(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390270 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.17

(22) Дата подачи заявки
2021.07.09

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

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОГО РАБДОВИРУСА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

(31) **20185118.5**
(32) **2020.07.10**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2021/069091**
(87) **WO 2022/008700 2022.01.13**

(71) Заявитель:
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Мюллер Детхардт, Гарсия Алан Пардо, Грайн Таня Аннелизе, Кесс Фридрих, Ын Джуди, Песта Катарина, Шнайдер Забрина, Тёрнбулл Джордан (DE)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области предварительной и последующей обработки и предлагает процесс получения очищенного рабдовируса из клеточной культуры, предпочтительно очищенного онколитического рабдовируса и, в частности, вируса везикулярного стоматита, включая фармацевтические композиции, содержащие рабдовирус.

202390270 A1

202390270 A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОГО РАБДОВИРУСА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Область изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к области предварительной и последующей обработки и предлагает способ и процесс получения, продуцирования и/или очистки рабдовируса от клеточной культуры, предпочтительно онколитического рабдовируса и, в частности, вируса везикулярного стоматита, включая фармацевтические композиции, содержащие рабдовирус.

Предпосылки создания изобретения

[0002] При разработке производственного процесса для онколитических вирусов необходимо учитывать несколько критических показателей качества конечного лекарственного вещества и лекарственного препарата. Среди них высокое содержание инфекционного вируса на единицу объема и низкий уровень приемлемости примесей, связанных с продуктом и процессом. Содержание вируса на единицу объема лекарственного препарата может находиться в диапазоне от 10^9 до 10^{12} инфекционных или геномных единиц на дозу и требует концентрирования активного вируса по меньшей мере на один порядок во время последующей очистки. Приемлемые пороговые значения примесей для типичных биологических препаратов все еще могут применяться, например, 10 нг/доза ДНК клетки-хозяина (предел ВОЗ), и создают еще одну серьезную проблему в сочетании с требуемым высоким содержанием продукта. Оба ограничения, как правило, на несколько порядков сильнее, чем ограничения, обнаруженные в других активных вирусных продуктах для фармацевтического применения, например, таких как вирусные вакцины. Следовательно, производственные процедуры для коммерческого масштаба должны быть оптимизированы и заново разработаны для данной цели. В частности, существует потребность в улучшенных способах получения, продукции или очистки рабдовирусов от клеточной культуры.

[0003] Например, в WO 2007/123961 описан способ очищения для выделения очищенного вируса везикулярного стоматита от клеточной культуры.

В этом процессе клеточную культуру загружают после осветления и фильтрации на адсорбер с анионообменной мембраной, после чего элюируют вирус, что сопровождают дальнейшей стадией очищения и фильтрации.

Краткое описание изобретения

[0004] Настоящее изобретение удовлетворяет вышеуказанные потребности, предоставляя способ и процесс получения очищенного рабдовируса, такого как вирус везикулярного стоматита, из клеточной культуры.

[0005] Следует понимать, что любой вариант воплощения, относящийся к конкретному аспекту, также может быть объединен с другим вариантом воплощения, также относящимся к этому конкретному аспекту, даже на множестве уровней и комбинаций, включающих несколько вариантов воплощения, относящихся к этому конкретному аспекту.

[0006] В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения рабдовируса в культуре клеток, включающему этап:

(i) получения сбора рабдовируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант.

[0007] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту, рабдовирус представляет собой везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита. В еще одном родственном варианте воплощения гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

[0008] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, высвобождающий вирус агент на этапе (ia) представляет собой твердую соль или водный раствор соли, а высвобождающий вирус агент на этапе (ib) представляет собой водный раствор соли. В дополнительном родственном варианте воплощения на этапе (ia)

концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают по меньшей мере примерно на 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М, и водный раствор соли на этапе (ib) имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М. В дополнительном родственном варианте воплощения на этапе (ia) увеличение концентрации соли в клеточной культуре и на этапе (ib) концентрация водного раствора соли составляет от примерно 0,01 М до примерно 5 М, примерно от 0,05 М до примерно 5 М, примерно 0,1 М до примерно 5 М, примерно 0,15 М до примерно 5 М, примерно 0,2 М до примерно 5 М, примерно 0,25 М до примерно 5 М, примерно 0,3 М до примерно 5 М, примерно 0,35 М до примерно 5 М, от примерно 0,4 М до примерно 5 М, от примерно 0,45 М до примерно 5 М или от примерно 0,5 М до примерно 5 М.

[0009] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, указанная соль представляет собой NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl, NH_4 сульфат, NH_4 ацетат или NH_4 бикарбонат.

[0010] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, высвобождающий вирус агент представляет собой аминокислоту, предпочтительно полярную, кислотную или основную аминокислоту, более предпочтительно аргинин.

[0011] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, высвобождающий вирус агент представляет собой сульфатированный полисахарид, предпочтительно сульфат декстрана.

[0012] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, в котором на этапе (ia) путем добавления высвобождающего вирус агента к клеточной культуре увеличивают ионную силу клеточной культуры, предпочтительно по крайней мере приблизительно на 0,01 М, или по крайней мере приблизительно на 0,05 М, или по крайней мере приблизительно на 0,1 М, или по крайней мере приблизительно на 0,15 М, или по крайней мере приблизительно на 0,2 М, или по крайней мере приблизительно на 0,25 М, или по крайней мере приблизительно на 0,3 М, или по крайней мере приблизительно на 0,35 М, или по крайней мере приблизительно на 0,4 М, или по крайней мере приблизительно на 0,45 М, или

по крайней мере приблизительно на 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М; и на этапе (ib) промывают фильтр высвобождающим вирус агентом, содержащим водный раствор, имеющий ионную силу, по крайней мере приблизительно 0,01 М, или по крайней мере приблизительно 0,05 М, или по крайней мере приблизительно 0,1 М, или по крайней мере приблизительно 0,15 М, или по крайней мере приблизительно 0,2 М, или по крайней мере приблизительно 0,25 М, или по крайней мере приблизительно 0,3 М, или по крайней мере приблизительно 0,35 М, или по крайней мере приблизительно 0,4 М, или по крайней мере приблизительно 0,45 М, или по крайней мере приблизительно 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М.

[0013] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, рабдовирус продуцируется в клетке-хозяине млекопитающего, предпочтительно в клетке HEK293. В еще одном родственном варианте воплощения клетку-хозяина млекопитающего культивируют в суспензии.

[0014] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, способ получения рабдовируса в культуре клеток дополнительно включает такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) (необязательно) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) (необязательно) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

[0015] В родственном варианте воплощения катионообменник представляет собой монолит, смолу или мембрану. В еще одном родственном варианте воплощения катионообменник представляет собой монолитный адсорбер.

[0016] В одном варианте воплощения, который относится к первому аспекту или любому из его вариантов воплощения, рабдовирус формулируют в фармацевтическую композицию.

[0017] Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу очищения рабдовируса от культуры клеток, инфицированной рабдовирусом, который включает этап:

(i) получения сбора рабдовируса из культуры клеток путем:

c. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

d. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант.

[0018] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту, рабдовирус представляет собой везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита. В еще одном родственном варианте воплощения гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

[0019] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, высвобождающий вирус

агент на этапе (ia) представляет собой твердую соль или водный раствор соли, а высвобождающий вирус агент на этапе (ib) представляет собой водный раствор соли. В дополнительном родственном варианте воплощения, на этапе (ia) концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают по крайней мере приблизительно на 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М и указанный водный раствор соли на этапе (ib) имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М. В дополнительном родственном варианте воплощения, на этапе (ia) увеличение концентрации соли в клеточной культуре и на этапе (ib) концентрация указанного водного раствора соли составляет от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,25 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,3 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,35 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,4 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,45 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,5 М до приблизительно 5 М.

[0020] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, соль представляет собой NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl, NH_4 сульфат, NH_4 ацетат или NH_4 бикарбонат.

[0021] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, высвобождающий вирус агент представляет собой аминокислоту, предпочтительно полярную, кислотную или основную аминокислоту, более предпочтительно аргинин.

[0022] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, высвобождающий вирус агент представляет собой сульфатированный полисахарид, предпочтительно сульфат декстрана.

[0023] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, в котором на этапе (ia) путем добавления высвобождающего вирус агента к клеточной культуре ионную силу клеточной культуры увеличивают, предпочтительно по крайней мере приблизительно на 0,01 М, или по крайней мере приблизительно на 0,05 М, или

по крайней мере приблизительно на 0,1 М, или по крайней мере приблизительно на 0,15 М, или по крайней мере приблизительно на 0,2 М, или по крайней мере приблизительно на 0,25 М, или по крайней мере приблизительно на 0,3 М, или по крайней мере приблизительно на 0,35 М, или по крайней мере приблизительно на 0,4 М, или по крайней мере приблизительно на 0,45 М, или по крайней мере приблизительно на 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М; и на этапе (ib) промывание фильтра высвобождающим вирус агентом, содержащим водный раствор, имеющий ионную силу по крайней мере приблизительно 0,01 М, или по крайней мере приблизительно 0,05 М, или по крайней мере приблизительно 0,1 М, или по крайней мере приблизительно 0,15 М, или по крайней мере приблизительно 0,2 М, или по крайней мере приблизительно 0,25 М, или по крайней мере приблизительно 0,3 М, или по крайней мере приблизительно 0,35 М, или по крайней мере приблизительно 0,4 М, или по крайней мере приблизительно 0,45 М, или по крайней мере приблизительно 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М.

[0024] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, рабдовирус продуцируется в клетке-хозяине млекопитающего, предпочтительно в клетке HEK293. В еще одном родственном варианте воплощения клетку-хозяина млекопитающего культивируют в суспензии.

[0025] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, способ очищения рабдовируса от культуры клеток, инфицированной рабдовирусом, дополнительно включает такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) (необязательно) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) (необязательно) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

[0026] В родственном варианте воплощения катионообменник представляет собой монолит, смолу или мембрану. В еще одном родственном варианте воплощения катионообменник представляет собой монолитный адсорбер.

[0027] В одном варианте воплощения, который относится ко второму аспекту или любому из его вариантов воплощения, рабдовирус формулируют в фармацевтическую композицию.

[0028] В третьем аспекте настоящее изобретение относится к вирусу везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), который был получен в соответствии со способом по любому из вышеупомянутых аспектов или вариантов воплощения или очищен в соответствии со способом по любому из вышеупомянутых аспектов или вариантов воплощения. В варианте воплощения, который относится к третьему аспекту, РНК-геном вируса везикулярного стоматита, полученный в соответствии со способом по любому из вышеупомянутых аспектов или вариантов воплощения или очищенный в соответствии со способом по любому из вышеупомянутых аспектов или вариантов воплощения, состоит из кодирующей последовательности, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 12. В дополнительном родственном варианте воплощения по третьему аспекту или любому из его вариантов

воплощения количество инфекционных частиц составляет по меньшей мере приблизительно 1 x 10^9, 2 x 10^9, 3 x 10^9, 4 x 10^9, 5 x 10^9, 6 x 10^9, 7 x 10^9, 8 x 10^9, 9 x10^9, или, по крайней мере, приблизительно около 1 x 10^{10} при измерении в $TCID_{50}$/мл (где $TCID_{50}$ – цитопатическая доза 50%).

Краткое описание рисунков

[0029] **ФИГ.1:** Примерная блок-схема, изображающая предварительные и последующие этапы процесса, выполняемые для очистки/производства вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного с помощью GP LCMV (VSV-GP).

[0030] **ФИГ.2:** Гистограмма чистоты ДНК клетки-хозяина, хронологически отсортированная для промежуточных продуктов процесса на дозу 1x10^{11} $TCID_{50}$ VSV-GP(-карго) в масштабном производстве. Предварительно осветленный образец (USP) получали путем отбора неочищенного образца сбора клеточной культуры, добавления NaCl к этому неочищенному образцу сбора и последующего осветления неочищенного образца сбора центрифугированием, что приводило к получению USP. Чистоту ДНК клетки-хозяина впоследствии измеряли в USP, а затем рассчитывали чистоту ДНК клетки-хозяина для всего сбора клеточной культуры. Стерильный отфильтрованный материал, полученный в конце процесса, демонстрирует чистоту ДНК клетки-хозяина на уровне для лекарственного вещества.

[0031] **ФИГ.3** Гистограмма чистоты белка клетки-хозяина, хронологически отсортированная для промежуточных продуктов процесса на дозу 1x10^{11} $TCID_{50}$ VSV-GP(-карго) в масштабном производстве. Предварительно осветленный образец (USP) получали путем отбора неочищенного образца сбора клеточной культуры, добавления NaCl к этому неочищенному образцу сбора и последующего осветления неочищенного образца сбора центрифугированием, что приводило к получению USP. Чистоту белка клетки-хозяина впоследствии измеряли в USP, а затем рассчитывали чистоту белка клетки-хозяина для всего сбора клеточной культуры. Стерильный отфильтрованный материал, полученный в конце процесса, демонстрирует чистоту белка клетки-хозяина на уровне для лекарственного вещества.

[0032] **ФИГ.4:** Гистограмма, показывающая уровень $TCID_{50}$/мл VSV-GP после инфицирования (п.и.) клеток HEK293F в указанные моменты времени. Уровень $TCID_{50}$/мл определяли либо в необработанном неочищенном сборе

(черные столбцы), либо в супернатанте центрифугированного образца обработанного неочищенного сбора (серые столбцы). Для этой цели образец неочищенного сбора обрабатывали различными добавками, а затем осветляли центрифугированием. Затем определяли уровень $TCID_{50}$/мл в супернатанте обработанного образца неочищенного сбора после центрифугирования. Уровень $TCID_{50}$ неочищенного сбора измеряли только для контрольных 30 и 48 часов п.и. и обработки сульфатом декстрана.

[0033] **ФИГ.5:** Гистограмма, показывающая уровень геномного титра/мл (черные столбцы) и $TCID_{50}$/мл (серые столбцы) VSV-GP после инфицирования клеток HEK293F. Уровень геномного титра/мл или уровень $TCID_{50}$/мл определяли в необработанных неочищенных сборах (без добавок, без центрифугирования) и в супернатанте центрифугированных образцов обработанных образцов неочищенного сбора. Для этой цели образцы неочищенного сбора обрабатывали различными добавками, а затем осветляли центрифугированием. Затем определяли геномный титр/мл или уровень $TCID_{50}$/мл в супернатанте обработанных образцов неочищенного сбора после центрифугирования.

[0034] **ФИГ.6:** Гистограмма, показывающая извлечение VSV-GP, измеренное по уровню геномного титра/мл (черные столбцы) и $TCID_{50}$/мл (серые столбцы) VSV-GP после инфицирования клеток HEK293F. Уровень геномного титра/мл или уровень TCID50/мл определяли в необработанном неочищенном сборе (без добавок) и принимали за 100%. Процент извлечение VSV-GP после обработки различными концентрациями солей измеряли в супернатанте центрифугированных образцов обработанных образцов неочищенного сбора. Для этой цели образцы неочищенного сбора обрабатывали различными добавками, а затем осветляли центрифугированием. Затем определяли уровень геномного титра/мл или уровень $TCID_{50}$/мл в супернатанте обработанных образцов неочищенного сбора после центрифугирования.

[0035] **ФИГ.7A-B:** Репрезентативные технические данные **(A)** VSV-GP, масштабируемые в данных контроля технологического процесса в масштабе 50 л; и **(B)** VSV-GP, масштабируемые в данных контроля технологического процесса в масштабе 4 л. Уровни $TCID_{50}$/мл и геномного титра/мл измеряли на различных этапах работы установки, начиная со сбора, обработанного солью, и заканчивая лекарственным веществом (ЛВ).

[0036] **ФИГ.8:** Гистограмма, показывающая уровень геномного титра/мл (черные столбцы) и $TCID_{50}$/мл (серые столбцы) VSV-GP после инфицирования клеток HEK293F. Уровень геномного титра/мл или уровень $TCID_{50}$/мл определяли в супернатанте центрифугированных образцов обработанных образцов неочищенного сбора. Для этой цели образцы неочищенного сбора обрабатывали различными составами $MgCl_2$ или NaCl, а затем осветляли центрифугированием. Затем определяли уровень геномного титра/мл или уровень $TCID_{50}$/мл в супернатанте обработанных образцов неочищенного сбора после центрифугирования.

[0037] **ФИГ.9:** Гистограмма, показывающая общую $TCID_{50}$ VSV-GP в сборе HEK293F инфицированных клеток. Общий уровень $TCID_{50}$ определяли в том же цикле для (i) неочищенного сбора, (ii) обработанного нуклеазой неочищенного сбора, (iii) обработанного нуклеазой неочищенного сбора после глубинной фильтрации (осветленный сбор), (iv) при первой промывке фильтра (элюат) с использованием трис-буфера, содержащего 0,25 М хлорида натрия, и (v) при второй промывке фильтра (элюат) с использованием трис-буфера, содержащего 0,5 М хлорида натрия.

Подробное описание изобретения

[0038] В следующем подробном описании изложены многочисленные конкретные детали для обеспечения полного понимания настоящего изобретения. Однако обычному специалисту в данной области будет очевидно, что заявленная технология может применяться на практике без некоторых из этих конкретных деталей. В других случаях хорошо известные структуры и способы не показаны подробно, чтобы не усложнять понимание настоящего изобретения. Заголовки включены только для удобства чтения, и их не следует понимать как ограничивающие изобретение конкретными аспектами или вариантами воплощения.

[0039] Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что при следовании способу или процессу согласно изобретению извлечение из и/или очистка рабдовируса от клеточной культуры значительно улучшаются по сравнению со способами и процессами, известными специалистам в данной области. Авторы изобретения обнаружили, что добавление высвобождающего вирус агента и, в частности, соли или сульфата декстрана непосредственно в клеточную культуру, инфицированную рабдовирусом, - до начала процедуры

сбора - значительно увеличивает количество рабдовируса, извлекаемого из клеточной культуры в последующих этапах. Кроме того, выделение и/или очистка рабдовируса дополнительно улучшаются за счет улавливания рабдовируса на катионообменнике. Выделенный рабдовирус может быть определен количественно, например, путем определения концентрации инфекционного вируса на общую цитопатическую дозу $TCID_{50}$ или в $TCID_{50}$/мл с использованием способа Спирмена-Кербера или на основе копий генома/мл в неочищенном супернатанте, определенных с помощью количественной ПЦР.

[0040] В самом широком смысле изобретение относится к способу получения рабдовирусов и, в частности, вирусов везикулярного стоматита. В одном аспекте выполнение способа или процесса согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать рабдовирус, предпочтительно в условиях cGMP, что приводит к высокому содержанию общего инфекционного вируса или инфекционного вируса в пересчете на объем. В родственном аспекте выполнение способа или процесса согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать рабдовирусы, достаточные для коммерческих целей, то есть для удовлетворения потребностей в коммерческом масштабе. Что касается этого аспекта, то способ/процесс согласно изобретению предпочтительно осуществляют с клеточными культурами, имеющими объем клеточной культуры по меньшей мере 2 л, 5 л, 10 л, 20 л, 30 л, 40 л, 50 л, 60 л, 70 л, 80 л, 90 л, 100 л, 110 л, 120 л, 130 л, 140 л, 150 л, 160 л, 170 л, 180 л, 190 л или по меньшей мере 200 л. Кроме того, что касается этого аспекта, общее количество извлеченных рабдовирусов может быть, по меньшей мере, приблизительно в диапазоне приблизительно от 10^8 до 10^{14} инфекционных частиц, измеренных в показателях $TCID_{50}$. В частности, по меньшей мере примерно 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} или 10^{14} инфекционных частиц измерены в показателях $TCID_{50}$. Предпочтительно, количество инфекционных частиц составляет, по меньшей мере, примерно 10^{13} при измерении в показателях $TCID_{50}$. Кроме того, что касается этого аспекта, количество извлеченного рабдовируса может быть, по крайней мере, приблизительно в диапазоне примерно от 10^8 до 10^{11} инфекционных частиц, измеренных в показателях $TCID_{50}$/мл. В частности, по меньшей мере примерно 10^8, 10^9, 10^{10} или 10^{11} инфекционных частиц, измеренных в показателях $TCID_{50}$/мл. Предпочтительно, количество инфекционных частиц составляет, по крайней мере, примерно 1 x 10^9,

2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, или по крайней мере около 9×10^9 при измерении в показателях $TCID_{50}$/мл. Более предпочтительно количество инфекционных частиц составляет, по крайней мере, примерно 10^{10} при измерении в показателях $TCID_{50}$/мл.

[0041] В другом аспекте выполнение способа или процесса согласно изобретению будет приводить к получению уровня ДНК клетки-хозяина <10 нг/на дозу, <9 нг/на дозу, <8 нг/на дозу, <7 нг /на дозу, < 6 нг/на дозу, < 5 нг/на дозу, < 4 нг/на дозу, < 3 нг/на дозу, < 2 нг/на дозу или < 1 нг/на дозу уровня ДНК клетки-хозяина, при этом доза представляет собой 1×10^{11} общую $TCID_{50}$ вируса. Предпочтительно, уровень ДНК клетки-хозяина на дозу составляет < 1 нг/на дозу, при этом доза представляет собой 1×10^{11} общую $TCID_{50}$ вируса.

[0042] В еще одном другом аспекте выполнение способа или процесса согласно изобретению будет приводить к получению уровня белка клетки-хозяина < 10 мкг/на дозу, < 9 мкг/на дозу, < 8 мкг/на дозу, < 7 мкг/на дозу, < 6 мкг/на дозу, < 5 мкг/на дозу, < 4 мкг/на дозу, < 3 мкг/на дозу, < 2 мкг/на дозу или < 1 мкг/на дозу белка клетки-хозяина, при этом доза представляет собой 1×10^{11} общую $TCID_{50}$ вируса. Предпочтительно, уровень белка клетки-хозяина на дозу составляет < 1 мкг/на дозу, при этом доза представляет собой 1×10^{11} общую $TCID_{50}$ вируса.

