



(21) 申请号 202110621093.X

(22) 申请日 2021.06.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113249339 A

(43) 申请公布日 2021.08.13

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.20649 2021.04.23

(73) 专利权人 北京市农林科学院
地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路9号
专利权人 青岛易邦生物工程有限公司

(72) 发明人 黄程 宋新宇 林健 杨志远
王龙 刘立新 李加凤 程慧敏
祝洪伟 刘月焕 王小蕾 赵际成
段会娟 潘洁

(74) 专利代理机构 北京国林贸知识产权代理有限公司 11001
专利代理师 李瑾 李连生

(51) Int.Cl.
C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103223162 A, 2013.07.31

CN 101732711 A, 2010.06.16

CN 103937752 A, 2014.07.23

王晓丽等.一株H3N2亚型犬流感病毒的分离与进化分析.《中国动物传染病学报》.2015, (第02期),

张家友等.以MDCK为基质的H5N1流感全病毒灭活疫苗的制备及其免疫学评价.《中国生物制品学杂志》.2020, (第01期),

Liu, F等.Heterologous Antibody Responses Conferred by A(H3N2) Variant and Seasonal Influenza Vaccination Against Newly Emerged 2016-2018 A(H3N2) Variant Viruses in Healthy Persons.《CLINICAL INFECTIOUS DISEASES》.2020, 第71卷(第12期), 第3061-3070页.

审查员 郭鑫鑫

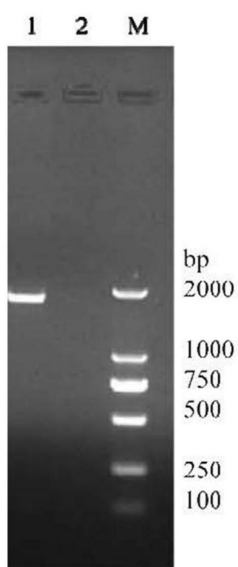
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种H3亚型犬流感病毒株、灭活疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种H3亚型犬流感病毒株、灭活疫苗及其制备方法。所述疫苗是用保藏编号CGMCC NO.20649的H 3亚型犬流感病毒株作为抗原灭活后制备得到。本发明采用SPF鸡胚或MDCK细胞作为载体进行病毒增殖,收集病毒液,灭活,纯化,制备成疫苗。本发明制备得到的H3亚型犬流感病毒灭活疫苗的病毒含量高、稳定性好、安全性高,是一种较为理想的H3亚型犬流感病毒灭活疫苗,具有重要的公共卫生意义。



1. 一种 H3 亚型犬流感病毒株,其特征在于:保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其保藏编号为CGMCC NO.20649。

2. 一种 H3 亚型犬流感病毒灭活疫苗,其特征在于:所述疫苗由权利要求1所述 H3 亚型犬流感病毒接种 SPF 鸡胚,收获鸡胚尿囊液,灭活,添加佐剂而得;

包括如下步骤:

(1) 接 种 :将 H3 亚型犬流感病毒经尿囊腔途径按照 $2 \times 10^4 \text{EID}_{50}$ /枚的剂量接种于 10~11日龄 SPF 鸡胚,35℃孵育;

(2) 孵育和观察:接种后 48 小时内,每日照蛋1 次,将 48 小时内死胚弃去,接种后48 小时的活胚取出置于 2~8℃冷却过夜;

(3) 收获:将冷却的鸡胚取出,消毒气室部位卵壳,无菌剥除气室部卵壳,吸取尿囊液,离心取上清液存于 2~8℃即为病毒原液;

(4) 浓缩与洗涤病毒原液:将步骤(3)收获得到的病毒原液用超滤浓缩设备浓缩至原来体积的 1/5,所述超滤浓缩设备为100KD~300KD超滤膜包;然后加入等体积的 pH 值为 7.0~7.2 的 PBS 溶液洗涤,再进行浓缩,如此反复1~ 3 次, 得到浓缩病毒液;

(5) 灭活病毒:向步骤(4)所得的浓缩病毒液,加入浓缩病毒液总体积0.1%的甲醛在 4℃振荡灭活 7 日;

(6) 柱纯化:将步骤(5)所得灭活好的浓缩病毒液经Capto Core 700柱纯化,流速1mL/min,得到纯化好的抗原,该抗原血凝效价不低于 1:512,最后蛋白含量不高于 400μg/mL,冻干保存;

(7) 疫苗配制:使用前,将步骤(6)所得冻干抗原用生理盐水进行稀释,与 Montanide™ GEL 02佐剂混合,搅拌混匀,得到疫苗。

一种H3亚型犬流感病毒株、灭活疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及病毒株、其疫苗制品及其制备方法,更具体地说涉及一种H3亚型犬流感病毒病毒株、其灭活疫苗及其制备方法。

