GMP级规模化制备重组慢病毒载体的纯化制剂的方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地涉及GMP级规模化制备重组慢病毒载体的纯化制剂的方法。

背景技术

基因治疗(gene therapy)是指将外源治疗性基因导入靶细胞，以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病，或通过外源基因表达的产物作用于疾病靶点，以达到治疗目的。

外源基因可通过病毒载体或非病毒载体进行转导或递送，常用的非病毒载体有脂质体、树枝状大分子、非天然阳离子聚合物、天然多糖等。非病毒基因递送载体较为安全、稳定，但其转染效率通常较低。病毒载体是将外源基因包装到天然病毒的外壳中，利用病毒对宿主细胞的感染性将外源基因导入细胞中。常见的病毒载体包括逆转录病毒(recombinant retrovirus，rRV)，重组慢病毒(recombinant lentivirus，rLV)、腺病毒(recombinant adenovirus，rAd)、腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus，rAAV)等。病毒载体的转导效率比非病毒载体的转导效率要高很多，特别适合用于侵染难感染的靶细胞，如淋巴细胞。

重组慢病载体是以HIV-1(人类免疫缺陷Ⅰ型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体。区别一般的逆转录病毒载体，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。重组慢病载体因其体内外生物滴度高和免疫原性低等优势，成为CART细胞和基因治疗的首选转基因载体。

目前的重组慢病毒载体是通过基因改造的方法，使慢病毒基因组中只留下包装信号和目的基因转录原件，而将逆转录酶、包膜蛋白VSVG、以及gag-pol等结构基因分散在2～3个载体上，同时删除致病基因。成熟的慢病毒颗粒通过将多个载体共同转染293T细胞后在细胞内包装而成，并由293T细胞分泌至培养上清，可以通过超速离心或者层析纯化的方法获得。

常规实验室用于获取慢病毒的方式是超速离心，该方法虽然简便但是无法进行工业化放大，且制备的慢病毒的载体可能存在较高的内毒素、BSA、HCP或者核酸等残留，无法直接用于人体。

此外，目前已有的层析纯化方法也存在步骤繁琐、得率低和纯度不够高等缺点，而且难以满足工业化大规模生产和 GMP 级生产的要求。

因此，本领域迫切需要开发新的、高效的、适合大规模生产且符合 GMP 级生产要求的制备纯化的慢病毒载体的方法。

发明内容

本发明的目的就是提供一种高效的、适合大规模生产且符合 GMP 级生产要求的制备纯化的慢病毒载体的方法。

本发明的另一目的是提供用所述方法纯化的重组慢病毒，以及含有所述重组慢病毒的纯化制剂及其应用。

在本发明的第一方面，提供了一种规模化纯化重组病毒载体制剂的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 提供一含待纯化的重组病毒载体的原料，所述原料是料液，所述料液的体积为 Va；

