

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780036247.7

[51] Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/05 (2006.01)

A61K 39/08 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

A61K 39/13 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 101522209A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/12 (2006.01)

[22] 申请日 2007.9.28

[21] 申请号 200780036247.7

[30] 优先权

[32] 2006.9.29 [33] JP [31] 267439/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2007/069509 2007.9.28

[87] 国际公布 WO2008/044611 日 2008.4.17

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.27

[71] 申请人 财团法人日本小儿麻痹症研究所

地址 日本东京都

共同申请人 武田药品工业株式会社

[72] 发明人 安部忍 清水文七

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 曹立莉

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 1 页

[54] 发明名称

IPV - DPT 疫苗

[57] 摘要

本发明提供下述混合疫苗的制备方法，该方法包括制备高效价脊髓灰质炎病毒沙宾株的步骤，所述混合疫苗包括灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株、百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素以及破伤风类毒素。混合疫苗的制备方法包括下述步骤：在约 4g/L ~ 约 6g/L 微载体存在下，培养待接种本发明脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞，该方法作为含有灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株的混合疫苗的高效制备方法是很有用的。

1.混合疫苗的制备方法,所述混合疫苗含有:

- (A)灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株、
- (B)百日咳菌的保护性抗原、
- (C)白喉类毒素,以及
- (D)破伤风类毒素,

该方法包括下述步骤:

(a)在约 4g/L~约 6g/L 的微载体存在下,培养待接种脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞。

2. 权利要求 1 所述的方法,其还包括下述步骤:

- (b)使脊髓灰质炎病毒沙宾株感染所述 Vero 细胞的步骤,
- (c)使该脊髓灰质炎病毒增殖的步骤,
- (d)回收含有该脊髓灰质炎病毒的病毒液的步骤,以及
- (e)灭活该脊髓灰质炎病毒的步骤。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中,所述微载体的浓度为约 5g/L。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中,所述微载体为葡聚糖制微载体。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中,培养 Vero 细胞的步骤(步骤(a))以约 3L 以上的规模进行。

6. 权利要求 1 所述的方法,其中,培养 Vero 细胞的步骤(步骤(a))以约 30L 以上的规模进行。

7. 权利要求 2 所述的方法,还包括

(d-2)将所述病毒液进行纯化的步骤。

8. 权利要求 7 所述的方法,其中所述纯化步骤(步骤(d-2))包括下述步骤:

- (i)将经所述步骤(d)回收的病毒液通过超离心进行沉淀化、
- (ii)将该沉淀的重悬液进行超声波处理、
- (iii)经柱色谱纯化。

9. 权利要求 8 所述的方法,其中,所述(iii)经柱色谱纯化的步骤只进行 1 次。

10. 用权利要求 1 所述方法制备的疫苗。

IPV-DPT疫苗

技术领域

本发明涉及混合疫苗，尤其是含有灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株(セービン株ポリオウイルス)(sIPV)的混合疫苗以及该混合疫苗的制备方法。

发明背景

脊髓灰质炎是脊髓灰质炎病毒引发的传染病。对于人而言，脊髓灰质炎病毒是经口感染，并在肠道增殖，经血液进入中枢神经系统的。进入中枢神经系统的脊髓灰质炎病毒通过在大型运动神经细胞中增殖，引起运动神经细胞变性、坏死，导致四肢发生急性弛缓性麻痹。此外，脊髓灰质炎病毒侵入延髓的呼吸中枢时，有时因呼吸麻痹而致死。为了抑制引发这些危重症状的脊髓灰质炎的发病，脊髓灰质炎疫苗广为使用。

可使用2种脊髓灰质炎疫苗：口服活脊髓灰质炎疫苗和灭活的脊髓灰质炎疫苗。口服活脊髓灰质炎疫苗是使用脊髓灰质炎病毒的弱毒株(沙宾株)的疫苗。口服给药的脊髓灰质炎病毒弱毒株引发通常的感染。口服活脊髓灰质炎疫苗来源的脊髓灰质炎病毒在人肠道大量增殖，其结果，在肠道局部形成免疫。另外，口服活脊髓灰质炎疫苗来源的脊髓灰质炎病毒进入血液中，通过引发病毒血症促进血中抗体的产生。但是由于脊髓灰质炎病毒弱毒株在中枢神经系统的增殖能力非常弱，通常不引起麻痹。此外，于被接种者的体内，在接种后约4~6周，口服活脊髓灰质炎疫苗来源的脊髓灰质炎病毒增殖，经排泄物排出。该排出的病毒感染被接种者周围对脊髓灰质炎免疫弱或无免疫的人，则与被接种者的情况相同，显示出赋予免疫或增强免疫的效果。

但口服活脊髓灰质炎疫苗来源的脊髓灰质炎病毒弱毒株在被接种者体内反复增殖期间，或在被所述排出的病毒感染的人的体内反复增殖期间，有时发生向强毒性转化的变异。在极少数情况下，该突变株导致疫苗相关的麻痹。

灭活的脊髓灰质炎疫苗是将脊髓灰质炎病毒经福尔马林灭活，失去感染力的疫苗。由于灭活的脊髓灰质炎疫苗不在被接种者体内增殖、不感染被接

种者周围的人，不会导致疫苗相关的麻痹。制备灭活的脊髓灰质炎疫苗时，以往使用强毒株，近年来逐渐开发了弱毒株(沙宾株)(Biologicals 34 (2006) 151-154, Dev Biol. Basel. Karger, 2001, vol. 105, pp 163-169, 临床和病毒 Vol. 30 No. 5(2002.12) 336-343)。认为存在下述缺点：弱毒株(沙宾株)的增殖性稍弱于强毒株的增殖性。

含有百日咳菌的保护性抗原(防御抗原)、白喉类毒素(ジフテリアトキソイド)、以及破伤风类毒素(破傷風トキソイド)的疫苗作为百日咳白喉破伤风混合疫苗而广泛使用。

已知由无细胞性百日咳疫苗、白喉类毒素、破伤风类毒素以及灭活的脊髓灰质炎病毒构成的多价疫苗(特表 2000-504032 号公报)。

Vero 细胞是绿猴肾脏来源的传代细胞，对各种病毒具有宽范围的敏感性，广泛用于病毒培养。文献公开了培养肠道病毒 71 疫苗的制备方法，该方法包括在微载体(マイクロキャリアー)上培养 Vero 细胞，用所培养的 Vero 细胞使培养肠道病毒 71 增殖(Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development: Suh-Chin Wu, etc., Vaccine, 22, 3858-3864, 2004)。文献还公开了使用微载体的通常的细胞培养条件(Microcarrier cell culture principles & methods: Pharmacia LKB, Biotechnology, 1988)。

发明内容

在上述情况下，期望一种包括制备高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株的步骤，制备含有灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株(sIPV)和百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素(DPT)的混合疫苗的方法。

为了解决上述问题，本发明者们经过潜心研究，结果发现通过在约 4g/L~约 6g/L 的微载体存在下，培养待接种脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞，可以制备高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株。基于这些发现，进行了反复研究，结果完成了本发明。

即，本发明提供：

(1)一种混合疫苗的制备方法，所述混合疫苗含有

(A)灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株、

(B)百日咳菌的保护性抗原、

(C)白喉类毒素、以及

(D)破伤风类毒素，

该方法包括下述步骤：

(a)在约 4g/L~约 6g/L 的微载体存在下，培养待接种脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞。

(2)上述(1)所述的方法，其还包括下述步骤：

(b)使脊髓灰质炎病毒沙宾株感染所述 Vero 细胞的步骤，

(c)使该脊髓灰质炎病毒增殖的步骤，

(d)回收含有该脊髓灰质炎病毒的病毒液的步骤，以及

(e)灭活该脊髓灰质炎病毒的步骤。

(3)上述(1)所述的方法，其中，所述微载体的浓度为约 5g/L。

(4)上述(1)所述的方法，其中，所述微载体为葡聚糖制微载体。

(5)上述(1)所述的方法，其中，使 Vero 细胞增殖的步骤(步骤(a))以约 3L 以上的规模进行。

(6)上述(1)所述的方法，其中，使 Vero 细胞增殖的步骤(步骤(a))以约 30L 以上的规模进行。

(7)上述(2)所述的方法还包括 (d-2) 将所述病毒液进行纯化的步骤。

(8)上述(7)所述的方法，其中，所述纯化步骤(步骤(d-2))包括下述步骤：

(i)将经所述步骤(d)回收的病毒液通过超离心进行沉淀(ペレット)化、

(ii)将该沉淀的重悬液进行超声波处理、

(iii)经柱色谱纯化。

(9)上述(8)所述的方法，其中，所述(iii)经柱色谱纯化的步骤只进行 1 次。

(10) 以上述(1)所述方法制备的疫苗。

(11)上述(1)所述的方法，其中，培养 Vero 细胞的步骤(步骤(a))以约 3L 以上的规模进行。

(12)上述(1)所述的方法，其中，培养 Vero 细胞的步骤(步骤(a))以约 30L 以上的规模进行。

通过在约 4g/L~约 6g/L 的微载体存在下，培养待接种脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞，可以得到高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株。通过使用高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株，可以高效地制备灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株。于是，包括下述步骤的混合疫苗的制备方法(本发明的制备方法)作为制

