使用混合模式 CHT 陶瓷羟基磷灰石 XT 填料进行单步流感和登革热病毒纯化

Yae Kurosawa,[1] Payal Khandelwal,[2] Daniel Yoshikawa,[2] 和 Mark Snyder[2]
[1] HOYA Technosurgical Corporation,日本东京
[2] Bio-Rad Laboratories, Inc., 6000 James Watson Drive, Hercules, CA

CHT 陶瓷羟基磷灰石

摘要

过去的研究表明，CHT™ 陶瓷羟基磷灰石填料可用于病毒纯化。我们在 CHT 家族的最新成员 CHT XT 填料上纯化了流感和登革热病毒。我们在每种病毒的一步纯化中回收率超过了 75%。此外，在这两种样本中，污染蛋白的去除率大于 90%，dsDNA 的去除率大于 60%。这就使 CHT XT 成为简单、快速且可重复的病毒纯化的附加填料，并克服了传统纯化方法的缺点。

简介

两百多年来，病毒制剂一直被用作疫苗，最近还被用于基因治疗平台。对于基因递送，传统的病毒纯化方法，如密度梯度超速离心法和沉淀法可能难以推广，也可能达不到治疗所需的纯度标准。因此，层析已成为满足大规模治疗性病毒纯化要求的先进工具。病毒通过静电作用与层析填料结合。

我们以前曾利用混合模式 CHT 陶瓷羟基磷灰石填料纯化过哺乳动物病毒（Kurosawa 等人2014 年）。CHT 填料是一组混合模式钙亲和/阳离子交换载体。许多病毒表面的高负电荷使其能够与 CHT 的钙离子位点紧密结合，从而实现高产率 (>80%) 的显著纯化。这种紧密结合还可用于提供强大的病毒清除能力，从而确保生物制造过程中的病毒安全性（ICH 专家工作组，1999 年；Moritz，2005 年）。

CHT XT 是 CHT 填料家族的最新成员。它具有优越的物理稳健性，以确保其可在大量循环中重复使用。它保持了 CHT 独特的分离特性，用于聚集体去除和单克隆抗体纯化。为了检测其病毒纯化能力，我们使用CHT XT 填料对流感和登革热病毒进行了单步纯化。

材料和方法

本研究中使用的病毒参见表 1。

表 1病毒类型和大小

病毒	基因组	包膜	尺寸，nm
流感	ssRNA	+	80–120
登革热	ssRNA	+	50

病毒生产

流感病毒：菌株 A/California/07/2009 在含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 L-谷氨酰胺的最低基础培养基 (MEM；Gibco)（225 cm^2 烧瓶）中的 MDCK 细胞上培养。当细胞几乎融合时，将流感病毒以 1:3,000 的稀释度接种到含有胰蛋白酶、青霉素和链霉素（流感培养基）的 75 mL D-MEM/F-12 的细胞单层上。在第 3、4 和 11 天收获上清液，并用 0.45 µm 过滤器进行澄清。

登革热病毒：2 型菌株 ThNH7/93 在 C6/36 细胞上培养。细胞在 225 cm^2 烧瓶中生长，烧瓶在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中用 100 µg/ml 的多聚赖氨酸预涂。细胞在含 10% FBS 的 Eagle 最低基础培养基（改良 EMEM，MP Biomedicals）中于 28°C 下培养 1 周。细胞达到融合后，将 2 型登革热病毒以 1:1,000 的稀释度接种到 75 mL 含 0.5% FBS 和 MEM 维生素溶液 (Thermo Fisher Scientific) 的改良 EMEM 中的细胞单层上，并在 28°C 下培养。第 3 天更换培养基，第 7 天收集培养液（约 75 mL）。使用 0.45 µm 过滤器过滤培养液，以除去细胞和大细胞碎片。

层析

将 CHT XT 填料填充至 4.6 x 35 mm 层析柱（0.58 ml 柱床体积）中，并以 360 cm/hr 的流速进行病毒纯化，如表 2（流感）和表 3（登革热）所示。所有实验均重复进行三次，结果如下。

表 2流感纯化方案

步骤	流动相	pH	体积，ml
预清洗	1 M NaOH		5
清洗	600 mM 磷酸钠	7.2	10
平衡	10 mM 磷酸钠	7.2	10
清洗	24% 的 600 mM 磷酸钠	7.2	10
样本上样和清洗	24% 的 600 mM 磷酸钠	7.2	24
洗脱	150-600 mM(24%-100%) 磷酸钠梯度洗脱	7.2	11
柱清洗	600 mM 磷酸钠	7.2	5

