

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193115 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.08(51) Int. Cl. C12N 7/02 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.04.21(54) ЭФФЕКТИВНОЕ УДАЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ С ПОМОЩЬЮ СПОСОБА
ДИАФИЛЬТРАЦИИ

(31) 62/847,420

(32) 2019.05.14

(33) US

(86) PCT/IB2020/053775

(87) WO 2020/229906 2020.11.19

(71) Заявитель:

ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

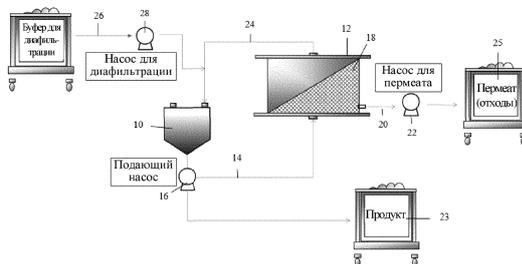
(72) Изобретатель:

Ко Хсу-Фэн, Бхатиа Равиндер,
Кришнату Сумия Моханан, Яннон
Ваишали, Ландау Джеффри Эдвард
(US), Дипенбрук Бас, Эркенс Гус
Бьорн, Мёленбрук Элизабет, Алази
Ферас Начми (NL)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу очистки вирусного вектора из раствора, содержащего вирусный вектор и белки клетки-хозяина (НСР). Способ включает обеспечение циркуляции раствора через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану с применением режима фильтрации в тангенциальном потоке (ТФФ) при загрузке до 100 л собранного материала из биореактора на квадратный метр площади поверхности ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны и в условиях пульсирующего потока, характеризующегося частотой от 1,66 до 50 Гц и амплитудой от 2 до 25%, при непрерывном добавлении буфера для диафильтрации. Способ дополнительно включает фильтрацию раствора через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану с получением пермеата и ретентата и сбор ретентата, в результате чего получают раствор очищенного вирусного вектора. Объем ретентата поддерживают постоянным путем непрерывного добавления буфера для диафильтрации. Вирусный вектор задерживается в ретентате. НСР отфильтровывается с пермеатом, и снижение уровня НСР из раствора составляет от 1,5 до 4,3 log.



A1

202193115

202193115

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571688EA/019

ЭФФЕКТИВНОЕ УДАЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ С ПОМОЩЬЮ СПОСОБА ДИАФИЛЬТРАЦИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и медицины, и более конкретно, к очистке биологических продуктов путем фильтрации.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Биологические продукты, такие как белки и вирусные векторы, в идеальном варианте содержат низкие уровни химических примесей. Вирусные векторы должны быть очищены путем удаления примесей в виде белков клетки-хозяина (НСР), остающихся после культивирования клеток. Например, в области рекомбинантных вирусных векторов существует потребность в крупномасштабном производстве и очистке вирусов фармацевтической степени чистоты. Рекомбинантные аденовирусы представляют собой хорошо известный класс вирусных векторов для применения в генной терапии и в целях вакцинации.

После размножения вирусов в клетках обычно необходимо очистить вирусы для применения у пациентов или в вакцинах. Способы очистки из предшествующего уровня техники включают, например, способы хроматографии и фильтрации. Например, в определенных способах очистки можно применять стадию ультрафильтрации/диафильтрации для концентрирования вируса и/или замены буфера, в котором содержится вирус.

Однако, несмотря на эти способы из предшествующего уровня техники, существует потребность в разработке эффективного способа очистки вирусных векторов, который обеспечивает улучшенное удаление примесей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способу очистки вирусного вектора из раствора, содержащего вирусный вектор и примеси, такие как НСР. Способ включает а) обеспечение циркуляции раствора через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану с применением режима фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) при загрузке от 5 до 100 литров собранного материала из биореактора на квадратный метр площади поверхности ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны и в условиях пульсирующего потока, характеризующегося частотой от 1,66 до 50 Гц и амплитудой от 2% до 25%, при непрерывном добавлении буфера для диафильтрации; б) фильтрацию раствора через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану с получением пермеата и ретентата и с) сбор ретентата, в результате чего получают раствор очищенного вирусного вектора. Объем ретентата поддерживают постоянным путем непрерывного добавления буфера для диафильтрации. Вирусный вектор задерживается в ретентате. НСР отфильтровывается с пермеатом, и снижение уровня НСР из раствора составляет от 1,5 log до 4,3 log.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 представляет собой схематическую диаграмму способа ультрафильтрации/диафильтрации согласно варианту осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 2 изображен колеблющийся профиль потока для поперечного потока для части способа ультрафильтрации/диафильтрации согласно варианту осуществления настоящего изобретения; и

на фиг. 3 изображен устойчивый профиль потока для поперечного потока для части способа ультрафильтрации/диафильтрации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способу очистки вирусного вектора из раствора, содержащего вирусный вектор и примеси.