备含有灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株的混合疫苗的高效制备方法是很有用的,所述步骤为在约 4g/L~约 6g/L 的微载体存在下,培养待接种脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞。

附图说明

图 1 表示经微载体法培养 Vero 细胞时, Vero 细胞的增殖曲线图。3L 表示初始细胞数约为 2×10^5 细胞/mL(低浓度), 和 3g/L 的微载体。3H 表示初始细胞数约为 10×10^5 细胞/mL(高浓度), 和 3g/L 的微载体。5L 表示初始细胞数约为 2×10^5 细胞/mL(低浓度), 和 5g/L 的微载体。5H 表示初始细胞数约为 10×10^5 细胞/mL(高浓度), 和 5g/L 的微载体。

图 2 为表示用在各种条件下培养的 Vero 细胞得到的 I 型脊髓灰质炎病毒的感染滴度(感染価)(病毒效价)的图。3L 表示初始细胞数约为 2×10^5 细胞/mL(低浓度), 用 3g/L 的微载体培养的 Vero 细胞得到的 I 型脊髓灰质炎病毒。5L 表示初始细胞数约 2×10^5 细胞/mL(低浓度), 用 5g/L 的微载体培养的 Vero 细胞得到的 I 型脊髓灰质炎病毒。5H 表示初始细胞数约 10×10^5 细胞/mL(高浓度), 用 5g/L 的微载体培养的 Vero 细胞得到的 I 型脊髓灰质炎病毒。Ref. 表示用绿猴肾脏细胞增殖的 I 型脊髓灰质炎病毒。

本发明提供下述混合疫苗的制备方法, 该方法包括可制备高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株的步骤, 所述混合疫苗包含灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株(sIPV)和百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素(DPT)。

以下, 对本发明进行详细说明。

1. 灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株

(1) 脊髓灰质炎病毒沙宾株

在本说明书中, 脊髓灰质炎病毒沙宾株是指来源于艾伯特 B. 沙宾博士(Dr. Albert B. Sabin)分离的脊髓灰质炎病毒的弱毒株的脊髓灰质炎病毒株(参照 Sabin AB, Boulger LR. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. J. Biol. Standard 1973, 1, 115-118 等)。

脊髓灰质炎病毒沙宾株中包括脊髓灰质炎病毒沙宾 I 型株、脊髓灰质炎病毒沙宾 II 型株以及脊髓灰质炎病毒沙宾 III 型株。作为脊髓灰质炎病毒沙宾 I 型株, 可以列举, LSc、2ab 株等。作为脊髓灰质炎病毒沙宾 II 型株, 可以列举, P712、Ch、2ab 株等。作为脊髓灰质炎病毒沙宾 III 型株, 可以

列举, Leon, 12a₁b 株等。

(2) 灭活

在本说明书中, 病毒的“灭活”是指使病毒失去感染能力。作为灭活的方法, 可以列举, 使用物理方法(例如, 使用 X 射线照射、热、超声波等的方法)、化学方法(例如, 使用福尔马林、汞、乙醇、氯等的方法)等, 但并不限于这些方法。

脊髓灰质炎病毒的灭活可用公知的方法进行(例如, 参照 Biologicals 34 (2006) 151-154 等)。具体来讲, 例如, 可通过将脊髓灰质炎病毒用福尔马林处理进行灭活。

(3) 灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株的免疫原性

灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株中通常混合存在被称为 D 抗原以及 C 抗原的 2 种病毒抗原。D 抗原为完全病毒粒子。D 抗原对应的抗体具有中和活病毒的感染性的能力, 作为保护性抗体(防御抗体)发挥作用。C 抗原被称为缺损粒子, 是完整病毒粒子缺失核心核酸 RNA 和部分病毒蛋白的粒子, 是中空状粒子。C 抗原对应的抗体无中和活病毒的感染性的能力, 即使有该能力也是非常低的。因此, 将灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株作为疫苗使用时, D 抗原是必要的。

脊髓灰质炎病毒包括 I 型、II 型、III 型 3 种类型。对感染脊髓灰质炎病毒的免疫, 对于 I 型、II 型、III 型 3 种病毒型是特异的, 即使存在型间交差免疫也很微弱。I 型、II 型以及 III 型灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株的 D 抗原具有可产生下述中和抗体的免疫原性, 所述中和抗体为分别对应于脊髓灰质炎病毒的 I 型、II 型以及 III 型野生株(强毒株)的中和抗体。灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株的 D 抗原对 I 型、II 型以及 III 型分别具有不同的免疫原性, 为了产生足够的抗体用于中和脊髓灰质炎病毒的 I 型、II 型以及 III 型的野生株(强毒株), 所必需的 D 抗原量因病毒型而异。

如上所述, 脊髓灰质炎病毒包括 I 型、II 型、III 型 3 种类型, 无论哪种类型都引发相同的脊髓灰质炎。因此, 将灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株作为疫苗(灭活的脊髓灰质炎疫苗)使用时, 必需具有可产生足够中和 I 型、II 型以及 III 型各野生株(强毒株)的脊髓灰质炎病毒抗体的免疫原性, 此外, 优选与以往使用的强毒株来源的灭活脊髓灰质炎疫苗的免疫原性接近的免疫原性。为了表现出该免疫原性, 以 D 抗原量计, 优选疫苗含有 I 型、II 型以及

III 型灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株的比例为 2~4: 80~120: 80~120, 特别优选约 3: 约 100: 约 100 的比例。由于按照上述特定比例含有 I 型、II 型以及 III 型, 本发明使用的灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株表现出与强毒株来源的灭活脊髓灰质炎疫苗(例如, Salk(ソーク)疫苗)相同的免疫原性。

2. 灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株的制备

本发明所用灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株可通过下述方法制备。

首先, 在约 4g/L~约 6g/L 微载体存在下, 培养 Vero 细胞, 得到脊髓灰质炎病毒培养用细胞。在所得脊髓灰质炎病毒培养用细胞中接种种病毒(脊髓灰质炎病毒沙宾株), 通过培养病毒得到增殖的脊髓灰质炎病毒沙宾株。将所得脊髓灰质炎病毒沙宾株灭活, 得到灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株。通过使用的种病毒(沙宾 I 型株、沙宾 II 型株或沙宾 III 型株), 可以得到相应的灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株。在病毒灭活前或后, 可将病毒浓缩以及 / 或纯化。

如上所述, 在灭活的脊髓灰质炎疫苗中, 必需具有可产生足够中和 I 型、II 型以及 III 型各野生株(强毒株)的抗体的免疫原性。但是, 灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株的 D 抗原对 I 型、II 型以及 III 型分别具有不同的免疫原性。于是, 关于具有可产生足够中和 I 型、II 型以及 III 型各野生株(强毒株)抗体的免疫原性的灭活脊髓灰质炎疫苗, 可通过调节含有的 I 型、II 型以及 III 型灭活脊髓灰质炎病毒的量而得到。

(Vero 细胞)

Vero 细胞是绿猴(*Cercopithecus aethiops*)肾脏来源的传代细胞, 在 ATCC(American Type Culture Collection)进行了登记。Vero 细胞表现出成纤维细胞样的细胞形态, 对各种病毒具有广范围敏感性, 由于易于传代培养和维持, 在病毒培养中被广泛使用。作为已知的可由 ATCC 获得的 Vero 细胞, 可以列举, ATCC 号 CCL-81、CRL-1587 等。

(微载体)

