



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110669738 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201910924577.4

(22)申请日 2019.09.27

(71)申请人 长春生物制品研究所有限责任公司

地址 130000 吉林省长春市高新区创新路
1616号

(72)发明人 孙宏亮 刘岩松 张颖 刘智慧
王伟 邢坤鹏 李景良 梅可佳
刘双军 赵健 孙超 张朔

(74)专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11369

代理人 许小东

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

C12N 5/071(2010.01)

C12R 1/93(2006.01)

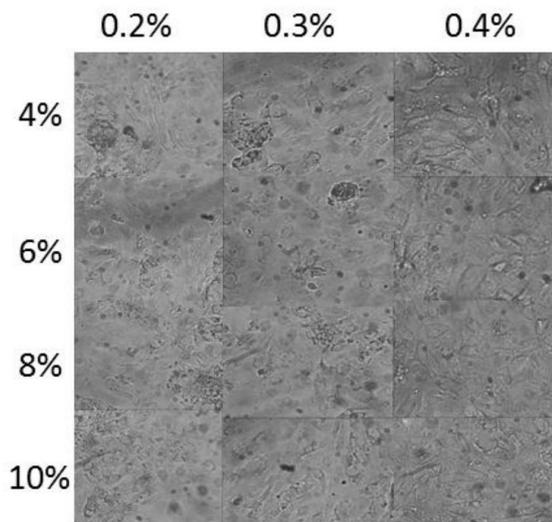
权利要求书2页 说明书23页 附图6页

(54)发明名称

一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法

(57)摘要

本发明公开一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,包括步骤1:对地鼠进行无菌取肾,剪碎并洗涤,按每对肾加入1.5~2.0ml消化液,并于2~8℃消化18~20h;步骤2:将消化后的肾脏组织接种至多层细胞工厂,加入生长液200~250ml/层,置于37±1℃的恒温室中静置培养68~72h,使得肾脏细胞长成致密单层;步骤3:将所述肾脏细胞感染森林脑炎病毒,控制感染复数为0.1~1.0,并加入病毒维持液200~250ml/层,置于33±1℃的恒温室静置培养96h后进行第一次收获,收获后补加与收获液量相同的维持液继续置于33±1℃的恒温室静置培养48小时,再次进行收获,反复进行多次收获。采用细胞工厂进行细胞培养,并使用新的生长液和病毒维持液,能够高效获得稳定的森林脑炎病毒。



1. 一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1:对地鼠进行无菌取肾,剪碎并洗涤,按每对肾加入1.5~2.0ml消化液,并于2~8℃消化18~20h;

其中,所述消化液为pH7.8~8.2的浓度为0.125%的胰蛋白酶液,且所述胰蛋白酶液中含有100IU/ml的硫酸卡那霉素;

步骤2:将消化后的肾脏组织接种至多层细胞工厂,加入生长液200~250ml/层,置于37±1℃的恒温室中静置培养68~72h,使得肾脏细胞长成致密单层;

其中,所述生长液为pH6.8~7.2且含6%~8%新生牛血清、0.2%乳蛋白水解物和1%谷氨酰胺的MEM培养液,且所述MEM培养液中含有100IU/ml的硫酸卡那霉素;

步骤3:将所述肾脏细胞感染森林脑炎病毒,控制感染复数为0.1~1.0,并加入病毒维持液200~250ml/层,置于33±1℃的恒温室静置培养96h后进行第一次收获,收获后补加与收获液量相同的维持液继续置于33±1℃的恒温室静置培养48小时,再次进行收获,反复进行多次收获;

其中,所述病毒维持液为pH7.4~7.8且含1%~2%新生牛血清的199培养液。

2. 如权利要求1所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述MEM培养液的制备包括:

将MEM干粉培养基溶解于灭菌注射用水中,充分搅拌至完全溶解后,通过0.22μm无菌滤膜过滤除菌,2~8℃保存备用;

其中,所述MEM培养液中MEM干粉培养基的浓度为0.0095g/ml;

所述199培养液的制备包括:

取199干粉培养基溶解于灭菌注射用水中,充分搅拌至完全溶解后,通过0.22μm无菌滤膜过滤除菌,2~8℃保存备用;

其中,所述199培养液中199干粉培养基的浓度为0.009549g/ml。

3. 如权利要求2所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述消化液的制备包括:

将浓度为0.5%的胰蛋白酶液通过所述MEM培养液按稀释至浓度为0.125%,用浓度为7.5%的NaHCO₃溶液调节pH至7.8~8.2后,加入硫酸卡那霉素使其浓度为100IU/ml。

4. 如权利要求2所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述生长液的制备包括:

在所述MEM培养液中加入乳白蛋白水解物、谷氨酰胺和新生牛血清,使得乳白蛋白水解物的浓度为0.2%,谷氨酰胺的浓度为1%,新生牛血清的浓度为6%~8%,并用浓度7.5% NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2。

5. 如权利要求1、2、3或4所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述病毒维持液的制备包括:

在199培养液中加入新生牛血清,使其浓度为1%~2%,并用浓度7.5%NaHCO₃溶液调节pH至7.4~7.8。

6. 如权利要求5所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述森林脑炎病毒为“森张”株病毒。

7. 如权利要求6所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述肾

脏细胞感染森林脑炎病毒后,反复进行5~6次。

8.如权利要求1、2、3、4、6或7所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述地鼠为体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠。

9.如权利要求8所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,将所述地鼠无菌取肾,剪碎并洗涤后置于装有玻璃珠的三角瓶内,加入消化液消化。

10.如权利要求9所述的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,所述多层细胞工厂每层接种地鼠的4对肾。

一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体的是,本发明涉及一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法。

背景技术

[0002] 森林脑炎(Tick-Borne Encephalitis, TBE)是林区的常见病及多发病,森林脑炎的发病具有季节性,每年5-7月份发病,在全球发病广泛,我国主要以东北地区为主。卫生部出台的《职业性森林脑炎诊断标准》中将职业性森林脑炎定义为劳动者在森林地区的劳动活动中因被蜱叮咬而感染的中枢神经系统的急性病毒性传染疾病,其由森林脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)(又称蜱传脑炎病毒)引发。

[0003] 森林脑炎病毒属黄病毒科黄病毒属,病毒颗粒呈直径40-50nm球形,分子量约 4×106 Da,为单链RNA病毒,含有三种结构蛋白,其传染性易为热灭活(72°C , 10秒),也可被蛋白酶、甲醛、过氧化氢、乙醚、 β -丙内酯、Triton X-100等作用而失活。

[0004] 现有预防森林脑炎发生的有效措施即接种疫苗,而常规的森林脑炎疫苗即森林脑炎病毒灭活疫苗。现有的森林脑炎病毒的制备主要是通过地对鼠进行无菌取肾后,消化,接种至转瓶,用含6~8%小牛血清、0.2%乳白蛋白水解物的Earle's生长液制成细胞悬液,置于 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温室静置培养68~72小时,待细胞长成致密单层后感染森林脑炎病毒毒种,感染后置 $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温室旋转培养4天进行第一次收获,收获后补加维持液(含0.002%半胱氨酸、1%~2%新生牛血清的Earle's液),置 $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温室旋转培养3天后,再次进行收获。

[0005] 而现有技术有如下缺点:

[0006] (1)金黄地鼠使用量较大,试验动物利用率较低,不符合目前关于在实验动物福利与伦理中提出的减少、替代及优化的3R原则。

[0007] (2)转瓶的培养面积较小,资源浪费严重,且制备效率较低,且工艺的可控性较低。

[0008] (3)制备的灭活病毒中需要加入防腐剂。

发明内容

[0009] 本发明设计开发了一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,采用细胞工厂进行细胞培养,并使用新的生长液和病毒维持液,能够高效获得稳定的森林脑炎病毒,且不需要添加防腐剂。

[0010] 本发明提供的技术方案为:

[0011] 一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,包括如下步骤:

[0012] 步骤1:对地鼠进行无菌取肾,剪碎并洗涤,按每对肾加入1.5~2.0ml消化液,并于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 消化18~20h;

[0013] 其中,所述消化液为pH7.8~8.2的浓度为0.125%的胰蛋白酶液,且所述胰蛋白

酶液中含有100IU/ml的硫酸卡那霉素；

[0014] 步骤2:将消化后的肾脏组织接种至多层细胞工厂,加入生长液200~250 ml/层,置于37±1℃的恒温室中静置培养68~72h,使得肾脏细胞长成致密单层；

[0015] 其中,所述生长液为pH6.8~7.2且含6%~8%新生牛血清、0.2%乳蛋白水解物和1%谷氨酰胺的MEM培养液,且所述MEM培养液中含有100IU/ml的硫酸卡那霉素；

[0016] 步骤3:将所述肾脏细胞感染森林脑炎病毒,控制感染复数为0.1~1.0,并加入病毒维持液200~250ml/层,置于33±1℃的恒温室静置培养96h后进行第一次收获,收获后补加与收获液量相同的维持液继续置于33±1℃的恒温室静置培养48小时,再次进行收获,反复进行多次收获；

[0017] 其中,所述病毒维持液为pH7.4~7.8且含1%~2%新生牛血清的199培养液。

[0018] 优选的是,所述MEM培养液的制备包括：

[0019] 将MEM干粉培养基溶解于灭菌注射用水中,充分搅拌至完全溶解后,通过0.22μm无菌滤膜过滤除菌,2~8℃保存备用；

[0020] 其中,所述MEM培养液中MEM干粉培养基的浓度为0.0095g/ml；

[0021] 所述199培养液的制备包括：

[0022] 取199干粉培养基溶解于灭菌注射用水中,充分搅拌至完全溶解后,通过0.22μm无菌滤膜过滤除菌,2~8℃保存备用；

[0023] 其中,所述199培养液中199干粉培养基的浓度为0.009549g/ml。

[0024] 优选的是,所述消化液的制备包括：

[0025] 将浓度为0.5%的胰蛋白酶液通过所述MEM培养液按稀释至浓度为0.125%,用浓度为7.5%的NaHCO₃溶液调节pH至7.8~8.2后,加入硫酸卡那霉素使其浓度为100IU/ml。

