



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106957860 A

(43)申请公布日 2017.07.18

(21)申请号 201710140542.2

(22)申请日 2017.03.10

(71)申请人 江苏省农业科学院

地址 210000 江苏省南京市孝陵卫钟灵街
50号

(72)发明人 吴培培 唐应华 冯磊 陈丽
恽君雯 侯继波

(74)专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
32206

代理人 张慧清

(51)Int.Cl.

C12N 15/866(2006.01)

C12N 15/44(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的制备方法

(57)摘要

本发明涉及H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的制备方法,属于生物技术领域。利用SF9和HiFi两种昆虫细胞,分别对H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的种毒和接种有种毒的疫苗进行高效增殖,从而克服了当前以鸡胚组织苗为基础的疫苗生产技术的不足,可以在反应器中实现无血清悬浮培养,大大降低了生产成本,缩短了生长周期,可以快速扩大生产规模,减少人力资源,显著提高疫苗的产量和质量。

1. H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的制备方法,其特征是,该制备方法是利用HiFi细胞培养增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗,所述的H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗是将表达重组表达H5亚型禽流感病毒HA蛋白的杆状病毒种毒接种在HiFi细胞中培养增殖得到。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征是,所述表达重组表达H5亚型禽流感病毒HA蛋白的杆状病毒种毒是利用Sf9细胞复制、繁殖得到的。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征是,所述的HiFi细胞是通过多轮单克隆筛选这一高效增殖筛选机制获得的增殖杆状H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的能力HA效价达到 $11-12\log_2$ 的细胞株。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征是,所述的Sf9细胞是通过多轮单克隆筛选这一高效增殖筛选机制获得的增殖杆状H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗种毒的能力达到 $10^{8.5}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的细胞株。

5. 根据权利要求1至4中任意一项所述的制备方法,其特征是,所述制备方法包括以下步骤,(1)培养用于增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗中毒的Sf9-HA细胞;(2)将种毒接种于Sf9-HA细胞,并培养增殖,收获种毒;(3)培养用于增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的HiFi-HA细胞;(4)将种毒接种于HiFi-HA细胞,并培养增殖,收获H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征是,步骤(2)中种毒的接种量为MOI $0.1\sim 1$ 。

7. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征是,步骤(4)中种毒的接种量为MOI $1\sim 4$ 。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征是,步骤(2)和步骤(4)中病毒在反应器中的增殖条件为:溶氧量为 $40\sim 60\%$ 的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为 $60\sim 100\text{rpm}$;pH为 $6.0\sim 6.5$;温度为 27°C 。

H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的制备方法,属于生物技术领域。

[0002]

背景技术

[0003] H5亚型禽流感病毒严重危害我国养殖业的发展,对公共安全卫生造成威胁。在部分养殖密度较高的地区,禽流感已成为制约当地经济发展的重要因素。尤其是近年来爆发的H5N1亚型高致病性禽流感病毒不仅引起禽类的大面积发病、死亡,更对人类健康构成了严重威胁。预防该病最行之有效的办法就是疫苗的接种,而目前市场生产的禽流感疫苗均为鸡胚组织苗。

[0004] 利用鸡胚繁殖病毒制备禽流感疫苗的生产过程中涉及活病毒操作,会对环境的生物安全产生威胁。同时在禽流感流行时由于受到鸡胚供应的限制,疫苗生产存在生产周期长和产量低等缺点。

[0005] 因此,人类社会亟需一种能够快速反应、大量生产的新型H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的生产方式。

[0006] 昆虫杆状病毒系统(Baculovirus expression vector system, BEVS)作为一种真核表达载体系统,具有安全性高,对外源基因克隆容量大,重组病毒易于筛选,具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点,目前已成为基因工程四大表达系统(即杆状病毒、大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统)之一。同时由于昆虫细胞属于半贴壁半悬浮细胞,对于实现大规模生产病毒或重组蛋白提供了很好的条件。

[0007] 但是,目前现有技术中尚未有报道公开利用昆虫杆状病毒系统来增殖生产H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的方法。因此,我们需要在利用昆虫杆状病毒系统增殖生产疫苗的实现过程中解决以下技术问题:首先,选择何种细胞株用于H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的生产;其次,如何获得能够高效增殖的,满足疫苗生产的细胞株;最后,我们还需要寻找到适合的培养生产工艺条件,从而保证疫苗生产的高效、安全,有利于工业化推广和实际应用推广。

发明内容

[0008] 本发明的发明目的是提供一种新的利用昆虫杆状病毒增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的方法。