在本说明书中, “微载体”是指使细胞附着在表面, 可在液体培养基中以混悬状态进行细胞培养的载体。只要是使细胞附着在表面, 可在液体培养基中以混悬状态进行细胞培养的载体即可, 对材质、形状、大小等没有特别限制。

作为微载体的材质, 可以列举, 葡聚糖(デキストラン)、明胶、胶原、

聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯酰胺、玻璃、纤维素等。作为微载体的材质，优选葡聚糖。

作为微载体的形状，可以列举，球状(珠状)、圆盘状等。微载体的形状优选为球状。

球状微载体的大小例如为约 0.01~1mm，优选为约 0.05~0.5mm，更优选为约 0.1~0.3mm。

微载体可以是多孔性的。

作为本发明使用的球状微载体，可以列举，Cytodex 1(商品名)、Cytodex 3(商品名)、Cytopore(商品名)(以上为 GE Health Biosciences 公司制)等。作为圆盘状微载体，可以列举，Cytoline 1(商品名)、Cytoline 2(商品名)(以上为 GE Health Biosciences 公司制)等。作为多孔性微载体，可以列举，Cytopore(商品名)、Cytoline 1(商品名)、Cytoline 2(商品名)(以上为 GE Health Biosciences 公司制)等。作为本发明使用的微载体，特别优选球状葡聚糖制微载体。作为球状葡聚糖制微载体，优选 Cytodex 1(商品名)、Cytodex 3(商品名)以及 Cytopore(商品名)，更优选 Cytodex 1(商品名)以及 Cytodex 3(商品名)，特别优选 Cytodex 1(商品名)。

(Vero 细胞的培养)

在本发明中，通过在约 4g/L~约 6g/L 的微载体存在下，培养 Vero 细胞，进行增殖。微载体浓度优选为约 4.5g/L~约 5.5 g / L，更优选为约 5g/L。

关于上述使 Vero 细胞增殖的步骤，作为液体量，优选以 3L 以上的规模进行，更优选 30L 以上，特别优选 150L 以上。此外，使 Vero 细胞增殖的步骤通常以 1000L 以下的规模进行。

在微载体存在下，培养 Vero 细胞时，作为培养基，可以使用含有约 5~20vol%的小牛血清或胎牛血清的 ME 培养基[Science, 122 卷, 501(1952)]、DME 培养基[Virology, 8 卷, 396(1959)]、RPMI 1640 培养基[The Journal of the American Medical Association 199 卷, 519(1967)]、199 培养基[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73 卷, 1(1950)]等。

作为培养基，优选 DME 培养基，更优选含有小牛血清的 DME 培养基，特别优选含有约 5vol%小牛血清的 DME 培养基。在细胞培养期间，根据需要交换培养基。优选 pH 为约 6~8，更优选 pH 为约 6.5~7.5，特别优选 pH 为约 7。培养通常在约 35℃~40℃进行约 5~9 日，根据需要进行通气、搅拌。细

胞培养时的溶氧浓度(DO)优选为约 60~90%，更优选为约 70~80%，特别优选为约 75%。

开始在微载体存在下的培养时，培养基中 Vero 细胞的细胞数(初始细胞数)可根据培养基、微载体的种类、培养规模等进行适当设定。优选初始细胞数为 2×10^4 个/mL~ 10×10^5 个/mL，特别优选 2×10^5 个/mL~ 10×10^5 个/mL。

(脊髓灰质炎病毒的培养)

关于脊髓灰质炎病毒的培养，可通过下述方法进行：在 Vero 细胞的培养细胞中接种脊髓灰质炎病毒沙宾株(种病毒)，使之感染，在细胞内培养脊髓灰质炎病毒。感染细胞的培养可按照与上述 Vero 细胞培养相同的方法进行。作为培养脊髓灰质炎病毒使用的培养基，优选 199 培养基，更优选添加了碳酸氢钠的 199 培养基，特别优选添加了 0.3w/v%碳酸钠的 199 培养基。

病毒培养时的培养温度优选为约 30℃~38℃，更优选为约 32℃~36℃，特别优选为约 33℃~35℃。病毒培养时间优选为约 1~5 日，更优选为约 2~4 日，特别优选为约 3 日。而且，病毒培养可以以脊髓灰质炎病毒所致细胞变性效果(脊髓灰质炎病毒感染细胞引起细胞的圆形化，从微载体脱离)为指标，使之结束。

作为种病毒，可以使用预先用绿猴原代肾培养细胞培养的脊髓灰质炎病毒沙宾株。

(含有脊髓灰质炎病毒的病毒液的回收)

病毒培养结束后，除去微载体，回收含有脊髓灰质炎病毒的病毒液(有时称为脊髓灰质炎病毒液。)。

关于微载体的除去，例如可用特氟龙筛(例如、孔径 120μm)等进行。由于筛上残留的微载体中残存(附着)有脊髓灰质炎病毒，可用病毒培养液等清洗，回收脊髓灰质炎病毒。

可用滤膜(例如 0.2μm 的滤膜)等过滤所得脊髓灰质炎病毒液，除去细胞屑。

可在灭活前或后，浓缩以及 / 或纯化脊髓灰质炎病毒液。

作为浓缩方法，可以列举，超滤法、超离心法、透析法等。作为浓缩方法，优选超滤法、超离心法，更优选超滤法和超离心法，进一步优选在进行超滤法后，进行超离心法。

作为超滤法中使用的超滤膜，可使用病毒浓缩时通常使用的超滤膜。作

为超滤膜的分级分子量(分画分子量), 优选 100kDa 左右。作为超滤膜的材料, 优选聚醚砜等。

关于通过超离心法浓缩脊髓灰质炎病毒, 例如, 可通过将脊髓灰质炎病毒液在 4℃, 以 100,000g 超离心 4 小时形成沉淀(pellet)来进行。所述沉淀可重悬于磷酸缓冲液等中。通过将沉淀的重悬液进行超声波处理, 可粉碎凝集块。超声波处理可使用市售装置例如 INSONATOR MODEL 200M(クボタ)等进行。关于超声波处理的条件, 只要为可使凝集块散开的程度即可, 可根据用于超声波处理的容器、超声波输出功率、重悬液的浓度等进行适当设定。作为超声波处理的条件, 可以列举, 在 200W 进行 3~10 分钟的超声波处理等。即使进行该超声波处理, 脊髓灰质炎病毒沙宾株也不会失去免疫原性, 可作为脊髓灰质炎病毒疫苗使用。

作为纯化方法, 可以列举, 利用纯化对象物的大小、密度、沉降系数等物理性质的方法、利用化学或物理化学反应(吸附和解吸等)的方法等, 没有特别限制。作为纯化方法, 可以更具体地列举, 密度梯度离心法、过滤(包括超滤)、离子交换柱色谱法、亲和色谱法、凝胶过滤色谱法、盐析法等。作为纯化方法, 优选柱色谱法, 更优选离子交换柱色谱法, 特别优选 DEAE-离子交换柱色谱法。关于进行柱色谱的纯化次数, 只要进行至达到必要的纯度即可, 没有特别限制, 从生产效率等角度考虑, 优选以最小限度的步骤进行。

作为浓缩以及纯化, 优选通过将脊髓灰质炎病毒液经超离心实现的沉淀化、对该沉淀的重悬液的超声波处理、以及柱色谱纯化而进行。从生产效率等角度考虑, 经柱色谱的纯化优选只进行 1 次。通过将脊髓灰质炎病毒液通过超离心实现的沉淀化、对该沉淀的重悬液进行超声波处理以及只进行 1 次的经柱色谱的纯化, 可以高效且充分地浓缩以及纯化脊髓灰质炎病毒液。

(脊髓灰质炎病毒的灭活)

脊髓灰质炎病毒的灭活可通过通常使用的方法进行。更具体地说, 例如, 向脊髓灰质炎病毒液中添加灭活剂, 通过使脊髓灰质炎病毒与灭活剂反应, 可以灭活脊髓灰质炎病毒。作为灭活剂, 优选福尔马林。关于灭活条件, 只要脊髓灰质炎病毒被灭活即可, 没有特别限制。为了避免残留有灭活不充分的脊髓灰质炎病毒, 灭活处理的时间通常为已确认脊髓灰质炎病毒灭活的时间的约 2~4 倍, 优选为约 2.5~3.5 倍, 更优选为约 3 倍。