[0026] 优选的是,所述生长液的制备包括：

[0027] 在所述MEM培养液中加入乳白蛋白水解物、谷氨酰胺和新生牛血清,使得乳白蛋白水解物的浓度为0.2%,谷氨酰胺的浓度为1%,新生牛血清的浓度为6%~8%,并用浓度7.5%NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2。

[0028] 优选的是,所述病毒维持液的制备包括：

[0029] 在199培养液中加入新生牛血清,使其浓度为1%~2%,并用浓度7.5%NaHCO₃溶液调节pH至7.4~7.8。

[0030] 优选的是,所述森林脑炎病毒为“森张”株病毒。

[0031] 优选的是,所述肾脏细胞感染森林脑炎病毒后,反复进行5~6次。

[0032] 优选的是,所述地鼠为体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠。

[0033] 优选的是,将所述地鼠无菌取肾,剪碎并洗涤后置于装有玻璃珠的三角瓶内,加入消化液消化。

[0034] 优选的是,所述多层细胞工厂每层接种地鼠的4对肾。

[0035] 本发明所述的有益效果：

[0036] 本发明设计开发了一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,采用细胞工厂进行细胞培养,并使用新的生长液和病毒维持液,在保证产品有效性及安全性的前提下,制备同等批量的森林脑炎灭活疫苗能够减少金黄地鼠使用约40%左右,提高了试验动物利用率,更加符合目前关于在实验动物福利与伦理中提出的减少、替代及优化的3R原

则。同时40层细胞工厂的培养面积约为10L转瓶的12倍左右,制备同等数量的地鼠肾细胞,所使用的细胞工厂数量明显少于10L转瓶,工艺的可控性。且制备的森林脑炎病毒中不需要添加任何防腐剂。

附图说明

- [0037] 图1为本发明所述培养68小时细胞工厂不同生长液配方细胞生长状态图。
- [0038] 图2为本发明所述培养72小时细胞工厂不同生长液配方细胞生长状态图。
- [0039] 图3为本发明所述培养68~72小时10L转瓶细胞生长状态图。
- [0040] 图4为本发明所述不同生长液加量葡萄糖消耗曲线图。
- [0041] 图5为本发明所述不同生长液加量乳酸堆积曲线图。
- [0042] 图6为本发明所述不同生长液加量细胞生长情况图。
- [0043] 图7为本发明所述感染病毒后病毒毒力曲线图。
- [0044] 图8为本发明所述不同病毒维持液加量森脑病毒多次收获液毒力曲线图。
- [0045] 图9为本发明所述不同病毒维持液加量森脑病毒多次收获液葡萄糖含量曲线图。
- [0046] 图10为本发明所述不同病毒维持液加量森脑病毒多次收获液乳酸含量曲线图。
- [0047] 图11为本发明所述不同容器森脑病毒多次收获液毒力曲线图。
- [0048] 图12为本发明所述不同容器病毒收获液葡萄糖含量曲线图。
- [0049] 图13为本发明所述不同容器森脑病毒收获液乳酸含量曲线图。

具体实施方式

[0050] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0051] 本发明提供一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0052] 步骤1:对体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠进行无菌取肾,剪碎并洗涤后置于装有玻璃珠的三角瓶内,按每对肾加入1.5~2.0ml消化液,并于2~8℃消化18~20h;

[0053] 其中,所述消化液为pH7.8~8.2的浓度为0.125% (100ml溶液中含有0.125g胰酶粉末,下述所有提到的%均为质量/体积分数,g/100ml)的胰蛋白酶液,且所述胰蛋白酶液中含有100IU/ml的硫酸卡那霉素;

[0054] 步骤2:将消化后的肾脏组织接种至多层细胞工厂(每层接种地鼠的4对肾),加入生长液200~250ml/层,置于37±1℃的恒温室中静置培养68~72h,使得肾脏细胞长成致密单层;

[0055] 其中,所述生长液为pH6.8~7.2且含6%~8%新生牛血清、0.2%乳蛋白水解物和1%谷氨酰胺的MEM培养液,且所述MEM培养液中含有100IU/ml的硫酸卡那霉素;

[0056] 步骤3:将所述肾脏细胞感染森林脑炎病毒(本实施例中为“森张”株病毒),控制感染复数为0.1~1.0,并加入病毒维持液200~250ml/层,置于33±1℃的恒温室静置培养96h后进行第一次收获,收获后补加与收获液量相同的维持液继续置于33±1℃的恒温室静置培养48小时,再次进行收获,反复进行多次收获;

[0057] 其中,所述病毒维持液为pH7.4~7.8且含1%~2%新生牛血清的199培养液。

[0058] 本实施例中,MEM培养液的制备包括:

[0059] 将MEM干粉培养基溶解于灭菌注射用水中,充分搅拌至完全溶解后,通过0.22 μ m无菌滤膜过滤除菌,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;

[0060] 其中,所述MEM培养液中MEM干粉培养基的浓度为0.0095g/ml。

[0061] 消化液的制备包括:

[0062] 将浓度为0.5%的胰蛋白酶液通过所述MEM培养液按稀释至浓度为0.125%,用浓度为7.5%的NaHCO₃溶液调节pH至7.8~8.2后,加入硫酸卡那霉素使其浓度为100IU/ml。

[0063] 生长液的制备包括:

[0064] 在所述MEM培养液中加入乳白蛋白水解物、谷氨酰胺和新生牛血清,使得乳白蛋白水解物的浓度为0.2%,谷氨酰胺的浓度为1%,新生牛血清的浓度为6%~8%,并用浓度7.5%NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2。

[0065] 病毒维持液的制备包括:

[0066] 在199培养液中加入新生牛血清,使其浓度为1%~2%,并用浓度7.5%NaHCO₃溶液调节pH至7.4~7.8。

[0067] 下面结合实施例对本发明提供的基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法进行详细说明。

[0068] 试验动物均采用SPF级金黄地鼠13g~16g,12~14日龄,由长春生物制品研究所有限责任公司动物室提供。主要试剂如表1所示。实验仪器及耗材如表2所示。

[0069] 表1主要试剂

试剂名称	生产厂家
MEM 培养基 (干粉)	Hyclone 公司
199 培养基 (干粉)	GIBCO 公司
胰蛋白酶	GIBCO 公司
水解乳蛋白	Hyclone 公司
新生牛血清	太原润生生物材料有限公司

[0071] 表2仪器及耗材

	名称	型号	生产厂家
	倒置显微镜	--	南京康达设备厂
	FFU	2400×1200	苏州安泰有限公司
[0072]	pH 检测仪	PHS-3C	上海仪电科学仪器公司
	自动细胞计数器	IC1000	上海睿钰生物科技有限公司
	细胞工厂	10 层	Corning 公司
	细胞工厂	40 层	Corning 公司

[0073] (一) 关于地鼠肾细胞的制备

[0074] 取体重为13~16g, 12~14日龄的SPF级地鼠, 无菌取肾并剪碎, 洗涤后的肾脏组织块置于装有玻璃珠的三角瓶内, 并按每对肾加入1.5~2.0ml pH 为7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液(含100IU/ml硫酸卡那霉素)于2~8℃ 消化18~20小时。来源于同一批地鼠、同一容器内消化制备的地鼠肾细胞为一个细胞消化批; 源自同一批地鼠、于同一天制备的多个细胞消化批为一个细胞批。

[0075] 在小规模方瓶实验中, 结果显示平均每个与Corning公司细胞工厂相同材质的225cm²方瓶中接种2对地鼠肾, 经68~72小时37±1℃培养后, 可以长成致密单层细胞且形态良好。故同面积基本同比例放大后, 本实验按照每层细胞工厂接种4对地鼠肾细胞接种细胞工厂, 即变更后工艺制备的拟以160对肾为一个细胞消化批, 每个消化批制备的细胞接种每层面积为636cm²的细胞工厂共计40层。

[0076] 按照变更前工艺制备的, 75~100对肾为一个细胞消化批, 每个消化批制备的细胞接种每瓶面积约为1900cm²的10L转瓶共计5瓶。

[0077] (二) 对细胞生长液进行变更试验

[0078] 变更前使用的溶液的配制

[0079] 消化液: 将0.5%胰蛋白酶使用MEM按照终浓度为0.125%进行稀释, 用7.5%的NaHCO₃溶液调节pH至7.8~8.2, 同时按照终浓度为100IU/ml补加硫酸卡那霉素。

[0080] 生长液: 含6~8%小牛血清、0.2%乳白蛋白水解物的Earle's液, 并用7.5%NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2。

[0081] 变更后使用的溶液的配制

[0082] MEM溶液: 取MEM干粉培养基4750g溶解于终体积为500L的灭菌注射用水中, 充分搅拌至完全溶解后0.22μm无菌滤膜过滤除菌, 2~8℃保存备用。

[0083] 消化液: 将0.5%胰蛋白酶使用MEM按照终浓度为0.125%进行稀释, 用7.5%的NaHCO₃溶液调节pH至7.8~8.2, 同时按照终浓度为100IU/ml补加硫酸卡那霉素。

[0084] 生长液: 在含有0.2%、0.3%及0.4%乳白蛋白水解物及1%谷氨酰胺的MEM液中按照试验要求分别加入4%、6%、8%及10%的新生牛血清, 并用7.5%NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2。

[0085] 细胞生长液变更前后的细胞工厂及培养瓶对比如表3所示。

[0086] 表3细胞工厂及培养瓶对比表

	材质	接种地鼠数量	培养容器数量	总面积
[0087]	10L 转瓶	100 对肾	5 瓶	9500cm ²
	细胞工厂	160 对肾	40 层	25440cm ²

