

GMP 级逆转录病毒载体的纯化方法与应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及 GMP 级逆转录病毒载体的纯化方法与应用，特别涉及可应用于嵌合抗原受体细胞治疗的 GMP 级逆转录病毒载体的纯化方法与应用。

背景技术

基因治疗在多种疾病治疗中具有巨大应用潜力，也被认为是下一代临床治疗的终极手段。基因治疗是指将外源 DNA 片段导入靶细胞，以纠正、修复、替换、补偿或沉默等方式对缺陷和异常基因进行针对性干预，以期恢复正常的基因功能，最终达到治疗甚至完全治愈的目的。逆转录病毒衍生载体成为基因治疗临床试验中应用最广泛的载体之一。目前，逆转录病毒载体的制备工艺仍面临着巨大挑战。病毒载体的临床应用方式主要分为两种：一种是在体外感染靶细胞，再将导入外源基因的靶细胞体外培养扩增后回输人体，称为 *ex vivo*，例如 CAR-T 细胞治疗；另一种是直接利用纯化的病毒载体感染在体靶细胞和组织，称为 *in vivo*，例如溶瘤病毒疗法。对于前者，临床所需的病毒活性滴度一般在 10^7 IP/mL 数量级；对于后者，病毒活性滴度甚至要求达到 10^9 IP/mL 数量级。而传统的通过收集稳产株上清获取逆转录病毒（逆转录病毒载体）液的方法无法满足这一要求。随着对临床级高纯度逆转录病毒（逆转录病毒载体）的需求日益增加，急需开发高效和适用于规模化生产的逆转录病毒（逆转录病毒载体）制备和纯化的新工艺。

逆转录病毒（逆转录病毒载体）制备的一般流程是，先用包含目的基因的质粒转染表达逆转录病毒 *gag*、*pol* 和 *env* 基因的细胞系，通过多轮亚克隆筛选，获得稳定分泌包含目的基因的重组逆转录病毒的稳产株。后续在需要时将稳产株扩大培养，收集上清获得逆转录病毒（逆转录病毒载体）粗提液，用于后续纯化步骤。相比于腺病毒和慢病毒，逆转录病毒的稳定性较差，对于剪切力较为敏感，因此在纯化工艺选择上，对于切向流超滤的工艺控制提出更高要求。另外，传统的超速离心法也不适用于逆转录病毒（逆转录病毒载体）的纯化过程，因为超速离心法需要配备昂贵的离心机，花费大量时间，并且不利于工艺放大。因此，逆转录病毒（逆转录病毒载体）的纯化是目前业界面临的共同难题，尚无适用于临床治疗的 GMP（药品生产质量管理规范）级逆转录病毒（逆转录病毒载体）的完整制备和纯化方法。

发明内容

本发明提供纯化逆转录病毒(逆转录病毒载体)的方法,所述方法包括以下步骤:

A)、对含有逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞培养上清液进行微滤处理,以除去所述细胞培养上清液中的细胞碎片,获得微滤病毒液;

B)、对所述微滤病毒液进行核酸酶处理,以将宿主 DNA 残留降解为小片段 DNA,获得酶消化病毒液;

C)、将所述酶消化病毒液进行超滤,使所述逆转录病毒(逆转录病毒载体)留在截留液中,收集截留液,获得超滤病毒液;

D)、低速离心处理所述超滤病毒液,使所述逆转录病毒(逆转录病毒载体)进行沉淀,收集沉淀,得到未经除菌的病毒。

进一步地,所述方法还包括对所述未经除菌的病毒进行过滤除菌得到纯化的逆转录病毒(逆转录病毒载体)的步骤。

进一步地,可使用 $0.22\mu\text{m}$ 孔径的 PVDF 膜材质滤器对上述病毒进行过滤除菌。

进一步地, A)所述微滤处理中,所采用的半透膜的膜分离孔径(微膜孔径)为 $0.45\mu\text{m}$ - $0.75\mu\text{m}$,和/或所采用的半透膜的膜材质为改性聚醚砜。

所述微滤处理中,所述膜分离孔径(微膜孔径)可为 $0.45\mu\text{m}$ - $0.65\mu\text{m}$ 、或 $0.65\mu\text{m}$ 或 $0.45\mu\text{m}$ 。

所述微滤处理中,所述细胞培养上清液的流速可为 $89\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ - $133.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $89\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 或 $133.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

所述微滤处理中,所述微滤处理的剪切速率可为 2000 s^{-1} - 3000 s^{-1} 、 2000 s^{-1} 或 3000 s^{-1} 。

所述微滤处理具体可为下述任一种:

MF1、所采用的半透膜的膜分离孔径(微膜孔径)为 $0.65\mu\text{m}$,所述细胞培养上清液的流速为 $89\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,所述微滤处理的剪切速率为 2000 s^{-1} ;

MF2、所采用的半透膜的膜分离孔径(微膜孔径)为 $0.65\mu\text{m}$,所述细胞培养上清液的流速为 $133.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,所述微滤处理的剪切速率为 3000 s^{-1} ;

MF3、所采用的半透膜的膜分离孔径(微膜孔径)为 $0.45\mu\text{m}$,所述细胞培养上清液的流速为 $89\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,所述微滤处理的剪切速率为 2000 s^{-1} 。

进一步地, B)所述核酸酶处理中,反应体系中的核酸酶浓度为 $1\sim 500\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,和/或 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 反应 8-24 小时。

所述核酸酶处理中,核酸酶浓度为 25、50 或 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$;

所述核酸酶处理中,核酸酶的处理时间为 8 小时,16 小时或 24 小时;

所述核酸酶处理中,核酸酶的处理温度为 4°C 或 37°C 。

所述核酸酶处理具体可为下述任一种：

b1)、反应体系中核酸酶的浓度为 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，和/或 4°C 反应 16 小时；

b2)、反应体系中核酸酶的浓度为 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，和/或 4°C 反应 24 小时；

b3)、反应体系中核酸酶的浓度为 $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，和/或 4°C 反应 24 小时。