(b) 将所述料液进行微滤处理，从而获得经微滤处理的滤液，其中所述滤液含有所述重组病毒载体，所述滤液的体积为 Vb；

(c) 任选地对所述滤液进行浓缩处理，从而获得经浓缩的滤液，所述经浓缩的滤液的体积为 Vc；

(d) 对所述的上一步骤获得的滤液进行层析纯化处理，从而获得含重组病毒载体的粗纯产物；

(e) 对所述的上一步骤获得的粗纯产物，进行换液和精纯，获得纯化的重组病毒载体；

其中，所述的层析选自下组：阴离子层析、分子排阻层析、多模式复合树脂层析、或其组合。

在另一优选例中，所述 Va≥100 升(或为 100－500 升)；

在另一优选例中，所述方法在步骤(e)之后还包括：

(f) 对纯化的重组病毒载体进行换液，置换成含重组病毒载体的病毒冻存液；

(g) 对经过溶液置换后的病毒进行过滤除菌，从而获得经除菌的重组病毒载体，

在另一优选例中，所述的病毒包括慢病毒，

在另一优选例中，所述的方法是符合 GMP 条件。

在另一优选例中，在步骤(d)中，依次、先后或同时进行分子排阻层析和阴离子层析。

在另一优选例中，所述的阴离子树脂选自下组：Capto Q，Capto ImpRes，Capto DEAE。

在另一优选例中，采用多模式复合层析树脂：Capto adhere ImpRes，Capto core 700。

在另一优选例中，所述的层析纯化处理是先进行阴离子层析粗纯，然后进行多模式复合层析精纯。

在另一优选例中，所述的层析纯化处理是先进行多模式符合层析粗纯，然后进行阴离子层析精纯，

在另一优选例中，所述的层析纯化处理是将两种多模式符合层析树脂串联后同时进行杂质吸附去除和病毒捕获，

在另一优选例中，浓缩后料液所述的层析纯化处理的时间为 10L/30min，

在另一优选例中，所述的层析纯化处理的处理速度为 20L 待层析的滤液/60 分钟，

在另一优选例中，所述的层析介质与待层析的滤液的重量体积比为 500mL：10L 滤液，

在另一优选例中，所述的除菌滤器的孔径为 0.2 μM，

在另一优选例中，所述层析介质选自下组：Capto Q ImpRes。

在另一优选例中，在步骤(d)中，所述的经纯化的重组慢病毒载体具有选自下组的一个或多个特征：

(p1) 重组慢病毒载体生物滴度 $1.06x10^{9}$Tu/mL；

(p2) BSA 残留<50ng/mL；

(p3) 内毒素<1 EU/mL。

在另一优选例中，在进行层析纯化处理之前，对所述滤液(包括经浓缩或未经浓缩的滤液)进行核酶处理，

在另一优选例中，所述的核酶处理包括：加入 10U/ml 的核酶，在 37℃孵育 30 min，

在另一优选例中，在步骤(b)中，采用微滤中空纤维柱进行微滤，

在另一优选例中，所述的微滤中空纤维柱是截断值(cut-off)为 0.4-1.0微米(较佳地 0.45-0.8 微米)的微滤膜，

在另一优选例中，在步骤(c)中，Vb 与 Vc 之比(Vb/Vc)为 5-50，较佳地10-30，更佳地 15-25。

在另一优选例中，在步骤(c)中，通过超滤进行浓缩。

在另一优选例中，所述的超滤采用截断值(cut-off)为 100~800K 的超滤膜，

在另一优选例中，所述超滤中空纤维柱的截断值为 200-1000K，较佳地300-500K，

在另一优选例中，所述的超滤采用超滤中空纤维柱和超滤系统进行，

在另一优选例中，所述超滤系统选自下组：AKTA flux 6、AKTA readyflux。

在本发明的第二方面，提供了一种用所述方法制备的纯化的重组慢病毒。

在本发明的第三方面，提供了一种制剂，所述制剂含有所述的纯化的重组慢病毒。

在另一优选例中，所述的制剂为药物组合物，

在另一优选例中，所述的药物组合物还含有药学上可接受的载体。

在本发明的第四方面，提供了一种用于所述方法的纯化装置，包括：

(S1) 任选的用于盛放待纯化的重组慢病毒的原料的第一容器；

(S2) 微滤单元，所述的微滤单元用于对待纯化的重组慢病毒进行微滤处理，从而获得经微滤处理的滤液；

(S3) 任选的浓缩单元，所述的浓缩单元用于对所述滤液进行浓缩处理，从而获得经浓缩的滤液；

(S4) 层析纯化单元，所述的层析纯化单元用于对来自微滤单元或来自浓缩单元的滤液进行层析纯化处理，从而获得经纯化的重组慢病毒载体；和

(S5) 收集单元，所述收集单元用于收集所述经纯化的重组慢病毒载体。

在另一优选例中，所述的第一容器、微滤单元、浓缩单元、层析纯化单元和收集单元是液体连通的。

在另一优选例中，所述的层析纯化单元包括：分子排阻层析单元和阴离子层析单元。

在另一优选例中，所述的分子排阻层析单元和阴离子层析单元是各自独立的；

在另一优选例中，所述的分子排阻层析单元和阴离子层析单元是合为一体的。

在另一优选例中，所述的纯化装置还包括：

(S6) 核酶处理单元，所述核酶处理单元包括用于添加核酶的添加装置。

在另一优选例中，所述的核酶处理单元还包括一孵育装置，用于对添加了核酶的滤液进行孵育处理。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，通过对纯化条件的大量筛选和摸索，首次意外地开发了一种快速、简便且纯化效果优异的GMP级大规模纯化重组慢病毒的方法。在本发明方法中，采用特定的纯化介质以及特定的纯化步骤和条件，可以极其高效、快速而大规模地对含重组慢病毒的生产原料进行纯化，从而制得纯化高、杂质少、无内毒素的重组慢病毒制剂。在此基础上完成了本发明。