[0088] 实施例

[0089] 在MEM溶液的基础上摸索新生牛血清及水解乳蛋白的最适加量,按照在 MEM溶液中加入终浓度为4%、6%、8%及10%的新生牛血清和0.2%、0.3% 及0.4%水解乳蛋白设计试验,用7.5%的NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2,共 设计12种生长液配方,每种生长液制备的细胞悬液接种一个10层细胞工厂, 按照每层加生长液200ml,使细胞悬液均匀分布在细胞工厂的每一层,置于 37±1℃恒温室静置培养,至第68~72小时观察细胞生长状态。

[0090] 对比例

[0091] 按照转瓶工艺用含6~8%小牛血清、0.2%乳白蛋白水解物的Earle's生长 液制成细胞悬液。分装5个10L瓶中,置于37±0.5℃恒温室静置培养,至第 68~72小时观察细胞生长状态。

[0092] MEM作为市售培养基,各厂家均按照统一标准进行生产,批间差异相对 较小,因此在变更后工艺拟采用MEM作为基础培养基,在其中加入少量的 水解乳蛋白和新生牛血清以满足细胞生长需要。在转瓶工艺的基础上按 4%~10%血清和0.2%~0.4%水解乳蛋白设计正交试验。培养至第68及72h观 察细胞生长状态结果表4、5所示,生长状态图如图1和2所示。

[0093] 表4培养68小时细胞工厂不同生长液配方生长状态汇总表

血清浓度	水解乳蛋白浓度		
	0.2%	0.3%	0.4%
[0094] 4%	+++	+++	+++~++++
6%	++++	++++	++++
8%	++++	++++	++++
10%	++++	++++	++++

[0095] 表5培养72小时细胞工厂不同生长液配方生长状态汇总表

	血清溶度	水解乳蛋白溶度		
		0.2%	0.3%	0.4%
[0096]	4%	+++	+++	++++
	6%	++++	++++	++++
	8%	++++	++++	++++
	10%	++++	++++	++++

[0097] (注释:每一个“+”代表细胞贴壁面积占培养面积的25%,故“++++”代表细胞已长满。)

[0098] 按照变更前工艺,采用转瓶工艺制备的5瓶原代地鼠肾细胞培养至第 68~72小时均长成致密单层,观察结果均为++++,其生长状态结果表6 所示,生长状态图如图3所示。

[0099] 表6培养68~72小时转瓶工艺细胞生长状态汇总表

培养时间	转瓶 1	转瓶 2	转瓶 3	转瓶 4	转瓶 5
[0100] 68h	++++	++++	++++	++++	++++
72h	++++	++++	++++	++++	++++

[0101] 由以上结果可知,在加入0.2%~0.4%水解乳蛋白的情况下,其浓度对细胞生长状态影响不大;而新生牛血清的终浓度超过6%时都能满足细胞经 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养68~72小时后均能满足细胞长成致密单层的要求。

[0102] 因此,基于对疫苗成本和下游纯化的考虑,在采用细胞工厂制备原代地鼠肾细胞过程中,确定生长液配方为“含6%~8%新生牛血清、0.2%乳蛋白水解物、1%谷氨酰胺的MEM液(含终浓度为100IU/ml的硫酸卡那霉素)”。在此配方下细胞经 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养68~72小时,可以长成致密单层的细胞,与采用变更前工艺制备的原代地鼠肾细胞的生长状态一致,能够满足生产所需。

[0103] (三)对生长液的加入量进行试验

[0104] 根据上述实验结果,在使用已经确定的消化参数、生长液配方,并按照 160只地鼠(即每层细胞工厂接种4对地鼠肾)为一个消化组的前提下,开展每层细胞工厂最适生长液加量的研究,考虑到每层细胞工厂的容积,初步确定以250ml/层为加液的上限。

[0105] 取160只(即每层细胞工厂接种4对肾)体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块,置于装有玻璃珠的三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH值为7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液(含100IU/ml硫酸卡那霉素)中,于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 消化18~20小时。

[0106] 消化后,每个解剖组均接种4个10层细胞工厂,分别按照每层加液100ml、150ml、200ml和250ml补加生长液,使细胞悬液均匀分布在细胞工厂的每一层,置于 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温室静置培养,分别于接种后第24小时、48小时、68小时及72小时分别取样,检测生长液中葡萄糖含量及乳酸含量,并观察细胞生长状态,以确定每层细胞工厂生长液的最适加量。

[0107] 以上工作连续重复3批,根据置 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温室静置培养三天内生长液中葡萄糖含量及乳酸含量及培养68~72小时后细胞的生长状态确定每层细胞工厂生长液的最适加量。

[0108] 10L转瓶对照组:按照变更前生产工艺,取300只体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠,平均分为三组,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块,置于装有玻璃珠的三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液于2~8℃消化18~20小时。消化后,每个解剖组接种5个10L转瓶,每个转瓶补加生长液至1200ml,置于 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温室旋转培养,分别于接种后第24小时、48小时、68小时及72小时取样,检测生长液中葡萄糖含量及乳酸含量,并观察细胞生长状态。

[0109] 具体试验结果如表7-9以及图4-6所示。

[0110] 表7不同生长液加量葡萄糖消耗汇总表

生长液 加量	批号	葡萄糖含量 (mmol/L)				
		生长液	24h	48h	68h	72h
[0111] 细胞工厂 100ml/层	SX201504	1.06	0.73	0.46	0.13	0.01
	SX201505	1.06	0.75	0.43	0.13	0.02
	SX201506	1.06	0.72	0.41	0.10	0.04
	三批均值	1.06	0.73	0.43	0.12	0.02
细胞工厂 150ml/层	SX201504	1.06	0.76	0.54	0.15	0.05
	SX201505	1.06	0.77	0.56	0.15	0.04

		SX201506	1.06	0.76	0.50	0.10	0.03
		三批均值	1.06	0.76	0.53	0.13	0.04
		SX201504	1.06	0.89	0.84	0.54	0.45
	细胞工厂 200ml/层	SX201505	1.06	0.90	0.83	0.55	0.47
		SX201506	1.06	0.93	0.79	0.52	0.43
		三批均值	1.06	0.91	0.82	0.54	0.45
[0112]		SX201504	1.06	0.94	0.79	0.61	0.45
	细胞工厂 250ml/层	SX201505	1.06	0.93	0.74	0.62	0.48
		SX201506	1.06	0.91	0.78	0.60	0.59
		三批均值	1.06	0.93	0.77	0.61	0.47
		SZX201503	1.06	0.96	0.80	0.63	0.52
	10L 转瓶	SZX201504	1.06	0.94	0.81	0.62	0.51
	1200ml/瓶	SZX201505	1.06	0.97	0.80	0.65	0.50
		三批均值	1.06	0.96	0.80	0.63	0.51

[0113] 表8不同生长液加量乳酸堆积汇总表

生长液 加量	批号	乳酸含量 (mmol/L)				
		生长液	24h	48h	68h	72h
细胞工厂 100ml/层	SX201504	0	0.5	1.1	1.8	1.9
	SX201505	0	0.4	0.9	1.6	1.9
	SX201506	0	0.5	1.2	1.5	1.8
	三批均值	0	0.5	1.1	1.6	1.9
细胞工厂 150ml/层	SX201504	0	0.4	0.9	1.6	1.7
	SX201505	0	0.5	0.9	1.5	1.7
	SX201506	0	0.4	0.9	1.5	1.6
	三批均值	0	0.4	0.9	1.5	1.7
细胞工厂 200ml/层	SX201504	0	0.2	0.6	0.9	1.0
	SX201505	0	0.2	0.4	0.9	1.0
	SX201506	0	0.3	0.5	0.7	0.9
	三批均值	0	0.2	0.5	0.8	1.0
细胞工厂 250ml/层	SX201504	0	0.1	0.4	0.9	0.9
	SX201505	0	0.2	0.3	0.7	1.0
	SX201506	0	0.2	0.4	0.7	0.8
	三批均值	0	0.2	0.4	0.8	0.9
10L 转瓶 1200ml/瓶	SZX201503	0	0.2	0.3	0.6	0.8
	SZX201504	0	0.4	0.4	0.7	0.9
	SZX201505	0	0.2	0.5	0.7	0.9
	三批均值	0	0.3	0.4	0.7	0.9

[0114] 表9不同生长液加量细胞生长状态汇总表

生长液加量	批号	细胞生长状态观察结果			
		24h	48h	68h	72h
细胞工厂 100ml/层	SX201504	+	+	++	+++
	SX201405	+	+	++	+++
	SX201506	+	+	++	+++
[0117] 细胞工厂 150ml/层	SX201504	+	+	++~+++	+++
	SX201405	+	+	++~+++	+++
	SX201506	+	+	++~+++	+++
细胞工厂 200ml/层	SX201504	+	++	++++	++++
	SX201405	+	++	++++	++++
	SX201506	+	++	++++	++++
细胞工厂 250ml/层	SX201504	+	++	++++	++++
	SX201405	+	++	++++	++++
	SX201506	+	++	++++	++++

[0118] 细胞工厂工艺分别按照每层补加100ml、150ml、200ml和250ml生长液，原转瓶工艺按照每瓶补加1200ml生长液，分别培养三批原代地鼠肾细胞，将其培养三天内生长液中的葡萄糖消耗量和乳酸堆积量进行比较，结果显示细胞工厂工艺按照每层补加200ml和250ml生长液，其葡萄糖消耗量和乳酸堆积量与转瓶工艺相接近；在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温室静置培养68~72小时后，每层生长液加量为100ml和150ml的原代地鼠肾细胞生长状态稍差，每层生长液加量为200ml和250ml的原代地鼠肾细胞可长成致密单层，且细胞呈梭形，边缘清晰，细胞内颗粒较少，细胞生长状态良好（具体细胞生长情况请见表3-18和图3-7）。综合考虑葡萄糖消耗量、乳酸堆积量和细胞生长状态，确定细胞工厂工艺细胞悬液加量为200~250ml/层。