表 3登革热纯化方案

步骤	流动相	pH	体积，ml
预清洗	1 M NaOH		5
清洗	600 mM 磷酸钠	7.2	10
平衡	10 mM 磷酸钠	7.2	20
样本上样和清洗	10 mM 磷酸钠	7.2	20
洗脱	10-600 mM 磷酸钠梯度洗脱	7.2	15
柱清洗	600 mM 磷酸钠	7.2	5

病毒活性测定

通过鸡红细胞血凝分析（HA 试验）测定回收组分中的流感病毒活性。如前所述，通过鹅红细胞 HA 试验测定回收组分中登革热病毒的活性 (Kurosawa 等人，2012 年）。

双链 DNA (dsDNA)

根据生产商说明，使用 Quant-iT PicoGreen dsDNA 测定试剂盒 (Thermo Fisher) 测定组分中 dsDNA 的浓度。

病毒组分中的蛋白质分析

使用 Micro BCA 蛋白浓度测定试剂盒分析病毒组分的总蛋白浓度。采用 MDCK HCP ELISA 试剂盒 (Cygnus Technologies) 对流感病毒组分进行宿主细胞蛋白 (HCP) 分析。

$TCID_{50}$ 流感病毒感染性测定

本试验使用 96 孔微孔板中的汇合单层 MDCK 细胞。试验前将 MDCK 细胞（2 x 10^4 个细胞/孔）在流感培养基中培养 1 天。每个病毒组分用流感培养基进行 10 倍连续稀释。向各孔 (n = 3) 中加入稀释的病毒组分 (50 µl)，并培养一周。在显微镜下研究细胞病变效应。采用 Reed-Muench 法计算滴度。

病毒纯度分析

通过 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳和免疫印迹法评估病毒纯度。这些分析所使用的方案如前所述（Kurosawa 等人，2012 年）。使用前用 10 kD MWCO 过滤器进行超滤，将细胞培养液浓缩 10 倍，所有其他样本浓缩 30 倍。Bio-Rad 凝胶 Doc EZ 成像系统用于定量带密度。在免疫印迹法中，流感病毒样本使用 1:200 稀释度的一抗-HA mAb (Abnova)，登革热病毒样本使用 1:500 稀释度的小鼠抗 D2 血清（由 HOYA Technosurgical 公司为这些实验自制）。使用 1:1,000 稀释度的抗小鼠 IgG(Fc)-POD (American Qualex) 二抗。使用 EzWestBlue (ATTO Corporation) 观察带。

结果

流感病毒

病毒活性

流感病毒纯化的层析结果参见图 1。流感病毒在大约 250 mM 磷酸盐溶液中洗脱，与大部分吸收紫外线的物质分离良好，并与 dsDNA 部分分离。红细胞凝集活性（层析图上的红色条形）测量能够与红细胞表面分子结合并引起凝集的病毒滴度。如图 1A 和 1B 所示，HA 活性主要出现在保留体积 26-31 mL 之间。经计算，从这些组分中回收的总病毒活性约为起始活性的 75%。此活性与 DNA 和 A280 吸收杂质充分分离。将显示大量病毒活性的样本混合，用于进一步的分析。

