

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/34

C12N 5/10 C07K 14/11

C07K 14/075 C12N 15/85

C12N 7/02 A61K 39/145



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818663.4

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433472A

[22] 申请日 2000.11.24 [21] 申请号 00818663.4

[30] 优先权

[32] 1999.11.26 [33] EP [31] 99203983.4

[86] 国际申请 PCT/NL00/00862 2000.11.24

[87] 国际公布 WO01/38362 英 2001.5.31

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.26

[71] 申请人 克鲁塞尔荷兰公司

地址 荷兰莱顿

[72] 发明人 玛丽亚·格拉齐亚·波

阿方萨斯·赫拉尔杜斯·科内利斯·

玛丽亚·乌依德阿格

霍弗特·约翰·斯豪滕

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 5 页 说明书 38 页 附图 26 页

[54] 发明名称 疫苗的生产

[57] 摘要

本发明提供了生产哺乳动物病毒的新手段和方法，包括用病毒感染无限增殖化的人类细胞培养物，在允许病毒生长的条件下温育用病毒感染的培养物以繁殖病毒，形成含有病毒的培养基，以及获取含有病毒的培养基。可以收获病毒并用于生产疫苗。本发明的优点是，本发明的人类细胞可以在规定无血清条件下培养，并且所述细胞显示改进的繁殖病毒的能力。具体地，提供了在培养的人类细胞中生产流感病毒的方法及其衍生的疫苗。这一方法无需使用全鸡胚生产流感疫苗。这一方法还可以连续或分批获取培养物培养基。因此，本发明使得可以大规模连续生产高滴度病毒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种生产用作疫苗的非腺病毒或腺病毒蛋白的病毒和/或病毒蛋白的方法，包括提供一种细胞，其具有至少一个编码至少一种腺病毒的 E1 基因的基因产物或其功能衍生物的序列，将编码所述病毒和/或所述病毒蛋白的核酸提供给所述细胞，将所述细胞在适当培养基中培养并使所述病毒和/或病毒蛋白表达，以及从所述培养基和/或所述细胞中收获所述病毒和/或病毒蛋白。

2.权利要求 1 的方法，其中所述细胞是人体原代细胞。

3.权利要求 1 或 2 的方法，其中所述原代细胞是通过所述 E1 基因的基因产物无限增殖化的。

4.权利要求 1-3 任一项的方法，其中所述细胞衍生自人胚胎成视网膜细胞。

5.权利要求 1-4 任一项的方法，其中所述编码 E1 基因的至少一种基因产物的序列存在于所述人体细胞的基因组中。

6.权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述细胞不产生腺病毒结构蛋白。

7.前述任一项权利要求的方法，其中所述细胞还包含一种编码 E2A 或其功能衍生物或类似物或片段的序列。

8.前述任一项权利要求的方法，其中所述编码 E2A 或其功能衍生物或类似物或片段的序列存在于所述人体细胞的基因组中。

9.权利要求 7 或 8 任一项的方法，其中所述 E2A 编码序列编码

一种温度敏感性突变体 E2A。

10. 前述任一项权利要求的方法，所述人体细胞不包含其它腺病毒序列。

11. 前述任一项权利要求的方法，其中所述人体细胞能悬浮培养。

12. 前述任一项权利要求的方法，其中所述人体细胞可以在没有血清的情况下培养。

13. 前述任一项权利要求的方法，其中所述人体细胞是保藏在 ECACC 中的保藏号为 96022940 的 PER.C6，或是其衍生物。

14. 权利要求 1-13 任一项的方法，其中所述病毒和/或病毒蛋白包含一种经过翻译后和/或翻译期间修饰的蛋白。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述修饰包括糖基化。

16. 前述任一项权利要求的方法，其中所述病毒蛋白包含至少一种流感病毒神经氨酸酶和/或血细胞凝集素。

17. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是肠病毒，如鼻病毒，口蹄疫病毒，或脊髓灰质炎病毒。

18. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是疱疹病毒，如单纯疱疹病毒，假狂犬病病毒或牛疱疹病毒。

19. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是正粘病毒，如流感病毒，副粘病毒，如新城疫病毒，呼吸道合胞病毒，腮腺炎病毒或麻疹病毒。

20. 权利要求 1-16 任一项的方法，所述病毒是逆转录病毒如

人免疫缺陷病毒，或其中所述病毒是细小病毒或乳多空病毒。

21. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是轮状病毒或冠形病毒，如传染性胃肠炎病毒或黄病毒，如蜱传脑炎病毒或黄热病病毒。

22. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是披膜病毒如风疹病毒或者东方、西方或委内瑞拉马脑脊髓炎病毒。

23. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是肝炎病毒，如甲肝病毒或乙肝病毒。

24. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是疫病毒，如猪霍乱病毒或弹状病毒，如狂犬病病毒。

25. 权利要求 1-16 任一项的方法，其中所述病毒是布尼病毒，如汉坦病毒。

26. 一种人体细胞的应用，所述人体细胞的基因组中具有编码腺病毒的至少一个 E1 蛋白或其功能衍生物，同源物或片段或至少一种用于疫苗中的病毒蛋白的序列，这种细胞不产生用于产生病毒的腺病毒结构蛋白。

27. 权利要求 26 的应用，其中所述人体细胞衍生自原代细胞。

28. 权利要求 26 或 27 的应用，其中所述人体细胞是 PER.C6 或其功能衍生物。

29. 权利要求 26-28 任一项的应用，其中所述细胞在其基因组中还包含一种编码 E2A 或其功能衍生物或类似物或片段的序列。

30. 权利要求 29 的应用，其中所述 E2A 是温度敏感性的。

31. 一种用于疫苗中的病毒或病毒蛋白，其可以通过权利要求 1-25 任一项的方法获得或由权利要求 26-30 任一项的应用获得，所述病毒或病毒蛋白没有任何非人哺乳动物蛋白质物质。

32. 一种人体细胞，其基因组中具有一种编码腺病毒的至少一种 E1 蛋白或其功能衍生物，同源物或片段的序列，这种细胞不产生腺病毒结构蛋白，并具有一种编码病毒或至少一种非腺病毒病毒蛋白的核酸。

33. 权利要求 32 的人体细胞，其衍生自在 ECACC 中保藏号为 96022940 的 PER.C6。

34. 权利要求 32-33 任一项的人体细胞，其基因组中还包含一种编码 E2A 或其功能衍生物或类似物或片段的序列。

35. 权利要求 34 的人体细胞，其中所述 E2A 是温度敏感性的。

36. 一种确定样品中蛋白酶活性的试剂盒，所述试剂盒包含至少一种病毒蛋白或病毒，这些病毒蛋白或病毒可以通过权利要求 1-25 任一项的方法获得或通过权利要求 26-30 任一项的应用获得。

37. 通过权利要求 1-25 任一项的方法或权利要求 26-30 任一项的应用获得的病毒蛋白或病毒在确定样品中的蛋白酶活性中的用途。

38. 权利要求 36 的试剂盒或权利要求 37 的应用，其中所述蛋白酶包括胰蛋白酶。

39. 权利要求 36 的试剂盒或权利要求 37 的应用，其中所述样品包含培养物培养基。

40. 一种在能至少部分保留病毒感染性的条件下浓缩流感病毒的方法，包括获得来自细胞培养物的包含所述病毒的细胞澄清上清，并在低剪切条件下超滤所述上清。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述低剪切条件是用中空纤维获得的。

42. 权利要求 40 或 41 的方法，其中所述细胞培养物包括体外培养的细胞。

43. 权利要求 40-42 任一项的方法，其中所述超滤是用截断值为 750KD 的滤膜进行的。

44. 权利要求 40-43 任一项的方法，其中所述浓缩还包括至少部分除去分子量小于 750KD 的蛋白质。

45. 用权利要求 40-44 任一项的方法浓缩的传染性流感病毒或其衍生物。

---

## 疫苗的生产

### 发明领域

本发明涉及疫苗的研制和生产。本发明特别涉及病毒蛋白和/或病毒的生产领域，尤其涉及使用哺乳动物细胞、优选人体细胞生产生长于真核细胞动物优选哺乳动物特别优选人体细胞中的病毒。本发明特别实用于疫苗的生产，以有助于脊椎动物，尤其哺乳动物特别是人对病毒病原体的抵抗力。

本发明揭示了优选使用一种已知成分合成培养基在人体细胞中产生病毒和/或病毒蛋白，以及从细胞或培养基中纯化病毒或其组分的手段和方法。本发明还提供了含有病毒或其组分的药物组合物，及生产和回收和/或纯化它们的方法。

### 发明背景

接种是对付病毒感染的一条最重要的途径。尽管已有许多抗病毒制剂，但这些制剂的效力有限。一旦个体被感染（被动免疫），施用抗病毒的抗体也许是一种对付病毒感染的良好方式，而且典型地人抗体或人源化抗体确实有希望对付一些病毒感染，但对付病毒感染的最安全有效的方式是并也许是通过主动免疫进行预防。主动免疫一般是指进行接种，而且疫苗包含典型地一种病毒的至少一个抗原性决定簇，优选包含至少一种病毒或其它病原体的多个不同的抗原性决定簇，例如通过将产生自病毒的至少一种（病毒）多肽或蛋白掺入疫苗中（亚单位疫苗）。典型地上述形式的疫苗包括佐剂以增强免疫应答。还可以是基于整个病毒（病原体）的疫苗，例如灭活形式的疫苗。另一种可能形式是使用活的但减毒形式的病原性病毒。另一种可能形式是使用野生型病毒，例如在成熟个体不受感染的威

胁，但通过母体抗体对婴幼儿也许有保护作用的情况下。疫苗的生产不总是一种简便的步骤。在一些情况中，病毒材料是在鸡蛋中生产的，这导致难以纯化材料和对污染物进行深入的安全性控制等。另外，有时但不经常是作为在鸡蛋中生产的替代的在细菌和或酵母上的生产也需要许多纯化和安全步骤。在哺乳动物细胞上生产是另一种替代方式，但所用的哺乳动物细胞均需要例如存在血清和/或粘着于固体支持物以生长。在第一种情况中，同样，纯化和安全性及例如蛋白酶的需要以支持一些病毒的复制成为一个问题。在第二种情况中，高产量和便利性成为另一个问题。本发明克服了现有技术中至少一些与用于疫苗的病毒和/或病毒蛋白的生产系统相关的问题。

### 发明详述

本发明揭示了一种新的用以增殖和收获病毒的人体无限增殖化细胞系，以生产所述病毒。PER.C6 细胞（WO 97/00326）是通过使用含有在人磷酸甘油激酶（PGK）启动子控制下的 Ad 血清型 5（Ad5）E1A-和 E1B 编码序列（Ad5 核苷酸 459—3510）的质粒转染原代人胚胎视网膜细胞产生的。

以下特点使 PER.C6 或其衍生物特别适用作产生病毒的宿主：其是一种充分定性的人体细胞系，其是顺应 GLP 开发的，其可以在已知成分无血清培养基中作为悬浮培养物生长，没有任何人或动物血清蛋白；其生长与滚瓶，摇瓶，旋转瓶和生物反应器相适应，倍增时间为大约 35 小时。

### 流感流行病学

流感病毒，正粘病毒科的成员，是急性呼吸道疾病年度流行的致病因素。仅在美国每年就有 5 千万美国人染上流感。估计全世界的死亡人数（1972—1992）为 60000（CDC 统计）。有 3 次全世界



流行性流感爆发，1918年（西班牙流感，估计4千万人死亡），1957年（亚洲流感，估计1千万人死亡），和1968年（香港流感，估计70000人死亡）。流感病毒感染与许多疾病和并发症相关，导致实质上世界范围发病率和死亡率，尤其在患有慢性疾病的老人和病人中。抗流感接种在预防与这种感染相关的通常致命的并发症中是最有效的（Murphy, B.R.和 R.G.Webster, 1996）。已经报道了在二倍体人体细胞系 MRC-5 上生产流感病毒（Herrero-Euribe L 等, 1983）。然而，流感病毒的效价非常低。

### 流感病毒毒株

目前流感疫苗含有流感病毒 A 和 B 的纯化的血凝素和神经氨酸酶。代表流行病学重要的毒株的 3 种病毒是流感病毒 A (H1N1)，流感病毒 A (H3N2) 和流感病毒 B。将流感病毒分为 A 和 B 型是基于其核蛋白 (NP) 和基质 (M) 蛋白抗原之间的抗原性差异。流感病毒 A 还可基于血凝素 (H1-H15) 和神经氨酸酶 (N1-N9) 分子的抗原性组分 (序列) 进一步分为亚型。这些亚型的每一种代表物均已经从水栖鸟类中分离，其可能是鸟类和哺乳动物物种的所有流感病毒的原始储存宿主。已经示出在猪和人之间的传染性，近来示出了在鸟和人之间的传染性 (H5N1)。

### 流感疫苗

目前在世界通用的 3 种灭活的流感疫苗是：全病毒，片段疫苗和表面抗原或亚单位疫苗。这些疫苗均含有预期在随即的季节中将在人群中传播的流感病毒毒株的表面糖蛋白，血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)。将这些掺入疫苗中的毒株在含胚卵中生长，并随后在进一步加工之前纯化病毒颗粒。需要逐年调整流感疫苗是因为由已知称为“抗原性漂移”和“抗原性转变”所致的抗原发生变化。

“抗原性漂移”是由于在病毒的 H 或 N 蛋白中积累一系列点突变而发生的，导致氨基酸取代。这些取代防止由各种感染产生的

中和抗体的结合，而且新变体可以感染宿主。

“抗原性转变”是通过在动物和人流感病毒 A 之间进行遗传重配而出现一种新的亚型。1957 年（H2N2）和 1968 年（H3N2）的全世界流行性毒株例如是重配的病毒，通过其鸟类 H 或 N 基因导入循环的人体病毒中，随后可以在人群中传播。

基于对一百个以上的国际流感病毒中心的流行病学监测，世界卫生组织（WHO）每年常在 2 月对北半球，在 9 月对南半球推荐一些流感疫苗组合物。这种惯例限定了疫苗产生和标准化的时间窗，最大为 9 个月。在急需大剂量疫苗的情况中，例如当流感病毒 A 的一种新亚型通过抗原性转变和抗原性漂移产生时，鸡蛋的有限资源可能妨碍疫苗的快速生产。这种生产系统的另一个缺点是适应性差，有存在毒素的风险和存在外来病毒尤其逆转录病毒的风险，并关系到不育性。目前在含胚卵上生产流感疫苗的实践存在严重问题。

因此，使用生产流感疫苗的一种细胞培养系统是具有吸引力的另一种选择。可以将流感病毒在许多原代细胞，包括猴肾，小牛肾，仓鼠肾和小鸡肾细胞上培养。但还未将它们实际用于生产疫苗，因为为制备疫苗，需要从这些原代细胞中重建培养物。因此，使用生产流感疫苗的持续性无限增殖化细胞系是另一种有吸引力的选择。

认识到 HA 蛋白酶解成其两个亚单位（HA1 和 HA2）是流感病毒感染性所需的，并可以通过加入胰蛋白酶而获得这一点有助于应用培养系统。包涵胰蛋白酶允许在 Madin-Darby 犬肾（MDCK）细胞中复制并形成噬斑（Tobita 等，1975）。

近来示出 MDCK 细胞系支持用以生产疫苗的流感病毒生长，（Brand 等，1996 和 1997，Palache 等，1997）。使用胰蛋白酶需要 MDCK 细胞在无血清的组织培养基（MDCK-SF1）中生长。然而，MDCK 细胞目前未经认可用作生产流感病毒的底物。

重要地是，任何生产流感疫苗的非人系统具有已知为“适应性”

的固有的缺点。由于在含胚卵中的适应性，人流感病毒 A 和 B 均携带 HA 中的突变。这些突变导致抗原性改变 (Newman 等, 1993, Williams 和 Robertson 1993, Robertson 等, 1994, Gubareva 等, 1994, Schild 等, 1993, Robertson 等, 1987, Kodihalli 等, 1995)。在人体中, 用含有并携带适应含胚卵引起突变的 HA 的疫苗进行免疫, 产生较少的对含有非含胚卵适应的 HA 的病毒的中和抗体 (Newman 等, 1993)。

在犬细胞如 MDCK 细胞中增殖的人流感病毒, 虽然程度较低, 但也示出适应性。这种病毒相对于含胚卵产生的病毒更类似原始的人中的病毒分离物 (Robertson 等, 1990)。

另外, 有这样的迹象即 NA 中的宿主特异性变化和 NA 的宿主特异性磷酸化模式可以影响流感病毒的复制 (Schulman 和 Palese 1977; Sugiara 和 Ueda 1980; Kistner 等 1976)。

因此, 避免流感病毒的适应性或其它宿主导致的变化无疑是有益的。这可以产生更同源的病毒群, 并最终使疫苗更有效。

因此, 本发明的一个目的是提供人体细胞, 这种人体细胞作为生产高效价流感病毒的底物, 适于研制疫苗。

### 轮状病毒和轮状病毒疫苗

轮状病毒是导致世界范围幼儿严重脱水性胃肠炎的最重要因素。在发展中国家, 轮状病毒感染每年导致 800000 以上病人死亡。在美国, 每年估计花费在治疗轮状病毒感染上的费用就超过 10 亿美元。

轮状病毒, 是呼吸道肠道病毒科的成员, 是由 11 个 RNA 节段组成的双链 RNA 病毒, 每个节段均编码结构或非结构病毒蛋白 (VP)。这种病毒的内核心包含 4 种 VP: VP1, 2, 3 和 6。VP 决定 HRV-组, 亚组和血清型的 3 种主要抗原性性质。已经鉴别了由 VP6

编码的 7 种抗原性不同的组 (A-G)。人轮状病毒 (HRV) 感染主要是由 A 组轮状病毒导致的, 所述 A 组轮状病毒具有与 95% 的临床疾病相关的血清型 1-4。天然的疾病防护是血清型特异性的。A 组还进一步分为亚组 I 和 II。

形成病毒衣壳的双层外壳由两种病毒蛋白组成, VP4 和 VP7, 它们是参与保护性免疫的中和抗原, 并决定血清型, 尽管 VP4 在血清型决定中只起微弱作用。在用不同的血清型共同感染期间, 分节段的基因组易于进行遗传重配, 这种性质已经用于生产疫苗 (Marsha 等, 1999)。

根据提供的世界范围流行轮状病毒相关的婴幼儿发病率和死亡率, 大规模接种抗轮状病毒疫苗是抵抗这种病毒的最有效的方式。接种的目的不是预防疾病而是降低其严重程度和并发症, 尤其在出生前几年期间。

目前可以获得的唯一有效的疫苗是基于人轮状病毒的 RNA 节段的重配的口服活减毒疫苗, 所述 RNA 节段编码恒河猴血清型 1, 2 和 4 的 VP7, 与血清型 3 的 VP7 一起提供减毒背景。用这种人恒河猴重配四价疫苗 (RRV-TV) 进行接种, 尽管可以高效预防严重的胃肠炎, 但其与肠套迭这种肠道梗阻疾病相关。为此这种疫苗不再使用。

## 发明描述

本发明提供了一种生产用作疫苗的非腺病毒或腺病毒蛋白的病毒和/或病毒蛋白的方法, 包括提供一种细胞, 其具有至少一个编码至少一种腺病毒的 E1 基因的基因产物或其功能衍生物的序列, 将编码所述病毒或所述病毒蛋白的核酸提供给所述细胞, 将所述细胞在适当培养基中培养并使所述病毒繁殖或所述病毒蛋白表达, 以及从所述培养基和/或所述细胞中收获所述病毒和/或病毒蛋白。

直至本发明作出时，极少发现（人体）细胞适于以任何可再生和可大规模方式和/或足够高的产量和/或易于纯化的方式生产用作疫苗的病毒和/或病毒蛋白。我们现已发现优选在其基因组中包含腺病毒 E1 序列的细胞能以显著数量持续增殖病毒。

本发明优选的细胞是从人体原代细胞中产生的，优选从通过所述 E1 基因的基因产物无限增殖化的细胞中产生。为了能生长，原代细胞当然需要无限增殖化。这种细胞例如是衍生自人胚胎成视网膜细胞的细胞。

在本发明的细胞中，重要的是 E1 基因序列在细胞周期中不丢失。因此优选编码 E1 基因的至少一个基因产物的所述序列存在于所述（人体）细胞的基因组中。考虑到安全性，最好在本发明的细胞中消除非所需腺病毒序列。这样本发明的另一实施方案提供了不产生腺病毒结构蛋白的细胞。然而，为通过细胞培养达到大规模（持续）生产病毒，优选使细胞不需要锚着而生长。本发明的细胞具有这种能力。为得到一种从中易于回收，及如果需要易于纯化病毒的清洁和安全的生产系统，优选本发明的方法，从而所述人体细胞不包含其它腺病毒序列。本发明的方法和使用中最优选的细胞是 PER.C6，在 ECACC 中的保藏号为 96022940，或其衍生物。