[0043] В другом аспекте выполнение способа или процесса согласно изобретению будет приводить к выходам лекарственного вещества с инфекционным титром, измеренным в пересчете на общую $TCID_{50}$, по меньшей мере 1×10^{12} $TCID_{50}$, 2×10^{12} $TCID_{50}$, 3×10^{12} $TCID_{50}$, 4×10^{12} $TCID_{50}$, 5×10^{12} $TCID_{50}$, 6×10^{12} $TCID_{50}$, 7×10^{12} $TCID_{50}$, 8×10^{12} $TCID_{50}$, 9×10^{12} $TCID_{50}$, 1×10^{13} $TCID_{50}$, 1.5×10^{13} $TCID_{50}$, 2×10^{13} $TCID_{50}$, $2{,}5 \times 10^{13}$ $TCID_{50}$, 3×10^{13} $TCID_{50}$ или $3{,}5 \times 10^{13}$ $TCID_{50}$. Предпочтительно, выполнение способа или процесса согласно изобретению в предварительном масштабе 200 л приведет к выходам лекарственного вещества с инфекционным титром, измеренным в пересчете на $TCID_{50}$, по меньшей мере 1×10^{13} $TCID_{50}$.

[0044] На первом этапе клетку-хозяина инфицируют рабдовирусом, предпочтительно вирусом везикулярного стоматита. Инфицирование клетки-хозяина осуществляют способами, которые обычно доступны специалистам в данной области, и обычно включают инокуляцию клеточной культуры посевными материалами (инокулятами) рабдовируса при определенной

множественности инфицирования. Предпочтительно, инфицирование проводят при плотности жизнеспособных клеток в диапазоне от 1,0 до 2,0 x 10^6 клеток/мл. Затем клеточную культуру культивируют в течение периода времени, чтобы обеспечить достаточную репликацию рабдовируса, то есть в условиях, позволяющих репликацию рабдовируса. Точные условия, обеспечивающие репликацию рабдовируса, выбираются квалифицированным специалистом в соответствии с конкретной линией клеток-хозяев. Предпочтительно, клетки инфицируют с использованием главного посевного вирусного материала при низкой множественности инфицирования, например, 0,0005 (или 5 инфекционных частиц на 10000 клеток). Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что способ согласно изобретению на первом этапе будет включать инфицирование подходящей клетки-хозяина рабдовирусом и культивирование инфицированной клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих репликацию рабдовируса.

[0045] Клетка-хозяин может иметь любое происхождение и может присутствовать в виде изолированной клетки или в виде клетки, включенной в клеточную популяцию. Предпочтительно, чтобы клетка-хозяин, продуцирующая рабдовирус, представляла собой клетку млекопитающего. Альтернативно клетка-хозяин может быть клеткой человека, клеткой обезьяны, клеткой мыши или клеткой хомяка. Квалифицированному специалисту известны способы, подходящие для использования при тестировании того, продуцирует ли данная клетка вирус и, таким образом, может ли конкретная клетка-хозяин использоваться в рамках настоящего изобретения. В этом отношении количество вируса, продуцируемого клеткой-хозяином, особо не ограничено. Предпочтительные вирусные титры составляют $\geq$ 1 x 10^7 $TCID_{50}$/мл или $\geq$ 1 x 10^8 копий генома/мл в неочищенных супернатантах данной клеточной культуры после инфицирования без дополнительной последующей обработки.

[0046] В одном варианте воплощения клетка млекопитающего представляет собой мультипотентную клетку-предшественника взрослого организма (MAPC), нейральную стволовую клетку (NSC), мезенхимальную стволовую клетку (MSC), клетку HeLa, клетку HEK, любую клетку HEK293 (например, HEK293F или HEK293T), клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку почки детеныша хомячка (BHK) или клетку Vero или инфильтрирующую опухоль костного мозга клетку (BM-TIC). Предпочтительно культивировать

клетку-хозяина в суспензии, например, путем адаптации клетки-хозяина к росту в суспензии, если она еще не растет естественным образом в суспензии. В предпочтительном варианте воплощения клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293F или HEK293T, происходящую из эмбриональной линии клеток почки человека (HEK) 293. Предпочтительно, клетки HEK293F/HEK293T культивируют в режиме периодического культивирования суспензии в системах с перемешиванием или волновых биореакторов в условиях, не содержащих компоненты животного происхождения, и в определенных химических условиях.

[0047] Клетки-хозяева в контексте изобретения включают классические упаковывающие клетки для продуцирования рабдовируса из нереплицируемых векторов, а также клетки-продуценты для продуцирования рабдовируса из векторов, способных к репродукции. Упаковывающие клетки обычно содержат одну или несколько плазмид для экспрессии важных генов, которых нет в соответствующем упаковываемом векторе и/или которые необходимы для продуцирования вируса. Такие клетки известны специалисту в данной области техники, который может выбрать соответствующие клеточные линии, подходящие для желаемой цели.

[0048] В одном варианте воплощения линия клеток-хозяев представляет собой клетку HEK293. Термин «клетка HEK293 или клеточная линия HEK293», используемый в данном документе, относится к адгезивной клеточной линии человека, которая происходит из почки эмбриона человека и первоначально была иммортализирована в 1973 г. путем интеграции фрагмента генома аденовируса 5 (ad5) размером 4 т.п.н., включая гены E1A и E1B на хромосоме 19 (Graham и соавт., J. Gen. Virol. (1977) 36: 59-72; Malm и соавт., Nature research, Scientific Reports (220) 10:18996). Эта клеточная линия, например, может быть получена от ATCC и DSMZ (ATCC-CRL-1573; DSMZ No: ACC305; RRID: CVCL_0045). В частности, чтобы обеспечить широкомасштабное культивирование и биопродуцирование терапевтических белков или вирусов в биореакторах, исходную (родительскую) клеточную линию HEK293 также адаптировали для выращивания в суспензии высокой плотности в бессывороточной среде. Они включают, не ограничиваясь перечисленными, промышленно значимые суспензионные клеточные линии HEK293-F, HEK293-H и клетки FreeStyle HEK293-F. Клетки FreeStyle HEK293-F адаптированы к суспензионной культуре в экспрессионной среде FreeStyleTM 293 и, например,

могут быть получены от ThermoFisher (R79007; RRID: CVCL_D603). Клетки HEK293-F и HEK293-H были получены из клональной селекции из клеток HEK293 для быстрого роста в безсывороточной среде (SFM), превосходной эффективности трансфекции и высокого уровня экспрессии белка, и их, например, можно получить от ThermoFisher (HEK293-F: 11625019, RRID:CVCL_6642; HEK293-H: 11631017, RRID:CVCL_6643). Штамм HEK293-H представляет собой вариант, который при выращивании в среде с добавлением сыворотки демонстрирует лучшую адгезию в монослойной культуре и простоту использования для анализа бляшек и других применений, зависящих от закрепления. HEK293-F и HEK-293-H обеспечивают как адаптированные к среде Gibco® CD 293. Другими клеточными линиями HEK293, не ограничиваясь перечисленными, являются, например, HEK293.2sus (ATCC CRL-1573.3), HEK293-SF-3F6 (ATCC CRL-12585; RRID: CVCL_4V94), Expi293F (Thermofischer A14527/A14528/100044202 (приготовленная в условиях cGMP); RRID:CVCL_D615) и HEK293-S (Ximbio 154155; RRID:CVCL_A784). Клеточные линии HEK293, адаптированные к выращиванию в суспензии, также могут обозначаться как «клетки 293, адаптированные к SFM».

[0049] Для культивирования клеток HEK293 клетки пассируют в питательной среде с химически определенным составом на последовательных этапах инокуляции в периодическом режиме до тех пор, пока не будет получено достаточное количество клеток для инокуляции, например, в реакторах с механическим перемешиванием. Перед инокуляцией посевным вирусным материалом проводят несколько периодических пассажей в перемешиваемом реакторе, при этом растворенный кислород, pH и температуру контролируют от инокуляции в перемешиваемом реакторе до сбора вируса. Температура во время накопления клеточной массы может отличаться от температуры, используемой после инокуляции посевным вирусным материалом, и обычно составляет около 37°C. В предпочтительном варианте температура смещается после инфицирования с 37°C вниз до диапазона от 32°C до 36°C и более предпочтительно до 34°C.

[0050] В общем, способ или процесс согласно изобретению применим для получения, продуцирования или очистки любого рабдовируса. В предпочтительном варианте воплощения способ или процесс согласно изобретению используют для получения, продуцирования или очистки

везикуловируса. Особенно предпочтительным является получение, продуцирование или очистка вируса везикулярного стоматита.

[0051] Семейство рабдовирусов включает 18 родов и 134 вида с отрицательно-полярными однонитевыми РНК-геномами размером приблизительно 10-16 т.п.н. (Walke и соавт., ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae, Journal of General Virology, 99:447–448 (2018)).

[0052] Характерные признаки представителей семейства рабдовирусов включают один или несколько из следующих: пулевидные или бацилловидные частицы длиной 100–430 нм и диаметром 45–100 нм, состоящие из спирального нуклеокапсида, окруженного матриксным слоем и липидной оболочкой, при этом некоторые рабдовирусы имеют безоболочечные нитевидные вирусы. Отрицательно-полярная одноцепочечная РНК размером 10,8–16,1 т.п.н., которые в основном несегментированные. Геном, кодирующий по меньшей мере 5 генов, кодирующих структурные белки нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G).

[0053] В данном контексте рабдовирус может принадлежать к роду: альмендравирус, куриовирус, циторабдовирус, дихоравирус, эфемеровирус, гапавирус, ледантевирус, лиссавирус, новирабдовирус, нуклеорабдовирус, перабдовирус, сигмавирус, спрививирус, шрипувирус, тибровирус, тупавирус, варикозовирус или везикуловирус.

[0054] В пределах упомянутого в данном описании рода рабдовирус может принадлежать к любому из перечисленных видов. Род альмендравирусов включает: альмендравирус арборетум (Arboretum), альмендравирус бальза (Balsa), альмендравирус Кут-бей (Coot Bay), альмендравирус Пуэрто Альмендрас (Puerto Almendras), альмендравирус Рио Чико (Rio Chico); род куриовирусов включает: куриовирус Курионополиса, куриовирус Ирири (Iriri), куриовирус Итакайунас (Itacaiunas), куриовирус Рошамбо (Rochambeau); род циторабдовирусов включает: циторабдовирус карликовости люцерны, циторабдовирус желтой полосатой мозаики ячменя, циторабдовирус некротической желтизны брокколи, циторабдовирус, ассоциированный с заболеванием *Colocasia bobone*, циторабдовирус полосатости листьев овсяницы, циторабдовирус некротической желтизны салата, циторабдовирус желтой мозаики салата, циторабдовирус северной мозаики злаков, циторабдовирус осота 1, циторабдовирус клубничной морщинистости, циторабдовирус американской

полосатой мозаики пшеницы; род дихоравирусов включает: дихоравирус кольцевой пятнистости кофе, дихоравирус орхидейных пятен; род эфемеровирусов включает: эфемеровирус Аделаида Ривер (Adelaide River), эфемеровирус Берримы, эфемеровирус бычьей лихорадки, эфемеровирус Кимберли, эфемеровирус Кулпинйя (Koolpinyah), эфемеровирус Котонкан (Kotonkan), эфемеровирус Ободхианг (Obodhiang), эфемеровирус Ята (Yata); род гапавирусов включает: гапавирус Фландерс (Flanders), гапавирус Грей Лодж (Gray Lodge), гапавирус Харт Парк (Hart Park), гапавирус Джоинякака (Joinjakaka), гапавирус Камезе (Kamese), гапавирус Ла Джойя (La Joya), гапавирус Ландъя (Landjia), гапавирус Манитоба, гапавирус Марко, гапавирус Москейру (Mosqueiro), гапавирус Моссурил (Mossuril), гапавирус Нгайнган (Ngaingan), гапавирус Орд Ривер (Ord River), гапавирус Парри Крик (Parry Creek), гапавирус Вонгабель (Wongabel); род ледантевирусов включает: ледантевирус Барур (Barur), ледантевирус Фикирини (Fikirini), ледантевирус Фукуока (Fukuoka), ледантевирус Каньявара (Kanyawara), ледантевирус Керн-Каньон (Kern Canyon), ледантевирус Кеуралиба (Keuraliba), ледантевирус Коленте (Kolente), ледантевирус Кумаси (Kumasi), ледантевирус Ле Дантек (Le Dantec), ледантевирус летучих мышей горы Элгон (Mount Elgon bat ledantevirus), ледантевирус Нишимуро (Nishimuro), ледантевирус Нколбиссон (Nkolbisson), ледантевирус Оита (Oita), ледантевирус Ухань (Wuhan), ледантевирус Юнцзя (Yongjia); род лиссавирусов включает: Араванский лиссавирус, австралийский лиссавирус летучих мышей, лиссавирус летучих мышей Бокело, лиссавирус Дювенхаге (Duvenhage), европейский лиссавирус летучих мышей 1, европейский лиссавирус летучих мышей 2, лиссавирус летучих мышей Ганнорува (Gannoruwa), лиссавирус Икома (Ikoma), лиссавирус Иркут (Irkut), лиссавирус Худжанда (Khujand), лиссавирус летучих мышей Лагоса, лиссавирус летучих мышей Ллейда (Lleida), лиссавирус Мокола (Mokola), лиссавирус бешенства (Rabies lyssavirus), лиссавирус летучих мышей Шимони (Shimoni), лиссавирус летучих мышей Западного Кавказа; род новирхабдовирусов включает: новирхабдовирус Хираме (Hirame), новирхабдовирус Писцине (Piscine), новирхабдовирус лососевых, новирхабдовирус змееголова; род нуклеорхабдовирусов включает: нуклеорхабдовирус желтой жилки дурмана; нуклеорхабдовирус пятнистой карликовости баклажанов, нуклеорхабдовирус мелкой полосы кукурузы, нуклеорхабдовирус иранской мозаики кукурузы,

нуклеорхабдовирус мозаики кукурузы, нуклеорхабдовирус желтой карликовости картофеля, нуклеорхабдовирус желтой низкорослости риса, нуклеорхабдовирус желтого нетто-вируса Сонха (Sonchus yellow net nucleorhabdovirus), нуклеорхабдовирус желтой жилки осота, нуклеорхабдовирус жилкового хлороза Таро; род перхабдовирусов включает: перхабдовирус угря, перхабдовирус окуня, перхабдовирус Океанической сельди; род сигмавирусов включает: сигмавирус *Drosophila affinis*, сигмавирус *Drosophila ananassae*, сигмавирус *Drosophila immigrans*, сигмавирус *Drosophila melanogaster*, сигмавирус *Drosophila obscura*, сигмавирус *Drosophila tristis*, сигмавирус мухи домовой (*Muscina stabulans*); род спрививирусов включает: спрививирус карпа, спрививирус мальков щуки; род шрипувирусов включает: шрипувирус Альмпивар (Almpiwar), шрипувирус Чако (Chaco), шрипувирус Ниаха (Niakha), шрипувирус Сены Модурейры (Sena Madureira), шрипувирус Сripура (Sripur); род тибровирусов включает: тибровирус Нижнего Конго, тибровирус Биатрис Хилл, тибровирус прибрежных равнин, тибровирус Экпомы 1, тибровирус Экпомы 2, тибровирус Свитвотер-Бранч (Sweetwater Branch), тибровирус тиброгаргана; род тупавирусов включает: тупавирус Дарема (Durham), тупавирус Кламат (Klamath), тупавирус Тупайа (Tupaia); род варикозавирусов включает: варикозавирус, связанный с большими прожилками салата; род везикуловирусов включает: везикуловирус Алагоаса (Alagoas), везикуловирус американских летучих мышей, везикуловирус Караджаса (Carajas), везикуловирус Чандипуры (Chandipura), кокальный везикуловирус, везикуловирус Индианы (Indiana), везикуловирус Исфахана (Isfahan), везикуловирус Юрона (Jurona), везикуловирус Мальпаис Спринг (Malpais Spring), везикуловирус Мараба (Maraba), везикуловирус Морретона (Morreton), везикуловирус Нью-Джерси (New Jersey), везикуловирус Перинета (Perinet), везикуловирус Пири (Piry), везикуловирус Ради (Radi), везикуловирус Юг Богдановац (Yug Bogdanovac), или вирус Мусса (Moussa).

[0055] Предпочтительно рабдовирус, полученный, продуцированный или очищенный согласно способу или процессу настоящего изобретения, представляет собой онколитический рабдовирус. В этом отношении термин «онколитический» имеет обычное значение, известное в данной области, и относится к способности рабдовируса инфицировать и лизировать (разрушать) раковые клетки, но не нормальные клетки (в какой-либо значительной степени). Предпочтительно, онколитический рабдовирус способен к репликации внутри

раковых клеток. Онколитическую активность можно тестировать в различных системах анализа, известных специалистам в данной области (типичный анализ *in vitro* описан Muik и соавт., Cancer Res., 74(13), 3567-78, 2014). Следует понимать, что онколитический рабдовирус может инфицировать и лизировать только определенные типы раковых клеток. Также онколитический эффект может варьироваться в зависимости от типа раковых клеток.

[0056] В предпочтительном варианте воплощения рабдовирус принадлежит к роду везикуловирусов. Виды везикуловирусов были определены главным образом серологическими методами в сочетании с филогенетическим анализом геномов. Биологические характеристики, такие как круг хозяев и механизмы передачи, также используются для различения видов вирусов внутри рода. Таким образом, род везикуловирусов образует отдельную монофилетическую группу, которая подтверждается деревьями Максимального правдоподобия, полученными из полных L-последовательностей.

[0057] Вирусы, отнесенные к разным видам в пределах рода везикуловирусов, могут иметь одну или несколько из следующих характеристик: A) минимальная дивергенция аминокислотной последовательности 20% в L; B) минимальная дивергенция аминокислотной последовательности 10% в N; C) минимальная дивергенция аминокислотной последовательности 15% в G; Г) можно отличить в серологических анализх; и E) занимают разные экологические ниши, о чем свидетельствуют различия в хозяевах и/или членистоногих переносчиках.

[0058] Предпочтительным является вирус везикулярного стоматита (VSV). В наиболее предпочтительном варианте воплощения способ или процесс по изобретению используют для получения, продуцирования или очистки вируса везикулярного стоматита, где гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), предпочтительно штамма WE-HPI. Такой VSV (рекомбинантный с GP LCMV), например, описан в WO 2010/040526 и называется VSV-GP.

[0059] Гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) может представлять собой GP1 или GP2. Также включены гликопротеины из различных штаммов LCMV. В частности, LCMV-GP может быть получен из штаммов LCMV дикого типа или LCMV LCMV-WE, LCMV-WE-HPI, LCMV-WE-HPlopt. В предпочтительном варианте воплощения ген,

кодирующий гликопротеин GP LCMV, кодирует белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:1, или аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83 %, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, в то время как функциональные свойства рекомбинантного рабдовируса, содержащего гликопротеин GP, кодирующий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1, сохраняются.

[0060] Вирус везикулярного стоматита обычно кодирует в своем геноме, по меньшей мере, нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G).

[0061] В предпочтительном варианте воплощения вирус везикулярного стоматита кодирует в своем геноме по меньшей мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, содержащий аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO:2, или функциональный вариант по меньшей мере на 80%, 81 %, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичный SEQ ID NO:2, фосфопротеин (P), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:3, или функциональный вариант по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичный SEQ ID NO:3, большой белок (L), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, или функциональный вариант по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86 %, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичный SEQ ID NO:4, и матриксный белок (M), содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:5, или функциональный вариант по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86% , 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичный SEQ ID NO:5.

[0062] Специалисту в данной области станет понятно, что существует возможность модификаций последовательности нуклеопротеина (N) вируса везикулярного стоматита, большого белка (L), фосфопротеина (P), матриксного белка (M) или гликопротеина (G) без потери основных функций этих белков. Такие функциональные варианты, применяемые в соответствии с изобретением, полностью или частично сохраняют свою основную функцию или активность.

Например, белок L является полимеразой и выполняет существенную функцию при транскрипции и репликации вируса. Его функциональный вариант должен сохранять по крайней мере часть этой способности. Четким признаком сохранения основной функциональности или активности является успешное продуцирование вирусов, включая эти функциональные варианты, сохраняющие способность к репликации и инфицированию опухолевых клеток. Продуцирование вирусов и испытание на инфицирование и репликацию в опухолевых клетках испытывают в различных аналитических системах, известных специалистам в данной области (типовой анализ *in vitro* описан в публикации Muik и соавт., Cancer Res., 74(13), 3567 - 78, 2014).

[0063] В оптимальном варианте воплощения вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G), причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности $\geq$ 80 % с SEQ ID NO: 4.

[0064] В оптимальном варианте воплощения вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G), причем нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности $\geq$ 90 % с SEQ ID NO: 2.

[0065] В ещё одном оптимальном варианте воплощения вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G), причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности, которая равняется или больше, чем 80 %, с SEQ ID NO: 4, и нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности $\geq$ 90 % с SEQ ID NO: 2.

[0066] В другом варианте воплощения гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином вируса Данденонг (DANDV) или вируса Мопея (MOPV). Вирус Данденонг (DANDV) является аренавирусом Старого света. В настоящее время существует только один штамм, известный

специалистам в данной области, который включает гликопротеин и который может быть использован. Гликопротеин DANDV, содержащийся в вирусе везикулярного стоматита имеет более 6 сайтов гликозилирования, в частности, 7 сайтов гликозилирования. Типичным оптимальным гликопротеином является содержащийся в DANDV и доступный под номером Genbank EU136038. В одном варианте воплощения ген, кодирующий гликопротеин DANDV, кодирует аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, которая имеет по крайней мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, и при этом функциональные свойства вируса везикулярного стоматита, который включает гликопротеин, который кодирует аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 6, сохраняются. Вирус Мопея (MOPV) является аренавирусом Старого света. Существуют несколько известных специалистам в данной области штаммов, которые включают гликопротеин и пригодны для применения в качестве доноров гликопротеина, содержащегося в вирусе везикулярного стоматита. Гликопротеин MOPV, содержащийся в вирусе везикулярного стоматита, имеет более 6 сайтов гликозилирования, в частности, 7 сайтов гликозилирования. Типичным оптимальным гликопротеином является содержащийся в вирусе Мопея и доступный под номером Genbank AY772170. В одном варианте воплощения ген, кодирующий гликопротеин MOPV, кодирует аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 7, или последовательность, которая имеет по крайней мере 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и при этом функциональные свойства вируса везикулярного стоматита, который включает гликопротеин, который кодирует аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 7, сохраняются.

