



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103525770 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201310463655. 8

CN 101816786 A, 2010. 09. 01, 全文.

(22) 申请日 2013. 10. 08

孙安顺. 沃森生物新建人二倍体细胞株

(83) 生物保藏信息

CCTCC C201055 2010. 07. 13

Walvax-2 通过专家咨询会 [http://blog.sina.com.cn/s/blog\\_88c6733d0101irsh.html](http://blog.sina.com.cn/s/blog_88c6733d0101irsh.html). 《俱浪

语天地新浪博客》. 2013, 1.

(73) 专利权人 云南沃森生物技术股份有限公司

云南沃森生物技术股份有限公司. 沃森生

地址 650106 云南省昆明市高新区省大学科技园 A3 幢 4 楼

物新建人二倍体细胞株 Walvax-2 通过专家咨

询会 [http://www.walvax.com.cn/info/1/939/](http://www.walvax.com.cn/info/1/939/index.aspx)

[index.aspx](http://www.walvax.com.cn/info/1/939/index.aspx). 《云南沃森生物技术股份有限公司新闻》. 2013, 1-3.

(72) 发明人 马波 杨喆 何丽芳 王丽丽

陈敏 王馨

审查员 陈莹

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 42222

代理人 张火春

(51) Int. Cl.

C12N 7/00(2006. 01)

A61K 39/29(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

C12R 1/93(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102911910 A, 2013. 02. 06, 权利要求 1,

说明书第 3-10 段, 摘要, 实施例 3-11.

CN 1077132 A, 1993. 10. 13, 全文.

CN 1490053 A, 2004. 04. 21, 全文.

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

人胚肺成纤维细胞株在制备甲肝疫苗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了人二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 在制备甲肝疫苗中的应用, 人二倍体成纤维细胞株对甲肝病毒易感, 采用 Walvax-2 生产甲肝疫苗, 可得到一种抗原纯度高、免疫效果好、安全性高、价格低的人用二倍体细胞甲肝病毒纯化疫苗。

1. 人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 在制备甲肝疫苗中的应用。
2. 人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 在制备治疗甲型肝炎病的疫苗中的应用。

## 人胚肺成纤维细胞株在制备甲肝疫苗中的应用

[0001] 发明所属领域：

[0002] 本发明属于疫苗技术领域，具体地说，本发明涉及人二倍体成纤维细胞株在制备甲肝疫苗中的应用，以及人二倍体成纤维细胞株在治疗甲型肝炎病的疫苗中的应用。

### 背景技术：

[0003] 甲型肝炎 (hepatitis A) 又被称为甲肝，是由甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus, HAV) 引起的肝脏炎症病变为主的传染性疾病，是我国重要的卫生问题。以粪-口传播为主，任何年龄均可患病，但主要为儿童及青少年，病死率低，重症病人多为儿童。

[0004] HAV 属于小核糖核酸病毒科，单列属。无包膜，直径为 27nm ~ 32nm，二十面立体对称的球形颗粒。具有嗜肝性，对环境耐受性强，耐酸、耐热，对 20% 乙醚及氯仿等不敏感。甲醛、β-丙内脂、高压均可使其灭活。HAV 有多个基因型及一个血清型。

[0005] 1978 年 Provost 和 Hilleman 从绒猴肝脏组织中提取得到 HAV，1979 年体外培养甲型肝炎病毒成功，至 20 世纪 90 年代中期，甲肝减毒活疫苗及甲肝灭活疫苗正式投入生产，甲肝疫苗的研究经历了漫长的时间及无数的实验。到目前为止，甲肝疫苗已经被证实是安全且有效的。

[0006] 全世界每年需要近 1 亿人份的 HAV 疫苗，因此需要大规模及高产量的 HAV 疫苗的生产。我国《中国药典》2010 版三部规定“冻干甲型肝炎减毒活疫苗”及“甲型肝炎灭活疫苗（人二倍体细胞）”的细胞培养基质为 2BS 株及 KMB17 株或其他经批准的人二倍体细胞株。2BS 株及 KMB17 株均为我国自行研制的人源二倍体成纤维细胞，属于贴壁生长细胞。此类细胞生长和正常功能表达的前提条件是附着培养容器表面生长。当生产需要量少时，可采用转瓶、细胞培养瓶等进行培养，但这些培养容器表面积小，培养量少，不利于工业大规模生产。现阶段许多类型的细胞工厂投入疫苗生产，细胞工厂可大量增加培养表面积，提高每个单元的生产能力，并很好的解决细胞贴壁生长及病毒滴度问题。但工业大规模生产仍需要大批量的细胞工厂，高成本限制了其工业生产的扩大及商业开发的潜能。因此经济上，使用生物反应器培养病毒是病毒性疫苗生产的最佳方法。