进一步地，步骤 C) 中超滤浓缩步骤中超滤膜的截留分子量为 350KD、500KD 或 750KD，优选为 750KD。

进一步地，步骤 C) 中分两次进行超滤浓缩分别如下：

c1) 首先使用中空纤维柱的内径为 0.5 mm 内径，膜面积 0.16 m^2 ；控制剪切速率为 2000 s^{-1} 对酶消化的病毒液进行超滤浓缩获得 5 倍浓缩的初级超滤浓缩病毒液；c1) 中病毒液的流速可为 $370 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；

c2) 然后使用中空纤维柱的内径为 0.5mm、膜面积为 115 cm^2 ，控制剪切速率为 2000 s^{-1} 将 c1) 获得的初级超滤浓缩病毒液进行超滤浓缩，获得 c1) 病毒液体积的 5-10 倍浓缩的二级超滤浓缩病毒液；c2) 中病毒液流速可为 $53 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

进一步地，步骤 D) 中低速离心的处理条件为：离心力 $4000\text{g} \sim 10000\text{g}$ ， 4°C 离心 4~24h；优选为在 4°C 条件下， 6000g 离心 16h；

所述低速离心中，离心力为 4000g 、 4000 g 、 6000g 或 8000g ；

所述低速离心中，所述离心时间为 4-24 小时、4 小时、8 小时、16 小时或 24 小时；

所述低速离心的处理工艺具体为如下任一种：

d1) 在 4°C 条件下， 6000g 离心 16h；

d2) 在 4°C 条件下， 6000g 离心 8h。

本发明提供上述方法得到的逆转录病毒(逆转录病毒载体)。

本发明提供一种产品（例如，药物或疫苗），所述产品含有上述的逆转录病毒(逆转录病毒载体)。

本发明还提供所述逆转录病毒(逆转录病毒载体)在制备基因治疗产品和/或细胞治疗产品和/或免疫治疗产品中的应用。

进一步地，所述基因治疗产品为 *ex vivo* 基因治疗产品，例如 CAR-T 细胞治疗产品。

与现有技术对比，本发明的有益效果如下：

1. 采用创新的纯化工艺组合，更有效去除逆转录病毒（逆转录病毒载体）中的杂质成分，提高逆转录病毒（逆转录病毒载体）的纯度。逆转录病毒（逆转录病毒载体）粗提液为逆转录病毒稳产株的培养上清液，其中包含多种杂质，包括宿主 DNA 残留（HCD）、宿主蛋白残留（HCP）、牛血清白蛋白残留（RSA）等。这些杂质可能在临

床应用过程中被带入人体，对患者带来不可控风险，包括过敏反应、致瘤性等。为此，《中国药典》对于上述各类杂质的残留量上限有着明确规定。例如，对于疫苗类生物制品，HCD 一般不高于 10ng/100μg 蛋白，BSA 不高于 50ng/剂，HCP 一般不高于总蛋白含量的 0.1%。而作为 *ex vivo* 基因治疗中间产品的逆转录病毒（逆转录病毒载体），虽然目前的政策法规并无明确规定，但是过高的杂质残留很难在下游工艺中除去。因此，需要在逆转录病毒（逆转录病毒载体）的纯化步骤中尽可能把杂质降到最低水平，避免带入下游工艺。本方案采用微滤，超滤，配合核酸酶处理，以及低速离心等步骤，针对大碎片、小分子以及核酸类杂质具有良好的清除效果。经过上述步骤，可有效去除逆转录病毒粗提液中宿主 HCD、HCP、BSA 等杂质成分。该工艺容易规模化放大并符合 GMP 要求。纯化后的逆转录病毒（逆转录病毒载体）料液经检测，BSA<200ng/ml，HCP<1μg/ml，HCD<100ng/ml。经验证，此病毒液可以进入 *ex vivo* 基因治疗的下游工艺，例如 CAR-T 或 CAR-NK 细胞制备等用途。

2. 最大限度保留逆转录病毒（逆转录病毒载体）的生物学活力，提高活性滴度。本方案两次用到了切向流微滤/超滤工艺。所谓的切向流，是指液体流动方向与过滤方向呈垂直方向的过滤形式，切向流过滤时，待过滤的液体的流动方向和过滤膜平面的方向平行，液体就会垂直于膜表面穿过膜孔。切向流会产生湍流（二次流），由于有了湍流，液体流动在过滤介质表面（即超滤膜表面）产生剪切力，减小了滤饼层或凝胶层在膜表面的堆积，使沉淀从膜表面剥离，降低膜污染，保证稳定的过滤速度。然而，切向流的剪切力可能破坏逆转录病毒的包膜结构，因此需要优化流速、膜面积、膜孔径等参数，以控制剪切力对逆转录病毒活力的损害。本发明通过采用大孔径（截留相对分子质量 750kDa）mPES 材质滤膜，通过优化剪切速率，保证渗透通量和过滤效果的同时减少剪切力损伤，从而减少对逆转录病毒的包膜结构的破坏，逆转录病毒总体回收率超过 80%。3. 申请人利用逆转录病毒（逆转录病毒载体）颗粒大，易沉降等特点，创新地使用低温低速离心法配合超滤的组合工艺，去除上清中 90%以上的 BSA 和 HCP 杂质，同时起到了浓缩病毒液的作用。该方案在保证逆转录病毒纯度的同时，浓缩病毒液滴度达到 10^7 IP/ml，符合下游工艺要求。

该方案成功避免使用离子交换层析的步骤，因高盐/渗透压可能对包膜的传染性产生不利影响。同时也避免了耗时且昂贵的超速离心步骤，易于规模化放大。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南，并不以任何方式构成对本发明的限制。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均设三次重复。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

实施例 1、含有重组逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞上清液的制备及纯化

1、含有重组逆转录病毒 (逆转录病毒载体)的细胞培养上清液的制备

重组逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞培养上清液可以是已经获得的产品，本实施例仅仅是示例性列举含有重组逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞培养上清液的制备方法：将目的基因插入逆转录病毒表达质粒，得到重组逆转录病毒表达质粒；重组逆转录病毒表达质粒转染包装细胞系，经过包装细胞系包装得到含有重组逆转录病毒（逆转录病毒载体）的细胞培养液，用含有重组逆转录病毒（逆转录病毒载体）的细胞培养液转染稳转细胞系，并经过数次亚克隆得到稳定包装逆转录病毒（逆转录病毒载体）的稳转细胞株；培养上述稳转细胞株，收集细胞上清液即可获得滴度稳定的含有重组逆转录病毒（逆转录病毒载体）的细胞培养上清液。