术语

如本文所用，术语“复合填料树脂”指 Capto Q，Capto ImpRes，Capto DEAE。

如本文所用，“复合填料树脂”指采用复合填料树脂进行的层析。

如本文所用，术语“重组慢病毒”、“慢病毒载体”等可互换使用，指通过将特定质粒导入特定的包装细胞后，所产生的慢病毒载体。典型地，这些慢病毒载体可用于后续的治疗目的或非治疗目的的转染预定细胞(包括人和非人哺乳动物的细胞)的反应。

本发明阐述的方法通过使用 GE AKTA 设备使用新一代 Capto Core700 和 Capto adhere ImpRes 树脂组合(但不限于)，快速获得高纯度慢病毒制剂。

采用本发明方法制备的重组慢病毒载体纯化制剂，可用于细胞或基因药品的生产。

本发明的主要优点包括：

通过将 Capto Core700 和 Capto adhere ImpRes 组合进行慢病毒纯化可快速获得高纯度慢病毒制剂。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人， 分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

实施例 1.

(1) 料液的收获：收集慢病毒料液

(2) 微滤澄清：

a)将 0.45-0.8μM 微滤中空纤维柱与 AKTA Flux 6 系统进行连接，测试完整性；

b)AKTA Flux 6 系统通过 1M NaOH 进行在线灭菌；

c)AKTA Flux 6 系统通过注射用水进行清洗；

d)AKTA Flux 6 系统通过无菌 1XPBS 进行清洗；

e)将 20L 重组慢病毒料液分两次倒入料液桶，进行微滤，收获滤过液。

(3) 超滤浓缩：

a)将 300-800K 超滤中空纤维柱与 AKTA Flux 6 系统进行连接，测试完整性；

b)AKTA Flux 6 系统通过 1M NaOH 进行在线灭菌；

c)AKTA Flux 6 系统通过注射用水进行清洗；

d)AKTA Flux 6 系统通过无菌 1XPBS 进行清洗；

e)将微滤后的慢病毒料液通过 300-800K 超滤柱和 AKTA Flux 6 系统进行超滤浓缩，弃去滤过液；

f)将慢病毒料液由20L浓缩到1~2L。

(4) 核酸酶处理：

a)将核酸酶按照10～1000U/mL的比例加入1~2L慢病毒料液中混匀；

b)2～8度过夜孵育。

(5) 使用Capto Core700与Capto adhere ImpRes串联进行去除杂质并捕获病毒的操作：

a)将含有500mL的Capto Core700与500mL Capto adhere ImpRes串联后安装到AKTA pure 150层析系统上；

b)AKTA Pure 150系统通过1M NaOH进行在线灭菌；

c)AKTA Pure 150系统通过注射用水进行清洗；

d)AKTA Pure 150系统通过无菌慢病毒冻存液

e)进行平衡；

f)将1~2L料液进行上样，上样结束使用20~50mM Tris-Cl/1~1.5M NaCl进行洗脱，收集洗脱峰。

(6) 超滤换液：

a)将300-800K超滤中空纤维柱与AKTA Flux 6系统进行连接，测试完整性；

b)AKTA Flux 6系统通过1M NaOH进行在线灭菌；

c)AKTA Flux 6系统通过注射用水进行清洗；

d)AKTA Flux 6系统通过无菌慢病毒冻存液进行清洗；

e)将微滤后的慢病毒料液通过300-800K超滤柱和AKTA Flux 6系统进行超滤换液，弃去滤过液；

f)收获重组慢病毒载体100~300mL。

(7) 过滤除菌与分装冻存：

a)用0.2μM的滤器过滤纯化后的慢病毒料液；

b)终产品按照1mL/管进行分装；

c)慢病毒制剂保存于超低温冰箱（≤-70° C）。

一、 结果：

（1）慢病毒终产品浓度2～4×10^9/mL

（2）BSA<50ng/mL；

（3）HCP<1ng/mL；

（4）核酸残留<5pg/mL；

（5）RCL 阴性。

二、 结论

使用 0.45-0.8μM 微滤中空纤维柱、300-800K 中空纤维柱以及 Capto Core700+Capto adhere ImpRes 复合填料分步进行澄清过滤、浓缩、换液和杂质的去除，能快速有效地获得高纯度慢病毒制剂。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。