



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105349499 B

(45)授权公告日 2018.12.07

(21)申请号 201510753006.0

A61K 9/107(2006.01)

(22)申请日 2015.11.06

A61P 31/16(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105349499 A

(43)申请公布日 2016.02.24

(73)专利权人 张澍

地址 北京市朝阳区管庄双柳北街1号院3号楼5单元702

专利权人 吕宏亮

山西隆克尔生物制药有限公司

(72)发明人 张澍 吕宏亮

(74)专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司 11139

代理人 孙皓晨 马鑫

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

(56)对比文件

CN 101784283 A,2010.07.21,

CN 103361319 A,2013.10.23,

CN 102816732 A,2012.12.12,

CN 104338127 A,2015.02.11,

WO 2012171026 A2,2012.12.13,

Opitz L et al.Lectin-affinity

chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A virus.《Vaccine》.2007,第25卷(第5期),

姚志东.MDCK细胞培养的甲型H1N1流感病毒疫苗研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑 E059-175》.2012,(第7期),

审查员 蔡玉品

权利要求书2页 说明书26页 附图5页

(54)发明名称

一种禽流感全病毒颗粒标记疫苗的制备方法及其产品和用途

(57)摘要

本发明公开了一种禽流感标记疫苗的制备方法及其产品和用途。所述方法包括:a)病毒培养;b)膜深层过滤、微滤、超滤;c)甲醛灭活;d)亲和层析以及在柱核酸酶解;e)疏水反应层析纯化;f)透析,除菌过滤;g)乳化。本发明提供的禽流感标记疫苗抗原为均一完整的禽流感病毒颗粒,不含禽流感病毒的非结构蛋白,不含未成熟的其他大小、形状的病毒颗粒。注入动物体内只产生针对禽流感病毒表面抗原的抗体,血凝素抗体和神经氨酸酶抗体,因此,能够完全区别动物感染和免疫禽流感病毒,有效降低了疫苗注射引起动物潜在过敏反应风险,降低了动物传染病如新城疫、禽流感等传播的潜在风险,安全性高,对动物食品安全和贸易没有影响。

1. 一种禽流感全病毒颗粒标记疫苗的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

a) 病毒培养

10000L生物反应器全悬浮培养MDCK细胞,细胞密度达到 $3-5 \times 10^6$ 个/ml,按照感染复数MOI0.01-0.1接种禽流感病毒MDCK细胞适应株,加入胰酶,使其终浓度达到 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$,搅拌速度不超过40rpm,4天收获病毒液,用制备型低速连续流离心机离心除去细胞碎片,同时收获上清液和沉淀;沉淀在Triton-X-100存在的条件下裂解禽流感病毒感染细胞和细胞膜碎片,所述Triton-X-100的终浓度为1-2% (v/v),反复冻融3次后超声3次,用制备型低速连续流离心机离心收集上清液,合并上清液;

该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒滴度为 $\geq 10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 30 \mu\text{g}/\text{ml}$,TritonX-100残余量 $\leq 600 \mu\text{g}/\text{ml}$,抗生素残余量为 $\leq 180 \mu\text{g}/\text{ml}$;

b) 膜深层过滤、微滤、超滤

步骤a)得到的病毒上清液,依次经过0.65微米的膜深层过滤以及0.45微米孔径的滤膜微滤后,经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤,进一步除去完整的MDCK细胞和大分子物质;

该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒滴度为 $\geq 10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 40 \text{EU}/\text{ml}$;

c) 灭活;

甲醛灭活,灭活条件:2-8℃,时间7-10天;灭活澄清液经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤,进一步除去小分子杂质和缩小体积以便纯化;

该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{ml}$,Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$,甲醛残余量 $\leq 300 \mu\text{g}/\text{ml}$;内毒素含量 $\leq 40 \text{EU}/\text{ml}$;

d) 亲和层析以及在柱核酸酶解:

包括:(1)采用硫酸纤维素或肝素作为亲和层析介质,将灭活后的禽流感病毒澄清液吸附在介质上,洗脱细胞DNA和细胞蛋白,吸附液为pH7.4的100mM柠檬酸,流感病毒颗粒洗脱液为pH 7.4的含2M氯化钠的100mM柠檬酸;(2)经过步骤(1)操作后,用非特异的核酸酶进行在柱酶解;(3)经步骤(2)操作后洗涤层析介质,洗脱禽流感病毒;

该步骤的质量控制指标为:体积为2000L,禽流感病毒血凝素含量 $\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 50 \text{ng}/\text{ml}$,MDCK细胞残余DNA量 $\leq 1000 \text{pg}/\text{ml}$,M2蛋白含量 $\leq 100 \text{ng}/\text{ml}$,牛血清白蛋白残余量 $\leq 100 \text{ng}/\text{ml}$,Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$;甲醛残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 30 \text{EU}/\text{ml}$;

e) 疏水反应层析

步骤d)洗脱后的禽流感病毒液上样于苯基琼脂糖疏水层析柱,洗脱禽流感病毒,吸附缓冲液为pH,7.4的含1.7M硫酸铵的50M磷酸二氢钾,洗脱缓冲液为pH,7.4的50M磷酸二氢钾,得到纯化后的禽流感病毒液;

该步骤的质量控制指标为:体积为2000L,禽流感病毒血凝素含量 $\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 30 \text{ng}/\text{ml}$,MDCK细胞残余DNA量 $\leq 500 \text{pg}/\text{ml}$,M2蛋白含量 $\leq 50 \text{ng}/\text{ml}$,牛血清白蛋白残余量 $\leq 50 \text{ng}/\text{ml}$,Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$;甲醛残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 30 \text{EU}/\text{ml}$;

f) 透析、除菌过滤

经步骤d) 纯化后的禽流感病毒液稀释为10000L, 进行透析, 透析后的病毒液经0.22 μ m膜除菌过滤;

该步骤质量控制指标为: 禽流感病毒血凝素含量 $\geq 40\mu\text{g/ml}$, 内毒素含量 $\leq 10\text{EU/ml}$, MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 10\text{ng/ml}$, MDCK细胞DNA残余量 $\leq 100\text{pg/ml}$, 甲醛残余量 $\leq 50\mu\text{g/ml}$, Triton X-100残余量 $\leq 5\mu\text{g/ml}$, 禽流感M2蛋白含量 $\leq 10\text{ng/ml}$, 牛血清白蛋白残余量 $\leq 20\text{ng/ml}$;

g) 乳化: 采用适宜的水包油包水佐剂进行乳化即得。

2. 如权利要求1所述的方法, 其特征在于步骤d) 中用非特异的核酸酶在柱酶解包括按每毫升病毒液加入1-100单位的量, 将非特异性、高活性的核酸酶加入到层析介质中, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 作用9-18小时。

3. 如权利要求1所述的方法, 其特征在于步骤e) 中所述的透析采用的透析液中含有蔗糖6% (w/v)、单盐酸精氨酸1% (w/v)、一水谷氨酸钠0.05% (w/v)、水解明胶0.5% (w/v)、无水磷酸氢二钾1% (w/v) 以及磷酸氢二钾0.25% (w/v)。

一种禽流感全病毒颗粒标记疫苗的制备方法及其产品和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种禽流感标记疫苗的制备方法及其产品和用途,特别涉及一种通过MDCK细胞悬浮培养禽流感病毒、以及采用新的浓缩纯化方法制备禽流感标记疫苗的方法,还涉及标记疫苗的质量标准和检定。本发明属于医药生物技术领域。

背景技术

[0002] 疫苗接种是特异性预防禽流感病毒(AIV)的有效手段,制备安全有效的疫苗是成功地预防、控制乃至最终消灭AIV的先决条件。疫苗使用的效果取决于快速大量疫苗的生产 and 供给,最近几年的流感流行和新的流感病毒爆发流行提示及时的疫苗接种是控制、预防流感的最重要措施。但是各地流行的高致病性禽流感亚型不同,疫苗株和流行株的抗原性不匹配或匹配程度低,给疫苗的开发和研制带来的极大挑战。目前国内鸡胚禽流感疫苗存在的问题,主要为:

- [0003] 1) 疫苗诱导抗体妨碍识别感染和免疫禽类;
- [0004] 2) 疫苗预防禽流感发病而不能预防阴性感染;
- [0005] 3) 免疫产生的压力促使禽流感病毒抗原突变逃逸免疫;
- [0006] 4) 免疫保护产生的时间晚,免疫保护期短;
- [0007] 5) 母体抗体对新生禽类免疫的干扰;
- [0008] 6) 疫苗对各种禽类的免疫效果不是很清楚;
- [0009] 7) 疫苗的质量:安全性、免疫原性、有效性、稳定性有待提高。

[0010] 用鸡胚生产禽流感疫苗,鸡胚供应和生产周期长,难以应对新发禽流感的防控;传统的兽用流感疫苗由于采用鸡胚规模化生产,疫苗尽管安全但容易引起严重的应急反应,需要对工艺进行改造、验证。

[0011] 禽流感病毒灭活疫苗具有良好的免疫原性,在预防和控制禽流感的过程中发挥着重要作用,但在疫苗制备过程中和产品中的一些宿主细胞蛋白残余、核酸、牛血清白蛋白、化学试剂等如果不加以控制,则会引起免疫动物产生严重副反应甚至死亡,特别是可能使动物致癌或影响肉类动物的食品安全。

[0012] 用宿主细胞MDCK培养病毒制备疫苗抗原或重组药物,从用药安全性考虑,必须纯化抗原去除影响禽流感病毒疫苗安全性的杂质,以使其符合药品质量规范和安全要求,同时尽量减少工艺或原辅材料中可能潜在的影响疫苗效果和安全的物质,特别是要尽量避免使用动物源性的原辅材料,以降低传播动物疫病如流感、犬瘟热、疯牛病、狂犬病等传染病风险。

[0013] 用生物反应器生产禽流感病毒抗原,提高了细胞密度、病毒抗原产量,同时增加了细胞杂质和添加物的量,也增加分离、浓缩、纯化禽流感病毒的工艺步骤。过去因为禽流感病毒疫苗抗原库主要以鸡胚作为抗原生产基质,疫苗多为粗制疫苗。纯化技术特别是现代规模化浓缩、纯化病毒抗原技术,如柱层析、蔗糖梯度超速离心技术、切向流中空纤维柱、深层过滤模块几乎没有在兽用疫苗生产中使用。这些技术和设备的应用易于疫苗质量控制和

保证,也易于GMP认证和工艺验证。

[0014] 现行生产灭活禽流感病毒抗原采用MDCK细胞为疫苗抗原生产基质,MDCK细胞悬浮培养后继灭活、浓缩工艺达到部分纯化,后经乳化制成疫苗供使用。尽管该疫苗的免疫效果达到疫苗规程要求,但按现代疫苗的安全性要求,杂质含量高、总蛋白含量高,有效完整病毒颗粒含量低,对有效抗原量、MDCK细胞DNA残余、MDCK细胞蛋白残余、牛血清白蛋白、灭活剂、防腐剂以及生产过程化学添加物没有明确界定和定量。疫苗的质量标准和工艺应不断提高,以保证疫苗稳定、安全、有效。

[0015] 纯化禽流感疫苗配方中禽流感M2蛋白含量甚微,且在各型流感病毒中高度保守,含高度纯化灭活完整禽流感病毒颗粒的疫苗,不引起动物产生抗M2抗体,而自然感染或隐形感染禽流感动物产生M2蛋白抗体,因此通过检测动物体内的M2非结构蛋白的抗体存在与否,可区别动物禽流感疫苗免疫和自然感染,发挥禽流感防控的免疫和检测作用。

发明内容

[0016] 本发明的目的在于提供一种大规模制备禽流感全病毒颗粒标记疫苗的方法及其产品和用途。

[0017] 本发明的一种禽流感全病毒颗粒标记疫苗的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

[0018] a) 病毒培养

[0019] 10000L生物反应器全悬浮培养MDCK细胞,细胞密度达到 $3-5 \times 10^6$ 个/ml,按照感染复数MOI 0.01-0.1接种禽流感病毒MDCK细胞适应株,加入胰酶,使其终浓度达到 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$,搅拌速度不超过40rpm,4天收获病毒液,用制备型低速连续流离心机离心除去细胞碎片,同时收获上清液和沉淀;沉淀在Triton-X-100存在的条件下裂解禽流感病毒感染细胞和细胞膜碎片,所述Triton-X-100的终浓度为1-2% (v/v),反复冻融3次后超声3次,用制备型低速连续流离心机离心收集上清液,合并上清液;

[0020] 该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒滴度为 $\geq 10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 30 \mu\text{g}/\text{mL}$,TritonX-100残余量 $\leq 600 \mu\text{g}/\text{mL}$,抗生素残余量为 $\leq 180 \mu\text{g}/\text{mL}$;

[0021] b) 膜深层过滤、微滤、超滤

[0022] 步骤a)得到的病毒上清液,依次经过0.65微米的膜深层过滤以及0.45微米孔径的滤膜微滤后,经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤,进一步除去完整的MDCK细胞和大分子物质;

[0023] 该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒滴度为 $\geq 10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$,内毒素含量 $\leq 40 \text{EU}/\text{mL}$;

[0024] c) 灭活;

[0025] 甲醛灭活,灭活条件:2-8°C,时间7-10天;灭活澄清液经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤,进一步除去小分子杂质和缩小体积以便纯化;

[0026] 该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$,Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$,甲醛残余量 $\leq 300 \mu\text{g}/\text{mL}$;内毒素含量 $\leq 40 \text{EU}/\text{mL}$

[0027] d) 亲和层析以及在柱核酸酶解:

[0028] 包括:(1)采用硫酸纤维素或肝素作为亲和层析介质,将灭活后的禽流感病毒澄清

液吸附在介质上,洗脱细胞DNA和细胞蛋白;(2)经过步骤(1)操作后,用非特异的核酸酶进行在柱酶解;(3)经步骤(2)操作后洗涤层析介质,洗脱禽流感病毒;