本实施例中以绿色荧光蛋白 EGFP 基因为例，将 EGFP 基因（MK387175.1，SYN 12-AUG-2019）插入逆转录病毒表达质粒（pMSCVneo，优宝生物）的 XhoI 和 EcoRI 识别位点间，且保持质粒 pMSCVneo 的其他序列不变，得到重组逆转录病毒表达质粒 pMSCVneo-EGFP。将 pMSCVneo-EGFP 按照以下方法包装得到重组逆转录病毒（逆转录病毒载体），命名为 EGFP-RV。

S1、包装细胞的培养

每 10cm 细胞培养皿中添加 6×10^6 个 Phoenix Ecotropic (ECO) 细胞（ATCC，CRL-3214，）（小于 20 代，不过分长满）和 10ml 的 DMEM 培养基，充分混匀细胞，37℃ 培养过夜。

S2、包装细胞的转染

待 ECO 细胞融合度达到 50-60% 左右进行转染；在一个管中添加目的质粒 pMSCVneo-EGFP 12.5μg，1.25M CaCl₂ 250μL，H₂O 1mL，总体积为 1.25mL；在另一个管里添加与质粒复合物等体积的 2×HBS 溶液，将质粒复合物加入 2×HBS 溶液中，边加质粒复合物边涡旋震荡 20s，得到混合物。轻柔地将混合物沿着边加入到 ECO 细胞培养皿中，37℃ 培养 6h，去除培养基，重新加入预热的新鲜 DMEM 培养基。

S3、粗病毒液的获得

转染 48h 后收集上清后，得到病毒液，分装保存于 -80℃。此粗病毒液命名为 EGFP-RV-C1。

S4、产毒细胞株的建立

将上一步获得的 EGFP-RV-C1 感染 PG13 细胞 (ATCC, CRL-10686), 感染两天后, 用 EGFP 抗体 (Biolegend) 对 EGFP 阳性的细胞进行富集, 得到富集后的细胞。取一部分富集后的细胞用流式检测 EGFP 的表达效率, 另取一部分富集后的细胞稀释成单细胞, 铺至 96 孔板, 将在 96 孔板培养后第 5 天的上清作为逆转录病毒(逆转录病毒载体)液。为测定上述逆转录病毒(逆转录病毒载体)液的病毒滴度, 进一步将逆转录病毒(逆转录病毒载体)液感染 HT1080 细胞 (ATCC, CCL-121), 流式细胞术测定上述逆转录病毒(逆转录病毒载体)液的病毒滴度。筛选出 96 孔板中病毒滴度最高的三个 PG13 细胞株, 接种至 24 孔板中继续培养, 进行二次筛选。继续用培养后第 5 天的 PG13 细胞上清作为逆转录病毒液, 感染 HT1080 细胞, 流式细胞术测定病毒滴度, 选择细胞培养上清病毒滴度最高的 PG13 细胞作为稳产株, 在液氮中长期保存。利用此细胞株在 DMEM 完全培养基 (DMEM 培养基+10% FBS+100U/mL 青霉素+10 μ g/mL 链霉素+2mM Glutamine) 中扩大培养, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱进行培养, 收集细胞培养上清液, 获得含有逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞培养上清液, 将该上清液命名为 EGFP-RV-C2, 作为后续纯化的料液。

2、逆转录病毒 (逆转录病毒载体) 的纯化

2.1、微滤

2.1.1 前处理: 将微滤澄清纯化系统 (瑞普利金, S02-E65U-07-N) 按照组装要求进行组装。在该微滤澄清纯化系统中使用膜分离孔径 (微膜孔径) 为 0.65 μ m、纤维内径为 0.75mm, 完整无损的中空纤维柱 (膜材质为改性聚醚砜 mPES), 用硅胶管进行系统连接。用压力保持法检测系统的完整性, 并使用 0.5M 或 1M 的 NaOH 溶液 循环 30-60min 进行灭菌处理, 剪切速率为 2000 s⁻¹~8000 s⁻¹, 灭菌结束后排空系统, 用无菌蒸馏水注满系统, 循环 20-30min, 直到纯化系统内 PH $\leq$ 7.0, 循环剪切速率为 6000/s。

2.1.2 再平衡: 纯水洗过后排空, 注入灭菌处理过的 4 $^{\circ}$ C 预冷 0.1M 或 0.2M PBS 缓冲液, 系统循环 20min, 6000/s。

2.1.3 微滤: 微滤澄清纯化系统系统平衡后排空, 注入步骤 1 的含有逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞培养上清液 EGFP-RV-C2 进入系统, 调节 EGFP-RV-C2 的流速 89mL $\cdot$ min⁻¹, 使剪切速率为 6000 s⁻¹。先关闭系统透过端, 让病毒液在系统中循环 2-10min, 使系统稳定, 开启透过端开关, 开始微滤, 收集透过液, 该透过液即为微滤病毒液, 命名为 EGFP-RV-C3。

以上全程在冰盒内操作, 保持液体温度为 2-8 $^{\circ}$ C。

2.2、核酸酶处理

向 2.1 获得的微滤病毒液 EGFP-RV-C3 中加入全能核酸酶 (义翘神州) 和 Mg²⁺离子, 使核酸酶的含量为 100 U $\cdot$ mL⁻¹, Mo²⁺离子的浓度为 2mM, 4 $^{\circ}$ C 反应 24h, 得到酶

消化病毒液命名为 EGFP-RV-C4。

2.3、超滤浓缩

将 2.2 获得酶消化病毒液使用超滤浓缩系统，进行超滤浓缩。

2.3.1 前处理：将超滤纯化系统（瑞普利金，KrosFlo Reseach 2i），按照组装要求进行组装。在该超滤纯化系统中使用截留相对分子质量为 750KD、中空纤维毛细管的内径（简称纤维内径）为 0.5mm、半透膜的膜面积为 0.16m² 完整无损的中空纤维柱，用硅胶管进行系统连接。用压力保持法检测系统的完整性，并使用 0.5 或 1M 的 NaOH 溶液 循环 30-60min 进行灭菌处理，剪切速率为 6000 s⁻¹，灭菌结束后排空系统，用无菌蒸馏水注满系统，循环 20-30min，直到纯化系统内 PH≤7.0，循环剪切速率为 6000 s⁻¹。