[0009] 为了实现这一目的,我们公开了以下技术方案。

[0010] 首先,我们公开了利用HiFi细胞培养增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗,并且进一步地,我们公开所述的H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗是将表达重组表达H5亚型禽流感病毒HA蛋白的杆状病毒种毒接种在HiFi细胞中复制繁殖的。

[0011] 其中,优选表达重组表达H5亚型禽流感病毒HA蛋白的杆状病毒种毒是利用Sf9细胞复制、繁殖。

[0012] 所述的HiFi细胞是指粉纹夜蛾卵巢细胞,属于昆虫细胞的一种。所述的Sf9是指草地贪夜蛾细胞,也是昆虫细胞的一种。

[0013] 进一步地,我们对HiFi细胞和Sf9细胞进行了单克隆筛选,利用这一高效增殖机制的筛选获得的HiFi细胞和Sf9细胞可以与病毒之间建立良好的匹配关系,从而使得繁殖获得的H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗血凝效价达到 2^{12} ,利用这一亚单位疫苗制备的灭活疫苗抗体效价达到 $8.17\log_2$,效果优于常规疫苗。

[0014] 具体地,这一筛选方式描述如下:将经过无血清驯化后的Sf9细胞用滴管重悬吹散后,利用96孔板进行多轮细胞单克隆化筛选,我们将96孔板的行以A-H标示,列以1-12标示,位于左上角的第一个孔的坐标即标记为A1,以此类推96个孔中的每一个孔都获得了一个标记号。

[0015] 然后将 $200\mu\text{l}$ 体积的细胞悬液加入到A1孔内,细胞数1000个,然后用8道移液器在所有孔中加入 $100\mu\text{l}$ 细胞培养液,从A1孔上下混匀吸出 $100\mu\text{l}$ 加入B1孔,再从B1孔上下混匀吸出 $100\mu\text{l}$ 加入C1孔,以此类推,依次进行一级稀释至H1孔;然后,分别用8道移液枪从A1-H1孔中上下混匀吸出 $100\mu\text{l}$,加入到A2-H2孔内,以此类推,依次进行二级稀释至A12-H12孔,这样就获得了多个单细胞孔,待单细胞孔中的细胞长满单孔时,挑选细胞形态均一,生长性能良好的细胞株扩增。

[0016] 向经过多轮细胞单克隆化筛选获得的细胞株进行H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗种毒的增殖,以杆状病毒TCID₅₀为检测标准,筛选获得增殖杆状H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗种毒的能力达到 $10^{8.5}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的细胞株作为用于表达重组表达H5亚型禽流感病毒HA蛋白的杆状病毒种毒的Sf9细胞备用。

[0017] 针对HiFi细胞来说,其筛选的方式描述如下:将经过无血清驯化后的HiFi细胞用滴管重悬吹散后,利用96孔板进行多轮细胞单克隆化筛选,我们将96孔板的行以A-H标示,列以1-12标示,位于左上角的第一个孔的坐标即标记为A1,以此类推96个孔中的每一个孔都获得了一个标记号。

[0018] 然后将 $200\mu\text{l}$ 体积的细胞悬液加入到A1孔内,细胞数1000个,然后用8道移液器在所有孔中加入 $100\mu\text{l}$ 细胞培养液,从A1孔上下混匀吸出 $100\mu\text{l}$ 加入B1孔,再从B1孔上下混匀吸出 $100\mu\text{l}$ 加入C1孔,以此类推,依次进行一级稀释至H1孔;然后,分别用8道移液枪从A1-H1孔中上下混匀吸出 $100\mu\text{l}$,加入到A2-H2孔内,以此类推,依次进行二级稀释至A12-H12孔,这样就获得了多个单细胞孔,待单细胞孔中的细胞长满单孔时,挑选细胞形态均一,生长性能良好的细胞株扩增。

[0019] 向经过多轮细胞单克隆化筛选获得的细胞株进行H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的增殖,以已培养物HA效价为检测标准,筛选获得增殖杆状H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的能力达到 $11-12\log_2$ 的细胞株作为用于表达重组表达H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的HiFi细胞备用。

[0020] 最后,我们还公开了疫苗生产培养工艺条件,包括以下步骤,(1)培养用于增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗中毒的Sf9-HA细胞;(2)将种毒接种于Sf9-HA细胞,并培养增殖,收获种毒;(3)培养用于增殖H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的HiFi-HA细胞;(4)将种毒接种于HiFi-HA细胞,并培养增殖,收获H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗。

[0021] 其中,步骤(2)中种毒的接种量为MOI0.1~1,步骤(4)中种毒的接种量为MOI1~4。

[0022] 步骤(2)和步骤(4)中,病毒在反应器中的增殖条件为:溶氧量为40~60%的溶液饱和和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。