[0029] 该步骤的质量控制指标为:体积为2000L,禽流感病毒血凝素含量 $\geq 100\mu\text{g}/\text{ml}$,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 50\text{ng}/\text{ml}$,MDCK细胞残余DNA量 $\leq 1000\text{pg}/\text{ml}$,M2蛋白含量 $\leq 100\text{ng}/\text{ml}$,牛血清白蛋白残余量 $\leq 100\text{ng}/\text{ml}$,Triton-X-100残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$;甲醛残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 30\text{EU}/\text{ml}$;

[0030] e) 疏水反应层析

[0031] 步骤d)洗脱后的禽流感病毒液上样于苯基琼脂糖疏水层析柱,洗脱禽流感病毒,得到纯化后的禽流感病毒液;

[0032] 该步骤的质量控制指标为:体积为2000L,禽流感病毒血凝素含量 $\geq 100\mu\text{g}/\text{ml}$,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 30\text{ng}/\text{ml}$,MDCK细胞残余DNA量 $\leq 500\text{pg}/\text{ml}$,M2蛋白含量 $\leq 50\text{ng}/\text{ml}$,牛血清白蛋白残余量 $\leq 50\text{ng}/\text{ml}$,Triton-X-100残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$;甲醛残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 30\text{EU}/\text{ml}$;

[0033] f) 透析、除菌过滤

[0034] 经步骤d)纯化后的禽流感病毒液稀释为10000L,进行透析,透析后的病毒液经0.22 μm 膜除菌过滤;

[0035] 该步骤质量控制指标为:禽流感病毒血凝素含量 $\geq 40\mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 10\text{EU}/\text{ml}$,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 10\text{ng}/\text{ml}$,MDCK细胞DNA残余量 $\leq 100\text{pg}/\text{ml}$,甲醛残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$,Triton X-100残余量 $\leq 5\mu\text{g}/\text{ml}$,禽流感M2蛋白含量 $\leq 10\text{ng}/\text{ml}$,牛血清白蛋白残余量 $\leq 20\text{ng}/\text{ml}$;

[0036] g) 乳化:采用适宜的水包油包水佐剂进行乳化即得。

[0037] 在本发明中,优选的,步骤d)中用非特异的核酸酶在柱酶解包括按每毫升病毒液加入1-100单位的量,将非特异性、高活性的核酸酶加入到层析介质中,2-8 $^{\circ}\text{C}$ 作用9-18小时。

[0038] 在本发明中,优选的,步骤e)中所述的透析采用的透析液中含有蔗糖6% (w/v)、单盐酸精氨酸1% (w/v)、一水谷氨酸钠0.05% (w/v)、水解明胶0.5% (w/v)、无水磷酸氢二钾1% (w/v)以及磷酸氢二钾0.25% (w/v)。

[0039] 在本发明所述的方法中,优选的,步骤f)中所述的乳化采用的佐剂包括细胞因子、油乳佐剂和合成佐剂,优选为ISA25、QS-21、MF59以及铝佐剂。

[0040] 如上,本发明提供了一种投入/产出效果明显的,用于制备高效、高纯度的完整禽流感全病毒颗粒标记疫苗的方法。本发明与纯化流感病毒方法以及质量控制方法、质量标准,特别是新的纯化方法和质量控制有关(图1和图2)。

[0041] 1、溶解宿主细胞

[0042] 由于禽流感病毒在MDCK细胞中增殖,形成细胞病变裂解了细胞,部分病毒释放,部分病毒在细胞内或细胞碎片上,本发明采用连续低速离心机收集病毒上清,对沉淀进行超声、冻融裂解后再进行低速离心,合并2部分上清。有许多方法如冻融、高渗、超声、裂解剂裂解可溶解细胞、释放禽流感病毒,但从规模化生产的方便和适用角度考虑,本发明采取冻融、超声、裂解剂溶解细胞,以提高禽流感病毒产量。

[0043] 2、裂解剂

[0044] 按照本发明,几乎除培养工艺中没有使用裂解剂,选取药学、兽医学认为安全的表面活性剂Triton X-100作为裂解剂,浓度为1-2% (v/v)。

[0045] 3、核酸酶

[0046] 许多核酸酶可以在实验室使用,如Benzonase、Pulmozyme或其他DNA酶、核酸酶,但从兽医学、药学安全角度考虑,本发明选用Benzonase,其可通过断裂磷酸酯键而水解核酸。使用浓度1-100单位/ml;

[0047] 4、深层过滤、微滤、超滤

[0048] 流感病毒收获病毒液经深层过滤(0.65微米孔径)去除碎片,再经微滤(0.45微米孔径),切向流超滤(750KD)除去完整的MDCK细胞和大分子物质。灭活澄清液经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤后,进入亲和层析柱,进一步除去MDCK残余蛋白和残余DNA,经亲和层析病毒液通过超滤、除菌过滤、进入下一工艺步骤。

[0049] 5、亲和层析以及疏水反应层析

[0050] 按照发明,单一的层析或连续流超速离心或蔗糖密度梯度离心已经不能满足禽流感标记疫苗的质量要求和标准,研究表明,中去除效果,亲和层析和疏水反应层析更适合对大量禽流感病毒液中杂质DNA的处理。

[0051] 本发明在禽流感病毒纯化采用了一种亲和层析、在位核酸酶解、疏水反应层析的组合,除去了大量的核酸,并浓缩了病毒原液。由于分子筛层析载量极限为柱体积的20%,且分离效果依赖蛋白浓度,限制了分子筛层析在禽流感疫苗工业化生产的使用。本发明的优点在于:(1)流速快30倍;(2)结合能力强;(3)收率高,(4)不需安装和清洁验证;(5)做成滤芯,没有使用寿命和贮存安全的担忧;

[0052] 6、超滤、浓缩、透析

[0053] 禽流感病毒培养液、原液、纯化液至少需要透析,去除小分子杂质和化学物质残余,也需要控制可操作体积,发明中提供了透析和超滤浓缩的步骤,使禽流感病毒达到部分纯化和浓缩,发明中的超滤优先采用切向流的中空纤维柱,膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0,具有对禽流感病毒剪切小、病毒破损少的优点。

[0054] 用超滤透析和缓冲液交换除去生产过程中溶液中的糖、盐、非液体溶剂、低分子物质,改变稳定禽流感病毒的粒子和pH环境,本发明在收获裂解后的工艺步骤中在纯化步骤转接之前、疫苗配制之前都用超滤,调整缓冲液、调整体积,浓缩病毒液适合后续纯化的载量要求。

[0055] 7、高度纯化

[0056] 细胞培养后流感病毒包括重组流感病毒去除杂质的纯化方法是经过低速离心、冻融超声细胞沉淀、低速离心收的收获病毒液合并病毒液,再经深层过滤、超滤,亲和层析、在位核酸酶解、疏水反应层析组合,连续流蔗糖密度梯度离心,增强了流感疫苗的安全性,扩展了疫苗的适用种群和范围,特别是禽的特殊种群。

[0057] 首先,不含有害杂质,如宿主细胞MDCK蛋白、宿主细胞MDCK的DNA、不含动物源性的活性物质,如酶或牛血清、工艺过程中的添加的化学物质残余。尽管目前暂未有国家标准的细胞流感疫苗,特别是禽流感细胞培养疫苗标准或规程,但细胞性流感疫苗如MDCK细胞流感疫苗制造过程必须说明、验证安全。本发明的标记疫苗工艺和质量标准说明了其安全性。用传代的MDCK细胞制备流感疫苗涉及外源因子污染的风险,微生物如细菌、真菌、支原体、

螺旋体、立克次体、病毒、原虫等有可能在生产过程中或原辅料添加的工艺步骤中引入到原液、半成品、成品中,在本发明中,通过纯化,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 30\text{ng/ml}$ 、MDCK细胞DNA残余量 $\leq 100\text{pg/ml}$ 。对人或动物更加安全,特别是过去不能注射流感疫苗的幼小禽或特殊种群安全有效。考虑到生产过程中外源因子污染的风险和一些化学物质添加物残余可能的安全风险,发明提供了大量的安全检验方法。也提供了细胞流感疫苗生产过程的关键指控点。

[0058] Madin Darby Canine Kidney (MDCK) 细胞成为流感疫苗包括禽流感疫苗基质,传代细胞生产疫苗,世界动物卫生组织OIE和国内兽药质控部门没有明确规程,本发明参照世界卫生组织WHO、美国药品食品监督管理局、中国的药典要求,对流感病毒纯化工艺进一步改进,加强了工艺以及指控方法验证,从疫苗指标上达到国际标准并建立了标准。

[0059] MDCK传统上用于实验室流感病毒的滴定,来自ATCC,MDCK (CCL-34),其有可能致癌且培养需要高浓度血清、培养流感病毒滴度低,不适合规模化的流感抗原生产,优选的,本发明所用MDCK细胞为MDCK-ZL2012,其菌种保藏编号为:CGMCC No.6210,保藏日期为2012年6月14日,已记载在专利号为ZL201210224401.6,发明名称为“适应全悬浮无血清培养的MDCK细胞系及其在培养流感病毒、生产流感病毒疫苗中的应用”的专利申请中,禽流感病毒液为由该细胞进全悬浮培养而成。

[0060] 生物反应器培养MDCK-ZL2012和流感病毒,1毫升培养原液的MDCK细胞蛋白达到 1mg/mL ,MDCK细胞DNA水平超过 $10\mu\text{g/mL}$,超出国际上安全疫苗的要求,如禽流感、狂犬病、甲型肝炎以及人用流感疫苗标准。由于疫苗生产过程中外源因子污染风险的存在,需要每批次大量的安全试验和安全评估,需要从鸡胚组织规模化生产流感疫苗到细胞规模化生产流感疫苗工艺转化和质量控制的转化,也需要降低外源因子污染风险和去除大量的宿主细胞杂质使其最小化。

[0061] 硫酸纤维素肝素亲和层析可用于某些病毒液的纯化,如乙型肝炎、丙型肝炎的小量实验室纯化,中试规模或工业化生产如5000L-10000L的病毒培养液纯化特别是现行的鸡胚流感疫苗纯化方法难以满足细胞流感疫苗的规模化要求。因为流感病毒糖蛋白和配体的有力结合,需要剧烈洗脱,导致流感病毒活性和完整结构丧失,因此亲和层析配体、介质、配体密度、配体偶联方式需要精心设计,使流感病毒和配体有效结合和洗脱,获得完整、有活性的流感病毒颗粒。本发明中,提供了规模化亲和层析纯化制备MDCK细胞培养灭活禽流感全病毒疫苗方法,保证了疫苗的纯度。本发明提供可在位灭菌和预消毒的层析柱。一般地禽流感疫苗生产,早期工艺收获后澄清阶段使用非特异性的核酸酶,如Benzonase,消除了MDCK细胞潜在的风险。本发明在纯化过程中,加入核酸酶的产物用直向流过滤除去病毒培养物的细胞和碎片,过滤液用切向流浓缩后进入下一步纯化步骤,一般再经离子交换、分子筛、曲带密度离心、透析步骤,或者经分子筛、离子交换、超滤透析的步骤,本发明用一步亲和层析代替了上述步骤,是本发明的特征之一。

[0062] 用本发明的方法制备的纯化病毒液经超滤透析和除菌过滤、乳化、分装。透析缓冲液含有蔗糖6% (w/v)、单盐酸精氨酸1% (w/v)、一水谷氨酸钠0.05% (w/v)、水解明胶(禽) 0.5 (w/v)、无水磷酸氢二钾1% (w/v) 以及磷酸氢二钾0.25% (w/v)。

[0063] 在位检测和纯化过程的质控是本发明提供的特征,如病毒滴度检或抗原含量检测,总蛋白和总核酸检测以确定病毒培养液中的杂质。

[0064] 纯化流感病毒的方法,特别是具有较高免疫原性禽流感病毒的纯化方法特点:

[0065] 1.处理上样量大满足工业化生产的流感病毒液处理,是亲和层析和疏水反应层析的完美结合。有配体吸附禽流感病毒、达到部分浓缩;配体和介质结合,是医学允许的疏水性芳香族带有苯基、PPG、丁基、己基的大分子,配体是生物大分子,肝素或硫酸乙酰肝素,相对于流感病毒抗体为配体,造价和成本非常低。

[0066] 2.操作简单,洗涤固相介质、洗脱禽流感病毒;

[0067] 3.去除DNA和目标病毒以外的杂质能力强,核酸减少到0.01%,蛋白减少到0.1%;

[0068] 4.目标病毒产量高,总蛋白达25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,适合新的注册的细胞培养流感疫苗世界卫生组织和中国食品药品监督管理局的最新指南,宿主细胞DNA水平超过10ng/剂是不可接受的,因此发明中应用了核酸酶极大减少了细胞DNA,Benzonase核酸酶处理大量减少病毒原液中的大分子DNA,进一步降低疫苗的致癌风险。特别是对禽类流感病毒易感动物和幼小的禽类。

[0069] 5.发明中的方法克服了目前已知禽流感疫苗生产工艺的瓶颈,可生产高活性、高纯度的流感全病毒,在产量、工艺流程时间、纯度、费用都低于已知禽流感病毒纯化疫苗方法,如蔗糖垫离心、分子筛层析以及非特异性离子交换层析。