因此本发明提供了一种使用本发明细胞的方法，其中所述细胞还包含一个编码 E2A 或其功能衍生物或其类似物或片段的序列，优选其基因组中存在编码 E2A 或其功能衍生物或其类似物或片段的所述序列的人体细胞，并最优选其中所述 E2A 编码序列编码温度敏感性突变体 E2A 的细胞。

另外，本发明还提供了一种方法，其中所述（人体）细胞能悬浮生长。

本发明还提供了一种方法，其中所述人体细胞可以在没有血清的情况下培养。本发明的细胞，尤其 PER.C6 细胞具有的另一优势

是其能在没有血清或血清成分的情况下培养。因此分离是简便的，安全性增强，而且系统的可靠性良好（合成培养基的重复性最好）。本发明的人体细胞，尤其基于原代细胞的细胞，特别是基于 HER 细胞的那些细胞，能正常地在翻译后和翻译期间修饰和装配。这意味着它们非常适于制备病毒蛋白和病毒以用于疫苗中。

因此本发明提供了一种方法，其中所述病毒和/或所述的病毒蛋白包含一种蛋白质，其经历了翻译后和/或翻译期间修饰，尤其其中所述修饰包含糖基化。以任何可靠方式生产均较麻烦的病毒疫苗的一个良好实例是流感疫苗。本发明提供了一种方法，其中所述病毒蛋白包含至少一种流感病毒神经氨酸酶和/或血凝素。可以以本发明的方法生产的其它病毒蛋白（亚单位）和病毒（待灭活的野生型）或减毒的病毒，包括肠道病毒如鼻病毒，口蹄疫病毒，或脊髓灰质炎病毒，疱疹病毒如单纯疱疹病毒，假狂犬病病毒或牛疱疹病毒，正粘病毒如流感病毒，副粘病毒如新城疫病毒，呼吸道合胞病毒，腮腺炎病毒或麻疹病毒，逆转录病毒如人免疫缺陷病毒或细小病毒或乳多空病毒，轮状病毒或冠形病毒如感染性胃肠炎病毒或黄病毒如蜱传脑炎病毒，或黄热病毒，披膜病毒如风疹病毒或东方，西方，或委内瑞拉马脑脊髓炎病毒，肝炎病毒如甲型肝炎病毒或乙型肝炎病毒，痘病毒如猪痘病毒或弹状病毒，如狂犬病毒，布尼病毒，如汉坦病毒。

在一个实施方案中，本发明的细胞用于生产一种在含胚卵上不能有效生长的流感病毒毒株。

本发明还提供了一种人体细胞的应用，所述人体细胞的基因组中具有编码腺病毒的至少一个 E1 蛋白或其功能衍生物，同源物或片段或至少一种用于疫苗中的病毒蛋白的序列，这种细胞不产生用于产生病毒的腺病毒结构蛋白。当然为了这种用途，本发明的方法中优选的细胞也是优选的。本发明还提供了根据本发明的方法和用途

获得的产物，特别是通过这些用途和/或方法可以获得的病毒蛋白和病毒，尤其当组成一种药物组合物时，所述药物组合物包含适当的赋形剂和在一些形式（灭活的病毒，亚单位）中包含的佐剂。给予剂量和方式可以通过常规临床实验选择，如果它们不能通过已经注册的疫苗获知。

因此本发明还提供了一种用于疫苗中的病毒或病毒蛋白，其可以通过本发明的方法和用途获得，所述病毒或所述病毒蛋白没有任何非人哺乳动物蛋白质物质，本发明还提供了一种包含这种病毒和/或病毒蛋白的药物配方。

本发明还提供了一种人体细胞，所述人体细胞在其基因组中具有编码腺病毒的至少一种 E1 蛋白或其功能衍生物，同源物或片段的序列，该细胞不产生腺病毒结构蛋白，并具有编码一种病毒或至少一种非腺病毒蛋白的核酸。这种细胞可用于本发明的方法中。

在本发明的一个优选的实施方案中，本发明提供了流感病毒，其可以通过本发明的方法或通过本发明的用途获得。在另一个实施方案中，本发明提供了流感疫苗，其可以通过本发明的方法或通过本发明的用途获得。

本发明的另一方面提供了一个试剂盒，用于确定样品中蛋白酶的活性，所述试剂盒包含至少一种通过本发明的方法和用途可以获得的病毒蛋白或病毒，所述病毒或病毒蛋白没有任何非人哺乳动物蛋白质物质。本发明的这个方面特别用于确定培养基中的蛋白酶活性。已知难以确定培养基的蛋白酶活性。然而，使用本发明的病毒蛋白或病毒作为蛋白酶的靶，就可能精确确定培养基中所述蛋白酶的活性。在一个优选的实施方案中，样品中所述蛋白酶活性包含在培养基中活性。在一个优选的实施方案中，所述蛋白酶包含胰蛋白酶。在一个优选的实施方案中，所述病毒蛋白包括 HA0。

本发明的另一方面提供了在能至少部分保留病毒感染性的条件

下浓缩流感病毒的一种方法，包括从细胞培养物中获得一种包含所述病毒的澄清的细胞上清，并将此上清在低剪切条件下超滤。从含胚卵中收获的流感病毒制品典型地需要纯化，以制备疫苗。纯化典型地必需至少一步病毒的浓缩步骤。目前从流感病毒的这种相对粗制品中浓缩流感病毒的方法是繁杂的。使用本发明的浓缩方法，可以在保留至少部分病毒感染性的条件下浓缩流感病毒。有效的，浓缩的病毒是感染性的或可以产生感染性。可以产生感染性至少意味着通过 HA0 的裂解产生感染性病毒。在一个优选的实施方案中，所述浓缩是用中空纤维进行的。中空纤维特别适于在低剪切条件下进行浓缩。在一个优选的实施方案中，所述细胞培养物包括体外培养的细胞。特别适于使用本发明的方法的离心滤液是来自体外培养的细胞的上清，特别是当所述上清包含无血清培养基时。在一个优选的实施方案中，所述超滤是用只使蛋白通过而保留病毒的滤膜进行的。优选地，所述滤膜包含一个 500KD 截断值。更优选地所述滤膜包含一个 750KD 的截断值。在一个特别优选的实施方案中，所述浓缩还包含至少部分除去分子量小于 500KD，优选小于 750KD 的蛋白质。优选地，所述纯化是使用所述滤膜完成的。

本发明的又一方面提供了用本发明的方法浓缩的感染性流感病毒或其衍生物。本发明的一种感染性流感病毒的衍生物是可以用于免疫的一种病毒，病毒颗粒，或病毒蛋白或其部分。典型地这必需一个病毒失效性灭活步骤。

## 实施例

为举例说明本发明，提供了以下实施例，但没有限制本发明范围之意。

### 实施例 1:



## 材料和方法

### PER.C6 和 MDCK 细胞培养物

将 Madin Darby 犬肾 (MDCK) 细胞, 在 37° C 和 10% CO<sub>2</sub> 条件下, 在 Dulbecco' s 修饰的 Eagle' s 培养基 (DMEM, Life Technologies Breda, 荷兰) 中培养, 所述培养基含有 10% 热灭活的胎牛血清和 1× L-Glutamin (Gibco-BRL)。将 PER.C6 的悬浮培养物在 37° C 和 10% CO<sub>2</sub> 条件下, 在补加 1× L-Glutamin 的 ExCell 525 (JRH Biosciences) 中, 在 6 孔培养皿 (Greiner) 静置培养, 或在 490cm<sup>2</sup> 组织培养滚瓶 (Corning Costar 公司) 中持续以 1 rpm 滚动培养。

### 免疫荧光测试

使用 IMAGEN™ 流感病毒 A 和 B 试剂盒 (Dako), 根据供应商的标准方案检测流感病毒感染。将样品使用表面荧光照明进行显微观测。感染的细胞具有明亮的苹果绿色荧光。

### 碘化丙锭染色

将细胞沉淀重悬浮于 300μl 冷 PBS/0.5% BSA + 5ul 于本领域技术人员已知的 PBS/FCS/叠氮化物溶液中的碘化丙锭 (浓度 50ug/ml) 中。然后通过流式细胞荧光测定方法检测存活和死亡的细胞。

### 血细胞凝集分析

通常地, 对流感病毒效价进行的血细胞凝集分析是根据本领域技术人员已知的方法进行的。在此, 将 50ul 在 PBS 中双倍稀释的病毒溶液加入 25ul PBS 和 25ul 在 PBS 中的 1% 火鸡红细胞悬浮液中 (Biotrading Benelux B.V.), 并在 96 孔微滴定平板中在 4° C 温育 1 小时。检测并记录血细胞凝集模式, 并以血细胞凝集单位 (HAU' s)

表示。HAU's 的数目相当于最高病毒稀释度的倒数值，示出完全的血细胞凝集。

### 流感 HA 蛋白的 Western 印迹分析

通常地，根据本领域技术人员已知的方法，将获得的流感病毒在 Laemmli 缓冲液中破坏，并将不同体积的所得蛋白质混合物用 10%SDS/PAGE 凝胶分离。简而言之，将印迹在室温用封闭溶液(TBST 中 5%脱脂奶粉 (Biorad)，补加 1%兔血清 (Rockland)) 封闭 30 分钟，随后用 TBST 洗 3 次。然后，将印迹用在 1%BSA/TBST 中用 5%兔血清 (Rockland) 稀释 1/500 的抗 A/Sydney/5/97 HA 抗血清 (98/768 NIBSC)，在室温温育过夜。再将印迹用 TBST 洗 8 次。最后，将印迹用在封闭溶液中稀释 1/6000 的兔抗绵羊抗血清 (HRP 标记的，Rockland)，在室温温育 1 小时。在用 TBST 洗 8 次后，将蛋白质缀合的复合物用 ECL (Amersham Pharmacia Biotbch) 观测，并曝光于胶片 (Hyperfilm, Amersham Life Science)。抗血清得自 NIBSC(UK)，并以 NIBSC 推荐的稀释液使用。

### 单向放射免疫扩散 (SRID) 分析

将得自流感病毒感染的 PER.C6 细胞的上清中血凝素的浓度，通过前述单向放射免疫扩散 (SRID) 分析测定 (Wood 等，1997)。使用标准的 NIBSC (UK) 抗原和抗血清试剂进行这项分析。

### 噬斑测定

将全部 1ml 的 10 倍系列稀释的病毒上清接种于在 6 孔平板中生长达到 95%铺满的 MDCK 细胞上。在 35° C 1 小时后，将细胞用 PBS 洗两次，并用 3ml 琼脂糖混合物 (1.2ml 2.5%琼脂糖，1.5ml 2 × MEM，30ul 200mM L-Glutamine，24ul 胰蛋白酶-EDTA，250ul

PBS) 覆盖。然后将细胞在 35° C 在潮湿的 10%CO<sub>2</sub> 大气环境中温育将近 3 天, 并对病毒噬斑进行观测记录。

### 病毒感染性分析 (TCID<sub>50</sub>)

感染性病毒的滴定是在 MDCK 细胞上进行的。简而言之, 将细胞以  $4 \times 10^4$  个细胞/孔的密度, 种植于 96 孔平板的补加 2mM L-Glutamin 的 DMEM 中。24 小时后, 将细胞在含有 4ug/ml 浓度的胰蛋白酶-EDTA 的培养基中, 用 100ul 的 10 倍系列稀释的培养上清感染, 一式四份。在感染 2 小时后, 将细胞单层在 PBS 中洗两次, 并在含有胰蛋白酶的培养基中在 35° C 温育 7 天。然后在 HA 分析中测试取自这些培养物中的上清。根据 Karber(1931)的方法计算 TCID<sub>50</sub> 效价。

### β-丙酸内酯流感病毒灭活

为灭活病毒以获得用于从 PER.C6 细胞中生产疫苗的全灭活的病毒, 使用β-丙酸内酯进行本领域技术人员已知的突变。β-丙酸内酯是一种非常有效的广泛用于灭活病毒的制剂, 其突变作用是本领域熟知的。其修饰病毒基因组和宿主细胞基因组的核酸碱基, 并阻断之后的复制。根据用于制备全灭活的在含胚卵上制备的流感疫苗的方案, 将相当于接近 400ug 的 HA/毒株数量的病毒灭活, 并用于最后的疫苗配方。简而言之, 将 1 体积的 0.3M 的磷酸钠缓冲液加入 9 体积的流感病毒制品中。将 1 体积的 10%β-丙酸内酯 (Newall Design, UK) 加入 100 体积的磷酸盐缓冲的病毒制品中, 并在 20° C 温育 24 小时, 从而进行灭活病毒。病毒的灭活通过噬斑分析测定, 在任何灭活的批次中检测不到噬斑 (数据未示出)。

实施例 2A: PER.C6 细胞建库和预培养

使用 PER.C6 细胞系（保藏在应用微生物学研究中心的欧洲动物细胞保藏中心，保藏号 No.96022940），或其衍生物（见 WO 97/00326 所述）。将细胞系通过两层细胞库系统建库。将选择的细胞系在研究用主细胞库（rMCB）中库存，贮存在不同的位置。从这个 rMCK 中如下制备工作细胞库（rWCB）：将 1 安瓿 rMCB 解冻，并将细胞增殖直至存在足够的细胞，通过使用干冰冷冻细胞。将含有 1ml（ $1-2 \times 10^6$  个细胞/ml）rMCB 的 500 安瓿贮存于液氮冷冻仪气相中。将 1 安瓿含有  $5 \times 10^6$  PER.C6 细胞的 WCB 在  $37^\circ$  水浴中解冻。将细胞迅速移至 50ml 试管中，并通过加入补加  $1 \times L$ -Glutamin 的 9ml 悬浮培养基 ExCell525（JRH Biosciences）而重悬浮。在台式离心机中以 1000rpm 离心 3 分钟后，将细胞以  $3 \times 10^5$  个细胞/ml 终浓度重悬浮，并在  $37^\circ$  C，在 10%CO<sub>2</sub> 情况下，在 T80 组织培养瓶中培养。在 2—3 天后，将细胞以  $3 \times 10^5$ /ml 的密度种植于  $490\text{cm}^2$  组织培养滚瓶中（Corning Coster 公司），并在 1rpm 持续滚动下培养。

实施例 2B：作为流感病毒 A 的允许细胞系的 PER.C6 细胞

由于未知人体 PER.C6 细胞维持流感病毒感染和复制的能力，因此要核实与 Madin Darby 犬肾（MDCK）细胞系相比，PER.C6 细胞是否是流感病毒感染允许的，MDCK 细胞系作为阳性对照。

在感染前 1 天，将  $2 \times 10^5$  MDCK 细胞/孔种植于 6 孔平板中。24 小时后，将每孔  $4 \times 10^5$  个种植的 PER.C6 细胞和 MDCK 细胞用 H1N1 毒株 A/Puerto Rico/8/34（效价  $3.6 \times 10^7$  pfu/ml）（得自 Dr.E.Class，Leiden 大学医学中心，荷兰）感染。在 0.1—10pfu/细胞范围内的各种感染复数（moi' s）下进行感染。在  $37^\circ$  C 温育大约 2 小时后，除去接种物，并用新鲜培养基置换。在感染 24 和 48 小时后，进行检测流感病毒感染的直接免疫荧光测定。实验示出 PER.C6 是流感病毒感染允许的，阳性细胞百分率是依赖于 moi 的并与 MDCK 相当

(图 1)。

### 实施例 3: 用于增殖流感病毒 A 的 PER.C6

核实流感病毒的复制和增殖是否可以由 PER.C6 支持。在感染当天, 将 PER.C6 细胞以  $2 \times 10^5$  个细胞/ml 的密度, 终体积为 40ml 种植于  $490\text{cm}^2$  的组织培养滚瓶中, 所述组织培养滚瓶中存在 5ug/ml 胰蛋白酶-EDTA (Gibco-BRL)。将细胞模拟接种或用 H3N2 毒株 A/Shenzhen/227/95 (效价  $1.5 \times 10^6$  pfu/ml) (得自 Dr.E.Class, Leiden 大学医学中心, 荷兰) 感染。moi 为  $10^{-4}$  和  $10^{-3}$  pfu/细胞。在  $37^\circ\text{C}$  温育 1 小时后, 将细胞以 1500rpm 离心除去接种物并将细胞重悬浮于补加 5ug/ml 胰蛋白酶-EDTA 的新鲜培养基中。从感染后第 1 天至第 6 天, 每天收集 1.3ml 的细胞悬浮液。将上清在  $-80^\circ\text{C}$  贮存并用于血细胞凝集分析。将细胞沉淀用于直接免疫荧光测定和碘化丙锭染色。

### 实施例 4: PER.C6 对不同流感病毒毒株的允许性

为进一步研究 PER.C6 对各种流感病毒毒株增殖的允许性, 用得自国际生物学标准和对照学会 (NIBSC, UK) 的 H1N1 疫苗株 A/Beijing/262/95 及其重排列的 X-127 进行感染。在感染当天, 将 PER.C6 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度, 终体积为 50ml 种植于  $490\text{cm}^2$  的组织培养滚瓶中。在存在 5ug/ml 胰蛋白酶-EDTA 情况下用 5 微升 ( $10^{-4}$  稀释度) 和 50 微升 ( $10^{-3}$  稀释度) 病毒接种细胞。为证明是否确实需要胰蛋白酶, 通过在不存在该蛋白酶情况下接种 5 微升疫苗株 A/Beijing/262/95 而进行再次感染。在  $37^\circ\text{C}$  保温 1 小时后, 将细胞以 1500rpm 离心除去接种物并将细胞重悬浮于新鲜培养基  $\pm 5\text{ug/ml}$  胰蛋白酶-EDTA 中。在感染后第 2 天和第 4 天将更多的胰蛋白酶加入样品中。从感染后第 1 天至第 6 天, 每天收集 1.3ml 的

细胞悬浮液。将上清在 $-80^{\circ}\text{C}$ 贮存并用于血细胞凝集分析和进一步的感染；将细胞沉淀用于直接免疫荧光测定。上述免疫荧光测定和血细胞凝集分析的结果分别示于图 4 和图 5，证明了病毒的有效复制和释放。

#### 实施例 5：在 PER.C6 细胞上增殖的病毒的感染性

核实在 PER.C6 中生长的病毒是否是感染性的，及对此细胞系的适应性是否可以提高病毒产量。所用的病毒上清得自毒株 A/Beijing/262/95 及其重排列的 X-127（稀释度  $10^{-3}$ ）感染的 PER.C6，并是在感染后第 6 天收获的。在感染的当天，将 PER.C6 以大约  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度，终体积 50ml 种植于  $490\text{cm}^2$  的组织培养滚瓶中。将细胞用 100ul 和 1ml 的病毒上清，在存在 5ug/ml 胰蛋白酶—EDTA 的情况下接种。为确定胰蛋白酶是否是确实需要的，用 100ul 的毒株 A/Beijing/262/95，在没有蛋白酶的情况下接种而再次感染。在  $37^{\circ}\text{C}$  温育大约 1 小时后，将细胞以 1500rpm 离心除去接种物并将细胞重悬浮于  $\pm 5\text{ug/ml}$  胰蛋白酶—EDTA 的新鲜培养基中。在感染后第 2 天和第 4 天，将更多的胰蛋白酶加入样品中。从感染后第 1 天至第 6 天，每天收集 1.3ml 的细胞悬浮液。将上清在 $-80^{\circ}\text{C}$ 贮存并用于血细胞凝集分析；将细胞沉淀用于直接免疫荧光测定。用上述免疫荧光测定和血细胞凝集分析获得的结果，分别示于图 6 和图 7。所得数据示出了生长于 PER.C6 中的病毒的感染性以及病毒产量提高。

#### 实施例 6：在 PER.C6 上存在流感病毒的细胞表面受体

人流感病毒 A 和 B 毒株在含胚卵中的增殖通常导致受体结合变体的选择，该变体在 HA 分子的暴露和功能重要的区域中的 HA 球状头部的远端部分存在氨基酸取代。由于这些突变，适应含胚卵的

毒株与最初的人病毒在其抗原性和免疫原性活性，以及其毒力方面有所不同。分离自 MDCK 细胞的人流感病毒通常存在一种 HA 蛋白，其与最初的临床样品的病毒上存在的 HA 蛋白相同。近来的研究（Govorkova 1999）阐明了在含胚卵中选择变体的分子学基础，及在 MDCK 细胞中没有这种变体选择现象。发现所有分离自 MDCK 细胞的人流感病毒 A 和 B 毒株，均与存在于细胞表面受体中的寡糖中的 $\alpha$ -2, 6 唾液酸-半乳糖键高度亲和性和特异性结合，而其在含胚卵中生长的对应物示出与携带寡糖（Sia2-3Gal）的细胞表面受体中的 $\alpha$ -2, 6 唾液酸-半乳糖键的亲和性提高。使用特异性凝集素表明只有含有 Sia2-3Gal 的受体在鸡胚细胞的表面存在，而 MDCK 细胞表达 Sia2-6Gal 和 Sia2-3Gal。PER.C6 细胞表面上 Sia2-6Gal 和 Sia2-3Gal 组分的表达是通过 FACS 分析研究的，使用两种不同的洋地黄毒苷（DIG）标记的凝集素：特异识别 Sia2-6Gal 键的 *Sambuca nigra* 凝集素（SNA），和特异识别 Sia2-3Gal 键的 *Maackia amurensis* 凝集素（MAA）。图 8A 示出 SNA 和 MAA 凝集素的识别作用及其与糖基化位点的结合。另外，图 8A 示出 FITC 标记的抗 DIG 抗体和 DIG 标记的凝集素之间的相互作用模式，其识别细胞表面存在的受体的糖基化骨架中特异的唾液酸键。这两种凝集素均取自多糖鉴别试剂盒（Boehringer-La Roche）。