[0007] 使用微载体的生物反应器培养过程中，微载体为细胞生长提供了大量的表面积，实现了高密度培养，是一个高效的生产系统。该系统可以提供均质的细胞培养环境，更易于细胞稳定的生长及产物的高效表达。脊髓灰质炎及狂犬疫苗的生物反应器培养方式投入生产，证明了此方法在工艺放大时的优势及商业上的潜力。

[0008] 美国专利 W095/24468 公开了微载体培养 MRC-5 细胞生产 HAV 的方法，在细胞-病毒培养物中收获了一定量的甲肝病毒。瑞士专利 W02003/049767 公布了一种用微载体无血清培养 Vero 细胞大规模生产甲型肝炎病毒的方法。中国专利 CN 101406699A 公布了一种利用细胞工厂制备冻干甲型肝炎减毒活疫苗的方法。

[0009] 从现有技术来看，无论是 MRC-5、2BS 或是 KMB-17，均在病毒疫苗生产中使用多年，安全性不容置疑。但缺点是细胞未推广使用及细胞代次高，限制了病毒产量的提高和进一步使用。人二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 在中国专利 201210371784. X 已公开，但此细胞

是否对甲肝病毒敏感及是否可利用其生产甲肝病毒疫苗不得而知。

#### 发明内容：

[0010] 本发明的一个目的是提供人胚肺二倍体成纤维细胞株在制备甲肝疫苗中的应用，人胚肺二倍体成纤维细胞株对甲肝病毒易感，使用此细胞生产甲肝病毒疫苗可得到一种抗原纯度高、免疫效果好、安全性高、价格低的人用二倍体细胞甲肝病毒纯化疫苗。

[0011] 本发明的另一个目的是提供人胚肺二倍体成纤维细胞株在制备治疗甲型肝炎病疫苗中的应用

[0012] 本发明公开了人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 在制备甲肝疫苗中的应用。

[0013] 本发明还公开了人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 在制备治疗甲型肝炎病的疫苗中的应用。

[0014] 本发明的人胚肺二倍体成纤维细胞株在中国专利 201210371784.X 已公开，为人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2，保藏于国家知识产权局指定的保藏机构 - 中国典型培养物保藏中心，保藏编号为 CCTCC NO:C201055，保藏日期是 2010 年 7 月 13 日。中国典型培养物保藏中心简称 CCTCC，位于湖北省武汉市武汉大学校内，邮编 430072，电话：027-68752319，Email:cctcc@whu.edu.cn。

[0015] Walvax-2 细胞株对甲型肝炎病毒株敏感，且病毒产量高。将甲肝病毒接种至 Walvax-2 细胞上，在 34 ~ 35℃ 常规培养下，就能生产高滴度的病毒疫苗原液；病毒原液通过抽提、浓缩、纯化、灭活并加入保护剂，就形成甲肝病毒灭活疫苗原液。疫苗原液分装后冻干即为冻干甲型肝炎灭活疫苗。

[0016] Walvax-2 细胞株对现在流行的疫苗株敏感如 H2 株，YN5 株，L-A-1 株。在本发明中采用的甲型肝炎病毒，为甲型肝炎病毒 YN5 株，按专利程序要求在 2001 年 4 月 20 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号是 CCTCC NO:V200104，此病毒在专利 02106985.9 中已公开，处于公开状态，科学工作者可向该菌种保藏中心按章索取；人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2，CCTCC NO:C201055 按专利法要求寄存在中国典型培养物保藏中心，处于公开状态，科学工作者可向该菌种保藏中心索取；MRC-5(ATCC CCL171)，WI-38(ATCC CCL75) 登载于美国典型培养物保藏中心的目录中，处于公开状态，科学工作者可向该菌种保藏中心索取。本发明中对照细胞 KMB-17, 2BS 登载于中国典型培养物保藏中心的目录中，处于公开状态，科学工作者可向该菌种保藏中心索取。

