



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02131812.3

[43] 公开日 2003 年 2 月 26 日

[11] 公开号 CN 1398638A

[22] 申请日 2002.6.27 [21] 申请号 02131812.3
 [30] 优先权
 [32] 2001. 6.28 [33] RU [31] 2001117483
 [71] 申请人 联邦国营一元企业维里昂科学生产协会
 地址 俄罗斯联邦托木斯克
 [72] 发明人 I·V·克拉斯尔尼克福
 O·I·沙罗瓦
 I·A·密斯彻恩克
 N·K·斯塔维特斯卡雅

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 孙 爱

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称 抗蜚传脑炎疫苗的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及生产疫苗制剂。本发明揭示抗蜚传脑炎疫苗的制备方法并包括若干步骤。在用病毒悬浮液制取疫苗过程中进行清除蛋白质杂质(具体是清除鸡胚胎蛋白)。用最终浓度为 50 - 100mg/ml 的鱼精蛋白硫酸盐处理未进行预澄清的、已灭活病毒悬浮液并用连续顺流离心法和过滤法去除生成的沉淀物和细胞碎屑。采取超滤法浓缩已纯化的病毒悬浮液。采用凝胶色谱法在大孔硅石上做进一步的纯化。对所得到的色层分离馏分监测其总蛋白质含量和鸡胚胎蛋白质含量。根据浓缩物抗原活性,用缓冲溶液稀释,使其用于制备吸着疫苗。用本推荐的方法制取的已纯化的疫苗半成品中的鸡胚胎蛋白质浓度不超过 1mg/ml 的界限。

ISSN 1008-4274

- 1、抗蜚传脑炎疫苗的制备方法，包括下述步骤：
 - 1) 在鸡胚胎的悬浮液初始培养物中培养病毒；
 - 2) 使病毒悬浮液灭活，得到未澄清的已灭活的病毒悬浮液；
 - 3) 用鱼精蛋白硫酸盐处理已灭活的病毒悬浮液并得到疫苗的半成品；
 - 4) 过滤和浓缩疫苗半成品；
 - 5) 纯化4)的浓缩物和
 - 6) 过滤已纯化的浓缩物，其中在未澄清的已灭活的病毒悬浮液步骤用鱼精蛋白硫酸盐处理。
- 2、按照权利要求1的方法，其中在步骤3)鱼精蛋白硫酸盐的最终浓度为0.05-0.1mg/ml.
- 3、权利要求1的方法所制备的疫苗。
- 4、按照权利要求3的疫苗，其中鸡胚胎蛋白的浓度不大于1mg/ml.

抗蜱传脑炎疫苗的制备方法

本发明涉及微生物学和可用于制取抗蜱传脑炎的人工培养疫苗。

制备抗蜱传脑炎疫苗的一个已知方法是基于收集培养病毒，使用原代/传代细胞培养物。

根据全俄卫生协会的要求，对于使用基于传代细胞培养物制出的疫苗，严格限制其残余脱氧核糖核酸含量：为了消除疫苗中潜在的可能的蛋白质，制造国国家监督部门规定，该含量为一次疫苗剂量中不得超过 10ng。

在使用鸡胚胎细胞的初始培养物制取蜱传脑炎疫苗时，对于象牛血清蛋白和鸡胚胎蛋白那样的异种蛋白质，在最终产品中的含量，规定了限制。根据医学免疫生物学制剂国家监督部门——人.A. 塔拉舍维奇标准化和监督国家研究院(人.A. 塔拉舍维奇 ТУСК)的要求，蜱传脑炎疫苗中的异种蛋白质，不得超过 1mg/ml。

从病毒悬浮液清除细胞的脱氧核糖核酸，纯化病毒悬浮液的已知方法包括：在继代细胞系的细胞上培养、澄清和采用超滤浓缩接着在蔗糖层中使用色谱法或者离心分离法纯化。为了提高从病毒悬浮液中清除细胞的脱氧核糖核酸的纯化程度，用最终浓度为 $4 \pm 1\text{mg/ml}$ 的鱼精蛋白硫酸盐处理所得到的浓缩物。(A. C. 1532, 050, 苏联, МЭКА61K39/00)。