例如,使用福尔马林作为灭活剂时,其添加量优选为约 0.001w/v%~0.1w/v%,更优选为约 0.005w/v%~0.05w/v%,特别优选为约 0.01w/v%。灭活温度特别优选为约 37℃。灭活时间因灭活剂的种类、灭活剂的浓度、灭活温度等而异。例如,使用约 0.01 w/v%的福尔马林作为灭活剂,当灭活温度为约 37℃时,灭活时间优选为约 8 日~16 日,更优选为约 10 日~14 日,特别优选为约 12 日。使用约 0.01 w/v%的福尔马林,灭活温度为约 37℃时,通常至第 4 日脊髓灰质炎病毒沙宾株被灭活。

3. 百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素(DPT)

本发明使用的百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素没有特别限制。

关于百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素,作为百日咳白喉破伤风混合疫苗,可购得市售品(例如、武田药品工业株式会社制、阪大微生物病研究会制、化学及血清疗法研究所制等)。此外,百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素可通过公知的方法获得。具体来讲,百日咳菌的保护性抗原例如可通过下述操作得到:通过将百日咳菌 I 相菌(东滨株)的培养液用硫酸铵分级分离法(分画法)/蔗糖密度梯度离心分级分离法等物理化学方法而萃取、分离、纯化感染保护性抗原级分后,用福尔马林减弱残存的毒性。白喉类毒可通过下述例如操作得到:将白喉菌(Park-Williams No.8 株)产生的毒素用柱色谱法等物理化学方法纯化浓缩后,用福尔马林进行无毒化。破伤风类毒素可通过下述例如操作得到:将破伤风菌(Harvard 株)产生的毒素用柱色谱法等物理化学方法纯化浓缩后,用福尔马林进行无毒化。

百日咳菌的保护性抗原包括百日咳毒素(PT 抗原)、纤维状红细胞凝集素(FHA 抗原)、外膜蛋白(69KD 抗原)、菌毛(線毛)(也称为 FB 抗原、凝集原(FGG))。作为百日咳菌的保护性抗原,不必须含有全部的上述各抗原,可含有这些抗原中的 1 种以上、优选 2 种以上、更优选 3 种以上。针对所述保护性抗原的抗体保护宿主不受百日咳的感染。

4. 混合疫苗

本发明的混合疫苗含有灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株、百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素。百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素,如上所述,作为百日咳白喉破伤风混合疫苗,可

购得市售品。因此，本发明的混合疫苗可通过混合灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株和百日咳白喉破伤风混合疫苗而制得。

灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株可通过混合灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾 I 型株、灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾 II 型株、以及灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾 III 型株而制得。如上所述，以 D 抗原量计，优选灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株含有 I 型、II 型以及 III 型灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株的比例为 2~4: 80~120: 80~120，特别优选为约 3:约 100:约 100。

在本发明的混合疫苗中，百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素的含量只要是可预防百日咳、白喉以及破伤风的有效量即可。更具体地讲，所述百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素的含量可以与上述可作为市售品购得的百日咳白喉破伤风混合疫苗中的含量相同。而且，灭活脊髓灰质炎病毒沙宾株以外的其它成分对百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素或 / 以及破伤风类毒素的免疫原性有影响时，通过适当调节百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素的含量，可以制备有效预防各疾患的混合疫苗。

本发明的混合疫苗可按照常规方法制备、使用。具体来讲，可按照以下所述方法制备、使用。

本发明的混合疫苗可按照常规方法进行制剂化，制成注射剂。注射剂可按照本身已知的方法进行制备，例如，将上述物质溶解于注射剂中通常使用的无菌的水性或油性溶液中，通过混悬或乳化进行制备。作为注射用水性溶液，例如，可以使用生理盐水、含有葡萄糖或其它佐剂的等渗液等。通常将制备的注射液充填到适当的安瓿、注射器等中。

根据需要，本发明的混合疫苗可含有防腐剂、抗氧化剂、螯合剂等制剂添加剂。作为防腐剂，可以列举，硫柳汞、2-苯氧基乙醇等。作为螯合剂，可以列举，乙二胺四乙酸、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(グリコールエーテルジアミン四酢酸)等。

本发明的混合疫苗还可进一步含有佐剂。作为佐剂，可以列举，氢氧化铝、磷酸铝、氯化铝等。

本发明的混合疫苗还可含有除灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株、百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素、以及破伤风类毒素以外的免疫原性成分。作为这些免疫原性成分，可以列举，除脊髓灰质炎病毒、百日咳菌、白喉菌以及

破伤风菌以外的病毒或菌的免疫原性成分。作为免疫原性成分，可以列举，类毒素、弱毒化病毒、灭活的病毒、蛋白质、肽、多糖、脂多糖、脂肽、或这些的组合等。作为除脊髓灰质炎病毒、百日咳菌、白喉菌以及破伤风菌以外的病毒或菌，可以列举，流行性感病毒、麻疹病毒、耳下腺炎病毒、风疹病毒、疱疹病毒、水痘病毒、狂犬病病毒、人免疫不全病毒、肝炎病毒、肺炎双球菌、脑膜炎菌、伤寒菌、流行性感 b 菌等。

本发明的混合疫苗可经例如皮下注射或肌肉注射非经口的施用，优选经皮下注射。

可根据给药对象的年龄、体重等各种条件，对本发明混合疫苗 1 次的给药量进行适当选择。具体来讲，例如，可含有 4 国际单位以上的百日咳菌的保护性抗原、约 15Lf 的白喉类毒素、约 2.5Lf 的破伤风类毒素、约 2~4 单位(优选为约 3 单位)的灭活的沙宾 I 型脊髓灰质炎病毒(作为 D 抗原)、约 80~120 单位(优选为约 100 单位)的灭活的沙宾 II 型脊髓灰质炎病毒(作为 D 抗原)、约 80~120 单位(优选为约 100 单位)的灭活的沙宾 III 型脊髓灰质炎病毒(作为 D 抗原)。

关于本发明混合疫苗的给药次数，例如，作为初次免疫，以 3~8 周为间隔，可给药 2~3 次。作为初次免疫，优选在给药本发明混合疫苗 2 次的情况下，间隔 3~8 周再给药 1 次百日咳白喉破伤风混合疫苗(DPT 疫苗)。作为追加免疫，在初次免疫后，间隔 6 个月以上(例如，在初次免疫结束后 12 个月至 18 个月期间)，可再给药 1 次。

实施例

下面，通过实施例详细地说明本发明，但本发明不受这些实施例的限制。

参考例 1 (脊髓灰质炎疫苗病毒制造用保存细胞库的建立)

由从 ATCC 获得的 Vero 细胞，按如下方法制作了疫苗病毒制造用的保存细胞库。

(i)原始细胞库(MCB: Master Cell Bank)的调制

融化从 ATCC 获得的装在安瓿中的冻存细胞(CCL 81 Vero, F-6573、传代数:124 代)，将其移入空的 4 盎司瓶(容量 154mL、细胞增殖面积为 54cm² 的培养瓶)。向装有细胞的 4 盎司瓶中滴加细胞增殖液(添加了 5vol%小牛血清、0.075%碳酸氢钠、20μg/mL 琥乙红霉素、100μg/mL 卡那霉素(最终浓度)

的 DME(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、SIGMA(シグマ)、商品号 D5523), 经约 5 分钟加入了 15mL。将装有细胞和细胞增殖液的瓶子在 36℃ 静置培养(1 只 4 盎司瓶、125 代)。第二天早上用新鲜的 15mL 细胞增殖液更换, 再于 36℃ 进行静置培养。静置培养开始后的第 6 天进行了传代(从 1 只 4 盎司瓶到 4 只 4 盎司瓶、126 代)。传代方法按以下的方法进行。

传代方法

- (1) 弃掉培养液。
- (2) 在 4 盎司瓶中加入传代用 0.25%胰岛素液 5mL。
- (3) 浸润细胞表面约 1 分钟, 然后弃掉传代用 0.25%胰岛素液。
- (4) 将 4 盎司瓶在 36℃ 静置, 等待细胞从玻璃表面剥离。
- (5) 细胞出现剥离后, 加入 5mL 细胞增殖液, 用吸管吹打将全部细胞剥离。
- (6) 进一步用吸管吹打使细胞均匀悬浮, 然后将细胞增殖液移入离心管。
- (7) 600rpm、离心 5 分钟, 弃上清, 将作为沉淀的细胞用吸管吹打从而均匀重悬在约 8mL 的新鲜的细胞增殖液中。
- (8) 在新的 4 只 4 盎司瓶(每只装入新鲜的细胞增殖液 13mL)的每 1 只中加入 2mL 的细胞混悬液。
- (9) 将 4 只 4 盎司瓶在 36℃ 静置, 进行细胞培养。

