



## 中空纤维切向流过滤结合膜层析制备高纯度 HSV-2 候选疫苗 ACAM529

### 简介

单纯疱疹病毒 2 型 (HSV-2) 是溃疡性生殖器疱疹的主要病原, 全球每年新增感染达 2300 万例, 其治疗方式主要围绕口服抗病毒治疗, 但已有 HSV-2 候选疫苗进入临床试验, 包括灭活、活性衰减、亚单位、DNA 及多肽疫苗等, 其中, 野生型病毒删除 *UL5* 和 *UL29* 基因构建的复制缺陷型 HSV-2 疫苗株病毒 (*dl5-29* 再衍生, 并重命名为 ACAM529) 被认为是较有效的候选疫苗, 在小鼠和豚鼠体内都有效诱导了保护性免疫反应。但传统使用疫苗经离心纯化方法制备, 该技术不适用于商业化生产。

临床用病毒疫苗的制备包括上游病毒生产和下游病毒纯化, 后者需维持病毒感染性, 并清除宿主细胞杂质。已有多种方法用于纯化细胞培养衍生病毒颗粒, 本实验使用膜层析结合中空纤维切向流过滤 (TFF) 制备高纯度、功能性 ACAM529 疫苗, 主要步骤包括使用硫酸葡萄糖 (DS) 从感染的互补 Vero 细胞培养中洗提 ACAM529、核酸内切酶处理、深层过滤、阴离子交换层析、中空纤维切向流过滤, 处理获得的疫苗株病毒纯度较高, 且具有良好的免疫源性。

### 实验

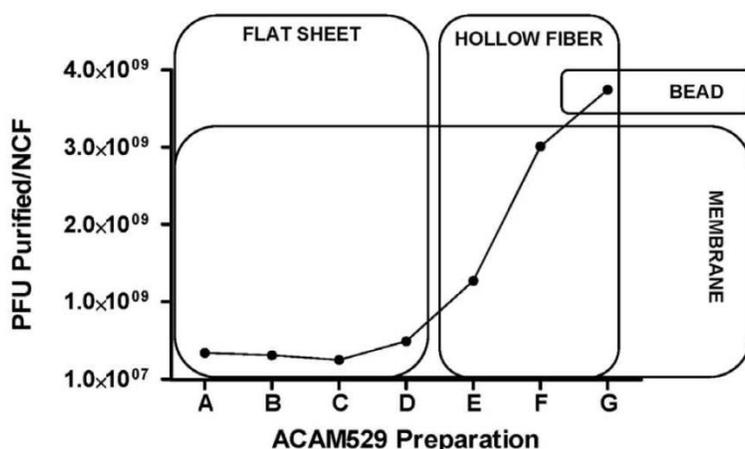
实验使用互补 Vero 细胞系 AV529-19, 按已有方法制备 ACAM529 主病毒种子库。小规模培养生产使用 12 孔板和 T125 摇瓶, 然后放大至 10 层 NUNC 细胞工厂 (NCF, 工作体积 2L, 培养面积 6320cm<sup>2</sup>, Thermo Fisher), 对培养条件进行优化, 以确保 ACAM529 产率最大化。

实验使用两种方法纯化 ACAM529, 第一种方法使用平面膜包式切向流过滤结合蔗糖垫超速离心, 具体操作包括从 NCF 手动刮离感染细胞, 离心后

加入稳定缓冲液重悬, 细胞悬液加入微流机 (Microfluidics Corporation) 机械破碎细胞并切断细胞基因组 DNA, 然后加入 Benzonase<sup>®</sup> 核酸内切酶 (Merck Millipore) 处理后, 离心澄清。澄清后的细胞裂解液使用配有 3 个 30kD、50cm<sup>2</sup> 聚醚砜板式膜的过滤系统从 1100mL 浓缩至 50mL, 过滤过程中, 入口压力维持为 30psi, 背压从 1psi 上升至 8psi, 以达到足够的流速。过滤后的回流液使用 25% 蔗糖垫超速离心处理 4h (50,000 ×g, 4°C), 并将获得的 ACAM529 颗粒重悬于 20% 蔗糖稳定缓冲液, -80°C 储存。