还有一个用病毒悬浮液制备抗蜱传或者日本脑炎疫苗的已知方法，该法与上述方法不同的是在使用鱼精蛋白硫酸盐从病毒悬浮液清除细胞的脱氧核糖核酸以及其它杂质之前，用甲醛溶液使病毒悬浮液灭活，然后再用游离的甲醛灭活。在用鱼精蛋白硫酸盐从病毒悬浮液清除细胞的脱氧核糖核酸和其它杂质之前，采用硫酸钡或者用高岭土清除该病毒悬浮液的细胞脱氧核糖核酸。(专利, 2120804, RU, МЭКА 61 K 39/12, С12N 7/02)。

为制取抗蜱传脑炎疫苗，在使用各种已知的病毒悬浮液纯化方法时，要监测脱氧核糖核酸杂质的去除程度，而不是异种蛋白质的去除程度，但是后者在疫苗中的含量也是有规定的。

目前俄罗斯联邦，采用鸡胚胎细胞初始培养物中制得的病毒悬浮液，制备

抗蜱传脑炎疫苗（联邦国家《为利昂》联合企业科学生产联合公司生产规程 P7 N524-95 和俄罗斯医学科学院 M. . 秋玛科夫脊髓灰质炎和病毒脑炎研究所生产规程 N793-98）。

根据 P7 N 524-95 生产规程，病毒悬浮液的制取方法是在鸡胚胎细胞的悬浮液培养物中，培养抗蜱传脑炎病毒（N205 抗蜱传脑炎病毒株）4 昼夜，接续用甲醛在 $(32 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 下，3 昼夜，使其灭活，最终浓度为 200mg/ml。初始培养容积为 6 升。然后采用离心作用，在加速度为 13200g 下，用连续顺流离心机，进行已灭活的病毒悬浮液的澄清并且同时并集已澄清的半成品，并经孔隙的最终尺寸为 0.45 微米的过滤器组，进行后续操作程序的过滤。如此所得到的病毒悬浮液中的鸡胚胎蛋白含量为 5-15mg/ml。

根据 P 793-98 生产规程，病毒悬浮液的制取方法是在鸡胚胎细胞的单层的或者悬浮的初始培养物中，培育抗蜱传脑炎病毒（《苏伏宁》抗蜱传脑炎疫苗毒株或者 N205）。根据毒株的不同，病毒培养时间为 3 或者 4 昼夜。初始培养容积为 600 毫升。然后用最终浓度为 200 微克/毫升的甲醛，3 昼夜，在温度为 $(32 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 下，进行并集和对病毒悬浮液中的病毒灭活。然后经孔隙最终尺寸为 0.45 微米的过滤器组并用过滤法澄清已并集，已灭活的病毒悬浮液。在组合过滤器上用超滤法浓缩已经澄清的病毒悬浮液。在一批（组）已经并集、已灭活的病毒悬浮液的组成中，一部分培养液可用单层培养法得到，而另外一部分，可用悬浮液培养法得到。如果采用单层培养法得到的培养液的分率占该批总体积的 40-60%，则用剂量为 3mg/ml (3000mg/ml) 的鱼精蛋白硫酸盐处理经超滤后所得的浓缩物。随后，在 6000-8000g 下，采用离心方法和用孔隙尺寸为 0.8 微米过滤器过滤去除沉淀。在 M C 1000-2000B X 型大气孔的硅石上，采用凝胶过滤法，进一步纯化浓缩物。根据病毒抗原含量对所得到的已纯化的浓缩物进行标准化、监测总蛋白含量（不大于 130mg/ml）和牛血清蛋白含量（不大于 1mg/ml）并用该浓缩物制备疫苗。不监测鸡胚胎蛋白浓度。