[0119] (四) 病毒维持液配方的变更

[0120] 本申请中所使用的森林脑炎病毒为“森张”株，其在病毒学属于黄病毒属黄病毒科(Flaviviridae-Flavivirus)。该病毒株由本申请人保藏在中国典型培养物保藏中心，地址为中国武汉的武汉大学，其保藏号为CCTCC V202004，保藏日期为2002年9月9日。

[0121] 常用溶液配制

[0122] MEM溶液：取MEM干粉培养基4750g溶解于终体积为500L的灭菌注射用水中，充分搅拌至完全溶解后0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌，2~8 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

[0123] 199溶液：取199干粉培养基954.9g溶解于终体积为100L的灭菌注射用水中，充分搅拌至完全溶解后0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌，2~8 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

[0124] 消化液：将0.5%胰蛋白酶使用MEM按照终浓度为0.125%进行稀释，用7.5%的

NaHCO₃溶液调节pH至7.8~8.2,同时按照终浓度为100IU/ml补加 硫酸卡那霉素。

[0125] 细胞生长液:在含有0.2%乳白蛋白水解物、1%谷氨酰胺的MEM液中按 照终浓度为6%加入新生牛血清,并用7.5%NaHCO₃溶液调节pH至6.8~7.2。

[0126] 变更前病毒维持液:含0.002%半胱氨酸、1%~2%新生牛血清的Earle's 液。

[0127] 变更后病毒维持液:内含1%~2%新生牛血清的199溶液,并用NaHCO₃溶液调节pH至7.4~7.8。

[0128] 根据前期实验结果,在使用已经确定的消化参数、生长液配方及加量的 前提下,开展病毒维持液配方变更的研究,其中,由于细胞基质及毒种制备 方式均未变更,故在开展本项研究时毒种仍按照MOI (感染复数)为0.1~1.0 加入。

[0129] 实施例

[0130] 取320只(即每层细胞工厂接种4对肾)体重为13g~16g,12~14日龄 的SPF级地鼠,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块,置于装有玻璃珠的 三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液(含 100IU/ml硫酸卡那霉素)于2~8℃消化18~20小时。消化后,每个解剖组 均接种4个10层细胞工厂,每个细胞工厂加生长液2000ml(即200ml/层), 置于37±1℃恒温室静置培养68~72小时,细胞长成致密单层后感染森林脑 炎病毒,每个细胞工厂加入病毒维持液2000ml(即200ml/层),其中4个细 胞工厂的维持液中按照1%添加新生牛血清,批号为SX201507,另外4个按 照2%添加新生牛血清,批号为SX201508,置33±1℃恒温室静置培养,每天 分别取样检测上清液中的毒力,连续检测7天。

[0131] 对比例

[0132] 按照变更前生产工艺,取100只体重为13g~16g,12~14日龄的SPF 级地鼠,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块,置于装有玻璃珠的三角瓶 内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液(含 100IU/ml硫酸卡那霉素)于2~8℃消化18~20小时。消化后,每个解剖组 均接种5个10L转瓶,每个转瓶加液1200ml,置于37±1℃恒 温室静置培养 68~72小时,待细胞长成致密单层后感染森林脑炎病毒,每个转瓶加入维持 液2.2±0.5L,批号为SZX201506,置33±1℃恒温室培养,每天取样检测上清 液毒力,连续检测7天。

[0133] 具体结果如表10和图7所示。

[0134] 表10病毒毒力结果汇总表

序号	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
[0135] SX201507	7.0	7.5	7.75	8.5	8.25	8.0	7.75
	7.25	7.4	8.0	8.5	8.4	8.0	7.75
	7.0	7.5	8.0	8.25	8.0	7.75	7.5
	7.0	7.25	7.5	8.5	8.4	8.0	7.5
	均值:						
	7.05	7.41	7.81	8.44	8.24	7.94	7.63

[0136]	SX201508	7.0	7.25	7.75	8.5	8.0	8.0	7.5
		7.0	7.25	7.5	8.4	8.25	8.0	7.4
		7.25	7.4	7.75	8.5	8.4	7.75	7.25
		7.25	7.25	7.75	8.5	8.25	8.0	7.5
		均值:						
		7.13	7.36	7.69	8.48	8.23	7.94	7.41
[0136]	SZX201506	7.0	7.4	7.75	8.5	8.0	7.5	7.25
		7.0	7.5	7.75	8.0	8.0	7.5	7.0
		7.0	7.5	7.75	8.25	8.0	7.25	7.0
		7.25	7.4	7.75	8.5	8.0	7.4	7.25
		7.0	7.25	7.75	8.4	8.0	7.4	7.25
		均值:						
		7.05	7.29	7.75	8.33	8.00	7.41	7.15

[0137] 实验结果表明,细胞工厂实验组与10L转瓶对照组,按照同一MOI进行感染时,在接种病毒后,病毒增殖曲线趋势基本一致,感染96小时后病毒增殖曲率均下降,提示可在感染72~96小时进行第一次收获,更换新的维持液继续培养并进行收获。

[0138] (五)对病毒维持液加量的试验

[0139] 由于细胞基质及毒种制备方式均未变更,故在开展本项研究时仍按照MOI为0.1~1.0加入毒种以感染细胞。

[0140] 实施例

[0141] 取160只(即每层细胞工厂接种4对肾)体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块,置于装有玻璃珠的三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液于2~8℃消化18~20小时。消化后,接种4个10层细胞工厂,每个细胞工厂加生长液8000ml(即200ml/层),置于37±1℃恒温室静置培养68~72小时,待细胞长成致密单层后感染森林脑炎病毒毒种,分别补加维持液1000ml(即100ml/层)、1500ml(即150ml/层)、2000ml(即200ml/层)、2500ml(即250ml/层),感染后置33±1℃恒温室静置培养4天进行第一次收获,收获后补加与收获液量相同的维持液置33±1℃恒温室静置培养48小时,再次进行收获。如此反复进行多次收获,每次取样检测上清液病毒毒力、葡萄糖含量、乳酸含量。

[0142] 对比例

[0143] 按照变更前生产工艺,取85只体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块,置于装有玻璃珠的三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液于2~8℃消化18~20小时。消化后,接种5个10L转瓶,每个转瓶加液1200ml,置于37±0.5℃恒温室静置培养68~72小时,待细胞长成致密单层后感染森林脑炎病毒毒种每个转瓶加入维持液1200ml,感染后置33±1℃恒温室旋转培养4天进行第一次收获,收获后补加维持液2.2±0.5L/瓶,置33±1℃恒温室旋转培

养3天后,再次进行收获。每次取样检测上清液病毒毒力、葡萄糖含量、乳酸含量。

[0144] 具体结果如表11-13和图8-10所示。

[0145] 表11不同维持液加量森脑病毒多次收获液毒力汇总表

维持液加量	病毒滴度 (lgLD ₅₀ /ml)									
	收获次数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
转瓶工艺 (2000ml/瓶)	8.0	7.5	7.0	6.0	-	-	-	-	-	-
[0146] 细胞工厂 (100ml/层)	8.0	8.4	8.25	8.25	8.0	7.75	7.5	7.0	6.5	6.5
细胞工厂 (150ml/层)	8.0	8.25	8.25	8.4	8.0	7.5	7.0	7.0	6.5	6.0
细胞工厂 (200ml/层)	8.25	8.5	8.5	8.25	8.25	8.0	7.5	7.5	7.0	6.5
细胞工厂 (250ml/层)	8.25	8.5	8.25	8.25	8.0	7.75	7.75	7.0	7.0	6.5

[0147] 表12不同维持液加量森脑病毒多次收获液葡萄糖含量汇总表

维持液加量	葡萄糖含量 (mmol/L)										
	收获次数										
	维持液	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
转瓶工艺 (2000ml/瓶)	1.04	0.86	0.84	0.92	0.97	-	-	-	-	-	-
[0148] 细胞工厂 (100ml/层)	1.04	0.59	0.76	0.78	0.86	0.90	0.95	0.97	0.97	0.98	0.98
细胞工厂 (150ml/层)	1.04	0.63	0.75	0.82	0.87	0.92	0.95	0.96	0.96	0.97	1.0
细胞工厂 (200ml/层)	1.04	0.77	0.83	0.84	0.84	0.86	0.87	0.89	0.90	0.91	0.91
细胞工厂 (250ml/层)	1.04	0.82	0.84	0.84	0.85	0.87	0.88	0.89	0.91	0.92	0.93

[0149] 表13不同维持液加量森脑病毒多次收获液乳酸含量汇总表

	乳酸含量 (mmol/L)										
	维持液加量	收获次数									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0150] 转瓶工艺(2000ml/瓶)	1.5	1.4	1.2	1.0	-	-	-	-	-	-	
细胞工厂(100ml/层)	1.8	1.7	1.6	1.5	1.1	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2	
细胞工厂(150ml/层)	1.7	1.6	1.4	1.2	1.2	1	0.8	0.7	0.7	0.6	
细胞工厂(200ml/层)	1.6	1.6	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.1	1	
细胞工厂(250ml/层)	1.5	1.5	1.4	1.4	1.3	1.3	1.1	1.1	0.9	0.8	

[0151] 细胞工厂实验组进行了10次病毒收获液的收获,转瓶对照组进行了4次 病毒收获液的收获,将补加维持液100ml/层、150ml/层、200ml/层和250ml/ 层的细胞工厂所得的每次收获液检测结果与10L转瓶对照组进行比较,结果 显示维持液加量为100ml/层和150ml/层所得病毒收获液的葡萄糖含量和乳酸 含量变化范围较大,200ml/层和250ml/层所得病毒收获液的葡萄糖含量和乳 酸含量变化范围相对稳定,结合病毒收获液病毒毒力变化情况、葡萄糖含量 变化情况、乳酸含量变化情况,拟确定细胞工厂工艺维持液加量为200~250ml 每层。