[0070] 本发明的目的之二是提供根据以上任一项所述的方法制备得到的禽流感全病毒颗粒标记疫苗。

[0071] 在本发明中,优选的,每毫升疫苗中总蛋白总量为20-72.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,禽流感病毒血凝素含量为5-7 $\mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量 $\leq 10\text{EU}/\text{ml}$,MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 10\text{ng}/\text{ml}$ 、MDCK细胞DNA残余量 $\leq 100\text{pg}/\text{ml}$ 、牛血清白蛋白残余量 $\leq 10\text{ng}/\text{ml}$ 、甲醛残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Triton X-100残余量 $\leq 15\mu\text{g}/\text{ml}$ 、抗生素残余量 $\leq 50\mu\text{g}/\text{ml}$,禽流感M2蛋白残余量 $\leq 2\text{ng}/\text{ml}$ 。

[0072] 更优选的,每毫升疫苗中总蛋白含量为12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,禽流感病毒血凝素含量为11.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,禽流感M2蛋白残余量为1.9ng/ml,MDCK细胞蛋白残余量为2.5ng/ml、MDCK细胞DNA残余量为25.0pg/ml、牛血清白蛋白残余量为2.5ng/ml、甲醛残余量为10.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Triton X-100残余量为2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、抗生素残余量为10.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,内毒素含量为1.5EU/ml。

[0073] 本发明提供的禽流感全病毒颗粒标记疫苗中禽流感病毒为均一完整病毒颗粒,效力高,且纯度高,不含病毒培养中禽流感的非结构蛋白和不成熟的病毒颗粒、除去了异源动物源性的外源蛋白、多肽、寡肽,有效降低了疫苗注射引起动物潜在过敏反应、致癌的风险,降低了引起动物传染病如疯牛病、禽流感的潜在风险,也除去了抗生素,对动物食品安全和贸易没有影响。

[0074] 本发明提供的禽流感标记疫苗中禽流感M2含量甚微,含高度纯化灭活完整禽流感病毒颗粒,注入动物机体产生禽流感结构蛋白抗体或中和抗体,使动物产生较强的体液免疫,检测动物体内M2蛋白的抗体,可区别动物禽流感病毒免疫和感染,成为一种高度安全、高效的标记疫苗,发挥防控中的有效免疫和监测作用。

[0075] 更进一步的,本发明还提出了所述的禽流感全病毒颗粒标记疫苗在制备预防或治疗动物流感药物中的用途。

[0076] 其中,所述的动物流感包括禽流感、猪流感、马流感、人流感以及犬流感。

[0077] 本发明提供的标记疫苗优选为水包油包水的佐剂乳化而成,能增强禽类动物对禽流感病毒的全面免疫,即增强中和抗体生成、增强细胞免疫。

[0078] 本发明提供了一种大规模制备高效、高纯度、高安全禽流感全病毒颗粒标记疫苗的方法及其产品,涉及病毒学、免疫学、疫苗学和过程工艺学,特别涉及标记疫苗、组分以及制法包括规模化禽流感病毒的纯化工艺、质量控制方法和指标。制法包括生物反应器全悬浮培MDCK细胞和禽流感病毒疫苗生产种子批病毒,经过反复冻融、裂解或超声、离心、深层过滤、亲和层析、在位核酸酶解、疏水反应层析、灭活、超滤透析、除菌过滤、稀释乳化配制,可用于商用禽流感MDCK适应或减毒株的纯化,也包括在其他敏感细胞系增殖的各型或亚型禽流感病毒。MDCK细胞系主要作为禽流感疫苗生产基质,用于各型或亚型的禽流感病毒标记抗原制备。

[0079] 相较于现有技术,本发明的优点在于:

[0080] 1、本发明提供了纯化流感病毒的方法,简化了流感病毒的纯化步骤、通过纯化工艺,纯化了流感病毒,进而可配制人或动物疫苗,如活疫苗或灭活疫苗,灭活疫苗用适宜浓度的福尔马林溶液。本发明的疫苗配方是液体剂型,可在2-8℃田间保护疫苗不失效,即效价稳定。

[0081] 按照发明提供的方法,制备生物制品,特别是疫苗,在发明实例中获得应用,控制流感,包括预防、治疗和诊断。发明方法提供纯化流感病毒配制的疫苗,接种动物,特别是禽类诱导的免疫反应是以纯化的禽流感病毒为主,通过纯化,使禽类的免疫副反应显著降低、在母体抗体存在下效果显著,能对特种鸡群和鸡龄幼小鸡群免疫,填补了禽类的免疫空白期,增加了疫苗的适宜群体和对象。20-30日龄(成为家禽特别是商品肉鸡的禽流感免疫空白期,一旦感染病毒就会造成不可估量的损失)可免疫此类疫苗。

[0082] 2、提供标记疫苗抗原中总蛋白含量、有效完整标记抗原含量、禽流感病毒血凝素含量,MDCK细胞蛋白残余量,MDCK细胞残余DNA量,M2蛋白含量,Triton-X-100残余量以及内毒素含量,使小分子物质或化学物质降至最低,保证了疫苗的高效、标记、安全、稳定和动物的安全性、因而保证动物性食品安全和人类的安全。

[0083] 通过纯化,使禽类的免疫副反应显著降低、在母体抗体存在下效果显著,能对特种鸡群和鸡龄幼小鸡群免疫,填补了禽类的免疫空白期,增加了疫苗的适宜群体和对象。20-30日龄可免疫此类疫苗。(成为家禽特别是商品肉鸡的禽流感免疫空白期,一旦感染病毒就会造成不可估量的损失)。不含外源性的蛋白、多肽、寡肽,如果添加使用则都被大量除去,降低了动物疫病的传播风险。发明提供的方法包括现代浓缩、超滤、纯化技术组合,工艺流程合理,禽流感完整病毒收率高且纯度高,易于大规模化生产和质量控制。

[0084] 3、一般兽用流感疫苗含完整的流感病毒,有效剂量为动物实验的结果,其中的成分没有精确定量,如半数鸡胚保护剂量1-100EID₅₀,人的疫苗中含单价血凝素15微克。剂量确定是在无佐剂条件下给药接种动物确定,结合动物年龄、性别、体重等体征、免疫时间、其他临床因素进行调整。本发明的疫苗配方抗原有效抗原量则以血凝素含量确定。以禽类动物的药理学试验为主进行注射接种,包括肌肉、皮下、皮内注射。

[0085] 4、由于大规模的生产需要,流感疫苗原液的杂质需要使用一些核酸酶去除,在收获病毒培养液或分离流感病毒的工艺中,需要将流感病毒和杂质特别是核酸进行分离和纯化。核酸酶加入后需要澄清,澄清工艺中,一般用正向流、切向流过滤,用离子交换层析,再经分子筛或离心。本发明提供的方法,采用亲和层析浓缩和纯化禽流感病毒,使核酸酶加入消化和亲和层析融为一体。

[0086] 5、本发明中提供了新的宿主细胞MDCK残余去除的方法和质控方法,亲和层析和疏水反应层析组合可大量去除MDCK细胞DNA。亲和层析纯化方法提高了流感病毒纯度、活性。疏水反应层析是生物大分子分离的常用手段,是基于离子相互反应正交分离技术,受配体种类、配体密度、所使用的盐、pH、缓冲液类型以及温度的影响。近几年用于质粒中核酸、脂多糖内毒素的去除分离。因此本发明也提供了禽流感疫苗原液中内毒素的去除方法。

[0087] 实验证明,本发明的亲和层析和疏水反应层析的组合使总的病毒蛋白收获率达55-76%,DNA去除下降到0.01%,杂蛋白(牛血清白蛋白和MDCK蛋白)去除下降到0.1%。

[0088] 本发明包括了纯化有生物活性禽流感病毒的方法,方法包括装载固相基质,连接配体、洗脱步骤。包括禽流感病毒结合到疏水层析柱固相中,洗脱禽流感病毒。禽流感病毒结合到亲和层析介质上,洗脱活性禽流感病毒。在结合到疏水反应层析之前结合亲和层析介质上。疏水层析配体包括PPG、苯基, α 丁基,或 α 己基ligand配体。发明包括有活性的禽流感病毒结合到液相疏水反应层析(HIC)介质方法和禽流感结合到液相假性亲和膜吸附层析介质的方法,包括洗脱禽流感病毒的方法且保持禽流感病毒的活性。包括先结合到假性亲和膜吸附层析介质后结合到疏水反应介质或者反向结合。洗脱的禽流感病毒原液1剂量含有少于10纳克DNA,减少0.04-0.01%。

[0089] 亲和层析介质为硫酸乙酰肝素或肝素,最佳洗脱液为1.7M的硫酸铵。疏水反应层析中,禽流感病毒病毒的优化洗脱液为柠檬酸缓冲液。

[0090] 6、MDCK细胞无论全悬浮培养、微载体培养或是贴壁培养禽流感病毒,培养基中都残余有动物源性的蛋白或酶,宿主细胞残余成分有DNA、核酸、蛋白质,工艺过程中的去污剂、灭活剂以及抗生素,通过本发明的纯化方法能够最大限度的去处上述杂杂质,从而达到降低动物群体过敏副反应以及动物长期、大量注射疫苗存在的潜在的致癌风险。禽流感病毒抗原包括但不限于禽流感病毒H1-H18,N1-N11。

[0091] 7、疫苗中血凝素抗原精确定量为20-25 μ g/ml,可进行快速配制苗,克服过去根据体内效力试验,按体积进行经验型配苗的不科学做法,另一方面抗原精确定量结合长期积累的本动物数据可取代本动物的攻击试验。最主要是达到体内免疫效果和降低过敏反应。

[0092] 8、本发明所提供制备方法容易进行质量控制和验证,分离、浓缩、纯化禽流感病毒的方法包括化学试剂、切向流膜包或中空纤维柱、离心、亲和层析以及疏水反应层析等方法,根据疫苗工艺质控和疫苗质量要求,对每一工艺步骤优化和组合,并验证,最终形成了本发明的方法。禽流感病毒的膜吸附性质决定了前期工艺采用1-2%Triton X 100去除部分杂蛋白、脂类。离子交换层析、凝胶分子筛2-3步层析的纯化方法,或者2步超速离心这些禽流感病毒纯化技术,在禽流感疫苗抗原生产中规模化使用,这些方法步骤多,病毒抗原收率低,去除杂质效率低。本发明提供了亲和吸附层析、在位核酸酶解、疏水反应层析组合的纯化方法,采用本发明提供的纯化方法,流感病毒产量高达 \geq 68%,蛋白杂质残余量符合欧洲、中国药典的要求、核酸去除率98.7%,每剂细胞宿主DNA残余量小于100pg,杂蛋白去除率达到99.9%,符合中国药典和WHO规程。除此之外,加入的核酸酶可被有效去除。因此本发明提供了禽流感病毒疫苗下游纯化工序,简单、高效、经济。本发明进一步提供了硫酸乙酰肝素吸附床、肝素纤维素亲和层析以及疏水反应层析组合优化的纯化MDCK细胞流感病毒液的方法,流速提高30倍,达30ml/分钟。

[0093] 9、本发明提供了生产工艺过程质控指标和方法,特别是MDCK细胞蛋白残余、DNA残

余含量检测以及添加物残余检测,这是生物制品质量控制方法首次在兽用疫苗中的使用。易于禽流感病毒疫苗质量控制和工艺的规模化放量生产,加强了疫苗工艺的质量控制。

[0094] 10、本发明提供的禽流感病毒抗原去除了生产过程使用去污剂、外源的酶、牛血清蛋白、宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA,化学添加物,抗原纯度高、临床使用副反应率低。

附图说明

[0095] 图1为本发明的一种大规模制备禽流感全病毒颗粒标记疫苗的方法流程图;

[0096] 图2为本发明的一种大规模制禽流感全病毒颗粒标记疫苗的方法质控方法和质控点;

[0097] 图3为重组全长M2蛋白ELISA包被浓度优化;

[0098] 图4为合成肽Me2-18包被浓度优化;

[0099] 图5为重组全长M2蛋白ELISA检测参考血清;

[0100] 图6为血凝抑制抗体检测结果;

[0101] 图7为重组全长M2ELISA检测结果;

[0102] 图8为免疫层析胶体金检测禽流感病毒M2抗体优化。

具体实施方式

[0103] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0104] 实施例1禽流感全病毒颗粒标记疫苗的制备

[0105] 包括以下步骤:

[0106] a) 病毒培养

[0107] 10000L生物反应器全悬浮培养MDCK-ZL2012细胞(培养基是MEM HAM和F12培养基的混合物,其中加入1.5g/L Na_2CO_3 无机盐以及0.5-8g/L的酵母或豆类提取物),在37℃,10% CO_2 的培养条件下,培养细胞至细胞密度达到 3×10^6 个/ml,按照病毒感染复数MOI0.05接种禽流感病毒MDCK细胞适应株,加入终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶以及10,000U/ml青霉素G以及10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素,搅拌速度不超过40rpm,4天收获病毒液,用制备型低速连续流离心机离心除去细胞碎片,同时收获上清液和沉淀;沉淀在Triton-X-100存在的条件下裂解禽流感病毒感染细胞和细胞膜碎片,所述Triton-X-100的终浓度为1.5% (v/v),反复冻融3次后超声3次,制备型低速连续流离心机离心收集上清液,合并上清液;

[0108] 该步骤的质量控制指标为:禽流感病毒滴度为 $\geq 10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 30 \mu\text{g}/\text{mL}$,TritonX-100残余量 $\leq 600 \mu\text{g}/\text{mL}$,抗生素残余量为 $\leq 200 \mu\text{g}/\text{mL}$;

[0109] 经检测,各项指标符合预期,参见表1,进行下一步操作:

[0110] b) 膜深层过滤、微滤、超滤

[0111] 步骤a)得到的病毒上清液,依次经过0.65微米的膜深层过滤以及0.45微米孔径的滤膜微滤后,经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤,进一步除去完整的MDCK细胞和大分子物质;

[0112] 该步骤的质量控制指标为：禽流感病毒滴度为 $\geq 10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ，禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，内毒素含量 $\leq 40 \text{EU}/\text{ml}$ ；