[0017] 本发明中，HAV 是指甲肝病毒。

[0018] 采用人胚肺二倍体成纤维细胞株 Walvax-2 生产的甲肝病毒灭活疫苗与 MRC-5，WI-38，KMB-17，2BS 细胞生产的甲肝病毒灭活疫苗相比，本发明的优点主要体现在以下几个方面：

[0019] 1) 对现用于甲肝病毒灭活疫苗用毒种具有很好的敏感性，适应性，病毒产量高，制成的疫苗免疫原性好。

[0020] 2) 人胚肺二倍体成纤维细胞株适应在细胞工厂或生物反应器工艺上或在微载体上进行很好的适应，适合大规模生产和应用。

[0021] 3) 人源 Walvax-2 细胞基质培养 HAV，避免了非人源宿主细胞蛋白残留，降低了培养过程中的外源因子污染，疫苗有更高的安全性。

[0022] 4) 所制备的疫苗安全性高,免疫效果好,使用方便,纯度高,本发明的生产方法制备的甲肝灭活疫苗产生的 ED50 显著低于 GSK 的甲肝灭活疫苗。

### 具体实施方式

[0023] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应当理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不能限制本发明的保护范围。

[0024] 实施例 1 用 Walvax-2 细胞株制备甲型肝炎灭活疫苗

[0025] 1.1 细胞工厂制备 Walvax-2 细胞

[0026] Walvax-2 细胞 20 代复苏于 T75 瓶中,细胞活率 99% 以上,37℃ ± 0.5℃ 密闭培养,直至细胞覆盖培养生长面,用 0.25% 胰蛋白酶消化,以 1:2 的分种率传代培养,至可用于生物反应器中大规模生产细胞量。将细胞消化后收集至三角瓶中等待接种病毒。细胞培养液中细胞生长培养基为含体积百分比为 10% 新生牛血清的 MEM 营养液。

[0027] 1.2 Walvax-2 细胞接种 HAV 病毒

[0028] 收集好的 Walvax-2 细胞取样计数,调细胞浓度并接种甲型肝炎病毒 YN5 株 CCTCC NO:V200104,感染复数 MOI 为 0.5,于 37℃ 条件下吸附 30min,并不时摇动,使病毒充分接触细胞。

[0029] 1.3 Walvax-2 细胞大规模生产 HAV

[0030] 提前将硅化好的生物反应器及微载体高压灭菌,通过补液泵将细胞培养液灌入反应容器中,溶液的加入量为反应器体积的 70%,微载体 10g/L 溶液, pH 在 6.5 ~ 7.5 之间,搅拌速度为 40rpm,平衡反应器及微载体系统,使环境适于培养 Walvax-2 细胞。

[0031] 将实施例 1 中 1.2 的 HAV 病毒吸附后的 Walvax-2 细胞转入生物反应器中培养,接种浓度为  $10^5$  个 /ml。以临界离底速度搅拌,使细胞吸附于微载体后,调整转速为 40rpm,培养 Walvax-2 细胞在微载体上形成单层,培养系统为细胞培养液,通过灌注方式培养。待每个微载体的细胞贴壁率达 80% 以上时,将培养系统调整为病毒维持液继续培养。病毒维持液中病毒生长培养基为含体积百分比为 2% 新生牛血清的 MEM 营养液。初期维持 0.3 ~ 1.0 培养体积 / 天,随着细胞病毒在生物反应器中培养时间的增加,逐步增加更换的溶液体积,调整至 0.5 ~ 2.5 培养体积 / 天。维持液的更换速度可依据溶液系统中乳酸及葡萄糖含量等检测结果的变化调整。以 15L 生物反应器为例,参数为 pH 为 7.0 ~ 7.4,溶氧浓度为 50%,搅拌速度为 45rpm,温度为 35℃ ± 0.5℃,培养 28 天收获。结果如表 1 所示,甲肝病毒滴度随培养时间的增长而提高,在 28 天的时候滴度达到最高。

[0032] 表 1 生物反应器培养 Walvax-2 细胞及上清液中 HAV 滴度

[0033]