[0067] Следует понимать, что рабдовирус и, в частности, вирус везикулярного стоматита, который получают, продуцируют или очищают в соответствии со способом или процессом согласно изобретению, может кодировать в своем геноме дополнительные гены (рекомбинантный рабдовирус).

Эти гены часто называют карго и включают, например, опухолевые антигены, хемокины, цитокины или другие иммуномодулирующие элементы. Независимо от типа карго, дополнительно экспрессируемого рабдовирусом, такой карго, экспрессирующий рабдовирус, может быть получен, продуцирован или очищен согласно способу или процессу согласно изобретению. Таким образом, в наиболее предпочтительном варианте воплощения вирус везикулярного стоматита получают, продуцируют или очищают в соответствии со способом или процессом согласно изобретению, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). В еще одном предпочтительном варианте воплощения вирус везикулярного стоматита получают, продуцируют или очищают в соответствии со способом или процессом согласно изобретению, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), а геном кодирует дополнительный карго, такой как опухолевый антиген, хемокины, цитокины или другие иммуномодулирующие элементы. Предпочтительно, карго представляет собой CCL21 или укороченный с С-конца белок CCL21 (имеющий аминокислоты 1-79 полной длины CCL21), характеризующийся делецией и/или мутацией аминокислот(ы) в удлиненном С-конце белка CCL21. Путем делеции и/или мутации аминокислот в удлиненном С-конце связывание с гликозаминогликанами, такими как гепарин, тем самым снижается. В еще одном предпочтительном варианте воплощения карго представляет собой слитый белок, содержащий внеклеточный домен CD80, слитый с Fc-концом IgG1, в результате чего образуется слитый белок CD80Fc. В наиболее предпочтительном варианте воплощения карго представляет собой слитый с Fc белок внеклеточного домена CD80, содержащий или состоящий из SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9. В другом предпочтительном варианте воплощения карго представляет собой белок CCL21, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. Однако для целей способа или процесса согласно изобретению авторы изобретения обнаружили, что дополнительный карго не влияет на эффективность способа или процесса, и поэтому природа карго не должна толковаться как ограничивающая применимость изобретения.

[0068] Рабдовирусы, кодирующие другие гены, могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, и

включают, без ограничения, (1) применение кДНК, трансфицированных в клетку, или (2) комбинации кДНК, трансфицированных в хелперную клетку, или (3) кДНК, трансфицированных в клетку, которую затем инфицируют хелпером/минивирусом, обеспечивая *in trans* остальные компоненты или виды активности, необходимые для получения инфекционного или неинфекционного рекомбинантного рабдовируса. При применении любых из этих способов (например, хелпера/минивируса, линии хелперных клеток или только трансфекции кДНК) минимальными необходимыми компонентами являются молекула ДНК, содержащая действующие в цис-позиции сигналы для (1) инкапсулирования геномной (или антигеномной) РНК N-белком, P-белком и L-белком рабдовируса и (2) репликации эквивалента геномной или антигеномной РНК (промежуточного продукта репликации).

[0069] Реплицирующий элемент или репликон является цепью РНК, минимально содержащей на 5' и 3' концах лидерную последовательность и трейлерную последовательность рабдовируса. В геномном направлении лидерная последовательность находится на 3′ конце, а трейлерная последовательность – на 5′ конце. Любая РНК, расположенная между этими двумя сигналами репликации, в свою очередь, реплицируется. Лидерные и трейлерные участки также должны содержать минимальные действующие в цис-позиции элементы с целью инкапсулирования N-белком и для связывания полимеразы, которые необходимы для инициации транскрипции и репликации. Для приготовления рекомбинантного рабдовируса минивирус, содержащий G-ген, также должен содержать лидерный участок, трейлерный участок и G-ген с соответствующими сигналами инициации и терминации для продуцирования мРНК G-белка. Если минивирус также включает M-ген, также должны присутствовать ответные сигналы инициации и терминации для продуцирования мРНК M-белка.

[0070] Для любого гена, содержащегося в геноме рекомбинантного рабдовируса, ген должен быть фланкирован соответствующими сигналами инициации и терминации транскрипции, которые обеспечивают возможность экспрессии этих генов и продуцирования белковых продуктов (Schnell и соавт., Journal of Virology, p. 2318 – 2323, 1996). Для продуцирования "неинфекционного" рекомбинантного рабдовируса рекомбинантный рабдовирус должен иметь минимальные репликонные элементы и N-, P- и L-белки, а также

должен содержать M-ген. Таким образом, продуцируются частицы вируса, которые отщепляются от клетки, но являются неинфекционными частицами. Для продуцирования "инфекционных" частиц частицы вируса должны дополнительно включать белки, способные опосредовать связывание и слияние частиц вируса, например, через применение прикрепляющего белка или рецепторного лиганда. Естественным рецепторным лигандом рабдовирусов является G-белок.

[0071] Для использования приемлема любая клетка, которая обеспечивает возможность составления рекомбинантного рабдовируса. Один способ получения инфекционных частиц вируса включает соответствующую линию клеток, инфицированную плазмидой, которая кодирует РНК-полимеразу T7 или другую подходящую полимеразу бактериофагов, такую как полимеразы T3 или SP6. Затем клетки трансфицируют отдельной кДНК, содержащей гены, кодирующие G-, N-, P-, L- и M-белки рабдовируса. Эти кДНК обеспечивают белки для построения частиц рекомбинантного рабдовируса. Клетки могут быть трансфицированы любым способом, известным в данной области.

[0072] Также в линию клеток трансфицируют "полицистронную кДНК", содержащую эквивалент геномной РНК рабдовируса. Если частица инфекционного рекомбинантного рабдовируса предполагается как литическая в инфицированной клетке, тогда должны присутствовать гены, кодирующие N-, P-, M- и L-белки, а также любой сегмент гетерологической нуклеиновой кислоты. Если частица инфекционного рекомбинантного рабдовируса предполагается как нелитическая, ген, кодирующий M-белок, не включают в полицистронную ДНК. Под "полицистронной кДНК" следует понимать кДНК, которая включает по крайней мере транскрипционные единицы, содержащие гены, кодирующие N-, P- и L-белки. Полицистронная ДНК рекомбинантного рабдовируса также может содержать ген, кодирующий вариант белка или его полипептидный фрагмент, или терапевтическую нуклеиновую кислоту или белок. В альтернативном варианте любой белок, который должен быть первоначально ассоциирован с образовавшейся сначала вирусной частицей или ее фрагментом, может быть обеспечен *in trans*.

[0073] Предполагаемая полицистронная кДНК может содержать ген, кодирующий вариант белка, ген, который кодирует репортер, терапевтическую нуклеиновую кислоту и/или N-P-L-гены или N-P-L-M-гены. Первым этапом в

генерировании рекомбинантного рабдовируса является экспрессия РНК, являющаяся геномным или антигеномным эквивалентом кДНК. Затем эту РНК упаковывают N-белком, а затем реплицируют P/L-белками. Образующийся таким образом рекомбинантный вирус может быть восстановлен. Если G-белок отсутствует в геноме рекомбинантной РНК, его обычно обеспечивают *in trans*. Если белки G и M отсутствуют, то оба обеспечивают *in trans*. Для получения частиц "неинфекционного рабдовируса" процедура может быть такой, как описано выше, за исключением того, что полицистронная кДНК, трансфицированная в клетки, должна содержать N-, P- и L-гены только рабдовируса. Полицистронная кДНК частиц неинфекционного рабдовируса может дополнительно содержать ген, который кодирует белок.

[0074] После трансфекции клеточной культуры всю клеточную культуру обычно собирают между одним и тремя днями после инфицирования. Преимущественно, способ/процесс согласно изобретению позволяет обрабатывать всю клеточную культуру для последующего этапа сбора.

[0075] В первом альтернативном варианте, в соответствии со способом или процессом согласно изобретению сбор рабдовируса получают из клеточной культуры путем добавления высвобождающего вирус агента, такого как соль или сульфат декстрана, непосредственно в клеточную культуру. Было замечено, что, хотя концентрации вируса, измеренные с помощью $TCID_{50}$ или на геномные копии в неочищенном супернатанте сбора, предполагали выход, достаточный для удовлетворения потребностей, после сбора наблюдалась значительная потеря концентрации вируса, которую нельзя было объяснить. Было высказано предположение, что это может быть связано с взаимодействием вируса с клетками, дебрисом и/или другими компонентами клеточной культуры, и что эти вирусы затем теряются после этапа осветления, т.е. глубинной фильтрации, центрифугирования или фильтрации с тангенциальным потоком (TFF). Не ограничиваясь какой-либо теорией, далее полагают, что вирусные частицы, которые уже отделились от клеток-хозяев, могут быть электростатически ограничены клеточной поверхностью. Таким образом, например, при увеличении ионной силы клеточной культуры с помощью высвобождающего вирус агента, частицы вируса могут высвобождаться с поверхности клетки. Эта гипотеза была проверена путем добавления в культуру клеток различных высвобождающих вирус агентов.

[0076] В этом отношении термин «высвобождающий вирус агент» или «агент, высвобождающий вирус» относится к агенту, предпочтительно приготовленному в виде раствора, который наносится на культуру клеток перед сбором и тем самым увеличивает количество вируса, высвобождаемого в супернатант для последующего этапа сбора (измеряемое с помощью $TCID_{50}$). Эффект и пригодность агента, высвобождающего вирусы, можно легко измерить, взяв, например, образец из клеточной культуры перед сбором, обработав образец высвобождающим вирус агентом и далее центрифугировав обработанный образец и определив количества вируса (измеряемое с помощью $TCID_{50}$) в супернатанте обработанного образца и сравнив его с необработанным образцом. Предпочтительно, высвобождающий вирус агент согласно изобретению не инактивирует (постоянно) или не повреждает вирус, не мешает последующим этапам способа/процесса и/или может быть легко удален во время последующих стадий способа/процесса. Другим аспектом является стоимость продуктов: предпочтительный высвобождающий вирус агент является экономически выгодным и его легко найти. В одном аспекте сбор вируса (измеряемый с помощью $TCID_{50}$), полученный из культуры клеток, обработанной высвобождающим вирус агентом, по сравнению с необработанной культурой клеток увеличивается по меньшей мере приблизительно в 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз. Предпочтительно, количество вируса (измеренное с помощью $TCID_{50}$), извлеченного из сбора, обработанного высвобождающим вирус агентом, по сравнению с необработанным сбором увеличивается по меньшей мере примерно в 10 раз, предпочтительно по меньшей примерно в 25 раз, предпочтительно по меньшей мере примерно в 50 раз, предпочтительно по меньшей мере примерно в 75 раз и более предпочтительно по меньшей мере примерно в 100 раз.

[0077] Для целей изобретения необходимое количество и/или пригодность агента, высвобождающего вирусы, для достижения желаемого эффекта может быть определено либо через (i) увеличение ионной силы в клеточной культуре после добавления высвобождающего вирус агента к клеточной культуре, либо может альтернативно определяться (ii) увеличением концентрации высвобождающего вирус агента в клеточной культуре. Для альтернативного варианта (i) следует понимать, что для цели изобретения высвобождающий вирус агент, который добавляется к клеточной культуре,

будет затем вызывать соответствующее увеличение ионной силы в клеточной культуре. В данном контексте термин «увеличение ионной силы» относится к увеличению ионной силы клеточной культуры после добавления высвобождающего вирус агента. Для альтернативного варианта (ii) «увеличение концентрации высвобождающего вирус агента» рассчитывается исключительно на основе конкретного высвобождающего вирус агента, который добавляется к культуре клеток, и делается ссылка с соответствующими изменениями на приведенный ниже термин «увеличение концентрации соли», который описывает это более подробно для соли в качестве высвобождающего вирус агента.

[0078] Следовательно, в одном аспекте высвобождающий вирус агент представляет собой агент, предпочтительно в растворе, который способен повышать ионную силу клеточной культуры после его добавления к клеточной культуре, такой как соли, аминокислоты или сульфатированные полисахариды, как раскрыто в данном описании, и тем самым способствует высвобождению вирусных частиц. Увеличение ионной силы в клеточной культуре должно составлять по меньшей мере приблизительно 0,01 М или по крайней мере примерно 0,05 М. В другом варианте воплощения увеличение ионной силы в клеточной культуре составляет от приблизительно 0,01 М до приблизительно 1,5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 1,5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 1,5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 1,5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 1,5 М. В другом варианте воплощения увеличение ионной силы в клеточной культуре составляет от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5М, от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 1,5 М. В предпочтительном варианте воплощения увеличение ионной силы в клеточной культуре составляет по меньшей мере приблизительно 0,1 М или более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 0,2 М. В зависимости от типа рабдовируса может быть достигнуто даже более высокое увеличение ионной силы, пока рабдовирус не будет безвозвратно инактивирован или поврежден. Таким образом, в культуре клеток может быть достигнуто увеличение ионной силы до приблизительно 2 М, 2,5 М, 3 М, 3,5 М, 4 М, 4,5 М или 5 М.

[0079] Известно, что ионная сила раствора является мерой концентрации ионов в растворе. Ионные соединения растворяются в воде, диссоциируются на ионы и приводят к получению ионной силы раствора, которая представляет собой функцию концентрации всех присутствующих ионов:

[0080]
$$I = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{n} c_i z_i^2$$

[0081] В этом уравнении c представляет собой молярную концентрацию иона i (M, моль/л), z представляет собой число зарядов этого иона, а сумма берется по всем ионам n в растворе. Для хлорида натрия ионная сила равна концентрации, но для таких солей, как $MgSO_4$, ионная сила в четыре раза выше, так что многовалентные ионы вносят большой вклад в ионную силу. Кроме того, также известно, как можно регулировать желаемую ионную силу раствора (соли), например, буфера; установка ионной силы раствора (соли) может быть выполнена в зависимости от концентрации и ионной активности присутствующих агентов, таких как соли. Кроме того, в предварительном уровне техники существует огромное количество публикаций и патентных документов, так что конкретное значение или диапазон ионной силы можно найти в справочнике, монографии и т.п. Таким образом, специалист в данной области может предоставить раствор (соли), который имеет требуемую ионную силу, чтобы вызвать требуемое увеличение ионной силы в клеточной культуре.

[0082] Предпочтительно, путем добавления высвобождающего вирус агента к клеточной культуре ионная сила клеточной культуры увеличивается по крайней мере приблизительно на 0,01 M, или по крайней мере приблизительно на 0,05 M, по крайней мере приблизительно на 0,1 M, или по крайней мере приблизительно на 0,2 M, или по крайней мере приблизительно на 0,25 M, или по крайней мере приблизительно на 0,3 M, или по крайней мере приблизительно на 0,35 M, или по крайней мере приблизительно на 0,4 M, или по крайней мере приблизительно на 0,45 M, или по крайней мере приблизительно на 0,5 M, или от приблизительно 0,01 M до приблизительно 1,5 M, или от приблизительно 0,05 M до приблизительно 1,5 M, или от приблизительно 0,1 M до приблизительно 1,5 M, или от приблизительно 0,15 M до приблизительно 1,5 M, или от приблизительно 0,2 M до приблизительно 1,5 M. В некоторых случаях в

культуре клеток может быть достигнуто увеличение ионной силы примерно до 2 М, 2,5 М, 3 М, 3,5 М, 4 М, 4,5 М или 5 М. Следует понимать, что любой из вышеупомянутых нижних пределов и диапазонов может быть объединен с любым из более высоких пределов или диапазонов.

[0083] Следует понимать, что термин «культура клеток» включает клетки-хозяева, рабдовирус и среду для культивирования клеток. Объем и/или концентрация высвобождающего вирус агента и, в частности, соли или сульфата декстрана в основном зависят от объема клеточной культуры и конечной концентрации или ионной силы, которые должны быть достигнуты в клеточной культуре. Соль может быть добавлена к культуре клеток в виде твердой соли или в виде водного раствора соли. Для солевого раствора в некоторых случаях может оказаться целесообразным добавить высококонцентрированный солевой раствор, имеющий небольшой объем, тогда как в других случаях может быть желательным добавить больший объем солевого раствора, имеющего более низкую концентрацию соли. Раствор соли можно добавлять непрерывно с течением времени или его можно добавлять в культуру клеток целиком сразу. Соль может быть добавлена к культуре клеток в виде твердой соли или в виде водного раствора соли. Для солевого раствора в некоторых случаях может оказаться целесообразным добавить высококонцентрированный солевой раствор, имеющий небольшой объем, тогда как в других случаях может быть желательным добавить больший объем солевого раствора, имеющего более низкую концентрацию соли. Раствор соли можно добавлять непрерывно с течением времени или его можно добавлять в культуру клеток целиком сразу. В одном варианте воплощения раствор соли добавляют к исходному раствору 4 М в разведении 1:20 к культуре, что приводит к увеличению концентрации дополнительно на 0,2 М NaCl непосредственно перед сбором. Для сульфата декстрана также может быть целесообразно добавить высококонцентрированный раствор сульфата декстрана, имеющий небольшой объем, тогда как в других случаях может быть желательным добавить больший объем раствора сульфата декстрана, имеющего более низкую концентрацию. Раствор сульфата декстрана можно добавлять непрерывно с течением времени или его можно добавлять в культуру клеток целиком сразу. В одном варианте воплощения раствор сульфата декстрана добавляют непосредственно перед сбором в культуру, что приводит к концентрации в клеточной культуре 100 мкг/мл. Однако в некоторых случаях

может потребоваться добавление к клеточной культуре сульфата декстрана с более низкими или более высокими концентрациями.

[0084] Эффект и пригодность высвобождающего вирус агента, а также требуемая концентрация могут быть легко определены специалистом в данной области техники, как объяснено заранее.

[0085] По-видимому, высвобождающий вирус агент и, в частности, соль или сульфат декстрана в клеточной культуре помогает растворять агрегаты рабдовируса, которые могли образоваться во время культивирования, а также способствует высвобождению рабдовируса из клетки-хозяина или мембран клетки-хозяина. Таким образом, в результате добавления высвобождающегося вирус агента и, в частности, соли или сульфата декстрана большее количество извлекаемого рабдовируса высвобождается в супернатант или высвобождается из клеток, которые могут быть захвачены и извлечены на последующих стадиях.

[0086] Понятно, что также предпочтительны другие сульфатированные полисахариды, а не сульфат декстрана. Предпочтительными могут быть сульфатированные полисахариды с более высокой степенью сульфатирования. Сульфатированные полисахариды могут включать, не ограничиваясь приведенными, сульфат декстрана, полисульфат пентозана, фукоидан и каррагинаны и их соответствующие соли.

[0087] Было также отмечено, что при использовании аргинина в качестве агента, высвобождающего вирус, количество рабдовируса, высвобождаемого в супернатант, может быть увеличено. Так, в одном варианте воплощения высвобождающий вирус агент представляет собой раствор, содержащий аргинин. Предпочтительно, чтобы концентрация аргинина в культуре клеток или ионная сила в культуре клеток увеличивались при добавлении раствора по крайней мере приблизительно на 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или по крайней мере приблизительно на 0,5 М. Также предполагается использование других аминокислот и их соответствующих солей, и в одном аспекте аминокислоты и их соответствующие соли могут быть использованы в качестве высвобождающего вирус агента, предпочтительно полярных аминокислот, в большей степени основных или кислых аминокислот. Наиболее предпочтительные аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, гистидин, лизин или тирозин. Предпочтительно, концентрация

аминокислот в клеточной культуре или ионная сила в клеточной культуре увеличивается путем добавления аминокислоты по крайней мере приблизительно на 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или по крайней мере приблизительно на 0,5 М.

[0088] Для целей изобретения важно, что путем добавления соли к культуре клеток достигается увеличение концентрации соли.

[0089] В данном контексте термин «повышение концентрации соли» всегда относится к конкретной соли, которую добавляют к культуре клеток, и к тому, повышается ли концентрация этой конкретной соли.

[0090] Следует понимать, что культура клеток может уже содержать определенный уровень концентрации соли в среде. Соль, которая может уже содержаться в клеточной культуре, и соль, которую добавляют в клеточную культуру для сбора, может быть одной и той же солью или могут быть разными солями. Если соль в клеточной культуре и соль, добавляемая в клеточную культуру, являются одинаковыми, специалист в данной области поймет, что необходимо приготовить достаточно концентрированную соль или солевой раствор, чтобы вызвать увеличение концентрации соли с учетом присутствующей соли в среде. Например, для повышения концентрации NaCl на 0,2 М в клеточной культуре, уже имеющей концентрацию NaCl 0,1 М (что приводит к конечной концентрации NaCl 0,3 М в клеточной культуре), необходимо приготовить достаточно концентрированный раствор соли NaCl, учитывая присутствующую в среде концентрацию NaCl.

[0091] С другой стороны, если клеточная культура не содержит какой-либо соли или содержит другую соль, чем та, которая должна быть добавлена к клеточной культуре, то увеличение концентрации соли будет основываться исключительно на той соли, которая будет добавлена к клеточной культуре. Следовательно, в обоих таких случаях (без соли или с другой солью) увеличение концентрации соли основано только на конкретной соли, добавленной в культуру клеток, т. е. увеличение концентрации соли будет рассчитываться только на основе конкретной соли, которую добавляют в культуру клеток.

