



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102886043 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201110203864. X

(22) 申请日 2011. 07. 20

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :V201119 2011. 06. 09

CCTCC NO :V201118 2011. 06. 09

(73) 专利权人 普莱柯生物工程股份有限公司

地址 471000 河南省洛阳市高新区凌波路

(72) 发明人 张许科 孙进忠 白朝勇

(74) 专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理

事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营

(51) Int. Cl.

A61K 39/295(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

A61P 31/20(2006. 01)

A61K 39/12(2006. 01)

A61K 39/23(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101979517 A, 2011. 02. 23, 全文.

CN 101979518 A, 2011. 02. 23, 全文.

姜天童等. 猪细小病毒感染症-乙型脑炎二联油乳剂灭活疫苗研究. 《中国兽医科技》. 1996, 第26卷(第10期), 第6-8页.

郑云程等. 利用一种新型反应器-BelloCell培养动物细胞. 《生物学杂志》. 2010, 第27卷(第1期), 第20-23页.

谢秋玲等. 昆虫细胞 Sf9 在四种生物反应器中的培养. 《暨南大学学报(自然科学版)》. 2009, 第30卷(第1期), 第96-100页.

审查员 李谦

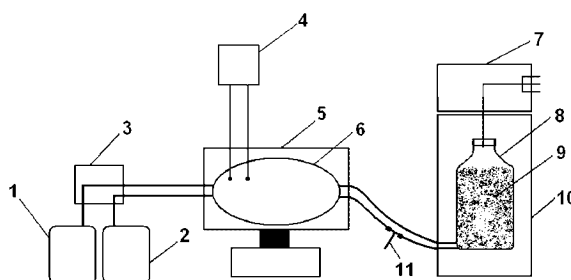
权利要求书2页 说明书15页 附图1页

(54) 发明名称

猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备方法:(1)在潮汐式生物反应器中,接种动物细胞至生物反应器内的微载体上,进行细胞的吸附培养与扩增培养过程;(2)将猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒接种到扩增培养的细胞上,进行病毒的吸附培养与增殖培养过程;(3)在接种的动物细胞CPE达到75%以上时,收获病毒液;(4)将收获的病毒培养液于-20℃冻融两次,浓缩后灭活,加入乳化剂,乳化后获得猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗。本发明的优点是保藏的种毒的免疫原性好、生长稳定、效价高;采用了潮汐式生物反应器,分别培养和收获高滴度的二种病毒,浓缩灭活后直接乳化配制,可以大规模连续生产二联灭活疫苗。



CN 102886043 B

1. 一种猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 在潮汐式生物反应器中,接种动物细胞至生物反应器内的微载体上,进行细胞的吸附培养;

2) 在细胞的吸附培养结束后进行细胞的扩增培养,将猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒分别接种到扩增培养的细胞上,进行病毒的吸附培养,其中,所述猪乙型脑炎病毒为 SD-2011 株,保藏号为 CCTCC No. V201119,所述培养猪乙型脑炎病毒的动物细胞为 BHK-21、IBRS-2、ST、Vero、C6/36 及鸡胚成纤维细胞;所述猪细小病毒为 HN-2011 株,保藏号为 CCTCC No. V201118,所述猪细小病毒的培养细胞为 ST、PK-15、IBRS-2、CPK 和 MVPK 细胞;

3) 在病毒的吸附培养结束后分别进行病毒的增殖培养;

4) 在接种的动物细胞病变 CPE 达到 75% 以上时,分别收获病毒液;

5) 将收获的病毒培养液于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻融两次,浓缩后分别灭活,获得灭活的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒混合液;

6) 进行水相与油相的配置:将猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒混合液作为水相,加入乳化剂,乳化后获得猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗。

2. 根据权利要求 1 所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,所述微载体由选自聚酯、明胶或多糖的一种或几种制成。

3. 根据权利要求 1 所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,所述微载体以  $0.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  cells/g 的终密度接种细胞。

4. 根据权利要求 1 所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,所述微载体的添加量为  $40 \sim 80\text{g/L}$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,步骤 2) 中接种时的细胞浓度为  $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$  cells/g。

6. 根据权利要求 1 所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,步骤 2) 中所述猪乙脑病毒和猪细小病毒接种的感染复数为  $0.0001 \sim 1.5$ 。

7. 根据权利要求 1 所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,步骤 1) 中所述的吸附培养和步骤 2) 中所述的扩增培养使用含 3%~5% (V/V) 牛血清的细胞培养液;步骤 3) 中所述的病毒吸附培养和步骤 4) 中所述的病毒增殖培养使用 1% (V/V) 牛血清的细胞培养液,其中所述的细胞培养液为选自 DMEM、MEM、 $\alpha$ -MEM、EMEM、1640、M199、F10 和 F12 中的一种,所述的牛血清为胎牛血清、新生牛血清或小牛血清。

8. 根据权利要求 1 中所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,在步骤 1) 至步骤 2) 的培养过程中控制葡萄糖含量范围为  $1.0 \sim 4.5\text{g/L}$ ,温度  $37.0^{\circ}\text{C}$ , pH 调节  $7.0 \sim 7.5$ ,溶氧调节 40%~80%,二氧化碳浓度为 5%~10%的条件下进行。

9. 根据权利要求 1 中所述的二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,在步骤 3) 至步骤 4) 的培养过程中控制温度  $36.5^{\circ}\text{C}$ , pH 调节  $7.0 \sim 7.5$ ,溶氧调节 30%~80%,二氧化碳浓度为 3%~5%的条件下进行。

10. 根据权利要求 1-9 任一项制备方法获得的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗。

11. 根据权利要求 10 的二联灭活疫苗,其特征在于,所述猪乙型脑炎病毒为

SD-2011 株,保藏号为 CCTCC No.V201119 ;所述猪细小病毒为 HN-2011,保藏号为 CCTCC No.V201118。

12. 一种猪乙型脑炎病毒 SD-2011 株,保藏号为 CCTCC No.V201119。
13. 一种猪细小病毒 HN-2011,保藏号为 CCTCC No.V201118。

## 猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种猪二联灭活疫苗,特别是指一种治疗和预防猪乙型脑炎和猪细小病毒感染的二联灭活疫苗,属于兽用疫苗领域。

### 背景技术

[0002] 猪乙型脑炎病毒 (Swine Japanese Encephalitis Virus, JEV) 和猪细小病毒 (Porcine Parvovirus Virus, PPV) 是引起猪繁殖障碍的重要病原体之一,主要表现为母猪流产、不孕、产死胎、木乃伊胎及弱仔,公猪睾丸急性炎症反应或不育,使养猪业损失巨大。JEV 和 PPV 除单独感染外,常常混合感染,对四川、重庆、湖北、河南等规模化猪场的混合感染调查,发现混合感染阳性率 $\geq 60\%$ 。

[0003] 《猪细小病毒感染症-乙型脑炎二联油乳剂灭活疫苗研究》中,公开了将猪细小病毒灭活油乳剂单苗和猪乙型脑炎灭活油乳剂单苗等量混合获得的一种二联灭活疫苗,但实际上,该文献所提供是在猪细小病毒和猪乙型脑炎病毒的增殖过程中,分别使用了胎猪内脏和小鼠鼠脑,不仅增殖方法繁琐,且依赖于动物器官组织,不利于扩大生产;而且在病毒液中存在大量的杂蛋白影响疫苗的安全性和稳定性,特别是容易引起动物的过敏反应。