[0113] 经检测，各项指标符合预期，参见表1，进行下一步操作：

[0114] c) 灭活；

[0115] 甲醛灭活，灭活条件：2-8℃，时间7-10天；灭活澄清液经膜孔截留值为750,000-1000,000MWC0的切向流超滤膜超滤，进一步除去小分子杂质和缩小体积以便纯化；

[0116] 该步骤的质量控制指标为：禽流感病毒血凝素含量为 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，甲醛残余量 $\leq 300 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；内毒素含量 $\leq 40 \text{EU}/\text{ml}$ ；

[0117] 经检测，各项指标符合预期，参见表1，进行下一步操作：

[0118] d) 亲和层析以及在柱核酸酶解：

[0119] 包括：(1) 采用硫酸纤维素或肝素作为亲和层析介质，将灭活后的禽流感病毒澄清液吸附在介质上，吸附液为100mM柠檬酸，pH7.4，流速1ml/分。洗脱液用光栅检测，流感病毒颗粒洗脱液为含2M氯化钠、100mM的柠檬酸，pH 7.4，洗脱细胞DNA和细胞蛋白；(2) 经过步骤(1)操作后，按每毫升病毒液加入50单位的量将非特异的核酸酶Benzonase (Merck KgaA) 加入到层析介质中，4℃作用10小时；(3) 经步骤(2)操作后洗涤层析介质，洗脱禽流感病毒；

[0120] 该步骤的质量控制指标为：体积为2000L，禽流感病毒血凝素含量 $\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 50 \text{ng}/\text{ml}$ ，MDCK细胞残余DNA量 $\leq 1000 \text{pg}/\text{ml}$ ，M2蛋白含量 $\leq 100 \text{ng}/\text{ml}$ ，牛血清白蛋白残余量 $\leq 100 \text{ng}/\text{ml}$ ，Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；甲醛残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，内毒素含量 $\leq 30 \text{EU}/\text{ml}$ ；

[0121] 经检测，各项指标符合预期，参见表1，进行下一步操作：

[0122] e) 疏水反应层析

[0123] 步骤d) 洗脱后的禽流感病毒液上样于苯基琼脂糖疏水层析柱，吸附缓冲液含1.7M硫酸铵、50M磷酸二氢钾，pH,7.4，上样前平衡疏水层析柱，上样吸附后洗涤柱床，用pH,7.4得50M磷酸二氢钾洗脱流感病毒，收集合并洗脱液，得到纯化后的禽流感病毒液；

[0124] 该步骤的质量控制指标为：体积为2000L，禽流感病毒血凝素含量 $\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 30 \text{ng}/\text{ml}$ ，MDCK细胞残余DNA量 $\leq 500 \text{pg}/\text{ml}$ ，M2蛋白含量 $\leq 50 \text{ng}/\text{ml}$ ，牛血清白蛋白残余量 $\leq 50 \text{ng}/\text{ml}$ ，Triton-X-100残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；甲醛残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，内毒素含量 $\leq 30 \text{EU}/\text{ml}$ ；

[0125] 经检测，各项指标符合预期，参见表1，进行下一步操作：

[0126] f) 透析、除菌过滤

[0127] 经步骤e) 纯化后的禽流感病毒液稀释为10000L，进行透析，透析后的病毒液经0.22 μm 膜除菌过滤；

[0128] 禽流感病毒血凝素含量 $\geq 40 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，内毒素含量 $\leq 10 \text{EU}/\text{ml}$ ，MDCK细胞蛋白残余量 $\leq 10 \text{ng}/\text{ml}$ ，MDCK细胞DNA残余量 $\leq 100 \text{pg}/\text{ml}$ ，甲醛残余量 $\leq 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，Triton X-100残余量 $\leq 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，禽流感M2蛋白含量 $\leq 10 \text{ng}/\text{ml}$ ，牛血清白蛋白残余量 $\leq 20 \text{ng}/\text{ml}$ 。

[0129] 所述的透析采用的透析液中含有蔗糖6% (w/v)、单盐酸精氨酸1% (w/v)、一水谷氨酸钠0.05% (w/v)、水解明胶(禽)0.5% (w/v)、无水磷酸氢二钾1% (w/v) 以及磷酸氢二钾0.25% (w/v)。

[0130] g) 乳化：采用佐剂ISA25进行乳化即得禽流感全病毒颗粒标记疫苗。

[0131] 所得到的疫苗中,每毫升疫苗中总蛋白含量为12.5μg/ml,禽流感病毒血凝素含量为11.5μg/ml,禽流感M2蛋白残余量为1.9ng/ml,MDCK细胞蛋白残余量为2.5ng/ml、MDCK细胞DNA残余量为25.0pg/ml、牛血清白蛋白残余量为2.5ng/ml、甲醛残余为10.6μg/ml、Triton X-100残余量为2.6μg/ml、抗生素残余量为10.3μg/ml,内毒素含量为1.5EU/ml。

[0132] 禽流感病毒标记疫苗规模化生产工艺流程图及和质控点如图1和图2所示,其中,具体的禽流感病毒标记疫苗规模化生产过程中各步骤的质量控制指标如下表1所示。

[0133]

表 1.禽流感病毒标记疫苗规模化生产工艺和质量控制(全文结果)

步骤	体积	总蛋白浓度 (μg/mL)	蛋白度 (μg/mL)	血凝素含量 (μg/mL)	M2蛋白 (ng/mL)	牛血清白蛋白残余量 (ng/mL)	MDCK蛋白残余量 (ng/mL)	MDCKDNA残余量 (pg/ml)	甲醛残余量 (μg/mL)	抗生素残余量 (μg/mL)	Triton X-100残余量 (μg/mL)	内毒素 (EU/mL)
病毒培养	10000L	1054.7		31.6	675	6795	1000000	1×10 ⁷	-	180	360.9	45.3
深层过滤\微滤\超滤	10000L	1000.9		28.5	650	6550	100502	6114.3	-	89.3	35.5	35.8
灭活	10000L	980.4		28.0	630	5645	10043	6113.0	200.6	88.5	35.0	34.5
亲和层析\在位核酸酶解\	2000L	420.5		220.6	60.2	75.5	45.9	800.7	45.6	70.5	34.6	22.5
疏水反相层析	2000L	360.5		198.5	30.6	46.3	30.0	256.8	40.2	62.5	34.2	21.0
透析\除菌过滤	10000L	30.0		50.2	6.0	9.8	10	75.5	45.5	42.5	11.5	7.5
乳化和配制	30000L	12.5		11.5	1.9	2.5	2.5	25.0	10.6	10.3	2.6	1.5

[0134] 实施例2.在柱核酸酶解和全工艺过程中Triton X-100的作用

[0135] 10000L生物反应器培养得到的禽流感病毒培养液离心沉淀,然后加入1-2% (v/v) Triton X-100 (Sigma公司产品),经冻融、超声,合并上清液和沉淀处理液,使吸附在细胞膜上的禽流感病毒释放,使禽流感病毒收率提高。

[0136] 在层析柱上加入Benzonase (Merck KgaA, 50units/ml), 4℃作用10小时。深层过滤依次采用0.8微米、0.45微米滤器过滤 (德国Sartorius公司产品),用0.05微米中空纤维柱浓缩,用6倍体积层析柱换成亲和膜吸附层析上样缓冲液,禽流感病毒洗脱和收集。

[0137] Triton X-100/Benzonase处理结合后续的疏水反应层析、纯化使成品的杂质含量达到标记疫苗的要求,多个批次DNA残余量 $\leq 100\text{pg/剂}$ 。如果工艺步骤中没有Triton X-100以及Benzonase核酸酶,则最后成品MDCK细胞DNA残余为20-80倍,达2-16ng/剂。说明Triton X-100/Benzonase大量减少了成品禽流感原液中MDCK细胞DNA残余。同时TritonX-100增强DNA从细胞释放,Benzonase消化1小时,增强了释放到培养液中的DNA的降解。

[0138] 实施例3.禽流感病毒纯化介质筛选、层析的优化组合 (禽流感病毒层析纯化工艺的建立)

[0139] 肝素和硫酸纤维素膜片 (德国赛诺利斯公司购买),不锈钢片架 (购自GE公司),疏水层析介质ToyoScreen HIC Mix Pack、Hexyl-650C、ToyoScreen Butyl-600M、ToyoScreen.Phenyl-650M、ToyoScreen、PPG-600M、ToyoScreen、Ether 650M (德国Toyo公司),小量试验和介质筛选用Akta探索系统 (GE Healthcare,中国),检测仪 (GE公司产品)。在UV280nm,流速1.0ml/分条件下进行。

[0140] 禽流感病毒吸附到介质HIC-phenyl盐浓度优化同样进行3次试验,洗脱液和收获液的病毒量、总蛋白以及总核酸量需要检测。疏水层析介质动力结合性用实施例1制备的禽流感病毒液样品,病毒滴度 $1.85 \times 10^8\text{TCID}_{50}/\text{mL}$,吸附缓冲液含1.7M硫酸铵、50M磷酸二氢钾,pH,7.4,洗脱采用光栅检测仪检测,病毒颗粒用50mM磷酸二氢钾 (pH7.4) 洗脱。

[0141] 硫酸纤维素、肝素亲和膜吸附层析的动力结合性分别用 $1.85 \times 10^8\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $4.65 \times 10^7\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的已经澄清的病毒液,硫酸纤维素层析的吸附液为100mM柠檬酸,pH7.4,流速1ml/分。洗脱液用光栅检测,流感病毒颗粒洗脱液为含2M氯化钠、100mM的柠檬酸,pH 7.4,洗脱液用MWC0750KD超滤膜透析,病毒滴度和DNA用实施例1的方法测定。

[0142] 疏水层析纯化试验,用滴度为 $4.65 \times 10^7\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 的流感病毒澄清液,吸附缓冲液含1.7M硫酸铵、50M磷酸二氢钾,pH,7.4,上样前平衡疏水层析柱,上样吸附后洗涤柱床,用pH,7.4得50M磷酸二氢钾洗脱流感病毒,收集合并洗脱液,检测洗脱液的病毒和成分。再生疏水层析介质用10倍体积0.5M NaOH和0.1M HCl。

[0143] 流感病毒吸附到HIC-Phenyl介质中的硫酸铵浓度的优化:0.45,0.6,0.85,1.0,1.25,1.5and 1.7M硫酸铵分别和50mM磷酸二氢钾组合为缓冲液测试介质吸附能力,结果表明:缓冲液1.7M硫酸铵、50M磷酸二氢钾,pH,7.4较为适合流感病毒吸附。

[0144] 亲和层析和疏水HIC-phenyl层析柱组合,硫酸纤维素或肝素亲和柱上样和平衡缓冲液为100mM柠檬酸pH 7.4,洗脱缓冲液含有1.7M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,50mM K_2HPO_4 ,pH 7.4,HIC-phenyl柱上样和平衡液与亲和膜吸附层析洗脱液一致,洗脱液为100mM柠檬酸,pH 7.4,流速1ml/min,禽流感病毒蛋白用ELISA测定,总的DNA检测方法按照试剂盒 (DNA; Quant-iT.RTM.PicoGreen.RTM.assay) 中的说明书进行,总的蛋白检测方法按照试剂盒 (P;

Pierce.RTM.BCA protein assay)中的说明书进行。试验3次,结果取平均值。

[0145] 亲和层析和疏水反应层析组合优化:

[0146] 层析的操作条件和上述相同,用同一系统和检测系统。澄清的病毒液分别透析到100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液中,含流感病毒 4.65×10^7 TCID₅₀/mL,分别上样已经用100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液平衡的硫酸纤维素或肝素柱,用100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液简短洗涤,洗脱液合并后分别上样已经平衡的疏水层析柱,100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液洗脱收集病毒液、合并,用上述方法检测病毒液的组分。

[0147] 2批流感病毒原液、不同的缓冲液条件,硫酸纤维素、肝素亲和膜吸附层析和HIC-phenyl、HIC-PPG resins组合纯化层析的操作条件和上述相同,用同一系统和检测系统。澄清的病毒液分别透析到100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液中,含流感病毒 4.65×10^7 TCID₅₀/mL,分别上样已经用100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液平衡的硫酸纤维素或肝素柱,用100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液简短洗涤,洗脱液合并后分别上样已经平衡的疏水层析柱,100mM柠檬酸,pH7.4或含50mM磷酸二氢钾、pH7.4缓冲液或1.7M硫酸铵洗脱收集病毒液、合并,用实例的方法检测病毒液的组分。

[0148] 结果:纤维素硫酸化依赖化学反应的温度,在35℃、40℃、45℃纤维素硫酸化程度分别为5.5%、9.3%、13%。1ml硫酸纤维素可吸附50ml的病毒液,病毒滴度 4.65×10^7 TCID₅₀/ml,吸附66%的病毒,最后洗脱病毒收获率79-80%,而纤维素骨架结合15%的DNA,吸附31%的流感病毒。说明硫酸纤维素纯化流感病毒可提高收率。

[0149] 硫酸化温度的提高,改善了流感病毒的吸附,也增强了DNA吸附,硫酸化达5.5重量%时,吸附15%的起始DNA。纤维素和硫酸化纤维素和DNA分子反应模式不同,环化的DNA、DNA的大小不同导致对纤维素和硫酸纤维素不同吸附,离子交换介质限制了MDCK细胞双链DNA对弱阴或强阴离子的吸附。