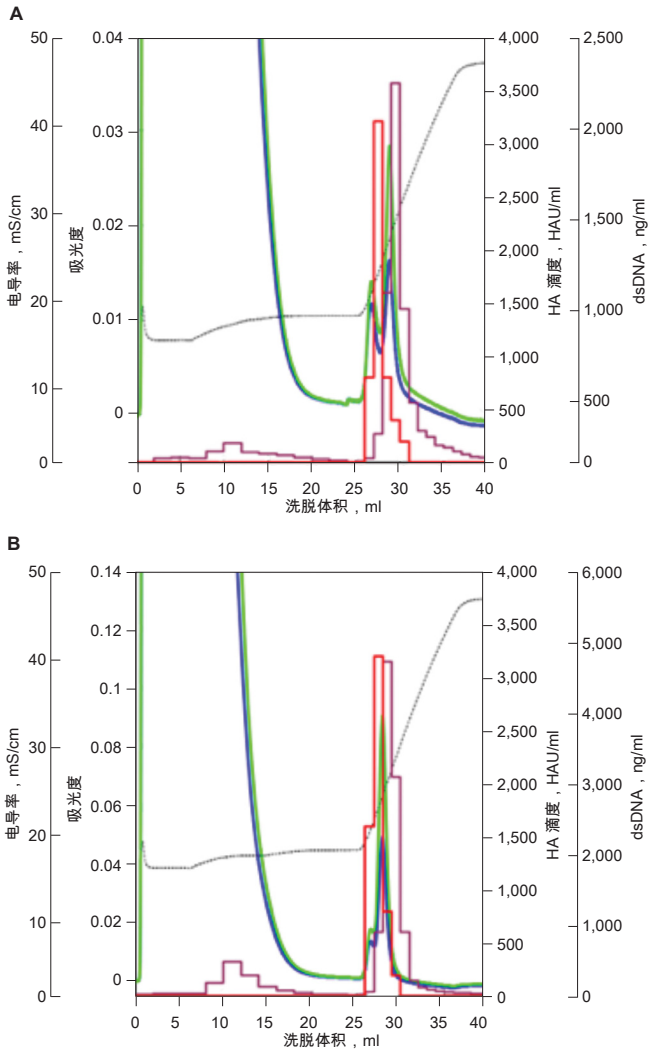


图 1从 CHT XT 中重复洗脱流感病毒HA 滴度 (—)；DNA (—)； A_{280} (—)；A_{260} (—)；电导率 (—)。

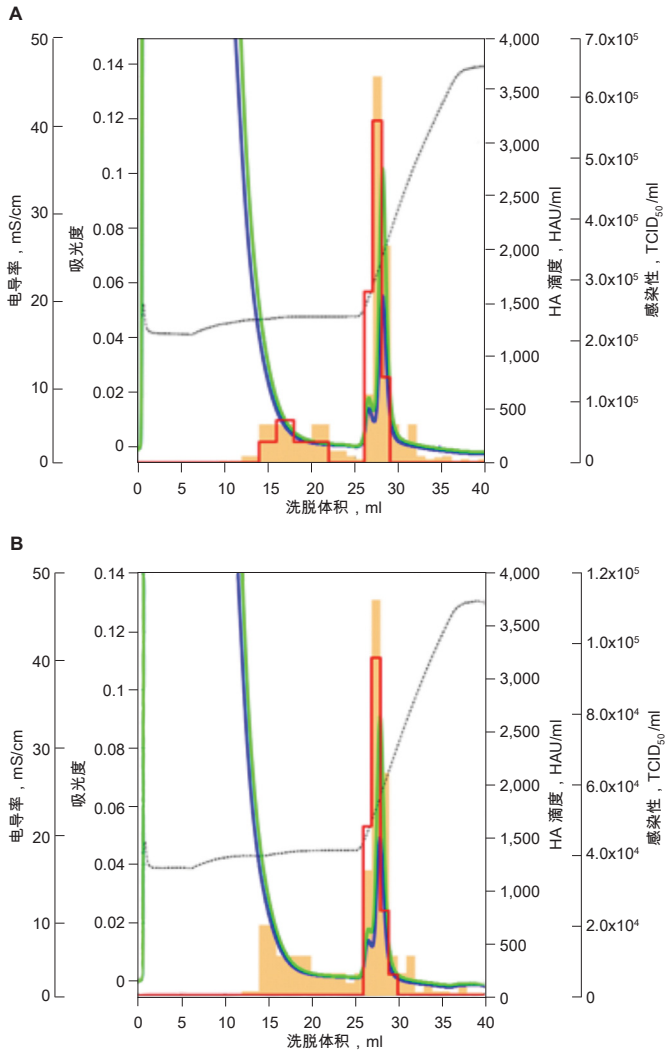


图 2在 CHT XT 上纯化的流感病毒的感染性感染性 (—)；HA 滴度 (—)；A_{280} (—)；A_{260} (—)；电导率 (—)。

病毒感染

为了确定纯化的流感病毒是否保持其感染性，进行了 $TCID_{50}$ 试验（图 2）以分析细胞病变效应 (CPE)。本试验测定活性、感染性颗粒的数量。经计算，重复试验的平均回收率约为 68%。如图 2A 和图 2B 所示，大部分感染性出现在保留体积上，而保留体积也显示出最高的 HA 活性。这证实了组分 26 至 32 含有活性纯化病毒。