Хотя следующее обсуждение сосредоточено на применении настоящего изобретения для очистки вирусных векторов, следует понимать, что этот способ может быть применим к разнообразным биологическим материалам.

Вирусы могут размножаться в клетках (иногда называемых "клетками-хозяевами"). Клетки культивируют для увеличения количества клеток и вирусов и/или титров вирусов. Культивирование клетки проводится для того, чтобы она могла метаболизировать и продуцировать вирус, представляющий интерес. Это можно осуществлять с помощью способов, хорошо известных в этом качестве специалистам в данной области.

Примеры вирусных векторов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, поксвирусные векторы, векторы на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), энтеровирусные векторы, векторы на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей, векторы на основе вируса леса Семлики, векторы на основе вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т. д.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой аденовирусный вектор. Аденовирус согласно настоящему изобретению принадлежит к семейству Adenoviridae и предпочтительно представляет собой аденовирус, принадлежащий к роду Mastadenovirus. Он может представлять собой аденовирус человека, а также аденовирус, который инфицирует другие виды, в том числе без ограничения аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус крупного рогатого скота 3, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус нечеловекообразных обезьян и аденовирус человекообразных обезьян, как, например, аденовирус шимпанзе или аденовирус горилл). Аденовирус предпочтительно представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu) или аденовирус обезьян, как, например, аденовирус шимпанзе или горилл (ChAd, AdCh или SAdV). В настоящем изобретении подразумевается аденовирус человека, если упоминается Ad без указания вида, например, краткое обозначение "Ad26" означает то же, что и HAdV26, а именно

аденовирус человека серотипа 26. Также используемое в настоящем изобретении обозначение "rAd" означает рекомбинантный аденовирус, например, "rAd26" относится к рекомбинантному аденовирусу человека серотипа 26.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса согласно настоящему изобретению лежит аденовирус человека. В предпочтительных вариантах осуществления в основе рекомбинантного аденовируса лежит аденовирус человека серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т. д. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26.

Специалисту в данной области будет понятно, что элементы, полученные из нескольких серотипов, можно объединять в одном рекомбинантном аденовирусном векторе. Таким образом можно получить химерный аденовирус, в котором сочетаются требуемые свойства от различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в химерном аденовирусе по настоящему изобретению может сочетаться отсутствие предсуществующего иммунитета от первого серотипа с такими характеристиками, как термостабильность, сборка, заякоривание, выход при получении, перенаправленная или улучшенная инфекционность, стабильность ДНК в клетке-мишени и т. п.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор, применимый в настоящем изобретении, получен главным образом или полностью из Ad26 (т. е. вектор представляет собой rAd26). Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники. Получение векторов на основе rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virol* 81(9): 4654-63. Иллюстративные последовательности генома Ad26 находятся в GenBank под номером доступа EF 153474 и в WO 2007/104792 под SEQ ID NO: 1. Примеры векторов, применимых в настоящем изобретении, включают, например, векторы, описанные в WO 2012/082918, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Однако следует понимать, что способ по настоящему изобретению не ограничен вирусами из группы аденовирусов, а скорее может быть применим к широкому спектру других вирусов (например, аденоассоциированному вирусу, поксвирусам, иридовирусам, вирусам герпеса, паповавирусам, парамиксовирусам, ортомиксовирусам, ретровирусам, вирусу осповакцины, ротавирусам, флавивирусам) и другим биологическим материалам, таким как белки.