传代用 0.25%胰岛素液的组成如下。

5%胰岛素*¹ 50 mL/L

5%聚乙烯基吡咯烷酮(90K) 20 mL/L

0.247 mol 依地酸钠*² 56 mL/L

EK*³ 2 mL/L

胰岛素稀释液*⁴ 872 mL/L

*1: 使用猪胰脏来源的 1:300 活性的胰岛素。

*2: 0.247 mol 依地酸钠的组成如下。

依地酸钠-2Na· 2H₂O 91.95 g/L

NaOH 9.88 g/L

*3: EK 的组成如下。

乳糖酸红霉素 10,000μg/mL

硫酸卡那霉素 50,000 μ g/mL

*4: 胰岛素稀释液的组成如下。

NaCl 8,000 mg/L

KCl 400 mg/L

Na₂HPO₄·12H₂O 150 mg/L

KH₂PO₄ 60 mg/L

以下,按相同的方法(因培养面积比在1次传代中为约3~4倍,所以培养瓶以及取液体量有所不同)每隔3~6日进行传代,制备了129代的细胞(每传代1次,传代数增加1)。在33只SR瓶(Small Roux瓶:容量727mL、细胞增殖面积156cm²的培养瓶)中,对培养的129代的细胞像传代时那样进行胰岛素处理,离心,将沉淀以约 1.5×10^7 个/mL重悬在冻存培养基(添加了10%DMSO(二甲亚砜)、10vol%小牛血清、0.075%碳酸氢钠、20 μ g/mL琥乙红霉素、100 μ g/mL卡那霉素(最终浓度)的DME(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、SIGMA、商品号D5523))中。向安瓿中分注上述细胞混悬液1mL,以缓慢地冷却速度(约1分降低1 $^{\circ}$ C)将温度降为-32 $^{\circ}$ C后,移入液氮中保存。将上述这样得到的129代的细胞作为原始细胞库(MCB)使用。

(ii)制造用保存细胞库(MWCB: Manufacture's Working Cell Bank)的调制

使用如上述(i)调制并保存的原始细胞库(MCB),按与上述(i)的原始细胞库(MCB)的调制方法基本完全相同的方法,从融化安瓿中的细胞开始,通过细胞的传代进行增殖直至134代(因初始细胞数多,故取液体量、培养瓶种类和数量有不同)。前述的134代的细胞也像原始细胞库(MCB)那样在液氮中保存。将像上述那样得到的134代的细胞作为制造用保存细胞库(MWCB)使用。

实施例1(脊髓灰质炎疫苗病毒制造用细胞的制备)

(i)静置培养步骤

将上述参考例1中制备并保存的制造用保存细胞库(MWCB)的1个安瓿(134代的细胞),用与制备上述参考例1的原始细胞库(MCB)及制造用保存细胞库(MWCB)时相同的方法进行解冻,将细胞用LR瓶(Large Roux瓶,容量约1540mL、细胞增殖面积约274cm²的培养瓶)($\times 3$ 只)静置培养7天(135代)。静置培养开始后的第7天进行传代,将培养规模扩大至18只LR瓶(136),并进行静置培养。静置培养及其传代按与上述参考例1的原始细胞库

(MCB)的调制及制造用保存细胞库(MWCB)的制备相同的方法进行。

接下来,用40室细胞工厂(40段セルファクトリー)(Nunc(ヌンク)、商品号139446)的静置培养7天(137代)。在静置培养开始后的第7天进行传代,再用40段细胞工厂4台静置培养7天(138代)。

(ii)微载体培养步骤

接下来,将上述(i)的静置培养步骤中得到的138代的细胞像上述(i)的传代时那样进行胰岛素处理,离心,将作为沉淀的细胞用吸管吹打均匀悬浮在1,000mL的微载体培养用细胞增殖液(添加了5vol%小牛血清(Thermo Trace公司制)、0.11%碳酸氢钠、0.1%果糖、20 μ g/mL琥乙红霉素、100 μ g/mL卡那霉素(最终浓度)的DME(Dulbecco's Modified Eagle's Medium、SIGMA、商品号D5523))中。将细胞混悬液与预先用PBS(磷酸缓冲盐水)膨润的、用微载体培养用细胞增殖液平衡化的微载体(Cytodex 1(商品名)、GE Healthcare Biosciences公司)相混合(所使用的Cytodex 1(商品名)膨润前的重量为5g/L),用3台50L容量培养器于37 $^{\circ}$ C、pH7.15在搅拌下进行培养。从培养的第2天开始,持续性地每1天将细胞增殖液的一半量更换为新鲜的细胞增殖液。将培养7天的细胞作为脊髓灰质炎疫苗病毒制造用细胞(139代)使用。

实施例2(灭活的脊髓灰质炎疫苗I型的制备)

(i)病毒培养步骤

对于实施例1得到的脊髓灰质炎疫苗病毒制造用细胞(139代),在即将接种病毒之前停止搅拌,使细胞沉淀,用添加了0.075%碳酸氢钠、20 μ g/mL琥乙红霉素、100 μ g/mL卡那霉素(最终浓度)的EBSS(Earl's Balanced Salt Solution)清洗1次。除去与微载体一起收集的5mL细胞培养液的上清后,添加0.25%胰岛素液使其重新为5mL,将细胞从小珠上剥下并使之悬浮,测定细胞数,推测50L容量培养器中的总细胞数。接种弱毒沙宾株(Sabin株)的I型(LSc, 2ab株)的种病毒,浓度是相对每个细胞为约 10^{-3} CCID₅₀。种病毒接种后,立即向培养器中注入病毒培养液(添加0.3%碳酸氢钠、20 μ g/mL琥乙红霉素、100 μ g/mL卡那霉素(最终浓度)的M199(Medium 199))50L。而且,使用的种病毒是预先用美洲绿猴原代肾培养细胞在约33.3 $^{\circ}$ C进行培养后、分装成小份在-70 $^{\circ}$ C下冻存的种病毒。

病毒培养在34 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C下进行3天。以脊髓灰质炎病毒引起的细胞变性效

果(脊髓灰质炎病毒感染细胞发生细胞的圆形化,其后从微载体脱离)为指标,在 95~100%的细胞从微载体脱离时结束病毒培养。病毒培养结束后,通过特氟龙筛(孔径 120 μ m)除去微载体,回收了病毒混悬液。对于残留在筛网上的微载体,每 1 台 50L 容量培养器用约 3L 的病毒培养液清洗一次。将该清洗液加到回收的病毒混悬液中,以此作为“ I 型脊髓灰质炎病毒液”。

(ii)病毒浓缩·纯化步骤

将上述(i)得到的 I 型脊髓灰质炎病毒液约 150L 用 0.2 μ m 的滤膜(Pall, SLK7002NRP)过滤,除去细胞碎屑。将滤液用超滤膜(沙多利斯、PESU(聚醚砜) 100kDa、0.1m²、3051466801E--SG)浓缩至 1.2L。对于浓缩的病毒液,在 6 $^{\circ}$ C、100,000g、超离心 4 小时使其沉淀化,并重悬于 PB(磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L)中(1 只离心管(约 100mL)的沉淀重悬于 5mL 的 PB)。将沉淀的重悬液于 4 $^{\circ}$ C 振荡一夜后,以 200W 进行 8 分钟超声波处理(Kubota、INSONATOR MODEL 200M),使凝集块分散。然后,15,000rpm、离心 30 分钟后取上清。将所得上清用 DEAE Sepharose CL-6B(商品名、GE Healthcare Biosciences 公司、GE 17-0710-05)纯化。使用 PB(磷酸盐缓冲液, 0.1mol/L)作为洗脱液。监测 280nm 处的吸光度,回收最初的峰,以此作为“纯化 I 型脊髓灰质炎病毒液”。对于采集的峰,通过计算 260/280nm 吸光度的值,确认了该值为 1.5 以上(脊髓灰质炎病毒完整粒子的 260/280nm 为 1.6~1.7)。