分析测定

对在 CHT XT 填料上运行的流感病毒收集样本进行了 3 次分析测定。分析测定结果参见表 4。在 CHT XT 上进行单步流感病毒纯化可显著清除 (>99%) 总蛋白和宿主细胞蛋白，并清除 60% 以上的 dsDNA。

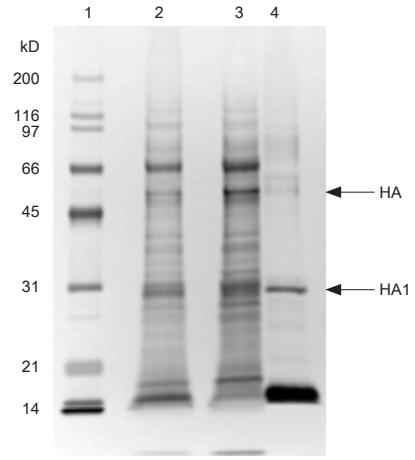
表 4通过 HA 测定对收集的流感样本进行分析测定的结果

dsDNA 对数减少值	总蛋白 对数减少值	HCP 含量 对数减少量
0.42	2.82	2.54

病毒纯度

对图 1 中的活性收集组分进行的 SDS-PAGE 分析证实，在预期分子量的两种形式的 HA 蛋白得到有效的纯化（图 3A）。相同样本的免疫印迹证实浓缩带为 HA（图 3B）。

A



B

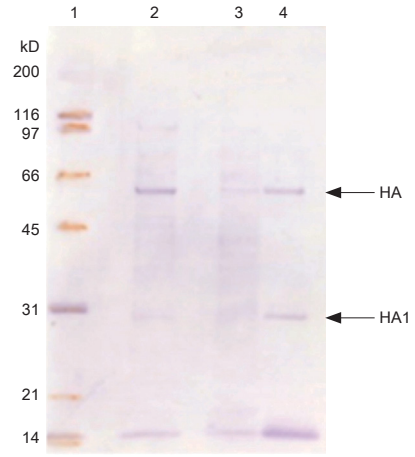


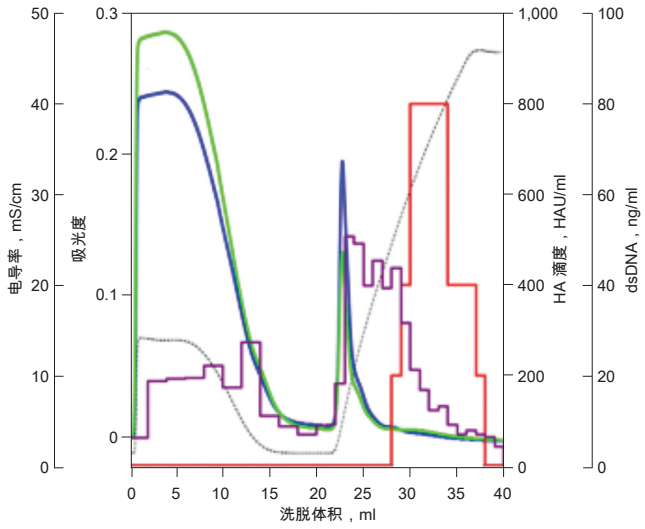
图 3组分的 SDS-PAGE (A) 和免疫印迹分析 (B)通过银染显示凝胶上的蛋白带，并使用 HA 特异性单克隆抗体检测活性样本中的 HA 蛋白。泳道 1：3 µL 蛋白 MW 标记物；泳道 2：10 µl 细胞培养液；泳道 3：10 µl 流穿液 组分；泳道 4：10 µl 收集组分，用于 HA 测定。

登革热病毒

病毒活性

登革热病毒纯化的层析结果参见图 4。登革热病毒在约 400 mM 磷酸盐处洗脱，与大部分紫外线吸收物质和 dsDNA 分离良好。HA 活性主要体现在 28 至 38 ml 的保留体积之间；收集组分 30-35 进行进一步分析。经计算，从这些组分中回收的总病毒活性约为 87%。在所有重复样品的流穿液组分中均未检出病毒活性。