Биологические продукты, как правило, содержат разнообразные загрязняющие вещества или примеси, остающиеся после культивирования клеток. "Загрязняющее вещество" или "примесь" представляет собой любой компонент нового лекарственного средства, не являющийся лекарственной субстанцией или наполнителем в лекарственном средстве. Способ по настоящему изобретению направлен на удаление белков клетки-хозяина (НСР), но другие примеси могут быть или могут не быть удалены вместе с

удалением НСР. Примеры таких примесей включают без ограничения ДНК клетки-хозяина (НС-DNA), Triton X-100, Tris, фосфат натрия (одноосновный и двухосновный), хлорид магния ($MgCl_2$), HEPES и инсулин.

Более конкретно, вирус (продукт) высвобождается в среду после химического лизиса клеточной мембраны, а затем примеси в лизированном собранном материале флокулируют. После удаления этих примесей материал осветляют для загрузки на хроматографическую мембрану. Полученный материал (вирусный вектор) представляет собой концентрированный продукт, который также содержит другие примеси, такие как НСР или НС-DNA.

Согласно настоящему изобретению вирусный вектор затем подвергают ультрафильтрации/диафильтрации для удаления примесей, таких как НСР, оставшихся после культивирования клеток, с целью очистки вирусного вектора. Предпочтительный способ ультрафильтрации/диафильтрации представляет собой фильтрацию в тангенциальном потоке.

Как видно из фиг. 1, на ней представлена схематическая диаграмма способа ультрафильтрации/диафильтрации согласно варианту осуществления настоящего изобретения. Подающий резервуар 10 содержит раствор образца, который должен быть отфильтрован, например, раствор, содержащий вирусный вектор, представляющий интерес. Раствор поступает в фильтрационную установку 12 через подающий канал или линию подачи 14. В линии подачи 14 предпочтительно предусмотрен первый механический насос 16 для обеспечения циркуляции и регулирования потока раствора. Фильтрационная установка 12 содержит ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18. По мере поступления подаваемого раствора в фильтрационную установку 12 ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана 18 разделяет раствор на пермеат и ретентат.

Буфер для диафильтрации непрерывно добавляют к подаваемому раствору в подающем резервуаре 10 через диафильтрационную линию 26 для поддержания общего объема продукта (ретентата). В линии 26 подачи буфера для диафильтрации может быть предусмотрен второй насос 28 для регулирования поступления буфера для диафильтрации в подающий резервуар 10. Можно использовать любой известный буфер, который не будет оказывать влияния на вирус, который должен быть очищен. Буфер предпочтительно имеет рН, составляющий примерно 6,2, и содержит малые молекулы для стабилизации продукта/вирусных частиц. На стадии диафильтрации предпочтительно заменяют от 7 до 11 объемов диафильтрации (DFV). На стадии диафильтрации более предпочтительно заменяют 10 DFV.

В одном варианте осуществления в линии подачи 14 могут быть предусмотрены один или несколько детекторов (не показаны) для измерения давления по разные стороны ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны 18.

Перепад давления по разные стороны ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны 18 вынуждает подаваемый раствор, и более конкретно, примеси, протекать

через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18, так что примеси содержатся в пермеате. Более конкретно, подаваемый раствор, содержащий вирусный вектор, проходит через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 так, что примеси удаляются из подаваемого раствора и задерживаются в пермеате, тогда как вирусный вектор не способен проходить через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 и, таким образом, задерживается в ретентате.

Площадь поверхности ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны 18 может быть выбрана в зависимости от объема подаваемого раствора, который должен быть очищен. Ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана 18 может иметь разные размеры пор в зависимости от очищаемого биологического материала (например, вирусного вектора) и содержащихся в нем примесей. Ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана 18 предпочтительно имеет размер пор, достаточно малый, чтобы задерживать вирусный вектор в ретентате, но достаточно большой, чтобы эффективно удалять примеси (т. е. позволять примесям проходить через поры мембраны) в пермеат. Для аденовирусного вектора в способе ультрафильтрации/диафильтрации используется мембрана 18, характеризующаяся номинальным молекулярно-массовым пределом (NMWL) в диапазоне от 100 до 1000 килодальтонов (кДа), предпочтительно в диапазоне от 300 до 500 кДа и более предпочтительно 300 кДа. Таким образом, примеси, такие как НСП (молекулярная масса от примерно 10 до 200 кДа), способны проходить через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 (и включаться в пермеат), тогда как вирусные частицы, имеющие больший размер, чем поры, задерживаются ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраной 18 в ретентате. Иными словами, ретентат содержит конечный продукт (вирус).

Ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана 18 может состоять, например, из регенерированной целлюлозы, полиэфирсульфона, полисульфона или их производных. Ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана 18 может представлять собой мембрану любого известного типа или конфигурации, например, плоский лист или пластину, спирально навитый элемент, трубчатый элемент или полые волокна. В одном варианте осуществления настоящего изобретения ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана 18 представляет собой ультрафильтрационную кассету Pellicon® 2 производства MilliporeSigma.

Пермеат выходит из фильтрационной установки 12 через канал для пермеата или линию 20 для пермеата и направляется в резервуар 25 для сбора пермеата. В одном варианте осуществления, как показано на фиг. 1, в линии 20 для пермеата предусмотрен третий механический насос 22 для регулирования потока пермеата по линии 20 для пермеата. Другими словами, отделение примесей от вирусного вектора осуществляется с помощью первого насоса 16, который подает подаваемый раствор и ретентат и обеспечивает их рециркуляцию, и третьего насоса 22, который облегчает прохождение

примесей (например, НСР) через поры мембраны и удаление пермеата.

Ретентат, который содержит вирусный вектор, представляющий интерес, проходит по каналу для ретентата или линии 24 для ретентата, которая обеспечивает его рециркуляцию обратно в подающий резервуар 10. Первый насос 16 обеспечивает поступление и рециркуляцию подаваемого раствора/ретентата на ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 и через нее при плотности потока от примерно 250 литров/м²/час (LMH) до примерно 400 LMH и более предпочтительно примерно 360 LMH. Для подаваемого раствора/ретентата предпочтительно поддерживаются постоянные скорость потока и объем. Подаваемый раствор/ретентат предпочтительно поступает на ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 при загрузке от 5 до 100 л собранного материала из биореактора на м² площади мембраны, более предпочтительно от 5 до 60 л собранного материала из биореактора на м² площади мембраны, и наиболее предпочтительно при загрузке от 5 до 45 л собранного материала из биореактора на м² площади мембраны.

Работа третьего насоса 22 и скорость потока пермеата являются функцией (т. е. зависят от) работы первого насоса 16 и скорости потока подаваемого раствора/ретентата. Скорость потока пермеата предпочтительно устанавливают на уровне менее 20% от скорости потока подаваемого раствора/ретентата, более предпочтительно от 5% до 15% и наиболее предпочтительно примерно 10%. Таким образом, если подаваемый раствор/ретентат поддерживается при скорости потока от 250 до 400 LMH, то пермеат предпочтительно поддерживается третьим насосом 22 при скорости потока от 25 до 40 LMH и наиболее предпочтительно при скорости потока 36 LMH (т. е. на уровне 10% от заданного целевого значения скорости потока 360 LMH для подаваемого раствора/ретентата).

В одном варианте осуществления первый насос 16 предпочтительно представляет собой насос прямого вытеснения. В одном варианте осуществления как первый насос 16, так и третий насос 22 представляют собой насосы прямого вытеснения. Примеры насосов прямого вытеснения, которые могут быть использованы, включают, например, коловратный насос, винтовой насос кавитационного типа, роторный шестеренчатый насос, поршневой насос, диафрагменный насос, винтовой насос, зубчатый насос, гидравлический насос, пластинчатый насос, перистальтический насос, канатный насос и насос с гибким импеллером. В предпочтительном варианте осуществления первый насос 16 представляет собой перистальтический насос. Третий насос 22 предпочтительно также представляет собой перистальтический насос.

В предпочтительном варианте осуществления способ ультрафильтрации/диафильтрации осуществляют в условиях колеблющегося профиля потока, где колеблющийся профиль потока приводит к пульсирующему движению жидкости. Предпочтительно только первый насос 16 работает в условиях колеблющегося профиля потока, тогда как другие насосы в системе работают в условиях относительно

устойчивого (неколеблющегося) профиля потока, что означает, что профиль потока может характеризоваться колебаниями небольшой амплитуды, но является относительно устойчивым. Однако также возможно, что другие насосы, такие как третий насос 22, также работают в условиях колеблющегося профиля потока. Например, предпочтительный колеблющийся профиль потока в способе показан на фиг. 2 в сравнении с более плавным, устойчивым профилем потока, показанным на фиг. 3.