(iii)灭活步骤

将上述(ii)得到的纯化 I 型脊髓灰质炎病毒液用灭活前稀释液(添加 5% 氨基乙酸(最终浓度)的不含 Ca、Mg、酚红、碳酸氢钠的 M199)稀释约 10 倍,用 0.2 μ m 的滤膜(Pall、SLK7002NRP)过滤,除去病毒凝集块。制备滤液后,迅速开始灭活,以防止病毒再次凝集。灭活开始 1 小时前,将滤液与 1:200 稀释的福尔马林分别在 37 $^{\circ}$ C 加热备用。在对滤液进行充分搅拌的条件下,向其中加入福尔马林使得最终浓度为 1:4,000,加温至 37 $^{\circ}$ C 开始灭活。在福尔马林处理中,每天上午和下午搅拌液体共 2 次,均匀地进行病毒的灭活。推测存在灭活不充分的病毒附着在容器的栓或容器的某个特定位置的情况,在灭活开始第 2、4 天更换栓,在第 6 天更换容器。此外,考虑到灭活步骤中病毒发生凝集的可能性,在灭活的第 6 天用 0.2 μ m 的滤膜(Pall、SLK7002NRP)进行了过滤。福尔马林处理步骤在 12 天结束。在第 12 天,用亚硫酸钠(添加浓度为 0.0264mol/L)中和福尔马林处理病毒液中的游离福尔马林,然后,

添加依地酸钠(0.0009mol/L)作为稳定剂,以此作为“灭活脊髓灰质炎疫苗 I 型”的原液。

(iv)D 抗原量的测定通过间接 ELISA 法进行,该方法使用了对类型(type)和 D 抗原特异性高的抗体。间接 ELISA 法是这样进行的:首先,将作为第 1 抗体的与被检抗原同型的 D 抗原特异性单克隆抗体(小鼠来源)包被在微板上。然后,加载稀释后的被检抗原。然后,加载作为第 2 抗体的与被检抗原同型的兔多克隆抗体,再加载 HRPO 标记抗兔 IgG 抗体进行反应。反应后,使用邻苯二胺溶液进行显色,然后,测定 492nm 的吸光度。通过采用平行线定量法比较被检抗体的吸光度测定值与对照抗原的测定值,求出被检抗原的 D 抗原量。

实施例 3 (灭活脊髓灰质炎疫苗 II 型的制备)

按照与实施例 2 相同的方法制备了“灭活脊髓灰质炎疫苗 II 型”的原液,除了用弱毒 Sabin 株 II 型(P712, Ch, 2ab 株)替代弱毒 Sabin 株 I 型(LSc, 2ab 株)作为种病毒。

实施例 4 (灭活脊髓灰质炎疫苗 III 型的制备)

按照与实施例 2 相同的方法制备了“灭活脊髓灰质炎疫苗 III 型”的原液,除了使用弱毒 Sabin 株 III 型(Leon, 12a,b 株)替代弱毒 Sabin 株 I 型(LSc, 2ab 株)作为种病毒。

实施例 5 (百日咳菌保护性抗原的制备)

(1)百日咳菌的培养

将百日咳菌 I 相菌(东浜株)用 Cohen-Wheeler 培养基于 30~34℃在搅拌下培养 20~24 小时。将用 Cohen-Wheeler 培养基培养出的百日咳菌用ステイナーショルト培养基于 30~34℃继续培养 48~68 小时。

采用超滤法将培养液浓缩至 1/10 量,采用离心分离将上清液和菌体分离。

(2)百日咳毒素的制备

向上述(1)得到的上清液中加入占 1/10 量的 1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0),再添加 25w/v%乙酸钙溶液使其为 0.1~2.0 w/v%,经过滤得到含百日咳毒素(感染保护性抗原)的滤液。采用 SP 柱色谱法(平衡化溶液:0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0))将滤液过柱,用 0.415mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)洗脱

吸附的百日咳毒素,分级分离出含百日咳毒素的液体。然后,采用凝胶柱色谱法(平衡化溶液:添加了 0.25mol/L 氯化钠的 0.025mol/L 磷酸钠液(pH8.7))将含有百日咳毒素的液体过柱,然后进行过滤(孔径 0.2 μ m),由此得到纯化百日咳毒素(PT 抗原)液。

(3)纤维状红细胞凝集素的制备

将上述(1)中分离的菌体用添加了 1mol/L 氯化钠的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0)溶解,然后通过离心分离重新分成上清液和菌体。向重新分离出的上清液中加入 25w/v%乙酸钙溶液使其为 0.1~2.0w/v%,通过过滤得到含纤维状红细胞凝集素(感染保护性抗原)的液体。对滤液用硫酸铵浓缩后,采用密度梯度离心法进行纯化,分级分离出纯化纤维状红细胞凝集素(FHA 抗原)。

(4)外膜蛋白的制备

将上述(3)中重新分离出的菌体用添加 0.145mol/L 氯化钠的 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)溶解,于 60℃加热 90 分钟,然后通过离心分离重新分离成上清液和菌体。向重新分离出的上清液中加入 1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0)使其占 1/10 量,再加入 25w/v%乙酸钙溶液使其为 0.1~2.0w/v%,过滤,得到了含有外膜蛋白(感染保护性抗原)的滤液。将含外膜蛋白(感染保护性抗原)的液体,经 SP 柱色谱法(平衡化溶液: 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0))纯化,回收通过柱的液体。然后,经凝胶柱色谱法(平衡化溶液:添加了 0.25mol/L 氯化钠的 0.025mol/L 磷酸钠溶液(pH8.7))过柱之后,进行过滤(孔径 0.2 μ m),由此得到纯化外膜蛋白(69K 抗原)。

(5)菌毛(凝集原(AGG))的制备

在上述(4)中收集含外膜蛋白的液体后的残渣中,加入上清液 1/10 量的添加了 1mol/L 氯化钠的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.0),进行过滤,得到了含菌毛(感染保护性抗原)的滤液。用硫酸铵浓缩所得含菌毛的液体后,采用密度梯度离心法进行纯化,分级分离出了纯化菌毛(FB 抗原)。

(6)保护性抗原的制备(减毒)

将上述(2)~(5)中得到的 PT 抗原、FHA 抗原、69KD 抗原以及 FB 抗原以下列抗原比例为目标品质混合:相对于 0.5mL 的下述实施例 8 中制备的 DPT 混合疫苗,为 PT 抗原为 1.89 μ g、FHA 抗原为 3.00 μ g、69K 抗原为 0.76 μ g、FB 抗原为 0.36 μ g,得到的液体为纯化的感染保护性抗原液。向纯化的感染保护性抗原液中加入 0.2~0.5vol%的福尔马林,并且根据需要加入 1w/v%以

下的赖氨酸盐酸盐, 37~41℃加热 7 天以上, 进行减毒, 得到百日咳保护性抗原液。采用超滤法除去多余的福尔马林和赖氨酸盐酸盐, 得到百日咳保护性抗原原液。

实施例 6 (白喉类毒素的制备)

(1) 白喉菌的培养

将白喉菌(Park Williams No.8)用 Loeffler's 培养基于 32.0 ~ 34.0℃培养 5 天。

(2) 白喉类毒素的制备

向上述(1)所得的培养液中加入硫酸铵后, 对上清液进行过滤(孔径 0.45μm), 得到的滤液采用苯基疏水性柱色谱法(平衡化溶液: 添加 1.25mol/L 硫酸铵的 0.01mol/L 磷酸钠溶液(pH6.5))过柱, 采用 DEAE 离子交换柱色谱法(平衡化溶液: 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0))将所得毒素液过柱, 然后采用凝胶柱色谱法(平衡化溶液: 添加了 0.145mol/L 氯化钠的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0))过柱而分级分离出白喉类毒素, 以此为纯化毒素液。

(3) 白喉类毒素的类毒素化

向上述(2)所得的纯化毒素液中加入 1w/v%以下的赖氨酸盐酸盐、0.3vol%的福尔马林, 38.0 ~ 40.0℃加热 21 天, 进行了类毒素化。

(4) 白喉类毒素的制备

在上述(3)中进行类毒素化后, 采用超滤法除去多余的福尔马林以及赖氨酸盐酸盐, 得到白喉类毒素液。

实施例 7 (破伤风类毒素的制备)