[0004] 中国专利的“猪细小病毒 L 株及在制备猪细小病毒病灭活疫苗中的用途”(CN 101851609A)、“猪细小病毒病油乳剂灭活疫苗”(CN1706497A) 和“猪细小病毒病油乳剂灭活疫苗”(CN 1704119A) 使用了转瓶培养的方式生产猪细小病毒。但这种转瓶培养的技术方案存在着一些与传统的转瓶培养所共有缺点:(1) 转瓶细胞培养,不能对培养液的养分、pH 及溶氧等培养条件进行实时调整,因此无法保证细胞处于最佳培养状态;(2) 转瓶细胞培养,操作程序繁琐,有污染风险的暴露点多,生产工艺难放大;(3) 转瓶细胞培养,批间差异大,生产质量难以控制,产品质量不稳定。

[0005] 中国专利“应用生物反应器工业化生产猪乙型脑炎疫苗的方法”(CN 102038943A) 和“应用生物反应器工业化生产猪细小病毒疫苗的方法”(CN 102038945A) 使用了微载体生物反应器培养猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒,进一步提高了生产的规模,但是由于用于增殖病毒的大多数传代细胞,如 BHK-21 或 ST 细胞等,均为动物细胞,细胞外层为质膜,脆性大,因此在反应器中应务必减少剪切力。而上述专利中病毒培养方式使用的为搅拌式生物反应器,这种搅拌式的培养方式所产生的高剪切力会导致细胞损耗率高,进而影响到生物反应器的生产效率及细胞产量,特别会形成不必要的细胞碎片,容易引起动物过敏反应,影响疫苗的质量。

[0006] 因此,由于上述困难,目前市场上未有猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的生产和销售,预防这两种病毒引起的疫病时,需单独接种 JEV 和 PPV 单苗,免疫程序复杂、成本较高。而且,由于二种病毒引起的疾病常常同时发生,单苗免疫效果也不尽如人意。因此,现实中迫切需要开发一种免疫性高、安全性好、免疫程序简便的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗,特别是需要一种简单方便、工艺易于放大的二联灭活疫苗的制备方法。

## 发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的主要目的提供一种猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备方法。

[0008] 本发明以免疫原性好、生长稳定、效价高的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒为毒种,采用潮汐式生物反应器大规模生产 JEV 和 PPV 抗原,通过抗原浓缩工艺,辅以高效的进口疫苗佐剂,制备成猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗,至少克服了现有技术中的如下缺点:

[0009] (1) 克服了传统疫苗毒株筛选中单纯的细胞适应方法,采用细胞适应、细胞克隆和病毒克隆纯化技术相结合,获得的毒种免疫原性好、生长稳定、效价高,制备的二联灭活在免疫抗体滴度、免疫持续期、疫苗保存期等方面优于目前市场使用的单苗。

[0010] (2) 克服了传统的转瓶培养规模小、质量难控、操作繁琐的缺点,又克服了搅拌式生物反应器高剪切力引起的细胞损耗率高、疫苗质量受损的缺点。

[0011] (3) 克服了猪场为预防猪乙型脑炎和猪细小病毒感染,需单独免疫 JEV 和 PPV 疫苗,简化了免疫程序,降低猪的临床应激反应,提高了疫苗的免疫效果。

### [0012] 技术方案

[0013] 因此,本发明提供了一种猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备方法,包括如下步骤:

[0014] 1) 在潮汐式生物反应器中,接种动物细胞至生物反应器内的微载体上,进行细胞的吸附培养;

[0015] 2) 在细胞的吸附培养结束后进行细胞的扩增培养,将猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒分别接种到扩增培养的细胞上,进行病毒的吸附培养;

[0016] 3) 在病毒的吸附培养结束后进行病毒的增殖培养;

[0017] 4) 在接种的动物细胞病变 (Cytopathic effect, CPE) 达到 75% 以上时,收获病毒液;

[0018] 5) 将收获的病毒培养液于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻融两次,浓缩后灭活,获得灭活的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒混合液;

[0019] 6) 进行水相与油相的配置:将猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒混合液作为水相,加入乳化剂,乳化后获得猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗。

[0020] 优选地,本发明所述微载体由选自聚酯、明胶或多糖的一种或几种制成。

[0021] 优选地,本发明所述微载体以  $0.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  cells/g 载体的终密度接种细胞。

[0022] 优选地,本发明所述微载体的添加量为  $40 \sim 80$  g/L。

[0023] 优选地,本发明所述的猪乙型脑炎病毒为 SD-2011 株,保藏号为 V201119;所述猪细小病毒为 HN-2011 株,保藏号为 V201118。

[0024] 优选地,本发明所述步骤 2) 中接种时的细胞浓度为  $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$  cells/g 载体。

[0025] 优选地,本发明所述步骤 2) 中所述猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒接种的感染复数为  $0.0001 \sim 1.5$ 。

[0026] 优选地,本发明所述步骤 1) 中所述的吸附培养和步骤 2) 中所述的扩增培养使用

含 3%~5% (V/V) 牛血清的细胞培养液;步骤 3) 中所述的病毒吸附培养和步骤 4) 中所述的病毒增殖培养使用 1% (V/V) 牛血清的细胞培养液,其中所述的细胞培养液为选自 DMEM、MEM、 $\alpha$ -MEM、EMEM、1640、M199、F10 和 F12 中的一种,所述的牛血清为胎牛血清、新生牛血清或小牛血清。

[0027] 优选地,本发明所述在步骤 1) 至步骤 2) 的培养过程中控制葡萄糖含量范围为 1.0~4.5g/L,温度 37.0℃,pH 调节 7.0~7.5,溶氧调节 40%~80%,二氧化碳浓度为 5%~10%的条件下进行。

[0028] 优选地,本发明所述在步骤 3) 至步骤 4) 的培养过程中控制温度 36.5℃,pH 调节 7.0~7.5,溶氧调节 30%~80%,二氧化碳浓度为 3%~5%的条件下进行。

[0029] 本发明的另一目的在于提供由上述制备方法获得的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗,以及该二联灭活疫苗在预防猪乙脑病毒和猪细小病毒感染中的应用。

[0030] 优选地,本发明所述的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗中,所用的猪乙型脑炎病毒为 SD-2011 株,保藏号为 V201119;所述猪细小病毒为 HN-2011 株,保藏号为 V201118。

[0031] 本发明的另一目的在于提供一种猪乙型脑炎病毒为 SD-2011 株,保藏号为 V201119。

[0032] 本发明的另一目的在于提供一种猪细小病毒为 HN-2011 株,保藏号为 V201118。

[0033] 本发明的另一目的在于提供获得免疫原性好、生长稳定、效价高的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒毒种的培养方法。

[0034] 由上可以看出,首先,本发明采用细胞适应、细胞克隆和病毒克隆纯化技术相结合,建立了获得理想毒种的培养方法,获得了二种免疫原性好、生长稳定、效价高的病毒株,即猪乙型脑炎病毒 SD-2011 株 (Swine Japanese Encephalitis Virus),于 2011 年 6 月 9 日保藏在中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection,简称 CCTCC),保藏编号 V201119;猪细小病毒 HN-2011 株 (Porcine Parvovirus Virus),于 2011 年 6 月 9 日保藏在 CCTCC,保藏编号 V201118。本发明的筛选获得的二种病毒株,不仅免疫性好,特异性强,而且这二种病毒无相互干扰的问题,从而使这二种病毒株制备的二联灭活疫苗在免疫抗体滴度、免疫持续期、疫苗保存期等方面优于目前市场使用的单苗,这是别的病毒株不能替代的。

