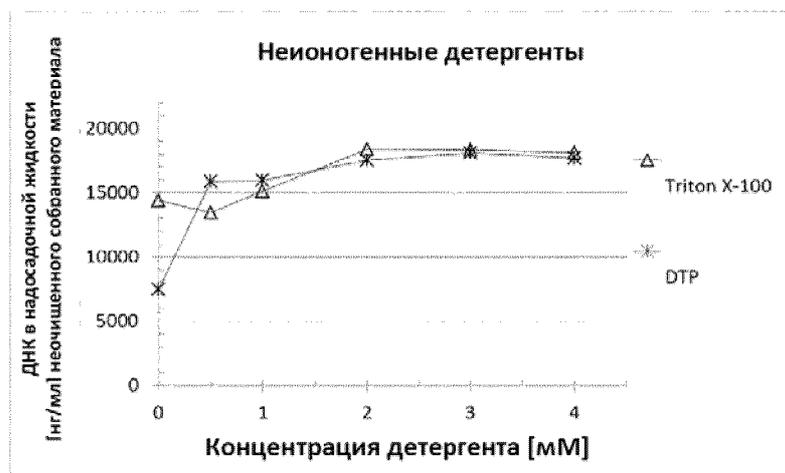
А



В



С



ФИГ. 8