[0092] Увеличение концентрации соли в клеточной культуре должно быть, по крайней мере, приблизительно на 0,01 М или по крайней мере приблизительно на 0,05 М. В другом варианте воплощения увеличение концентрации соли в клеточной культуре составляет от приблизительно 0,01 М

до приблизительно 1,5 М, от приблизительно 0,05 М до приблизительно 1,5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 1,5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 1,5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 1,5 М.

[0093] В предпочтительном варианте увеличение концентрации соли в клеточной культуре составляет, по меньшей мере, приблизительно 0,1 М или более, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 0,2 М. Авторы изобретения тестировали увеличение концентрации до 1,5 М без какого-либо негативного воздействия на рабдовирус. В зависимости от типа рабдовируса могут быть достигнуты даже более высокие концентрации соли, если рабдовирус не инактивируется или не повреждается концентрацией соли. Таким образом, в клеточной культуре может быть достигнуто увеличение концентрации солей приблизительно до 2 М, 2,5 М, 3 М, 3,5 М, 4 М, 4,5 М или 5 М.

[0094] Подходящие соли включают как органические, так и неорганические соли. Неорганическая соль не ограничена в соответствии с настоящим изобретением, может быть использована любая неорганическая соль, которая растворима в водном растворе и не повреждает безвозвратно клеточную культуру и/или вирус. Неорганическая соль, например, выбрана из группы, состоящей из солей щелочных или щелочноземельных металлов сульфатов, нитратов, фосфатов, карбонатов, галогенидов, боратов, силикатов и т.п. Если должен быть предоставлен фармацевтически приемлемый продукт, неорганическая соль, а также органическая соль должны быть выбраны из группы фармацевтически приемлемых солей, известных *per se*. Например, фармацевтически приемлемые неорганические соли выбирают из солей натрия, таких как галогениды натрия, предпочтительно хлорид натрия, сульфат натрия, борат натрия; из солей кальция, таких как галогениды кальция, предпочтительно хлорид кальция, сульфат кальция, борат кальция; из солей магния, таких как галогениды магния, предпочтительно хлорид магния, сульфат магния, борат магния и их комбинации, а также других фармацевтически приемлемых неорганических солей.

[0095] Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, соли неорганических или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Например, такие соли включают соли бензолсульфоновой кислоты, бензойной

кислоты, лимонной кислоты, этансульфоновой кислоты, фумаровой кислоты, гентизиновой кислоты, бромистоводородной кислоты, соляной кислоты, малеиновой кислоты, яблочной кислоты, малоновой кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, 4-метил-бензолсульфокислоті, фосфорной кислоты, салициловой кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты и винной кислоты. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли могут быть образованы с катионами аммиака, L-аргинина, кальция, 2,2'-иминобисэтанола, L-лизина, магния, N-метил-D-глюкамина, калия, натрия и трис(гидроксиметил)-аминометана.

[0096] Предпочтительные соли включают, но не ограничиваются ими, NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl, сульфат NH_4, ацетат NH_4 или бикарбонат NH_4. В наиболее предпочтительном варианте используют раствор соли NaCl. Солевой раствор может содержать буфер и предпочтительно буфер с pH от приблизительно 5 до приблизительно 9, желательно от приблизительно 6,5 до приблизительно 8,5.

[0097] Следует понимать, что pH клеточной культуры после добавления высвобождающего вирус агента поддерживают в диапазоне, который сохраняет целостность клеток и/или, что более важно, вируса, например, в диапазоне от приблизительно pH 5 до 9 или более примерно от 6,5 до 8,5. Кроме того, в некоторых случаях может оказаться желательным - в зависимости от природы высвобождающего вирус агента - отрегулировать pH до определенного диапазона, чтобы повлиять на заряд высвобождающего вирус агента и тем самым улучшить его свойства в качестве высвобождающего вирус агента.

[0098] После добавления высвобождающего вирус агента и, в частности, соли или сульфата декстрана в клеточную культуру для достижения желаемой концентрации или ионной силы в клеточной культуре не предвидится специфического времени удерживания или инкубации. Таким образом, после достижения желаемой концентрации или ионной силы в культуре клеток вся культура клеток будет дополнительно обработана на следующем этапе. Может оказаться желательным перемешивать или перемещать клеточную культуру для достижения равномерного распределения высвобождающего вирус агента в клеточной культуре. Из-за технической необходимости добавления высвобождающего вирус агента и, в частности, соли или сульфата декстрана, а также подготовки или перемещения клеточной культуры на следующие этапы

процесса, по своей природе достигается определенное время инкубации с высвобождающим вирус агентом. В некоторых случаях может быть желательно инкубировать клеточную культуру после добавления высвобождающего вирус агента в течение определенного периода времени. Это время инкубации может составлять 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа или 24 часа.

[0099] В соответствии со способом или процессом согласно изобретению клеточную культуру затем подвергают стадии осветления. Поскольку рабдовирус секретируется в супернатант, эта стадия осветления служит для отделения как можно большего количества твердых частиц, то есть клеток и клеточного дебриса, от супернатанта, содержащего рабдовирус. Квалифицированному специалисту доступны различные способы удаления клеток из супернатанта клеточной культуры, предпочтительно осветление включает один или несколько из следующих способов: глубинная фильтрация, фильтрация с тангенциальным потоком и/или центрифугирование. В каждом из этих способов осветления супернатант отделяют от клеток и клеточного дебриса, а супернатант с рабдовирусом собирают для дальнейшей обработки. Другие способы, известные специалистам в данной области, для отделения твердых частиц от супернатанта могут быть также применены на этой стадии осветления. В предпочтительном варианте воплощения клеточную культуру осветляют микрофильтрацией с поперечным потоком, более предпочтительно с использованием отрезанного полого волокна размером 0,65 мкм. В другом предпочтительном варианте воплощения культуру клеток осветляют с помощью глубинного фильтра. В некоторых случаях - для предотвращения потенциального загрязнения бионагрузкой - фильтрацию 0,45 мкм / 0,2 мкм последовательно подключают к глубинному фильтру.

[00100] Во втором альтернативном варианте согласно способу или процессу изобретения, сбор рабдовируса получают из клеточной культуры, сначала осветляя клеточную культуру посредством стадии фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтр с высвобождающим вирус агентом, в частности водным раствором соли или сульфатом декстрана. Если используется водный раствор соли, этот солевой раствор имеет концентрацию или ионную

силу по меньшей мере примерно 0,01 М или 0,05 М, или концентрацию или ионную силу от приблизительно 0,01 М до приблизительно 1,5 М или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 1,5 М. Затем извлекают супернатант (или, в данном случае, фильтрат) и раствор для промывания, оба из которых содержат сбор рабдовируса.

[00101] Таким образом, в этом альтернативном варианте высвобождающий вирус агент, в частности раствор соли или сульфат декстрана, не добавляют непосредственно в культуру клеток, а культуру клеток сначала осветляют посредством этапа фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации и фильтр, предпочтительно глубинный фильтр промывают высвобождающим вирус агентом (предпочтительно солевым раствором или сульфатом декстрана). Клетки и клеточный дебрис задерживаются фильтром, предпочтительно глубинным фильтром, и высвобождающий вирус агент обеспечивает в первую очередь высвобождение рабдовируса из клеток или клеточных мембран, задерживаемых фильтром, предпочтительно глубинным фильтром. Таким образом, в этом альтернативном варианте эффект от добавления высвобождающего вирус агента такой же, как и в первом альтернативном варианте, т. е. высвобождается и собирается большее количество извлекаемого рабдовируса, который может быть захвачен и извлечен на последующих этапах. Понятно, что специалист в данной области техники может выбрать из ряда различных фильтров те, которые позволили бы удалить клетки и клеточный дебрис, и выберет подходящий фильтр.

[00102] Также здесь, в зависимости от типа рабдовируса могут применяться даже более высокие, т.е. концентрации солей, если рабдовирус не инактивируется полностью или не повреждается концентрацией соли. Подходящие соли включают как органические, так и неорганические соли. Неорганическая соль не ограничивается в соответствии с настоящим изобретением, может быть использована любая неорганическая соль, которая растворима в водном растворе и не влияет на культуру клеток и/или вирус. Неорганическую соль, например, выбирают из группы, состоящей из солей щелочных или щелочноземельных металлов сульфатов, нитратов, фосфатов, карбонатов, галогенидов, боратов, силикатов и т.п. Если должен быть предоставлен фармацевтически приемлемый продукт, неорганическая соль, а также органическая соль должны быть выбраны из группы фармацевтически

приемлемых солей, известных *per se*. Например, фармацевтически приемлемые неорганические соли выбирают из солей натрия, таких как галогениды натрия, предпочтительно хлорид натрия, сульфат натрия, борат натрия; из солей кальция, таких как галогениды кальция, предпочтительно хлорид кальция, сульфат кальция, борат кальция; из солей магния, таких как галогениды магния, предпочтительно хлорид магния, сульфат магния, борат магния и их комбинаций, а также других фармацевтически приемлемых неорганических солей.

[00103] Предпочтительные соли включают, но не ограничиваются ими, NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl, сульфат NH_4, ацетат NH_4 или бикарбонат NH_4. В наиболее предпочтительном варианте используют раствор соли NaCl. Солевой раствор может содержать буфер и предпочтительно буфер с pH от приблизительно 5 до приблизительно 9, желательно от приблизительно 6,5 до приблизительно 8,5. Для сульфата декстрана также может быть целесообразно добавить высококонцентрированный раствор сульфата декстрана, имеющий небольшой объем, тогда как в других случаях может быть желательным добавить больший объем раствора сульфата декстрана, имеющего более низкую концентрацию. Требуемая концентрация может быть легко определена квалифицированным специалистом, как это было объяснено ранее.

[00104] Аналогичным образом, в альтернативном втором варианте аргинин можно использовать в качестве высвобождающего вирус агента. Так, в одном варианте воплощения высвобождающий вирус агент представляет собой раствор, содержащий аргинин. Предпочтительно, концентрация аргинина в растворе или ионная сила раствора составляет по меньшей мере приблизительно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или по крайней мере приблизительно 0,5 М. Также предполагается использование других аминокислот и их соответствующих солей, и в одном аспекте аминокислоты могут быть использованы в качестве высвобождающего вирус агента, предпочтительно полярные аминокислоты, более предпочтительно основные или кислые аминокислоты. Наиболее предпочтительные аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, гистидин, лизин или тирозин. Предпочтительно, концентрация аминокислот в растворе или ионная сила раствора составляет по

крайней мере приблизительно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или по крайней мере приблизительно 0,5 М.

[00105] В другом варианте воплощения можно комбинировать как первый, так и второй альтернативный вариант, т.е. сбор рабдовируса получают из культуры клеток путем добавления высвобождающего вирус агента и, в частности, соли или сульфата декстрана, непосредственно в культуру клеток с последующей глубинной фильтрацией культуры клеток и последующей промывкой глубинного фильтра высвобождающим вирус агентом (предпочтительно солевым раствором или сульфатом декстрана).

[00106] Необязательно, в некоторых случаях может быть необходимо уменьшить количество или удалить высвобождающий вирус агент из полученного сбора рабдовируса, чтобы не мешать последующим этапам способа/процесса или лекарственному веществу. Например, может быть так, что концентрация соли мешает последующим этапам захвата, этапам деградации ДНК или концентрация соли может повредить или сделать неактивным рабдовирус при инкубации в течение более длительных периодов времени. Снижение концентрации солей может быть достигнуто предпочтительно путем разбавления, диафильтрации и/или диализа. В любом случае в каждом из этих способов концентрация соли снижается, а собранный рабдовирус с пониженной концентрацией соли затем подвергают дальнейшей обработке в соответствии со способом или процессом согласно изобретению. В равной степени можно применять и другие способы, известные специалисту в данной области, которые подходят для снижения концентрации соли в собранном рабдовирусе.

[00107] Кроме того, необязательно, в некоторых случаях может быть желательно обработать сбор рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, такой как бензоназа. В предпочтительном варианте воплощения нуклеаза, расщепляющая ДНК, представляет собой активируемую солью нуклеазу, такую как SAN-HQ.

[00108] Сбор рабдовирусов, который выделяют после этапа осветления, затем подвергают дополнительному этапу очистки путем загрузки указанного сбора на катионообменник. Этот сбор можно загружать на катионообменник сразу после этапа осветления. В некоторых случаях восстановленный сбор хранят некоторое время, например, в течение ночи, а затем на следующий день наносят на катионообменник. В одном варианте воплощения материал

катионообменника представляет собой монолит, смолу, волокно или мембрану. В предпочтительном варианте воплощения катионообменник представляет собой монолитный адсорбер. Было обнаружено, что при использовании катионообменника улавливание рабдовируса было намного более эффективным по сравнению, например, с использованием анионного обмена. Предпочтительно, этот этап улавливания и очистки выполняют с помощью монолитной катионообменной хроматографии в режиме связывание/элюирование.

[00109] В одном аспекте вышеупомянутый этап очистки также служит цели концентрирования сбора рабдовируса. В этом отношении сбор (осветленного) вируса (измеряемый в $TCID_{50}$/мл) концентрируют по крайней мере примерно в 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз. Предпочтительно, вирус концентрируют (измеряя в $TCID_{50}$/мл) по крайней мере приблизительно в 10 раз, предпочтительно, по крайней мере, приблизительно в 25 раз, предпочтительно, по крайней мере, приблизительно в 50 раз, предпочтительно, по крайней мере, приблизительно в 75 раз и более предпочтительно, по крайней мере, приблизительно в 100 раз. Например, концентрирование 10 л раствора вируса с концентрацией 1×10^{9} $TCID_{50}$/мл в 10 раз приведет к получению 1 л раствора вируса с концентрацией 1×10^{10} $TCID_{50}$/мл вируса.

[00110] Буферы, выбранные для нанесения сбора рабдовирусов на катионообменник, обычно хорошо известны специалистам в данной области. Подбирают такие условия, которые приведут к максимальному связыванию рабдовируса с катионообменником. Предпочтительно, сбор перед нанесением на катионообменник разбавляют кондиционирующим буфером. В одном варианте воплощения кондиционирующий буфер содержит Трис-буфер, более предпочтительно кондиционирующий буфер содержит 100 мМ Трис-буфера, доведенного до pH 7,5 с помощью HCl. Предпочтительно, сбор и кондиционирующий буфер разводят в соотношении по меньшей мере 1:1 или по меньшей мере 1:2 перед нанесением на катионообменник.

[00111] Захваченный рабдовирус затем элюируют из катионообменника. Элюирование обычно осуществляется путем нанесения на катионообменник элюирующих буферов с линейно возрастающей концентрацией солей или с

использованием одноэтапного процесса элюирования. В предпочтительном варианте воплощения буфер для элюирования дополнительно содержит аргинин.

[00112] Очищенный таким образом элюат затем собирают и объединяют. Этот элюат рабдовируса уже является высокоочищенным, но в зависимости от предполагаемого дальнейшего использования элюата рабдовируса, с элюатом рабдовируса можно выполнить один или несколько из следующих необязательных этапов обработки:

[00113] (i) Тонкая очистка элюата рабдовируса для удаления дополнительных примесей происходит предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком.

[00114] В предпочтительном варианте воплощения этап тонкой очистки основан на смешанной эксклюзионной фильтрации на микрочастицах и анионообменной хроматографии на основе гранул (Capto™ Core) в проточном режиме, например, с приблизительным эксклюзионным пределом 700 кДа.

[00115] (ii) Замена буфера элюата рабдовируса или тонко очищенного рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа.

[00116] В предпочтительном варианте воплощения замену буфера проводят с использованием ультра-/диафильтрации с последующей фильтрацией бионагрузки, в результате чего получают лекарственное вещество.

[00117] (iii) Стерильная фильтрация рабдовируса.

Фармацевтические композиции

[00118] Для применения в терапии рабдовирус, полученный, продуцированный и/или очищенный в соответствии со способом или процессом согласно изобретению, рецептируют в фармацевтические композиции, подходящие для содействия введению животным и человеку. Типичные рецептуры приготавливают путем смешивания этого рабдовируса с физиологически приемлемыми носителями, формообразователями или стабилизаторами в виде водных растворов или водных или неводных суспензий. Носители, формообразователи, модификаторы или стабилизаторы нетоксичны в применяемых дозах и концентрациях. Они включают буферные системы, такие как фосфат, цитрат, ацетат и другие неорганические или органические кислоты и их соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин;

консерванты, такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол; белки, такие как альбумин сыворотки, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль (PEG); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды, олигосахариды или полисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу, декстрины или декстраны; хелатообразователи, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы ZN-белок); и/или ионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™ (полисорбаты), PLURONICS™ или эфиры жирных кислот, эфиры жирных кислот или эфиры сахаров. Формообразователи могут также выполнять модифицирующую высвобождение или модифицирующую абсорбцию функцию.

[00119] В одном варианте воплощения рабдовирус рецептируют в фармацевтическую композицию, которая включает Tris, аргинин и необязательно цитрат. Tris в оптимальном варианте применяют в концентрации от примерно 1 до примерно 100 мМ. Аргинин в оптимальном варианте применяют в концентрации от примерно 1 до примерно 100 мМ. Цитрат может находиться в концентрации до 100 мМ. Оптимальная рецептура включает примерно 50 мМ Tris и 50 мМ аргинина.

[00120] Фармацевтическая композиция может быть предусмотрена в форме жидкости, замороженной жидкости или в лиофилизированной форме. Замороженную жидкость хранят при температурах от приблизительно 0 °C до приблизительно -85 °C, включая температуры от -70 °C до -85 °C и приблизительно -15 °C, -16 °C, -17 °C, -18 °C, -19 °C, -20 °C, -21 °C, -22 °C, -23 °C, -24 °C или приблизительно -25 °C.

[00121] Рабдовирус или фармацевтическую композицию необязательно рецептируют с одним или несколькими агентами, которые в настоящее время применяют для профилактики или лечения данного нарушения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества рекомбинантного антитела, присутствующего в рецептуре, типа нарушения или их лечения и

других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно применяют в таких же дозах и вводят такими путями, которые описаны авторами, или в количестве, которое составляет примерно от 1 до 99% описанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и любым путем, который эмпирически / клинически определен как надлежащий.

[00122] Для профилактики или лечения заболевания надлежащая доза рабдовируса или фармацевтической композиции (при применении отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами) зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, типа рабдовируса, тяжести и протекания заболевания, от того, вводят ли рабдовирус с профилактической или терапевтической целью, от предварительной терапии, от истории болезни пациента и его ответа на рабдовирус и от мнения врача. Рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению соответствующим образом вводят пациенту за один раз или последовательно курсом лечения.

[00123] В зависимости от типа и тяжести заболевания, примерно от 10^8 до 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по $TCID_{50}$ рабдовируса, могут быть начальной подходящей дозой для введения пациенту, например, один или несколько отдельных раз или путем непрерывной инфузии. Для многократного введения в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение в целом должно быть длительным до выявления желаемого угнетения симптомов болезни. Типичная доза рабдовируса должна составлять от примерно 10^8 до 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по $TCID_{50}$. Таким образом, пациенту вводят одну или несколько доз приблизительно 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12} или 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по $TCID_{50}$ (или их любой комбинации). Такие дозы вводят периодически, например, раз в неделю или раз в три недели (например, таким чином, чтобы пациент получил от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шесть доз рекомбинантного рабдовируса). Возможным является введение начальной высшей насыщающей дозы с последующими одной или несколькими более низкими дозами, или наоборот. Однако возможно и применение других режимов дозировки. Прогресс этой терапии легко отслеживается с помощью традиционных технологий и анализов.

[00124] Эффективность рабдовируса и композиций, которые их включают, испытывают, применяя любой подходящий *in vitro* анализ, анализ на основе клеток, *in vivo* анализ и/или животную модель, которая известна сама по себе, или любой их комбинацию в зависимости от конкретного заболевания. Подходящие анализы и животные модели станут понятны специалисту в данной области и включают, например, анализы и животные модели, применяемые в приведенных ниже Примерах.

[00125] Конечно, фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза зависит от факторов, известных специалистам в данной области, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. В любом случае рабдовирус вводят в дозах и способах, позволяющих доставлять фармацевтически эффективное количество в зависимости от уникального состояния пациента.

[00126] В альтернативном варианте рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению доставляют в объёме от приблизительно 50 мкл до приблизительно 100 мл, включая все значения в рамках этого диапазона, в зависимости от размера участка, который подвергают лечению, применяемого вирусного титра, пути введения и желаемого эффекта способа.

[00127] Для внутриопухолевого введения объём в оптимальном варианте составляет от приблизительно 50 мкл до приблизительно 5 мл, включая значения приблизительно 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 400 мкл, 500 мкл, 600 мкл, 700 мкл, 800 мкл, 900 мкл, 1000мкл, 1100 мкл, 1200 мкл, 1300 мкл, 1400 мкл, 1500 мкл, 1600 мкл, 1700 мкл, 1800 мкл, 1900 мкл, 2000 мкл, 2500 мкл, 3000 мкл, 3500 мкл, 4000 мкл или приблизительно 4500 мкл. В оптимальном варианте воплощения объём составляет приблизительно 1000 мкл.

[00128] Естественно, для системного введения, например, путем инфузии рабдовируса, объемы могут быть больше. В альтернативном варианте возможно растворение концентрированного раствора рабдовируса в большем объеме раствора для инфузии непосредственно перед инфузией.

[00129] В частности, для внутривенного введения объём в оптимальном варианте составляет от 1 мл до 100 мл, включая объёмы приблизительно 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, 50 мл, 55 мл, 60 мл, 70 мл, 75 мл, 80 мл, 85 мл, 90 мл, 95 мл или приблизительно 100 мл. В

оптимальном варианте воплощения объём составляет от приблизительно 5 мл до 15 мл, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, объём составляет приблизительно 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл или приблизительно 14 мл.