[0150] 疏水层析反应的流感病毒结合动力性试验表明所有介质可吸附20ml流感病毒液,含 3.7×10^9 TCID₅₀病毒。肝素介质动力结合活性为结合6ml流感病毒液,含 1.1×10^9 TCID₅₀病毒,硫酸纤维素结合活性为50ml流感病毒液,含 9.3×10^9 TCID₅₀病毒,硫酸纤维素的高结合性通过实验确证,流感病毒液50ml、4ml纯化的收获率分别为79%、81%,为结合的流感病毒为22%、23%。因此 9.3×10^9 TCID₅₀流感病毒颗粒未能吸附到介质上,进入3-5微米介质颗粒的过滤。可以忽略非特异性的结合。

[0151] 2M氯化钠溶液导致流感病毒对乙基、苯基、己基配体的结合不足,因此发明中,流感病毒原液经亲和膜吸附层析后,为能提高疏水层析的杂质去除分离水平,选择使用硫酸铵和一系列不同的疏水配体试验,包括乙醚,聚丙二醇(poly-propylene glycol (PPG)),苯基,丁基以及己基。结果:PPG以及苯基为配体的层析液中无流感病毒颗粒检出(ELISA),乙醚、丁基、己基作为HIC-配体的层析液分别含3%、6%、7%的起始上样的病毒。苯基、丁基、己基作为配体洗脱后的洗脱液中分别含有起始病毒量的84%、67%、63%。

[0152] 疏水介质层析不吸附对DNA的几率分别为乙醚(75%)、PPG(64%)、苯基(58%)、丁基(48%)、己基(53%)。和流感病毒共同洗脱的DNA,不同配体有所不同:乙醚(29%)、PPG(13%)、苯基(19%)和己基(4%)。配体疏水性和n-alkyl链长度增长导致对DNA结合能力的

增强因而导致总DNA的减少。强疏水性的配体,如能结合48%、43%起始DNA的丁基、己基不能达到工艺物料平衡,在再生工艺步骤去除。发明所提供的结果明显地揭示流感病毒培养液的自由DNA的疏水性可用于亲和膜吸附层析去除纯化液中的残余DNA。

[0153] 疏水层析中除乙醚结合2%病毒液起始蛋白,其他配体都能大量结合病毒液蛋白,洗脱液无蛋白检测到。应用的洗脱液在硫酸铵存在下,不能充分洗脱吸附在介质上蛋白,洗脱液中的蛋白含量在检测限值(丁基,己基)到2% (PPG)。乙醚和苯基HIC-陪体中含1%总蛋白。大量的在疏水层析吸附介质上的蛋白可在再生工艺或步骤中通过激剧冲洗除去。因此PPG和苯基HIC和亲和膜吸附层析用作流感疫苗下游的纯化。

[0154] 2批流感病毒原液、不同的缓冲液条件,硫酸纤维素、肝素亲和膜吸附层析和HIC-苯基、HIC-PPG resins组合纯化的结果,如下表2所示:.

[0155] 表2

[0156]

批次	步骤	缓冲液	病毒颗粒 (%)	DNA 含量 (%)	总收率
A	1、亲和层析(硫酸纤维素)	磷酸二氢钾缓冲液/柠檬酸	73±1.7	5.8±3.9	56%
	2、疏水反应 HIC-苯基层析	磷酸二氢钾缓冲液/柠檬酸	72±5.6	3.7±0.5	
B	1、亲和吸附层析(硫酸纤维素)	柠檬酸	75±1.7	2.9±0.6	66%
	2、疏水反应 HIC-PPG 层析	磷酸二氢钾缓冲液/柠檬酸	64±0.8	4.7±0.9	
C	1、亲和层析(硫酸纤维素)	柠檬酸	71±2.7	4.9±0.6	75%
	2、疏水反应 HIC-苯基层析	柠檬酸	74±1.5	2.0±0.6	
D	1、亲和层析(硫酸纤维素)	柠檬酸	77±1.6	4.2.0±0.8	59%
	2、疏水反应 HIC-PPG 层析	柠檬酸	76±0.5	3.1±0.6	

[0157] 从试验中看出用磷酸钾盐、柠檬酸缓冲液洗脱流感病毒并无差别,且可能减少流感病毒的凝聚,流感病毒收率分别为73%、77%、75%、71%,纯化流感液的DNA分别为5.8%-2.0%,4.9%-4.2%,各试验结果无显著差异,但流感病毒产量明显提高。肝素亲和层析用磷酸钾、柠檬酸缓冲液纯化流感病毒的病毒收率为68%、71%、59%、68%,用磷酸盐缓冲液的纯化液中有12%、14%DNA,柠檬酸缓冲液洗脱的病毒纯化液有20%的DNA和蛋白一起洗脱。HIC-PPG、HIC-苯基柱上样澄清后病毒液与纯化假性亲和吸附膜的洗脱液不同,纯化上步澄清的流感病毒液收获率分别为88%、84%,纯化假性亲和膜吸附层析纯化后样品的流感病毒收获率58%、75%。可能是假性吸附膜层析大量病毒蛋白损失影响病毒颗粒的吸附性。

[0158] 发明的实例发现磷酸钾盐和柠檬酸缓冲系统可作为纯化工艺的缓冲系统,对流感

病毒的收率影响非常小,硫酸纤维素膜亲和层析(SC-MA)/HIC-苯基组合收率最高达56%,其次为肝素亲和层析(heparin-MA)/HIC-苯基组合收率为50%,SC-MA/HIC-PPG组合收率44%heparin-MA/HIC-PPG组合病毒收率35%;SC-MA/HIC-苯基层析组合使DNA下降到起始含量的0.01-0.04%。

[0159] 疏水层析中,离子强度影响DNA的减少,heparin-MA以及HIC-苯基是流感病毒适宜的分选纯化介质。硫酸铵浓度在0.45M时,95%DNA和92%的流感病毒不吸附在HIC-苯基介质上,浓度增加0.6M、0.85M、1.0M、1.25M、1.5M、1.7M时,分别有43%,58%,63%,77%,85%和85%的病毒吸附到介质上,且在1.5M后,洗脱液无病毒颗粒能检出,但含40%的DNA,因此考虑到疏水层析的性质:40%DNA吸附于介质,20%随病毒洗脱,约有80%的DNA去除。HIC-苯基介质在1.5M硫酸铵的洗脱下,可去除大量DNA和杂质。优化的硫酸铵浓度为1.7M。1.7M硫酸铵对流感病毒滴度影响经测定下降小,抗原损失小。因此基于以上实例结果,禽流感标记疫苗规模化生产工艺流程、步骤质量控制点如图1和图2。

[0160] 实施例4禽流感疫苗纯化工艺和质量控制方法

[0161] 总蛋白浓度检测:用BCA试剂盒检测(购自Pierce公司)、白蛋白标准品(BSA,Cat.#23209,购自Thermo Fisher公司),该法已经验证的使用范围25-250 μ g/ml,检测限值:8.3 μ g/ml,定量限值:25 μ g/ml。

[0162] 流感病毒血凝素检测用夹心ELISA。

[0163] 滴度用在MDCK细胞上的50%感染剂量TCID₅₀法检测,采用试剂盒(购自ECACC; Cat.#88020401,UK;2.0 \times 10⁵个/well),细胞培养液含高糖DMEM培养(购自Invitrogen公司)含4mM谷氨酰胺(Cat.#G-3126-250G Sigma-Aldrich,北京,中国),0.1%庆大霉素(Cat.#15710080,Invitrogen,北京,中国)and 10%胎牛血清FBS(Cat.#3302-P280703,Invitrogen,北京,中国),在37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳孵箱培养。病毒液样品10倍稀释加入单层MDCK细胞培养48小时,用固定液固定(1体积丙酮和2体积甲醇混合),加入兔抗流感病毒多克隆抗体(用含1%胎牛血清PBS1000倍稀释),加入抗兔过氧化物酶偶联IgG抗体(1:10000稀释),加入ACE底物(0.3mg/ml 3-amino-9-ethyl-carbazole溶解于缓冲液含0.1M醋酸钠、0.015%双氧水,pH 5.0),依次分步洗涤,在显微镜下观察,计算TCID₅₀。

[0164] MDCK细胞残余DNA、MDCK细胞双链DNA检测采用试剂Quant-iT PicoGreens DNA reagent(购自美国生命公司),使用范围4-1000ng/mL,用lambda DNA(Cat.#D1501, Promega公司产品)校验,使用缓冲液为100mM醋酸,工作范围4-1000ng/mL,检测限值0.66ng/ml;定量限值2.36ng/ml,总DNA测定6-400pg/mL范围获得验证。

[0165] DNA定量用限值总DNA测试盒和工作站(Cat.#R 9009,德国MDS公司产品)。样品经DNA抽提,用调零液调整体积到500微升,105 $^{\circ}$ C灭活15分钟,加入1000微升对单链DNA有高亲和性生物素偶联蛋白、链霉素亲和素、脲酶偶联抗单链单抗的混合液,标准液和样品37 $^{\circ}$ C孵育1小时,移入工作站的孔中,通过生物素包被醋酸纤维膜吸附器过滤,用PBS缓冲液(含0.05%叠氮化钠、0.05%吐温,pH 6.5)洗涤,继续高真空过滤直到各孔干燥,膜吸附器移入限值读数仪(已经包被底物溶液500微升,含5M尿素、0.05%叠氮化钠、0.05%吐温的PBS缓冲液,读数仪有光测感受器),尿素是样品的pH发生变化,所有样品测试3次。该法用小牛胸腺DNA校验,用50pg的胸腺DNA作为参照物以便满足工艺过程纯化和半成品残余检测。

[0166] 实施例5禽流感标记疫苗原液、半成品、成品M2蛋白的定量检测

[0167] 禽流感病毒全长M2蛋白按专利号为ZL201210241084.9,发明名称为“一种制备甲型流感病毒全长M2蛋白的方法”的中国专利申请所提供的方法制备和纯化。

[0168] 疫苗原液、半成品、成品的M2蛋白的定量ELISA检测:纯化M2蛋白抗体溶于纯水,使5 μ g/ml,加100微升于96孔板37 $^{\circ}$ C过夜,用含10%马血清的PBS在4 $^{\circ}$ C封闭2h,洗涤3次,加入100 μ l的10倍稀释液待测样品在室温下作用1h,用PBST洗涤3次,再用HRP标记的M2蛋白抗体(1:1000~1:5000稀释)室温下反应1h,加入HRP底物,反应20min,用1M磷酸终止反应,OD值大于阴性平均值为阳性,用纯化的M2蛋白不同稀释度已知含量的M2蛋白标准品重复获得的标准曲线比较,获得样品中M2含量。

[0169] 蛋白测定方法:中国药典2005版附录29VI B,外源性DNA残余量测定法:中国药典2005版附录46IXB,抗生素残余量测定法,中国药典2005版附录45IX A,,游离甲醛 \leq 50 μ g/剂,中国药典2005版附录34VI L。

[0170] 分子排阻高压液相层析在线分析疫苗抗原纯度,在线的AIV病毒抽提液、原液100微升、浓缩原液100微升、纯化液100微升注入分析型分子排阻层析柱(TSK-Gel PW column G6000PW.sub.XL,particle size 17. μ m.,pore size 1000.ANG.) (Tosho Biosciences LLC.;Mon tgomeryville,Pa.),平衡液PBS(无Ca²⁺or Mg²⁺)平衡柱子,流速1ml/分,紫外光吸收值215nm,蠕动泵采用Agilent 1100TM.附带ChemStationTM软件(Agilent Technologies Inc.;Palo Alto,Calif.)。

[0171] 血凝素含量检测按中国药典2005年版三部113页提供方法进行。

[0172] MDCK细胞残余DNA检测按中国药典2005版附录46IX B进行,MDCK宿主细胞蛋白测定试剂盒(Cygnus Technologies公司)按操作说明进行。牛血清白蛋白检测采用酶联免疫法。

[0173] 工艺中的质量控制和检验结果见表1。标记抗原原液质量检验结果见表3。

[0174] 表3. 3批标记抗原半成品主要质量检验结果

[0175]

批 次	检验项目								
	血凝 素 (μ g/ mL)	M2 蛋白 (ng/ mL)	牛白残 余量 (ng/m L)	MDCK DNA残 余量 (pg/mL)	MD CK 细胞 蛋白 残余 量 (ng/ mL)	甲 醛 残 余 量 (μ g/ mL)	抗 生 素 残 余 量 (μ g/mL)	Triton X-100 残 余 量 (μ g/m L)	内 毒 素 (EU/ mL)
1	5.8	1.9	7.9	75.0	10	40	48.2	15.0	4.5
2	7.0	1.8	8.6	75.0	9	35	45.6	14.5	5.0
3	6.2	2.0	9.7	75.0	10	45	40.2	13.4	4.8

[0176] 每ml疫苗原液半成品中总蛋白总量20-72.5 μ g/ml,禽流感病毒血凝素含量5-7 μ g/ml,内毒素含量 \leq 10EU/ml,MDCK细胞蛋白残余量 \leq 10ng/ml、MDCK细胞DNA残余量 \leq 100pg/ml、牛血清白蛋白残余量 \leq 10ng/ml、甲醛残余 \leq 50 μ g/ml、Triton X-100残余 \leq 15 μ g/ml、抗生素残余 \leq 50 μ g/ml,禽流感M2蛋白残余 \leq 2ng/ml。。

[0177] 实施例6禽流感病毒标记疫苗在10-20日龄鸡上的安全、效力以及诱导禽流感病毒M2抗体的能力试验

[0178] 按照实施例1的方法制备四个批次的禽流感全病毒颗粒标记疫苗抗原,制备得到的抗原用PBS (pH7.6) 稀释至5-7微克血凝素/1ml,乳化需采用Seppic公司按佐剂ISA780VG: 抗原=70:30(重量:重量)乳化。

[0179] 疫苗的安全性试验:每批疫苗取10-20日龄5只28d SPF鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品1mL,在负压隔离饲养器中饲养观察14天观察临床体征,到期逐只进行剖检,观察注射部位的病理变化。