实验是在悬浮的 PER.C6 细胞和粘附的 MDCK 和 CHO 细胞上进行的。MDCK 和 CHO 细胞使用胰蛋白酶-EDTA（Gibco-BRL）从固体支持物中释放。然后将细胞悬浮液用 Mem-5% FBS 洗一次，并在此培养基中在 37° C 温育 1 小时。在用 PBS 洗（Gibco-BRL）后，将细胞在结合培养基（Tris 缓冲盐水，pH7.5，0.5%BSA，和各 1mM 的  $MgCl_2$ ， $MnCl_2$ ，和  $CaCl_2$ ）中，以大约为  $10^6$  个细胞/ml 的浓度重悬浮。将细胞等分在室温用 DIG 凝集的凝集素 SNA 和 MAA 温育 1 小时。1 小时后，将用凝集素处理的细胞用 PBS 洗，并在室温用 FITC

标记的抗 DIG 抗体 (Boehringer-Mannheim) 另外温育 1 小时。最后, 将细胞用 PBS 洗并使用 FAC-分选设备 (Becton Dickinson) 通过荧光激活的细胞分选加以分析。图 8B 所示的结果表明 PER.C6 细胞被这两种凝集素染色, 示出存在 Sia2-6Gal 以及 Sia2-3Gal 受体。

在相同的实验中, 将 MDCK 细胞用作这两个唾液酸化的受体的阳性对照物, 而 CHO 细胞由于不存在 $\alpha$ -2, 6 唾液酸转移酶, 所以这些仓鼠细胞中的糖基化酶作为 Sia2-6Gal 组分的阴性对照物。上面一组示出用 SNA 凝集素的结果, 下面一组示出用 MAA 凝集素的结果。从这些结果中可以证明 PER.C6 细胞表达细胞表面蛋白, 所述蛋白在其多糖链中具有 Sia2-6Gal 和 Sia2-3Gal 键。

实施例 7: 不同浓度的胰蛋白酶-EDTA 对 PER.C6 细胞的存活性, 对在 PER.C6 细胞中流感病毒的产生, 及对其衍生的球状 HA 蛋白的作用

由于细胞培养中流感病毒增殖对胰蛋白酶的绝对需求, 因此对不同浓度的胰蛋白酶-EDTA 对 PER.C6 细胞的存活性, 及在用一些流感病毒毒株感染后 PER.C6 细胞中病毒复制的作用加以研究。

用流感病毒毒株 A/Sydney/5/97, 在存在低浓度的胰蛋白酶的情况下感染

在感染当天, 将 PER.C6 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度种植于  $490\text{cm}^2$  的组织培养滚瓶中, 所述滚瓶中存在终浓度为 0.5, 1, 2, 3, 和  $5\mu\text{g/ml}$  的胰蛋白酶-EDTA。这些胰蛋白酶浓度不干扰细胞的生长特性及其存活性 (数据未示出)。将细胞模拟感染或用在 PER.C6 中生长的流感病毒 A/Sydney/5/97 感染, moi 为  $10^{-4}$  pfu/细胞。病毒的产生通过上述直接免疫荧光测定 (数据未示出), 血细胞凝集分析, 单向放射免疫扩散 (SRID) 和噬斑分析加以监测。实验结果示于图



9, 示出当使用 1ug/ml 浓度的胰蛋白酶时, 通过 SRID 测定的 HA 含量以及以 HAU 表示的病毒的生物活性是最高的。图 9 还示出通过使用噬斑分析, 每 ml 最高数目的噬斑形成单位 (pfu) 是在细胞在含有 2ug/ml 胰蛋白酶的培养基中生长的样品中观测到。

#### 用流感病毒毒株 B/Harbin/7/94 感染

在感染当天, 将 PER.C6 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度种植于 490cm<sup>2</sup> 的组织培养滚瓶中, 所述滚瓶中存在 1—5ug/ml 范围内不同浓度的胰蛋白酶-EDTA。将细胞用在 PER.C6 中生长的病毒 B/Harbin/7/94 感染, moi 为  $10^{-3}$  pfu/细胞。病毒的产生通过直接免疫荧光测定, 血细胞凝集和噬斑分析进行监测, 如图 10 所示。在第 2 天, PER.C6 的感染能力随着胰蛋白酶的浓度而提高。然而在第 3 天, 当存在 1, 2.5 或 5ug/ml 胰蛋白酶时, 感染的细胞的百分率没有明显差异。在没有胰蛋白酶的情况下 (0ug/ml), 检测不到流感病毒感染。在最后收获那天 (感染后第 4 天), 通过血细胞凝集分析测定的病毒的生物活性没有明显不同。令人感兴趣地, 在取自感染后第 3 天和第 4 天的样品中进行的感染性分析示出病毒的产生中的差异。当使用 2.5—5 (第 3 天) 和 1ug/ml (第 4 天) 浓度的胰蛋白酶时, 在第 3 天和第 4 天获得最高效价。

#### 用流感病毒重排列的 X-127 感染

在感染当天, 将 PER.C6 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度种植于 T25 组织培养瓶中, 所述培养瓶中存在 0—7.5ug/ml 范围内不同浓度的胰蛋白酶-EDTA。将细胞用在 PER.C6 中生长的病毒 X-127 (在鸡卵中重排列的毒株 A/Beijing/262/95) 感染, moi 为  $10^{-4}$  和  $10^{-3}$  pfu/细胞。病毒生长通过直接免疫荧光测定, 血细胞凝集和噬斑分析进行监测。如图 11 和图 12 所示, HAU 效价与样品相同, 不依赖于使

用的胰蛋白酶浓度和初始 moi。另外，在通过噬斑分析测定的感染性效价中未观测到明显不同。

### 用流感病毒毒株 A/Sydney/5/97 在存在高浓度胰蛋白酶的情况下感染 PER.C6

为测试胰蛋白酶的浓度提高对细胞的存活性和病毒复制的作用，将 PER.C6 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度种植于滚瓶中，所述滚瓶中存在 0—12.5ug/ml 范围内不同浓度的胰蛋白酶-EDTA。将细胞模拟感染或用 PER.C6 生长的病毒 A/Sydney/5/97 病毒感染，moi 为  $4 \times 10^{-5}$  pfu/细胞。如上所述测定所得批次中存在的 HAU。重要地，图 13 所示的数据清晰地示出胰蛋白酶的浓度直至 10ug/ml 也不影响细胞的存活性。另外，当使用 2.5—5ug/ml 浓度的胰蛋白酶时，在感染后第 4 天通过 HAU 测定的病毒的生物活性较高。另外，测定 TCID<sub>50</sub>（图 14A）及进行噬斑分析（数据未示出）。在这些噬斑分析，感染性效价（TCID<sub>50</sub>），及 HA 裂解和通过 Western 印迹分析测定的数量（大约 10ug/ml）中未发现明显不同，如图 14B 所示。

实施例 8：在中空纤维灌流生物反应器系统中在 PER.C6 细胞上生产流感病毒

通过使用 3L（总体积）生物反应器研究在悬浮生长的 PER.C6 细胞中生产流感病毒的规模，所述反应器中含有在无血清培养基中 2L 体积的细胞悬浮液，其没有动物或人衍生的蛋白质（ExCell 525，JRH Biosciences）。

在大约  $3 \times 10^6$  个细胞/ml 的密度进行流感病毒感染。将细胞用 PER.C6 培养的 A/Sydney/5/97 病毒接种，moi 为  $10^{-4}$  pfu/细胞。每天取 5—10ml 细胞悬浮液样品，进行一般细胞计数，以确定细胞的存活性，进行葡萄糖浓度测定，直接免疫荧光测定，血细胞凝集分析

和感染性分析。这些实验结果示于图 15。

为研究 HA 蛋白的存在和状况，使用得自 NIBSC 的两种不同的抗 HA 抗体进行 Western 印迹。也可以进行上述 SRID 分析。示于图 16 中的两种 Western 印迹结果示出在这种生物反应器中产生的流感病毒批次产生的 HA 含量估计为 15ug/ml，这是通过 SRID 分析证实的。产生的 HA 在亚单位组成和与参考的亚型特异性抗血清的免疫反应性方面，可与参考的 NIBSC HA 相比。

实施例 9：在 15L 生物反应器中用 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6，随后进行特异性下游加工（DSP）

将悬浮生长的 PER.C6 细胞在 37° C，在 15L 生物反应器中空纤维灌流系统中温育，所述生物反应器中空纤维灌流系统中具有 10L 无血清 ExCell 525 培养基（JRH Biosciences）中的细胞悬浮液。在 35° C 以大约  $3.3 \times 10^6$  个细胞/ml 的细胞密度，在含有 5ug/ml 胰蛋白酶-EDTA（Life Technologies）的培养基中，进行流感病毒感染。将细胞用 PER.C6 中培养的 A/Sydney/5/97 病毒（传代数 3）接种，moi 为  $10^4$  pfu/细胞。用含有胰蛋白酶-EDTA 的无血清 ExCell 525 培养基，在感染后的前 24 小时持续进行灌流。在感染后 2 天，将细胞用含有葡萄糖，必需氨基酸和额外的谷氨酰胺的补料分批溶液培养：82ml 50m/v% 葡萄糖/L 悬浮液（NPBI，荷兰），50×必需氨基酸，无 Gln（Gibco-BRL-Life Technologies），和 200mM 谷氨酰胺（Gibco-BRL-Life Technologies）。每天取 10ml 细胞悬浮液样品，以进行标准细胞计数（结果示于图 17，左侧），葡萄糖浓度测定（结果示于图 17，右侧），直接免疫荧光(图 18)，血细胞凝集分析（图 19）和感染性分析（数据未示出）。另外，对 HA 蛋白通过 Western 印迹分析进行研究，并与 NIBSC 标准 HA 对照物比较（图 20）。在最后收获全部细胞悬浮液那天（感染后 92 小时），使用 Powerfuge™ 分离系统（Carr，

JM Separations), 根据生产者的指导, 以持续 20000g 的流量进行细胞碎片澄清。然后将澄清的上清使用具有 500kD 截断值的中空纤维膜萃取柱浓缩 20 倍 (A/G Technology, JM Separations)。图 21 所示结果示出在通过血细胞凝集和感染性分析测定的通过中空纤维浓缩后的活流感病毒的定量回收是非常显著的。

实施例 10: PER.C6 中生长的流感病毒的免疫原性及其衍生的疫苗

为测定 PER.C6 中生长的流感病毒的免疫原性, 设计一种在雪貂体内研究和攻击模式。使用两批三价全灭活流感疫苗 (由 A/Sydney/5/97, A/Beijing/262/95 和 B/Harbin/7/94 组成), 含有各 15 $\mu$ g 这 3 个毒株中的 HA。第一批得自能育的鸡卵, 第二批得自 PER.C6 细胞。如下所述进行三价全灭活的 PER.C6 衍生的流感疫苗的生产, 纯化, 灭活和配制。

#### A/Sydney/5/97, A/Beijing/262/95 和 B/Harbin/7/94 流感毒株在 PER.C6 上的生长

在 3 个单独的 3L 中空纤维补料分批生物反应器系统中, 生产所有三种流感病毒, 所述反应器中含有体积为 2L 的细胞悬浮液。加入以下溶液进行分批补料: 一次加入总体积为 96ml 的含有 50m/v% 葡萄糖 (NPBI), 50 $\times$  无 Gln 的必需氨基酸 (Gibco-BRL-Life Technologies), 200mM 谷氨酰胺 (Gibco-BRL-Life Technologies) 和 7.5m/v% NaHCO<sub>3</sub> (Merck) 的溶液。在含有 5 $\mu$ g/ml 胰蛋白酶-EDTA 的无血清的 ExCell 525 培养基中, 以  $1.8 \times 10^6 - 2.6 \times 10^6$  个存活细胞/ml 的细胞密度, 进行流感病毒感染。将 PER.C6 细胞用 PER.C6 中生长的 A/Sydney/5/97, A/Beijing/262/95 和 B/Harbin/7/94 病毒接种, moi 为  $10^{-4}$  (A/Sydney/5/97) 或  $10^{-3}$  (A/Beijing/262/95 和 B/Harbin/7/94) pfu/细胞。在病毒生产期间, 每天取 10ml 样品, 以进行标准细胞和存活性计数, 葡萄糖浓度测定, 直接免疫荧光测定和血细胞凝集分析。图 22 (得自 A/Sydney/5/97 感染的 PER.C6 细胞) 示出在用病毒

感染后总细胞计数和存活细胞计数（上左侧），葡萄糖消耗（上右侧），在直接免疫荧光测定中阳性细胞百分率（下左侧）和 HAU' s（下右侧）。图 23（得自 A/Beijing /262/95 感染的 PER.C6 细胞）示出在用病毒感染后总细胞计数和存活细胞计数（上左侧），葡萄糖消耗（上右侧），在直接免疫荧光测定中阳性细胞百分率（下左侧）和 HAU' s（下右侧）。图 24（得自 B/Harbin/7/94 感染的 PER.C6 细胞）示出在用病毒感染后总细胞计数和存活细胞计数（上左侧），葡萄糖消耗（上右侧），在直接免疫荧光测定中阳性细胞的百分率（下左侧）和 HAU' s（下右侧）。将含有病毒的浓缩物贮存于 $-80^{\circ}\text{C}$ ，直至 DSP。

在所有这三种情况中，葡萄糖消耗和 PER.C6 细胞的存活性和总细胞计数是可比的。通过直接免疫荧光分析测定的这三种病毒的生产水平也是相似的。尽管在不同的毒株之间 HAU 和感染性效价不同，但 PER.C6 持续复制测试的所有流感病毒。

在收获全部批次当天（在感染后第 3 或 4 天），将病毒上清在台式离心机中，以 2000rpm 离心澄清，并使用具有 750kD 截断值的中空纤维膜萃取柱（A/G Technology, JM Separations），根据生产者的指导通过超滤浓缩 10 倍。流感病毒是通过两个相继的密度离心步骤从浓缩的上清中纯化的：25—70%封闭蔗糖梯度（在 27K 1.5 小时），随后持续 25—70%蔗糖梯度（在 23K 4 小时）。将病毒条带在大约 50ml 的磷酸盐缓冲液中稀释，并最后在超离心机中以 24000rpm 沉淀。将病毒沉淀溶解于 1.5—2.3ml 磷酸盐缓冲液中，等分，并在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻。

配制灭活的流感疫苗是基于“免疫活性的”HA 蛋白的数量（在微生物中），通过 SRID 分析测定（Wood 等，1977）。进行定性批次中 HA 含量的测试。同时使用基于 Lowry 的 DC-蛋白分析试剂盒（Biorad），根据生产者建议的步骤测定蛋白质总量。发现 HA 组成了病毒制品的总蛋白质含量的大约 20—30%。

### 实施例 11：在鸡卵中和在 PER.C6 上产生的灭活疫苗的体内免疫原性

雪貂和小鼠是研究流感病毒感染的两个充分确定的动物模型，并已经用于确定流感疫苗的效力和免疫原性。使用小鼠模型测试系统，将由 PER.C6 和鸡卵衍生的三价疫苗的免疫原性，通过血细胞凝集抑制分析接种动物的血清加以对比，所述三价疫苗含有 A/Sydney/5/97, A/Beijing/262/95 和 B/Harbin/7/94。使用雪貂感染模型，免疫是在用 A/Sydney/5/97 攻击后产生的。在 MDCK 细胞上回收病毒及利用血清进行血细胞凝集抑制分析，用于对比两个疫苗的免疫原性和效力。

#### 在小鼠中进行体内研究

将 90 个雌性 Balb/C 小鼠分成 9 组，每组 10 只小鼠。在第 0 天收集最多 100 $\mu$ l 的血液。分离血清并贮存于 -20 $^{\circ}$  C。然后将每只小鼠根据表 1 所示用适当的疫苗接种。在第 28 天，取另外 100 $\mu$ l 血液。将血清贮存于 -20 $^{\circ}$  C。将每只小鼠根据表 1 所示再接种。在第 42 天，取 100 $\mu$ l 血液样品，并将所有小鼠处死。分离血清并在 -20 $^{\circ}$  C 冷冻。对取自第 0, 28 和 42 天的血清样品进行血细胞凝集抑制 (HI) 分析。每天对在鸡卵和细胞中生长的病毒并列进行所有这些分析。

表 I 小鼠中的免疫原性测试

组号	抗原类型	免疫接种体积 (ml)	接种途径	HA 总量 $\mu$ g/剂
1	鸡卵三价全毒粒	0.5	s.c.	9.0
2	鸡卵三价全毒粒	0.5	s.c.	3.0
3	鸡卵三价全毒粒	0.5	s.c.	1.5
4	鸡卵三价全毒粒	0.5	s.c.	0.15
5	PER.C6 三价全毒粒	0.5	s.c.	9.0
6	PER.C6 三价全毒粒	0.5	s.c.	3.0
7	PER.C6 三价全毒粒	0.5	s.c.	1.5
8	PER.C6 三价全毒粒	0.5	s.c.	0.15
9	PBS	0.5	s.c.	0

### 在雪貂中进行体内分析

将 18 个雌性雪貂（白化变种或臭鼬）如下分成 3 组，每组 6 只：第 1 组通过肌肉(IM)注射接受鸡卵衍生的测试疫苗，将动物用 A/Sydney/5/97 攻击。第 2 组 IM 接受 PER.C6 衍生的测试疫苗，将动物用 A/Sydney/5/97 攻击。第 3 组只接受测试疫苗稀释剂，并用 A/Sydney/5/97 攻击。在第 0 天和第 28 天施用测试疫苗。在第 56 天，将所有雪貂均用 0.5ml 的 A/Sydney/5/97 攻击病毒经鼻内感染，TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>3</sup>。对鼻腔进行洗涤，并从第 57—63 天每天监测一次雪貂的炎症细胞计数，温度和体重。在第 63 天将所有的动物处死。分离血清并贮存于 -20° C。将鼻腔洗涤样品贮存于冰上，使用锥虫蓝排出分析计数鼻腔洗涤回收的细胞。

得自鼻腔洗涤样品的病毒效价是通过测定在 MDCK 细胞上回收的病毒而确定的。将 Spearman 和 Karber (1931) 的计算公式用于计算 TCID<sub>50</sub>。对取自第 0 天，28 天，56 天和 63 天的血清样品进行血细胞凝集抑制分析。从这个实验中可以论证 PER.C6 衍生的测试疫苗是有效的。

### 实施例 12：来自 PER.C6 上生产的流感病毒的 HA 蛋白的特性

为研究 PER.C6 细胞中 HA 的糖基化，产生一批未裂解的 HA (HA0)。将 PER.C6 细胞用病毒 A/Sydney/5/97（在 PER.C6 上传代数为 5），在含有终浓度为 5μg/ml 的胰蛋白酶-EDTA 的 ExCell 525 培养基中感染。Moi 为 1，0.1 和 0.01pfu/细胞。在 35° C 温育 1 小时后，将细胞用 PBS 洗两次以除去胰蛋白酶，并在 35° C 在 10%CO<sub>2</sub> 条件下，在没有胰蛋白酶的情况下温育过夜。在第 2 天，收集细胞悬浮液并离心（500g），将细胞沉淀用培养基洗两次。将病毒上清在 -80° C 冷冻，并将其样品用于所述的 Western 印迹分析中，以研究

未裂解的 HA 蛋白的存在与否。

未裂解的 HA 蛋白 (HA0) 由两个亚单位组成: HA1 和 HA2, 它们通过二硫键连接。由于这种二硫键可以通过用 DTT 还原而破坏, 因此 HA1 和 HA2 可以在还原凝胶上分离并观测, 随后用识别亚单位的抗血清进行 Western 印迹。如果 HA 蛋白只由 HA0 组成, 将观测到与 HA1 亚单位和迁移最快的 HA2 亚单位相比通过 SDS/PAGE 凝胶迁移较慢的一个条带。示于图 25 的结果提示当与得自 NIBSC(UK)的鸡卵衍生的阳性参照物相比时, 在 PER.C6 中主要存在未裂解的 HA0。为证实检测的条带确实是未裂解血细胞凝集素, 将 HA0 样品用在 2.5—10 $\mu$ g/ml 范围内不同浓度的胰蛋白酶, 在培养基中在 37 $^{\circ}$ C 消化过夜。然后将消化的蛋白质在还原条件下加样于 SDS/PAGE 凝胶上, 随后使用如图 14 所述相同抗血清进行 Western 印迹分析。如图 26A 所示, 可以达到 HA0 裂解, 证实未裂解的 HA 蛋白是在 PER.C6 上产生的。基于这些结果, 产生了一种使用流感 HA0 作底物, 确定培养基中胰蛋白酶活性的分析方法。