Пульсирующее движение жидкости, вызываемое колебаниями потока, как показано на фиг. 2, позволяет большему количеству примесей (например, НСР) проходить через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 в пермеат, чем позволялось бы при более устойчивом движении жидкости, которое было бы достигнуто за счет более плавного, устойчивого профиля потока согласно фиг. 3. Благодаря способу ультрафильтрации/диафильтрации по настоящему изобретению предпочтительно происходит снижение уровня примесей (например, НСР), составляющее более 1,5 log, и более предпочтительно снижение уровня примесей, составляющее от 1,5 до 4,3 log, и наиболее предпочтительно снижение уровня примесей, составляющее от 1,5 до 2,3 log.

В предпочтительном варианте осуществления первый насос 16 предпочтительно работает для достижения пульсирующего потока с заданной частотой и амплитудой. Пульсирующий поток из первого насоса 16 более предпочтительно характеризуется частотой от 1,66 до 50 Гц, более предпочтительно от 1,66 до 33 Гц и еще более предпочтительно от 1,66 до 25 Гц. Пульсирующий поток из первого насоса 16 предпочтительно характеризуется соответствующей амплитудой от 2% до 25%.

В частности, при проведении способа ультрафильтрации/диафильтрации в условиях пульсирующего движения жидкости, характеризующегося частотой от 1,66 до 50 Гц и амплитудой от 2% до 25%, может быть достигнуто снижение, составляющее более чем 1,5 log, и, более конкретно, снижение уровня примесей (например, НСР), составляющее от 1,5 до 4,3 log. Это значительно больше, чем снижение, которое может быть достигнуто с помощью традиционных способов.

В одном варианте осуществления первый насос 16 также предпочтительно работает для достижения заданного или целевого вытесняемого объема. Первый насос 16 более предпочтительно работает для достижения заданного или целевого удельного вытеснения, выраженного в виде объема, вытесняемого за один оборот на квадратный метр площади поверхности ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны 18 (мл/об./м²). В одном варианте осуществления согласно настоящему изобретению первый насос 16 работает для достижения удельного вытеснения в диапазоне от 10 до 100 мл/об./м² и предпочтительно в диапазоне от 17 до 83 мл/об./м², что обеспечивает превосходную очистку от примесей.

Способ ультрафильтрации/диафильтрации согласно вариантам осуществления настоящего изобретения проиллюстрирован следующими неограничивающими примерами.

Примеры 1-10 по настоящему изобретению. Необходимо было обработать элюат

вирусного вектора на основе аденовируса серотипа 26, полученный с помощью анионообменной (АЕХ) хроматографии. Элюат разделяли на контролируемые партии, и обеспечивали рециркуляцию каждой партии элюата через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 с порогом отсечения 300 кДа при постоянной скорости потока 360 LMН в условиях колеблющегося профиля потока (т. е. пульсирующего движения жидкости) и загрузке от 30 до 40 л собранного материала из биореактора на м² площади мембраны. Скорость потока пермеата поддерживали на уровне 36 LMН. Частота пульсирующего движения жидкости находилась в диапазоне от 1,66 до 50 Гц, а его амплитуда находилась в диапазоне от 2% до 25%. Кроме того, поддерживали удельное вытеснение в диапазоне от 17 до 83 миллилитров за один оборот на квадратный метр площади поверхности ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны. В ходе фильтрации элюата с помощью ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны 18 вирусные частицы задерживались в ретентате, тогда как НСР и другие примеси отфильтровывались с пермеатом. В ходе процесса фильтрации к ретентату добавляли буфер для поддержания целевого общего объема продукта. Способ ультрафильтрации/диафильтрации завершали после замены 10 DFV. Этот способ осуществляли несколько раз, используя элюат, полученный с помощью АЕХ, характеризующийся различными начальными концентрациями НСР.