[0035] 其次,本发明还利用潮汐式生物反应器进行多种动物细胞培养,并增殖不同病毒的工艺流程,克服了以往转瓶或搅拌式生物反应器的工艺不易放大、高剪切力、高成本等缺点。具有细胞培养条件实时可控、病毒产量高、污染率低、操作简单、稳定性好,无外源因子污染、易于规模化生产的优点。本发明使猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的规模化生产工艺得以显著提升,使得养殖场能够应对日益增多的猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒混合感染。

## 附图说明

[0036] 图 1 为为本发明所使用的 Tidecell 潮汐式生物反应器结构图。

[0037] 菌株保藏信息

[0038] 猪乙型脑炎病毒 SD-2011 株:

- [0039] 保藏日期:2011年6月9日,
- [0040] 保藏地址:中国武汉,武汉大学,中国典型培养物保藏中心,
- [0041] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC),
- [0042] 保藏编号:CCTCC NO:V201119;
- [0043] 猪细小病毒 HN-2011 株:
- [0044] 保藏日期:2011年6月9日,
- [0045] 保藏地址:中国武汉,武汉大学,中国典型培养物保藏中心,
- [0046] 保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC),
- [0047] 保藏编号:CCTCC NO:V201118。

### 具体实施方式

[0048] 以下通过具体实施例进一步说明:

[0049] 本发明猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备方法中,使用的猪乙型脑炎病毒为 SD-2011 株,于 2011 年 6 月 9 日保藏在中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,简称 CCTCC),保藏编号 V201119;使用的猪细小病毒为 HN-2011 株,于 2011 年 6 月 9 日保藏在 CCTCC,保藏编号 V201118。

[0050] 猪乙型脑炎病毒 SD-2011 株分离自母猪死胎的肝、肠系膜淋巴结、肾、脑等组织,为一种特异性强、免疫性好的病毒株,主要特征如下:

[0051] 理化特性检测:将病毒液经 56℃ 30min 灭活,乙醚、盐酸、氢氧化钠以及常用消毒剂处理后,接种单层 BHK-21 细胞,观察 CPE。结果表明,病毒对热抵抗力弱,56℃ 30min 可完全灭活;病毒对脂溶剂、酸、碱以及常用消毒剂敏感,均可完全灭活。

[0052] 病毒的电镜观察:病毒经 BHK-21 细胞培养 72h 后,将病变细胞上清经蔗糖梯度超速离心(30,000rpm/h),纯化病毒颗粒经 2% 磷钨酸负染后,进行电镜观察。结果显示,病毒颗粒为球形,具有囊膜,直径 40nm ~ 60nm。

[0053] 间接免疫荧光法检测:取分离的毒株接种 BHK-21 细胞,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 48h,经丙酮固定后,进行间接免疫荧光检测。结果显示,病毒液感染的 BHK-21 细胞出现了特异性荧光,阴性对照无特异性荧光出现。

[0054] 特异性血清中和试验:将病毒液和猪乙型脑炎特异性血清(南京农业大学提供)中和后,接种 BHK-21 细胞,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 72h,收获细胞培养液,经 2 次反复冻融,收集培养液。连续传代 3 次,观察 CPE。结果显示,病毒液通过猪乙型脑炎特异性血清中和后,无细胞病变。

[0055] 病毒的 PCR 基因扩增和序列测定:参考国家标准“日本乙型脑炎病毒反转录聚合酶链反应试验方法”(编号 GB/T 22333-2008)进行基因序列分析,其方法包括设计引物、PCR、电泳、连接、转化、单克隆鉴定、测序、序列比对。结果显示,PCR 扩增出了特异性条带,大小为 375bp,与预期一致;进一步的序列测定和分析证实,该毒株与目前我国流行的猪乙型脑炎病毒株的序列同源性在 98% 以上,为目前猪群流行毒株。

[0056] BABL/c 小鼠感染实验:将乙脑病毒 10 倍稀释后,脑内接种 4 周龄的 BABL/c 小鼠(0.03ml/只),观察小鼠的临床症状。病毒接种小鼠后 3 天出现典型的脑炎症状,表现为兴奋、转圈、后肢麻痹、抽搐,并于 7 日内全部死亡。

[0057] 病毒的毒力鉴定:将病毒稀释至  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml,滴鼻接种怀孕 45 天左右的初产母猪 5 头,每头 4ml,跟踪观察母猪的产仔情况。结果显示,病毒接种怀孕母猪,可发生繁殖障碍,出现死胎、产弱仔等情况。

[0058] 猪细小病毒 HN-2011 株为采集母猪死胎的肝、肠系膜淋巴结、肾、脑等组织,为一种特异性强、免疫性好的病毒株,主要特征如下:

[0059] 理化特性检测:将病毒液经 56℃ 30min 灭活,乙醚、盐酸、氢氧化钠以及常用消毒剂处理后,接种单层 ST 细胞,观察 CPE。结果表明,病毒对热抵抗力强,对脂溶剂、酸、碱以及常用消毒剂不敏感。

[0060] 病毒的电镜观察:病毒经 ST 细胞培养 72h 后,将病变细胞上清经蔗糖梯度超速离心 (40,000rpm/h),纯化病毒颗粒经 2% 磷钨酸负染后,进行电镜观察。结果显示,病毒外观呈六角形或圆形,无囊膜,直径约为 20nm。

[0061] 间接免疫荧光法检测:取分离的毒株接种 ST 细胞,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 48h,经丙酮固定后,进行间接免疫荧光检测。结果显示,病毒液感染的 ST 细胞出现了特异性荧光,阴性对照无特异性荧光出现。

[0062] 特异性血清中和试验:将病毒液和猪细小病毒特异性血清(南京农业大学提供)中和后,接种 ST 细胞,在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 72h,收获细胞培养液,经 2 次反复冻融,收集培养液。连续传代 3 次,观察 CPE。结果显示,病毒液通过猪细小病毒特异性血清中和后,无细胞病变。

[0063] 病毒的 PCR 基因扩增和序列测定:参考行业标准“猪细小病毒聚合酶链反应操作规程”(编号 SN/T 1874-2007)进行基因序列分析,方法包括设计引物、PCR、电泳、连接、转化、单克隆鉴定、测序、序列比对。结果显示,PCR 扩增出了特异性条带,大小为 445bp,与预期一致;进一步的序列测定和分析证实,该毒株与目前我国猪细小病毒流行毒株的序列同源性在 98% 以上,为目前猪群流行猪细小病毒毒株。

[0064] 病毒血凝活性检测:取 96 孔微量反应板(U 型),用 pH 7.2 的 PBS 将病毒培养液做 2 倍连续稀释,加入反应板,并设 PBS 阴性对照和猪细小病毒抗原阳性对照,再加入 0.6% 豚鼠红细胞悬液,置室温 1h。结果显示,病毒培养液能凝集豚鼠红细胞,具有较高的血凝活性,而且随着传代培养次数的增加,病毒对细胞的适应性增强,病毒血凝价可达到  $2^{10}$  以上。

[0065] 病毒的毒力鉴定:将病毒稀释至  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml,滴鼻接种怀孕 45 天左右的初产母猪 5 头,每头 4ml,跟踪观察母猪的产仔情况。结果显示,病毒接种怀孕母猪,可发生繁殖障碍,出现死胎、产弱仔等情况。

[0066] 本发明实施例中免疫原性好、生长稳定、效价高的猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒是经过细胞适应、细胞克隆和病毒克隆纯化技术获得的,技术方案包括以下步骤:

[0067] (1) 适宜细胞系筛选

[0068] 将猪乙型脑炎病毒接种于 BHK-21(ATCC, 编号 CCL-10)、IBRS-2(CCTCC, 编号 GDC0022)、ST(CCTCC, 编号 GDC0007)、Vero(ATCC, 编号 CCL-81)、C6/36(ATCC, CRL-1660)及鸡胚成纤维细胞,将猪细小病毒接种于 PK-15(CCTCC, 编号 GDC0060)、ST(CCTCC, 编号 GDC0007)、IBRS-2(CCTCC, 编号 GDC0022)、CPK 细胞(中国兽医药品监察所提供)和 MVPK 细胞(中国兽医药品监察所提供),采用不同的培养基进行培养,控制培养条件为 pH 值为 7.0 ~ 7.3,温度为 35 ~ 37℃,连续传代培养 8 代,观察病毒适宜细胞的情况,测定病毒增殖



滴度,以病毒增殖滴度最高的细胞作为疫苗生产的适宜细胞系。结果显示,猪乙型脑炎病毒在 BHK-21 细胞上的病变最明显,病毒滴度最高,可达  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml;猪细小病毒在 ST 细胞上的病变最明显,病毒滴度最高,可达  $10^{5.3}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

#### [0069] (2) 细胞克隆筛选

[0070] 我们采用有限稀释法对 BHK-21 和 ST 细胞进行了克隆,筛选到生长良好的 BHK-21 细胞 10 株,其中一株细胞对猪乙型脑炎病毒敏感,病毒滴度可达  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml;筛选到生长良好的 ST 细胞 8 株,其中一株细胞对猪细小病毒敏感,病毒滴度可达  $10^{6.3}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

#### [0071] (3) 病毒克隆纯化

[0072] 将 BHK-21 和 ST 细胞在 6 孔板上培养成单层,以细胞维持液分别将猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒作连续的 10 倍稀释,选择适当稀释度的病毒悬液分别接种 BHK-21 和 ST 单层细胞,每个稀释度至少接种 2 孔,置 37℃ 感作 1~2h,使病毒充分吸附;吸附完毕后,吸出病毒液;取含中性红的营养琼脂糖,融化后降温至 37℃,注入 6 孔板上,使营养琼脂糖覆盖在细胞表面,平放 30~60min,待琼脂糖凝固,随后置 37℃ 继续培养;在培养板上出现清晰的蚀斑时,即可进行挑斑;将挑取的猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒分别接种 BHK-21 和 ST 细胞,待其充分增殖以后,再作下一轮的蚀斑纯化,并挑斑。如此操作 3 次,获得纯化的猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒。结果显示,纯化后的猪乙型脑炎病毒接种 BHK-21 细胞,病毒滴度可达  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 以上;纯化后的猪细小病毒接种 ST 细胞,病毒滴度可达  $10^{7.2}$ TCID<sub>50</sub>/ml 以上。

[0073] 本发明实施例的制备二联灭活疫苗技术方案包括以下步骤:

#### [0074] (1) 细胞接种、吸附与培养

[0075] 将动物细胞悬液以  $0.5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  cells/g 载体的终密度接种于载体罐中,设定生物反应器的参数进行细胞吸附与培养过程。其中,培养猪乙型脑炎病毒的动物细胞有 BHK-21、IBRS-2、ST、Vero、C6/36 及鸡胚成纤维细胞,优选的是 BHK-21 细胞。猪细小病毒的培养细胞有 ST、PK-15、IBRS-2、CPK 和 MVPK 细胞,优选的是 ST 细胞。

#### [0076] (2) 病毒接种、吸附与增殖

[0077] 待细胞生长至  $0.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$  cells/g 载体的密度时,更换细胞培养液,再将猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒病毒液分别接种到载体罐中,设定生物反应器的参数进行病毒吸附与增殖过程。

#### [0078] (3) 病毒收获

[0079] 病毒液中培养细胞的 CPE 达 75% 以上时,进行病毒液的收获。

[0080] 在本发明中,用于配制细胞培养液的培养基包括但不限于 DMEM 或  $\alpha$ -MEM,还可使用其它细胞培养基配制,如 EMEM、MEM、1640、M199、F10、F12 等。在实施例中的步骤 (1) 中使用的培养液为含 3%~5% (V/V) 牛血清(美国 PAA 公司)的  $\alpha$ -MEM(Modified Eagle Medium) 培养液或 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养液(Invitrogen 公司)。

[0081] 步骤 (1) 中所述的载体为聚酯纤维载体(美国 CESCO 公司),在载体罐中的加入量为 40~80g/L。

[0082] 较佳的,步骤 (2) 中病毒感染细胞时的感染复数(Multiplicity of Infection, M. O. I.) 为 0.0001~1.5,优选 0.01。

#### [0083] (4) 病毒液的浓缩、灭活

[0084] 采用美国密理博公司的 MINI-PELLICON 标准超滤设备, 分别对猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒进行超滤浓缩, 最终病毒液体积为原体积的 1/5 (即 5 倍浓缩)。病毒浓缩完毕后, 分别采用甲醛溶液灭活, 浓度为 0.1%, 37°C 灭活 24h。

[0085] (5) 二联灭活疫苗的配制

[0086] 将收获的灭活猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒混合液作为水相, 加入乳化剂, 乳化后获得猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗。

[0087] 本发明实施例中使用了 Tidecell 潮汐式生物反应器, 结构见图 1, 其主要组成部分包括: 1 进料桶、2 收料桶、3 自动馈料仪、4pH/DO 监控器、5 恒温振荡箱、6 培养液袋、7 电脑控制器、8 载体罐、9 载体、10 恒温培养舱、11 进 / 取样管。各组成部分的主要功能如下:

[0088] 载体罐放置于恒温培养舱中, 恒温培养舱为载体罐提供一个恒温的环境。载体罐是细胞培养与病毒增殖的场所, 细胞贴附生长在载体罐内部的载体上, 当培养液泵入载体罐时, 载体罐内的培养液液面上升并淹没细胞, 向细胞供给养分, 并将细胞的新陈代谢产物从细胞上去除。当载体罐内的培养液被泵出时, 载体罐中的培养液液面随之下降, 细胞露出, 进行通风供氧。这个重复的运动使载体上的细胞能够得到足够的营养和氧气, 同时产生的代谢废物如 CO<sub>2</sub> 能够有效地被排出去。

[0089] 载体罐的盖子上装有数根管道, 这些管道的作用包括: 人工手动方式向载体罐内注入液体 (如接种细胞悬液等) 或排出载体罐内的液体; 由电脑控制器向载体罐注入气体, 气体通常是压缩空气、氧气及 CO<sub>2</sub> 三种的混合物, 三种气体在混合物中的比例可以自动调节控制, 以适应细胞培养需要。电脑控制器可自动控制混合气体向载体罐内的注入与排出, 并为潮汐提供动力。

[0090] 培养液袋用以盛装培养液, 并通过管道与载体罐底部相通, 通过与载体罐之间的液体流动, 从而完成潮汐过程。培养液在潮汐过程中的灌流速度可通过电脑控制器进行调整。培养液的换液量是指在一次潮汐过程中, 泵入或泵出载体罐的液体量, 换液量的大小决定了载体罐内液面顶部和底部所处的位置。

[0091] 在培养液袋与载体罐之间相连通的管道上设有进 / 取样管, 可使用无菌注射器通过进 / 取样管对培养液进行取样, 用以检测其中的葡萄糖含量及病毒含量等指标。

[0092] 恒温振荡箱通过加热与振荡, 来维持培养液袋内培养液温度的恒定及成分的匀质性。

[0093] 收料桶及进料桶均通过自动馈料仪与培养液袋相连, 培养液袋内的培养液需要进行收获时, 可通过自动馈料仪进入收料桶, 而进料桶内的培养液则可以通过自动馈料仪对培养液袋进行补充。