(1) 破伤风菌的培养

将破伤风菌(Harvard47-A)用肝肉汤(liver-liver broth)于 34.5℃ ~ 36.5℃培养 5 天。

(2) 破伤风类毒素的制备

向上述(1)中所得的培养液中添加硫酸铵, 使其浓度为 1.25mol/L。然后, 采用苯基疏水性柱色谱法(平衡化溶液: 添加 1.25mol/L 硫酸铵的 0.01mol/L 磷酸钠溶液(pH6.5))过柱, 将所得毒素液经 DEAE 离子交换色谱法(平衡化溶液: 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.5))过柱, 然后再采用凝胶柱色谱法(平衡化溶液: 添加 0.145mol/L 氯化钠的 0.004mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0))过柱, 分级分离出破伤风类毒素, 以此为纯化毒素液。

(3)破伤风类毒素的类毒素化

向上述(2)中所得的纯化毒素液中加入 0.3vol%的福尔马林, 调整为 pH7.0, 于 39℃加热 15~23 天进行了类毒素化。

(4)破伤风类毒素的制备

在上述(3)的类毒素化之后, 采用超滤法除去多余的福尔马林以及赖氨酸盐酸盐, 得到破伤风类毒素液。

实施例 8 (混合疫苗的制备)

(i)混合灭活的脊髓灰质炎疫苗的制备

将上述实施例 2、3 以及 4 所得的灭活脊髓灰质炎疫苗 I 型、灭活脊髓灰质炎疫苗 II 型以及灭活脊髓灰质炎疫苗 III 型的原液以 D 抗原量分别为 3、100、10, 与 199 培养基(M199)、最终浓度为 0.5vol%的 2-苯氧基乙醇以及最终浓度为 0.09 w/v % 的氯化铝混合。将所得混合液的 pH 用氢氧化钠或盐酸调整为 7, 得到混合灭活脊髓灰质炎疫苗。

(ii)DPT 混合疫苗的制备

将上述实施例 5、6 以及 7 中所得的百日咳菌的保护性抗原、白喉类毒素以及破伤风类毒素的原液与 199 培养基(M199)、最终浓度为 0.5vol%的 2-苯氧基乙醇以及最终浓度为 0.24 w/v % 的氯化铝混合。将所得混合液的 pH 用氢氧化钠和盐酸调整为 7, 得到 DPT 混合疫苗。

(iii)混合疫苗的制备

将上述(i)中所得的混合灭活脊髓灰质炎疫苗与上述(ii)中所得的 DPT 混合疫苗等量混合, 制备了混合疫苗。

实施例 9 (混合疫苗的稳定性的)

对于实施例 8 所得的混合疫苗, 在 25℃进行加速试验来测定稳定性。稳定性通过对各病毒的效价试验来进行评价。

(1)沉淀纯化百日咳疫苗的效价试验

使用了受试物、标准百日咳疫苗以及百日咳菌 18323 株。分别稀释受试物及标准液, 以此为基础, 分别以 4 倍或其它合适的对数等间隔进行共计 3 个梯度稀释以上的稀释液。以 16 只以上的 4 周龄小鼠为 1 组, 对于各稀释液分别使用 1 组。对于每 1 只小鼠 1 次腹腔内注射稀释液 0.5mL。免疫注射 21 天后, 对于每 1 只小鼠脑内注射用于攻击的菌混悬液 0.025mL, 观察 14 天, 计算出死亡只数。用统计学方法处理试验结果并进行比较, 发现受试物

的效价一定为 8 单位/mL 以上。

(2) 沉淀白喉类毒素的效价试验

使用了受试物、对照沉淀白喉类毒素和适当的毒素液。受试物和对照品的稀释使用生理盐水，此外，毒素液的稀释使用添加 0.2w/v % 明胶的 0.017mol/L 磷酸盐缓冲氯化钠溶液(pH7.0)。分别稀释受试物和对照品，制作对数等间隔的梯度稀释液。以 10 只以上的 5 周龄小鼠为 1 组，对于受试物和对照品的各稀释液分别使用 1 组，对于每 1 只皮下注射 0.5mL。免疫注射 4~6 周后，从各动物采血，测定血中抗毒素效价。用统计学方法处理试验结果并进行比较，发现受试物的效价一定在 47 单位/mL 以上。

(3) 沉淀破伤风类毒素的效价试验

使用了受试物、对照沉淀破伤风类毒素和适当的毒素液。受试物和对照品的稀释使用生理盐水，此外，毒素液的稀释使用添加 0.2w/v % 明胶的 0.017mol/L 磷酸盐缓冲氯化钠(pH7.0)。分别稀释受试物和对照品，制作对数等间隔的梯度稀释液。10 只以上的 5 周龄小鼠为 1 组。对于受试物和对照品的各稀释液分别使用 1 组，对于每 1 只小鼠 1 次皮下注射 0.5mL。免疫注射 4~6 周后，用约 100LD₅₀ 的毒素攻击各小鼠，观察 4 天。用统计学方法处理试验结果并进行比较，发现受试物的效价一定在 27 单位/mL 以上。

(4) 大鼠免疫原性试验

使用了受试物、IPV 效价试验用对照品、各型标准血清、和用于中和试验攻击的脊髓灰质炎病毒沙宾株(I、II、III型)。分别稀释受试物和对照品，制作对数等间隔的稀释液。以 10 只以上的 Wister 系 8 周龄、雌性大鼠为 1 组，各稀释液分别使用 1 组。对于每 1 只，在后肢大腿部肌肉内接种 0.5mL。接种 21 日后，从全部动物按个体采血，采集血清，56℃加热 30 分钟。添加个体动物血清和标准血清，各血清添加 2 孔以上，用 MEM 培养基进行 2 倍梯度稀释。而且，在各孔中接种各型中和用病毒混悬液至约 100CCID₅₀。然后，将全部板在 36±1℃的 CO₂ 培养箱中放置 3 小时后，约 4℃下反应一夜。第二天，向各孔中添加 1×10⁴ 个细胞的细胞混悬液，在 36±1℃的 CO₂ 培养箱中培养 7 天。培养结束后，观察各孔的 CPE，计算出 50% 中和点的血清稀释倍数，以其倒数为中和抗体价。用统计学方法处理试验结果并进行比较，发现受试物的效价一定与对照品相等或更高。

加速试验的结果示于表 1。作为对照 IPV，使用了 Lot 04 C(日本脊髓灰

质炎研究所制)。

表 1.

	规格	开始 时	1 个 月	2 个 月	3 个 月
灭活脊髓灰质炎疫苗 I 型	与对照 IPV 相等或更高	1.7	1.7	1.5	2.1
灭活脊髓灰质炎疫苗 II 型	与对照 IPV 相等或更高	2.1	2.0	1.6	1.5
灭活脊髓灰质炎疫苗 III 型	与对照 IPV 相等或更高	20.3	12.3	5.9	6.0
沉淀纯化百日咳疫苗	8 单位/mL	15.8	13.8	14.6	27.3
沉淀白喉类毒素	47 单位/mL	97.9	109.3	85.9	102.9
沉淀破伤风类毒素	27 单位/mL	72.3	88.6	105.5	79.4

实施例 10(利用微载体法的 Vero 细胞培养和脊髓灰质炎病毒培养)

(i)Vero 细胞的培养

使用胰岛素—EDTA 溶液(0.25 % 胰岛素、0.014M EDTA)将下述细胞剥离后, 于 600rpm、离心 10 分钟, 然后悬浮于细胞增殖用培养基(添加 5vol% 小牛血清、0.11% 碳酸氢钠(NaHCO_3)、0.1% 果糖、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 琥乙红霉素以及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 Dulbecco's modified Eagle Medium(DME)), 其中所述细胞是来源于 Vero 细胞的工作库(ワーキングバンク)(MWCB93), 以静置培养方式传代培养的细胞。

将微载体(Cytodex 1(商品名))用 PBS(-)膨润后, 用高压灭菌器 121℃ 灭菌 15 分钟, 更为细胞增殖用培养基后使用。

培养装置使用 New Brunswick Scientific 公司制造的セリジエンプラス和セリジエン, 加入微载体、细胞混悬液后, 用细胞增殖用培养基调整至最终 4.8L(使用セリジエン时为 3.5L), 在培养温度: 37.0℃、溶氧浓度(DO): 15%、pH: 7.15、转数: 35~50rpm 的条件下进行培养。使用 NaHCO_3 浓度为 0.15% 的细胞增殖用培养基作为更换用培养基, 从培养的第 2 天起以约 4L/天的量连续进行培养基更换(使用セリジエン时, 隔 1 日更换全量)。此外,