[0023] 具体地,这一疫苗生产培养工艺条件可以描述为,包括以下步骤:

(1) 用于增殖H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的sf9-HA细胞的培养:

a: 摇瓶增殖自悬浮SF9-HA细胞的方法:将复苏的细胞重悬在无血清培养基中,在100mL摇瓶中自悬浮培养,培养96h后,按照1:4的比例进行传代;

b: 搅拌式反应器自悬浮增殖SF9-HA细胞的方法:将扩增的SF9-HA细胞按照 $1\sim 2\times 10^6$ cell/mL的初始密度接种至新鲜无血清培养基中;溶氧量为40~60%的溶液饱和和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。培养72~96h后,细胞达到能够接种H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗制备种毒的要求 $2\sim 4\times 10^6$ cell/mL;

(2) 种毒的增殖与收获:步骤1中细胞达到接种要求后,进行以下步骤:将种毒按照MOI 0.1~1的接种量通过补液装置进入反应器中培养,同时添加新鲜无血清培养基至原培养体积的2倍,继续培养;病毒在反应器中的增殖的条件:溶氧量40~60%的溶液饱和和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。培养72~96h后,种毒效价达到 $10^{8.5}$ TCID₅₀/mL,达到后期接毒的标准,低温保存备用。

[0024] (3) 用于增殖H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的HiFi-HA细胞的培养:

摇瓶增殖自悬浮HiFi-HA细胞的方法:将复苏的细胞重悬在无血清培养基中,在100mL摇瓶中自悬浮培养,培养96h后,按照1:5的比例进行传代;

搅拌式反应器自悬浮增殖HiFi-HA细胞的方法:将扩增的HiFi-HA细胞按照 $1\sim 2\times 10^6$ cell/mL的初始密度接种至新鲜无血清培养基中;溶氧量为40~60%的溶液饱和和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。培养72~96h后,细胞达到能够接种H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的要求 $2\sim 4\times 10^6$ cell/mL;

H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的增殖与收获:步骤3中细胞达到接种要求后,进行以下步骤:将种毒按照MOI 1~4的接种量通过补液装置进入反应器中培养,同时添加新鲜无血清培养基至原培养体积的2倍,继续培养;病毒在反应器中的增殖的条件:溶氧量40~60%的溶液饱和和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。培养72~96h后,H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗HA效价达到 $2^{11\sim 12}$,符合制苗要求。

[0025] 其中Sf9-HA细胞和HiFi-HA细胞是指前述的经过多轮细胞单克隆化筛选获得的细胞株。

[0026] 本发明所公开的H5亚型禽流感病毒HA亚单位疫苗的制备方法克服了当前以鸡胚组织苗为基础的疫苗生产技术的不足,可以在反应器中实现无血清悬浮培养,大大降低了生产成本,缩短了生长周期,可以快速扩大生产规模,减少人力资源,显著提高疫苗的产量和质量。

[0027] 同时,本发明提供H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的培养过程中不需要添加血清,安全性高,不存在被外源病毒污染的可能。

[0028] 另外,本发明应用生物反应器进行疫苗生产,具有自动化程度高,生产工艺简单稳定,减少人工操作。产量大,占地小。

[0029] 同时,本发明提供H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗制备方法,该方法简单、安全、高效,得到的病毒液效价高、质量稳定,适合工业放大培养。

[0030] 最后,通过本发明所公开的技术方案后获得的H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗制备疫苗接种后,抗体效价高,持续期长,能够有效保护接种动物。

附图说明

[0031] 图1为疫苗免疫后抗体效价检测结果。

[0032]

具体实施方式

[0033] 为了更好的理解本发明,下面我们结合具体的实施例对本发明进行进一步的阐述。

[0034] 除非有特殊说明,本发明实施例中所用的试剂、仪器等均为市售产品。

[0035] 材料说明

按照公开文献《H5亚型禽流感病毒HA基因杆状病毒系统的表达及活性鉴定》(畜牧与兽医2014年第46卷第3期:15-19)中公开的方式获得H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒。

[0036] 用于Sf9-HA细胞培养的无血清培养基为GIBCO生产Sf-900™ II SFM。

[0037] 用于HiFi-HA细胞培养的无血清培养基为GIBCO生产Express Five™ SFM。

[0038] 实施例1 高效增殖H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的SF9细胞株(SF9-HA)的筛选

SF9-HA细胞株是从草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) 卵巢细胞系SF9中筛选获的。具体筛选步骤如下:

SF-9细胞在无血清的培养基中进行适应和驯化,无血清培养基采用GIBCO公司生产Sf-900™ II SFM。

[0039] 传代至2~4代后,得到明显适应无血清培养的SF9细胞株,将细胞用滴管重悬吹散后,进行多轮细胞单克隆化筛选,单克隆筛选方法如下:将200u1体积的细胞悬液加入96孔板的左上角一孔,即A1孔,(细胞数1000个细胞),然后用8道移液器在所有孔中加100u1细胞培养液。从A1孔上下混匀吸出100u1,加入B1孔,以此类推,依次进行一级稀释;用8道移液器从A1~H1孔,上下混匀吸出100u1,加入A2~H2孔,以此类推,依次进行二级稀释;理论上可以得到多个单细胞孔。待单细胞孔细胞长满单孔,挑选细胞形态均一,生长性能良好的细胞株扩增、冻存、备用。

[0040] 将筛选获得细胞株进行H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的增殖,以杆状病毒TCID₅₀为检测标准,筛选获得能够高效增殖H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的细胞株。

[0041] 经过三轮单克隆筛选后的细胞经过测试检测后,获得的新的SF9细胞株增殖杆状H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的能力从原来的107.5TCID₅₀/mL增加至108.5TCID₅₀/mL,建立筛选候选细胞株细胞库;

摇瓶培养:将候选细胞株重悬至无血清培养的新鲜培养基中,摇瓶震荡培养,培养条件为:转速为60~100rpm、温度为27℃;

搅拌式反应器自悬浮增殖SF9-HA细胞的方法:将扩增的SF9-HA细胞按照1~2×10⁶cell/mL的初始密度接种至新鲜无血清培养基中;溶氧量为40~60%的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。

[0042] 实施例2 高效增殖H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的HiFi细胞株(HiFi-HA)的筛选

HiFi-HA细胞株是从粉纹夜蛾Trichoplusia ni卵细胞系BTI-Tn-5B1-4(HiFi细胞系)细胞系中筛选获的。具体筛选步骤如下:

HiFi细胞在无血清的培养基中进行适应和驯化,无血清培养基是GIBCO公司生产Express Five™SFM。

[0043] 传代至2~4代后,得到明显适应无血清培养的HiFi细胞株,将细胞用滴管重悬吹散后,进行多轮细胞单克隆化筛选,单克隆细胞株的获得方式与SF9-HA相同,挑选细胞形态均一,生长性能良好的细胞株扩增、冻存、备用。

[0044] 将筛选获得细胞株进行H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的增殖,以已培养物HA效价为检测标准,筛选获得能够高效增殖H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的HiFi细胞株。

[0045] 经过三轮单克隆筛选后的细胞经过测试检测后,获得的新的HiFi-HA细胞株增殖杆状H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗种毒的能力从原来的9~10log₂提高至11~12log₂,建立筛选候选细胞株细胞库;

摇瓶培养:将候选细胞株重悬至无血清培养的新鲜培养基中,摇瓶震荡培养,培养条件为:转速为60~100rpm、温度为27℃;

搅拌式反应器自悬浮增殖HiFi-HA细胞的方法:将扩增的HiFi-HA细胞按照1~2×10⁶cell/mL的初始密度接种至新鲜无血清培养基中;溶氧量为40~60%的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。

[0046] 实施例3 大规模制备H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗的生产方式,包括如下步骤:

制备种毒用细胞的传代与培养:摇瓶培养悬浮培养SF9-HA细胞,待细胞密度达到4~6×10⁶cell/mL时进行分瓶传代,培养条件为:转速为60~100rpm、温度为27℃;待细胞密度再次达到4~6×10⁶cell/mL时,用于继续传代或接种于生物反应器内进行自悬浮培养,反应器培养条件:1~2×10⁶cell/mL细胞初始密度溶氧量为40~60%的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。

[0047] 细胞种毒的增殖:SF9-HA进入反应器培养24h后,将重组病毒接种至反应器中。将种毒按照MOI 0.1~1的接种量通过补液装置进入反应器中培养,同时添加新鲜无血清培养基至原培养体积的2倍,继续培养;病毒在反应器中的增殖的条件:溶氧量40~60%的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。培养72~96h后,种毒效价达到10^{8.5}TCID₅₀/mL,达到后期接毒的标准,低温保存备用。