2.3.2 再平衡：纯水洗过后排空，注入灭菌处理过的 4℃ 预冷 0.1M 或 0.2M PBS 缓冲液，系统循环 20min，6000 s⁻¹。

2.3.3 病毒液超滤浓缩：取 2L 步骤 2.2 的酶消化病毒液 EGFP-RV-C4，系统平衡后排空，注入酶消化病毒液 EGFP-RV-C4 进入系统，调节流速为 370 mL·min⁻¹，使剪切速率为 2000 s⁻¹。先关闭系统透过端，让病毒液在系统中循环 2-10min，使系统稳定，开启透过端开关，开始超滤。先将病毒液浓缩至 1/5，然后连续注入 PBS 缓冲液进入系统，调节流速使 PBS 缓冲液注入流速等于透过液流速 370 mL·min⁻¹，保持病毒液体积不变。收集截留液，按 1: 1 (V/V) 截留液体积的 PBS，开启循环泵循环洗涤 5min，收集第一次洗涤液，按 1: 1 (V/V) 截留液体积的 PBS，开启循环泵循环洗涤 5min，收集第二次洗涤液。按照上述方法循环多次，分别至第 3 次、第 4 次、第 5 次，将所有每次收集的洗涤液混合在一起，即为初级病毒浓缩液即一级超滤病毒液，命名为 EGFP-RV-C5 (5)。此步骤获得的浓缩液 EGFP-RV-C5 (5) 体积为 400mL。

2.3.4 病毒液再次超滤浓缩

由于实际的超滤纯化起始料液体积较大，因此还需要额外的超滤浓缩步骤。本发明在上述超滤步骤之前增加了大体积中空纤维柱（膜面积 0.16m²，其余参数同上）对起始料液进行 5 倍浓缩。更换上述超滤纯化系统的中空纤维柱，该新的中空纤维柱中的截留相对分子质量为 750KD、中空纤维毛细管的内径（简称纤维内径）为 0.5mm、半透膜的膜面积为 0.0115m²。灭菌、平衡同上，将 400mL 上述 EGFP-RV-C5 (5) 注入系统，调节流速为 53 mL·min⁻¹，使剪切速率为 2000 s⁻¹。先关闭系统透过端，让病毒液在系统中循环 2-10min，使系统稳定，开启透过端开关，开始超滤。先将病毒液浓缩至 1/10，然后连续注入 PBS 缓冲液进入系统，调节流速使 PBS 缓冲液注入流速等于透过液流速 53 mL·min⁻¹，保持病毒液体积不变。收集截留液，按 1: 1 (V/V) 截留液体积的 PBS，开启循环泵循环洗涤 5min，收集冲洗液，将冲洗液与截留液混合即为一级病毒浓缩液即超滤病毒液。命名为 EGFP-RV-C6。体积 40mL。

2.4、低速离心及除菌过滤

将 2.3 获得的 40mL 超滤病毒液 EGFP-RV-C6 进一步低速离心处理, 使用离心力为 6000g, 离心 16h, 离心温度为 4℃。离心后弃上清, 收集沉淀, 该沉淀即为未经除菌的病毒。使用含 2%人血白蛋白的 PBS 重悬该沉淀, 重悬体积为离心前的 1/10。4℃ 放置 1h 用含 2%人血白蛋白的 PBS 复溶, 获得病毒重悬液命名为 EGFP-RV-C7。

最后, 使用 0.22μm 孔径的 PVDF 膜材质滤器对病毒重悬液 EGFP-RV-C7 进行过滤除菌, 获得纯化的病毒液, 即 GMP 级逆转录病毒(逆转录病毒载体), 体积为 4mL, 命名为 EGFP-RV-F, 放置于-80℃冻存。

3、逆转录病 EGFP-RV-F 的生物性状检测

3.1、逆转录病毒滴度检测

采用流式法通过检测 EGFP 表达, 间接测定出单位体积逆转录病毒感染的 HT1080 细胞数, 即病毒活性滴度或感染颗粒数 (Infectious particles, IP/mL)。

首先, 收集处于生长对数期的 HT1080 细胞, 胰酶消化 2-3min, 加入完全培养基制备成细胞悬液。按照 1.5×10^5 个/孔的密度接种对数生长期的 HT1080 细胞。铺细胞后的 TC6 孔板上下左右摇匀, 做好标记, 放置于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养 20~24h。转导时, 每孔分别加入含 8μg/mL polybrene 的病毒液, 其中病毒液和完全培养基分别按照不同比例稀释。转导后细胞置于 37℃, CO₂ 培养箱内孵育 1 h, 中间每隔 15 min 摇匀 1 次, 第 4 次摇匀后加入 2mL 完全培养基, 继续培养 48h。吸除细胞板孔内的病毒转导液, 每孔加 2 mL PBS 润洗细胞。每孔加入 100 μL 0.25% 胰酶, 室温放置 1~2min。每孔加入 500 μL 完全培养基, 终止消化。用吸头吸液吹打细胞悬液, 1500 rpm, 离心 5 min, 收集细胞沉淀。

将细胞悬液按照 3×10^4 个细胞/孔接种 96 孔板, 1500 rpm, 离心 5 min。每孔用 200μL FACS buffer 洗 1 次, 1500 rpm, 离心 5 min。按照 1:100 稀释度每孔加入 20μL FITC 标记的 EGFP 抗体 (Biolegend), 避光孵育 10min。再次离心, 每孔补加 200 μL FACS buffer。流式上机检测。

按照以下公式计算病毒滴度:

$$\text{病毒滴度 (IP} \cdot \text{mL}^{-1}) = (F \times N) / V$$

F: 流式检测细胞阳性率 (测定值-空白对照 CTR 值)