[00130] В оптимальном варианте одну и ту же рецептуру применяют для внутриопухолевого введения и внутривенного введения. Соотношение дозы и/или объема между внутриопухолевым введением и внутривенным введением может составлять примерно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1 :9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19 или приблизительно 1:20. Например, соотношение дозы и/или объема 1:1 означает, что одинаковые дозы и/или объемы вводят внутриопухолево и внутривенно, тогда как, например, соотношение дозы и/или объема приблизительно 1:20 означает, что для внутривенного введения доза и/или объем в двадцать раз выше дозы и/или объема для внутриопухолевого введения. В оптимальном варианте соотношение дозы и/или объема между внутриопухолевым введением и внутривенным введением составляет приблизительно 1:9.

[00131] Эффективная концентрация рабдовируса в оптимальном варианте составляет от приблизительно 10^8 до 10^{14} векторных геномов на миллилитр (вг/мл). Инфекционные дозы измеряют, як описано в публикации McLaughlin et al., J Virol.; 62(6): 1963 - 73 (1988). В оптимальном варианте концентрация составляет от приблизительно 1,5 x 10^9 до приблизительно 1,5 x 10^{13}, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, от приблизительно 1,5 x 10^9 до приблизительно 1,5 x 10^{11}. В одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^9. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{10}. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{11}. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{12}. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{13}. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{14}. Предпочтительным может быть применение самой низкой эффективной концентрации с целью снижения риска нежелательных эффектов. Врачом могут быть выбраны и другие дозы в этих пределах с учетом физического состояния субъекта, в оптимальном варианте поддающегося

лечению человека, возраста субъекта, конкретного типа рака и степени, до которой развился рак в случае его прогрессирования.

[00132] Эффективную целевую концентрацию рабдовируса выражают через $TCID_{50}$. $TCID_{50}$ определяют, например, применяя способ Спирмана-Кербера. Оптимальные диапазоны охватывают эффективную целевую концентрацию от 1 x 10^8/мл до 1 x 10^{14}/мл $TCID_{50}$. В оптимальном варианте эффективная целевая концентрация составляет от приблизительно 1 x 10^9 до приблизительно 1 x 10^{12}/мл, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, от приблизительно 1 x 10^9 до приблизительно 1 x 10^{11}/мл. В одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1 x 10^{10}/мл. В оптимальном варианте воплощения целевая концентрация составляет 5 x 10^{10}/мл. В ещё одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{11}/мл. В одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1 x 10^{12}/мл. В ещё одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1,5 x 10^{13}/мл.

[00133] Эффективную целевую дозу рабдовируса также выражают через $TCID_{50}$. В оптимальном варианте диапазоны охватывают целевую дозу от 1 x 10^8 до 1 x 10^{14} $TCID_{50}$. В оптимальном варианте целевая доза составляет от приблизительно 1 x 10^9 до приблизительно 1 x 10^{13}, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, от приблизительно 1 x 10^9 до приблизительно 1 x 10^{12}. В одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1 x 10^{10}. В оптимальном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1 x 10^{11}. В одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1 x 10^{12}. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1 x 10^{13}.

[00134] Фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза, конечно, будет зависеть от факторов, известных специалистам в данной области, таких как возраст и вес пациента, способ введения и тяжесть заболевания. В любом случае рабдовирус будет вводиться в дозах и таким образом, которые позволяют доставлять фармацевтически эффективное количество в зависимости от индивидуального состояния пациента.

[00135] Как правило, для лечения и/или облегчения заболеваний, нарушений и состояний, упомянутых в настоящем документе, и в зависимости от конкретного заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, активности конкретного рабдовируса, конкретного пути введения и конкретного фармацевтического состава или композиции, рабдовирус обычно вводят, например, в дозах, подходящих для введения два раза в неделю, еженедельно или ежемесячно, но они могут значительно варьироваться, особенно в зависимости от ранее упомянутых параметров. Таким образом, в некоторых случаях может быть достаточно использовать меньшую дозу, чем указанная выше минимальная доза, тогда как в других случаях может потребоваться превышение верхнего предела. При введении больших количеств может быть целесообразно разделить их на несколько меньших доз, распределенных в течение дня.

[00136] Понятно, что специалист в данной области техники может выбирать и комбинировать различные альтернативные варианты в рамках способа или процесса согласно изобретению без чрезмерной нагрузки. Например, квалифицированный специалист может свободно выполнять необязательные этапы процесса по мере необходимости и комбинировать их в различных установках, например, с разными клетками-хозяевами, конкретными рабдовирусами или конкретными способами осветления клеточной культуры. В нижеследующем описаны некоторые предпочтительные варианты воплощения, однако способ и процесс согласно изобретению не должны толковаться как ограниченные этими вариантами воплощения.

[00137] В одном варианте воплощения способ или процесс согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита, более предпочтительно вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) в клеточной культуре/от клеточной культуры и включает следующие этапы:

(i) получение сбора вируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно

с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, и извлечения сбора вируса в супернатант.

[00138] В другом варианте воплощения способ или процесс согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита, более предпочтительно вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в клеточной культуре/от клеточной культуры и включает следующие этапы:

(i) получение сбора вируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента, где высвобождающий вирус агент представляет собой твердую соль или водный раствор соли, с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, где высвобождающий вирус агент представляет собой водный раствор соли, и извлечения сбора вируса в супернатант.

[00139] В другом варианте воплощения способ или процесс согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита, более предпочтительно вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в клеточной культуре/от клеточной культуры и включает следующие этапы:

(i) получение сбора вируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента, где высвобождающий вирус агент представляет собой твердую соль или водный раствор соли, и концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают, с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и выделения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, где высвобождающий вирус агент представляет собой водный раствор соли, и выделения сбора вируса в супернатант.

[00140] В другом варианте воплощения способ или процесс согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита, более предпочтительно вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в клеточной культуре/от клеточной культуры и включает следующие этапы:

(i) получение сбора вируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента, где высвобождающий вирус агент представляет собой твердую соль или водный раствор соли, и концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают по крайней мере приблизительно на 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М, с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и выделения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации, с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, где высвобождающий

вирус агент представляет собой водный раствор соли, имеющий концентрацию по меньшей мере примерно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М, и выделения сбора вируса в супернатант.

[00141] В другом варианте воплощения способ или процесс согласно изобретению позволяет получать, продуцировать и/или очищать везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита, более предпочтительно вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в клеточной культуре/от клеточной культуры, и включает следующие этапы:

(i) получение сбора вируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента, где высвобождающий вирус агент представляет собой твердую соль или водный раствор соли, и концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,25 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,3 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,35 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,4 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,45 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,5 М до приблизительно 5 М, с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, где высвобождающий вирус агент представляет собой водный раствор соли, имеющий концентрацию от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,25 М до приблизительно 5 М, от

приблизительно 0,3 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,35 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,4 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,45 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,5 М до приблизительно 5 М, и извлечения сбора вируса в супернатант.

[00142] В дополнительном предпочтительном варианте воплощения любой из указанных выше вариантов воплощения может дополнительно включать такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) (необязательно) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник, предпочтительно монолит, смолу или мембрану, более предпочтительно монолитный адсорбер,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) (необязательно) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

[00143] В дополнительном родственном варианте воплощения любой из указанных выше вариантов воплощения может дополнительно включать такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник, предпочтительно монолит, смолу или мембрану, более предпочтительно монолитный адсорбер,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) (необязательно) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

[00144] В дополнительном родственном варианте воплощения любой из указанных выше вариантов воплощения может дополнительно включать такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник, предпочтительно монолит, смолу или мембрану, более предпочтительно монолитный адсорбер,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

[00145] В дополнительном родственном варианте воплощения любой из указанных выше вариантов воплощения может дополнительно включать такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник, предпочтительно монолит, смолу или мембрану, более предпочтительно монолитный адсорбер,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

[00146] В дополнительном родственном варианте воплощения любой из указанных выше вариантов воплощения может дополнительно включать такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник, предпочтительно монолит, смолу или мембрану, более предпочтительно монолитный адсорбер,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) стерильная фильтрация рабдовируса.

[00147] В дополнительном родственном варианте воплощения, любой из указанных выше вариантов воплощения может дополнительно включать такие этапы:

(ii) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник, предпочтительно монолит, смолу или мембрану, более предпочтительно монолитный адсорбер,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) стерильная фильтрация рабдовируса.

[00148] Кроме того, в связи с любым из вышеизложенных конкретных вариантов осуществления изобретения предпочтительно получать, продуцировать или очищать везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита, более предпочтительно вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в клеточной культуре/от клеточной культуры, содержащей клетку-хозяина млекопитающего, предпочтительно клетку-хозяина млекопитающего, культивируемую в суспензии, и более предпочтительно клетку HEK293.

[00149] В предпочтительном варианте воплощения, относящемся к любому из вышеуказанных конкретных вариантов воплощения, РНК-геном вируса везикулярного стоматита состоит из кодирующей последовательности, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 12.

Примеры

[00150] Пример 1: Предварительный процесс производства лекарственного вещества

[00151] Обзор и определение партии

[00152] Из одного размороженного флакона с клетками HEK293 (UPS01) клетки размножали и культивировали во встряхиваемых колбах большей емкости (UPS02-UPS06). После UPS06 был засеян первый биореактор (UPS07) с последующим культивированием и размножением клеток в биореакторе для выращивания вторичного посевного материала (UPS08) и, наконец, в производственном биореакторе (UPS09). Одну партию необработанного сбора, содержащую лекарственное вещество, получали в периодическом режиме путем инфицирования клеток через 48 или 56 часов после посева в производственном биореакторе (UPS10). На момент инфицирования температуру культивирования либо поддерживали постоянной (вариант процесса 1, 48 ч), либо снижали с 37,0°C до 34,0°C (вариант процесса 2, 56 ч). Инфицирование проводили с помощью VSV-GP (где гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен на гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)) или VSV-GP-карго, т.е. VSG-GP, кодирующий дальнейший трансген, в частности, укороченный белок CCL21 (1-79) или слитый белок CD80-Fc. Далее все процессы проводили с VSV-GP, а также с различными вариантами VSV-GP-карго (CCL21 (1-79) и слитый белок CD80-Fc) и для простоты чтения будут обозначаться одним термином VSV-GP(-карго). Сбор происходил через 34 ± 2 часа после инокуляции (UPS11). Впоследствии весь рабочий объем примерно 200 л подвергали последующей обработке.

[00153] UPS01 – Оттаивание клеток

[00154] Клетки HEK293 из одного флакона основного банка клеток (MCB) или рабочего банка клеток (WCB) оттаивали в нагревательном блоке и адаптировали к среде культивирования. После стадии центрифугирования полученный клеточный осадок ресуспендировали в среде и инкубировали во встряхиваемой колбе на 125 мл.

[00155] UPS02 – UPS06 - Размножение клеток во встряхиваемых колбах

[00156] Клетки HEK293 размножали в течение пяти стадий субкультивирования во встряхиваемых колбах. Следующую стадию начинали, когда были достигнуты критерии инокуляции. Здесь для каждой новой стадии

субкультивирования использовалась следующая более вместительная колба для встряхивания. Если максимальный объем культуры превышался, оставшиеся клетки отбрасывали. Для UPS07 было использовано столько колб для встряхивания на 2000 мл, сколько было необходимо/требуется для соответствия критериям инокуляции в биореакторе с волновым смешиванием.

[00157] UPS07 - Размножение клеток в (первом посевном) биореакторе (необязательно)

[00158] Последнее субкультивирование во встряхиваемой колбе (UPS06) использовали для инокуляции первого посевного биореактора для дальнейшего размножения клеток в периодическом режиме. Волновой биореактор или реактор с мешалкой подходят для размножения клеток. До и во время инокуляции значение pH контролировали добавлением CO_2 в свободное пространство биореактора. В течение всего культивирования проводили аэрацию свободного пространства воздухом. Количество растворенного кислорода контролировали путем подачи воздуха и кислорода с помощью усовершенствованного контроллера в режиме каскадного регулирования. Рассчитывали объем инокулята, а также объем среды, который необходимо было добавить, в зависимости от концентрации жизнеспособных клеток в конце UPS06. Биореактор заполняли рассчитанным объемом среды. Среду кондиционировали внутри биореактора без аэрации и контроля pH не менее 2 часов. Непосредственно перед инокуляцией начинали аэрацию и среду выдерживали в биореакторе с активным контролем pH. Общее время кондиционирования не должно превышать 24 ч. Как только условия, необходимые для инокуляции биореактора, были соблюдены, клеточную суспензию переносили в биореактор с помощью откачивания. Если клеточная суспензия не полностью используется во время инокуляции, оставшиеся клетки выбрасываются.

[00159] UPS08 - Размножение клеток в биореакторе для выращивания посевного материала

[00160] Для культивирования использовали одноразовый биореактор с мешалкой объемом 50 л. До и во время инокуляции значение pH контролировали добавлением CO_2 через барботер и свободное пространство над биореактором. После инокуляции активировали контроль pH нижней стороны путем добавления основания.

[00161] В качестве альтернативного варианта для культивирования использовали стеклянный биореактор. До и во время инокуляции значение pH контролировали добавлением CO_2 через барботер и свободное пространство над биореактором. После инокуляции активировали контроль pH нижней стороны путем добавления основания. В течение всего культивирования проводили аэрацию свободного пространства воздухом. Процент растворенного кислорода (DO) контролировали подачей кислорода под водой и регулировали усовершенствованным контроллером.

[00162] Для посева определяли концентрацию жизнеспособных клеток в клеточной суспензии, содержащейся в биореакторе с волновым смешиванием. В соответствии с требуемой концентрацией клеток в биореакторе рассчитывали объем инокулята, а также объем среды, который необходимо добавить. Биореактор заполняли рассчитанным объемом среды. Среду кондиционировали внутри биореактора для выращивания посевного материала без аэрации и контроля pH не менее 2 часов. Во время инокуляции клеток начинали аэрацию и среду поддерживали в биореакторе для выращивания посевного материала с активным контролем pH. Общее время кондиционирования не должно превышать 24 ч. Как только условия, необходимые для инокуляции биореактора, были соблюдены, клеточную суспензию переносили в биореактор с помощью откачивания. Если клеточная суспензия не полностью используется во время инокуляции, оставшиеся клетки выбрасываются.

[00163] Стратегия против пенообразования (необязательно): для предотвращения образования пены во время культивирования в культуру можно добавить пеногаситель с использованием зависимого от времени профиля накачивания, который начинают сразу после инокуляции. Следовательно, пеногаситель будет дозироваться непосредственно в клеточную суспензию каждые шесть часов, и каждый раз насос будет работать в течение одной секунды. Добавленный объем пеногасителя фиксируют системой управления технологическим процессом.

[00164] UPS09 - Размножение клеток в производственном биореакторе

[00165] Для производства использовали одноразовый биореактор с мешалкой объемом 200 л. До и во время инокуляции значение pH контролировали добавлением CO_2 через барботер и свободное пространство. После инокуляции активировали контроль pH нижней стороны путем

добавления основания. В течение всего культивирования проводили аэрацию свободного пространства воздухом. Процент растворенного кислорода будет контролироваться подачей кислорода под водой и регулироваться модулем смешивания четырех газов с использованием усовершенствованного контроллера.

[00166] Для посева определяли концентрацию жизнеспособных клеток в клеточной суспензии, содержащейся в биореакторе для выращивания посевного материала. В соответствии с требуемой концентрацией клеток в биореакторе рассчитывали объем инокулята, а также объем среды, который необходимо добавить. Биореактор заполняли рассчитанным объемом среды. Среду кондиционировали внутри производственного биореактора без аэрации и контроля pH не менее 2 часов. Непосредственно перед инокуляцией начинали аэрацию и среду выдерживали в посевном биореакторе с активным pH контролем. Общее время кондиционирования не должно превышать 24 ч. Как только условия, необходимые для инокуляции биореактора, были соблюдены, клеточную суспензию переносили в биореактор с помощью откачивания. Если клеточная суспензия не полностью используется во время инокуляции, оставшиеся клетки выбрасывают. Чтобы предотвратить образование пены во время культивирования, в культуру можно добавить пеногаситель с использованием зависимого от времени профиля накачивания, который начинался сразу после инокуляции. Следовательно, пеногаситель будет дозироваться непосредственно в клеточную суспензию каждые шесть часов, и каждый раз насос будет работать в течение одной секунды. Добавленный объем пеногасителя фиксируют системой управления технологическим процессом.

[00167] UPS10 – Вариант инфицирования вирусом I

[00168] Инфицирование VSV-GP(-карго) проводили через 48 ч после инокуляции клеток на стадии производственного биореактора, что приводило к концентрации жизнеспособных клеток от $1{,}0\times10^6$ до $2{,}0\times10^6$ клеток/мл во время инфицирования. Вирус предварительно разбавляли кондиционированной средой для культивирования клеток. После выполнения критериев инфицирования производственного биореактора, контрольные клетки высевали в две встряхиваемые колбы на 250 мл с клеточной суспензией, взятой из производственного биореактора. Встряхиваемые колбы инкубировали до тех пор, пока не проводили сбор из производственного биореактора, и с

контрольными клетками проводили те же операции, что и с клетками производственного цикла. Во время инфицирования температура культивирования в производственном биореакторе будет постоянной в диапазоне от 36,0 °C до 39,0 °C.

[00169] UPS10 – Вариант инфицирования вирусом II

[00170] Инфицирование VSV-GP(-карго) проводили через 56 ч после инокуляции клеток на последней стадии реактора, что приводило к получению концентрации жизнеспособных клеток от $1,0\times10^6$ до $2,0\times10^6$ клеток/мл во время инфицирования. Вирус предварительно разбавляли кондиционированной средой для культивирования клеток. После выполнения критериев инфицирования производственного биореактора, контрольные клетки высевали в две встряхиваемые колбы на 250 мл с клеточной суспензией, взятой из производственного биореактора. Встряхиваемые колбы инкубировали до тех пор, пока не проводили сбор из производственного биореактора, и с контрольными клетками проводили те же операции, что и с клетками производственного цикла. Во время инфицирования температуру культивирования в производственном биореакторе снижали с 37,0 °C до 34,0 °C. В случае чрезмерного пенообразования во время инфицирования можно добавить пеногаситель непосредственно в биореактор, чтобы предотвратить засорение, например, трубок аэрации. Добавленный объем пеногасителя фиксируют системой управления технологическим процессом.

[00171] UPS11 – Сбор

[00172] Сбор проводили через 34 ± 2 часа после инфицирования. Процедура сбора начиналась с добавления 4 - 5 М исходного раствора NaCl к бульону инфицированных клеток, что приводило к увеличению концентрации примерно на 0,2 М NaCl с последующим периодом инкубации от 10 до 30 минут перед началом переноса и разделения клеток. Все параметры контролировали, как при культивировании, если не указано иное. После определенного времени инкубации контроль температуры, растворенного кислорода (DO) и pH контроль отключали. После этого инфицированный клеточный бульон переносили на последующую обработку.

[00173] Данные о производительности процесса

[00174] Типичные результаты мониторинга процесса и аналитического контроля в процессе производства сбора VSV-GP-CCL21 (1-79), полученного с

помощью описанного процесса, обобщены ниже. Характеристики процесса между различными вариантами VSV-GP(-карго) (без карго, CCL21 (1-79) или слитый белок CD80-Fc) были сопоставимы.

- максимальная клеточно-специфическая скорость роста $\mu \neg = 0{,}7\ d^{-1}$ в производственном биореакторе;
- общая концентрация клеток 2-3 x 10^6 клеток на миллилитр сбора с жизнеспособностью >90%;
- содержание инфекционного вируса в конечном супернатанте клеточной культуры около 2 x 10^9 $TCID_{50}$/мл, содержание вирусных геномов в супернатанте клеточной культуры около 3 – 3,5 x 10^{10} $TCID_{50}$/mL.

[00175] Пример 2: Последующий процесс производства лекарственного вещества

[00176] Обзор и определение партии

[00177] Производство VSV-GP-(карго) было основано на производстве одной партии. Все последующие типовые операции выполнялись в одном цикле без каких-либо этапов разделения и объединения. Обработанный солью сбор (UPS11) очищали путем глубинной фильтрации или микрофильтрации с тангенциальным потоком с последующим этапом расщепления нуклеазой. Осветленный сбор дополнительно разбавляли перед очисткой с помощью монолитной катионообменной хроматографии в режиме связывания-элюирования (DPS03). В этот момент выполняли этап выдержки, когда промежуточное соединение хранили в течение ночи. На второй день последующего процесса промежуточное соединение очищали мультимодальной хроматографией в проточном режиме (DPS04). Поток собирали и обрабатывали на этапе ультра-/диафильтрации (DPS05). На заключительном этапе фильтрации и этапе рецептирования (DPS06) была получена одна партия, которую разделили на аликвоты во флаконы для клеточных культур, упаковали и заморозили при -80°C (-86°C - -70°C).

[00178] Вариант сбора I – Глубинная фильтрация

[00179] Этап глубинной фильтрации проводили для осветления основного сбора. Поэтому VSV-GP(-карго), содержащий неочищенный сбор, перекачивали из биореактора STR® 200 через капсулы глубинной фильтрации с инкапсулированной системой 3M™ Zeta Plus™ в одноразовый пакет. Максимальное давление составляло 0,9 бар. Осветление проводили при

комнатной температуре. Капсулы глубинной фильтрации с инкапсулированной системой 3M™ Zeta Plus™ были продезинфицированы 0,5 М раствором NaOH для утилизации.

[00180] Вариант сбора II – микрофильтрация с тангенциальным потоком

[00181] Этап микрофильтрации с тангенциальным потоком проводили для осветления основного сбора. Поэтому одноразовый биореактор соединяли с модулем микрофильтрации, оснащенным мембраной из полых волокон mPES размером 0,65 мкм с эффективной длиной 41,5 см и внутренним диаметром волокна 0,75 мм. Фильтрацию проводили при постоянной скорости потока ретентата со скоростью сдвига 2100 $с^{-1}$ и максимальным трансмембранным давлением ≤ 0,7 бар. Микрофильтрацию проводили до повышения давления на входе до ≥ 0,7 бар. Ожидалось, что в сосуде биореактора останется 2-5 литров концентрированной клеточной суспензии. Фильтрат собирали в одноразовый пакет на 500 л. Температуру и pH поддерживали на уровне 37°C, pH 7,1 до тех пор, пока зонды не переставали контактировать со сбором.