#### 胰蛋白酶活性分析

为确定存在于产生流感病毒的培养基中的胰蛋白酶是否仍具有活性, 研制了一种胰蛋白酶活性分析方法。这种分析方法是基于测定胰蛋白酶裂解与流感疫苗生产最相关的底物 HA0 的酶促活性。

确定在用流感病毒 B/Harbin/7/94 接种的 PER.C6 (moi 为  $10^3/10^4$  pfu/细胞) 培养物中, 胰蛋白酶在整个生产期间是否保留活性。为此, 将在感染后第 1, 2 和 3 天取的 10 $\mu$ l 上清, 用于在 37 $^{\circ}$ C 过夜裂解 68ng 由流感病毒 A/Sydney/5/97 病毒的 HA0 组成的底物。在消化后, 将蛋白酶抑制剂 (完全蛋白酶抑制剂混合物, Boehringer Mannheim) 加入具有 150mM DTT (Fluka) 的 3 $\times$ Laemli 缓冲液中, 至终浓度为 1 $\times$ 。将样品加样于 10% Tris-HCl SDS/PAGE 凝胶中 (Biorad) 进行实验。如述进行 Western 印迹。结果示于图 26B, 表



明在用流感病毒 B/Harbin/7/94 接种的 PER.C6 培养物中，胰蛋白酶在整个生产期间保留活性，因为培养上清能完全裂解 HA0。

### 实施例 13：用 N-糖苷酶 F 消化 HA0

流感病毒 HA 蛋白是一种糖蛋白，含有 3—9 个 N-连接的糖基化寡糖位点。位点的数目取决于病毒毒株。这些位点的位置是通过 HA 基因的核苷酸序列确定的，而且因为流感病毒的基因组是通过易错 RNA 聚合酶复制的，因此产生糖基化位点的添加或除去的突变高频率发生。然后对 HA 上存在的寡糖链的组分和结构，通过宿主细胞提供的生物合成的阵列和微调糖基化酶确定。由于 HA 的糖基化在毒力和疫苗效力中起重要作用，因此对在流感病毒感染的 PER.C6 上生产的 HA 的性质加以研究。根据生产者提供的方案，用 N-糖苷酶 F 消化 A/Sydney/5/97 未裂解的 HA0 蛋白，以除去预期存在于 A/Sydney/5/97 HA 多肽上的 7 个寡糖。将流感病毒 A/Sydney/5/97 用 1% 的 Triton X-100 (Merck) 裂解。将蛋白酶抑制剂加入相当于 68ng HA 的这种裂解的病毒等分中，至终浓度为 1× (完全蛋白酶抑制剂混合物, Boehringer Mannheim)。将此样品在存在 100mM NaPO<sub>4</sub> pH7, 10mM EDTA (J.T.Baker), 1% SDS (J.T.Baker) 和 1% B-巯基乙醇 (Merck) 的情况下温育。在室温下温育 10 分钟。将样品用 100mM NaPO<sub>4</sub> pH7, 10mM EDTA (J.T.Baker), 0.625% NP-40 和 1% B-巯基乙醇 (Merck) 稀释 5 倍。将稀释液的 40μl 用于糖苷酶-F 消化。为此，加入 2μl 1U/μL 的糖苷酶-F (N-糖苷酶 F, Boehringer)，并在 37° 温育最少 16 小时。然后加入具有 150mM DTT (Fluka) 的 3× Laemli 缓冲液，至终浓度为 1×。将样品在 7.5% SDS/PAGE 凝胶上进行实验。如下进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹。简而言之，将印迹在室温用封闭液 (补加 1% 兔血清 (Rockland) 的 TBST 中 5% 脱脂奶粉, Biorad) 封闭 30 分钟，随后用 TBST 洗 3 次。然后，将印

迹用抗 A/Sydney/5/97 HA 抗血清（98/768 NIBSC）在室温温育过夜，所述抗血清在具有 5%兔血清(Rockland)的 1%BSA/TBST 中稀释 500 倍。将印迹再用 TBST 洗 8 次。最后将印迹用在封闭液中稀释 6000 倍的 HRP 标记的-兔抗绵羊抗血清在室温温育 1 小时。在用 TBST 洗 8 次后，用 ECL（Amersham Pharmacia Biotech）观测缀合蛋白质的复合物，并在胶片（Hyperfilm, Amersham Life Science）曝光。如图 27 所示，用糖苷酶-F 处理明显使蛋白质的大小降低为大约 28—30kD，每个寡糖丧失大约 4kD。用\*表示的蛋白质条带是去糖基化的 HA0，其迁移类似于将 HA0 裂解为 HA1 和 HA2 亚单位获得的 HA1 亚单位产物（右侧泳道）。

#### 实施例 14：用 Accutase 裂解 HA0

对用非哺乳动物的或重组的蛋白质代替哺乳动物产生的胰蛋白酶-EDTA 的可能性进行研究。近年来，来自无脊椎动物的一种蛋白酶和胶原酶的混合物（Accutase™, PAA），可以通过常规细胞培养获得。由于其来源于无脊椎动物，因此 Accutase 没有朊病毒，细小病毒和潜在的可以污染胰蛋白酶-EDTA 溶液的其它组分。目前还没有关于 Accutase 中存在的蛋白酶类型的信息。使用 Western 印迹分析研究 HA0 的裂解。将一种常量的 HA0 蛋白用系列稀释的 Accutase 在 37° C 消化过夜，所述 HA0 蛋白是用 A/Sydney/5/97 在没有胰蛋白酶的情况下 moi 为 1pfu/细胞而感染 PER.C6 获得的。作为阳性对照，使用等量的用 100ng 胰蛋白酶-EDTA 消化的 HA0。然后将消化的蛋白质加以于 10% SDS-PAGE 凝胶上，在还原条件下进行 Western 印迹分析。如图 28 所示，用 2 $\mu$ l Accutase 处理可以完全裂解 HA0；使用 0.2 $\mu$ l 只观测到部分裂解。

这些结果提示在流感病毒复制和产生期间用 Accutase 处理，可以代替在流感病毒感染 PER.C6 期间的胰蛋白酶-EDTA。

#### 实施例 15: 对 PER.C6 细胞上流感病毒进行电子显微镜检

对用流感病毒毒株 A/Sydney/5/97 感染的 PER.C6 细胞, 以及对含有上清和蔗糖纯化物的病毒, 进行透射电镜研究, 以确定在 PER.C6 上产生的这种流感病毒的表型。所有使用的方法均是本领域技术人员熟知的。图 29 示出病毒生活周期在最后阶段是通过芽殖并从胞质膜中释放包膜的毒粒而代表的。检测相当于 HA 和 NA 病毒蛋白的噬菌体刺突, 其装饰在毒粒的外围。此图还示出流感病毒的多态性特征。

#### 实施例 16: 用多种流感病毒 A 和 B 毒株感染 PER.C6

使用 PER.C6 作为生产流感疫苗的平台的方法, 要求 PER.C6 支持广泛的的不同亚型流感毒株的生长。

将在 T25 烧瓶和/或在 6 孔平板中 ExCell 525 培养基中生长的 PER.C6 细胞的静态悬浮培养物, 用图 30A 所示的 16 种不同的流感病毒毒株, 以  $10^6$  个细胞/ml 的细胞密度感染。这些毒株包含一些 H3N2, H1N1, B 型和禽类毒株。在存在  $5\mu\text{g/ml}$  胰蛋白酶的情况下进行感染。病毒得自 NIBSC (UK) 用鸡卵传代的野生型或重排列的毒株。用由 NIBSC 推荐的病毒稀释液在绵羊中进行感染, 对所述绵羊施用不同毒株。通过免疫荧光测定 (数据未示出) 和 pfu 分析中上清液的效价 (图 30B), 观测到所有测试病毒均能在 PER.C6 上增殖。

这些结果示出甚至通常在含胚卵上难以生产的流感毒株 (用\*表示的) 如 A/Johannesburg/33/94, B/Beijing/184/93 和 A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97, 也能在人 PER.C6 细胞上复制和产生。

#### 实施例 17: 在 PER.C6 上生产 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-1), II 型单

### 单纯疱疹病毒（HSV-2）和麻疹病毒

对除了流感病毒和腺病毒之外的其它病毒如 I 型单纯疱疹病毒（HSV-1），II 型单纯疱疹病毒（HSV-2）和麻疹病毒是否也能在 PER.C6 上复制进行测试。衍生自这些在 PER.C6 中生长的病毒的疫苗和在人体中产生中和作用以对野生型感染有防护作用的疫苗，是从 PER.C6 生长的病毒中生产的。得自 ATCC 并用于感染 PER.C6 细胞的毒株见表 2 所示。

表 2: 得自 ATCC 及用于感染 PER.C6 细胞的单纯疱疹病毒和麻疹病毒毒株

病毒	毒株	ATCC 目录号	批号	传代历史	效价
I 型单纯疱疹病毒	Macintyre	VR-539	1327850	y.s./12, PR RabK/5, Mb/1, PrPabK/5, Vero/4, Vero(ATCC CC1-81)/1	$10^{6.75}$ TCID <sub>50</sub> /200 $\mu$ l
II 型单纯疱疹病毒	MS	VR-540	216463	绵羊脉络膜 plexus/?, HeLa/?, PrRabK/7, Vero(ATCC CC1-81)/3	$10^{7.5}$ TCID <sub>50</sub> /200 $\mu$ l
麻疹病毒	Edmonston	VR-24	215236	HK/24, HuAm/40, MRC-5/1, MRC-5(ATCC CC1-171)/1	$10^4$ TCID <sub>50</sub> /ml

为测试得自 ATCC 的 HSV-1 和 HSV-2 及麻疹病毒是否能在 PER.C6 上复制和生产，将传代数为 46 的细胞以  $10^5$  个细胞/孔种植于根据本领域技术人员已知方法用聚-L-赖氨酸包被的 labtekchambers 中。将猴衍生的 Vero 细胞（得自 ATCC）培养至传代数为 137，并用作阳性对照，以  $2.5 \times 10^4$  个细胞/孔的密度种植。在第 0 天，当具有 PER.C6 的孔是 60% 铺满及具有 Vero 细胞的孔是 80% 铺满时，将细胞用不同 moi 感染（ $10^{-3}$ ， $10^{-2}$ ， $10^{-1}$  和 1 TCID<sub>50</sub>/细胞）。在感染后隔天将细胞固定，并使用 FITC 缀合的类型特异性单克隆抗体，使用一种试剂盒（Imagen 单纯疱疹病毒（HSV）I 型和 II 型（Dako），和 FITC 缀合的抗 HA 和麻疹病毒基质蛋白的抗体（麻疹 IFA 试剂盒，

Light diagnostics)), 根据生产者建议的程序进行免疫荧光测定。抗血清直接抗 HSV-1 和 HSV-2 和麻疹病毒抗原。

概括于图 31 的结果示出 PER.C6 允许 HSV-1(图 31D)和 HSV-2 (图 31E) 和麻疹病毒 (图 31A) 感染。另外, 动力学提示这些病毒在 PER.C6 上以 moi 依赖性方式复制。

接着对 HSV-1 和 HSV-2 和麻疹病毒是否能在 PER.C6 上增殖进行研究。为此, 将细胞用 HSV-1 和 HSV-2 和麻疹病毒感染, 对 HSV-1 (图 32C) 和 HSV-2 (图 32A) 而言, moi 为 0.01, 0.1 和  $1\text{TCID}_{50}/\text{细胞}$ , 对麻疹病毒 (图 32B) 而言, moi 为  $0.001\text{TCID}_{50}/\text{细胞}$  (传代数为 1)。在发生几乎完全细胞病变作用时, 收获细胞和上清, 迅速在液氮中冷冻, 并融解。之后, 将大约  $100\mu\text{l}$  的澄清上清随机传代至 PER.C6 (此为传代数 2)。在再一次达到几乎完全细胞病变作用后, 以相似方式进行第三次传代 (传代数为 3)。传代数为 2 和 3 的 moi 是通过  $\text{TCID}_{50}$  分析确定的。

这些实验结果示出单纯疱疹病毒 I 型和 II 型和麻疹病毒可以在 PER.C6 上复制, 甚至在使用低如  $10^{-7}$  的 moi 时也可以发生复制和增殖。

#### 实施例 18: 筛选在 PER.C6 上复制的轮状病毒

为测试 PER.C6 是否还支持轮状病毒的复制, 将 PER.C6 细胞用猕猴轮状病毒感染 (MMU 18006; ATCC#VR-954, 毒株 S:USA:79:2; lot#2181153)。将 PER.C6 细胞 (传代数 41) 以  $1 \times 10^5/\text{ml}$  密度培养, 将猴衍生的 Vero 细胞 (得自 ATCC, 传代数 139) 以  $2.5 \times 10^4$  密度/ml 培养, 接着种植于 Labtekchambers 中, 其已经根据本领域技术人员已知的方法用聚-L-赖氨酸预包被。将细胞用猕猴轮状病毒在有或无  $2\mu\text{g}/\text{ml}$  胰蛋白酶-EDTA 的情况下感染, moi 为  $1\text{TCID}_{50}/\text{细胞}$ 。在感染 90 分钟后, 将细胞用 ExCell 525 培养基洗, 并在 37

° C 在 10% CO<sub>2</sub> 的湿润环境中进一步温育。在感染后连续 5 天收集上清样品，从细胞中澄清并将细胞碎片通过在台式离心机中以 2000rpm 离心除去，及在特异于轮状病毒的 ELISA 中分析（IDEIA 轮状病毒，Dako）。示于图 33 的结果清晰示出猕猴轮状病毒可以在 PER.C6 上复制。

#### 附图简述

图 1：在免疫荧光测定后通过显微镜观察的感染的细胞（阳性细胞）的百分率，及相对的在碘化丙锭染色之后通过 FACS 测定的死亡细胞百分率，moi 为 10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup>。在 moi 为 10<sup>-3</sup> 时，来自感染样品的细胞存活率很低，不能产生可靠的数据。

图 2：在免疫荧光测定后通过显微镜观察的感染的细胞的百分率。由于充分的 CPE，衍生自 moi 为 10 和 1 的感染的感染后 48 小时的样品未示出。

图 3：在感染后从第 1 天至第 6 天以血细胞凝集单位（HAU）测定的病毒增殖动力学。

图 4：在免疫荧光测定后通过显微镜观察的感染的细胞（阳性细胞）的百分率。

图 5：在感染后从第 1 天至第 6 天以血细胞凝集单位（HAU）测定的病毒增殖动力学。

图 6：在免疫荧光测定后通过显微镜观察的感染的细胞（阳性细胞）的百分率。

图 7：在感染后从第 2 天至第 6 天以血细胞凝集单位（HAU）测定的病毒增殖动力学。

图 8：在中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，PER.C6 细胞和 MDCK 细胞上存在的细胞表面受体上的 Sia2-3Gal 和 Sia2-6Gal 连键的表达。

（A）特异识别 Sia2-6Gal 连锁的 Sambuca nigra 凝集素（SNA），和

特异识别 Sia2-3Gal 连键的 *Maackia amurensis* 凝集素 (MAA) 相互作用的代表图式。也描述了与 FITC 标记的抗 DIG 抗体相互作用的图式, 所述抗体识别结合细胞表面蛋白上寡糖链的 DIG 标记的凝集素。(B) 对用 DIG 标记的凝集素温育的细胞进行的 FACS 分析。根据本领域技术人员已知的方法用 FITC 标记的抗 DIG 抗体检测粘附于细胞的凝集素。根据凝集素染色的细胞的荧光强度 (灰色) 与只用 FITC-抗-DIG 抗体温育的细胞 (空心的) 相对比, 绘制细胞计数图。上面实验组示出通过使用 SNA 凝集素获得的 FACS 分析中的变换, 下面实验组示出通过使用 MAA 凝集素获得的 FACS 分析中的变换。

图 9: 用 A/Sydney 对 PER.C6 进行的感染。(A) 胰蛋白酶-EDTA 对 HAU 效价的作用。(B) HA 的浓度  $\mu\text{g/ml}$ 。(C) 在感染后 96 小时在粗提的病毒上清中测定的病毒感染性效价, 以 pfu/ml 为单位。

图 10: 用 B/Harbin/7/94 对 PER.C6 进行的感染。(A) 在病毒感染期间和之后存在不同浓度的胰蛋白酶-EDTA 对生长动力学的作用。(B) 每 50  $\mu\text{l}$  的 HAU 效价, 和 (C) 病毒感染性效价, 以 pfu/ml 为单位。

图 11: 用 X-127 以 moi 为  $10^{-3}$  对 PER.C6 进行的感染。(A) 胰蛋白酶-EDTA 对以 HAU/50  $\mu\text{l}$  表示的 HAU 的作用, 和 (B) 在感染后 5 天期间病毒感染性效价, 以 pfu/ml 为单位。

图 12: 用 X-127 以 moi 为  $10^{-4}$  对 PER.C6 进行的感染。(A) 胰蛋白酶-EDTA 对以 HAU/50  $\mu\text{l}$  表示的 HAU 的作用, 和 (B) 在感染后 5 天期间病毒感染性效价, 以 pfu/ml 为单位。

图 13: 胰蛋白酶-EDTA 对 (A) PER.C6 细胞存活性和 (B) 病毒的生物学活性的作用。细胞存活性是在经锥虫蓝染色后测定的。HAU 效价如上述测定并以每 50  $\mu\text{l}$  中的值表示。

图 14: 在用流感病毒 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6 后, 胰蛋白

酶-EDTA 对病毒感染性效价和 HA 蛋白含量的作用。(A) 通过用总共 100 $\mu$ l 的 10 倍系列稀释的含有病毒的上清, 在具有胰蛋白酶-EDTA (4 $\mu$ g/ml) 的无血清培养基中以四份接种 MDCK 细胞, 进行感染性分析。在 7 天后, 对这些培养上清测试 HA 活性。感染性病毒效价根据 Spearman-Kärber 的方法 (1931) 计算。(B) A/Sydney/5/97 HA 蛋白的 Western 印迹分析。使用含有 SDS 的裂解缓冲液通过对蛋白质进行破坏和变性收获病毒蛋白。在还原条件下在 10%SDS/PAGE 凝胶上进行电泳。将分离的蛋白用特异性抗 A/Sydney/5/97-HA 抗血清探查。加样增加数量的阳性对照 A/Sydney HA 抗原 (左侧 4 条泳道), 和指定的经胰蛋白酶温育的样品的 10 $\mu$ l PER.C6 细胞上清 (右侧 5 条泳道)。

图 15: 在中空纤维灌流系统中 PER.C6 细胞的存活性, 葡萄糖浓度和 A/Sydney/5/97 的生长动力学。

图 16: 在中空纤维灌流系统中在 PER.C6 细胞上增殖的流感病毒 A/Sydney/5/97 的定性和定量。如图 14 所述对绵羊抗 A/Sydney-HA 抗体进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。将抗 HA 标记的单克隆抗体 (HA 探针 (F7), 小鼠单克隆抗体, (Santa Cruz)) 以 1:1000 稀释度使用。作为二级抗体, 山羊抗小鼠-HRP 缀合的抗体 (Biorad), 以 1:7500 的稀释度使用。

图 17: 在用 A/Sydney/5/97 病毒感染后直至 92 小时, 在 12L 生物反应器中 PER.C6 细胞的存活性 (左侧) 和葡萄糖浓度 (右侧)。

图 18: 在 12L 生物反应器中的 10L 细胞悬浮液中, 用 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6。通过免疫荧光测定的病毒复制动力学, 以阳性染色的细胞百分率示出。

图 19: 在 12L 生物反应器中的 10L 细胞悬浮液中, 用 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6。通过血细胞凝集分析测定的病毒复制动力学, 是以在病毒感染后几天内的 HAU 示出的。用\*表示的线条



是在如述进行 Powerfuge™ 澄清后获得的 HAU 数。

图 20: 在 12L 生物反应器中的 10L 细胞悬浮液中, 用 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6 之后进行 Western 印迹分析。所示是对流感病毒 A/Sydney/5/97 HA 多肽进行的定性和定量结果。如图 14 所述进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹。用箭头表示不同的亚单位(HA1 和 HA2) 和未裂解的 HA0 蛋白。得自 NIBSC 的 HA 作用阳性对照。

图 21: 在 12L 生物反应器中的 10L 细胞悬浮液中, 用 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6 后, 确定 HAU 和 pfu/ml。感染后进行下游加工 (DSP)。还示出了在中空纤维超滤后 (20 倍浓缩), 回收的病毒产量。

图 22: 在 3L 生物反应器中的 2L 细胞悬浮液中, 用 A/Sydney/5/97 感染 PER.C6。提供了 PER.C6 细胞的存活性 (上左侧), 葡萄糖浓度 (上右侧) 和阳性染色的细胞的百分率表示的病毒的生长动力学 (下左侧) 和 HAU (下右侧)。