N: 转染时细胞数 (3×10^5) 个/孔

V: 加入的病毒体积 mL。

病毒回收率: 收获病毒滴度/初始病毒滴度 $\times 100\%$ 。

3.2、宿主残留 DNA (HCD) 检测

样本前处理. 采用宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒 (磁珠法) (湖州申科。

SK030203D100) 完成。

样本的 qPCR 检测按照以下步骤进行:

a. PG13 DNA 定量参考品和标准曲线的制备:

收集 PG13 细胞, 用 DNA 提取试剂盒 (QIAGEN, 80204) 提取基因组 DNA 作为定量参考品。用 1×PBS (pH7.4, 无 Ca 和 Mg) 将 DNA 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3ng/μL、300pg/μL、30pg/μL、3pg/μL、300fg/μL, 30fg/μL, 3fg/μL。

取 7 支干净的 1.5ml 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。在 ST0 管中用 PBS 将 DNA 定量参考品稀释至 3ng/μL, 振荡混匀后短时间快速离心 10s。在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 90μL PBS。依次做梯度稀释。

设置回收质控 ERC: 以制备加 300pg 定量参考品的样本作为 ERC, 取 100μL 待测样本加入 1.5ml 干净的离心管中。再加入 10μL ST2, 混匀, 标记为样本 ERC。

设置阴性质控 NCS: 取 100μL 样本基质溶液(或 DNA 稀释液)加入 1.5ml 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。

b. qPCR 反应液 (qPCR MIX) 的准备

根据所要检测的标准曲线及待测样本数量, 计算所需反应孔数, 一般做 3 个重复孔/样。反应孔数=(6 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+1 个阴性质控 NCS +待测样本×2) ×3; 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量, 按照表 1 配方, 配制 qPCR MIX。引物序列为:

探针, 5'-FAM-AGGGCCCCCAATGGAGGAGCT-TAM-3';

正向引物, 5'-CCCCTTCAGCTCCTTGGGTA-3';

反向引物, 5'-GCCTGGCAAATACAGAAGTGG-3'。

Q-PCR probe mix 购买现成的商品化预混液 (Vazyme, AceQ PCR probe master mix)。

c. qPCR 反应: 将表 2 中各试剂置于冰上混匀, 加样后总体积 25μL。建立 qPCR 模板和运行参数。95℃, 10min, 1 cycle; 95℃, 15s, 60℃, 1min, 40 cycle; 40℃, 30s, 1 cycle。

d.上机和结果分析: 在 ABI 7500 qPCR 仪上运行程序, 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本、样本 ERC 的检测值, 单位为 pg/10μL。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/μL 或 pg/mL。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率, 加样回收率要求在 50%~150% 之间。NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值≥35。NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 值。

表 1. qPCR MIX 配制表

组分	单孔体积 (μL)
qPCR probe mix	12.5
mDNA-F	2
mDNA-R	2
mDNA-P	1
RNAse-free water	补齐至反应体积
Total	20

表 2. 加样配制表

标准曲线	20μL qPCR MIX+5μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20μL qPCR MIX + 5μL DNA 稀释液
阴性对照	20μL qPCR MIX + 5μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	20μL qPCR MIX + 5μL 待测样本纯化液
ERC	20μL qPCR MIX + 5μL 样本 ERC 纯化液

3.3、牛血清白蛋白（BSA）残留检测

BSA 的测定方法为：采用 Bovine Serum Albumin (BSA) ELISA 检测试剂盒（Cygnus, F030）对样本的 BSA 残留进行检测。该试剂盒提供了抗 BSA 单克隆抗体包被板，以酶标记抗 BSA 多抗为检测抗体，组成双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒。根据供应商的说明书，先加入待测样品或标准品，使其中的 BSA 与固定在板上的抗体结合，彻底洗涤后加入 HRP 标记的抗 BSA 多抗孵育。洗涤后再加入 TMB 底物，TMB 在 HRP 的催化作用下转化成蓝色，并最终在终止液的作用下转化成黄色。颜色的深浅与样品或标准品中的 BSA 数量相关。最后，用酶标仪测定各样品孔在 450nm 处的吸光值，通过 BSA 标准曲线计算待测样品中的 BSA 浓度。

3.4、宿主残留蛋白（HCP）检测

本发明采用 ELISA 夹心法对样本中的 HCP 进行检测。HCP 抗体为用 PG13 细胞培养上清蛋白免疫家兔后的血清中纯化获得的多克隆抗体。具体的检测方法为：

a. 平板包被：用抗 PG13 细胞上清蛋白抗体，以最佳浓度包被于试验平板的反应孔的表面。最佳抗体浓度是通过用已知浓度的 PG13 细胞上清蛋白绘制一条标准曲线来确定的，该曲线在所要求的有效浓度范围中具有所要求的灵敏度和精确度。对于 PG13 细胞上清蛋白，本试剂盒可以检测的有效浓度范围为 62.5ng/mL 到 4000ng/mL。

本领域的普通技术人员，可以方便地确定在所要求范围内是否具有合适灵敏度和精确度，而无须进行多余的实验。

b. 平板洗涤：将包被溶液倒去，加入洗涤缓冲液（每孔大约 400 微升）然后倒去。按要求将这个洗涤循环重复多次。洗涤缓冲液可选为 0.01mol/L 的磷酸缓冲液（0.0027mol/L 氯化钾，0.137mol/L 氧化钠，pH7.4，含有 0.01 % w/v TritonX-100）。

c. 平板封闭：将含有蛋白质和去垢剂封闭缓冲液（含 1% BSA /0. 1% Triton X-100 的包被缓冲溶液）加入反应孔。平板可以此形式储存。

d. 样品和标准品的加入：平板按上述方式进行洗涤。向平板反应孔内分别加入标准品与待测样本各 100 μ l，然后每孔分别加入偶联物试剂 50 μ l，轻轻混合 15 秒后置 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟，丢弃反应液，用缓冲液清洗反应板 5 次，吸干多余水分，向反应孔内加入 50 μ L 显色液，置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟，终止反应。将反应板置于酶标仪上读取光密度值。

e. 用四甲基联苯胺磺酸盐（TMBS）作为显色底物，读取 450nm 的吸光度。HCP 准确浓度可以通过读取测试样品的吸光度、再参考由 HCP 标准品所作出的标准曲线来换算得出。