第二种方法使用膜层析结合中空纤维切向流过滤。具体操作时, 先倒出 NCF 中的感染培养基, 加入 DS 洗提缓冲液, 孵育后离心澄清, 加入 Benzonase<sup>®</sup> 反应液, 温和搅拌, 反应特定时间后, 使用 0.65μm 深层过滤器过滤清除残留的细胞碎片及其它聚集杂质。膜层析使用 Mustang<sup>®</sup> Q 滤芯 (Pall Corporation), 操作前先灭菌、预湿、低盐平衡, 上样后用平衡缓冲液漂洗, 然后用 0.7M NaCl 缓冲液洗脱杂质, 再用 2M NaCl 缓冲液洗脱含 ACAM529 馏分, 后者使用 KrosFlo<sup>®</sup> 研发用 III 切向流过滤系统 (Spectrum Laboratories, 产品编号: SYR2-U20-01N; 配 100kD、85cm<sup>2</sup> 聚砜中空纤维过滤组件) 浓缩 5-10 倍, 并进行 3-5 体积洗滤后换液至 20% 蔗糖稳定缓冲液。操作过程中, 为降低剪切, 流速设定为 130mL/min (剪切约为 4,000 S<sup>-1</sup>)。洗滤时, 跨膜压 (TMP) 控制为 4psi 以下, 以减缓凝胶层形成。产物于 -80°C 保存。所有操作在无茵条件下进行, 因 HSV-2 病毒颗粒较大 (180-200nm), 无法对终产物进行除菌过滤。

产物纯化后, 测定 ACAM529 滴度, 并使用 ELISA、qPCR 及 PicoGreen dsDNA 分析法检测 ACAM529 纯度, 免疫源性通过小鼠皮下免疫实验进行分析。



纯化条件优化，以提高产量 (~4 x 10<sup>9</sup> PFU/NCF)。图中每个点代表进行完整纯化工艺后的产量，实验最初使用板式膜TFF进行纯化疫苗病毒的浓缩和制剂，但阶段收率较低 (~20-40%)，改用中空纤维TFF后，感染性病毒回收率明显改善 (~70-100%)。实验同时检测了使用高容量强阴离子交换剂Fractogel TM AE HiCap 替换Mustang Q进行层析的可行性。

## 结果

使用蔗糖垫超速离心进行 ACAM529 实验室规模制备时，每 1 X 10<sup>7</sup> PFU ACAM529 中会有 2μg 以上的宿主细胞 DNA 残留，而使用本实验方法二时，残留量低于 10ng，如以宿主细胞蛋白残留为衡量标准，该方法产物纯度高出 200 倍，而工艺处理液杂质为衡量标准时，纯度高出 2 个数量级。

使用机械细胞破碎时，产物中会有较高的 dsDNA 残留。替代方法是使用 DS，从宿主细胞表面有效化学洗提获得 ACAM529，并使用 Benzonase® 核酸内切酶降低产物中的 DNA 载量。

在比较了一系列层析方法后发现，使用 Mustang® Q 膜层析滤芯所获得的阶段收率最高，而使用 KrosFlo® 中空纤维切向流过滤系统替换板式膜过滤系统，可有效使收率加倍，原因可能是开放式流道降低了剪切，而在板式膜设计中增加了用于形成湍流的筛网，虽然筛网在一定程度上可提高流速，降低凝胶层形成，但同时亦增加对样品的剪切力。

如以产物中 Vero 宿主细胞蛋白 (HCP) 为衡量标准，ACAM529 终产物纯化因子可达 250 倍，而 Vero DNA 含量亦低于 WHO 规定限量。纯化过程中加入的 DS、Benzonase® 等可分别在深层过滤及膜层析过程中清除。此外，动物免疫实验表明，层析纯化获得的 ACAM529 具有与蔗糖垫层离心纯化获得的样品一致的免疫源性和保护性。

## 讨论

ACAM529 是一种复制缺陷的预防性候选疫苗，在初步的动物实验中已证明其效力，但为满足进一步的动物及临床实验需要，急需一种可规模放大的下游纯化工艺。本实验使用方法结合 DS 洗提、Benzonase® 处理、深层过滤、膜层析及中空纤维超滤/洗滤，有效提高了疫苗总收率。

实验中发现，流体动力学剪切压力对于感染性病毒滴度的损耗非常关键，所以将封闭流道板式膜 TFF 及微珠层析更换成开放流道的中空纤维 TFF 及膜层析，从而在纯化步骤的每个阶段都可获得更高的感染性病毒收率。动物实验中获得的疫苗免疫源性 & 保护性效力数据，也确认了工艺的可行性。

参考文献：  
Mundle, S.T., Hernandez, H., Hamberger, J., et al., High-Purity Preparation of HSV-2 Vaccine Candidate ACAM529 Is Immunogenic and Efficacious In Vivo. PLOS ONE, 2013, 8(2):1-10.