培养天数(天)	15L 生物反应器 HAV 病毒滴度	
	细胞/EU/ml	上清液/EU/ml
7	2560	阴性
14	10240	40
21	20480	160
28	40960	640

[0034] 1.4 灭活甲肝疫苗的制备

[0035] 在本发明提供的甲肝灭活疫苗制备工艺,收集生物反应器培养消化后获得的细胞病毒液,冷却至 4℃。并在 4℃ 条件下超声破碎细胞,超声频率为 600 ~ 750 赫兹,每次超声时间为 10s,间隔 4s。细胞破碎率达 95% 以上时即可。收集细胞病毒混合液,离心 6000rpm, 20min,收集上清液。向上清液中加入氯仿抽提,体积比为 1:1,混匀,4℃ 条件下抽提液离心, 8000rpm, 5 ~ 10min,离心后明显可见混合液分为上下两层,收集上层清液。根据抽提效果抽提 3 ~ 5 次,收集抽提后溶液。

[0036] 采用 100kDa11 膜对抽提后收集的溶液超滤浓缩至原体积的 1/5,然后再采用 0.01M 的 PBS 恢复到原体积,继续采用 0.01M 的 PBS 超滤浓缩至原体积的 1/5,如此操作,反复 3 次,最后一次浓缩到原体积的 1/10,浓缩液过滤澄清。0.2M 的 NaCl 平衡 Sepharose 4Fast Flow 琼脂糖凝胶柱 (GE XK 50/100),流速为 13ml/min,平衡 5 ~ 10 个柱体积后,测定出液端 pH, pH 在 7.0 ~ 7.4 之间,即可上样。

[0037] 将上述浓缩液加入已平衡好的 Sepharose 4FF 琼脂糖凝胶柱上,上样量为 80ml,用 0.2M 的 NaCl 流洗,流速约 8ml/min,在线检测波长为 280nm 的紫外吸光值变化,分段收集峰的流出液。经 ELISA 试验检测,收集纯化后的 HAV 病毒液,加入终浓度为 200 μg/ml 甲醛灭活,以 1:4000 比例,37 ~ 40℃ 灭活 12 天。灭活病毒原液经 0.2 μm 除菌过滤,即为灭活的 HAV 原液。

[0038] 在本发明中公开的甲肝灭活疫苗,调整 HAV 含量并添加保护剂,分装,最终使每剂疫苗含纯化的灭活 HAV 病毒 4800EU/ml。

[0039] 在本发明中冻干甲肝疫苗采用常规冻干方法,将原液与保护剂的混合液,分装在 1.0ml/支的西林瓶中,-40℃ 预冻 8 小时,-10 ~ -28℃ 真空干燥 24 小时,20 ~ 28℃ 干燥 6 小时,西林瓶封口压盖。

[0040] 实施例 2 不同浓度甲肝灭活疫苗的免疫原性检测

[0041] 采用小鼠体内效力检测甲肝灭活疫苗的免疫原性。ED50 为半数有效量,指疫苗在一群动物中引起半数动物特异性抗体阳性反应的剂量。同一种动物在不同疫苗或相同疫苗不同含量中,ED50 值越低越说明某动物产生特异性抗体的能力越高。

[0042] 采用本发明的生产方法制备一批甲肝灭活疫苗,批号为 20110403,病毒滴度为 40960EU/ml,调整甲肝抗原含量分别为 2000EU/0.5ml、2400EU/0.5ml、2800EU/0.5ml 及 3200EU/0.5ml。小鼠选取 4 ~ 6 周龄的 ICR 小鼠 260 只 (SFP 级)。每个抗原浓度的甲肝灭活疫苗 (含 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂 (1.0mg/ml) 与不含 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂) 分别作 4 倍系列稀释,各稀释 3 个稀释度,每个稀释度免疫 10 只小鼠。同时设阴性对照组—第 9 组,10 只小鼠免疫生

理盐水；佐剂对照组—第 10 组，10 只小鼠免疫 1.0mg/ml 的 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂。各组接种样品体积均为 0.5ml/只，免疫 28 天后采集并分离血清，-4℃ 保存备用。采用甲型肝炎病毒抗体 (HAV Ab) 酶联免疫试剂盒检测，诊断试剂由北京万泰生物药业有限公司生产。