3.5、核酸酶（Supernuclease）残留检测

核酸酶能够完全消化不少于 5 个磷酸残基的 RNA 和 DNA(单链、双链、线性、圆形和超级螺旋状)，形成长度为 3-5 个碱基的 5'-单磷酸端寡核苷酸。本发明运用核酸酶降解工艺中的 HCD，使之方便地通过后续纯化方法去除。然而，由于核酸酶本身也属于蛋白杂质，需要在后续纯化工艺中和其他杂质一起除去。本发明通过购买义翘神州 Supernuclease ELISA kit 检测下游产品中核酸酶残留量。具体的检测步骤参照义翘神州官网和产品说明书。

按照实施例 1 中步骤 2 逆转录病毒(逆转录病毒载体)的纯化中所述方法重复 3 次得到 3 个批次的 GMP 级逆转录病毒(逆转录病毒载体)EGFP-RV-F，分别命名为批次 1、批次 2 和批次 3，按照上述方法检测批次 1、批次 2 和批次 3 的核酸酶含量、BSA 含量、HCP 含量、HCD 含量和病毒滴度。

结果表明经过上述微滤、核酸酶处理、超滤和低速离心步骤之后，料液体积的浓缩倍数 500 倍。获得 GMP 级逆转录病毒(逆转录病毒载体)EGFP-RV-F 的得率在 10-20% 之间，活性滴度 $>1.0E+07$ ，HCD <100 ng/ml，核酸酶低于检测限（ <3.15 ng/mL），HCP $<1\mu$ g/mL，BSA <200 ng/mL，符合下游生产工艺需求（表 9）。

表 9 逆转录病毒(逆转录病毒载体)最终纯化产物的杂质残留和总体回收率

GMP 级逆 转录病毒	BSA 残留 (ng/mL)	核酸酶残 留(ng/mL)	HCP 残留 (ng/mL)	HCD 残留 (ng/mL)	起始料液活性滴 度(IP·mL ⁻¹) [1]	纯化后活性滴 度(IP·mL ⁻¹)[2]	回收率 (%)
批次 1	198	低于检测 限	486	87	8.86E+05	8.22E+07	18.56
批次 2	142	低于检测 限	315	64	4.32E+05	3.54E+07	16.42
批次 3	146	低于检测 限	330	53	6.84E+05	5.07E+07	14.82

注：[1]起始料液滴度指换算成体积为 2L 料液的滴度；

[2]纯化后滴度指换算成体积为 4mL 料液的滴度。

实施例 2、逆转录病毒（逆转录病毒载体）纯化工艺的优化

2.1、粗毒液微滤工艺优化

参照实施例 1 的步骤 2 的 2.1 微滤，采用不同的流速和膜孔径，控制剪切力，获得不同条件下，粗毒液微滤的回收率。

除将实施例 1 的步骤 2 的 2.1 微滤中的 2.1.3 的含有逆转录病毒(逆转录病毒载体)的细胞培养上清液 EGFP-RV-C2(病毒的滴度为 8.86×10^5 IP·mL⁻¹)的流速由 89mL·min⁻¹ 分别替换为表 3 的 133.5mL·min⁻¹ 和 44.5 mL·min⁻¹，将剪切速率由 6000 s⁻¹ 分别替换为表 3 的 1000 s⁻¹ 和 2000 s⁻¹，将膜分离孔径（微膜孔径）由 0.45μm 替换为 0.65μm 外，其它操作均与实施例 1 的步骤 2.1 相同。

实验结果见表 3。由实验结果可知，流速 89 mL·min⁻¹ 剪切力控制在 2000 s⁻¹，膜孔径 0.65μm，可获得逆转录病毒(逆转录病毒载体)的最佳回收率。

表 3 不同微滤条件对病毒回收率的影响

料液名称	流速 (mL·min ⁻¹)	剪切速率(s ⁻¹)	膜孔径(μm)	滴度(IP·mL ⁻¹)	回收率(%)
EGFP-RV-C2	——	——	——	8.86E+05	100
EGFP-RV-C3	133.5	3000	0.65	7.80E+05	88.04
EGFP-RV-C3	89	2000	0.65	8.71E+05	98.31
EGFP-RV-C3	44.5	1000	0.65	5.71E+05	64.44
EGFP-RV-C3	133.5	3000	0.45	6.52E+05	73.59

EGFP-RV-C3	89	2000	0.45	7.68E+05	86.68
EGFP-RV-C3	44.5	1000	0.45	5.21E+05	58.80

2.2、核酸酶处理工艺优化

参照实施例 1 的步骤 2 的 2.2 的核酸酶处理，采用不同的核酸酶浓度，处理时间和处理温度，获得不同条件下，核酸酶处理后病毒液的回收率。

除将实施例 1 的步骤 2 的 2.2 的核酸酶处理中的核酸酶的含量由 100 U·mL⁻¹ 分别替换为表 4 的 50 U·mL⁻¹ 和 25 U·mL⁻¹，将反应时间由 24h 分别替换为表 4 的 8h 和 16h 外，其它操作均与实施例 1 的步骤 2 的 2.2 相同。

实验结果见表 4。由实验结果可知，酶浓度 100 U·mL⁻¹，4℃处理 24h，可获得最高的 HCD 清除效率。

表 4 不同条件下核酸酶处理对 HCD 的清除作用

料液名称	酶活性 (U·mL ⁻¹)	时间 (h)	温度 (℃)	HCD 浓度 (ng·mL ⁻¹)	去除率 (%)
EGFP-RV-C3	——	——	——	2292	0
EGFP-RV-C4	100	8	4	89.68	96.09
EGFP-RV-C4	50	8	4	137.95	93.98
EGFP-RV-C4	25	8	4	180.49	92.13
EGFP-RV-C4	100	16	4	76.54	96.67
EGFP-RV-C4	50	16	4	103.79	95.47
EGFP-RV-C4	25	16	4	146.69	93.60
EGFP-RV-C4	100	24	4	53.72	97.66
EGFP-RV-C4	50	24	4	74.95	96.73
EGFP-RV-C4	25	24	4	155.35	93.22
EGFP-RV-C4	100	8	37	165.7	92.77
EGFP-RV-C4	50	8	37	185.47	91.91
EGFP-RV-C4	25	8	37	260.37	88.64
EGFP-RV-C4	100	16	37	135.63	94.08
EGFP-RV-C4	50	16	37	169.23	92.62
EGFP-RV-C4	25	16	37	181.03	92.10
EGFP-RV-C4	100	24	37	127.56	94.43