[00182] DPS02 – Ферментативное расщепление

[00183] Этап процесса DPS02 представляет собой ферментативное расщепление фильтрата из DPS01, осуществляемое эндонуклеазой SAN-HQ (ArcticZymes®). Внутри ламинарного потока в отделении USP исходный раствор эндонуклеазы SAN-HQ уравновешивали до комнатной температуры и разводили в буфере (50 мМ трис, pH 7,5) в отдельном одноразовом пакете. В качестве кофактора фермента добавляли хлорид магния. Буфер для расщепления последовательно добавляли к промежуточному продукту (осветленному сбору). Полученный промежуточный продукт перемешивали в течение > 10 мин и инкубировали в течение > 20 мин при комнатной температуре. После обработки нуклеазой промежуточное соединение разбавляли в соотношении 1:2 с помощью 0,1 М трис-буфера до определенного значения pH и электропроводности. Целью стадии ферментативного расщепления является удаление нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), присутствующих в суспензии.

[00184] Стратегия снижения бионагрузки на уровне осветленного сбора – вариант I

[00185] Для снижения предполагаемого загрязнения бионагрузкой в процессе сбора продукта проводили фильтрацию для уменьшения бионагрузки с использованием 0,45 мкм / 0,2 мкм Sartopore® 2 MaxiCaps® размер 1 (фильтры

были соединены последовательно). Фильтр можно подключить последовательно к глубинному фильтру или к порту фильтрата системы микрофильтрации. Фильтр заменяли, если трансмембранное давление составляло ≥ 0,9 бар. После фильтрации фильтр 0,45 мкм/0,2 мкм Sartopore® 2 MaxiCaps® размера 1 удаляли из агрегата и проверяли на целостность.

[00186] Стратегия снижения бионагрузки на уровне осветленного сбора – вариант II

[00187] Для снижения предполагаемого загрязнения бионагрузкой в процессе сбора продукта проводили фильтрацию для уменьшения бионагрузки с использованием 5 мкм полипропиленового фильтра Kleenpak Nova 10" Profile II 0,5 мкм или 0,45 мкм / 0,2 мкм Sartopore® 2 MaxiCaps® размер 1. Фильтрацию проводили после обработки нуклеазой и после разбавления. Фильтр заменяли, если трансмембранное давление составляло ≥ 0,9 бар. После фильтрации фильтр извлекали из агрегата и проверяли на целостность.

[00188] DPS03 – Катионообменная хроматография

[00189] Этап процесса DPS03 представлял собой этап улавливания, осуществляемый с помощью катионообменной хроматографии на монолите CIMmultus™ SO_3. Буфер для связывания содержал 50 мМ трис, pH 7,5, необязательно, с добавлением аргинина в различных концентрациях. Хроматографию проводили в режиме связывания/элюирования с пошаговым элюированием. Очистку VSV-GP(-карго) проводили при комнатной температуре. Элюат собирали в один пакет. Загрузку проводили при скорости потока 5 или 10 CV/ч (где CV – объем колонки). Монолит промывали 10 CV или 50 CV и объемным потоком 5 CV/ч или 10 CV/ч. Элюирование проводили при скорости потока 120 CV/ч или 10 CV/ч. Собранный элюат хранили при 2-8°C в течение ночи. Целью этого этапа было концентрирование вируса и удаление примесей (в частности, остаточной ДНК клетки-хозяина и белков клетки-хозяина).

[00190] DPS04 – Мультимодальная эксклюзионная хроматография

[00191] Этап процесса DPS04 представлял собой технологический этап мультимодальной хроматографии, выполняемый на готовом градиенте ÄktaTM с ReadyToProcess™ Capto® Core 700 с высотой слоя 20 см и объемом слоя 2,5 л. Хроматографию проводили в проточном режиме. Смолу кондиционировали с использованием элюирующего буфера катионообменной хроматографии. Элюат захвата инкубировали не менее 30 минут при комнатной температуре перед

стадией тонкой очистки. Тонкую очистку VSV-GP(-карго) проводили при комнатной температуре и постоянной скорости 42 см/ч. Проток собирали в один пакет. Целью этапа было окончательное удаление второстепенных примесей (в частности, остатков нуклеаз, HCP).

[00192] DPS05 – Ультра/диафильтрация

[00193] Этап замены буфера проводили посредством двухэтапной диафильтрации. Здесь использовали модуль ультрафильтрации MiniKros® с полыми волокнами (Repligen) с отсечкой 750 кДа. На первом этапе проводили диафильтрацию постоянного объема, при этом начальный объем промежуточного продукта подвергали 6-кратной диафильтрации против диафильтрационного буфера при постоянной скорости поперечного потока, что приводило к максимальному напряжению сдвига 3000 $с^{-1}$. На этапе 2 диафильтрованный ретентат концентрировали до определенного объема ретентата при постоянной скорости поперечного потока, что приводило к максимальному напряжению сдвига 3000 $с^{-1}$. Концентрированное промежуточное соединение сливали в одноразовый пакет объемом 5 л. Целью этапа была замена матрицы на диафильтрационный буфер.

[00194] DPS06 – Наполнение и заморозка

[00195] Ретентат диафильтрации фильтровали через фильтр 0,45 мкм/0,2 мкм (Sartopore® MidiCaps®) и собирали в пакет или бутылку в виде суспензии. Окончательный первичный упаковочный материал асептически присоединяли к пакету/бутылке, заполняемой насосом. Затем бутылки вакуумировали и упаковывали в полиэтиленовую пленку. После этого суспензию замораживали и хранили при -80°C. Целью фильтра 0,2 мкм было окончательное снижение бионагрузки. Процедура замораживания позволяла сохранять условия хранения суспензии лекарственного вещества до дальнейшей переработки.

[00196] Данные о производительности процесса

[00197] Типичные результаты мониторинга процесса и аналитического контроля в процессе производства сбора VSV-GP(-карго) для производства лекарственного вещества с использованием описанного процесса с применением варианта I на любом этапе процесса обобщены в Таблице 1 и на Фигурах 2 и 3. Снижение содержания примесей соответствует высоким требованиям и стандартам для лекарственного средства против онколитических вирусов. Эффективность снижения содержания примесей от предварительного до

конечного лекарственного вещества соответствует логарифмическому значению снижения приблизительно 3,5 для белка клетки-хозяина (<0,4 мкг/мл) и 5,4 для ДНК клетки-хозяина (кхДНК) (конечная концентрация <3 нг/мл), что значительно ниже типичных пределов общих ограничений для примесей при разработке биологических препаратов (например, 10 нг кхДНК на дозу согласно рекомендациям ВОЗ). Общий выход позволяет получать достаточно высококонцентрированные дозы вируса даже для самых высоких требований.

[00198] Таблица 1: Пример содержания инфекционного VSV-GP(-карго) в операциях производственной единицы, извлечение рассчитано на основе $TCID_{50}$ исходного культурального супернатанта (центрифугированного, обработанного солью)

Промежуточный процесс	**Объем (л)**	**Содержание вируса ($TCID_{50}$/мл)**	**Общее извлечение (%)**
Культуральный супернатант	198,32	1,49E+09	100%
Осветленный сбор	205,10	1,26E+09	87%
Деградация ДНК	206,25	9,67E+08	67%
Захват (CEX)	0,84	2,41E+11	69%
Этап выдержки	0,84	1,98E+11	56%
Тонкая очистка (CC700)	1,36	1,10E+11	51%
Диафильтрация	1,22	4,90E+10	20%
Фильтрация бионагрузки	1,69	4,28E+10	24%

[00199] **Пример 3: Тестирование различных добавок перед сбором продукта**

[00200] ФИГ. 4

[00201] Низкие титры сбора VSV-GP наблюдались в супернатанте после осветления центрифугированием по сравнению с нецентрифугированным материалом сбора. Было высказано предположение, что VSV-GP взаимодействует и связывается с фрагментами мембран клетки-хозяина. Затем эти фрагменты со связанным VSV-GP осаждаются. Были предложены добавки для нарушения взаимодействия между фрагментами мембраны, позволяющие осаждать фрагменты мембраны и достаточно осветлять VSV-GP, оставшийся «свободным» в супернатанте. Осветленный материал сбора разделяли на аликвоты по 15 мл через 30 часов после инфицирования и добавляли добавки до конечных концентраций, показанных на ФИГ. 4. Образцы, содержащие NaCl,

$CaCl_2$, Tween, Pluronic, инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 355 g в течение 3 минут. Образцы, содержащие бензоназу и трипсин, инкубировали в течение 30 минут при 37°C и центрифугировали при 355 g в течение 3 минут. Образцы, содержащие сульфат декстрана, инкубировали в течение 18 ч в условиях культивирования и центрифугировали при 355 g в течение 3 минут. Затем супернатант тестировали с использованием $TCID_{50}$. Наибольшие извлечения наблюдались для двух концентраций NaCl (0,2 M и 1 M) и 100 мкг/мл сульфата декстрана, что указывает на то, что эти добавки успешно высвободили свободные вирусные частицы в супернатант. Другие добавки не показали значительного улучшения титра после центрифугирования.

[00202] Пример 4: Дальнейшее тестирование различных добавок и концентраций

[00203] ФИГ. 5

[00204] Дальнейшее тестирование добавок проводили для изучения того, можно ли улучшить титр VSV-GP во время сбора продукта с помощью альтернативных добавок. Добавки выбирали на основе того, как они взаимодействовали с вирусом: хлорид калия для тестирования другого одновалентного иона, глицин, который может увеличить растворимость и создать вытесняющее давление, и L-аргинин, который ослабляет гидрофобные взаимодействия и имеет заряды 2+/1- при нейтральном pH. Осветленный материал сбора делили на аликвоты - фракции по 15 мл через 30 часов после инфицирования и добавляли добавки до указанных конечных концентраций, инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 355 g в течение 3 минут. Затем супернатант тестировали с использованием $TCID_{50}$ и количественной ПЦР. Необработанный сырой сбор, который не подвергали центрифугированию, показал высокие титры инфекционного VSV-GP, взаимодействие VSV-GP с дебрисом клетки-хозяина не ингибировало способность VSV-GP заражать новые клетки, однако большое количество дебриса является загрязняющей примесью, которая, как широко известно, отрицательно влияет на производительность процесса на последующих этапах обработки. Из всех добавок, протестированных на ФИГ. 5, только KCl продемонстрировал лучшее выделение вируса по сравнению с NaCl. Также было замечено, что увеличение концентрации KCl улучшало высвобождение VSV-GP.

Однако было решено, что, поскольку NaCl продемонстрировал хорошее высвобождение VSV-GP и используется для элюирования при захвате катионным обменом, а также будет использоваться на других этапах процесса, его следует использовать в качестве добавки для сбора VSV-GP.

[00205] Пример 5: Тестирование минимальной концентрации NaCl

[00206] ФИГ. 6

[00207] NaCl был выбран в качестве добавки для высвобождения VSV-GP во время сбора материала, поскольку он продемонстрировал высокую способность к выделению вируса и будет присутствовать в различных концентрациях на протяжении всего процесса. В исследовании изучалось, могут ли более низкие концентрации NaCl ниже 0,2 М иметь сопоставимые эффекты высвобождения вируса, потому что это уменьшит количество буфера для разбавления, необходимого для снижения проводимости сырья перед захватом VSV-G с использованием катионообменной хроматографии, чувствительного к соли этапа процесса. Осветленный материал сбора разделяли на аликвоты - фракции по 15 мл через 30 часов после инфицирования и добавляли NaCl до конечных концентраций, показанных на ФИГ. 6, инкубировали 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 355 g в течение 3 минут. Затем супернатант тестировали с использованием $TCID_{50}$. Было показано, что выделение вируса с использованием 0,2 М NaCl было самым высоким, хотя более низкие концентрации также работали в определенной степени. Таким образом, эта концентрация оказалась наиболее многообещающей для высокого извлечения VSV-GP во время сбора материала при минимизации фактора разбавления, необходимого для достижения захвата VSV-GP на последующем этапе катионного обмена.

[00208] Пример 6: Примеры данных о производительности процесса

[00209] ФИГ. 7A+B

[00210] Здесь показаны дополнительные иллюстративные рабочие характеристики для процесса, подробно описанного в Примерах 1 и 2, для инфицирования клеток вирусом VSV-GP и в культуральных объемах 50 л (ФИГ. 7A) или 4 л (ФИГ. 7B). Вкратце, клетки культивировали в суспензии в течение 48 часов, добавляли VSV-GP при множественности инфицирования 0,0005, вирус собирали и отделяли от дебриса клеток-хозяев путем добавления конечной концентрации 0,2 М NaCl при ТОН 36 часов. VSV-GP осветляли для удаления

дебриса клеток-хозяев с помощью микрофильтрации с 0,65 мкм полыми волокнами и обрабатывали нуклеазой SAN-HQ для уменьшения кхДНК. Сырье готовили перед хроматографическим захватом путем 0,5 мкм глубинной фильтрации и разбавления 1:2 в буфере для связывания (конечная концентрация 50 мМ Трис, pH 7,5). Вирусную суспензию улавливали и концентрировали с использованием катионообменного монолита, элюирование осуществляли с использованием солевого этапа. Захваченный материал выдерживали в течение ночи перед хроматографической тонкой очисткой с использованием мультимодальной эксклюзионной смолы CC700. На этом этапе VSV-GP дополнительно очищали от белков, происходящих из клетки-хозяина, (HCP) и кхДНК, не удаленных во время захвата. Наконец, тонко очищенный элюат подвергали диафильтрации в буфер для рецептирования и подвергали стерильной фильтрации с использованием фильтра 0,2 мкм.

[00211] Пример 7: Тестирование $MgCl_2$ в качестве альтернативной добавки во время сбора материала

[00212] ФИГ. 8

[00213] В дополнение к ранее протестированным наполнителям во время сбора материала добавляли хлорид магния для высвобождения VSV-GP(-карго) из инфицированных клеток. Было исследовано влияние хлорида магния как двухвалентного катиона, поскольку он хорошо растворяется в воде и проявляет аналогичную ионную силу по сравнению с хлоридом натрия при более низких концентрациях. Кроме того, катионы магния (Mg^{2+}) играют важную роль в качестве кофактора при ферментативном расщеплении нуклеиновых кислот для удаления свободной ДНК/РНК. Во время сбора материала суспензию вируса разделяли на аликвоты по 5 или 40 мл, инкубировали (10 мин при 34 °C) с различными количествами хлорида магния (добавляли от 0,04 М до 0,07 М), как показано на ФИГУРЕ 8 и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Супернатант анализировали с использованием $TCID_{50}$ и GC кПЦР. Образец, обработанный NaCl (добав. 0,2 М), использовали в качестве контрольного образца (аналогичная ионная сила по сравнению с 0,07 М $MgCl_2$).

[00214] Неочищенный сбор, обработанный NaCl (контроль, добав. 0,2 М), показал аналогичный титр вируса ($TCID_{50}$ и GC кПЦР) по сравнению с сырым сбором, обработанным $MgCl_2$ (добав. 0,07 М). Более низкие концентрации $MgCl_2$ приводили к меньшему высвобождению VSV-GP(-карго). Хлорид магния

представляет собой возможную альтернативу высвобождению вируса из клеток HEK293 во время сбора материала. Кроме того, более низкая проводимость в обработанной солью вирусной суспензии снижает количество буфера для разбавления, необходимое для регулирования проводимости для последующего этапа катионообменной хроматографии (захвата).

[00215] Пример 8: Промывка фильтра после глубинной фильтрации для высвобождения вирусов с использованием NaCl

[00216] ФИГ. 9

[00217] Помимо добавления хлорида натрия для высвобождения VSV-GP(-карго) во время сбора, тестировали элюирование вируса с использованием промывки фильтра после глубинной фильтрации. В исследовании изучалось, высвобождается ли VSV-GP(-карго) из клеток HEK293 после удержания в фильтрующем материале.

[00218] Во время сбора VSV-GP(-карго) инкубировали с бензоназой в течение 30 минут при 37°C во встряхиваемом инкубаторе. Глубинную фильтрацию (3M™ Zeta Plus™) для осветления крупного сбора выполняли с определенной объемной нагрузкой на фильтр (200 л/м²), постоянным объемным потоком (200 л/м^2/ч) и максимальным давлением 1,5 бар (предварительный фильтр). После глубинной фильтрации проводили промывку фильтра одной пятой (20 %) отфильтрованного объема с использованием трис-буфера, содержащего хлорид натрия (0,25 М и 0,5 М NaCl). ФИГУРА 9 представляет собой превосходный пример взаимодействия VSV-GP(-карго) с клетками HEK293, когда во время сбора не добавлялись никакие добавки, поскольку титр инфекционного вируса в осветленном сборе довольно низок. Высвобождение вируса с использованием первой промывки фильтра 0,25 М NaCl уже было достаточным для полного выделения инфекционного вируса. Вторая промывка фильтра 0,5 М раствором NaCl высвободила некоторое дополнительное количество вируса, но первая промывка фильтра уже почти «элюировала» большую часть вируса. Необходимое количество NaCl для высвобождения вируса с помощью промывки фильтра сравнимо с количеством NaCl, добавляемым во время сбора материала (добав. 0,2 М). Несмотря на хорошее извлечение VSV-GP(-карго) при использовании промывки фильтра после глубинной фильтрации, добавление NaCl во время сбора является убедительным из-за простоты процедуры.

[00219] **Пример 9: Пример способа для определения $TCID_{50}$**

[00220] Клетки и вирусы:

[00221] BHK-21 клетки (#603126 (C13), CLS) культивировали в 5 % CO_2 и при 37 °C. Среду (GMEM #21710082, Thermo) дополняли с помощью 8,7 % ФБС и 4,3 % триптозо-фосфатного бульона. BHK-21 клетки промывали с помощью ФБС и отделяли от колбы для культивирования клеток путем инкубирования с ферментом TrypLE™ Select при 37 °C в течение 6-8 минут. Клетки переносят в среду, подсчитывают с помощью Flex2 (nova biomedical) и высевают на 96-луночные планшеты.

[00222] $TCID_{50}$ исследование:

В 96-луночные планшеты засевают 10^4 клетки BHK-21 в 100 мкл дополненной GMEM на лунку. Через 24 часа прикрепившиеся клетки инфицируют 11 последовательными разведениями вируса 0,5 $\log_{10}$ или только разбавителем (отрицательный контроль) перед инкубацией в течение трех дней при 37 °C, 5 % CO_2. Изображения лунок с культурой клеток в светлом поле получают с помощью многорежимного считывателя изображений Cytation5 (BioTek) с 4X объективом. Независимо от того, являются ли изображенные лунки положительными или отрицательными, цитопатическое действие (CPE) оценивается на глаз (т.е. визуально). Конечный титр [$TCID_{50}$/мл] рассчитывают по формуле Спирмена и Кербера. Для каждого образца вируса инфицирование серийными разведениями проводят всего в восьми планшетах в один и тот же день. На основании этих восьми повторов рассчитывают $TCID_{50}$/мл, как описано выше (однократное измерение).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продуцирования рабдовируса в культуре клеток, включающий этап:

(i) получения сбора рабдовируса из культуры клеток путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, с высвобождающим вирус агентом, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант.

2. Способ по п. 1, в котором рабдовирус представляет собой везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита.

3. Способ по п. 2, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

4. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором высвобождающий вирус агент на этапе (ia) представляет собой твердую соль или водный раствор соли, и высвобождающий вирус агент на этапе (ib) представляет собой водный раствор соли.

5. Способ по п. 4, в котором на этапе (ia) концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают по крайней мере приблизительно на 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М и указанный водный раствор соли на этапе (ib) имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М.

6. Способ по п. 4, в котором на этапе (ia) увеличение концентрации соли в клеточной культуре и на этапе (ib) концентрация указанного водного раствора соли составляет от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, от 0,05 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,25 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,3 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,35 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,4 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,45 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,5 М до приблизительно 5 М.

7. Способ по любому из п.п. 4 – 6, в котором указанная соль представляет собой NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl, NH_4 сульфат, NH_4 ацетат или NH_4 бикарбонат.

8. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором высвобождающий вирус агент представляет собой аминокислоту, предпочтительно полярную, кислотную или основную аминокислоту, более предпочтительно аргинин.

9. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором высвобождающий вирус агент представляет собой сульфатированный полисахарид, предпочтительно сульфат декстрана.

10. Способ по любому из п.п. 1 - 3, в котором на этапе (ia) путем добавления высвобождающего вирус агента к клеточной культуре ионную силу клеточной культуры увеличивают, предпочтительно по крайней мере приблизительно на 0,01 М, или по крайней мере приблизительно на 0,05 М, или по крайней мере приблизительно на 0,1 М, или по крайней мере приблизительно на 0,15 М, или по крайней мере приблизительно на 0,2 М, или по крайней мере приблизительно на 0,25 М, или по крайней мере приблизительно на 0,3 М, или по крайней мере приблизительно на 0,35 М, или по крайней мере приблизительно на 0,4 М, или по крайней мере приблизительно на 0,45 М, или по крайней мере приблизительно на 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или

от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М; и на этапе (ib) промывание фильтра высвобождающим вирусы агентом, содержащим водный раствор, имеющий ионную силу по крайней мере приблизительно 0,01 М, по крайней мере приблизительно 0,05 М, или по крайней мере приблизительно 0,1 М, или по крайней мере приблизительно 0,15 М, или по крайней мере приблизительно 0,2 М, или по крайней мере приблизительно 0,25 М, или по крайней мере приблизительно 0,3 М, или по крайней мере приблизительно 0,35 М, или по крайней мере приблизительно 0,4 М, или по крайней мере приблизительно 0,45 М, или по крайней мере приблизительно 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М.

11. Способ по любому из п.п. 1 - 10, в котором рабдовирус продуцируется в клетке-хозяине млекопитающего, предпочтительно в клетке HEK293.