使用已知的不论在鸡胚胎细胞的悬浮培养物中，或者单层培养物中制取病毒悬浮液的方法，都关系到在其中积累相当多的鸡胚胎蛋白的问题。

本发明任务是将抗蜱传脑炎疫苗中鸡胚胎蛋白的数量降低到不大于 1mg/ml 的规定水平以及减少为做到此规定所必须的工艺步骤。

达到所提出的任务的办法是在包含用鱼精蛋白硫酸盐去除病毒悬浮液的杂

质，然后对其进行离心和/或色层分离的制备抗婢传脑炎病毒的方法中，在未澄清的灭活病毒悬浮液阶段用最终浓度 50-100mg/ml (0.05-0.1mg/ml) 的鱼精蛋白硫酸盐进行纯化。

鱼精蛋白硫酸盐的最终浓度 50-100mg/ml 是最佳浓度，而且它的选择与病毒悬浮液中鸡胚胎蛋白浓度有关，选用低于 50mg/ml (0.05mg/ml) 时，导致降低所得到的抗婢传脑炎疫苗的纯度（增加疫苗中的蛋白质杂质含量，具体是增加鸡胚胎蛋白质），但是大于 100mg/ml (0.1mg/ml) 就不再引起制剂进一步提高纯度，却会导致增加鱼精蛋白硫酸盐的消耗量。澄清用离心法和过滤法得到的已并集的半成品以及清除用鱼精蛋白硫酸盐沉淀出来的沉淀物，这两者要同时进行。

本方法采用下列办法实施：

根据 P N524-95 生产规程，在鸡胚胎细胞的悬浮液初始培养物中培养病毒（抗婢传脑炎疫苗毒株 N205），可得到病毒悬浮液。用容积 6 升的大瓶，在辊式装置上，以 8-10 转/分的转动速度，在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下连续搅拌 4 昼夜，进行培养。然后用最终浓度为 200mg/ml (0.02%) 的甲醛，在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下，3 昼夜，使病毒悬浮液灭活。监测病毒悬浮液中传染病毒的浓度降到灭活和灭活后的半成品中鸡胚胎蛋白的数量。然后得到并集疫苗半成品。执行如下的操作：往装有已灭活的病毒悬浮液的多个烧瓶中，添加鱼精蛋白硫酸盐至最终浓度为 50-100 微克/毫升。在 $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下留存，作用 30-40 分或者 18-20 小时。然后在 OTP-101K-01 过流离心机上，在 13200g 加速度下，离心除去细胞碎屑和形成的沉淀物。从离心机出来的半成品，被收集进入共用的容器，然后经最终孔隙为 0.45 微米的过滤器过滤半成品。用组合过滤器，采取超滤法将如此得到的并集的半成品，浓缩 30-50 倍。然后在大孔硅石柱上用凝胶色谱法纯化浓缩物。吸附剂类型——氧化硅二醇或者用聚乙烯吡咯烷酮改性的（二）氧化硅。在收集的色层分离馏分中，监测抗婢传脑炎病毒的抗原活性，总蛋白数量和鸡胚胎蛋白的数量。然后根据所得到的已纯化的浓缩物的抗原活性，用缓冲溶液稀释浓缩物，并使其再经孔隙为 0.22 微米的过滤器过滤，使浓缩物用于制备所需的疫苗。用反向免疫电泳法做鸡胚胎蛋白浓度测定。

本推荐方法可使鸡胚胎蛋白浓度从病毒悬浮液中的 5-15mg/ml 降低到在已纯化的成品中的不大于 1mg/ml。从而提高抗婢传脑炎疫苗的生产效率，即

可以降低对病毒悬浮液澄清过滤的过滤器消耗和用超滤法做病毒悬浮液的后续浓缩所用的组合过滤器的消耗 2-2.5 倍。显著地减少完成这些操作的时间。减少用病毒悬浮液制取疫苗所必须的步骤。