A



B

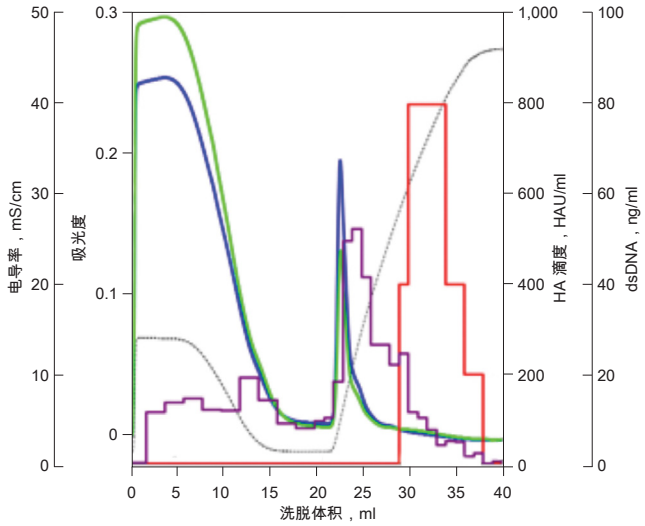


图 4从 CHT XT 中重复洗脱登革热病毒HA 滴度 (—)；DNA (—)；A_{280} (—)；A_{260} (—)；电导率 (—)。

分析测定

对在 CHT XT 上运行的登革热病毒收集样本进行了两次分析测定。分析测定结果参见表 5。在 CHT XT 上进行单步登革热病毒纯化可显著清除蛋白质 (>93%) 和 dsDNA (>91%) 污染物。

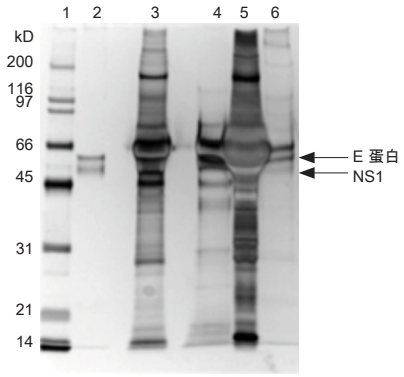
表 5通过 HA 测定对收集登革热样本进行分析测定的结果

dsDNA 对数减少值	总蛋白对数减少值
1.07	1.15

病毒纯度

图 4 中收集活性保留组分的 SDS-PAGE 分析表明，收集液中含有在登革热 E 和 C 蛋白预期位置迁移的蛋白，如免疫印迹法所示 (图 5)。请注意，在 SDS-PAGE 凝胶上的 E 蛋白正上方可观察到污染物迁移。

A



B

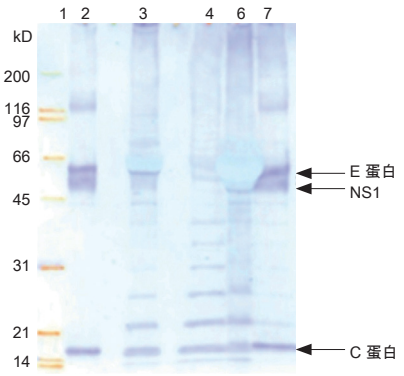


图 5组分的 SDS-PAGE (A) 和免疫印迹分析 (B)通过银染显示凝胶上的蛋白带，并使用登革热病毒 2 型抗血清检测活性样本中的病毒蛋白。泳道 1：3 µL 蛋白 MW 标记物；泳道 2：5 µL 登革热阳性对照；泳道 3：细胞培养液；泳道 4：10 µl 流穿液组分；泳道 5：5 µL UV 富集组分；泳道 6：10 µl 收集组分，用于 HA 测定。

层析填料正不断发展，以满足生物产业日益增长的需求。我们开发了新型 CHT XT 填料，以满足对具有出色使用寿命和单步纯化功能的稳健填料的需求，从而实现卓越的工艺经济性。由于对流感和登革热病毒均具有高纯度和高产率，我们证明 CHT XT 可用于单步杂质清除。这就使 CHT XT 成为简单、快速、可扩大且可重复的病毒纯化的填料。

参考文献

ICH Expert Working Group (1999). Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human and animal origin. In Federal Register 63 (185), pp. 51,074–51,105.

Kurosawa Y et al. (2012). Purification of dengue virus particles by one-step ceramic hydroxyapatite chromatography. World J Vaccines 2, 155.

Kurosawa Y et al. (2014). Mammalian virus purification using ceramic hydroxyapatite. Bio-Rad Bulletin 6549.

Moritz A (2005). Virus safety evaluation of biotechnology products in development. BioProcess Int Suppl. 3, 15–16.

请访问 **bio-rad.com/CHTXTVirusPurification**，了解更多信息并索取样本。

Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 080 007 7373* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

Bulletin 7115 Ver B CN US/EG *24-0355 0524 Sig 0124*