图 23: 在 3L 生物反应器中的 2L 细胞悬浮液中, 用 A/Beijing/262/95 感染 PER.C6。提供了 PER.C6 细胞的存活性 (上左侧), 葡萄糖浓度 (上右侧) 和阳性染色的细胞的百分率表示的病毒的生长动力学 (下左侧) 和 HAU (下右侧)。

图 24: 在 3L 生物反应器中的 2L 细胞悬浮液中, 用 B/Harbin/7/94 感染 PER.C6。提供了 PER.C6 细胞的存活性 (上左侧), 葡萄糖浓度 (上右侧) 和阳性染色的细胞的百分率表示的病毒的生长动力学 (下左侧) 和 HAU (下右侧)。

图 25: 未裂解的 A/Sydney/5/97 HA0 蛋白的 Western 印迹分析。阳性染色的蛋白是在用得自 NIBSC 的特异性抗 A/Sydney 抗血清如图 14 所述及文中所述温育后检测的。

图 26: (A) A/Sydney/5/97 衍生的用胰蛋白酶消化的 HA0 蛋白的 Western 印迹分析。蛋白质是在用特异性抗 A/Sydney 抗血清温育

后检测的。左侧的是标准裂解的 A/Sydney HA，右侧的是用增加数量的胰蛋白酶处理的 HA0。(B)使用流感病毒 A/Sydney/5/97 的 HA0 作底物，测定流感病毒 B/Harbin 产生期间，培养上清中胰蛋白酶活性。HA0 的裂解产物 HA1 和 HA2 的 Western 印迹分析，如图 14 所述通过抗流感病毒 A/Sydney/5/97 HA 的特异性抗血清观测。

图 27：用 N-糖苷酶 F 消化的 A/Sydney HA0 的 Western 印迹分析。蛋白质是在用特异性抗 A/Sydney 抗血清温育后检测的。用\*表示的蛋白质条带是去糖基化的产物。

图 28：在用 Accutase 消化后 A/Sydney/5/97 HA 的 Western 印迹分析。蛋白质是在用特异性多克隆抗 A/Sydney-HA 抗血清温育后检测的。左侧的是在用胰蛋白酶处理之前和之后的 HA0，右侧的是用降低数量的 Accutase 消化的 HA0。

图 29：流感病毒 A/Sydney/5/97 的电子显微镜检。(A) 感染后 72 小时的 PER.C6 细胞。(B 和 C) 衍生自感染的 PER.C6 的病毒的阴性染色。(D 和 E) 蔗糖纯化的材料的阴性染色。

图 30：(A) 在 PER.C6 细胞上测试的所有不同的流感病毒 A 和 B 毒株。(B) 衍生自感染的 PER.C6 细胞的 3 种所示 A 和 B 型流感病毒的感染性效价。

图 31：用除了流感病毒之外的病毒感染的 PER.C6 和 Vero 细胞的免疫荧光性。(A) 在用麻疹病毒感染基础上阳性染色的细胞。

(B) 在用 HSV-1 病毒感染 Vero 细胞基础上阳性染色的细胞。(C) 在用 HSV-2 病毒感染 Vero 细胞基础上阳性染色的细胞。(D) 用 HSV-1 病毒感染 PER.C6 基础上阳性染色的细胞。(E) 用 HSV-2 病毒感染 PER.C6 细胞基础上阳性染色的细胞。

图 32：在麻疹病毒（中间），HSV-1（下面）和 HSV-2（上面）病毒在 PER.C6 细胞上增殖后测定的感染性效价。

图 33：在用不同 moi 感染 PER.C6（上面）和 Vero（下面）细胞后，在粗提上清中通过 ELISA 测定的轮状病毒的复制情况。

## 参考文献

Bachmayer H. 来自流感病毒的血凝素和神经酰胺酶的选择性溶解. *Intervirology* 1975; 5:260-272.

Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJM. 用于生产失活的流感病毒亚单位疫苗的 Madin Darby 犬肾 (MDCK)-细胞. 在老年人中的安全性特征和临床结果, 见: Brown LE, Hampson EW, Webster RG, 编辑的《III 型流感控制方法》. Amsterdam Elsevier, 1996. P. 683-693.

Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJM. 用哺乳动物细胞培养物产生的流感亚单位疫苗的开发, 见 Carrondo MJT, Griffiths B, Moreira JLP 编辑的《动物细胞技术: 从疫苗到基因药物》. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997:165-167.

Gubareva LV, Wood JM, Meyer WJ, Katz JM, Robertson JS, Major D, Webster RG. 由宿主细胞变异导致的流感病毒毒株中的病毒的共显性混合物. *Virology* 1994; 199: 89-97.

Govorkova EA, Matrosovich MN, Tuzikov AB, Bovin NV, Gerdil C, Fanget B, Webster RG. 在幼仓鼠肾细胞中选择人流感 A 和 B 病毒的受体结合变体. *Virology* 1999 15; 262(1):31-8

Herrero-Euribe L et al. 流感 A 和 B 病毒在人二倍体细胞中的复制. *J. Gen. Virol.* 1983; 64: 471-475.

Karber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Exp. Pathol. Pharmacol.* 1931; 162, 480-483.

Kodihalli S, Justewicz DM, Gubareva LV, Webster RG. 通过鸡卵选择血凝素分子中的单氨基酸取代可使流感 A 病毒 (H3) 候选疫苗失效. *J. Virol.* 1995;69:4888-4897.

Kirstner O, Muller K, Scholtissek C. 流感 A 病毒的核蛋白的差异磷酸化. *J. Gen. Virol.* 19989;70:2421-2431.

Marsha A 等, *Pharmacotherapy* 19(11):1279-1295, 1999: 婴儿及儿童中的轮状病毒疾病及其预防

Murphy BR and Webster RG. 正粘病毒, 参见:《野外病毒学》, 第 46 章, 1397. Eds.B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996.

Newman RW, Jennings R Major DL, Robertson JS, Jenkins R, Potter CW, Burnett I, Jewes L, Anders M, Jackson D, Oxford JS. 人志愿者和动物对接种卵培养流感 A (H1N1) 病毒的免疫应答受血凝素分子中的 3 个氨基酸取代的影响.

Vaccine 1993;11:400-406.

Palache AM, Brands R, van Scharrenburg GJM. 在 MDCK 细胞或受精鸡卵中生产的流感亚单位疫苗的免疫原性和反应原性 J. Infet. Dis. 1977;176:S20-S23.

Robertson JS, Cook P, Nicolson C, Newman R, Wood JM. 流感疫苗株的混合群. Vaccine 1994; 12:1317-1320.

Robertson JS, Bootman JS, Nicolson C, Mjor D, Robertson EW, Wood JM. 临床材料中存在的流感 B 病毒的血凝素是与哺乳动物细胞培养的病毒的相同的一个单一物种. Virol. 1990; 179:35-40

Robertson JS, Bootman JS, Newman R, Oxford JS, Daniels RS, Webster RG, Schild GC. 与流感 A(H1N1)病毒的卵适应相伴的血凝素中的结构变化. Virol. 1987;160:31-37.

Schild GC, Oxford JS, de Jong JC, Webster RG. 流感病毒抗原变体的宿主细胞选择的证据. Nature 1983; 303:706-709.

Schulman JL, Palese P. 流感 A 病毒的毒力因子: 在 MDBK 细胞中产生噬斑所需的 WSN 病毒神经酰胺酶. J. Virol. 1977;24:170-176.

Sugiara A, Ueda M. 流感病毒在小鼠中的神经毒力 I. 强毒和无毒毒株之间的重组体的神经毒力. Virol 1980;101:440-449.,495,271).

Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M. 在胰蛋白酶存在下在建立的犬肾细胞(MDCK)系中进行的流感 A 病毒的噬斑分析和初级分离. Med.Microbiol. Immunol. 1975;162:9-14.

Williams SP, Robertson JS. 未经卵适应的人流感病毒在卵中生长的限制分析. Virol. 1993;196:660-665.

Wood JM, Schild GC, Newmann RW, Seagroatt V. 用于分析全病毒和亚单位流感疫苗的血凝素抗原含量的改进的单向放射免疫扩散技术. Dev. Biol. Stand. 1977 1-3;39:193-20

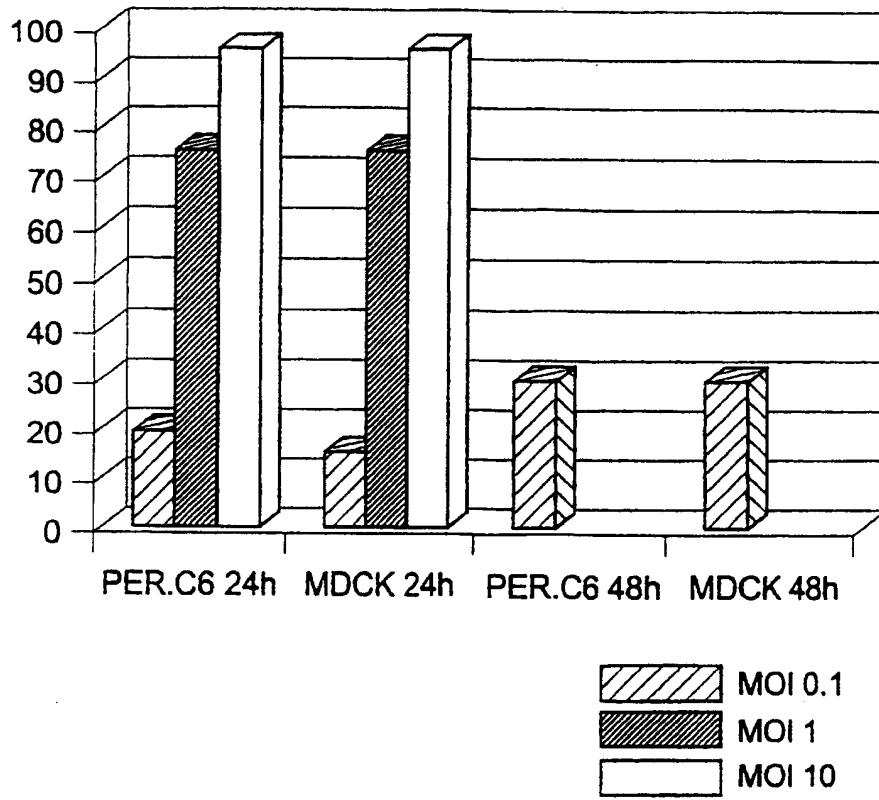


图 1

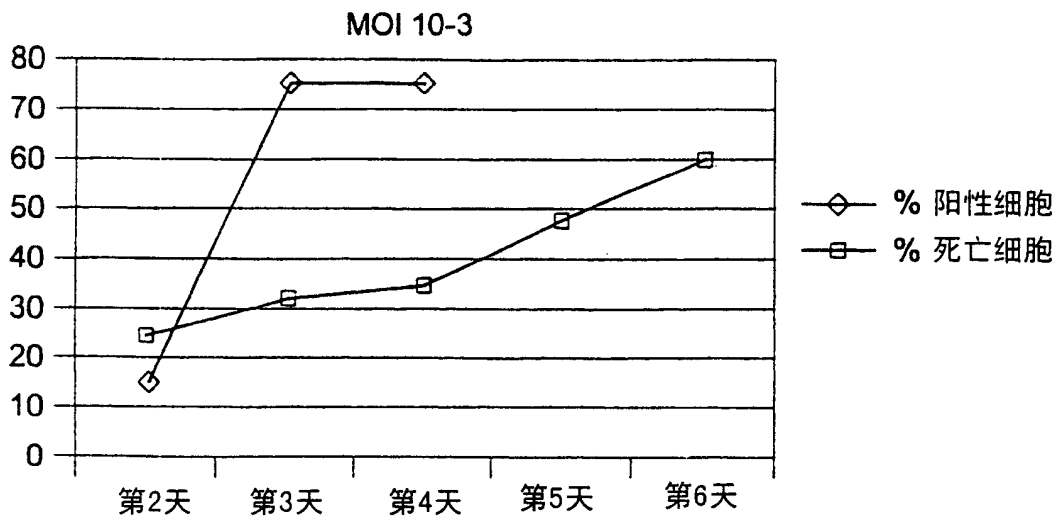
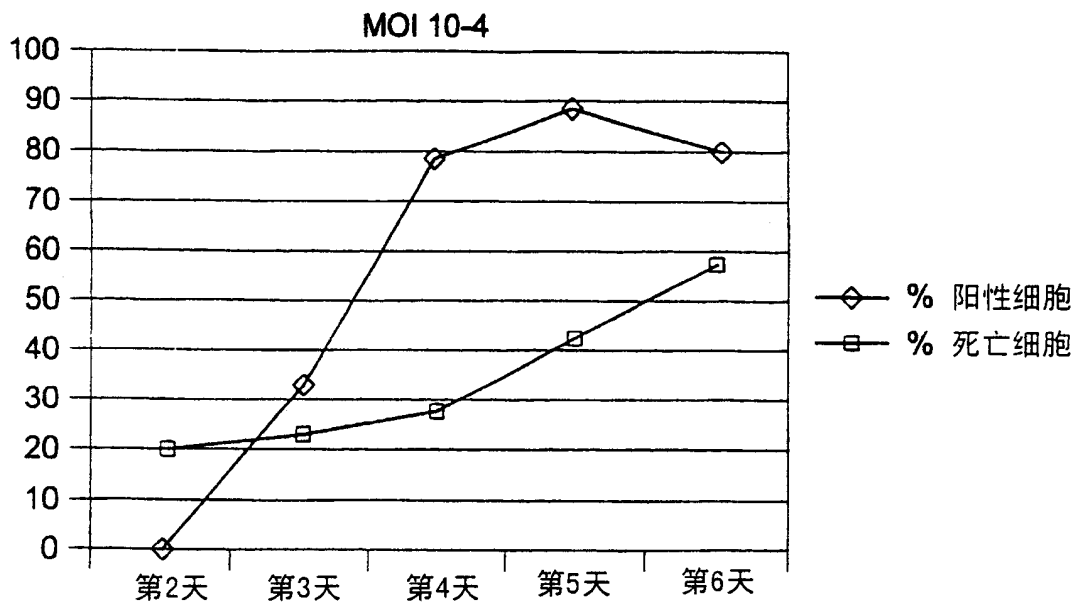


图2

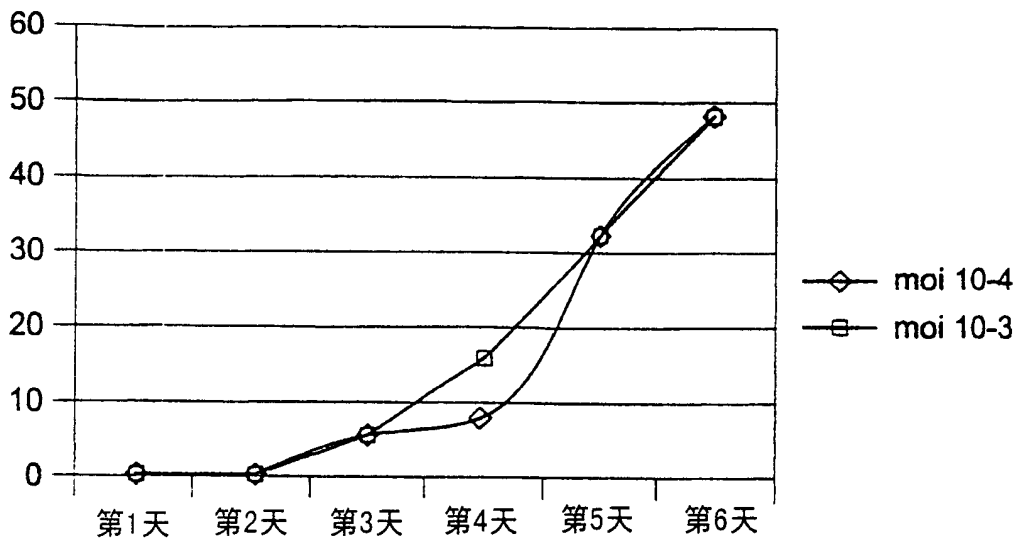


图3

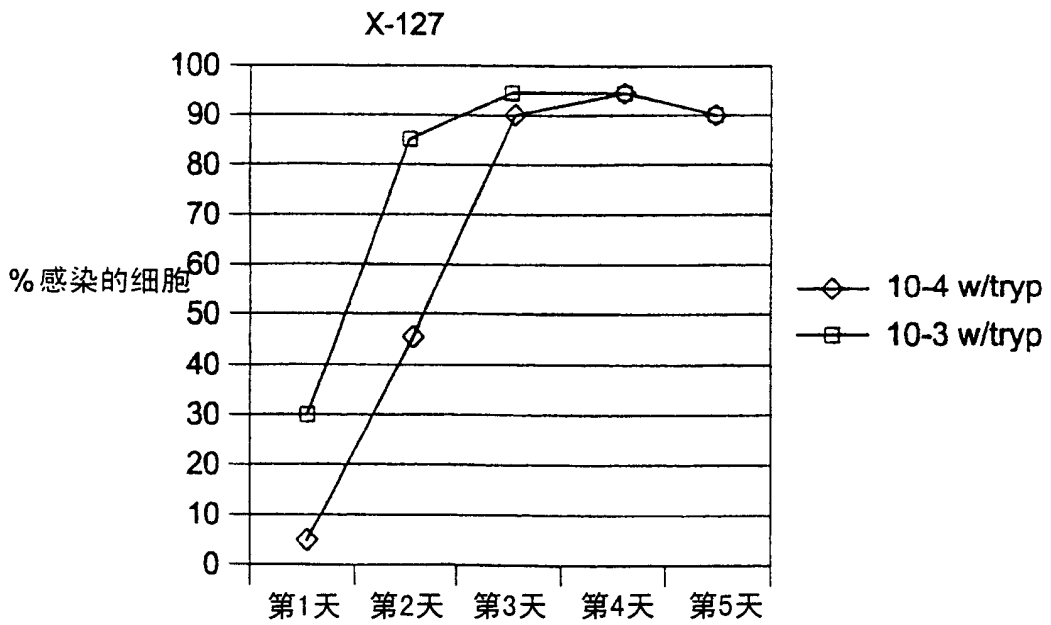
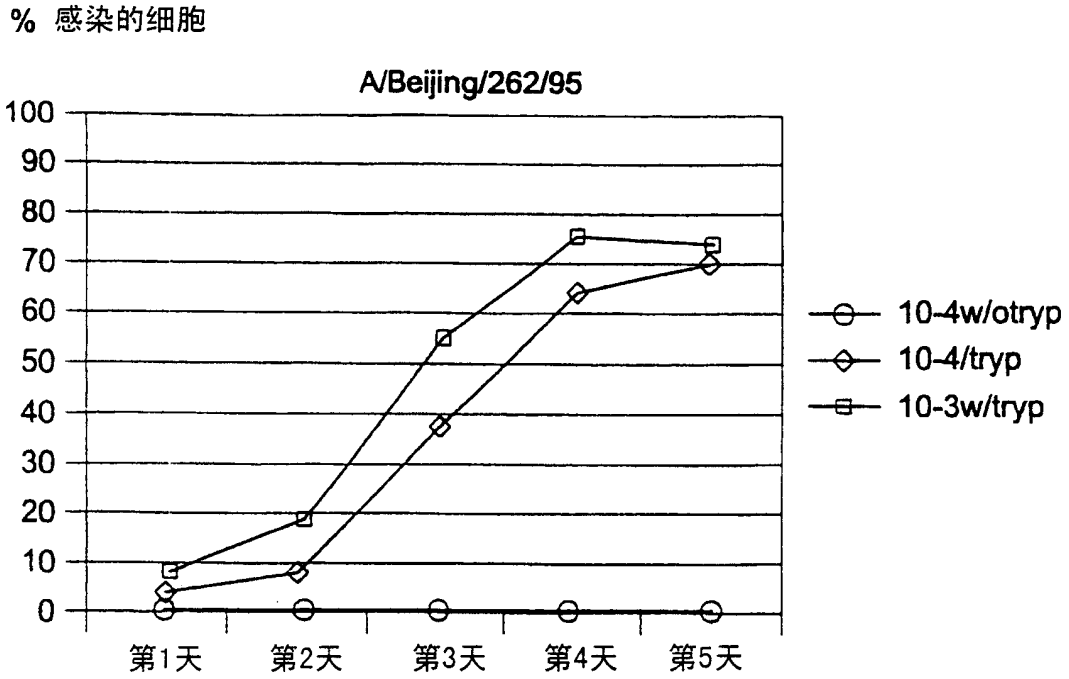