[0043] 结果如表 2 所示，当甲肝病毒抗原含量为 2400EU/0.5ml 时，ED<sub>50</sub> 最低，即特异性抗体应答能力最强。1.0mg/ml Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂可提高本方法制备的甲肝灭活疫苗在小鼠体内的效力检测结果。

[0044] 表 2 不同抗原量的甲肝灭活疫苗在小鼠中的体内效力检测结果

[0045]

组别	实验组组成		阳性率			ED <sub>50</sub>
	病毒抗原(EU/0.5ml)	Al(OH) <sub>3</sub> (mg/ml)	1:4	1:16	1:64	
1 组	2000	—	6/9	5/10	3/10	31.2
2 组	2000	1.0	7/10	6/10	3/10	27.3
3 组	2400	—	10/10	7/10	5/10	16.9
4 组	2400	1.0	10/10	9/9	7/10	6.2
5 组	2800	—	9/10	8/10	4/10	23.8
6 组	2800	1.0	10/10	7/10	6/10	10.7
7 组	3200	—	9/10	7/9	3/10	24.9
8 组	3200	1.0	10/10	7/10	4/10	13.2

[0046] 实施例 3 甲肝灭活疫苗与现有甲肝疫苗的小鼠体内效力对比

[0047] 选取 4~6 周龄的 ICR 小鼠 190 只，随机分成七组。前三组作为试验疫苗组，30 只/组，后三组作为对照疫苗组，30 只/组，第七组为阴性对照组，10 只/组。实验疫苗组小鼠接种的疫苗采用本发明所述的甲肝灭活疫苗，采用甲肝病毒 HZD 接种新人源二倍体细胞 Walvax-2 细胞，经过生物反应器培养，收获，纯化，灭活并加入 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂制成，0.5ml/支，含灭活甲肝病毒 2400EU，Al(OH)<sub>3</sub> 终浓度为 1.0mg/ml，连续生产三批，批号为：20111007、20111108 及 20111209。每个批号的甲肝灭活疫苗（含 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂 1.0mg/ml）作 4 倍系列稀释，共稀释 3 个稀释度，每个稀释度免疫 10 只小鼠，共 90 只。对照疫苗组小鼠接种的疫苗为史克公司 (GSK) 生的甲肝灭活疫苗（批号为 YHAVB440BA(2 次试验) 及 YHAVB483AA），0.5ml/支，每个批号的甲肝疫苗作 4 倍系列稀释，共稀释 3 个稀释度，每个稀释度免疫 10 只小鼠，共 90 只。每支抽取 0.5ml 免疫小鼠，含甲肝灭活病毒 720E<sub>1</sub>U/0.5ml。阴性对照组，10 只小鼠，每支免疫 0.5ml 生理盐水，结果见表 3。

[0048] 对结果进行统计学分析，结果显示两种甲肝灭活疫苗的抗体反应明显不同，本发明的生产方法制备的甲肝灭活疫苗产生的 ED<sub>50</sub> 显著低于 GSK 的甲肝灭活疫苗 (P<0.05)。由于 ED<sub>50</sub> 检测值越低说明 ICR 小鼠的抗体应答水平越高，因此本发明的甲肝灭活疫苗的特异性抗体应答能力强于 GSK 的甲肝疫苗。

[0049] 表 3 冻干甲肝灭活疫苗的小鼠体内效力检测与现有甲肝疫苗效力对比

[0050]

组别	病毒抗原	批号	HAV-Ab 阳性率			ED <sub>50</sub>	平均 ED <sub>50</sub>	标准 差	95%可信限	
			1: 4	1: 16	1:64				下限	上限
1 组	2400(EU/0.5ml)	20111007	10/10	10/10	7/10	6.7				
2 组	2400(EU/0.5ml)	20111108	10/10	9/10	7/9	7.2	7.1	0.21	6.2	8.00
3 组	2400(EU/0.5ml)	20111209	10/10	10/10	6/10	7.4				
4 组	720E1.U/0.5ml	YHAVB440BA	9/10	3/10	1/10	55.8				
5 组	720E1.U/0.5ml	YHAVB483AA	8/10	3/10	0/9	57.9	54.4	2.49	43.7	65.2
6 组	720E1.U/0.5ml	YHAVB440BA	9/10	4/10	2/10	49.6				

a.