Сравнительные примеры 1-12. Обеспечивали рециркуляцию элюата вирусного вектора на основе аденовируса серотипа 26, полученного с помощью анионообменной (АЕХ) хроматографии, через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18 с порогом отсечения 300 кДа в условиях устойчивого профиля потока. В ходе фильтрации элюата с помощью ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны 18 вирусные частицы задерживались в ретентате, тогда как НСР и другие примеси отфильтровывались с пермеатом. К ретентату добавляли буфер для поддержания целевого общего объема продукта. Способ ультрафильтрации/диафильтрации завершали после замены 10 DFV. Этот способ осуществляли несколько раз, используя элюат, полученный с помощью АЕХ, характеризующийся различными начальными концентрациями НСР, различными значениями скорости потока рециркуляции, различными значениями скорости потока пермеата и различными значениями давления ретентата.

В таблице 1 представлены результаты этих различных экспериментов.

Таблица 1. Очистка от НСР с помощью ультрафильтрации/диафильтрации

Пример	Профиль потока	Начальная концентрация НСР (мкг/мл)	Конечная концентрация НСР (мкг/мл)	Log снижения
Пример 1 по настоящему	Колеблущийся	32,0	< 0,2	> 2,2

изобретению				
Пример 2 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	40,2	< 0,2	> 2,2
Пример 3 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	9,6	< 0,2	> 1,9
Пример 4 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	6,7	< 0,2	> 1,6
Пример 5 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	5,99	< 0,2	> 1,5
Пример 6 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	32,98	0,63	1,8
Пример 7 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	26,54	< 0,2	> 2,1
Пример 8 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	23,28	< 0,2	> 2,0
Пример 9 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	10,72	0,28	1,5
Пример 10 по настоящему изобретению	Колеблущийс я	28,31	< 0,2	> 2,2
Сравнительный пример 1	Устойчивый	37,5	5,3	1,1
Сравнительный пример 2	Устойчивый	37,5	5,2	1,2
Сравнительный пример 3	Устойчивый	32,0	1,8	1,3

Сравнительный пример 4	Устойчивый	37,5	2,3	1,2
Сравнительный пример 5	Устойчивый	30,6	6,0	0,71
Сравнительный пример 6	Устойчивый	10,27	0,96	1,0
Сравнительный пример 7	Устойчивый	10,44	1,61	0,78
Сравнительный пример 8	Устойчивый	10,2	0,59	1,2
Сравнительный пример 9	Устойчивый	4,4	0,20	1,3
Сравнительный пример 10	Устойчивый	10,32	0,47	1,3

В сравнительных примерах, обобщенных в таблице 1, различные параметры способа, такие как скорость потока рециркуляции, скорость потока пермеата и давление ретентата, изменяли при поддержании устойчивого профиля потока. Даже при изменении этих других параметров способа эффективное удаление НСР (т. е. снижение уровня НСР, составляющее более чем 1,5 log, и конечный уровень НСР, составляющий менее 0,2 мкг/мл) по-прежнему не могло быть достигнуто. Как показано в таблице 1, только при осуществлении способа ультрафильтрации/диафильтрации в условиях колеблющегося профиля потока может быть достигнуто снижение уровня НСР, составляющее более чем 1,5 log (и, более конкретно, снижение, составляющее от 1,5 до 4,3 log). Предположительно механизм пульсации жидкости вызывает нарушение слоя геля, выстилающего ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану 18, в достаточной степени, чтобы позволить НСР проходить через поры мембраны с большей легкостью, чем когда слой геля остается полностью нетронутым в условиях неп пульсирующего движения жидкости.

Дальнейшие эксперименты проводили в условиях примеров 1-3 по настоящему изобретению, где некоторые примеры попадали в предпочтительный диапазон частоты и амплитуды пульсирующего потока, тогда как другие находились за пределами предпочтительного диапазона. Эти результаты обобщены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры способа ультрафильтрации/диафильтрации

№ прогона	Количество барабанов	Об./мин *	Частота (об./мин*коли)	Амплитуда (% изменения)	Площадь мембраны (м ²)	ID системы трубок	Вытеснение за один оборот (мл/об.)	Удельное вытеснение (мл/об./)	Log снижения уровня НСР
-----------	----------------------	-----------	------------------------	-------------------------	------------------------------------	-------------------	------------------------------------	-------------------------------	-------------------------