[0094] pH/DO 监控器可以监测培养液袋内培养液的酸碱度 (pH) 及溶氧 (DO) (溶氧是指氧气在培养液中的溶解饱和度), 并通过向培养液袋内自动注入碱性溶液 (如 NaOH 溶液或 NaHCO<sub>3</sub> 溶液) 将培养液的 pH 值控制在合适范围内。

[0095] 电脑控制器可以调节控制多种参数, 如潮汐过程中载体罐内培养液的潮汐速率及频率、恒温培养舱的温度、溶氧、CO<sub>2</sub> 浓度 (指载体罐内液面上方的混合气体中 CO<sub>2</sub> 所占的体积百分比) 等。

[0096] 对培养液中葡萄糖含量的调节是通过人工方式进行, 根据对培养液中剩余葡萄糖的含量测定结果及培养液的总体积计算出需补加的葡萄糖量, 然后通过注射器将高浓度的

葡萄糖溶液从进 / 取样管处注入培养液。

[0097] 实施例 1 猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备方法

[0098] 本实施例中所用的微载体为聚酯纤维, 制苗用细胞系为 BHK-21 细胞和 ST 细胞, 其中, 猪乙型脑炎病毒使用 BHK-21 细胞增殖, 而猪细小病毒使用 ST 细胞增殖。

[0099] 生物反应器为 10L 载体瓶 Tidecell 潮汐式生物反应器。

[0100] 细胞生长液的配方: BHK-21 细胞的生长液为含 5% (V/V) 胎牛血清的 DMEM (Invitrogen 公司); ST 细胞的生长液为含 5% (V/V) 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM (Invitrogen 公司)。

[0101] 细胞维持液的配方: BHK-21 细胞的生长液为含 1% (V/V) 胎牛血清的 DMEM (Invitrogen 公司); ST 细胞的生长液为含 1% (V/V) 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM (Invitrogen 公司)。

[0102] (1) 细胞接种、吸附与培养

[0103] 10L 生物反应器中, 加入无菌微载体聚酯纤维 650g, 以细胞密度为  $1.0 \times 10^9$  cells/L (即细胞起始浓度相当于  $1.5 \times 10^6$  cells/g 载体) 接入 10L 生物反应器中, 使之与微载体结合, 生物反应器与装有细胞生长液的 37°C 恒温振荡系统 (容量 500L) 连接, 培养条件为吸附程序: 培养液在载体罐中的液面上升速度 5mm/s, 在载体罐中的下降速度 3mm/s, 液面在反应器上下端点停滞时间为 60s/10s。培养温度 37.0°C, pH 值调节 7.3, 溶氧调节 65%, 二氧化碳浓度调节 10%。

[0104] 自运行吸附程序计时, 3h 后启动培养程序: 培养液在载体罐中的液面升降速度均为 4mm/s, 液面在反应器上下端点停滞时间为 50s/50s。灌注培养 3 天, 培养温度 37.0°C, 采用 7.5% (W/V)  $\text{NaHCO}_3$  自动调节 pH 值, 使值控制在 7.2 左右, 溶氧为 50%, 二氧化碳浓度为 5%。细胞接种后按每 24h 的时间点取载体样和培养基样, 控制培养液中葡萄糖浓度 1.0 ~ 4.5g/L。

[0105] 细胞接种之后每间隔 12 小时, 用经灭菌的载体取样棒从载体罐中对载体进行一次取样, 使用细胞计数器监测细胞生长密度。细胞接种后 72 小时, 密度已达到  $3.5 \times 10^{10}$  个/L (即相当于  $5.4 \times 10^7$  cells/g 载体), 可用于病毒接种。

[0106] (2) 病毒的接种、吸附与增殖

[0107] 在 10L 潮汐式生物反应器中, 细胞培养至第 3 天, BHK-21 细胞和 ST 细胞在生物反应器内的密度达  $3.5 \times 10^{10}$  个/L, 把培养基恒温备料槽体中的培养液换成维持液含有 1% 牛血清的 DMEM 或  $\alpha$ -MEM 培养基, 按 M. O. I. 为 0.01 分别接种猪乙型脑炎病毒 (BHK-21 细胞) 和猪细小病毒 (ST 细胞)。

[0108] 运行接毒程序: 细胞生长液在载体罐中的液面上升速度 4mm/s, 下降速度 2mm/s, 液面在反应器顶部停留 55s, 底部停留 10s, 病毒吸附 3h。之后, 运行病毒培养程序: 细胞维持液在载体罐中的液面上升与下降速度均为 4mm/s, 液面在反应器顶部停留 50s, 底部停留 50s。培养温度 36.5°C; 采用 7.5% (W/V)  $\text{NaHCO}_3$  自动调节 pH, 使 pH 值维持在 7.2; 溶氧为 30%, 二氧化碳浓度为 3%。病毒吸附程序结束后, 继续运行细胞培养程序, 此时参数根据二氧化碳浓度利用 7.5% (W/V)  $\text{NaHCO}_3$  自动调节 pH 值 7.3, 溶氧为 45%, 二氧化碳浓度为 5%。

[0109] (3) 病毒收获

[0110] 从病毒接种后的 24 小时开始, 每间隔 12 小时对培养液 (即病毒液) 进行一次取

样,用显微镜法检测病毒液的 CPE。培养至接毒后第 3 天检测到 CPE 大于 75%,分别收获病毒液。收获时,先对载体瓶运行病毒液排除程序,使之全部流入恒温振荡系统中,对恒温振荡系统中的病毒液,采用 50L 的自动收集桶,按照 5L/min 的流速进行收集。经 -20℃ 反复冻融 2 次后合并 in 收料桶。收获的猪乙型脑炎病毒及猪细小病毒滴度都为  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

[0111] (4) 病毒液浓缩、灭活

[0112] 收获的病毒液,经美国密理博公司的 MINI-PELLICON 标准超滤设备,先对病毒液进行粗滤,滤除病毒液中的杂质;然后采用 50KD 和 30KD 截流分子量的超滤膜包,分别对猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒进行超滤浓缩,最终各病毒液体积为原体积的 1/5(即 5 倍浓缩)。浓缩完毕后,分别采用甲醛溶液灭活,使用灭活剂浓度为 0.1%,37℃ 灭活 24h,完全灭活猪乙型脑炎和猪细小病毒。

[0113] (5) 二联灭活疫苗的配置:

[0114] 1) 油相制备:取法国赛比克公司的疫苗佐剂 ISA206、ISA15AVG 和 IMS251CVG 3 种佐剂,121℃ 灭菌 30min 后冷却至室温备用。

[0115] 2) 水相配置:检验合格的猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒灭活抗原混合液作为水相。

[0116] 3) 油相与水相的配置:将检验合格的猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒灭活抗原混合液(按 1:1 体积比例混合均匀)与进口疫苗佐剂 ISA206、ISA15AVG 和 IMS251CVG 3 种佐剂按 1:1 的体积比混合,在 500~800rpm/min 的转速下搅拌 10min,在终止搅拌前加入 1% (W/V) 硫柳汞溶液,使其终浓度为万分之一,充分振荡混匀,分装后 2~8℃ 保存即可完成猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的制备。

[0117] 根据后续的一系列实验结果,疫苗佐剂 ISA206 的稳定性、效力、保存期等效果优于其他两种佐剂 (ISA15AVG 和 IMS251CVG),因此本发明优选 ISA206 佐剂为疫苗制备佐剂。

[0118] 实施例 2 猪乙型脑炎病毒与猪细小病毒二联灭活疫苗的检验

[0119] 1. 二联灭活疫苗的成品检验:

[0120] 物理性状检验:

[0121] a) 外观:为乳白色或淡红色均匀乳剂。

[0122] b) 剂型:为双向型,即水包油包水 (W/O/W)。取清洁吸管,吸取少量疫苗滴于清洁冷水中,除第 1 滴外,均呈油滴状不扩散。

[0123] c) 稳定性:取疫苗 10ml 加入离心管中,经 3,000rpm/min 离心 15min,不分层,管底析出水相 ≤ 0.5ml;取疫苗在 37℃ 左右放置 21d,结果显示不分层,没有破乳现象。

[0124] d) 黏度:用 1ml 清洁吸管(下口径 1.2mm,上口径 2.7mm)吸取 25℃ 左右的疫苗 1ml 令其垂直自然流出,记录流出 0.4ml 所需时间,结果显示,3 次流出时间均在 8s 内。

[0125] 无菌检验:按《中国兽药典》附录进行,无菌生长。

[0126] 支原体检验:按现行《中国兽药典》附录进行检验,无支原体生长。

[0127] 甲醛及硫柳汞含量测定:按《中国兽药典》附录进行,甲醛及硫柳汞含量不超过规定的含量。

[0128] 2. 二联灭活疫苗的安全性试验

[0129] 将实验室试制的 3 批疫苗(批号分别为 201001、201002 和 201003)分别进行了安全性试验。试验内容包括对 3~5 日乳鼠、10~20kg 仔猪、5~6 月龄青年后备母猪、种公

猪、怀孕母猪分别进行 1 次单剂量接种、超剂量接种、单剂量重复接种的安全性试验。试验结果表明 3 批疫苗接种动物后,均未出现红肿、瘙痒、破溃等局部反应,采食和精神状态正常,无全身反应。将部分免疫动物 28 天扑杀,取注射部分组织制备成切片,观察组织病变。结果显示,3 批疫苗免疫动物后,对注射部位无损伤,表明疫苗安全性好。

### [0130] 3. 二联灭活疫苗的效力试验

[0131] 将实验室试制的 3 批疫苗(批号分别为 201001、201002 和 201003)分别进行免疫效力试验,内容包括:最小免疫剂量试验、HI 抗体滴度与免疫攻毒保护相关性试验、豚鼠的 HI 抗体滴度与猪的 HI 抗体相关性试验。

[0132] 最小免疫剂量试验:将 3 批疫苗分别以 0.2ml、1.0ml、2.0ml/头免疫青年后备母猪、5~6 月龄种公猪,28 天后采血分离血清,测定 HI 抗体效价,结果见表 1。结果显示,免疫 0.2ml/头,猪乙型脑炎 HI 抗体效价不低于 1:32;免疫 1.0ml/头,猪乙型脑炎 HI 抗体效价不低于 1:64;免疫 2.0ml/头,猪乙型脑炎 HI 抗体效价不低于 1:128。同时,免疫 0.2ml/头,猪细小 HI 抗体效价不低于 1:32;免疫 1.0ml/头,猪细小 HI 抗体效价不低于 1:64;免疫 2.0ml/头,猪细小 HI 抗体效价不低于 1:128。根据文献报道,免疫后猪乙型脑炎 HI 抗体效价在 1:40 以上,猪细小 HI 抗体效价在 1:64 以上,即可达到攻毒保护效果。因此,二联灭活最小免疫剂量是 1.0ml/头。

### [0133] 表.1 二联灭活疫苗最小免疫剂量试验结果

[0134]

免疫剂量 (ml/头)	动物类型	抗体水平(平均 HI 值)					
		抗猪乙型脑炎病毒(不同批次)			抗猪细小病毒(不同批次)		
		1	2	3	1	2	3
0.2	后备母猪	48.3	45.8	50.5	56.2	50.3	57.5
	种公猪	38.6	37.3	45.2	44.5	45.3	48.6
1.0	后备母猪	88.2	110.7	95.8	108.4	134.5	124.3
	种公猪	105.4	115.0	98.5	115.4	125.0	108.5
2.0	后备母猪	238.5	176.2	262.5	273.3	215.2	311.4
	种公猪	166.4	214.3	236.8	204.5	251.4	277.8

[0135] HI 抗体滴度与免疫攻毒保护相关性试验:将 3 批疫苗分别免疫后备母猪,在 7、14、21、28 日采血测血清 HI 抗体,取抗体为 1:16、1:32、1:64 和 1:128 的猪,以猪乙型脑炎病毒(含量  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)和猪细小病毒(含量  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml)4ml 分别滴鼻攻毒,在攻毒后 5、7、9 日采血,综合三次测定结果,测定有无病毒血症,并跟踪母猪产仔情况,结果见表 2。结果表明,当乙脑 HI 抗体效价不低于 1:32 时,攻毒保护率可达 90%以上;当细小 HI 抗体效价不低于 1:32 时,攻毒保护率可达 95%以上。考虑到疫苗临床使用时的复杂情况,为保证疫苗实际使用的免疫保护效果,确定疫苗效力检验时,检验标准为免疫 28 日后,其血清猪乙型脑炎和猪细小 HI 抗体效价均不低于 1:64。

### [0136] 表.2 HI 抗体滴度与免疫攻毒保护相关性试验结果

[0137]

抗体滴度	病毒	病毒血症 (天)			保护率 (%)
		3	5	9	
1:16	猪乙型脑炎病毒	+	+	+	76.5
	猪细小病毒	+	+	—	80.4
1:32	猪乙型脑炎病毒	+	—	—	90.3
	猪细小病毒	—	—	—	95.2
1:64	猪乙型脑炎病毒	—	—	—	100.0
	猪细小病毒	—	—	—	100.0
1:128	猪乙型脑炎病毒	—	—	—	100.0
	猪细小病毒	—	—	—	100.0

[0138] 备注：“+”表示检测结果阳性，“-”表示检测结果阴性。

[0139] 与此同时我们进行了豚鼠的免疫效力平行实验，即同时将实验室试制的 3 批疫苗，分别免疫 350g 左右的豚鼠 0.5ml/只，后备母猪和种公猪各 2.0ml/头，均于免疫 14、21、28、35、42 日采血分离血清，测定 HI 抗体效价，结果见表 3。结果显示同一批疫苗免疫后，随着免疫时间的增长，豚鼠、后备母猪和种公猪的 HI 抗体效价逐步升高，至 28 日豚鼠的猪乙型脑炎和细小 HI 抗体效价不低于 1 : 128，而后备母猪和种公猪的猪乙型脑炎和细小 HI 抗体效价均不低于 1 : 128。比较各组免疫后，同一时间豚鼠的血清 HI 抗体效价与猪的血清 HI 抗体效价，可看出二者有明显的平行关系，因此可以用实验动物（豚鼠）代替本动物（猪）做免疫效力检验。标准确定为体重为 350g 左右、猪乙型脑炎和猪细小 HI 抗体均为阴性豚鼠 5 只，各肌肉注射疫苗 0.5ml。28 日后采血，测定抗体，其中 4 只豚鼠的猪乙型脑炎和猪细小 HI 抗体效价均应  $\geq 1 : 64$  判为合格。

[0140] 表 . 3 豚鼠和猪做免疫效力平行试验结果

[0141]

动物类型	免疫剂量 (ml)	抗体水平 (3 批疫苗平均 HI 值)									
		抗猪乙型脑炎病毒 (不同天数)					抗猪细小病毒 (不同天数)				
		14	21	28	35	42	14	21	28	35	42
豚鼠	0.5	54.2	146.3	223.1	256.5	291.4	69.1	166.3	243.7	296.2	312.5
后备母猪	2.0	58.7	153.5	215.4	247.2	283.1	70.8	179.1	258.2	287.5	303.4
种公猪	2.0	52.3	137.6	195.3	228.9	258.4	67.2	153.6	227.4	263.5	288.4