[0180] 疫苗的效力试验:疫苗免疫后保护抗体试验,每批疫苗取10只10-20日龄SPF鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品0.1mL,在负压隔离饲养器中饲养观察,分别于免疫后的前28d每7d一次、28d以后每14d一次采免疫鸡心脏血样,按2000版农业部生物制品规程方法检测HI抗体。

[0181] 免疫鸡的攻毒保护试验:每批疫苗取10只10-20日龄SPF鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品0.1mL,在负压隔离饲养器中饲养观察18d后,每只鸡用1000倍稀释的H5N2病毒液攻毒1mL,同时取未免疫的同批SPF鸡10只使用相同剂量病毒攻毒作为阳性对照。在负压隔离饲养器中饲养,观察疫苗的免疫保护效果。

[0182] 疫苗中蛋白抗体产生能力试验:以含3-7 μ g/ml血凝素的疫苗注射5周龄鸡和鸭各10只,每次1ml疫苗,免疫后7、21天分别再注射一次,最后一次免疫的一周后,采用专利号为ZL201210241084.9,发明名称为“一种制备甲型流感病毒全长M2蛋白的方法”的专利申请所公开的方法制备和纯化M2抗原,然后用ELISA检测抗M2抗体。

[0183] 结果:免疫的鸡\鸭大剂量注射均没有检查到禽流感病毒M2蛋白抗体。因此根据检测灵敏度和禽流感病毒疫苗纯度,禽流感标记疫苗最多含M2在1-2ng/ml之间,可作为标记疫苗使用,对鸡和鸭反复三次注射免疫不产生抗体,可区别鸡、鸭的感染和免疫。禽流感标记疫苗的安全、效力、诱导禽流感非结构蛋白抗体能力见表4。

[0184]

表 4

批次	鸡							鸭					
	血凝素 ($\mu\text{g/ml}$)	安全性 (1ml)	攻毒保 护率 (%)	血凝抑制 抗体 (log2)	M2 蛋白抗 体	疫苗 M2 蛋 白残余 (ng/ml)	血凝素 含量 ($\mu\text{g/ml}$)	安全性	保 率 (%)	护 抗 体 (log2)	M2 蛋白 抗体	疫苗 M2 残余 (ng/ml)	
2013-1	4.8	通过	100	7.2	无	1.5	6.3	通过	100	8.0	无	1.5	
2013-2	5.8	通过	100	8.2	无	1.9	5.9	通过	100	8.2	无	1.8	
2013-3	5.5	通过	100	7.6	无	1.7	6.0	通过	100	7.2	无	1.9	
2014-4	6.2	通过	100	8.0	无	1.8	5.0	通过	100	8.2	无	1.8	
平均	5.58	安全试验 均通过	100	7.8	检测 不到	1.70	5.8	均通过安全试验	100	8.0	检测 不到	1.75	

[0185] 实施例7.感染与免疫动物的区别(检测M2抗体以区别禽类感染和疫苗免疫)

[0186] 7.1禽流感病毒全长M2蛋白的制备

[0187] 全长M2蛋白的制备方法,具体见专利ZL 201210241084.9.

[0188] 以全长M2蛋白为基础ELISA试剂盒的制备和验证,H5N1基因来源H5N1,基因库(accessionnumber EU014132.1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),合成肽S M2e(2-24)氨基酸序列SLLTEVETPTRNEWECKCSDSSD,和合成肽M2e(2-18)氨基酸序列SLLTEVETPTRNEWECKC,自行合成,用高压液相色谱测定纯度为85%,溶于蒸馏水。

[0189] 7.2免疫迎迹

[0190] 纯化的M2蛋白进行12.5%SDS-PAGE电泳,电转染醋酸纤维素膜,转染后,用含10%牛血清白蛋白PBST(0.5%Tween 20PBS)室温下封闭2h。待检测的血清见表1,用含1%BSA的PBST 1:500稀释,加入室温孵育1h,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡IgG孵育,PBST洗涤,用(diaminobenzidine,DAB)作为底物,观察。

[0191] AIV参考血清禽流感各亚型参考血清购自中国农业部禽流感参比实验室,见表5,所有血清来自SPF鸡接种AIV各亚型灭活疫苗,免疫2次,用血凝抑制试验测定免疫鸡抗体。

[0192] 表5. 禽流感病毒抗血清参考品

[0193]

免疫用毒株	亚型	HI滴度(log2)
A/Mallard/Italy/3401/05	H5N1 LPAIV	7
A/Chicken/Pennsylvania/21525/83	H5N2 LPAIV	7
A/Chicken/Saudi Arabia/ SP02525/3AAV/2000	H9N2 LPAIV	9
A/Pintail/AB/293	H2N9	7
H1N1 A/Mallard/ON/6/2005	H1N1	9
A/Chicken/Italy/1067/99	H7N1 LPAIV	8
A/Duck/Memphis/546/74	H11N9	9
A/Duck/Ukraine/1/1963	H3N8	6

[0194]

A/Chicken/N etherlands/06022003/06	H7N7 LPAIV	7
A/Vietnam/1194/2004	H5N1	6
A/Chicken/Konawi Selatan/8/2004	H5N1	7

[0195] 7.3重组M2蛋白ELISA优化

[0196] M2的检测使用浓度、AIV阳性和阴性血清的光密度OD450nm值的确定:

[0197] M2蛋白用0.1M碳酸钠缓冲液(pH 9.6)稀释至0.82-200mg/mL,包被96孔平底板,室温孵育过夜,用高盐洗液(WB,NaCl,37.5g,KCl,0.2g,Na₂HPO₄,1.15g,KH₂PO₄,0.5g,Tween 20,0.5ml溶于1L蒸馏水,,pH 7.2)洗涤,用含5%BSA的PBS室温封闭未饱和的孔(200微升/孔),室温孵育2h,用WB洗涤三次.待检血清用稀释液(DB)(0.1M Tris pH 7.4,0.5M NaCl,1mMNa₂EDTA,2%w/v BSA,3%w/v Triton X-100,3%w/v Tween20)按1:25-1:800稀释血清,每孔100微升,复孔加入,室温孵育1h,所有的检测试验设有阳性血清和阴性血清对照各4孔.用PBS-T洗涤三次,每孔加入辣根过氧化物酶标记兔抗鸡IgG 100微升,室温孵育1h,洗涤后加入底物溶液(100mg/ml TMB,溶于柠檬酸溶液pH 8),每孔加入100微升0.6%H₂O₂,孵育10-15min,颜色反应用1M硫酸终止,测定OD450。

[0198] 7.4合成肽M2e ELISA优化

[0199] 合成肽M2e-23、M2e-18合成肽作为包被抗原进行ELISA反应,合成肽M2e-23、M2e-18合成肽1mg溶于1mL无菌蒸馏水,0.1M碳酸钠缓冲液(pH 9.6)倍比稀释至含160-0.31mg/mL,包被96孔板,其余步骤和重组M2蛋白ELISA优化相同。

[0200] 重组M2蛋白ELISA、合成肽M2eELISA优化,每份血清样本用4孔,2孔用抗原包被,2孔不包被用作每个血清标本的内部对照.每份血清,抗原阴性孔的平均OD450为抗原包被血清孔OD450和“正确OD450值”的差.正确OD450值大于阴性血清平均正确OD450+2倍标准差(临界值)时,血清阳性。

[0201] 7.5AIV感染试验:重组M2为基础的ELISA和通常HA为基础的血凝抑制试(HI)验进行DIVA试验比较

[0202] 试验的目的是模仿和测定重组重组M2为基础的ELISA在检测免疫鸡受活病毒感染时的灵敏度,和HI法比较的检测效率.试验性免疫/攻击的鸡血清来自山西隆克尔生物制药公司,是用21天龄、未免疫无AIV感染的20只肉鸡制备.鸡分成2组,每组20只,第一组单剂灭活纯化禽流感疫苗(实施例1制备).第二组不免疫单独相同条件饲养.第一组免疫三周后用同源HA抗原采用HI法测定血凝抑制抗体.移入在P3实验房的隔离器中用10⁶ELD₅₀AIV(A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006)病毒液0.1ml经鼻内感染.第二组继续饲养不免疫也不攻毒.攻毒2周后,2组所有的鸡取血单独进行HI抗体检测和M2ELISA检测,比较监测免疫鸡感染和免疫的效率,同时用t检验的方法比较M2ELISA和HI检验鸡的感染攻击。

[0203] 7.6重组M2ELISA大规模DIVA检测

[0204] 本实例评估重组M2ELISA田间使用的效果.检测了3组鸡,包括(a)阴性组(非感染

和非免疫组,收集了商用肉鸡和蛋鸡群的血清,用IDEXX AIV抗体检测试剂盒确证无AIV抗体;(b)免疫组,总计334份血清,来自河北威县养鸡场;(c)感染组(c)总计56份血清,来自河北威县养鸡场;用M2-ELISA测定每份血清正确OD值(450nm)并比较不同检测组的数值,用Tukey检验平均值的差异,考量M2-ELISA区别免疫鸡和非免疫鸡血清的能力。

[0205] 7.7ELISA临界值

[0206] 使用双平面接收操作特征(two-graph receiver operating characteristic, TG-ROC)分析,从H5N1感染鸡血清(标准血清以及试验性感染攻击血清)、疫苗免疫鸡的血清的ELISA检测值测算。所有的动物实验均在中国流感中心P3试验房符合生物安全3级要求下进行,试验用鸡按国家试验动物指导原则饲养,试验结束后CO2麻醉,心脏穿刺取。

[0207] 结果:

[0208] 1、免疫印迹确证重组M2蛋白

[0209] 纯化的重组M2蛋白用AIV血清包括活的H5N1(A/Chicken/Scotland/1959和A/Ck/Viet Nam/8/2004)、H5N2(A/Ostrich/Denmark/72420/1996)、live H9N2(A/Turkey/Wisconsin/1/1966,均有舒跃龙博士惠赠,进行免疫印迹,H5N1、H5N2、H9N9抗血清与15-18kD的蛋白反应。免疫H5N1(疫苗)的抗血清因无抗M2抗体,则无显示反应的条带。

[0210] 2、重组M2ELISA和合成的M2eELISA优化

[0211] 免疫印迹确证了M2蛋白的抗原性并能从免疫的鸡血清区别活的病毒感染,有可能用此抗原的ELISA评估,另外一方面,合成肽M2e-18ELISA也可区别感染和免疫的鸡。首先,对M2的包被抗原和活H5N1血清的最低背景的最大吸收值为25 μ g/ml,M2e-18肽为10 μ g/ml,结果见表6、表7及图3、图4,H5N1活的和灭活抗血清在1:100稀释时,非特异性反应最小,获得最高OD450值。因此后续ELISA检测,血清稀释按此稀释度。

[0212] 表6重组全长M2蛋白ELISA包被浓度优化

[0213]

M蛋白浓度(μ g/ml)	结合对照	H5N1感染	灭活H5N1疫苗	SPF	非免疫
200	0.05	1.14	0.3	0.15	0.2
100	0.03	1	0.25	0.14	0.2
50	0.04	0.87	0.2	0.13	0.2
15	0.05	0.95	0.19	0.12	0.15
12.5	0.05	0.76	0.18	0.1	0.14
6.25	0.05	0.76	0.17	0.05	0.13
3.32	0.04	0.6	0.18	0.05	0.05
1.65	0.05	0.48	0.19	0.05	0.05

[0214] 表7 Me2-18合成肽ELISA包被浓度优化

[0215]

Me2-18 蛋白浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	结合对照	H5N1 感染	灭活 H5N1 疫苗	SPF	非免疫
0.03	1.2	0.43	0.4	0.34	0.03
0.03	1.36	0.39	0.38	0.33	0.03
0.03	1.58	0.38	0.37	0.2	0.03
0.03	1.4	0.22	0.21	0.18	0.03
0.02	1.15	0.21	0.2	0.16	0.02
0.03	1	0.21	0.2	0.15	0.03
0.03	0.58	0.21	0.2	0.15	0.03
0.03	0.38	0.21	0.2	0.15	0.03

[0216] 3、重组M2ELISA和合成的M2eELISA检测活AIV暴露的比较

[0217] 重组M2ELISA和合成的M2eELISA检测AIV 11中亚型鸡免疫血清 (HI滴度在6-9log 2), 结果表明, 使用2种ELISA方法对所有免疫血清检测存在相当程度的一致。但对H3N2抗血清, M2蛋白的反应性低于M2e合成肽, 可能产生了某种干扰。

[0218] 表8及图5显示2种活H5N1株, 苏格兰和越南株的抗血清和重组M2蛋白反应强烈, 和灭活疫苗免疫血清没有反应。清楚说明了M2蛋白在DIVA检测从感染动物区别免疫的可操作性。M2蛋白和M2e合成肽ELISA检测结果显著呈正向Pearson相关 ($p=0.05, 67\%$), 显示用M2蛋白代替昂贵M2e合成肽的可能。

[0219] 表8重组全长M2蛋白ELISA检测参考血清

[0220]

禽流感参考血清	OD450nm
H3N8	1.2
H7N1	0.58
H3N2	0.31

[0221]

H7N7	0.96
H11N6	0.56
H2N3	0.78
H1N1	0.73
H5N1-Ch	0.92
H5N1-Viet	0.75
H9N2	0.7
H5N2	0.46
H5N1灭活疫苗	0.21

[0222] 活的AIV亚型的抗血清H11N6、H7N7、H1N1、H7N1、H2N3、H9N2、H3N8、H5N2用ELISA检测都和M2、M2e合成肽反应, 这也和M2蛋白的广谱抗原性一致。