12. Способ по п. 11, в котором клетку-хозяина млекопитающего культивируют в суспензии.

13. Способ продуцирования рабдовируса в культуре клеток по любому из п.п. 1 - 12, дополнительно включающий такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) (необязательно) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) (необязательно) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной

эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

14. Способ по п. 13, в котором катионообменник представляет собой монолит, смолу или мембрану.

15. Способ по п. 14, в котором катионообменник представляет собой монолитный адсорбер.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором рабдовирус формулируют в фармацевтическую композицию.

17. Способ очищения рабдовируса от клеточной культуры, инфицированной рабдовирусом, включающий этап:

(i) получения сбора рабдовируса из клеточной культуры путем:

a. добавления непосредственно к клеточной культуре высвобождающего вирус агента с последующим осветлением клеточной культуры, предпочтительно с помощью глубинной фильтрации, фильтрации с тангенциальным потоком или центрифугированием, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант,

ИЛИ

b. подвергания клеточной культуры этапу фильтрации, предпочтительно глубинной фильтрации с последующим промыванием фильтра, предпочтительно глубинного фильтра, высвобождающим вирус агентом, и извлечения сбора рабдовируса в супернатант.

18. Способ по п. 17, в котором рабдовирус представляет собой везикуловирус, предпочтительно вирус везикулярного стоматита.

19. Способ по п. 18, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

20. Способ по любому из п.п. 17 - 19, в котором высвобождающий вирус агент на этапе (ia) представляет собой твердую соль или водный раствор соли, и высвобождающий вирус агент на этапе (ib) представляет собой водный раствор соли.

21. Способ по п. 20, в котором на этапе (ia) концентрацию соли в клеточной культуре увеличивают по крайней мере приблизительно на 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М и указанный водный раствор соли на этапе (ib) имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М, 0,35 М, 0,4 М, 0,45 М или 0,5 М.

22. Способ по п. 21, в котором на этапе (ia) увеличение концентрации соли в клеточной культуре и на этапе (ib) концентрация указанного водного раствора соли составляет от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,25 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,3 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,35 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,4 М до приблизительно 5 М, от приблизительно 0,45 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,5 М до приблизительно 5 М.

23. Способ по любому из п.п. 20 – 22, в котором указанная соль представляет собой NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NH_4Cl, NH_4 сульфат, NH_4 ацетат или NH_4 бикарбонат.

24. Способ по любому из п.п. 17 - 19, в котором высвобождающий вирус агент представляет собой аминокислоту, предпочтительно полярную, кислотную или основную аминокислоту, более предпочтительно аргинин.

25. Способ по любому из п.п. 17 - 19, в котором высвобождающий вирус агент представляет собой сульфатированный полисахарид, предпочтительно сульфат декстрана.

26. Способ по любому из п.п. 17 - 19, в котором на этапе (ia) путем добавления высвобождающего вирус агента к клеточной культуре ионную силу клеточной культуры увеличивают, предпочтительно по крайней мере приблизительно на 0,01 М, или по крайней мере приблизительно на 0,05 М, или по крайней мере приблизительно на 0,1 М, или по крайней мере приблизительно на 0,15 М, или по крайней мере приблизительно на 0,2 М, или по крайней мере приблизительно на 0,25 М, или по крайней мере приблизительно на 0,3 М, или по крайней мере приблизительно на 0,35 М, или по крайней мере приблизительно на 0,4 М, или по крайней мере приблизительно на 0,45 М, или по крайней мере приблизительно на 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М; и на этапе (ib) промывают фильтр высвобождающим вирус агентом, содержащим водный раствор, имеющий ионную силу по крайней мере приблизительно 0,01 М, или по крайней мере приблизительно 0,05 М, или по крайней мере приблизительно 0,1 М, или по крайней мере приблизительно 0,15 М, или по крайней мере приблизительно 0,2 М, или по крайней мере приблизительно 0,25 М, или по крайней мере приблизительно 0,3 М, или по крайней мере приблизительно 0,35 М, или по крайней мере приблизительно 0,4 М, или по крайней мере приблизительно 0,45 М, или по крайней мере приблизительно 0,5 М, или от приблизительно 0,01 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,05 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,1 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,15 М до приблизительно 5 М, или от приблизительно 0,2 М до приблизительно 5 М.

27. Способ по любому из п.п. 17 - 26, в котором рабдовирус очищают от клетки-хозяина млекопитающего, предпочтительно клетки HEK293.

28. Способ по п. 27, в котором клетку-хозяина млекопитающего культивируют в суспензии.

29. Способ очищения рабдовируса по любому из п.п. 17 - 28, дополнительно включающий такие этапы:

(ii) (необязательно) снижение концентрации соли в собранном материале, полученном после этапа (ia) или (ib), предпочтительно путем разбавления, диафильтрации или диализа,

(iii) (необязательно) обработка сбора рабдовируса нуклеазой, расщепляющей ДНК, предпочтительно бензоназой или активируемой солью нуклеазой,

(iv) улавливание рабдовируса путем загрузки раствора, полученного после любого из этапов (i) - (iii), на катионообменник,

(v) элюирование рабдовируса и извлечение элюата,

(vi) (необязательно) тонкое очищение элюата рабдовируса с этапа (vii), предпочтительно посредством эксклюзионной фильтрации, мультимодальной эксклюзионной фильтрации, ионного обмена и/или фильтрации с тангенциальным потоком,

(vii) (необязательно) замена буфера тонко очищенного элюата рабдовируса, предпочтительно с помощью ультрафильтрации и диафильтрации или диализа,

(viii) (необязательно) стерильная фильтрация рабдовируса.

30. Способ по п. 29, в котором катионообменник представляет собой монолит, смолу или мембрану.

31. Способ по п. 30, в котором катионообменник представляет собой монолитный адсорбер.

32. Способ по любому из п.п. 17 - 31, в котором рабдовирус формулируют в фармацевтическую композицию.

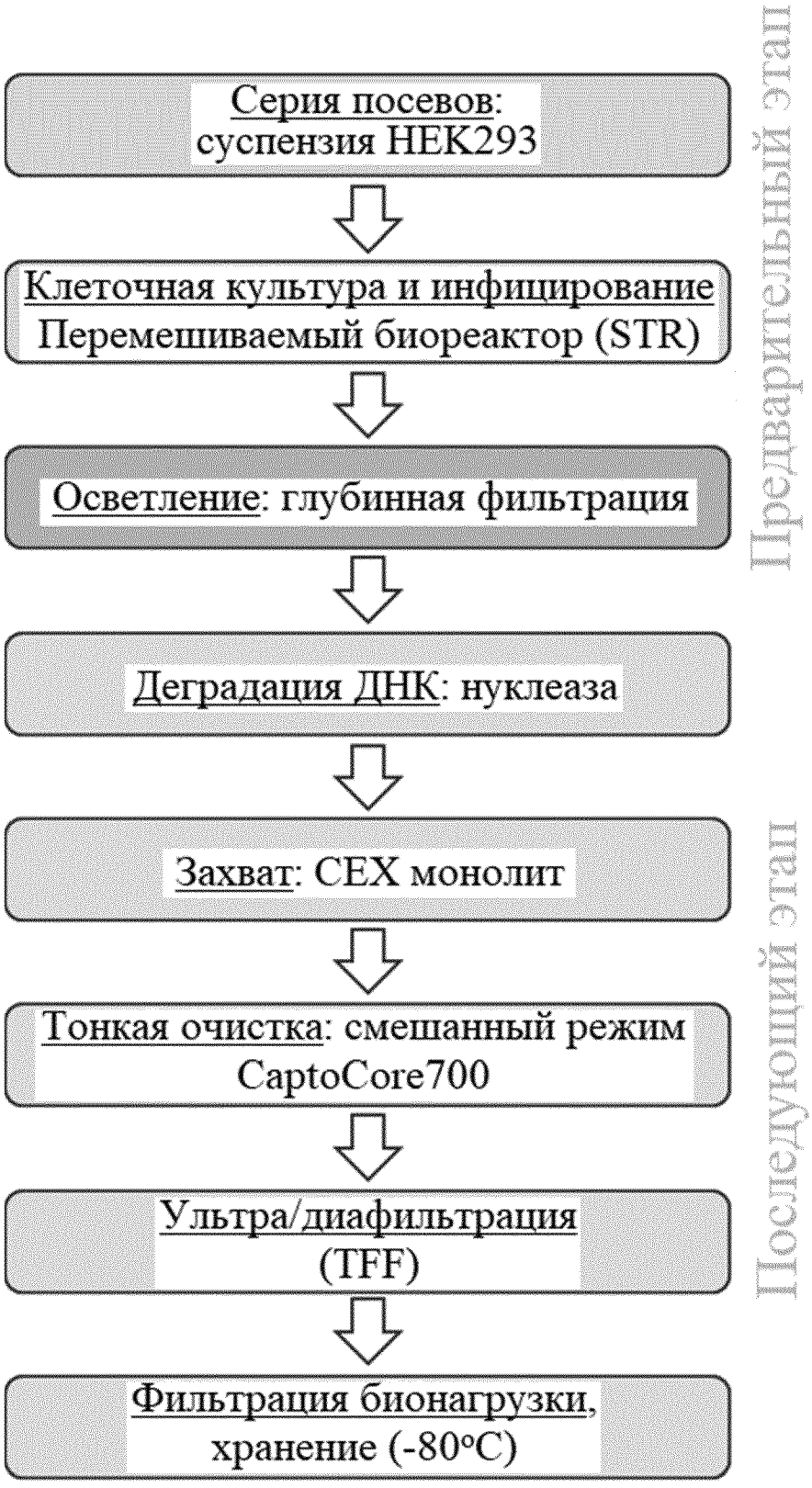
33. Вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G вируса везикулярного стоматита заменен гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), который был получен в соответствии со способом по

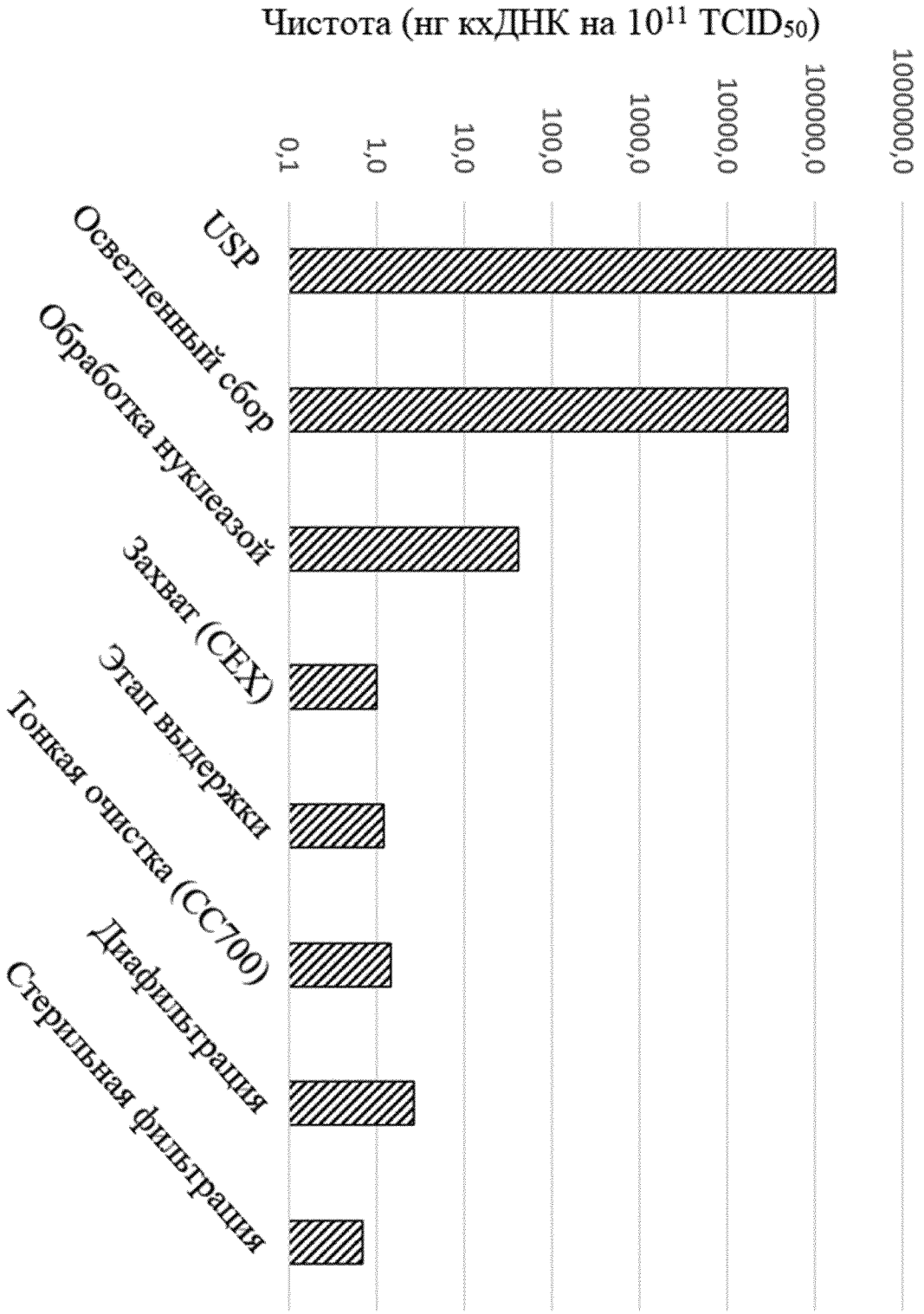
любому из п.п. 1 – 16 или очищен в соответствии со способом по любому из п.п. 17 – 32.

34. Вирус везикулярного стоматита, полученный или очищенный по п. 33, причем РНК геном вируса везикулярного стоматита состоит из кодирующей последовательности, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичной SEQ ID NO: 12.

35. Вирус везикулярного стоматита, полученный или очищенный по п. 33 или 34, причем количество инфекционных частиц составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, или, по крайней мере, приблизительно около 1×10^{10} при измерении в $TCID_{50}$/мл.

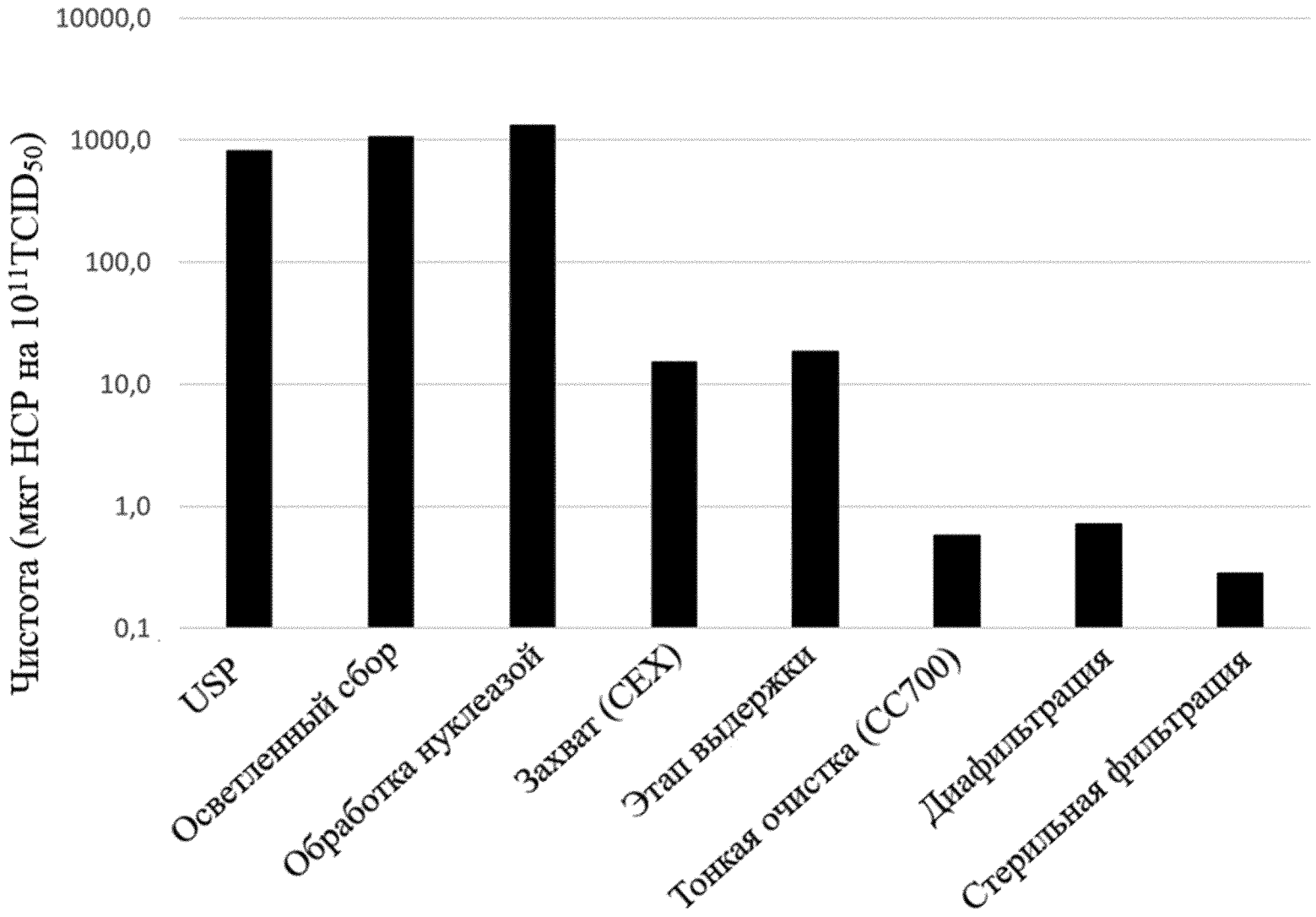
ФИГ. 1


Серия посевов: суспензия HEK293
Клеточная культура и инфицирование Перемешиваемый биореактор (STR)
Осветление: глубинная фильтрация
Деградация ДНК: нуклеаза
Захват: CEX монолит
Тонкая очистка: смешанный режим CaptoCore700
Ультра/диафильтрация (TFF)
Фильтрация бионагрузки, хранение (-80°C)
Предварительный этап
Последующий этап

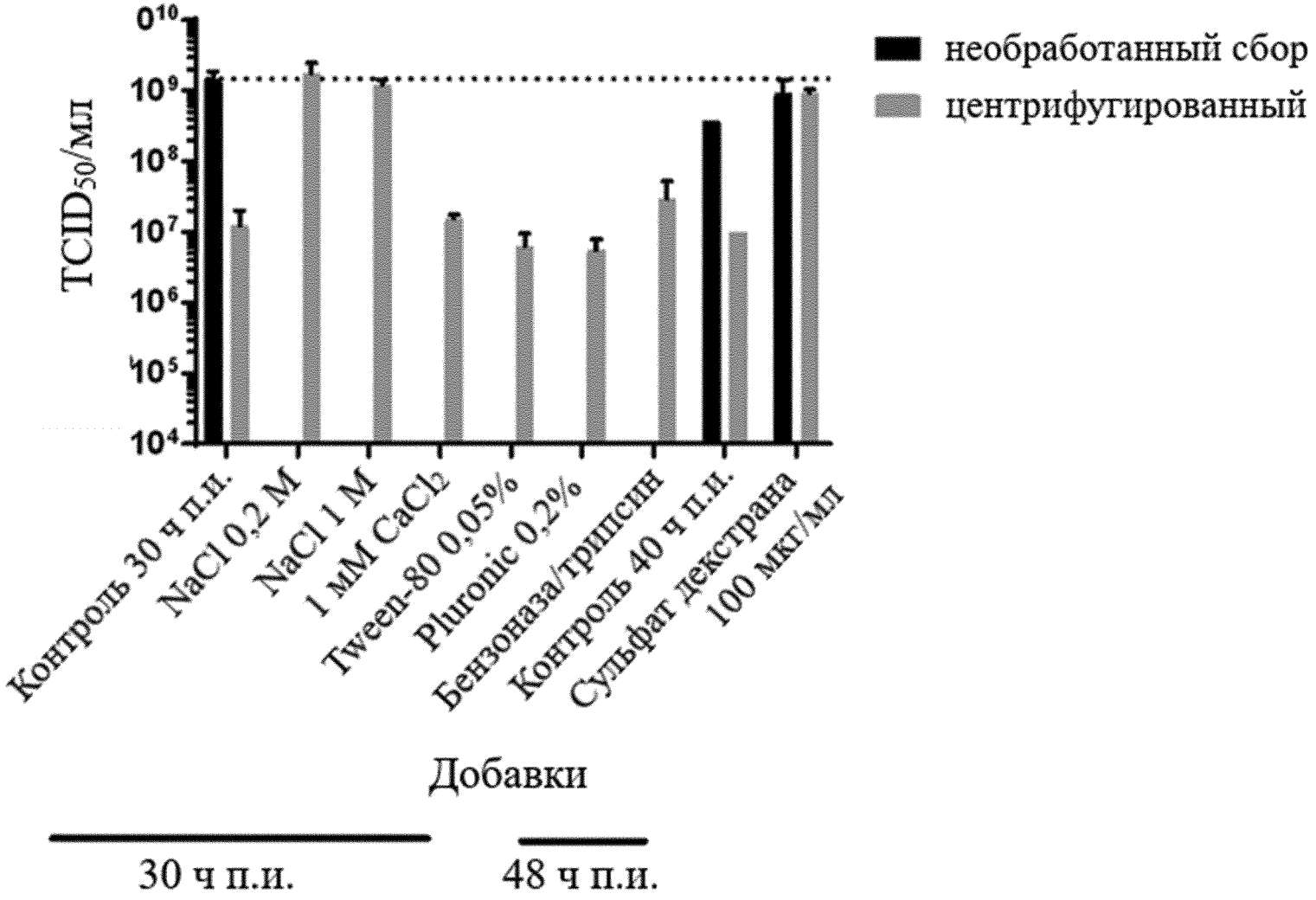

Чистота (нг кхДНК на 10^11 TCID50)
0,1
1,0
10,0
100,0
1000,0
10000,0
100000,0
1000000,0
USP
Осветленный сбор
Обработка нуклеазой
Захват (CEX)
Этап выдержки
Тонкая очистка (CC700)
Диафильтрация
Стерильная фильтрация

