

腺病毒纯化研究

孙爱喜

上海元宋生物技术有限公司 上海 201401

摘要：腺病毒是肿瘤免疫治疗领域的最常用的一种溶瘤病毒，通过裂解肿瘤细胞和激活机体自身免疫来发挥作用。本研究开发的重组腺病毒规模纯化工艺，全封闭设计和自动化操作符合《药品生产质量管理规范》基本原则和相关要求。经验证工艺稳定总收率高，原液的浓度高、纯度高、活性高；制剂的安全性、滴度、纯度、生物活性等均符合药物临床研究质量标准。

关键词：溶瘤病毒；重组腺病毒；纯化；离子交换层析

一、综述

腺病毒（Adenovirus, AdV）是常用的一种溶瘤病毒，有多种策略改造增强其肿瘤靶向性和有效性，近些年不断有新的腺病毒载体研制成功。溶瘤病毒（Oncolytic virus, OV）是一类能选择性感染并进行大量复制最终溶解肿瘤细胞而不损伤正常细胞的天然或重组病毒，对癌细胞具有直接细胞毒性作用，还可增强宿主免疫反应，建立持续的抗肿瘤免疫破坏剩余肿瘤组织^[1]。利用溶瘤病毒开发出的肿瘤治疗药物称为溶瘤病毒药物，发展经历三个阶段：一代产品主要野生病毒株发现及应用；二代产品通过基因工程的手段改造病毒株；三代产品通过插入免疫调节基因及联合治疗增强溶瘤效果。溶瘤病毒多种多样包含DNA病毒和RNA病毒，它们感染宿主细胞和复制能力具有差异，其中腺病毒、疱疹病毒是热门改造病毒类型^[2]。

（一）纯化目的

从细胞培养收获液中分离纯化腺病毒，纯化后腺病毒的杂蛋白HCP < 100ng/ml、核酸残留HCD < 10ng/ml。腺病毒培养收获液裂解后含有大量杂质，包括不完整病毒颗粒、病毒外壳、细胞毒素、培养基、细胞碎片等。病毒纯化就是在保持生物活性和感染性的前提下，利用物理或化学方法最大程度去除细胞宿主成分，将病毒从宿主细胞内提纯出来。

（二）腺病毒

腺病毒粒径70nm~90nm，基因组大小通常在30~40kb，二十面体衣壳的非包膜病毒^[3]。人类腺病毒包含104种候选血清型，5型腺病毒（Ad5）是临床研究最常用的病毒载体。Ad5通过纤维旋钮（fiber knob）与柯萨奇腺病毒受体（Coxsackie-adenovirus receptor, CAR）

的相互作用进入靶细胞^[4]，主要引起人体上呼吸道感染。5型腺病毒具有易编辑、病毒滴度高且安全的优点，溶瘤腺病毒在肿瘤治疗方面潜力巨大，与传统肿瘤治疗的方式相比，溶瘤腺病毒具有靶向性高、副作用小和肿瘤细胞杀伤效率高的优点。

腺病毒是表面具有蛋白外壳的无囊膜双链DNA病毒，衣壳蛋白带有的净电荷取决于表面氨基酸集团的PH值，具有在酸性条件下等电点，在中性PH条件下带负电荷，因此可用阴离子吸附交换层析方法纯化；细胞裂解产物中腺病毒颗粒明显比蛋白大，因此可用分子筛分离纯化。由于腺病毒粒子的大尺寸，导致有些层析纯化方法柱层析收获阶段病毒粒子显著丢失，选择层析纯化方案时还需考虑腺病毒的相对易碎性，离子强度的快速变化，以及溶液PH > 8.0，都可能导致腺病发生聚集、破裂、失活。在一些纯化策略中，由于渗透作用导致病毒粒子的分解现象也可能出现。

（三）选择纯化策略

层析策略CIPP（Capture, Intermediate purification, Polishing）利用组合层析技术纯化蛋白，获得合适纯度和收率的纯化路线。研究证明阴离子层析纯化+分子筛过滤2步层析可获得高纯度腺病毒，且有多种填料选择如：①强阴离子凝胶Q sepharose XL+高分辨阴离子凝胶source 30Q；②强阴离子凝胶Q sepharose HP+复合型凝胶Capto core 700；③强阴离子凝胶Q sepharose XL+分子筛凝胶Sephacryl S6 FF；④强阴离子凝胶Capto Q ImpRes+复合型凝胶Capto core 700等。