[0142] 4. 免疫持续期试验与免疫程序确定

[0143] 将实验室试制的 3 批疫苗 (批号分别为 201001、201002 和 201003)，分别免疫初产母猪 (两组：一组配种前 1 个月免疫 1 次，一组首免 2 ~ 4 周后加强免疫 1 次)，经产母猪 (配种前 3 ~ 4 周免疫 1 次)、5 ~ 6 月龄种公猪 (免疫 1 次)，于免疫后 28 日、2 个月、3 个月、6 个月、9 个月、12 个月分别采血，测定血清中猪乙型脑炎和猪细小的抗体效价，分析

抗体消长规律,确定疫苗的免疫持续期,结果见表 4。结果表明,初产母猪首免后,2~4 周后加强免疫 1 次与经产母猪免疫 1 次,免疫后的抗体高峰均在 2~5 个月,6 个月后其抗体水平开始下降,至 9 个月抗体效价降至较低水平,初产母猪(配种前免疫 1 次)和 5~6 月龄种公猪(免疫 1 次)的抗体规律与经产猪基本相同,但抗体高峰值低于经产猪和加强免疫的初产母猪,且至 6 个月时抗体效价下降较快,因此将疫苗的免疫持续期定为 6 个月。

[0144] 根据猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒感染发病特点及抗体消长规律,确定使用该疫苗的免疫程序为:初产母猪配种前免疫 1 次,24 周后加强免疫 1 次,每次 2ml/头;经产母猪配种前 3~4 周免疫 1 次,2ml/头;种公猪每 6 个月免疫 1 次,2ml/头。

[0145] 表.4 免疫持续期试验结果

[0146]

动物类型	免疫方式	抗体水平(3批疫苗平均 HI 值)											
		抗猪乙型脑炎病毒(不同时间)						抗猪细小病毒(不同时间)					
		28(天)	2(月)	3(月)	6(月)	9(月)	12(月)	28(天)	2(月)	3(月)	6(月)	9(月)	12(月)
初产母猪	配种前 1 个月免疫 1 次	174.6	212.7	453.6	236.5	107.8	45.2	213.5	254.2	463.1	257.5	102.1	57.4
	首免 2~4 周后加强免疫 1 次	248.3	384.5	547.2	323.0	186.5	85.7	263.4	301.6	565.2	340.1	209.0	104.7
经产母	配种前 3~4	270.4	315.2	496.6	264.5	131.2	67.3	289.0	337.7	533.6	312.0	184.8	68.3

[0147]

猪	周免疫 1 次												
种公猪	5~6 月龄免疫 1 次	217.5	263.2	419.3	232.7	116.5	58.4	242.8	281.5	451.3	239.7	128.4	63.4

[0148] 5. 二联灭活疫苗的保存期试验

[0149] 将实验室试制的 5 批二联灭活疫苗(批号分别为 201001、201002201003、201004 和 201005),放在 2~8℃ 条件下保存,并在 6、9、12 和 15 个月分别取样进行性状、无菌检验,取其中 3 批进行安全性及免疫效力检验。结果 5 批疫苗在 2~8℃ 条件下保存 15 个月,疫苗的剂型、黏度、稳定性等性状均未发生显著变化,无菌检验 5 批 5/5 无菌生长;安全检验结果,3 批疫苗贮藏在 2~8℃ 6、9、12 和 15 个月,接种 3~5 日乳鼠、10~20kg 仔猪均未见

全身及局部反应,5/5 健活,安全检验结果符合规定,证明该疫苗 2~8℃贮藏 15 个月,仍具有良好的安全性;效力检测结果,3 批疫苗 2~8℃保存 6、9、12 和 15 个月,用猪和豚鼠两种效力检验方法,28 日后测定 HI 抗体,3 批疫苗免疫豚鼠后猪乙型脑炎和猪细小的 HI 抗体效价不低于 1:128,猪血清中的猪乙型脑炎和猪细小 HI 抗体效价也不低于 1:128,表明 15 个月后疫苗的免疫效力仍符合免疫保护要求,结果见表 5。对疫苗在 2~8℃保存不同时间的各项检验结果表明,疫苗贮藏 15 个月后,各项检验结果均符合规定。考虑到疫苗运输、贮藏条件的不确定性,为确保用于动物预防疫苗的安全、有效,故将疫苗的保存期定为 12 个月。

[0150] 表 .5 二联灭活疫苗的保存期试验结果

[0151]

动物类型	抗体水平 (3 批疫苗平均 HI 值)							
	抗猪乙型脑炎病毒 (不同时间)				抗猪细小病毒 (不同时间)			
	6 (月)	9 (月)	12 (月)	15 (月)	6 (月)	9 (月)	12 (月)	15 (月)
豚鼠	201.3	195.2	164.5	140.8	243.4	214.7	185.6	167.8
仔猪	196.2	175.4	153.5	129.0	230.2	208.7	197.2	152.5

[0152] 6. 二联灭活疫苗与市售同类制品的对比试验

[0153] 购得市售武汉中博生物股份有限公司产品猪乙型脑炎病毒灭活疫苗单苗和猪细小病毒灭活疫苗单苗,与试验苗进行免疫抗体滴度、免疫持续期、疫苗保存期比较。本试验均与前述的相关试验同步进行,结果表明:实验猪和豚鼠,28 日采血,其血清中猪乙型脑炎 HI 抗体效价不低于 1:128,而市售单苗不低于 1:64;血清中猪细小 HI 抗体效价不低于 1:128,而市售单苗最高的才 1:128;虽然试验苗和市售猪乙型脑炎和猪细小单苗均可满足免疫保护要求,但免疫试验苗产生的抗体效价高于市售单苗。

[0154] 在疫苗免疫后 3、6、9 和 12 个月,分别采血测定实验苗和市售单苗免疫猪的 HI 抗体效价,结果表明:在免疫后 6 个月内,试验苗的 HI 抗体效价均能维持在相对较高的水平,即猪乙型脑炎和猪细小 HI 抗体效价 $\geq$ 1:128。而用市售疫苗免疫的实验猪,HI 抗体效价也可以达到免疫保护要求,即猪乙型脑炎和猪细小的 HI 抗体效价 $\geq$ 1:64。虽然市售的单苗与试验苗免疫持续期基本,但血清 HI 抗体效价低于试验苗。

[0155] 2~8℃贮藏了 6、9、12 和 15 个月的疫苗,各组免疫猪产生的猪乙型脑炎和猪细小的 HI 抗体符合免疫保护要求,但试验苗的 HI 抗体效价高于市售猪乙型脑炎和猪细小单苗。

[0156] 上述试验苗和市售猪乙型脑炎和猪细小单苗的对比实验表明,试验苗在免疫抗体滴度、免疫持续期、疫苗保存期等方面优于目前市场使用的单苗。

[0157] 实施例 3:潮汐式生物反应器与其他病毒培养方式的比较

[0158] 1. 潮汐式生物反应器与转瓶培养的比较

[0159] 1) 在 10L 转瓶中生产猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒,先将 BHK-21 细胞 (接种猪乙型脑炎病毒) 和 ST 细胞 (接种猪细小病毒) 进行细胞的复苏、方瓶扩增培养,再以终浓度为  $4.5 \times 10^4$  cells/ml 接种至 10L 转瓶,加细胞生长液至 3.0L。至 37℃温室中于转瓶机上以 5 转/h 培养,以此方式培养细胞至 3 天分别接种猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒,接毒前,先把 10L 转瓶中的细胞生长液倒掉,然后按 M. O. I. 为 0.01 分别进行接毒,补加细胞维持液