ФИГ. 2

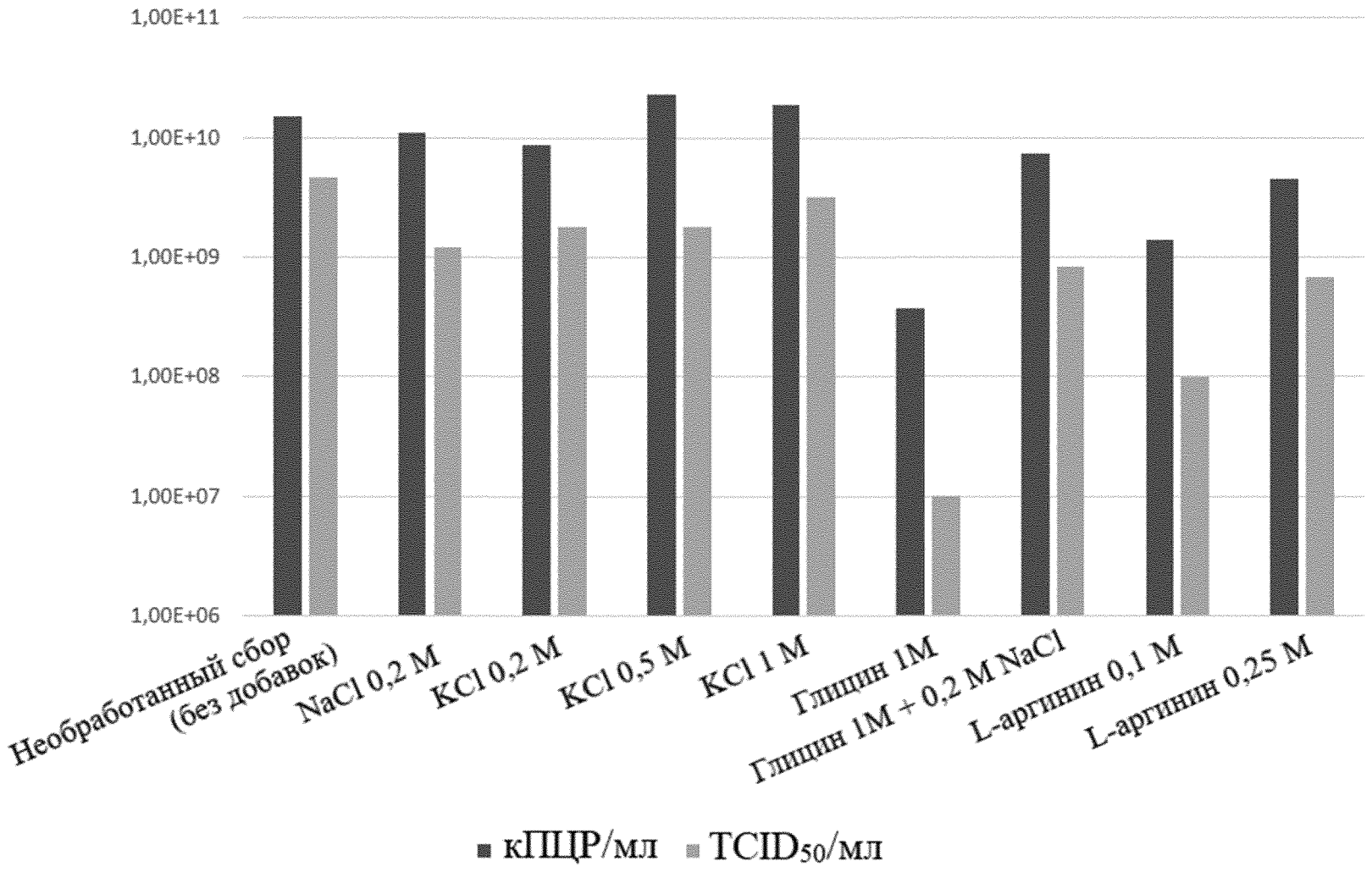
ФИГ. 3


10000,0
1000,0
100,0
10,0
1,0
0,1
Чистота (мкг HCP на 10^{11}TCID$_{50}$)
USP
Осветленный сбор
Обработка нуклеазой
Захват (CEX)
Этап выдержки
Тонкая очистка (CC700)
Диафильтрация
Стерильная фильтрация

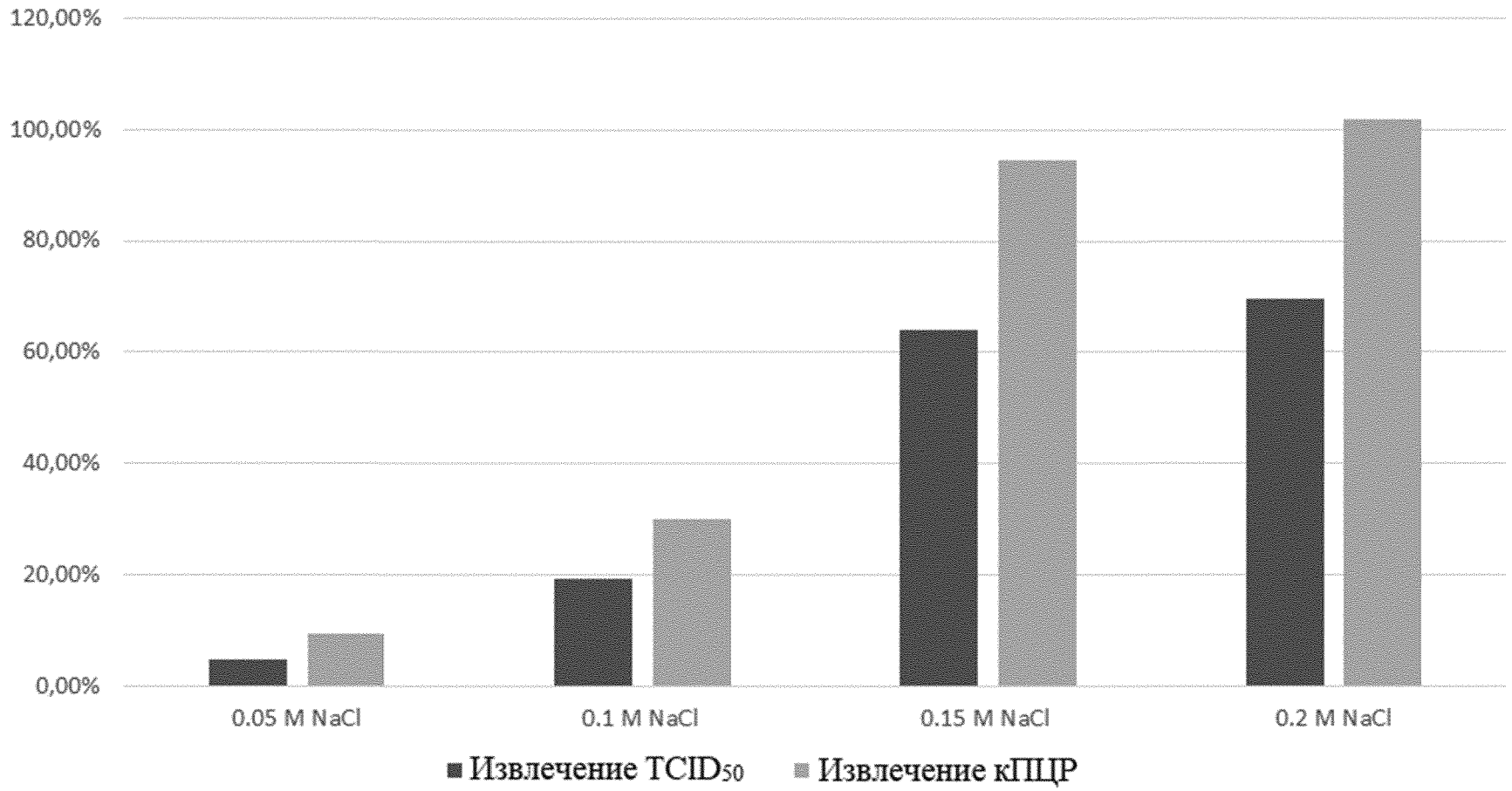
ФИГ. 4


необработанный сбор
центрифугированный
TCID50/мл
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
Контроль 30 ч п.и.
NaCl 0,2 M
NaCl 1 M
1 мМ CaCl2
Tween-80 0,05%
Pluronic 0,2%
Бензоназа/трипсин
Контроль 40 ч п.и.
Сульфат декстрана 100 мкг/мл
Добавки
30 ч п.и.
48 ч п.и.

ФИГ. 5

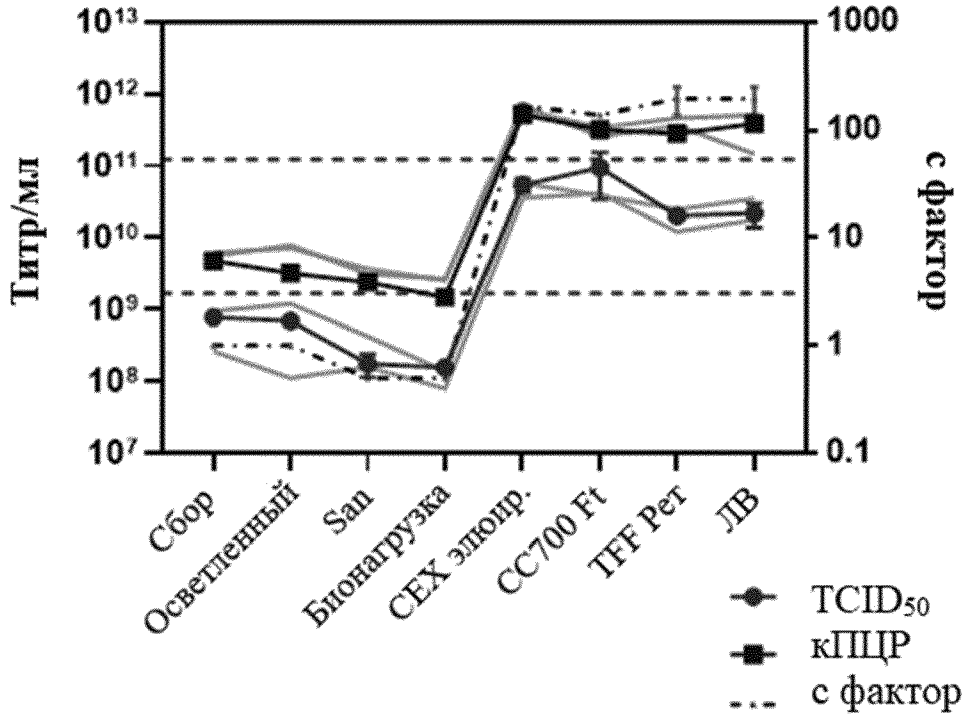

1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Необработанный сбор (без добавок)
NaCl 0,2 M
KCl 0,2 M
KCl 0,5 M
KCl 1 M
Глицин 1M
Глицин 1M + 0,2 M NaCl
L-аргинин 0,1 M
L-аргинин 0,25 M
кПЦР/мл
TCID50/мл

ФИГ. 6

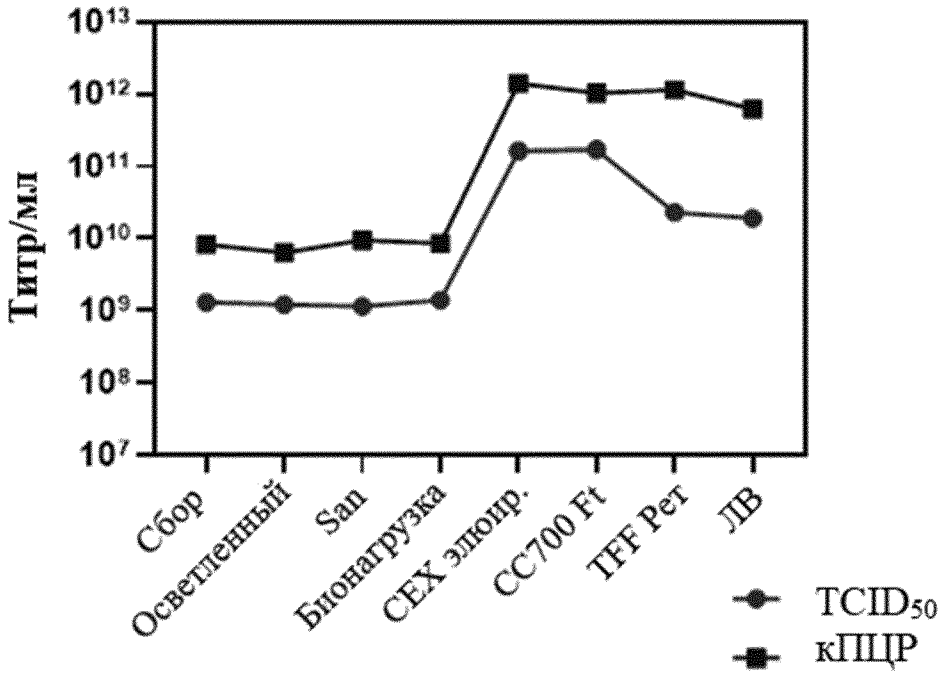

120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
0.05 M NaCl
0.1 M NaCl
0.15 M NaCl
0.2 M NaCl
Извлечение TCID50
Извлечение кПЦР

ФИГ. 7A-B

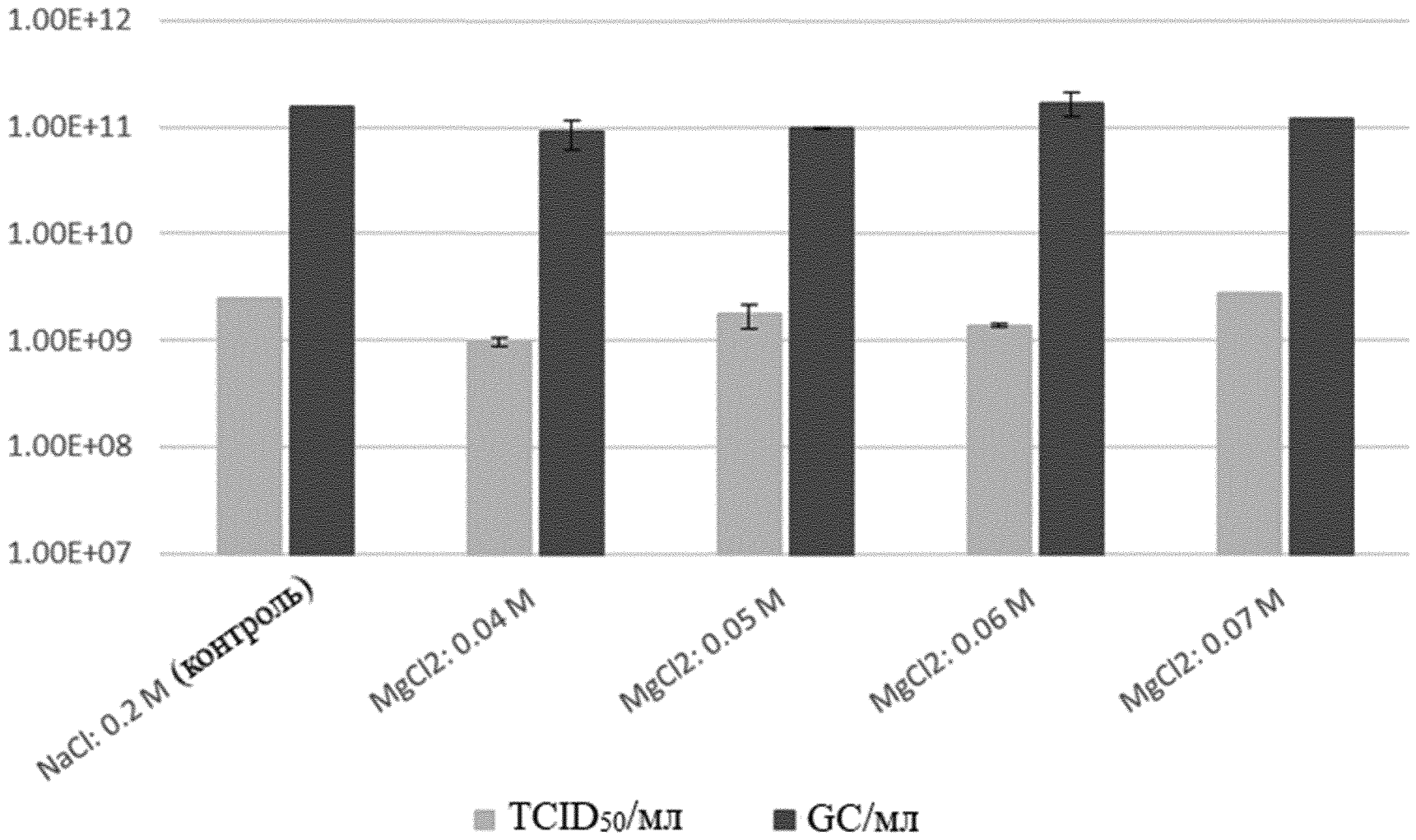
A


Титр/мл
с фактор
Сбор
Осветленный
San
Бионагрузка
CEX элюир.
CC700 Ft
TFF Ret
ЛВ
TCID50
кПЦР
с фактор

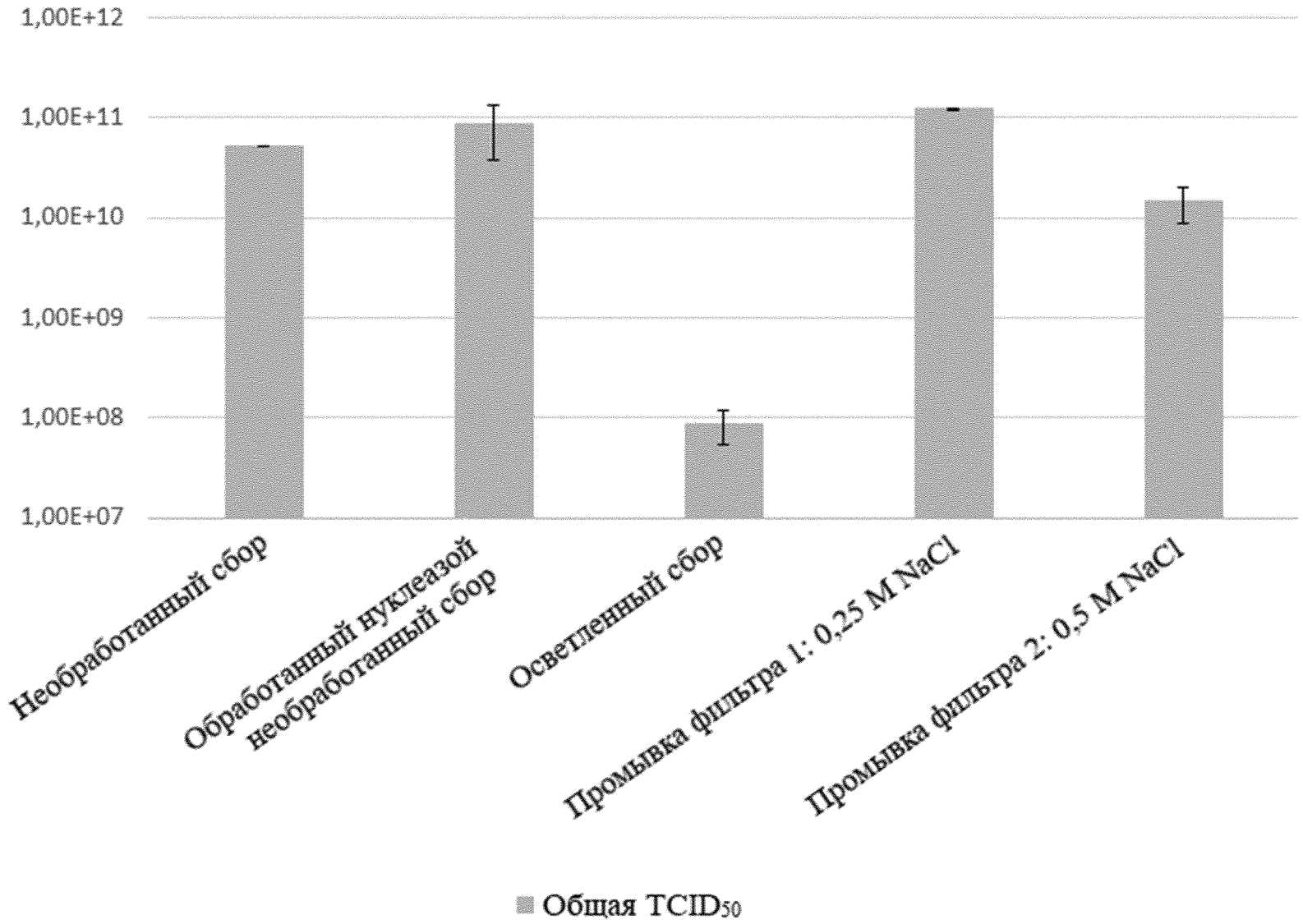
B


Титр/мл
Сбор
Осветленный
San
Бионагрузка
CEX элюир.
CC700 Ft
TFF Ret
ЛВ
TCID50
кПЦР

ФИГ. 8


1.00E+12
1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
NaCl: 0.2 M (контроль)
MgCl2: 0.04 M
MgCl2: 0.05 M
MgCl2: 0.06 M
MgCl2: 0.07 M
TCID50/мл
GC/мл

ФИГ. 9


1,00E+12
1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
Необработанный сбор
Обработанный нуклеазой необработанный сбор
Осветленный сбор
Промывка фильтра 1: 0,25 M NaCl
Промывка фильтра 2: 0,5 M NaCl
Общая TCID50