（四）分析方法

高效液相色谱法HPLC（High Performance Liquid

Chromatography) 分析纯化的效果, 不受杂蛋白影响可检未纯化的裂解液样品, HPLC法可对纯化全程所有的腺病毒样品进行鉴定和量化分析, 还有分析快速30min每样品, 样品量少 μL 数量级, 样品不易被破坏等优点。

二、材料与方法

(一) 细胞和病毒

细胞 HEK 293 购自 ATCC (American type culture collection); 悬浮细胞 293F 购自赛默飞 (Thermo Fisher); 重组 5 型腺病毒由上海元宋生物技术有限公司改造合成。

(二) 材料和试剂

Dynamis 培养基购自 gibco; EmCD HEK293 Plus、EmACF HEK293 Plus 培养基产自艾美能斯; 293Pro[®] CD 293 无血清培养基产自源培; Celer-S101、Celer-S001 产自倍谙基; DMEM 培养基产自 gibco; 胎牛血清购自 gibco; Q Sepharose XL、Sepharose 4FF 填料购自 Cytiva, 300kD 中空纤维柱购自 Repligen, Fibracel Disks 购自 eppendorf 公司。

A 液 (20 mM Tris、2 mM MgCl_2 , pH 8.0), B 液 (20 mM Tris、1000mM NaCl、2 mM MgCl_2 , pH 8.0) 和 C 液 (20 mM Tris、100mM NaCl、2 mM MgCl_2 , 5% 蔗糖、pH 8.0), 纯化工艺优化配方及新增液相均由实验室自制。

(三) 主要设备

生物反应器 BioFlo 320 购自 eppendorf; 蛋白纯化层析系统 AKTA pilot 600 购自 GE; 蛋白质分离纯化系统 AKTA Pure 购自 Cytiva; 蛋白纯化系统 Unique Auto Pre 购自英赛斯; 蛋白层析系统 ACHROM Firin Plus 100T 自泰渡; 实验室层析系统 Bio-Lab100 自汉凰; 蛋白纯化系统 PPS-HD 自艾纯; 蛋白层析系统 PPS-100 购自中科森辉; 磁驱 CO_2 立式单温恒温振荡器 UL 1L 12C 购自永联; CO_2 培养箱 Forma I 160 购自 Thermo; 台式低速离心机 RJ-TDL-40B 购自瑞江; 蠕动泵 L600-1F 购产自兰格; 高效液相色谱仪 LC-2030C 3D 购自岛津。

(四) 试验方法

采用贴壁和悬浮工艺培养 HEK 293 细胞扩增重组腺病毒, 研究上游工艺对下游纯化的影响。多种纯化方法、填料、流动相、盐浓度离子层析纯化, 根据检测结果调整纯化参数, 直至达到理想的纯化效果。

1. 上游细胞培养

(1) 细胞瓶贴壁培养

复苏 HEK293 细胞接种于细胞方瓶, 添加含 10%FBS

的 DMEM 置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 生产规模较大时可用细胞工厂, 可有效节省空间, 减少人员操作降低污染风险, 实现贴壁培养工艺大规模生产。

(2) 生物反应器贴壁培养

篮式搅拌桨和 Fibracel[®] disk 5L 反应器连续培养, 检查 PH、温度、溶氧电极完整性及灵敏度, 反应罐装填 disk 加入适量 PBS 湿热灭菌, 冷却后连接控制系统, 放掉 PBS 泵入含 10% FBS 的 DMEM 接种 HEK293 细胞, 待细胞固定在片状载体上开始连续培养, 每日监测糖耗调节补料速度、确认培养结束时间。

(3) 病毒扩增

细胞培养至理想密度后, 按各自工艺 SOP 接种腺病毒, 培养 48h 收获。

2. 病毒纯化

初始纯化策略参考 Cytiva (原 GE 生命科学部) 推荐腺病毒载体 Ad5 纯化路线: 细胞裂解→过滤澄清→中空纤维 300kD 超滤浓缩→Q Sepharose XL 捕获层析→Sepharose 4FF 过滤层析。层析纯化搭配分子筛 2 步层析纯化, 根据纯化小试检测结果, 逐步调整纯化参数。