EGFP-RV-C4	50	24	37	211.67	90.76
EGFP-RV-C4	25	24	37	266.52	88.37

2.3、超滤工艺优化

不同中空纤维膜截留相对分子质量对病毒液回收率和杂质清除率会产生不同的影响。中空纤维截留相对分子质量越大，杂质清除率越高，但是如果截留相对分子质量超过病毒颗粒的大小，也可能造成部分病毒颗粒的损失，影响回收率。

参照实施例 1 中 2.3 超滤工艺的操作流程，采用不同截留相对分子质量的中空纤维柱，获得不同截留相对分子质量的中空纤维膜对病毒回收率及杂质清除率的影响。

将实施例 1 中 2.3 中的中空纤维膜的截留相对分子质量替换为 750kDa、500kDa、300kDa，保持其他条件不变，得到的结果如表 5 所示。

表 5 不同中空纤维膜孔径对病毒回收率和杂质清除率的影响

料液名称	膜孔径 (kDa)	核酸酶 清除率 (%)	HCP 清除 率(%)	BSA 清除 率(%)	HCD 清 除率 (%) ^[1]	滴度 (IP·mL ⁻¹)	回收 率(%)
EGFP-RV-C3	——	——	——	——	——	7.61E+05	100
EGFP-RV-C6	300	98.15	98.70	99.49	88.16	5.78E+05	75.95
EGFP-RV-C6	500	98.89	98.62	99.48	96.20	4.59E+05	60.32
EGFP-RV-C6	750	99.22	99.15	99.63	97.92	6.16E+05	80.95

注：[1] 本项 HCD 清除率计算是与核酸酶处理前的料液比较，即
$$\text{HCD(EGFP-RV-C6)}/\text{HCD(EGFP-RV-C3)} \times 100\%。$$

确定了中空纤维膜截留相对分子质量后，进一步探索不同剪切速率和纤维内径对病毒液回收率的影响。因逆转录病毒(逆转录病毒载体)颗粒对剪切力敏感，因此剪切速率会直接影响病毒活性和回收率。另外，中空纤维管的内径会直接影响料液通量，对于相同体积的料液，内径越小，通量越小，流速越慢。

参照实施例 1 中 2.3 超滤的处理工艺，将超滤病毒液的流速控制在 38、53、79、100、106、141、212、283 mL·min⁻¹，剪切速率控制在 1441、2000、3000、4000 s⁻¹，纤维内径选择 0.5、1.0mm，膜面积选择 75 、115cm² 保持 2.3 其他处理工艺不变，得到的结果如表 6 所示。

表 6 检测结果表明，用 0.5 mm 内径，膜面积 115cm² 的中空纤维柱，柱内液体流

速为 53mL·min⁻¹，控制剪切速率为 2000 s⁻¹时，能获得最大病毒回收率。

表 6 不同剪切速率和纤维内径对病毒回收率的影响

料液名称	流速 (mL·min ⁻¹)	纤维内 径(mm)	膜面 积 (cm ²)	剪切速 率 (s ⁻¹) ^[1]	滴度 (IP·mL ⁻¹)	回收 率(%)
EGFP-RV-C4				——	5.40E+05	100
EGFP-RV-C6	100	1.0	75	1441	3.57E+05	66.11
EGFP-RV-C6	141	1.0	75	2000	3.24E+05	60.00
EGFP-RV-C6	212	1.0	75	3000	3.02E+05	55.93
EGFP-RV-C6	283	1.0	75	4000	3.08E+05	57.04
EGFP-RV-C6	38	0.5	115	1441	4.48E+05	82.96
EGFP-RV-C6	53	0.5	115	2000	5.32E+05	98.52
EGFP-RV-C6	79	0.5	115	3000	4.19E+05	77.59
EGFP-RV-C6	106	0.5	115	4000	3.68E+05	68.15

注：[1] 本项测试通过在确定型号的中空纤维柱中的流速变化来调节剪切速率。

根据超滤的原理，每次循环都能去除一定量的杂质，循环次数越多，杂质清除率越高。但是超滤工艺产生的切向流也会导致一部分的病毒失活，因此保持实施例 2.3 超滤工艺的其他步骤不变，测试了不同循环次数对病毒回收率的影响（表 7）。检测结果表明，循环超滤 5 次在最大程度保证回收率的前提下，提高了部分杂质的清除效率。

表 7 超滤浓缩不同循环次数对病毒回收率和杂质清除率的影响^[1]

料液名称	循环次 数	滴度 (IP·mL ⁻¹)	回收率 (%)	BSA 浓度 (ng/mL)	BSA 清除率 (%) ^[2]
EGFP-RV-C4	——	5.78E+05	100	2978000	——
EGFP-RV-C5(1)	1	1.36E+06	94.3	982740	86.8
EGFP-RV-C5(2)	2	1.35E+06	93.8	550930	92.6
EGFP-RV-C5(3)	3	1.34E+06	92.7	461590	93.8
EGFP-RV-C5(4)	4	1.32E+06	91.3	335025	95.5
EGFP-RV-C5(5)	5	1.30E+06	90.0	91919	98.8
EGFP-RV-C5(6)	6	1.02E+06	70.6	84561	98.9

EGFP-RV-C5(7)	7	9.40E+05	65.1	69779	99.1
EGFP-RV-C5(8)	8	8.28E+05	57.3	49444	99.3

注：[1] 浓缩倍数为 2.5 倍。

[2] BSA 清除率=[BSA(EGFP-RV-C5)×收获料液体积]/[BSA(EGFP-RV-C4)×起始料液体积]。

2.4、低速离心去除 HCP 和 BSA 的工艺优化

经过超滤步骤之后，HCD <100 ng/ml，核酸酶低于检测限 (<3.15ng/mL)，表明这两项工艺残留指标已基本达到要求。然而，HCP 和 BSA 仍略高于标准，中位数均值分别为 13078 ng/ml 和 2056 ng/ml (EGFP-RV-C6)。