			чес тв о бара бан о в)/60 (Гц)	скоро сти пото ка)		(дюйм)		м ²)	
1	2	90	3	4%	5	1	326,7	65,2	> 2,21
2	2	90	3	4%	5	1	326,7	65,2	> 1,64
3	2	216	7,2	23%	1,5	0,5	41,5	27,67	> 1,7
4	2	245, 2	8,2	24%	1,5	0,5	41,5	27,67	> 1,5
5	1 (4 поршня)	948, 5	63,2	1,90%	1,5	0,5	9,7	6,5	0,37
6	1 (4 поршня)	1015	67,7	1,50%	1,5	0,5	9,4	6,3	0,09
7	1 (4 поршня)	989	65,9	1,60%	1,5	0,5	9,0	6,0	0,75
8	1 (4 поршня)	1020	68	1,70%	1,5	0,5	9,2	6,1	1,3
9	1 (4 поршня)	1020	68	2,10%	1,5	0,5	9,3	6,2	1,24

* Все заданные значения об./мин выбраны так, чтобы получить в результате поток/плотность потока ретентата на уровне 360 LMH.

Как видно из результатов, обобщенных в таблице 2, если частота и амплитуда пульсирующего потока поддерживаются в предпочтительных диапазонах (т. е. частота от 1,66 до 50 Гц и амплитуда от 2% до 25%), то происходит снижение уровня примесей, составляющее от 1,5 до 4,3 log. С другой стороны, если частота и/или амплитуда выходят за пределы предпочтительных диапазонов, как, например, в прогонах 5-9, то снижение уровня примесей является значительно более низким.

Согласно способу по настоящему изобретению после осуществления способа

ультрафильтрации/диафильтрации не требуется никакой дополнительной очистки. Однако следует понимать, что продукт необязательно может быть дополнительно очищен с помощью способов, общеизвестных для специалистов в данной области, таких как центрифугирование в градиенте плотности, хроматография и т. п.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от общей идеи изобретения. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предполагает охват модификаций в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки вирусного вектора из раствора, содержащего вирусный вектор и белки клетки-хозяина (НСР), включающий:

а) обеспечение циркуляции раствора через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану с использованием режима фильтрации в тангенциальном потоке (ТФФ) при загрузке от 5 до 100 литров собранного материала из биореактора на квадратный метр площади поверхности ультрафильтрационной/диафильтрационной мембраны и в условиях пульсирующего потока, характеризующегося частотой от 1,66 до 50 Гц и амплитудой от 2% до 25%, при непрерывном добавлении буфера для диафильтрации;

б) фильтрацию раствора через ультрафильтрационную/диафильтрационную мембрану с получением пермеата и ретентата, при этом объем ретентата поддерживают постоянным путем непрерывного добавления буфера для диафильтрации, при этом вирусный вектор задерживается в ретентате, и НСР отфильтровывается с пермеатом, при этом снижение уровня НСР из раствора составляет от 1,5 до 4,3 log; и

в) сбор ретентата, в результате чего получают раствор очищенного вирусного вектора.

2. Способ по п.1, где вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор.

3. Способ по п.1, где ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана характеризуется NMWL, составляющим от приблизительно 100 кДа до приблизительно 500 кДа.

4. Способ по п.3, где ультрафильтрационная/диафильтрационная мембрана характеризуется NMWL, составляющим приблизительно 300 кДа.

5. Способ по п.1, где скорость потока раствора, который должен быть отфильтрован, находится в диапазоне от 250 литров/м²/час (LMH) до 400 LMH.

6. Способ по п.5, где скорость потока раствора, который должен быть отфильтрован, составляет примерно 360 LMH.