[0152] (六) 病毒收获次数试验

[0153] 由于细胞基质及毒种制备方式均未变更,故在开展本项研究时仍按照 MOI为0.1~1.0加入毒种。根据前期细胞工厂实验组及10L转瓶对照组的病 毒增殖实验结果,初步确定,感染后置33±1℃恒温室静置培养96小时进行 第一次收获,收获后补加维持液置33±1℃恒温室静置培养48小时,再次进 行收获。

[0154] 实施例

[0155] 取160只(即每层细胞工厂接种4对肾)体重为13g~16g,12~14日龄 的SPF级地鼠为一个解剖组,共解剖5组,分别无菌取肾并剪碎,洗涤后的 肾脏组织块,置于装有玻璃珠的三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液(含100IU/ml硫酸卡那霉素)于2~8℃ 消化18~20小时。消化后,每个解剖组均接种1个40层细胞工 厂,每个细 胞工厂加生长液8000ml(即200ml/层),置于37±1℃恒温室静置培养68~72 小时,待细胞长成致密单层后感染森林脑炎病毒,每个细胞工厂加入维持液 8000ml(即 200ml/层),感染后置33±1℃恒温室静置培养96小时后进行第一 次收获,收获后补加维持液8000ml(即200ml/层)置33±1℃恒温室静置培养 48小时,再次进行收获。如此反复进行 多次收获,每天取样检测上清液病毒 毒力、葡萄糖含量、乳酸含量。

[0156] 对每次收获后的病毒液抽提RNA,反转录并对编码病毒主要保护性抗原 E蛋白的 核酸扩增后,进行测序,分析各代次编码主要保护性抗原的核酸变 异情况。同时将第9次收 获的病毒液作为毒种感染已经长成致密单层的原代 地鼠肾细胞,置33±1℃恒温室培养96 小时后收获上清液,记为第10次收获 液并检测病毒毒力,同时将第10次收获液作为毒种再

次感染已经长成致密单层的原代地鼠肾细胞,置 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温室培养96小时后收获上清液检测病毒毒力,如此反复,继续进行10次收获。每次收获后均对收获液抽提RNA,反转录并对编码病毒主要保护性抗原E蛋白的核酸扩增后,进行测序,分析各代次编码主要保护性抗原的核酸变异情况。

[0157] 对比例

[0158] 按照变更前生产工艺,取100只体重为13g~16g,12~14日龄的SPF级地鼠,无菌取肾并剪碎,洗涤后的肾脏组织块置于装有玻璃珠的三角瓶内,并按每对肾加入1.5~2.0ml pH7.8~8.2的0.125%的胰蛋白酶液(含100IU/ml 硫酸卡那霉素)于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 消化18~20小时。消化后,接种5个10L转瓶,每个转瓶加液1200ml,置于 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 恒温室静置培养68~72小时,待细胞长成致密单层后感染森林脑炎病毒,每个转瓶加入维持液 $2.2\pm 0.5\text{L}$,感染后置 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温室静置培养96小时进行第一次收获,收获后补加维持液 $2.0\pm 0.5\text{L}$ 置 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温室静置培养48小时,再次进行收获,共计收获四次,每天取样检测上清液病毒毒力。

[0159] 具体结果如表14-17和图11-13所示。

[0160] 表14病毒滴度结果汇总表

容器	批号	病毒滴度 (lgLD ₅₀ /ml)									
		收获次数									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
转瓶	ZS201501	8.0	7.75	7.5	7.0	-	-	-	-	-	-
	SS201501	8.5	8.5	8.25	8.0	8.0	7.75	7.5	7.0	7.0	6.5
	SS201502	8.5	8.5	8.0	8.25	8.0	8.0	7.75	7.5	7.0	6.5
细胞工厂	SS201503	8.75	8.5	8.5	8.25	8.0	8.0	7.5	7.4	7.0	6.5
	SS201504	8.5	8.5	8.25	8.0	8.25	8.0	7.75	7.0	7.0	6.5
	SS201505	8.5	8.4	8.5	8.25	8.0	8.0	7.75	7.5	7.0	6.5

[0162] 表15不同容器森脑病毒收获液葡萄糖含量汇总表

容器	批号	维持液	葡萄糖含量 (mmol/L)									
			收获次数									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0163] 细胞工厂	转瓶 ZS201501	1.04	0.79	0.86	0.93	0.99	-	-	-	-	-	-
	SS201501	1.04	0.75	0.78	0.80	0.83	0.86	0.87	0.97	0.98	0.99	0.99
	SS201502	1.04	0.78	0.80	0.81	0.84	0.85	0.88	0.93	0.96	0.97	0.99
	SS201503	1.04	0.79	0.83	0.83	0.84	0.86	0.87	0.96	0.97	0.98	1.00
	SS201504	1.04	0.81	0.82	0.84	0.84	0.86	0.87	0.97	0.98	0.99	0.99
	SS201505	1.04	0.80	0.83	0.84	0.84	0.88	0.95	0.97	0.98	0.99	1.00

[0164] 表16病毒收获液乳酸堆积汇总表

容器	批号	乳酸含量 (mmol/L)									
		收获次数									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0165] 细胞工厂	转瓶 ZS201501	1.5	1.4	1.2	1.2	-	-	-	-	-	-
	SS201501	1.6	1.8	1.6	1.5	1.4	1.4	1.3	1.1	0.9	0.5
	SS201502	1.6	1.7	1.6	1.5	1.5	1.5	1.2	0.9	0.7	0.3
	SS201503	1.7	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.1	1.0	1.0	0.4
	SS201504	1.7	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.1	0.9	0.8	0.5
	SS201505	1.6	1.7	1.6	1.5	1.5	1.3	0.9	0.6	0.5	0.4

[0166] 表17突变位点信息汇总表

突变位点	突变代次	碱基突变情况	编码的氨基酸变化情况	对E蛋白的影响
[0167] 第 608 位	15、19、20	A→C	终止→Cys	无影响
第 1260 位	11、12、13	A→C	Leu→Leu	无影响

[0168] 实验结果表明,细胞工厂实验组与10L转瓶对照组,按照同一MOI进行感染细胞,病毒经96小时培养可以进行第一次收获,更换维持液并培养48小时后可再次收获病毒液,细胞工厂实验组收获10次,细胞无明显变化。结合收获液病毒毒力变化情况、葡萄糖含量变化情况、乳酸含量变化情况、编码主要保护性抗原的核酸变异情况及后续实际生产情况,拟规定细胞工厂实验组可进行3~5次病毒收获。

[0169] 在另一种实施例中,结合收获液病毒毒力变化情况、葡萄糖含量变化情况、乳酸含量变化情况、编码主要保护性抗原的核酸变异情况及后续实际生产情况,拟规定细胞工厂实验组可进行5~6次病毒收获。

[0170] 对每次收获后的病毒液抽提RNA,反转录并对编码病毒主要保护性抗原 E蛋白的核酸扩增后,进行测序,分析各代次编码主要保护性抗原的核酸变异情况。同时将第9次收获的病毒液作为毒种感染已经长成致密单层的原代地鼠肾细胞,置 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养96小时后收获上清液,记为第10次收获液并检测病毒毒力,同时将第10次收获液作为毒种再次感染已经长成致密单层的原代地鼠肾细胞,置 $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养96小时后收获上清液检测病毒毒力,如此反复,继续进行10次收获,即从感染毒种记,累计收获19次。每次收获后均对收获液抽提RNA,反转录并对编码病毒主要保护性抗原E蛋白的核酸扩增后,进行测序,分析各代次编码主要保护性抗原的核酸变异情况。

[0171] 测序结果表明,除第11、12及13次收获液的1260位有突变、第15、19级20次收获的608位有突变外,其他各代次收获液的测序结果表明均无突变。其中,编码主要保护区第1260位的突变导致了碱基由A突变为C,但由于密码子简并性,这种改变并没有使其编码的氨基酸发生改变,均为编码Leu。对于编码主要保护区第608位的突变导致了碱基由A突变为C,编码的氨基酸也由终止密码子突变为Cys,但杨睿在《贾第虫GeRF1识别终止密码子性质分析》一文中指出:Paramecium、Tetrahymena和Stylonychia将通用终止密码子UAA和UAG翻译成谷氨酰胺,将UGA识别为终止密码。Euplotes中UAA和UAG作为终止密码子,而通用终止密码子UGA翻译成半胱氨酸。由此推测第608位由于碱基突变造成终止密码子突变成了半胱氨酸密码子,这个突变并没有改变蛋白的性质,突变前终止密码子和突变后半胱氨酸密码子表达的氨基酸都是半胱氨酸(见表17)。因此,从遗传稳定性方面,变更后采用细胞工厂方法连续收获10代对E蛋白无影响,参考《中国药典(三部)》(2015年版)“人用疫苗学总论”3.3项“病毒性疫苗种子批系统”中关于种子批遗传稳定性的评估的相关要求,同时结合制品的生产情况,故规定采用细胞工厂制备森林脑炎灭活疫苗病毒收获液时,可进行5~6次病毒收获。

[0172] (六)对按照变更后工艺试生产森林脑炎病毒制备的灭活疫苗原液进行研究

[0173] 按照变更后工艺试生产森林脑炎灭活疫苗原液3批,留样品放置在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 及 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下,按照疫苗原液稳定性考察方案进行考察。其在0天、30天、60天、90天和120天分别检查时,无菌检查符合规定,抗原含量符合规定,均满足 $\geq 1:32$,其他各项检定项目结果(见表18、表19及表20),疫苗在观察条件下,质量稳定。

[0174] 表18疫苗原液长期稳定性考察结果汇总表($5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下)

[0175]