图4



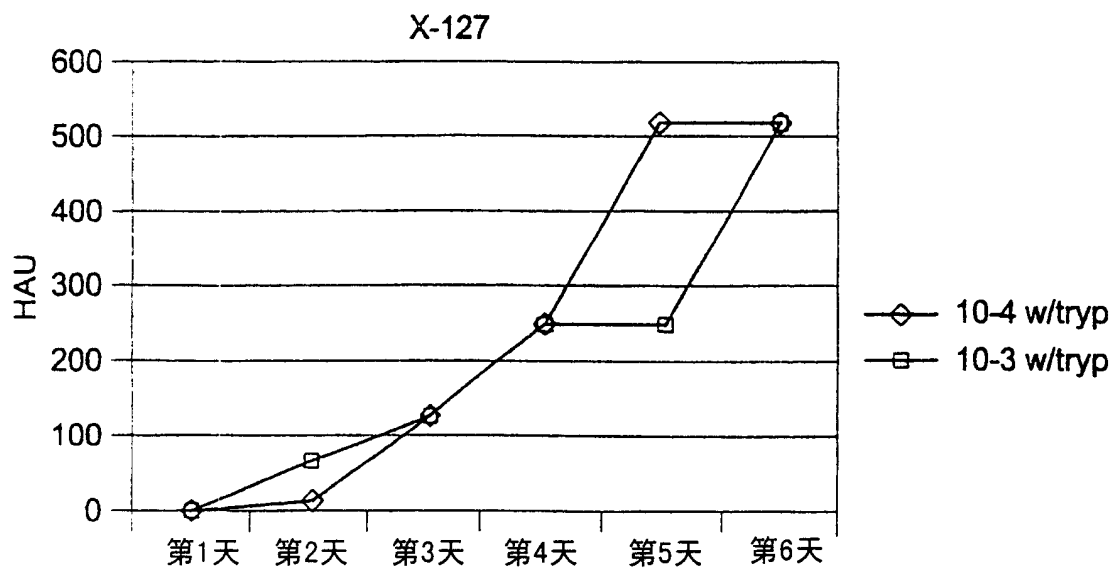
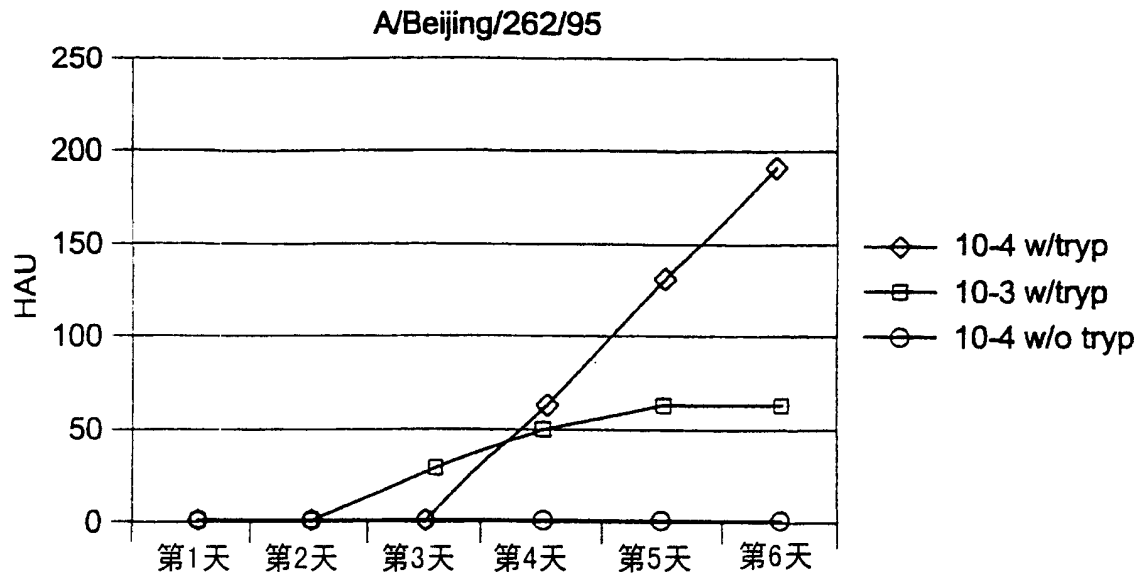


图5

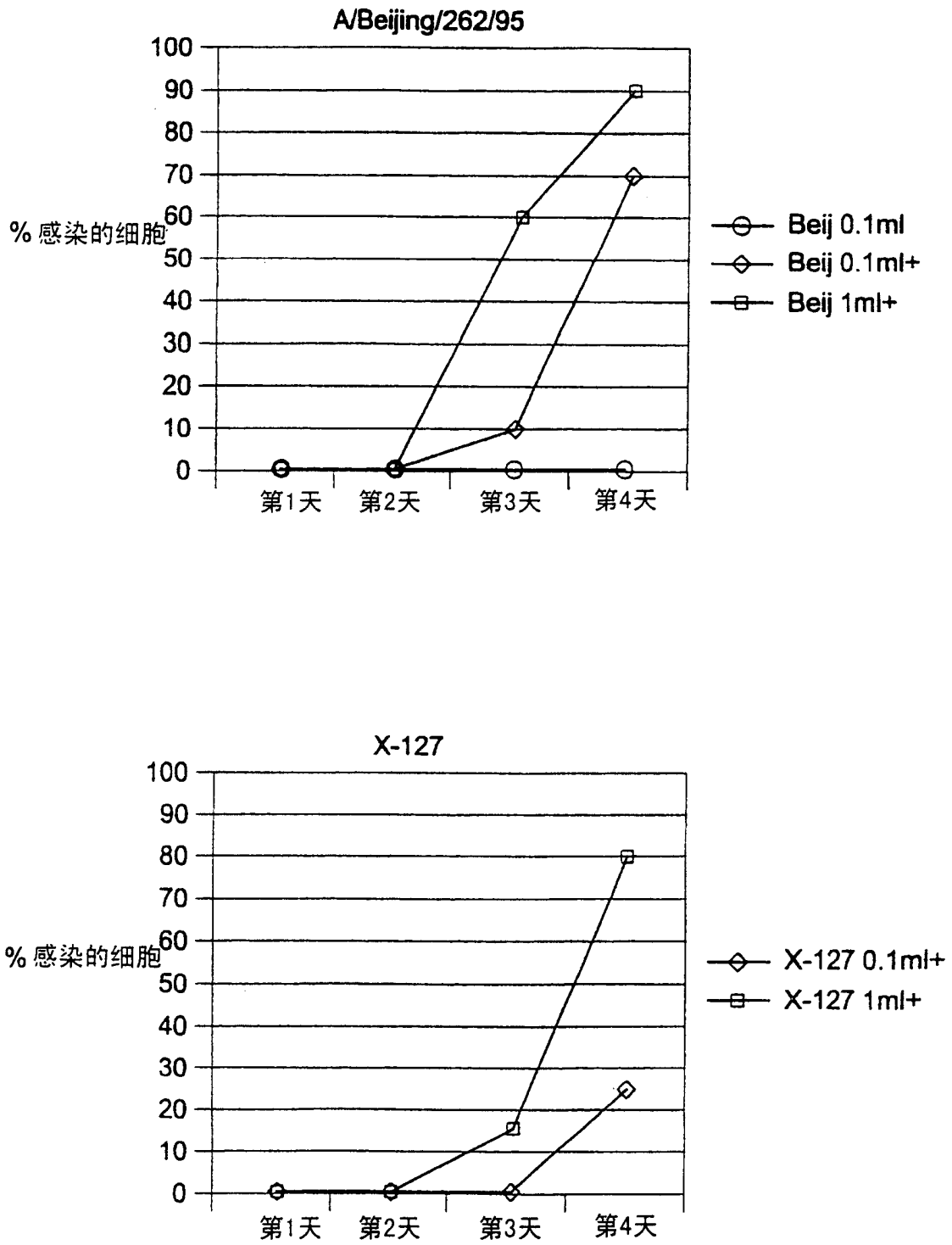


图6

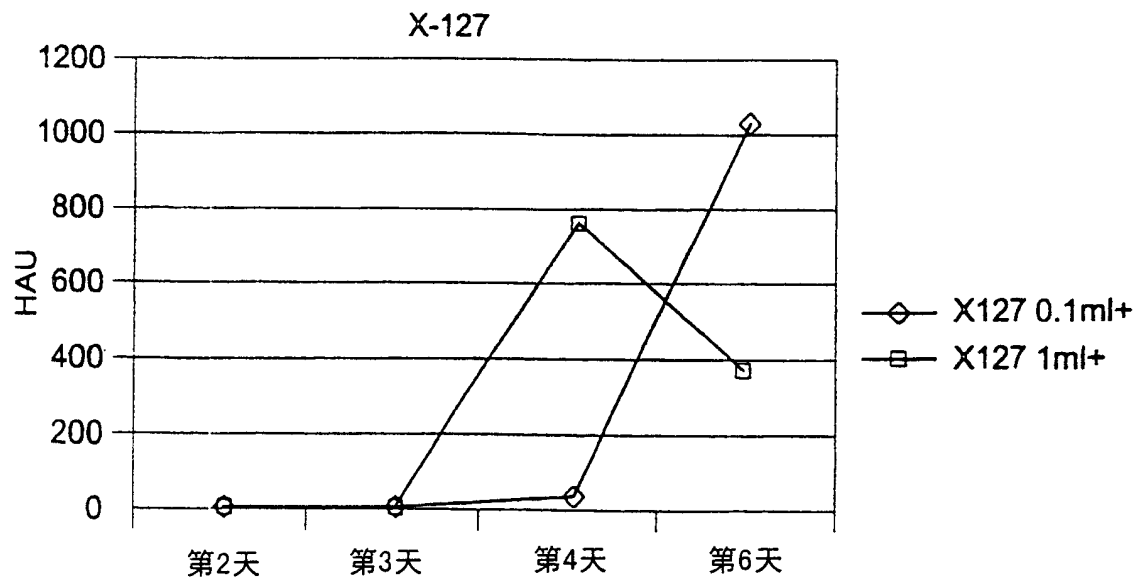
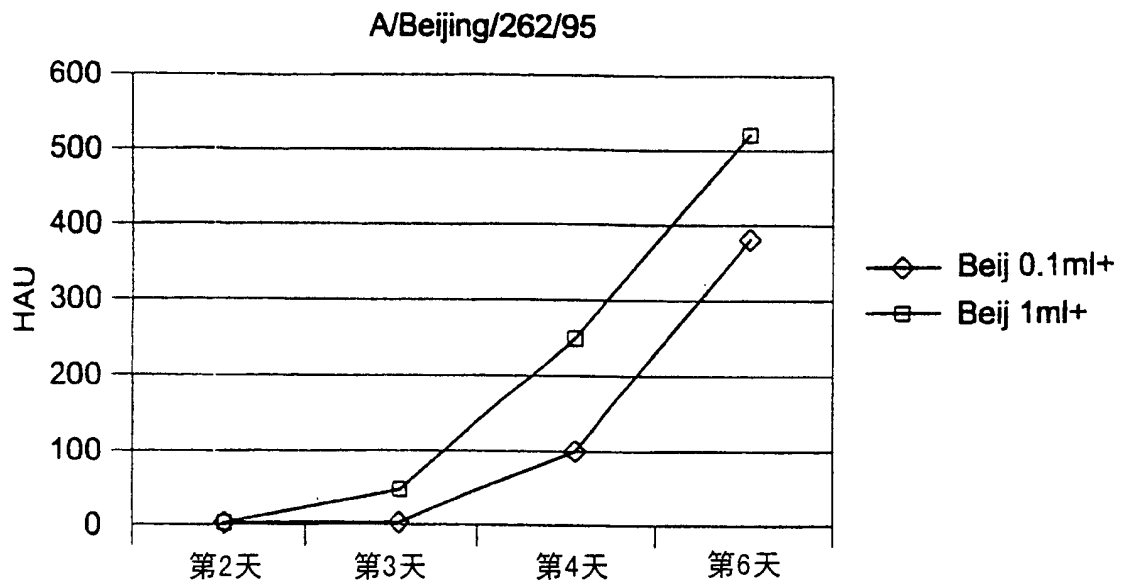