细胞裂解: 腺病毒富集于细胞内, 需破碎细胞释放病毒。常用冻融裂解、低渗裂解、化学裂解和机械裂解方法, 前 3 种方法试验均有应用。随着细胞破裂, 宿主核酸释放使得病毒液变粘稠, 无法直接澄清或纯化, 极易堵塞滤器和纯化柱。Benzonase 核酸酶可降解所有形式的 DNA 或 RNA, 降解成 2~5 个碱基的 5' 单磷酸核苷酸, 有效降低病毒液黏度。生物反应器中加入裂解液: 0.5% tween80+20u Benzonase/ml+1mM MgCl_2 , 37°C 培育 2~4h, 开启搅拌充分混匀。

三、试验结果

(一) 上游对纯化的影响

贴壁、悬浮培养工艺均可进行重组腺病毒的大规模生产。优先选择悬浮培养工艺, 腺病毒颗粒数稳定在 $5 \times 10^{10}\text{VP/mL}$ 左右, 批次间稳定性好结果差异小。用于商业化生产的生物制品应尽量避免使用含动物源的物料, 避免使用血清可能存在的微生物污染风险。悬浮工艺可实现无血清培养, 无血清培养是行业发展的方向。

细胞悬浮培养和贴壁培养对腺病毒的敏感性不同, 需建立相应的病毒接种工艺; 贴壁培养病毒的细胞单产高, 悬浮培养单位体积的病毒含量高; 培养基成分不同对产毒影响明显, 一是细胞生长状态 (倍增速度和活

力)不同,二是相同工艺接毒的产毒量不同,甚至有的培养基几乎就不产毒;悬浮培养杂质含量也高;以上都会对下游纯化产生影响。

(二) 细胞破碎化学裂解

细胞破碎大生产用化学裂解法,生物反应器内加入裂解液和核酸酶操作简便,用时最短;冻融破碎细胞反复冻融3次耗时长,适用于小试规模;低渗裂解提取细胞去培养基加等体积低渗溶液重复2-3次,体积变大、工序繁琐不适用于规模生产。

(三) 纯化异常原因分析

纯化工艺开发过程发现存在病毒聚集、收率低等异常情况。前文所述原因外,还有工艺及纯化设备的影响因素。澄清处理时超过滤器处理能力,通过增加压力强行完成过滤可能损伤病毒影响纯化收率;洗脱方式和盐浓度影响纯化收率;纯化设备控制系统软件的完善程度和控制精度会影响腺病毒纯化收率;纯化样品系统泵上样,混合器高速旋转或损伤腺病毒会导致纯化病毒聚集;“背压阀”故障发生虹吸,高盐流动相进入层析柱病毒异常洗脱等。问题均已解决。

(四) 建立规模纯化工艺

重组腺病毒商业规模纯化3步层析法,病毒纯化工艺路线:澄清过滤→Q Sepharose XL粗纯层析→Q Sepharose XL精纯层析→Sepharose 4FF分子筛层析→除菌过滤(0.22 μm),粗纯,捕获病毒去除大部分杂质;精纯,去除粗纯剩余的大部分杂质;分子筛层析,去除与重组腺病毒性质接近的残留微量杂质和无机盐达到最终纯度。

四、讨论

重组腺病毒生产上下游工艺互有影响,开发纯化工艺需考虑上游工艺的影响。上游工艺倾向于生产高效价的腺病毒产品,细胞株、细胞数量、细胞活力、接毒量、培养基以及其他产品质量特征的改变都可能影响腺病毒的效价,不同工艺的病毒液杂质成分及含量明显不同,会影响下游纯化,上游工艺调整提前与下游沟通,可共同评估可行性,防止超出纯化处理能力导致整体工作推到重来。

综上,开发重组腺病毒商业规模纯化工艺稳定可行,匹配生产规模和多种培养工艺;运用多种层析方法,各步层析纯化设置合理;纯化步骤精简,工艺步骤可线性放大;是平衡重组腺病毒特性、生产工艺规模、纯化收率、纯化工艺步骤等影响因素的最佳纯化方案。

参考文献

- [1] Kelly E, Russell S J History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering[J]. Molecular Therapy, 2007, 15(4):651-659.
- [2] 韩佳, 范月蕾, 毛开云. 溶瘤病毒市场及研发格局分析[J]. 中国生物工程杂志 China Biotechnology, 2023, 43(6): 87-101.
- [3] Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoebe R C. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins[J]. Journal of General Virology, 2005, 86(6):1581-1588.
- [4] Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2012, 33(8):442-448.