参照实施例 1 中 2.4 低速离心处理工艺步骤，采用不同的离心力和离心时间，保持 2.4 其他处理工艺不变，获得不同离心力和离心时间的条件下病毒回收率和杂质清除率的结果 (表 8)。结果表明，在 4℃条件下，6000g 离心 16h 后，纯化后的料液中 HCP<1μg/mL，BSA<200ng/mL，符合下游生产工艺要求。

表 8 不同条件低速离心后的病毒回收率和杂质清除率^[1]

料液名称	离心力 (g)	离心时 间(h)	滴度 (IP·mL ⁻¹)	回收率 (%)	BSA 浓 度 (ng/mL)	BSA 清 除率 (%) ^[2]	HCP 浓 度 (ng/mL)	HCP 清除 率(%) ^[3]
EGFP-RV-C6	——	——	9.10E+06	——	2198	——	13078	——
EGFP-RV-C7	4000	4	1.03E+07	22.64	105	99.04	568	99.13
EGFP-RV-C7	4000	8	2.13E+07	46.81	165	98.50	780	98.81
EGFP-RV-C7	4000	16	2.22E+07	48.79	174	98.42	894	98.63
EGFP-RV-C7	4000	24	1.52E+07	33.41	145	98.68	691	98.94
EGFP-RV-C7	6000	4	1.23E+07	27.03	112	98.98	541	99.17
EGFP-RV-C7	6000	8	2.83E+07	62.20	154	98.60	728	98.89
EGFP-RV-C7	6000	16	3.12E+07	68.57	198	98.20	486	99.26
EGFP-RV-C7	6000	24	2.18E+07	47.91	210	98.09	856	98.69
EGFP-RV-C7	8000	4	1.64E+07	36.04	142	98.71	648	99.01
EGFP-RV-C7	8000	8	2.44E+07	53.63	146	98.67	630	99.04
EGFP-RV-C7	8000	16	2.22E+07	48.80	185	98.32	962	98.53
EGFP-RV-C7	8000	24	1.78E+07	39.12	243	97.79	1015	98.45

注:

[1] 浓缩倍数为 5 倍。

[2] BSA 清除率=[BSA(EGFP-RV-C7) ×收获料液体积]/[BSA(EGFP-RV-C6)×起始料液体积]。[3] HCP 清除率=[HCP(EGFP-RV-C7) ×收获料液体积]/[HCP(EGFP-RV-C6)×起始料液体积]。

以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说，在不脱离本发明的宗旨和范围，以及无需进行不必要的实验情况下，可在等同参数、浓度和条件下，在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例，应该理解为，可以对本发明作进一步的改进。总之，按本发明的原理，本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进，包括脱离了本申请中已公开范围，而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围，可以进行一些基本特征的应用。

1.纯化逆转录病毒的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

A)、对含有逆转录病毒的细胞培养上清液进行微滤处理，以除去所述细胞培养上清液中的细胞碎片，获得微滤病毒液；

B)、对所述微滤病毒液进行核酸酶处理，以将宿主 DNA 残留降解为小片段 DNA，获得酶消化病毒液；

C)、将所述酶消化病毒液进行超滤，使所述逆转录病毒留在截留液中，收集截留液，获得超滤病毒液；

D)、低速离心处理所述超滤病毒液，使所述逆转录病毒进行沉淀，收集沉淀，得到未经除菌的病毒。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括对所述未经除菌的病毒进行过滤除菌得到纯化的逆转录病毒的步骤。

3.如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述微滤处理中，所采用的半透膜的膜分离孔径(微膜孔径)为 $0.45\mu\text{m}$ - $0.75\mu\text{m}$ ，和/或所采用的半透膜的膜材质为改性聚醚砜。

4.如权利要求 1 或 2 或 3 所述的方法，其特征在于，所述核酸酶处理中，反应体系中的核酸酶浓度为 $1\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~ $500\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，和/或 2°C ~ 8°C 反应 8h-24h。

5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤 C)中超滤步骤中，所述超滤的截留相对分子量为 350KD-750KD 或 750KD。

6.如权利要求 1-5 中任一所述的方法，其特征在于，步骤 C)中所述超滤包括：

c1)对所述酶消化病毒液使用截留相对分子质量为 750KD、中空纤维毛细管的内径为 0.5mm、半透膜的膜面积为 0.16m^2 的中空纤维柱进行剪切速率为 2000s^{-1} 的超滤，得到一级病毒超滤液；

c2)对所述一级病毒超滤液使用截留相对分子质量为 750KD、中空纤维毛细管的内径为 0.5mm、半透膜的膜面积为 0.0115m^2 的中空纤维柱进行剪切速率为 2000s^{-1} 的超滤，得到二级病毒超滤液。

7.如权利要求 1-6 中任一所述的方法，其特征在于，步骤 D)中低速离心的处理条件为：离心力 4000g ~ 10000g ，离心 4 h~24h。

8.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述微滤处理中，所述细胞培养上清液的流速为 $89\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ - $133.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $89\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 或 $133.5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

9.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述微滤处理中，所述微滤处理的剪切速率为 2000s^{-1} - 3000s^{-1} 、 2000s^{-1} 或 3000s^{-1} 。

10.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，微滤处理中保持液体的温度在 2°C ~ 8°C 。

11.如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，低速离心的温度是 2°C ~ 8°C 。

12.如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，低速离心的温度是 4°C 。

13.由权利要求 1-12 任一项所述方法得到的逆转录病毒。

14.如权利要求 13 所述的逆转录病毒，其特征在于，逆转录病毒的 BSA< 200ng/ml ，HCP< $1\mu\text{g/ml}$ ，HCD< 100ng/ml 。

15.一种产品，其特征在于，所述产品含有权利要求 13 所述的逆转录病毒。

16.一种权利要求 13 所述的逆转录病毒在制备治疗产品中的应用。

17.如权利要求 16 所述的逆转录病毒在制备治疗产品中的应用，其特征在于，所述治疗产品包括基因治疗产品和/或细胞治疗产品和/或免疫治疗产品。