[0048] 生产疫苗用细胞的传代及培养:摇瓶培养悬浮培养HiFi-HA细胞,待细胞密度达到4~6×10⁶cell/mL时进行分瓶传代,培养条件为:转速为60~100rpm、温度为27℃;待细胞密度再次达到4~6×10⁶cell/mL时,用于继续传代或接种于生物反应器内进行自悬浮培养,反应器培养条件:1~2×10⁶cell/mL细胞初始密度溶氧量为40~60%的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。

[0049] 制苗毒液的增殖:HiFi-HA进入反应器培养后,将重组病毒接种至反应器中。将种毒按照MOI 0.1~1的接种量通过补液装置进入反应器中培养,同时添加新鲜无血清培养基至原培养体积的2倍,继续培养;病毒在反应器中的增殖的条件:溶氧量40~60%的溶液饱和溶氧度;搅拌速度为60~100rpm;pH为6.0~6.5;温度为27℃。培养72~96h后,接毒后每隔

一段时间取样观察,用显微镜观察细胞病变情况,并检测细胞培养物的HA效价,待细胞大部分出现病变(肿大、破碎),且溶氧值呈明显的上升趋势,停止反应器搅拌,收获抗原。

[0050] 实施例4 半成品检验及制苗、成品检验:

a: 血凝价的测定:将以上收获的细胞悬液反复冻融3次后,测定血凝效价。血凝效价 $\geq 11\log_2$ 。

[0051] b: 无菌检测:按照《中华人民共和国兽用生物制品质量标准》附录301页进行,无细菌生长。

[0052] c: 油佐剂疫苗的配置:油相制备按照注射用白油(见《中华人民共和国兽用生物制品质量标准》附录343页)96份、司本-80 4份、硬脂酸铝2份的比例配置油相。取硬脂酸铝,用少量注射用白油混合,加热融化至半透明状,再与全量司本-80及剩余注射用白油混合均匀,经121℃灭菌15min,冷却至室温,备用。水相制备取经检验合格的H5亚型禽流感病毒亚单位疫苗,按照病毒液的4%加入吐温-80乳化1min。将水相和油相按照1:3(体积比)比例进行乳化,1000rpm \times 3~5min。

[0053] 实施例5 疫苗成品检测

a: 性状外观为白色乳状液;剂型呈油包水型;稳定性在37℃保存21天或者以3000rpm \times 15min,为破乳;粘度用1mL洁净吸管(上口内经2.7mm、下口内经1.2mm),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,在8秒以内。

[0054] b: 无菌检测按《中华人民共和国兽用生物制品质量标准》附录301页进行,结果:无菌生长;

c: 安全检验用3~5周龄SPF(Specific Pathogen Free,即无特定病原)鸡10只,皮下、肌肉注射疫苗2羽份(0.4mL),观察14天。鸡全部存活,剖检注射部位,无因疫苗注射引起的严重局部反应,如红肿、疫苗残留等。

[0055] d: 效力检测(血清效价)

用3~5周龄SPF(Specific Pathogen Free,即无特定病原)鸡10只,皮下、肌肉注射疫苗1羽份(0.2mL),同时设立同类商品疫苗和空白对照各10只。14天、21天、28天后,采集各组血清并测定血清HI抗体效价。具体结果见图1。

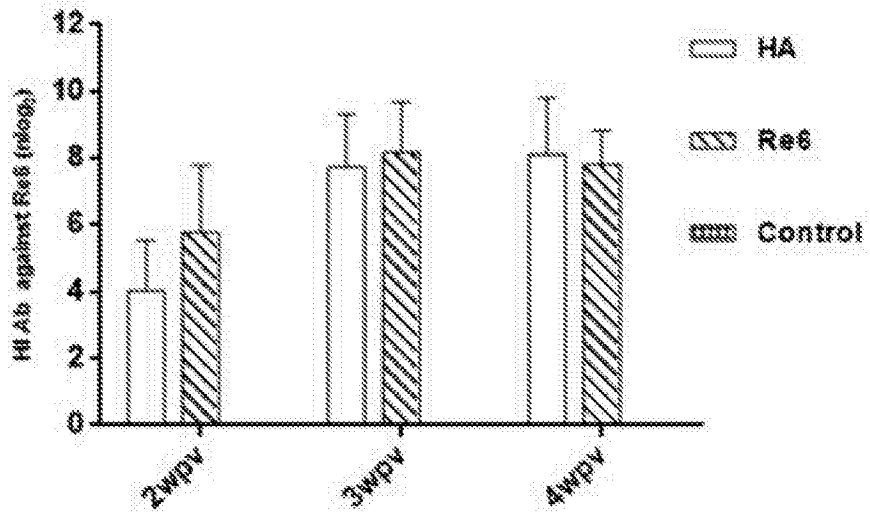


图1