图7

# 图8

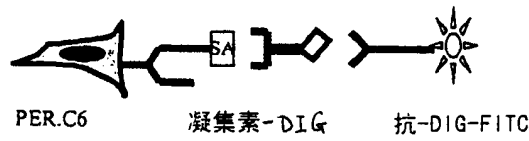
A



Sambucus nigra凝集素



Maackia amurensis凝集素



B

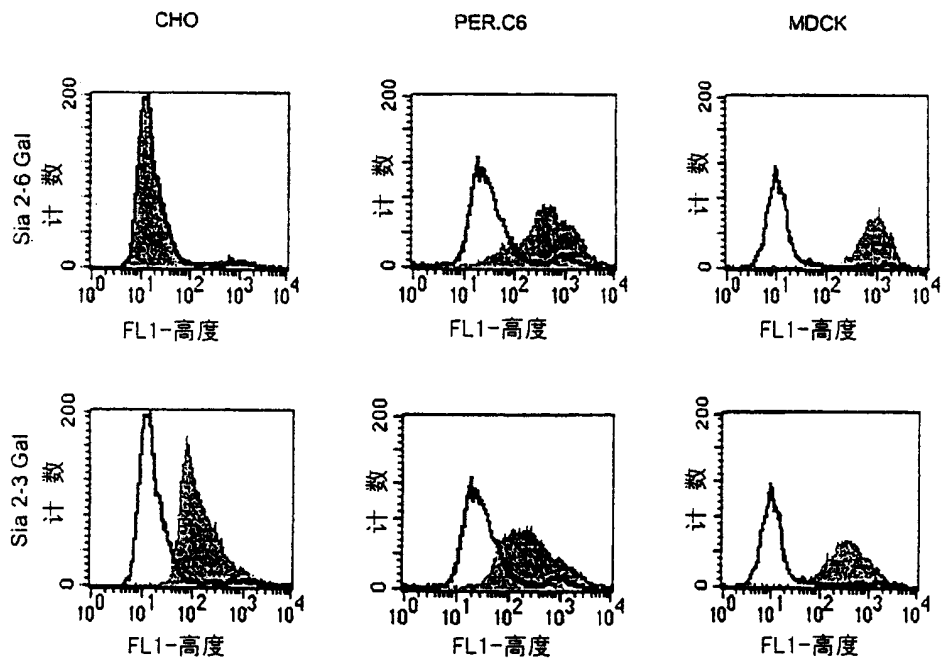


图9

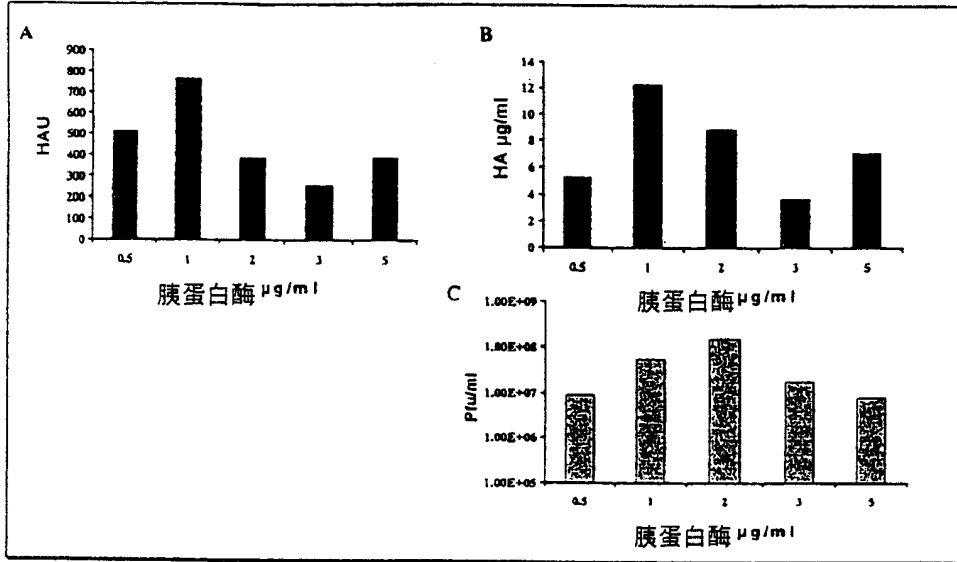


图10

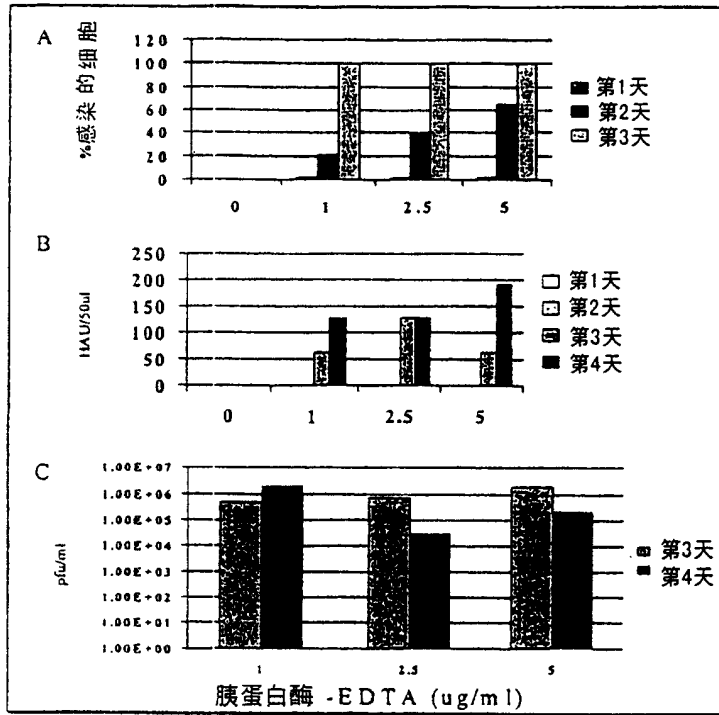


图 11

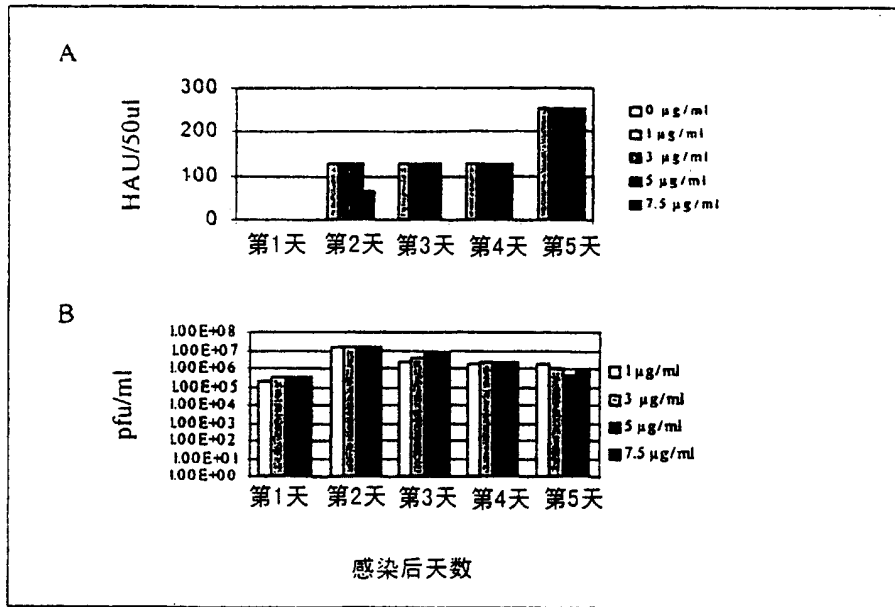


图 12

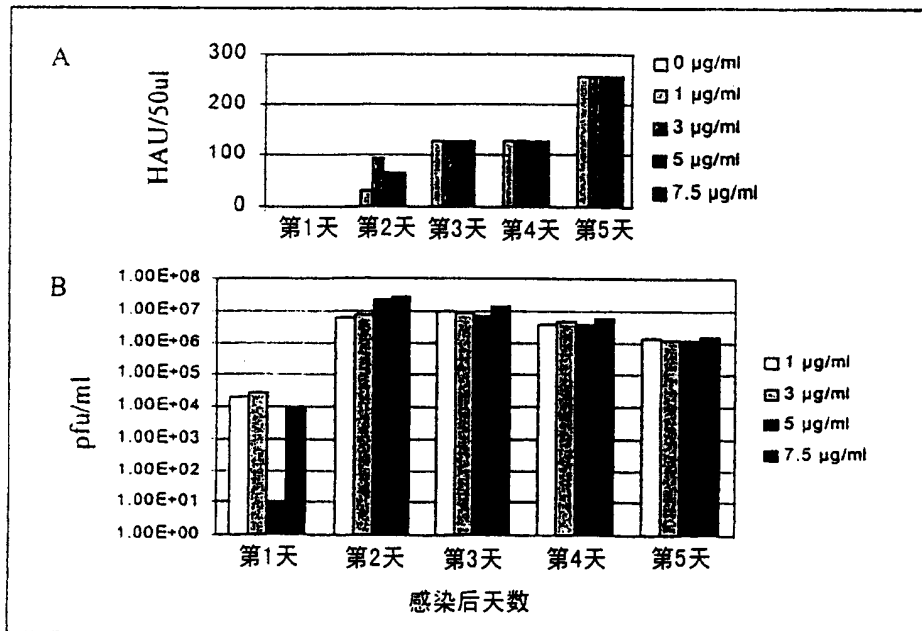


图13

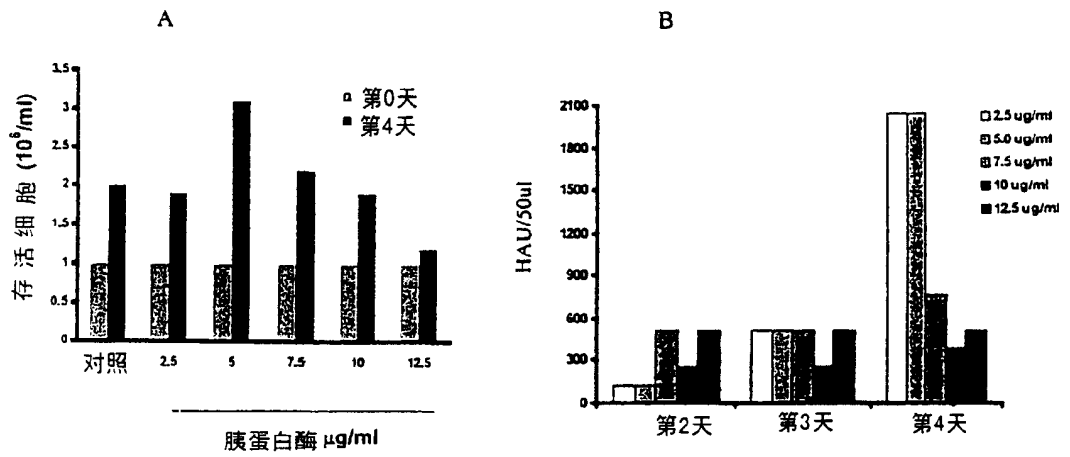


图14

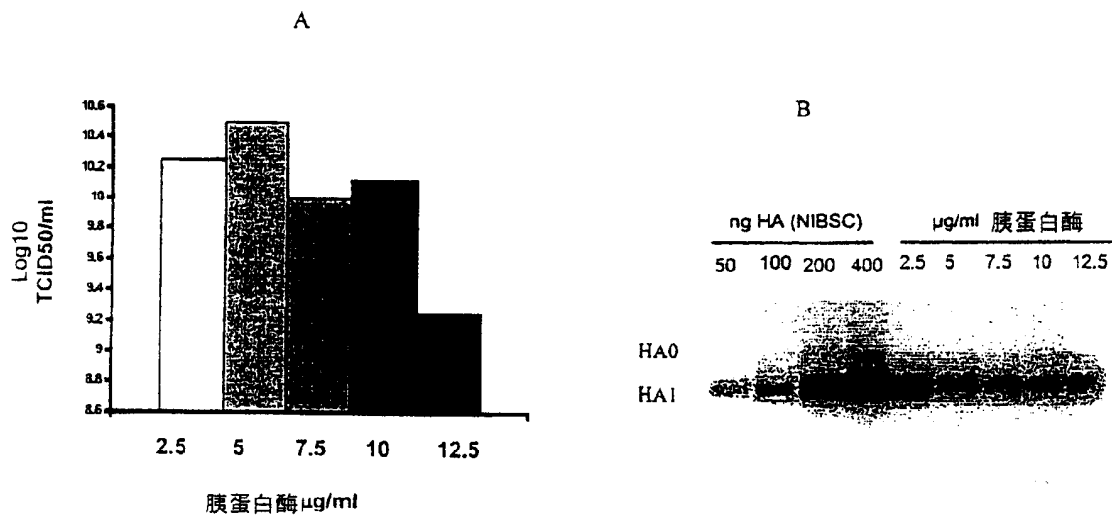




图15

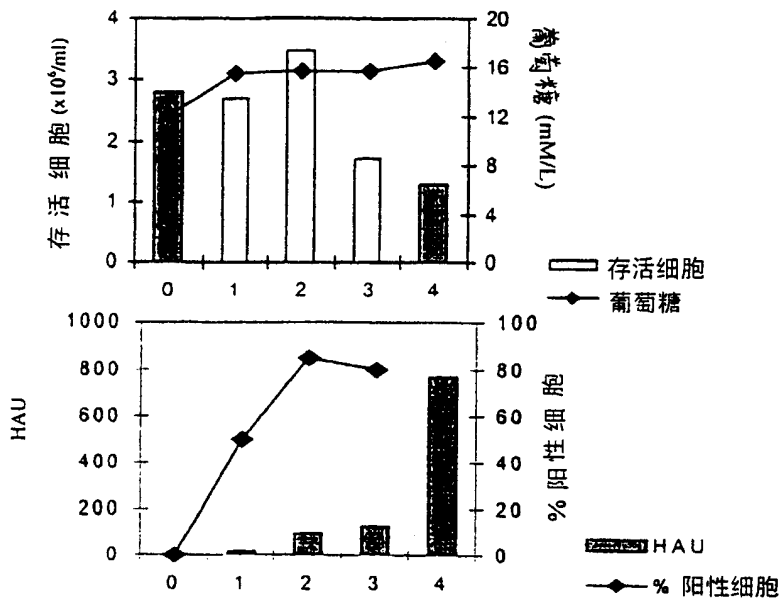


图16

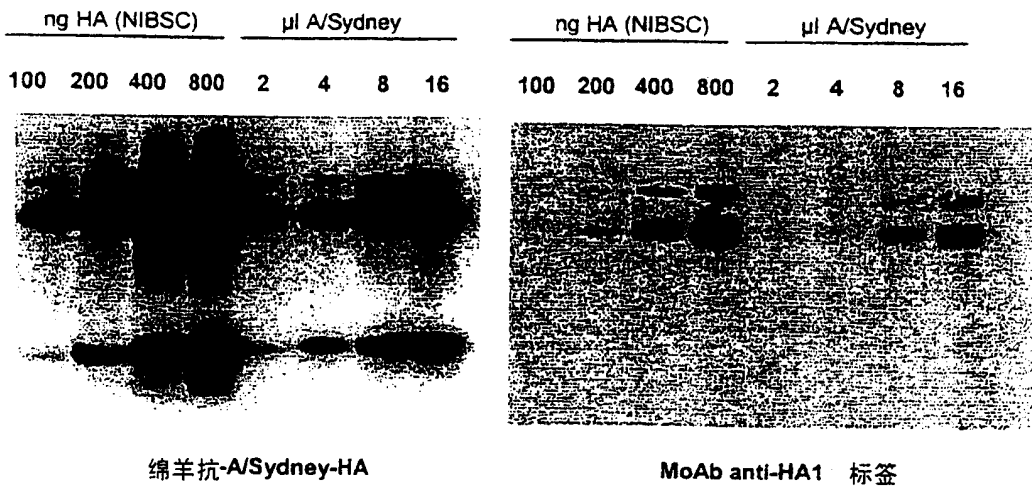


图17

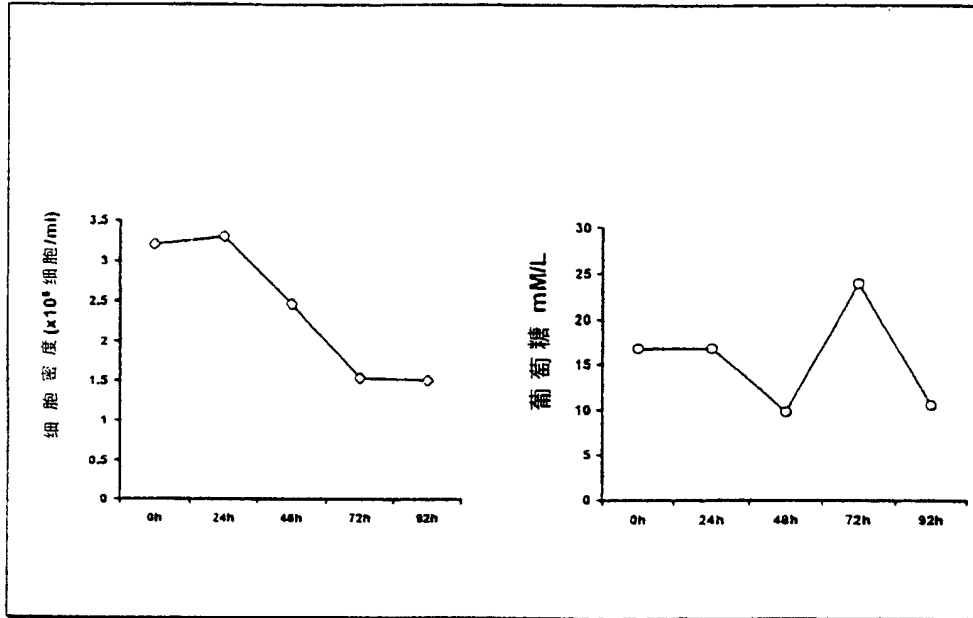


图18

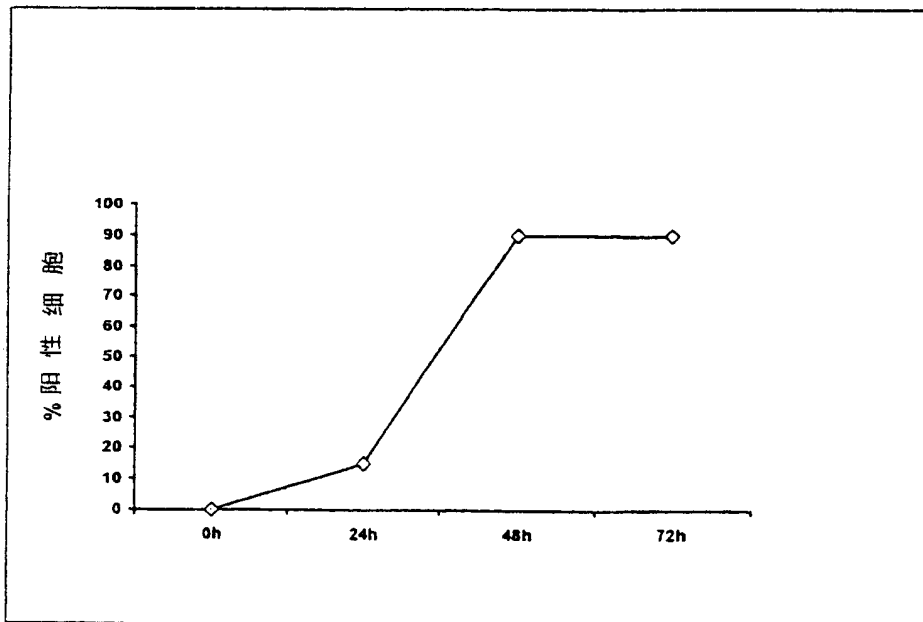


图19

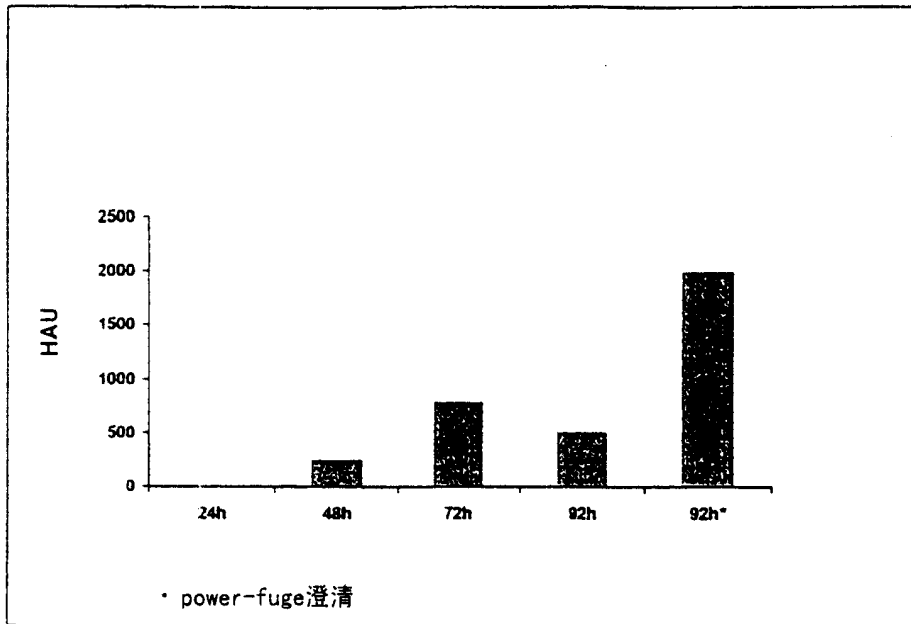


图20

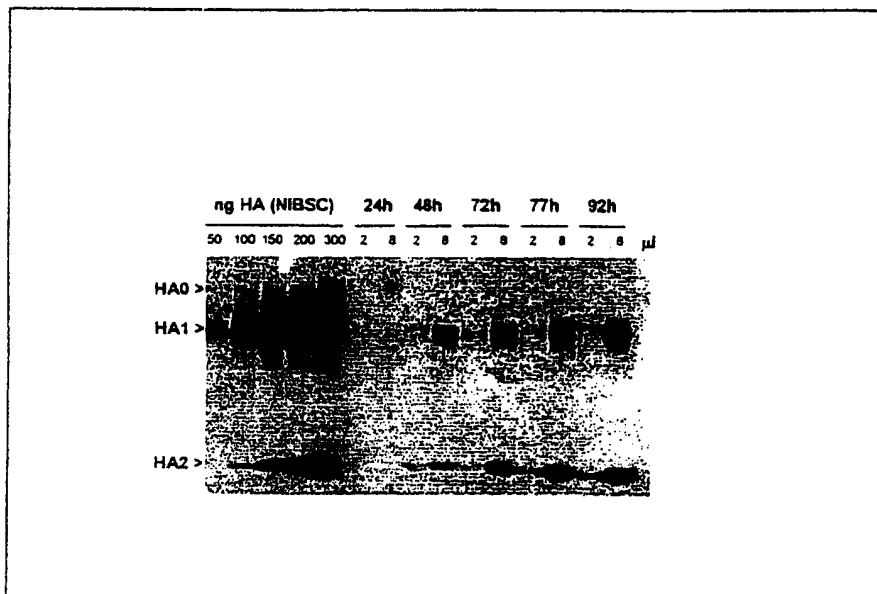


图21

	未浓缩的	20x 浓缩的
HAU	2048	98304
pfu/ml	1.80E+07	1.80E+08

图22

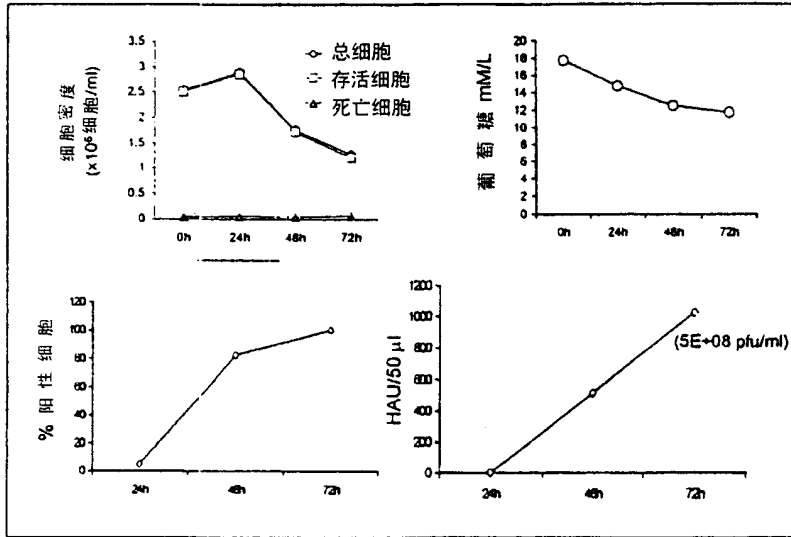


图23

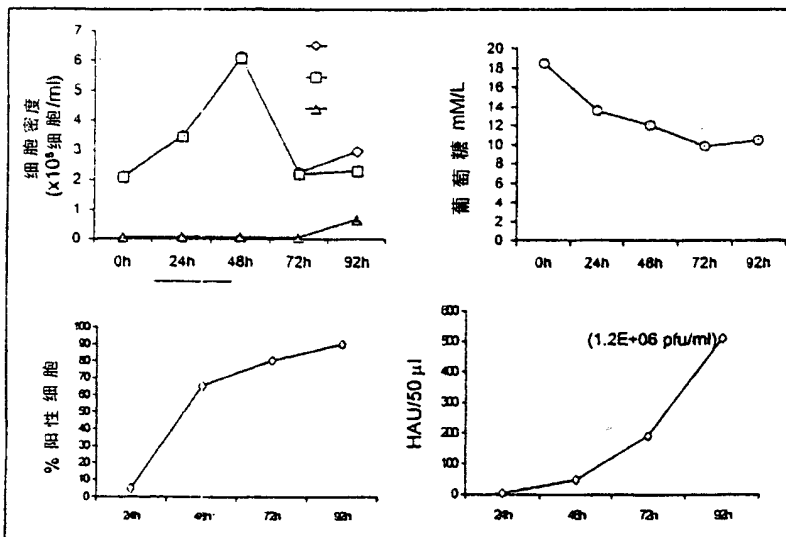


图24

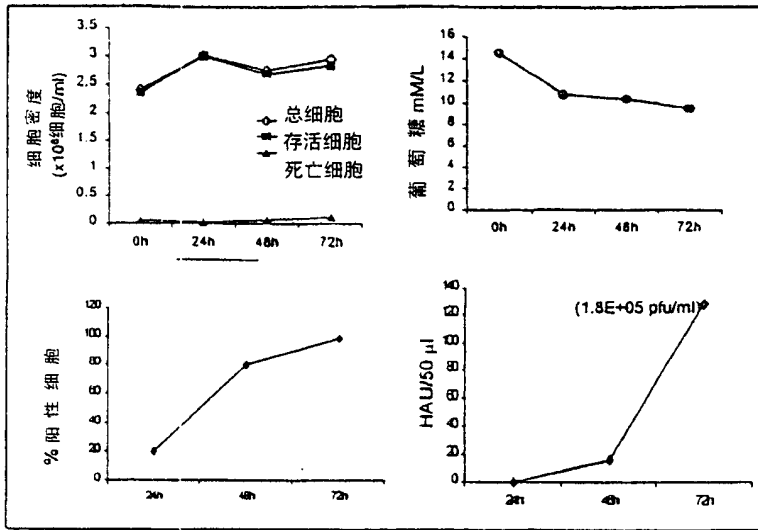


图25

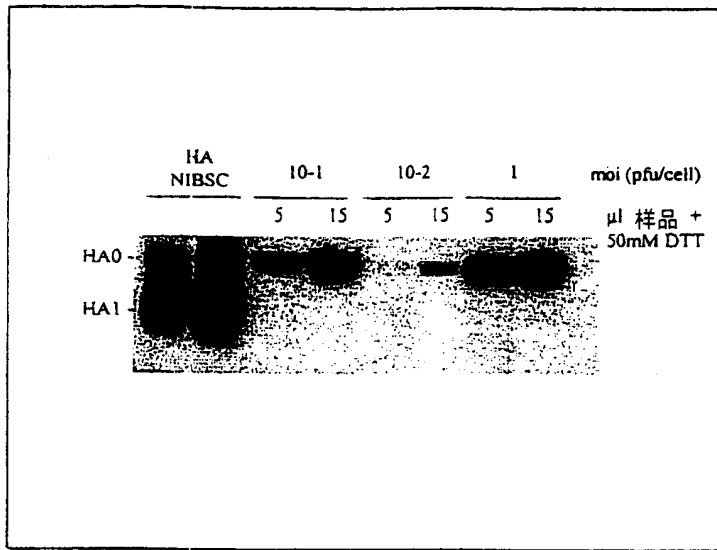


图26A

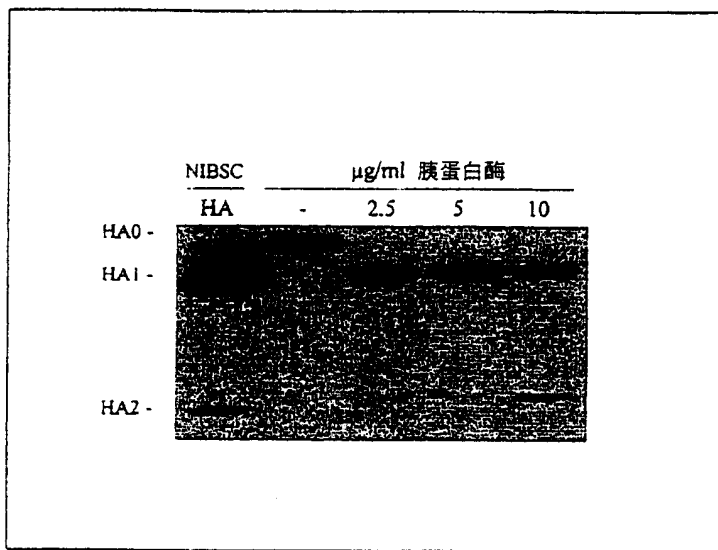


图26B