背景技术

[0002] 犬流感(Canine influenza,CI)是由正粘病毒科甲型流感病毒属的犬流感病毒(Canine influenza virus,CIV)引起的犬类动物接触性呼吸道传染病。CIV主要分为H3N8和H3N2亚型。H3N8亚型是马流感病毒跨种间传播赛犬,感染宠物犬临床症状轻微或未见明显的临床症状。H3N2亚型CIV感染犬后,犬表现出明显的发热、精神沉郁、咳嗽流鼻汁等明显临床症状,部分犬治疗不及时死亡,或治愈后易发生呼吸道疾病。

[0003] H3N2亚型CIV主要通过气溶胶传播,是我国目前主要流行亚型。

[0004] 2004年,美国佛罗里达州的赛犬第一次暴发CI,研究发现该CIV为H3N8亚型且起源于马流感病毒(Equine influenza virus,EIV)。2007年韩国暴发犬流感疫情,研究分离得到H3N2亚型CIV,该亚型最早于2005年左右从禽类转移至中国犬类,极易在犬之间传播。2009-2010年,在浙江、江苏、北京、辽宁等地也相继分离到了禽源H3N2亚型CIV,且与中国华南及韩国H3N2亚型CIV高度同源。截至2015年,H3N2亚型在中国及韩国等亚洲地区广泛流行。流行趋势表明H3N2亚型犬流感已经成为包括中国在内的亚洲及美国地方性动物传染病。除此之外,H3N2亚型CIV出现仅十多年,就已经出现多起与人流感病毒重配事件。2012及2014年韩国报道了从犬分离的新型CIV毒株由H3N2亚型CIV与H1N1亚型人流感病毒重配而来。

[0005] 我国对于该病研究比较深入的是华南农业大学李守军课题组,他们在2010年分离到H3N2亚型犬流感病毒,随后又对全基因组测序,NS1基因原核表达、诊断(HA1蛋白间接ELISA、HI-HA、RT-LAMP)、灭活疫苗、基因工程苗、致病性(PB2基因位点突变对小鼠致病性)等进行了深入研究。目前,预防CIV感染最有效的策略是疫苗接种,美国、韩国等犬流感高发国家市面上已有针对该病的疫苗。鉴于此,研发一种新型高效犬流感疫苗具有重要的公共卫生学意义。

[0006] 由于疫苗评价模型尚未建立,制约着目前疫苗的开发。因此,研制安全有效的犬流感疫苗,控制犬流感的流行,对保障公共卫生安全有重大意义。

发明内容

[0007] 本发明目的之一是提供一种H3亚型犬流感病毒灭活疫苗;

[0008] 本发明目的之二是提供所述H3亚型犬流感病毒灭活疫苗的制备方法。

[0009] 本发明所述病毒毒株命名为H3亚型犬流感病毒HB株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC.N0.20649;所述病毒属于正黏病毒科(Orthomyxoviridea)A型流感病毒属(Influenza A virus),是单链负股RNA病毒,有囊膜;所述病毒对环境的抗性和热稳定性都比较差,在56℃的环境中30分钟、65℃~75℃几分钟

即可灭活,在4℃只能保存很短的时间,在-20℃冰箱中冻存能保持几个月的活性,但是病毒凝集红细胞的能力可能消失;所述病毒通常可接种于9~11日龄的鸡胚尿囊腔,培养48小时即可收获;或在MDCK细胞培养。

[0010] 一种H3亚型犬流感病毒灭活疫苗,所述疫苗由所述H3亚型犬流感病毒接种SPF鸡胚或MDCK细胞,收获鸡胚尿囊液或细胞培养上清,灭活,添加佐剂而得。

[0011] 所述疫苗的制备方法包括如下步骤:

[0012] (1) 接种:将H3亚型犬流感病毒经尿囊腔途径按照 $2 \times 10^4 \text{EID}_{50}$ /枚的剂量接种于10~11,日龄SPF鸡胚,35℃孵育;通过实验显示,这个剂量收获的鸡胚尿囊液病毒含量高且稳定,该接种剂量是本发明重要条件之一。

[0013] (2) 孵育和观察:接种后48小时内,每日照蛋1次,将48小时内死胚弃去,接种后48小时的活胚取出置于2~8℃冷却过夜。选择接种时间为48h也是本发明通过实验确定的重要条件之一,这个时间收获的鸡胚尿囊液病毒含量高且稳定。

[0014] (3) 收获:将冷却的鸡胚取出,消毒气室部位卵壳,无菌剥除气室部卵壳,吸取尿囊液,离心取上清液存于2~8℃即为病毒原液;按照《中华人民共和国兽药典》二〇一五年版三部附录7规定的半数感染量测定方法进行病毒含量测定,增殖病毒效价 $\geq 10^{7.5} \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ 。

[0015] (4) 浓缩与洗涤病毒原液:将步骤(3)收获得到的病毒原液用超滤浓缩设备(100KD~300KD超滤膜包)浓缩至原来体积的1/5(该浓缩程度保证了足够的病毒含量,达到血凝效价即HA 1:512的标准);然后用加入等体积的pH值为7.0~7.2的PBS溶液洗涤(洗去杂蛋白,提高抗原纯度),再进行浓缩(用超滤设备浓缩1倍),如此反复1~3次,得到浓缩病毒液,蛋白含量不高于3mg/mL;通过浓缩与洗涤提高了抗原浓度,纯化了抗原。