细胞数的测定使用 Coulter Counter(商品名)进行。

细胞培养的结果示于图 1 (仅 3 H 的实验使用了セリジェン)。可知: 当使用 3g/L 的载体时, 低浓度初始细胞数(3L、约 2×10^5 个细胞/mL)在第 7 天、高浓度初始细胞数(3H、约 10×10^5 个细胞/mL)在第 8 天细胞数为最大, 其后降低。此外, 当使用 5g/L 的载体时, 低浓度初始细胞数(5L、约 2×10^5 个细胞/mL)的情况下, 可见的细胞数增加了 11 天, 但在第 12 天细胞数降低。在低浓度初始细胞数的情况下, 与 3g/L 载体相比, 5g/L 载体的总细胞数在第 10 天处于优势, 但差别不大。在 5g/L 载体, 高浓度初始细胞数(5H、约 10×10^5 个细胞/mL) 的情况下, 第 9 天仍处于细胞数增加的阶段, 此时细胞数为约 2.8×10^6 个细胞/mL, 增殖为初始细胞数的约 2.7 倍。

(ii) 脊髓灰质炎病毒的培养

种病毒使用了 1 型脊髓灰质炎病毒(IS-90C)。细胞计数的最后 1 天, 使用培养容量 4 倍量的添加了 0.075% NaHCO_3 的 EBSS 清洗细胞, 然后在添加了 0.3% NaHCO_3 、20 $\mu\text{g/mL}$ 琥乙红霉素以及 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素 M-199(E) 的 1L 培养基(病毒培养用培养基)中稀释制备种病毒。将其接种于清洗后的细胞, 添加病毒培养用培养基使其达到各培养装置的培养容量。病毒培养在下述条件下进行, 培养温度: 33.3 $^\circ\text{C}$ 、DO: 15%、pH: 7.40、转数: 35~50rpm。在细胞因病毒的 CPE(cytopathic effect: 细胞变性效果)而完全脱离微载体时, 中止病毒培养, 收获病毒液。收获的病毒液于-80 $^\circ\text{C}$ 冻存。

本试验中, 病毒培养开始于图 1 所示的细胞增殖曲线中的各个最终计数日。

病毒效价的测定如下进行。将在旋转管中培养了 3 天的 GMK-2 细胞用 1mL 的添加了 0.075% NaHCO_3 、200u/mL 青霉素、200 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 HBSS 清洗 2 次后, 加入 1mL 的细胞维持液(添加 0.1%牛血清白蛋白、0.225% NaHCO_3 、200u/mL 青霉素、200 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 M-199 培养基)。试验病毒液用细胞维持液进行 0.5 $\log_{10}$ 梯度稀释, 将 $10^{-7} \sim 10^{-8.5}$ 的病毒液每管接种 0.2mL, 每个稀释液接种 5 只管。接种后, 在 36 $^\circ\text{C}$ 的培养室中培养 7 天, 以第 7 天的 CPE 观察判定为基础采用 Reed & Muench 法计算出感染滴度(CCID₅₀/0.2mL)。

使用各条件下培养的 Vero 细胞所得到的 I 型脊髓灰质炎病毒的感染滴度(病毒效价)示于图 2。病毒培养的结果是: 在第 9 天细胞密度为约 2.8×10^6

个细胞/mL 的载体 5g/L 的高浓度初始细胞数体系(5H)中,得到了最高的感染滴度。感染滴度的顺序为 5H、5L、3L,该结果与总细胞数相一致。此外,与对照中使用绿猴肾脏细胞培养得到的病毒液相比,5H 体系获得了 10 倍以上的感染滴度。图 2 所示的病毒效价($\log_{10}$ CCID₅₀/0.2mL)具体如下: 3L 体系为 8.18、5L 体系为 8.51、5H 体系为 8.59、Ref. (对照)为 7.50。

工业实用性

通过在约 4g / L ~ 约 6g / L 的微载体存在下培养待接种脊髓灰质炎病毒沙宾株的 Vero 细胞,能够获得高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株。通过使用高效价的脊髓灰质炎病毒沙宾株,能够高效地制造灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株。因而,包括在约 4g / L ~ 约 6g / L 的微载体存在下培养将要接种沙宾株脊髓灰质炎病毒的 Vero 细胞的步骤的混合疫苗制造方法(本发明的制造方法),作为含有灭活的脊髓灰质炎病毒沙宾株的混合疫苗的高效制造方法是有用的。此外,本发明的混合疫苗能够有效地抑制脊髓灰质炎、百日咳、白喉以及破伤风的发病,因此其作为针对脊髓灰质炎、百日咳、白喉以及破伤风的疫苗是有用的。

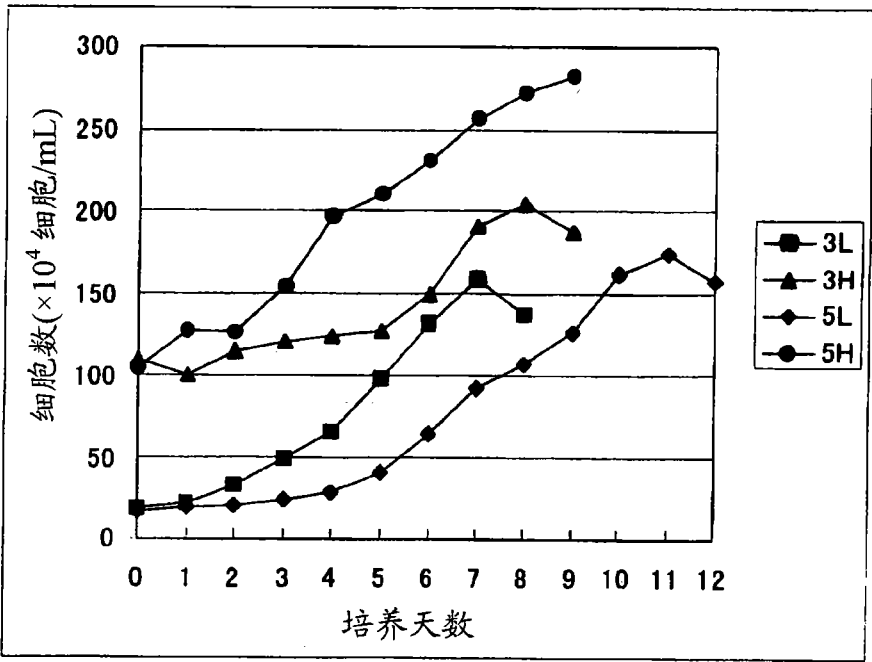


图 1

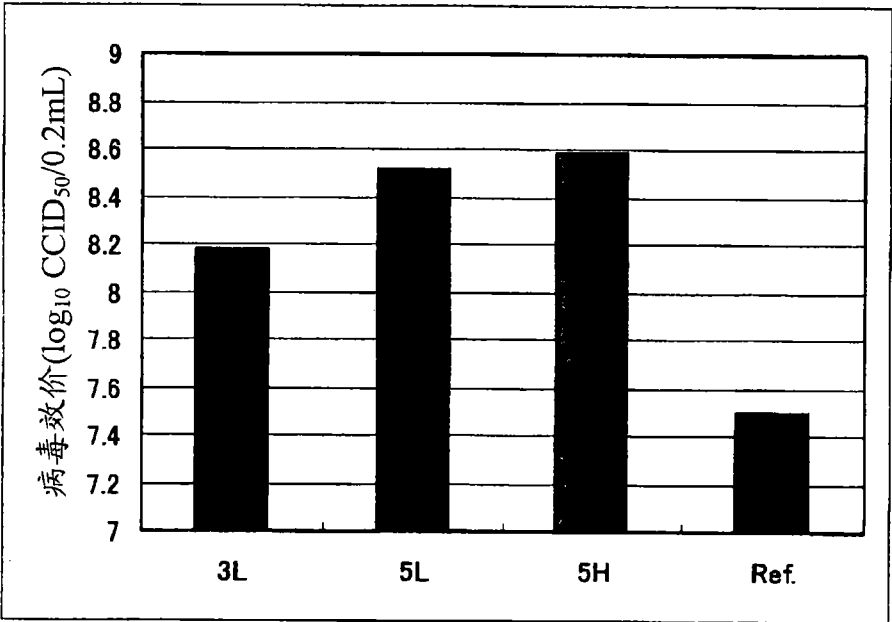


图 2