检定项目	工艺情况	合格标准	批号	0天	30天	60天	90天	120天
蛋白质含量测定	变更前工艺生产	≤80μg/ml	Y201508	71.4μg/ml	70.8μg/ml	71.1μg/ml	70.2μg/ml	70.1μg/ml
			Y201509	71.0μg/ml	70.2μg/ml	71.1μg/ml	70.8μg/ml	70.5μg/ml
			Y201601	69.8μg/ml	69.0μg/ml	69.1μg/ml	69.5μg/ml	69.1μg/ml
	变更后工艺生产		SY201601	36.6μg/ml	35.8μg/ml	36.2μg/ml	36.6μg/ml	36.0μg/ml
			SY201602	40.2μg/ml	40.8μg/ml	40.1μg/ml	39.2μg/ml	40.7μg/ml
			SY201603	35.0μg/ml	35.4μg/ml	35.1μg/ml	34.9μg/ml	35.2μg/ml
牛血	变更	< 40ng/ml	Y201508	11ng/ml	10ng/ml	10 ng/ml	11ng/ml	11 ng/ml
			Y201509	10 ng/ml	11 ng/ml	10 ng/ml	10ng/ml	11 ng/ml

[0176]

清白蛋白残留量测定	前工艺生产	Y201601	11ng/ml	11ng/ml	11 ng/ml	10ng/ml	11 ng/ml
		SY201601	13 ng/ml	11 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml
	变更后工艺生产	SY201602	13 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml	13 ng/ml	11 ng/ml
		SY201603	11ng/ml	10ng/ml	11ng/ml	11 ng/ml	11 ng/ml

[0177] 注：/表示按照《森林脑炎灭活疫苗原液长期稳定性考察方案》不进行该项检定。

[0178] 表19疫苗原液加速稳定性考察结果汇总表(25±2℃条件下)

检定项目	变更情况	合格标准	批号	0 天	30 天	60 天	90 天
[0179] 蛋白质含量测定	变更前工艺生产	≤80μg/ml	Y201508	71.4μg/ml	71.2μg/ml	71.6μg/ml	71.1μg/ml
			Y201509	71.0μg/ml	71.5μg/ml	71.2μg/ml	71.3μg/ml
			Y201601	69.8μg/ml	69.5μg/ml	69.3μg/ml	69.9μg/ml
	变更后工艺生产		SY201601	36.6μg/ml	36.2μg/ml	36.5μg/ml	35.9μg/ml
			SY201602	40.2μg/ml	39.9μg/ml	39.5μg/ml	40.7μg/ml
			SY201603	35.0μg/ml	34.7μg/ml	34.9μg/ml	35.3μg/ml
牛血清白蛋白残留量测定	变更前工艺生产	< 40ng/ml	Y201508	11 ng/ml	10 ng/ml	10ng/ml	10 ng/ml
			Y201509	10 ng/ml	11 ng/ml	11 ng/ml	11 ng/ml
			Y201601	11 ng/ml	11 ng/ml	11 ng/ml	10 ng/ml
	变更后工艺生产		SY201601	13 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml
			SY201602	13 ng/ml	11 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml
			SY201603	11ng/ml	11 ng/ml	11 ng/ml	11 ng/ml

[0180] 注：/表示按照《森林脑炎灭活疫苗原液加速稳定性考察方案》不进行该项。

[0181] 表20疫苗原液加速破坏性考察结果汇总表(37±1℃条件下)

检定项目	变更情况	合格标准	批号	0 天	7 天	14 天
[0182] 蛋白质含量测定	变更前工艺生产	≤80μg/ml	Y201508	71.4μg/ml	70.6μg/ml	71.0μg/ml
			Y201509	71.0μg/ml	70.5μg/ml	70.8μg/ml
			Y201601	69.8μg/ml	69.5μg/ml	69.3μg/ml
	变更后工艺生产		SY201601	36.6μg/ml	37.1μg/ml	36.4μg/ml
			SY201602	40.2μg/ml	39.8μg/ml	40.5μg/ml
			SY201603	35.0μg/ml	35.4μg/ml	34.8μg/ml
牛血清白蛋白残留量测定	变更前工艺生产	< 40ng/ml	Y201508	11 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml
			Y201509	10 ng/ml	10 ng/ml	11 ng/ml
			Y201601	11 ng/ml	10 ng/ml	11 ng/ml
	变更后工艺生产		SY201601	13 ng/ml	13 ng/ml	12 ng/ml
			SY201602	13 ng/ml	13ng/ml	13 ng/ml
			SY201603	11 ng/ml	12 ng/ml	12 ng/ml

[0183] (七)对按照变更后工艺试生产森林脑炎病毒制备的疫苗成品稳定性进行考察

[0184] 按照变更后生产工艺试生产森林脑炎灭活疫苗成品3批样品分别放置在 5±3℃、25±2℃及37±1℃条件下,按照成品稳定性考察方案进行考察。由于 内包材由安瓿瓶变更为西林瓶,故每种考察条件下均进行正放、侧放及倒 放的稳定性考察。对其在0、3、6、9、12、18、24和33个月时分别进行检查,其外观符合规定,装量符合规定,PH值符合规定,渗透压摩尔浓度检测 (mOsmol/kg)均在280左右,符合规定,氢氧化铝含量(mg/ml)均在0.30~0.70,符合规定,游离甲醛含量(μg/ml) < 10,符合规定,抗生素残留量(ng/剂)符合规定,

无菌检查符合规定,细菌内毒素含量<100EU/ml,符合规定,异常毒性检查符合规定,效价测定见表21、表22及表23,疫苗在观察条件下,质量稳定。同时,正放、侧放及倒放对疫苗的稳定性研究结果未造成影响。

[0185] 表21疫苗成品长期稳定性考察结果汇总表(5±3℃条件下)

[0186]		检	批号	合格	放	检测时间(月)						
定 项 目			标准	置 状 态	0	3	6	9	12	18	24	27
[0187] 效 价 测 定	变更前 工艺生 产 (安瓶 瓶)	201604 08	> 5.0*1 0 ⁵	--	2.6* 10 ⁸	7.2* 10 ⁷	1.0* 10 ⁸	1.6* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	7.8*10 ⁷	4.9*10 ⁷
		201604 09		--	2.5* 10 ⁸	3.2* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	7.6* 10 ⁷	1.2* 10 ⁸	7.0*1 0 ⁷	4.9*10 ⁷	3.6*10 ⁷
		201604 10		--	2.5* 10 ⁸	2.5* 10 ⁸	1.8* 10 ⁸	5.0* 10 ⁷	7.6* 10 ⁷	7.0*1 0 ⁷	7.4*10 ⁷	4.5*10 ⁷
	变更后 工艺生 产 (西林 瓶)	S20160 704		正 放	2.6* 10 ⁸	1.8* 10 ⁸	7.6* 10 ⁷	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	7.8*10 ⁷	7.8*10 ⁷	
				侧 放	1.8* 10 ⁸	2.0* 10 ⁸	1.2* 10 ⁸	1.2* 10 ⁸	7.6* 10 ⁷	7.0*1 0 ⁷	5.6*10 ⁷	2.3*10 ⁷
				倒 放	2.6* 10 ⁸	1.8* 10 ⁸	7.8* 10 ⁷	1.8* 10 ⁸	1.8*1 0 ⁸	1.8*10 ⁸	2.0*10 ⁷	
		S20160 705		正 放	1.8* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	7.6* 10 ⁷	1.6* 10 ⁸	5.5* 10 ⁷	5.6*1 0 ⁷	5.6*10 ⁷	1.4*10 ⁷

[0188]

S20160 706	侧放	1.0* 10 ⁸	1.2* 10 ⁸	3.2* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	7.8*10 ⁷	1.3*10 ⁷
	倒放	1.8* 10 ⁸	1.8* 10 ⁸	7.8* 10 ⁷	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	7.8*10 ⁷	3.2*10 ⁷
	正放	1.0* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	7.8*10 ⁷	4.9*10 ⁷
	侧放	1.0* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.2* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	8.7*10 ⁷	4.5*10 ⁷
	倒放	1.8* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0* 10 ⁸	1.0*1 0 ⁸	1.1*10 ⁸	4.4*10 ⁷

[0189]

表22疫苗成品加速稳定性考察结果汇总表 (25±2℃条件下)

[0190]

检定项目	批号	合格标准	放置状态	检测时间 (月)				
				0	3	6		
效价测定	变更前工艺生产 (安瓿瓶)	20160408	>5.0*10 ⁵	--	2.6*10 ⁸	1.8*10 ⁸	7.6*10 ⁷	
		20160409		--	2.5*10 ⁸	1.8*10 ⁸	7.9*10 ⁷	
		20160410		--	2.5*10 ⁸	1.0*10 ⁸	5.5*10 ⁷	
	变更后工艺试生产 (西林瓶)	S20160704		正放	1.8*10 ⁸		1.3*10 ⁸	5.5*10 ⁷
				侧放			1.0*10 ⁸	7.2*10 ⁷
				倒放			1.0*10 ⁸	5.5*10 ⁷
		S20160705		正放	1.8*10 ⁸		7.9*10 ⁷	5.5*10 ⁷
				侧放			1.0*10 ⁸	5.5*10 ⁷
				倒放			1.8*10 ⁸	5.5*10 ⁷
	S20160706	正放		1.8*10 ⁸	1.0*10 ⁸	1.0*10 ⁷		

[0191]		S20160706		侧放	符合规定	1.0*10 ⁸	7.2*10 ⁷
				倒放		1.0*10 ⁸	7.2*10 ⁷
				侧放		符合规定	符合规定
				倒放		符合规定	符合规定
				正放		符合规定	符合规定
				侧放		符合规定	符合规定
				倒放		符合规定	符合规定

[0192] 表23疫苗成品加速破坏性考察结果汇总表 (37±1℃条件下)