[0223] 4、重组全长M2蛋白ELISA检测AIV具有高度的灵敏性, 优于常规HA为基础的HI滴度检测

[0224] HI、重组M2ELISA对免疫鸡感染AIV监测,HI滴度不能区别已经免疫鸡的活病毒感染(A/Ck/West Java/Pwt-Wij/2006),结果如图6,ELISA检测免疫鸡和非免疫鸡血清,感染前OD值几乎相等,感染后OD值从0.14急剧上升到1.2,达到8倍增高,结果如图7所示。M2ELISA临界值为0.58,T检验统计分析确证M2ELISA对活病毒的感染区别的高效,优于普通常规的HA法($p=0.00001$)。

[0225] 5、M2和M2e合成肽ELISA检测田间样品(大规模DIVA检测)

[0226] M2和M2e合成肽ELISA检测非免疫、免疫的商用蛋鸡血清、非免疫肉鸡血清。

[0227] 非免疫蛋鸡中,除M2ELISA检测有6份血清OD450大于0.58,为阳性,假阳性率为2.9%,其余皆为阴性,对假阳性血清进行免疫印迹分析显示没有和M2蛋白反应。免疫鸡群的血清中,M2ELISA检测,有19/334份血清阳性,假阳性率为5.6%,表明M2ELISA区别田间非感染鸡群(阴性)和免疫鸡群的高效性感染鸡群和非感染鸡群、免疫鸡群的ELISA OD值显著差异。见表9及表10。

[0228] 表9. 重组全长M蛋白ELISA检测感染血清、阴性血清、免疫血清抗体比较

[0229]

平均比较			
检测分组	平均	标准误	99%的可信水平
感染	0.9059	0.23523	A
免疫	0.2031	0.1651	B
阴性	0.1835	0.0113	B
偏差分析			

[0230]

偏差来源	自由度	卡方平均值	F 值	P值
检测组	2	15.145	349.0	0.0001
偏差	591	0.0257		

[0231] ($p=0.0001$)。

[0232] 表10. 重组全长M2蛋白ELISA检测田间大量临床样本血清结果

	感染组血清	阴性血清	免疫血清
[0233] OD450nm	0.72-1.10	0.13-0.32	0.14-0.31

[0234] 6、以全长M2蛋白为基础的胶体金免疫层析条制备和评估

[0235] 免疫层析是利用金纳米颗粒快速检测并容易观察抗原抗体反应的一种方法.,结果用肉眼可观察,在田间操作方便,即时监测。膜带从左到右包括样品垫层膜(0.5X1.5cm²),用样品垫层缓冲液处理,缓冲液含0.02% (vol/vol) Tween-20,0.5% (wt/vol) 脱脂牛奶、0.05% (wt/vol) 十二烷基磺酸钠,空气干燥。结合垫层(0.5X0.5cm²),用Tris-缓冲盐水(TBS;pH 7.4)预洗涤,空气干燥。硝酸纤维素(0.5X2.5cm²),固定抗原和控

制线,未处理的纤维素膜(0.5X1.5cm²)作为吸附垫层。以上膜固定在塑料支架上构成免疫层析条。

[0236] 10ml胶体金溶液加到结合pad的适当位置(离左边1.5cm处),空气干燥。包装防止脱落和污染。捕获抗原禽流感全长M2蛋白制法见具体见专利ZL 201210241084.9,蛋白浓度用Bradford法检测。M2蛋白高亲和多克隆抗体用鸡超免血清制备,具体制备方法,纯化全长M2蛋白0.1ml(蛋白量)眼内和肌肉注射35日龄的SPF鸡,每隔2周免疫一次,免疫4次。

[0237] 25微克(纯化融合M2蛋白和完全弗氏佐剂乳化物)初免,2周后用15微克(纯化M2蛋白和不完全弗氏佐剂乳化物)进行第二次免疫。总计4次,8周后取血,免疫血清用50%的饱和硫酸铵沉淀,用PBS在4℃透析。为制备MBP重组M2蛋白或MBP亲和层析柱,介质已经用50倍体积的1M盐酸、10倍柱床体积蒸馏水,10倍柱床体积的结合缓冲液(0.1M NaHCO₃,0.5M NaCl,pH 8.3)处理,表达纯化的重组全长M2蛋白或MBP与50mlCNBr活化的Sephacrose 4B进行反应,在4℃过夜,洗去未结合蛋白,用0.2M甘氨酸在4℃封闭12小时。为纯化所有M2蛋白或片段的抗体,抗血清在4℃透析过夜,用5倍柱床体积结合缓冲液洗涤,用抗体洗脱液(0.1M glycine,pH 2.7)洗脱后,用液体(3M Tris,pH 8.8)将洗脱液立即调节pH=8.0,按30%(v/v)加入甘油-20℃保存备用,浓度为150-250μg/ml。

[0238] 每只鸡加强免疫前和免疫后血清抗体滴度用自建的M2-ELISA检测。

[0239] M2抗原和鸡高亲和M2多克隆抗体各5ml分别用巴斯德滴管在检测线和控制线上直接印迹(离纤维素膜后部约有2cm),固化的条带在37℃孵箱空气干燥,贮存在4℃备用。胶体金(直径40nm)用作标记免疫球蛋白IgY。羊抗鸡结合物优化后制备溶于20mM Tris-HCl溶液(pH 8.2,含1%牛血清白蛋白),其OD值10.1。

[0240] 血清样本来自试验性感染的SPF鸡和田间免疫、自然感染的鸡。血清样本用抗体稀释液(0.02% [vol/vol] Tween-20,1.0% [wt/vol] BSA in TBS[pH 7.4])按1:500稀释,移入96孔板,层析条插入溶液10-20秒,移出孵育2分钟,观察结果。检测线和控制线显栗紫色为阳性结果。反应线条强度可进行定量,栗紫色带强度可用volume contour tools检测。每次测量各进行三次重复,确定平均值和标准误。

[0241] 选取高速流动性的膜,120秒可流动4cm,为使膜毛细流动速率和膜的敏感性达到平衡,固化抗原结合待检测抗体的比例、数量。M2蛋白浓度进行了测定,M2蛋白在2.90mg-0.029mg/ml范围,见图8,AIV全长M2蛋白按1:1、1:5、1:10、1:50、1:100稀释对应的蛋白含量分别为2.90mg/ml、0.58mg/ml、0.29mg/ml、58.0mg/ml、29.0mg/ml,与阳性血清、阴性血清、1:10胶体金标记物反应结果如图8,图中反应曲线高峰平台第一点为Xa=稀释因子,小于1:500检测无效,样品需要高倍稀释,曲线高峰平台末尾点为Xb,稀释因子1:20,000,可认为阴性。

[0242] 用胶体金标记的抗鸡抗体按1:5稀释,M2蛋白抗原可获得最高信号强度(OD)。M2蛋白浓度为2.90mg/ml。血清按1:20,000稀释,层析条检测为阳性,抗原稀释度增加,高稀释血清检测阳性下降。在检测线和控制线上的无效检测则发生在血清没有稀释或低于1:500稀释,可能是多余蛋白阻塞了检测的仪器。因此建议稀释的比例1:10(0.29mg/ml),OD为86.9%,最大的稀释比例1:100(0.029mg/ml),OD为16.0%。因此提供阳性结果的最小浓度为1:10,最大比例超过1:100稀释获得的OD值几乎和阴性结果OD值相近,约为15.0%OD,而无法确定阳性结果。

[0243] 纯化M2蛋白抗原高信号的强度为99.5.1%,M2e的信号强度为66.1%,因为1)全长M2蛋白完全干燥和遇到样品水化保持了结构的完整性;2)M2e多肽机构的改变。

[0244] 胶体金结合的最佳浓度为1:10稀释,可产生有效信号并易快速清洗。样品产生有效结果的体积为50微升,高于此体积产生的结果与最小不需体积的结果一样,说明检测不需限定样品体积,层析条检测读数时间建议为1-2min,读取检测结果过早减少可见条带的强度,晚于建议时间读取结果,获得的信号强度无大的差异,这揭示胶体金的稳定性,但在1-2小时读取的结果,信号的强度弱且低于早期观察的信号强度。所使用的试剂条经贮存后使用并无褪色现象。

[0245] 本实例对免疫层析胶体金条检测鸡自然感染禽流感病毒亚型参考血清和实验性感染血清的灵敏性和特异性进行了再次评估。通过对M2-ELISA检测鸡自然感染禽流感亚型病毒参考血清和实验性感染血清稀释检测,见表11,免疫层析胶体金条检测的6个M2抗体阳性血清,1:20000稀释,信号强度为OD_{255nm} 50%OD,阳性率为100%。

[0246] 纯化灭活禽流感疫苗免疫血清并没有和禽流感固化的M2蛋白反应,说明了M2蛋白的特异性。

[0247] AIV阳性血清作为阳性对照,层析条上与血清抗体颜色反应与OD_{255nm}有必然联系。阳性血清系列稀释,信号强度随抗体的存在在一定比例减弱,有检测的临界值。本实例AIV感染的临界值最小在50%OD以上,绝对保证可区别不同的检测结果,弱信号导致假阳性结果的增加。

[0248]

表11 M2蛋白免疫层析检测大量样本的灵敏性(OD255nm光密度%[平均值±标准差])

分 组	ELISA滴度									
	原始血清	1000	500	250	125	62.5	31.25	0		
感 染 组 血 清	10626	+	89.7±0.6	+	84.5±2.0	+	87.5±0.6	33.1±0.3	29.7±2.2	22.5±1.5
	13800	+	90.7±0.8	+	90.7±0.8	+	90.6±1.0	34.7±2.4	22.9±1.9	29.0±1.5
	10934	+	96.0±2.7	+	85.4±2.6	+	85.7±4.9	28.8±1.2	22.0±1.7	16.0±0.5
疫 苗 免 疫 血 清	41.2	-	28.8±2.2	-	20.3±0.9	-	21.8±0.9	18.6±0.5	17.0±1.5	28.8±3.1
	44.5	-	40.2±1.5	-	39.9±1.4	-	23.2±1.5	40.5±1.0	42.5±2.3	39.0±1.5
	41.2	-	38.8±1.4	-	41.6±1.8	-	42.0±0.9	39.0±1.5	37.9±1.5	38.8±4.0
田 间 血 清	2768	+	76.5±1.2	+	89.9±2.1	+	75.9±1.9	18.8±0.9	15.9±2.1	19.7±1.0
	2719	+	85.6±2.8	+	90.6±4.0	+	30.6±0.8	23.5±1.3	27.8±0.9	15.7±1.6
	2571	+	80.9±1.0	+	79.0±1.5	+	80.8±3.0	24.5±1.8	24.0±1.9	34.6±3.8

“+”阳性“-”阴性 所有血清用M2-ELISA检测为阳性，调整为0-1000ELISA滴度，层析条M2抗原按0.29 mg/ml 固化，1: 10稀释结合胶体金结合物，结果以255 nm 的光吸收值的百分比表示；9次重复检测的平均值±标准误。

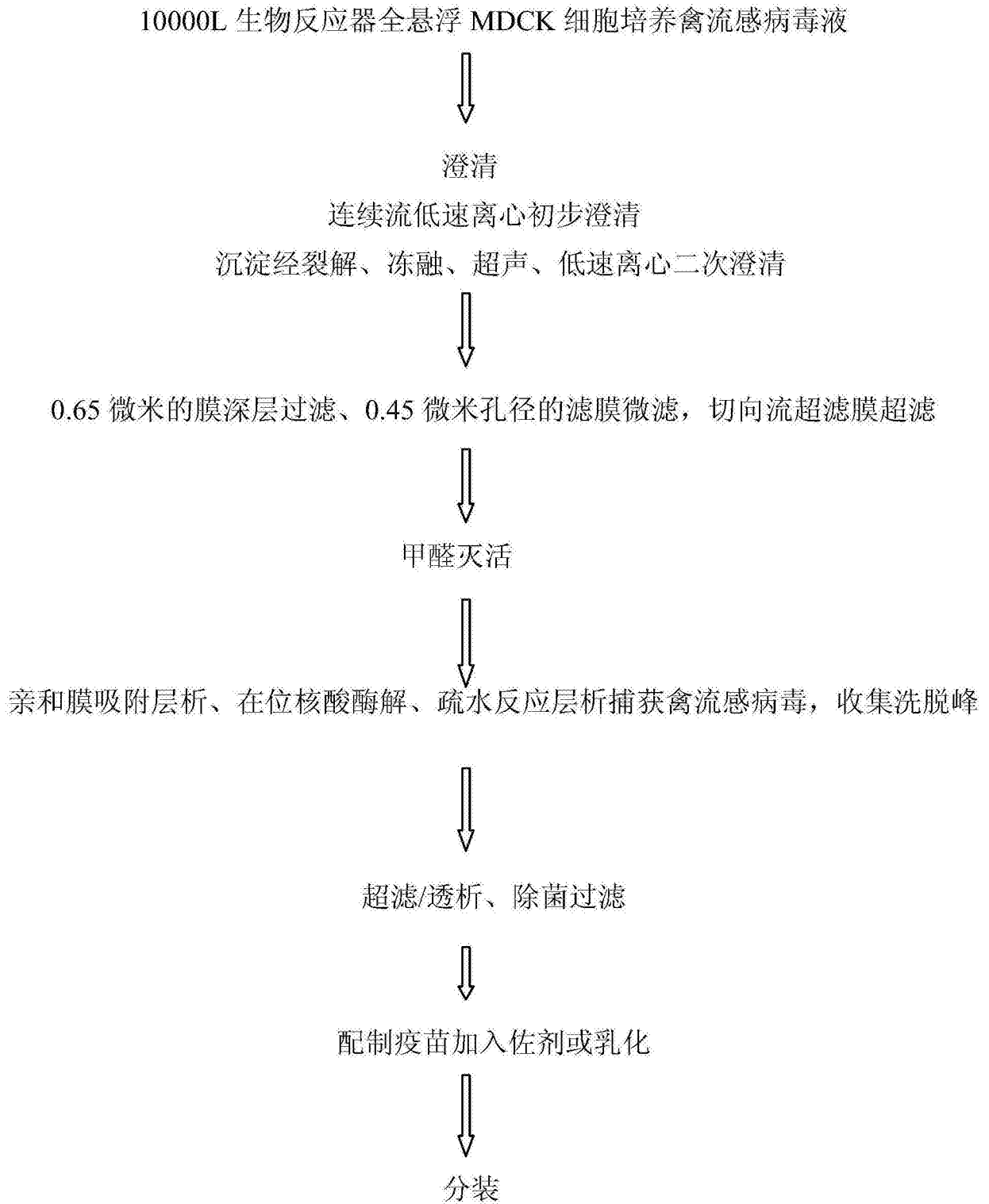


图1

禽流感标记疫苗规模化生产的质控点

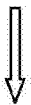
细胞密度、细胞接种感染复数 MOI、病毒滴度 TCID50、胰蛋白酶浓度、无菌试验