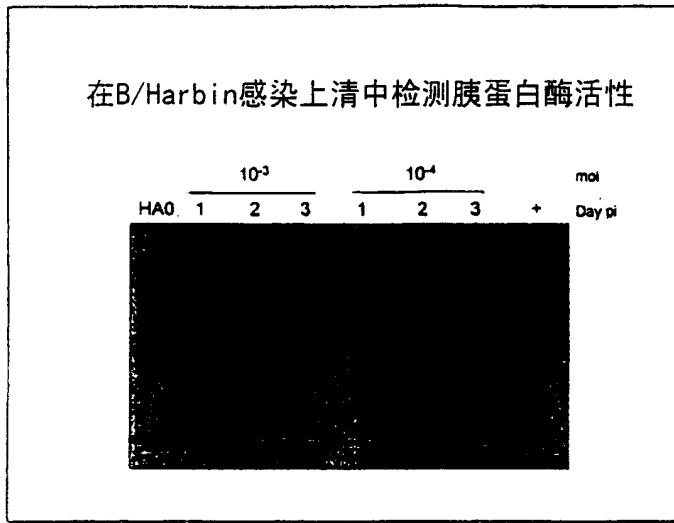


图27

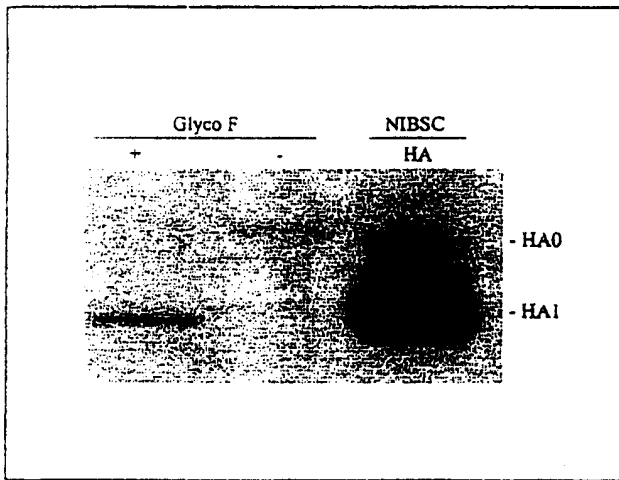




图27

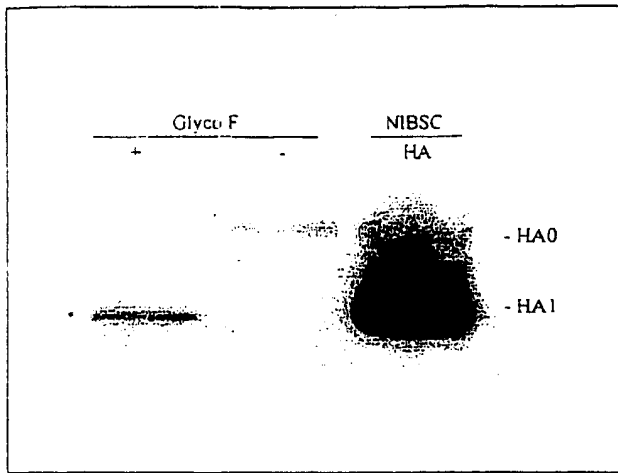


图28

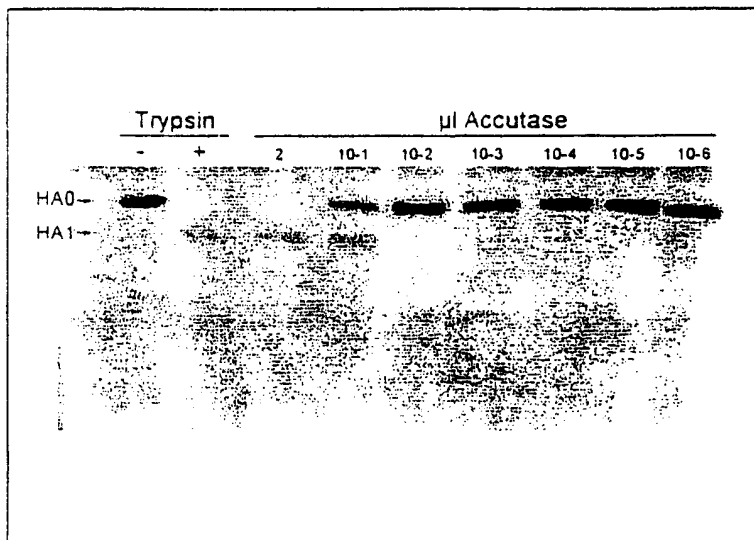


图29

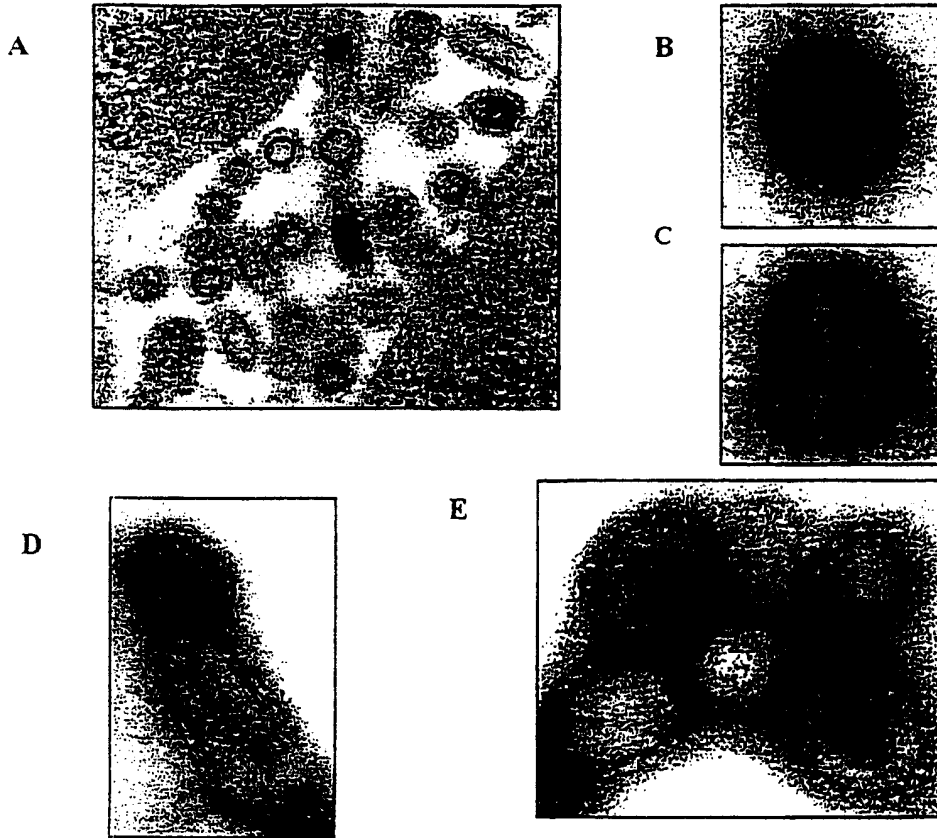


图 30A

**PER.C6™ 上的流感病毒**

- H3N2 毒株
  - A/Sydney/5/97\*
  - A/Johannesburg/33/94\*
  - A/Nanchang/933/95\*
  - A/Wuhan/359/95\*
  - A/Moscow/10/99\*
  - A/Panama/2007/99
- H1N1 毒株
  - A/Beijing/262/95
  - X-127 A/Beijing reassortant
  - A/New Caledonia/20/99
  - A/Johannesburg/282/96
  - A/Texas/36/91
- B 毒株
  - B/Harbin/7/94
  - B/Yamanashi/166/98
  - B/Beijing/184/93\*
  - B/Shandong/7/97
- 禽类毒株
  - A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97\*
- 在卵上很难生长

图 30B

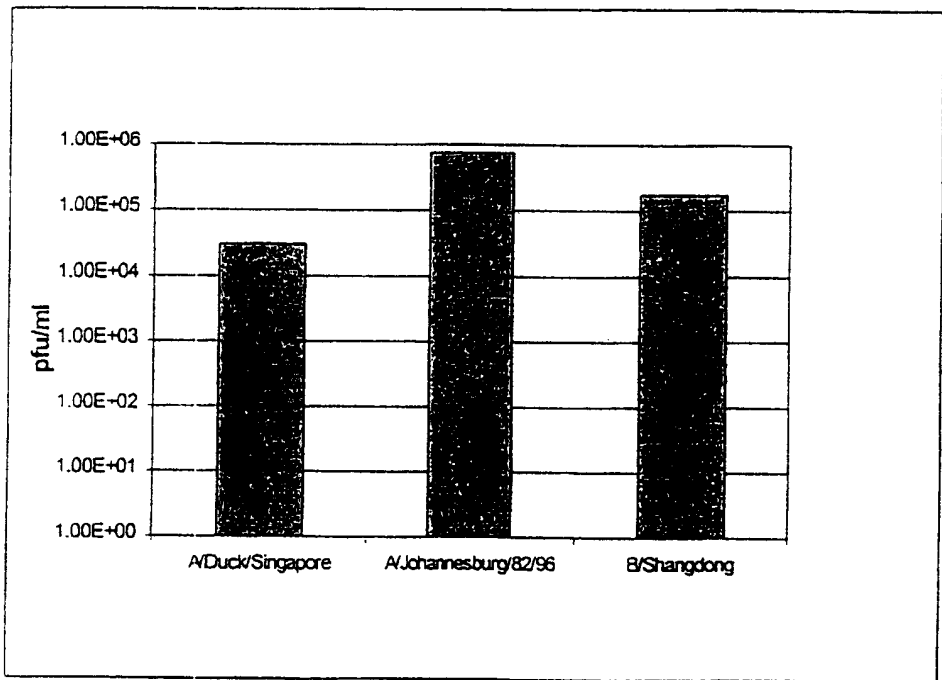
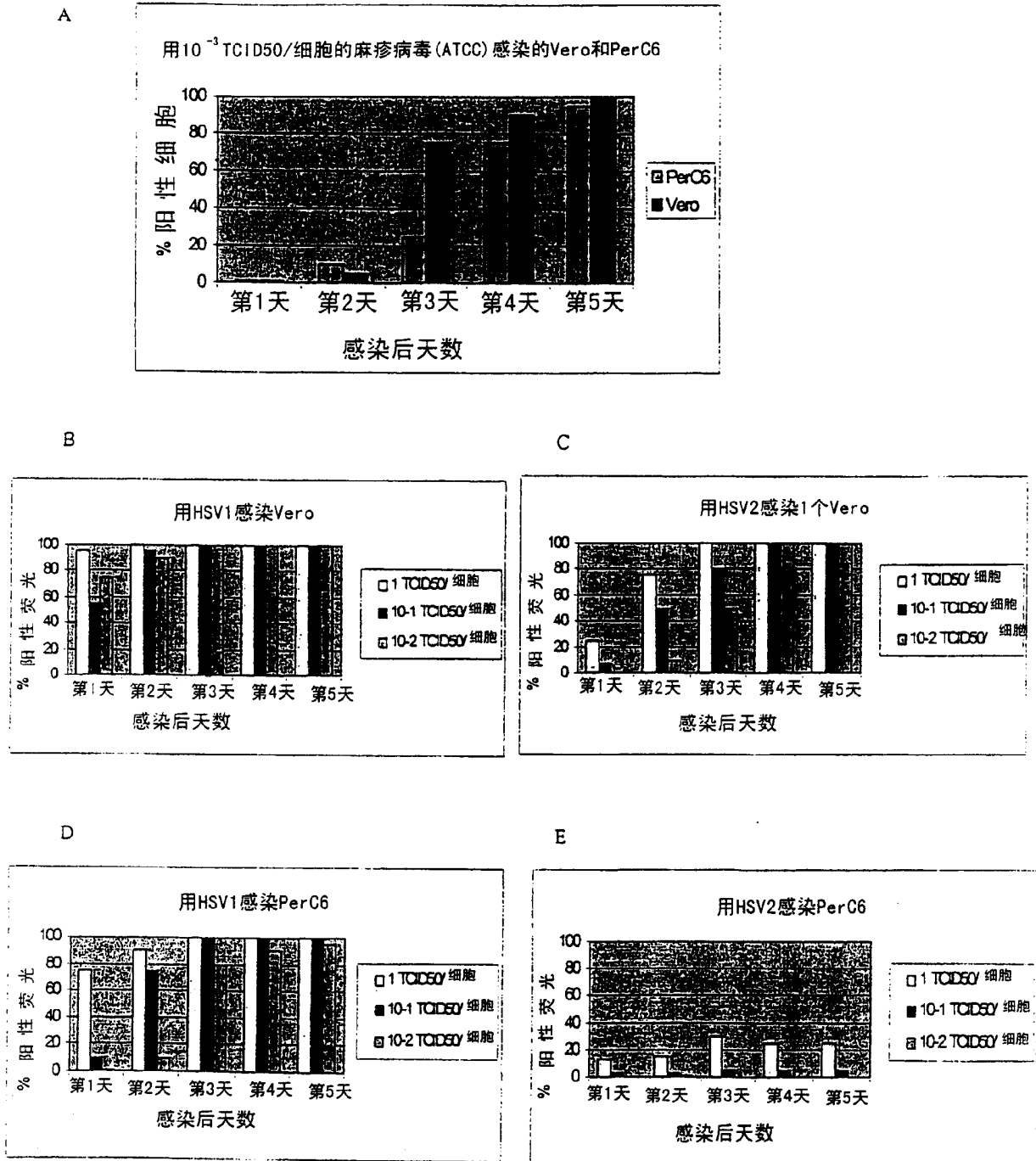


图31



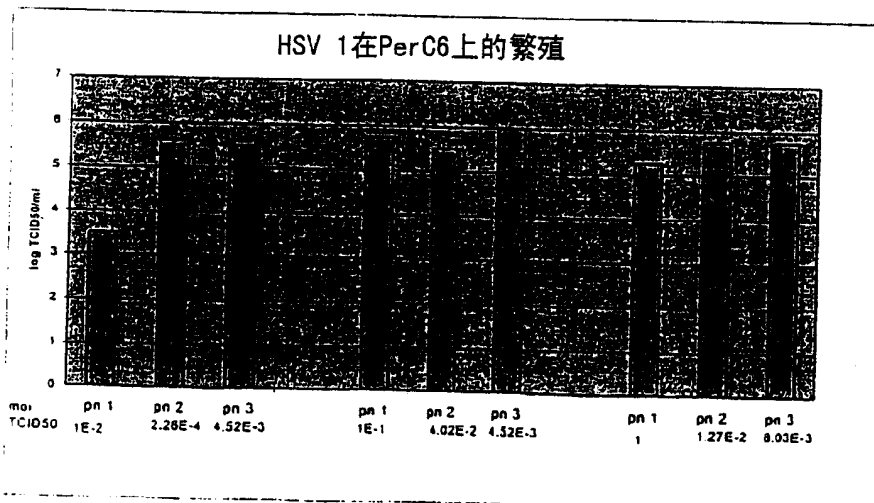
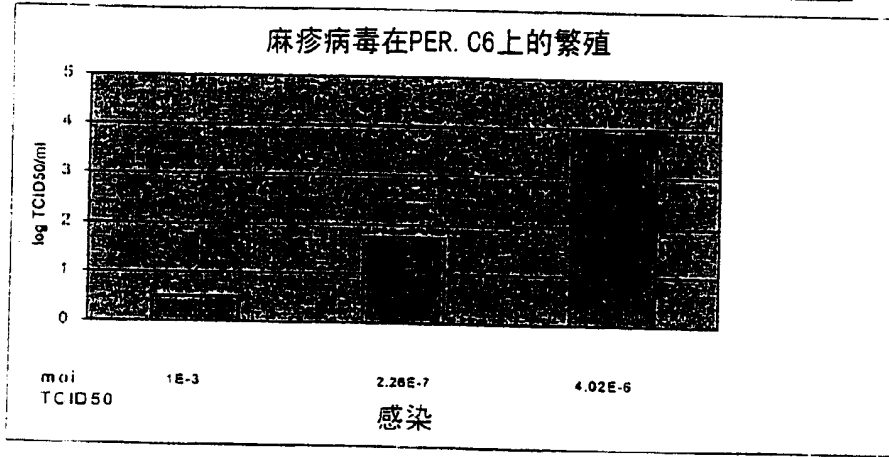
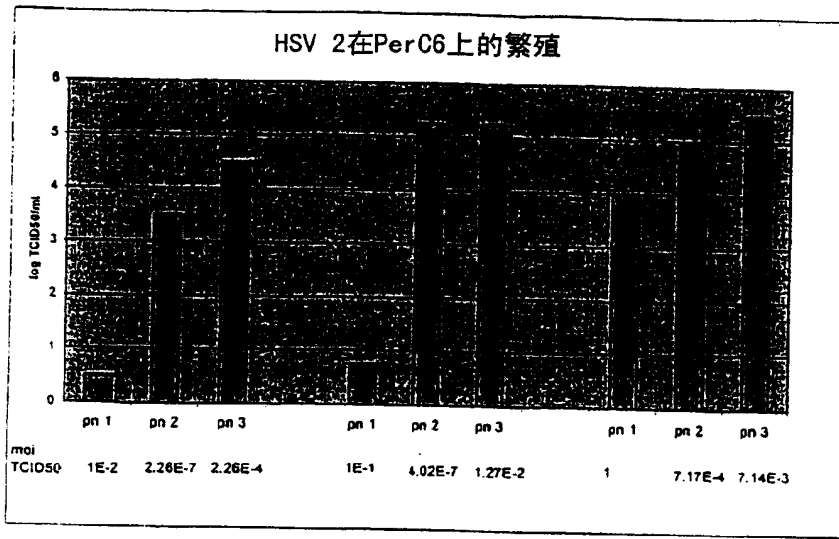


图32

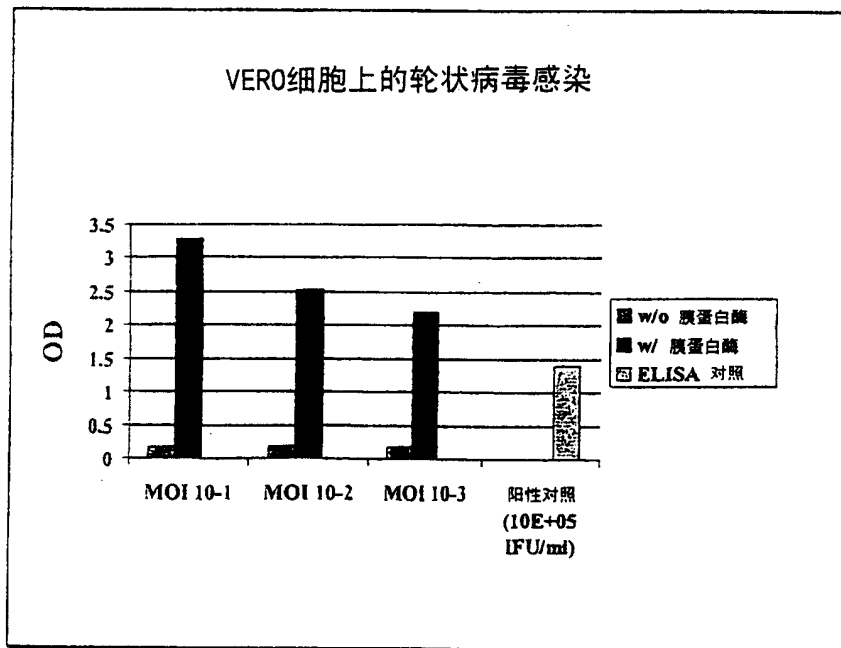
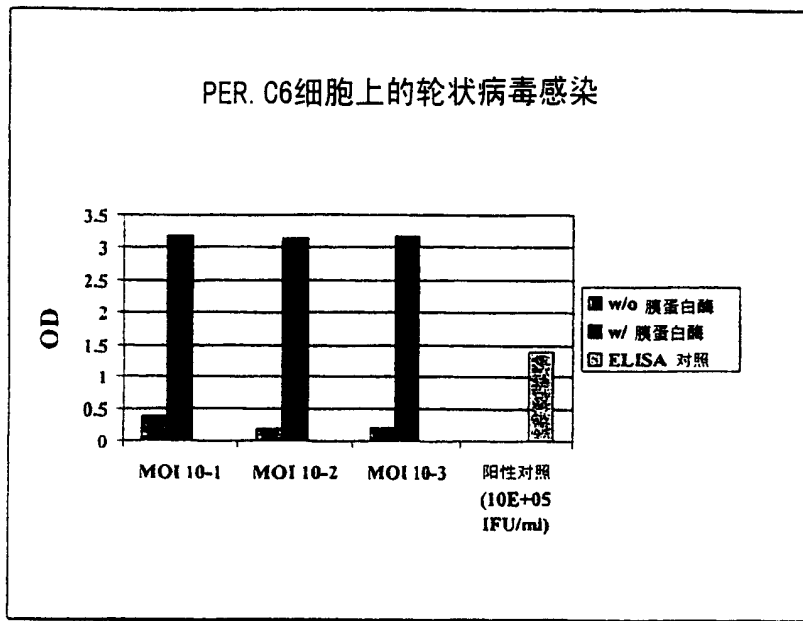


图 33