检定项目	批号	合格标准	放置状态	检测时间 (天)			
				0	7	14	
[0193] 效价测定	变更前工艺生产 (安瓿瓶)	20160408	> 5.0*10 ⁵	--	2.6*10 ⁸	2.6*10 ⁸	8.4*10 ⁶
		20160409		--	2.5*10 ⁸	2.5*10 ⁸	1.2*10 ⁷
		20160410		--	2.5*10 ⁸	2.5*10 ⁸	1.8*10 ⁷
	变更后工艺试生产 (西林瓶)	S20160704		正放	1.8*10 ⁷	1.8*10 ⁸	7.6*10 ⁶
				侧放		1.8*10 ⁸	1.2*10 ⁷
				倒放		1.8*10 ⁸	7.9*10 ⁶
		S20160705		正放	1.8*10 ⁷	1.8*10 ⁸	7.9*10 ⁶
				侧放		1.8*10 ⁸	1.0*10 ⁷
				倒放		1.8*10 ⁸	5.0*10 ⁶
		S20160706		正放	1.8*10 ⁷	1.8*10 ⁸	1.0*10 ⁷
				侧放		1.8*10 ⁸	1.0*10 ⁷
				倒放		1.8*10 ⁸	5.5*10 ⁶

[0194] 本发明设计开发了一种基于细胞工厂的森林脑炎病毒的制备方法,采用 细胞工厂进行细胞培养,并使用新的生长液和病毒维持液,在保证产品有效 性及安全性的前提下,制备同等批量的森林脑炎灭活疫苗能够减少金黄地鼠 使用约40%左右,提高了试验动物利用率,更加符合目前关于在实验动物福 利与伦理中提出的减少、替代及优化的3R原则。同时40层细胞工厂的培养 面积约为10L转瓶的12倍左右,制备同等数量的地鼠肾细胞,所使用的细胞 工厂数量明显少于10L转瓶,工艺的可控性。且制备的森林脑炎病毒中不需要添加任何防腐剂。

[0195] 尽管本发明的实施方案已公开,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中 所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的 人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所 限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