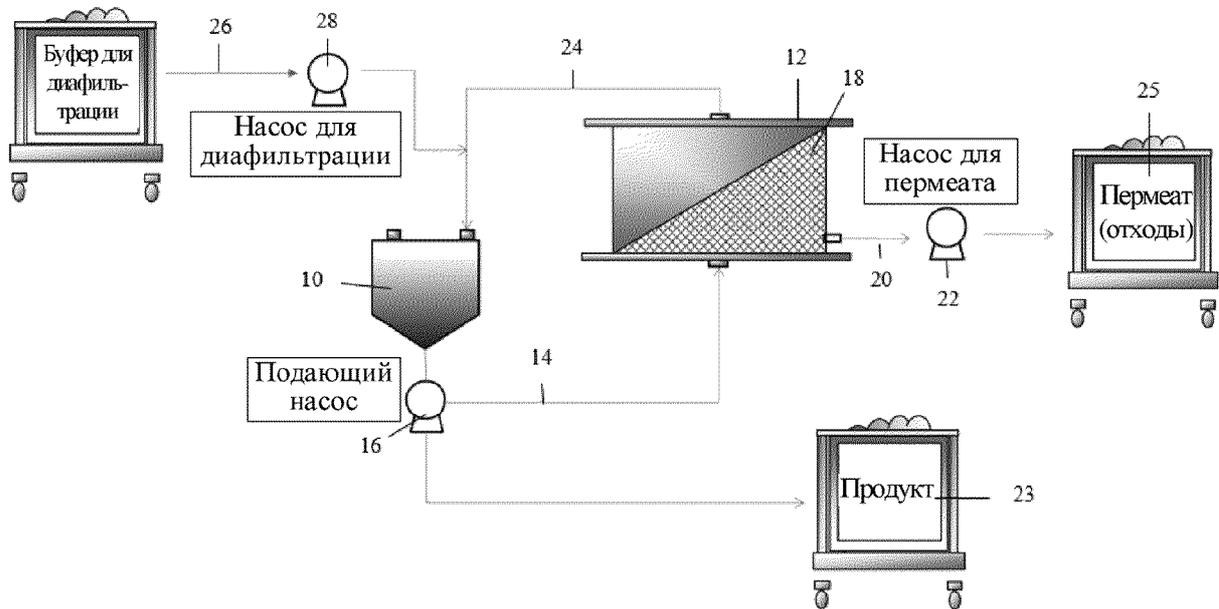
7. Способ по п.5, где скорость потока раствора, который должен быть отфильтрован, является постоянной.

8. Способ по п.5, где скорость потока пермеата составляет от 5% до 15% от скорости потока раствора, который должен быть отфильтрован.

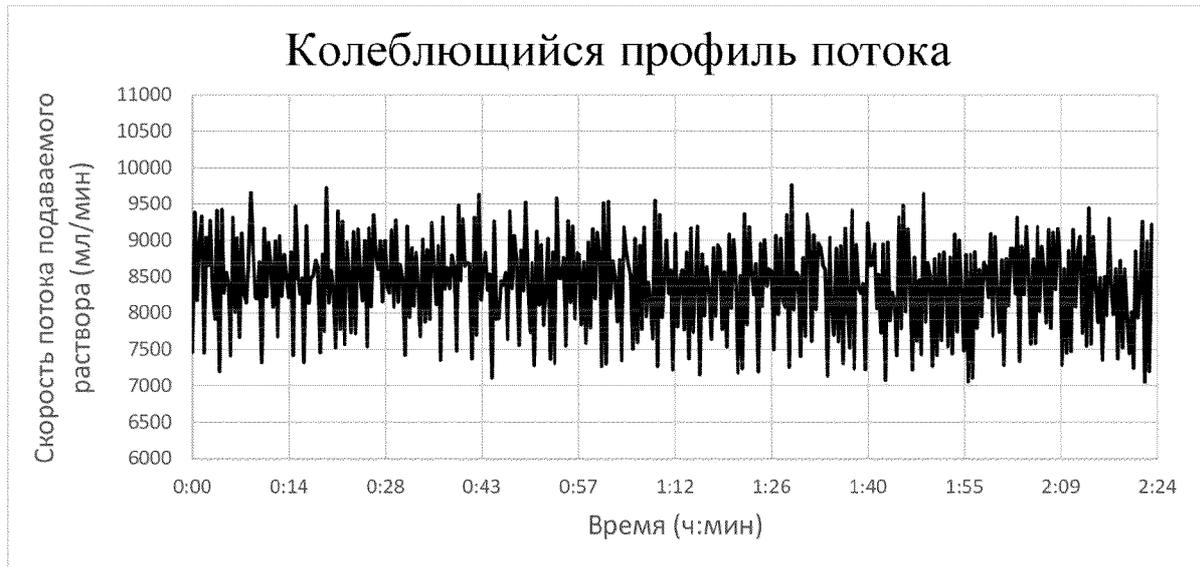
9. Способ по п.1, где фильтрацию раствора осуществляют с использованием перистальтического насоса.

По доверенности

Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