病毒滴度、收率、无菌试验、蛋白总量、DNA 总量、血凝素含量、残余抗生素、Triton-X100 含量



病毒滴度、收率、无菌试验、蛋白总量、DNA 总量、血凝素含量、Triton-X100 含量、



病毒毒力残余验证、甲醛浓度、作用温度、作用时间



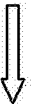
蛋白总量、DNA 总量、血凝素含量、MDCK 细胞蛋白残余、MDCK 细胞 DNA 残余、Triton-X100 浓度、甲醛残余量、M2 蛋白含量、牛血清白蛋白残余



收率、体积、无菌试验、血凝素含量、蛋白总量、MDCK 细胞蛋白残余、MDCK 细胞 DNA 残余、残余 Triton-X100、M2 蛋白残余、无菌试验、牛血清白蛋白残余



内毒素含量、粘度、稳定性、佐剂质量控制、防腐剂



蛋白总量、血凝素含量、MDCK 细胞蛋白残余量、MDCK 细胞 DNA 残余量、牛血清白蛋白残余、M2 蛋白残余 Triton-X100 残余、抗生素残余、甲醛残余量、硫柳汞残余

图2

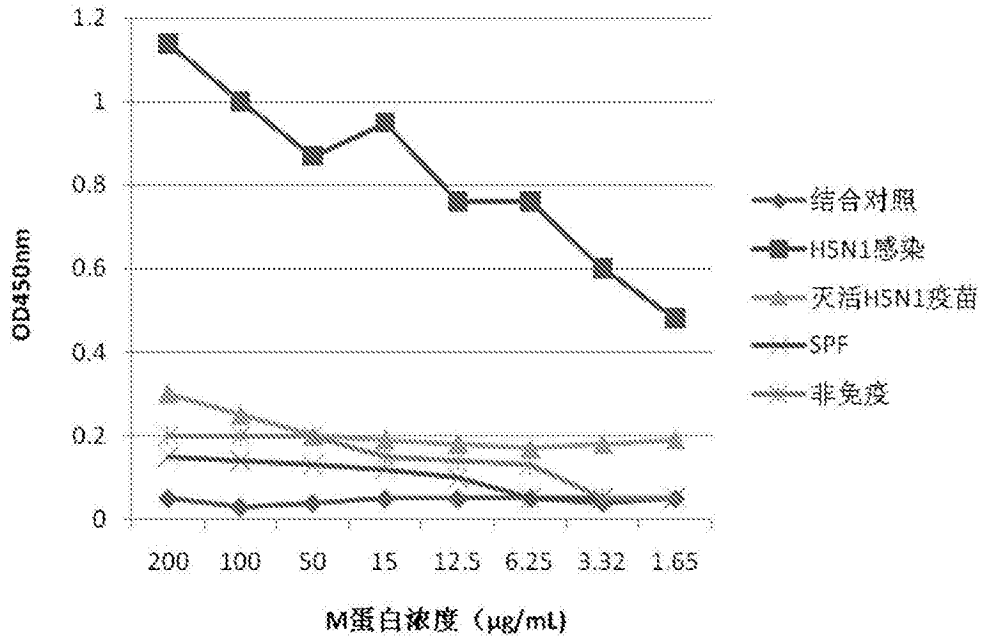


图3

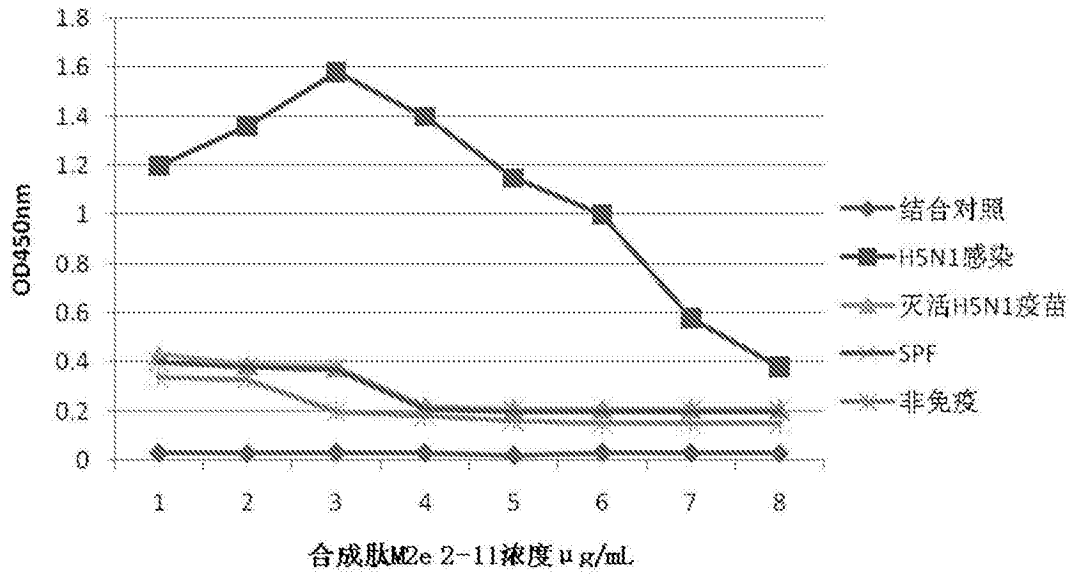


图4

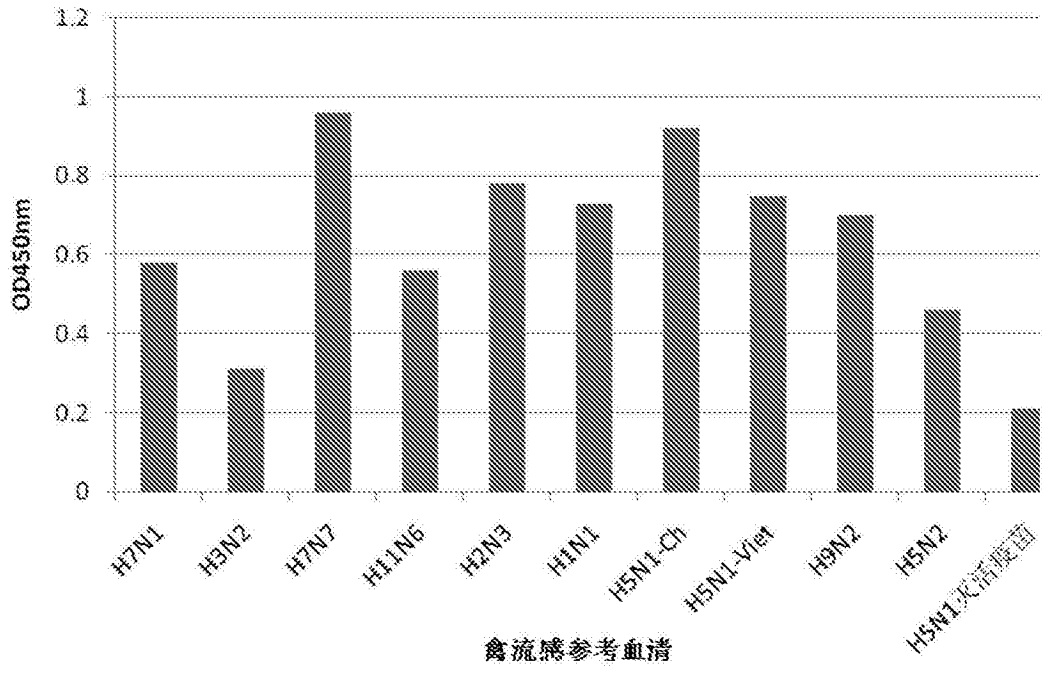


图5

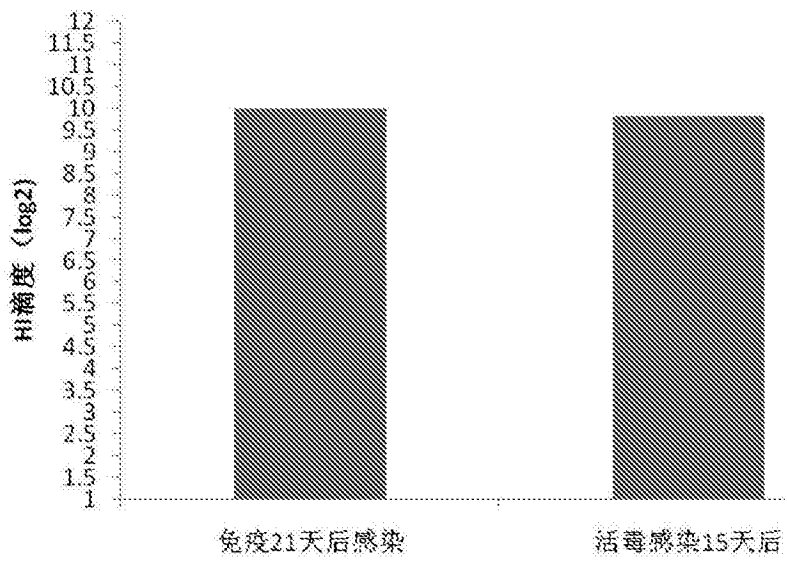


图6

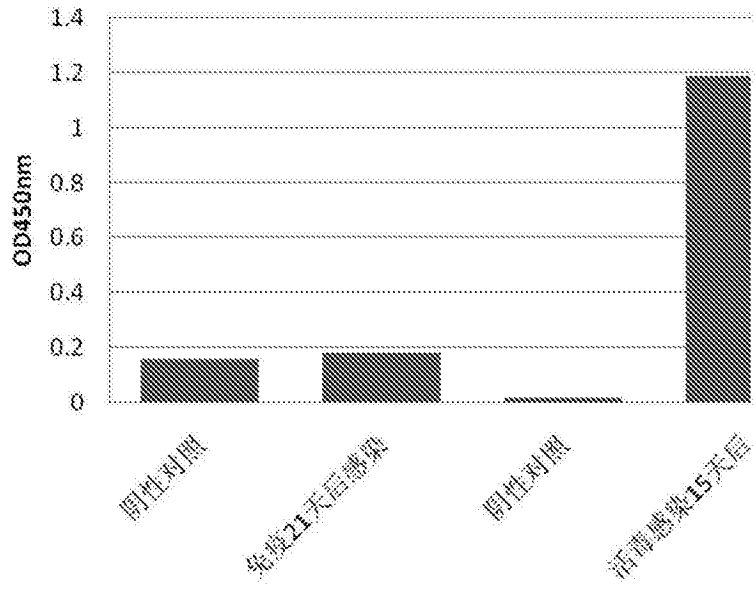


图7

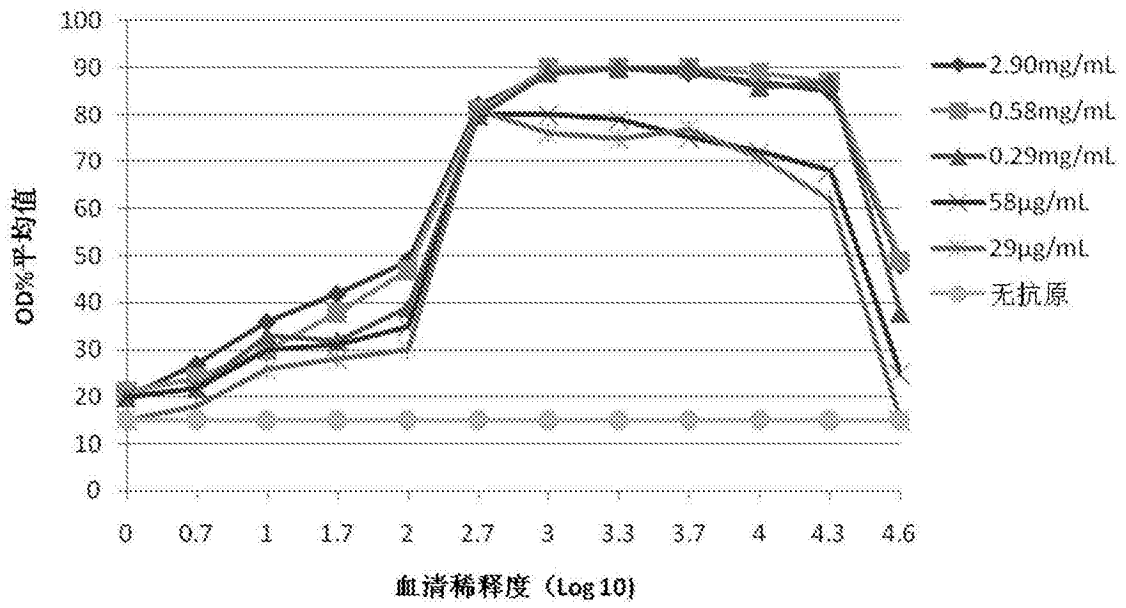


图8