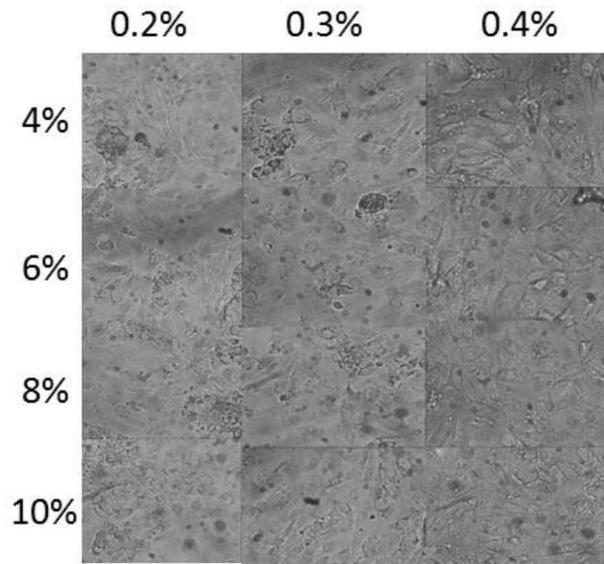


图1

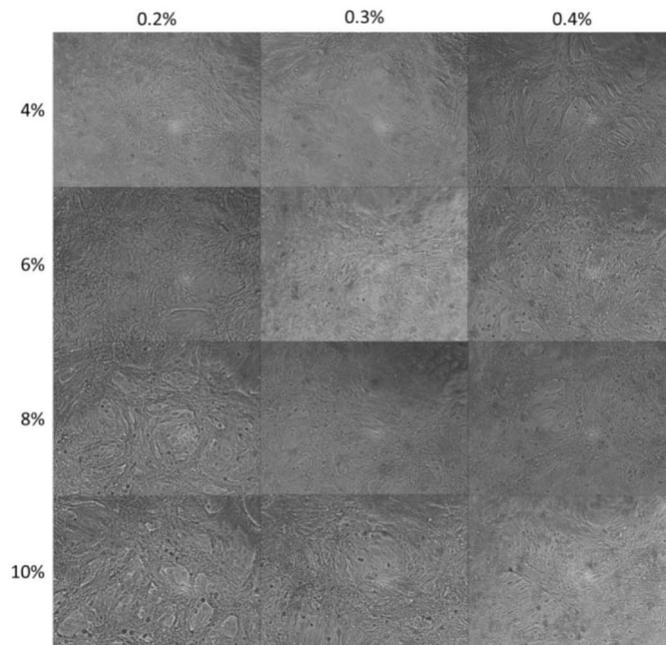


图2

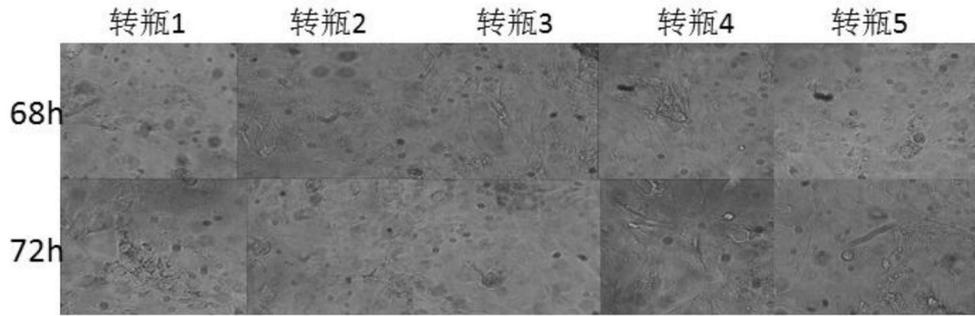


图3

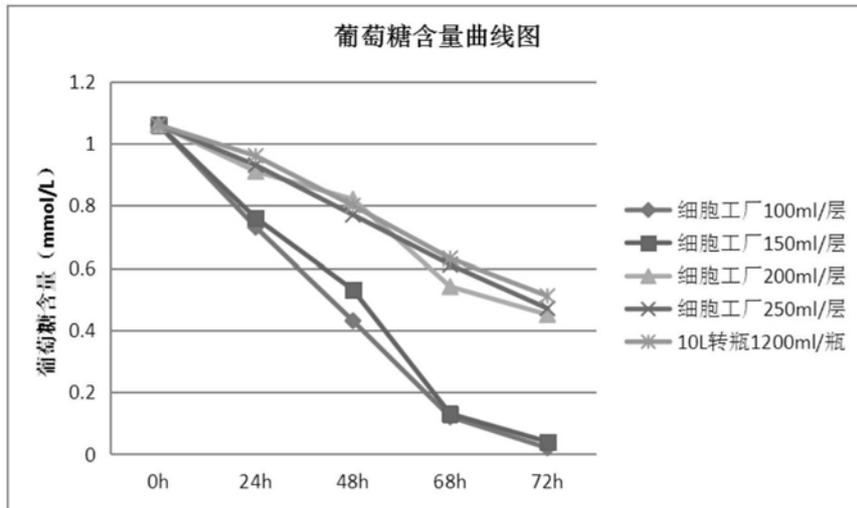


图4

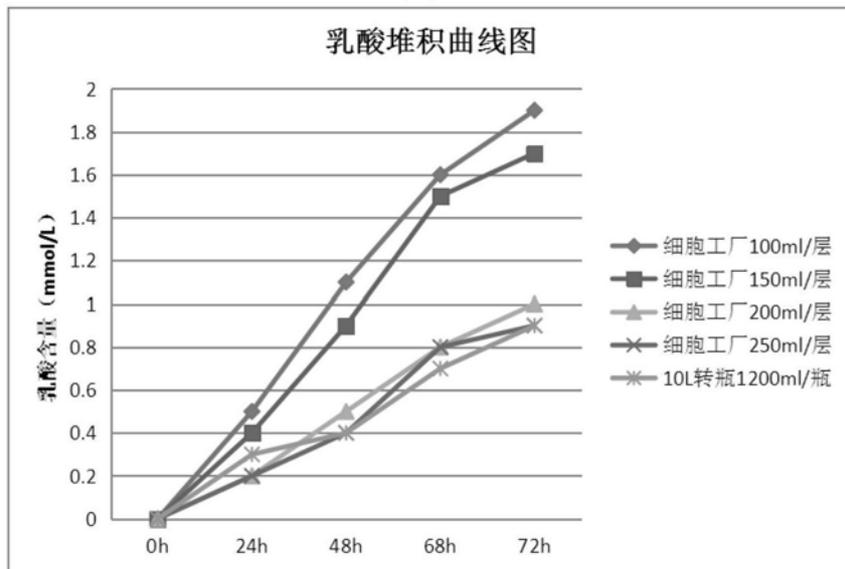


图5

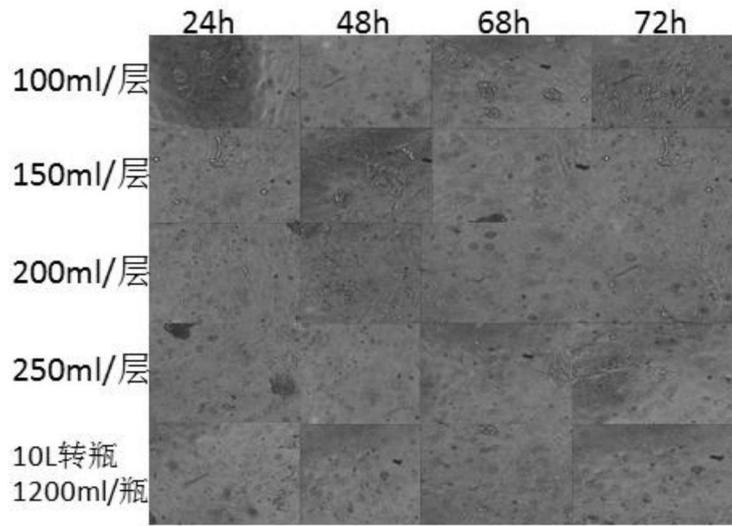


图6

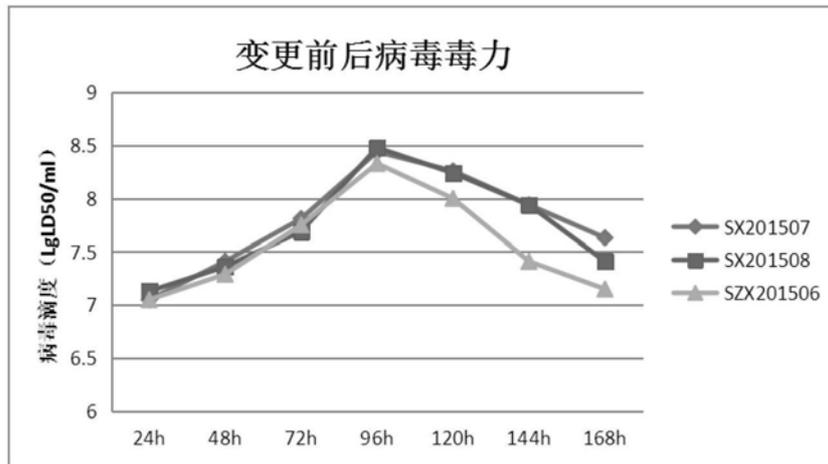


图7

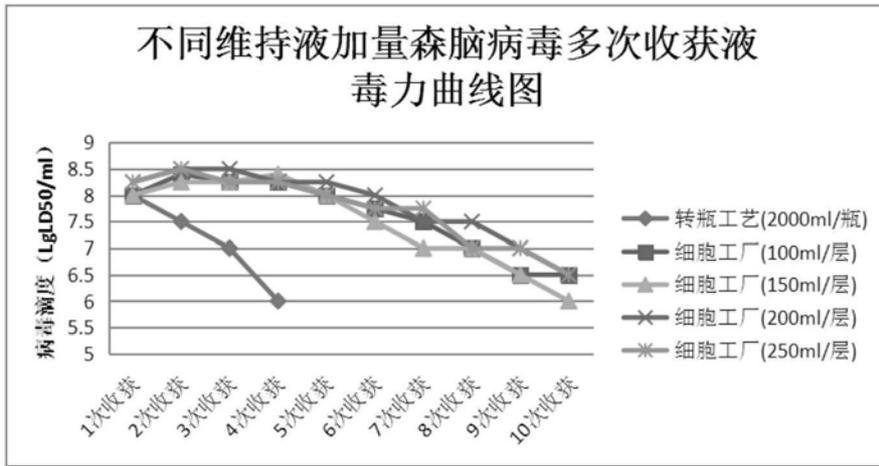


图8

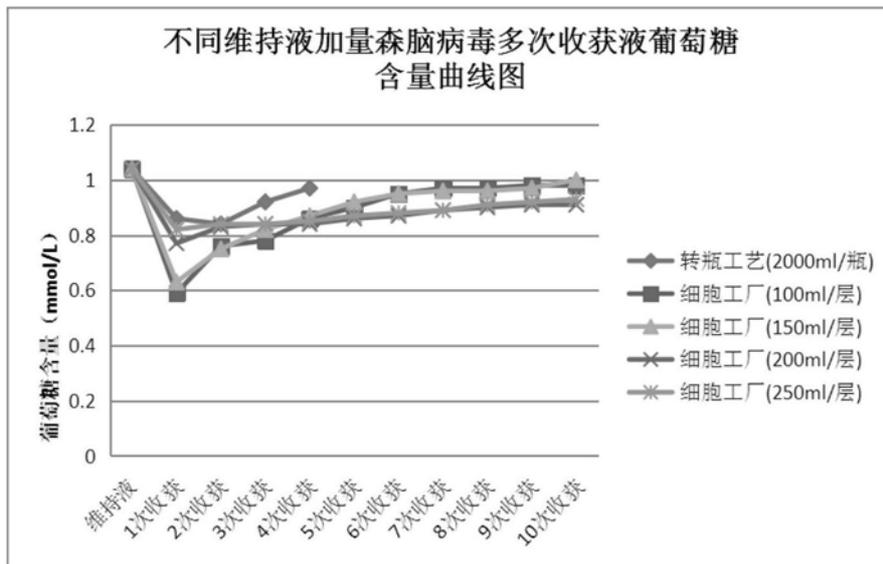


图9

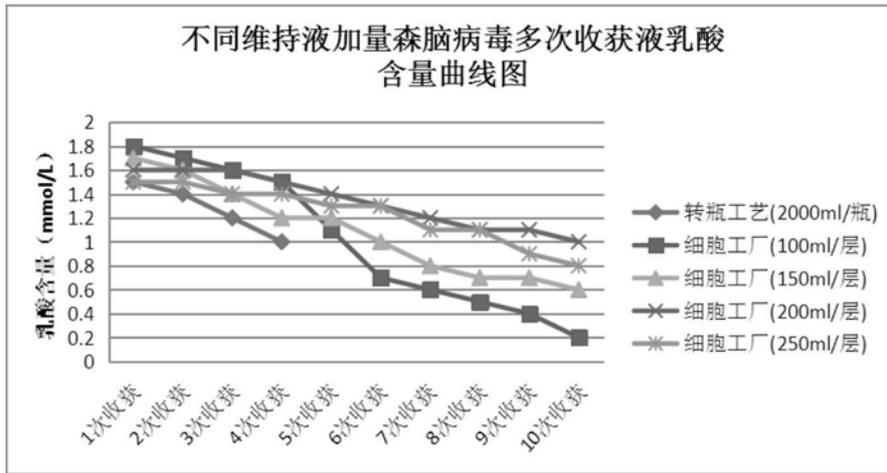


图10

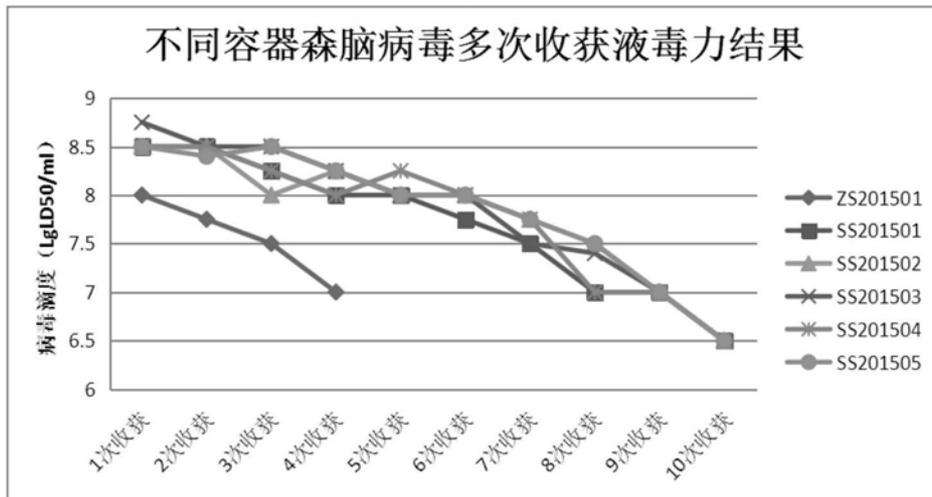


图11

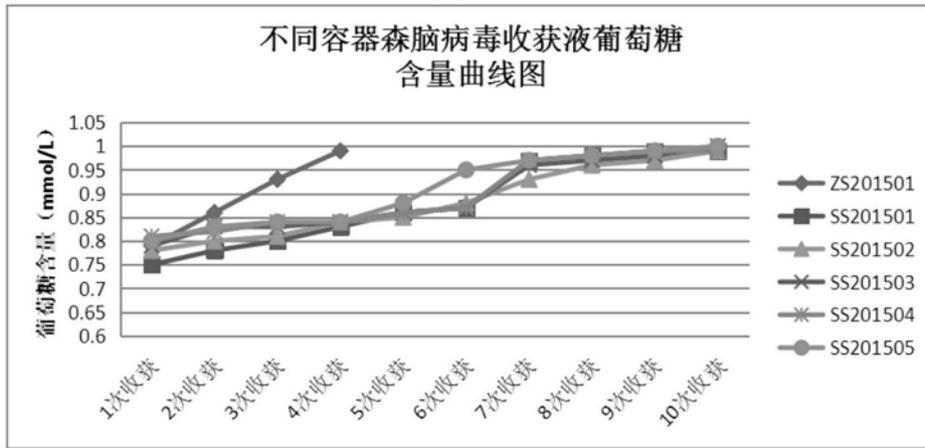


图12

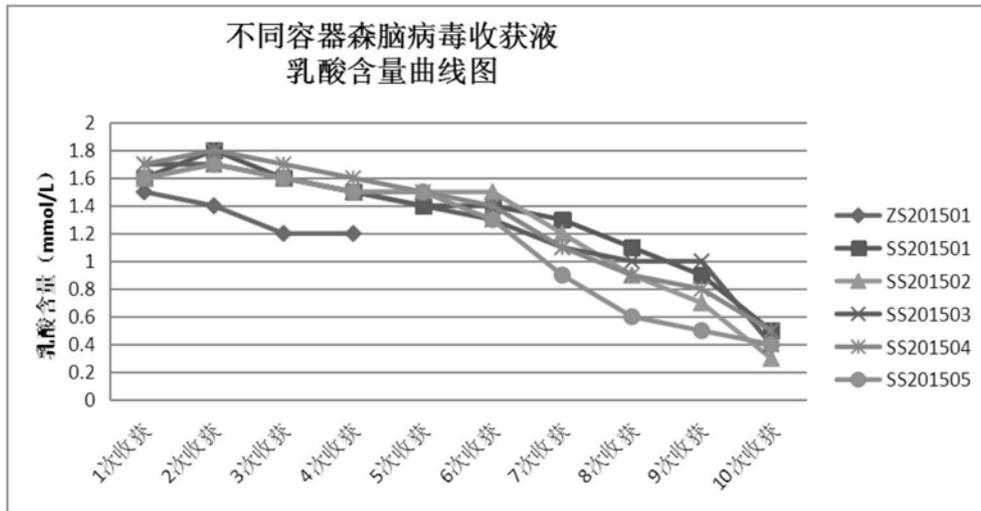


图13