至 3.0L, 至 37℃ 温室中于转瓶机上以 10 转/h 培养, 此过程为病毒吸附 1h 后, 1h 后把转瓶机的转速改为 5 转/h, 其他条件不变, 自接毒之时起算培养至第 3 天, 收获病毒液, 即 10L 转瓶连同其中的细胞、细胞维持液置 -20℃ 冻融两次后收获, 测定病毒滴度  $TCID_{50}$ 。

[0160] 2) 在 10L 的生物反应器中分别生产猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒, 方法步骤同实施例 1。

[0161] 3) 实验结果: 10L 转瓶中培养猪乙型脑炎病毒的平均滴度为  $10^{7.2}TCID_{50}/ml$ , 而 10L 反应器中的病毒平均滴度为  $10^{8.0}TCID_{50}/ml$ ; 10L 转瓶中培养猪细小病毒的平均滴度为  $107.5TCID_{50}/ml$ , 而 10L 反应器中的病毒平均滴度为  $10^{8.5}TCID_{50}/ml$ 。各项参数比较具体见表 6。

[0162] 表 .6 潮汐式生物反应器与转瓶培养的结果比较

培养方式	10L 生物反应器	10L 转瓶培养系统
细胞贴壁面积	$1.56 \times 10^6 cm^2$	$3000 cm^2$
占地面积	$20 m^2$	$150 m^2$
人工投入	2 个人 × 4 h	30 个人 × 8 h
耗材成本	低	高
[0163] 清洗成本	低	高
收获病毒	50L	3L
病毒毒价	$10^{8.0} TCID_{50}/ml$ (猪乙型脑炎病毒); $10^{8.5} TCID_{50}/ml$ (猪细小病毒)	$10^{7.2} TCID_{50}/ml$ (猪乙型脑炎病毒); $10^{7.5} TCID_{50}/ml$ (猪细小病毒)
操作工艺	全自动微电脑控制	程序繁琐

[0164] 2. 潮汐式与搅拌式生物反应器培养的比较

[0165] 1) 搅拌式生物反应器: 美国 NBS 公司 14L 生物反应器;

[0166] 微载体: Cytodex-1 (通用电气医疗集团生命科学部);

[0167] 细胞生长液的配方: BHK-21 细胞的生长液为含 5% (V/V) 胎牛血清的 DMEM (Invitrogen 公司); ST 细胞的生长液为含 5% (V/V) 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM (Invitrogen 公司)。

[0168] 细胞维持液的配方: BHK-21 细胞的生长液为含 1% (V/V) 胎牛血清的 DMEM (Invitrogen 公司); ST 细胞的生长液为含 1% (V/V) 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM (Invitrogen 公司)。

[0169] 细胞培养: 分别在生物反应器内, 按照 10g/L 的浓度加入 Cytodex-1, 水化后, 用 pH7.2 的 PBS 洗涤 2 遍, 灭菌, 加入细胞生长液, 分别接种 BHK-21 和 ST 细胞, 进行培养; 培养的方法参数为: pH7.2、37℃、溶氧 40%、搅拌速度 30 ~ 100rpm; 每 12h 取样观察细胞生长情况, 进行细胞计数, 测定葡萄糖的消耗, 当细胞的密度达到  $1.5 \times 10^6/ml$  时, 开始灌注, 灌注的速度依据细胞密度的递增、葡萄糖的消耗以每天 0.5 ~ 4 个工作体积, 以维持细胞的生长, 培养 4 天, 细胞的密度达到  $8 \times 10^6/ml$ 。

[0170] 病毒增殖: 细胞的密度达到  $8 \times 10^6/ml$ , 更换病毒维持液, 按照 0.01MOI 分别接种猪乙型脑炎病毒 (BHK-21 细胞) 和猪细小病毒 (ST 细胞); 接毒后 6h 开始灌注培养, 以维

持病毒繁殖必需的营养物质,待细胞病变达到 75% 以上时,结束培养,收获细胞和细胞维持液,置 -20℃ 冻融两次后测定病毒滴度  $TCID_{50}$ 。

[0171] 2) 在 10L 的潮汐式生物反应器中分别生产猪乙型脑炎病毒和猪细小病毒,方法步骤同实施例 1。

[0172] 3) 实验结果:14L 搅拌式反应器中培养猪乙型脑炎病毒的平均滴度为  $10^{7.6}TCID_{50}/ml$ ,而 10L 潮汐式反应器中的病毒平均滴度为  $10^{8.0}TCID_{50}/ml$ ;14L 搅拌式反应器中培养猪细小病毒的平均滴度为  $10^{8.0}TCID_{50}/ml$ ,而 10L 潮汐式反应器中的病毒平均滴度为  $10^{8.5}TCID_{50}/ml$ 。各项参数比较具体见表 7。

[0173] 表 .7 潮汐式与搅拌式生物反应器的结果比较

[0174] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0175]

培养方式	潮汐式	搅拌式
接种效率	高	高
混合效率	好	好
剪切力	低	高
氧气供应	充足	一般
放大培养	容易	一般
病毒效价	$10^{8.0} TCID_{50}/ml$ (猪乙型脑炎病毒); $10^{8.5} TCID_{50}/ml$ (猪细小病毒)	$10^{7.6} TCID_{50}/ml$ (猪乙型脑炎病毒); $10^{8.0} TCID_{50}/ml$ (猪细小病毒)

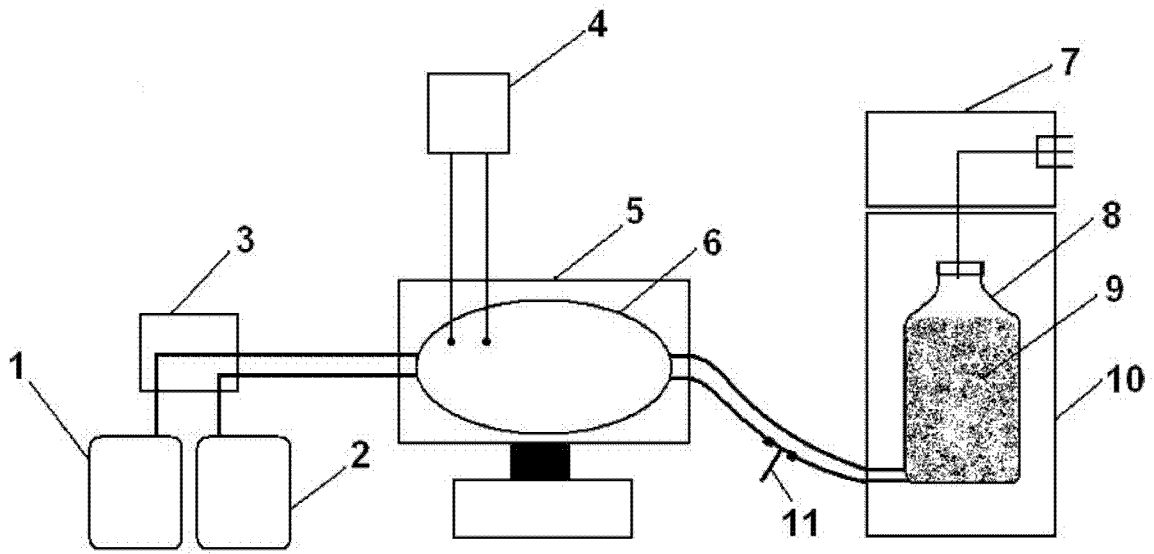


图 1