[0016] (5) 灭活病毒:向步骤(4)所得的浓缩病毒液,加入浓缩病毒液总量(V/V)0.1%的灭活剂甲醛,在4℃振荡灭活7日。

[0017] (6) 柱纯化:将步骤(5)所得灭活好的浓缩病毒液经Capto Core 700柱纯化(流速1mL/min),得到纯化好的抗原,该抗原血凝效价不低于1:512,最后蛋白含量不高于400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (该参数为关键参数),冻干保存;柱纯化可以除杂和减少甲醛,降低对犬的副反应。

[0018] (7) 疫苗配制:使用前,将步骤(6)所得冻干抗原用生理盐水进行稀释,与Montanide™ GEL 02佐剂按合适比例混合(GEL02加入量为8%),搅拌混匀,得到疫苗。

[0019] 所述疫苗的评价方法包括如下步骤:

[0020] (1) 免疫:取4~6月龄比格犬5只,每只颈部皮下注射疫苗0.5mL,免疫28日后以相同剂量进行二次免疫,同时设对照5只。

[0021] (2) 攻毒:二次免疫后14~28日,采血,分离血清,测定血凝抑制(HI)抗体,所有犬通过鼻内喷雾接种H3亚型犬流感病毒(约含 $1 \times 10^{7.0} \text{EID}_{50}$)。

[0022] (3) 病毒分离:攻毒后5日,采集所有犬的鼻拭子,取原液、10及100倍稀释的病毒液分组接种鸡胚尿囊腔,每组接种5个9~11日龄鸡胚,每胚接种0.2mL,置35℃培养96小时测定HA效价;免疫组应显著低于对照组。

[0023] (4) 剖检:7~14日后剖检观察肺部实变情况,80%非免疫对照剖检出现10%以上实变认为攻毒有效,80%免疫组剖检未出现明显实变认为疫苗保护。

[0024] 犬流感H3亚型HI抗体检测方法如下步骤:

[0025] (1) 利用PBS将犬流感H3亚型HI抗原做连续倍比稀释,加入0.5%的鸡红细胞悬液,观察凝集反应。

[0026] (2) 根据凝集试验结果,用PBS配制4~8个工作单位的抗原。

[0027] (3) 待测血清经10%白陶土和鸡红细胞悬液处理后,视为1:10稀释度的血清。

[0028] (4) 利用(3)处理后的血清做连续倍比稀释后,加入4~8个工作单位的HI抗原室温作用30分钟后,再加入0.5%的鸡红细胞悬液,轻轻混匀后观察凝集抑制反应,试验设阴、阳性血清对照。

[0029] 本发明的有益效果:

[0030] 1) 本发明的疫苗对免疫犬的肺部具有良好的保护作用,肺部实变情况数据显示,注射该疫苗后可以保护免疫犬肺部形态。

[0031] 2) 本发明的疫苗免疫产生迅速,将其免疫犬,2周内产生免疫应答,一个月可产生高水平的抗犬流感病毒H3亚型的HI抗体。

[0032] 3) 本发明的疫苗采用新型聚合物佐剂作为水佐剂制备,易于分散、稳定性高,是一种理想的犬流感病毒H3亚型灭活疫苗。

[0033] 4) 本发明的疫苗安全性好,采用2倍剂量免疫犬,观察2周,精神状态、采食量等均未见任何异常。

附图说明

[0034] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0035] 图1为HA基因PCR鉴定结果。

[0036] 1为HA PCR产物,2为阴性对照,M为DL2000 Marker。

[0037] 图2为NA基因PCR鉴定结果。

[0038] 1为阴性对照,2为NA PCR产物,M为DL2000 Marker。

[0039] 图3为疫苗制备过程蛋白含量变化。

[0040] 收获表示收获过程蛋白含量,浓缩洗涤表示浓缩和3次洗涤过程的蛋白含量,纯化表示柱纯化后蛋白含量。

具体实施方式

[0041] 以下通过具体实施方式的描述对本发明作进一步说明,但并非是对本发明的限制。

[0042] 实施例1

[0043] 病毒的分离及鉴定:

[0044] (1) 病毒分离:2019年,鼻咽拭子采自北京延庆某宠物医院呼吸道症状发病犬,将采集的鼻咽拭子无菌处理后,接种10日龄SPF鸡胚尿囊腔,每胚0.2mL,37℃孵化,弃去24小时内死亡胚,72小时后,收集鸡胚尿囊液,测定血凝价,-70℃保存备用。

[0045] (2) 病毒的分型:将分离获得的犬流感病毒HB株提取病毒RNA,进行RT-PCR扩增HA

和NA片段对序列进行测序分析。结果表明该分离株为犬流感病毒H3N2亚型毒株,将其命名为A/Canine/Huabei/2019 (H3N2),结果见图1和图2。该病毒株于2021年4月23日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC.NO.20649。

[0046] (3) 病毒的特异性:将有血凝活性的鸡胚尿囊液分别与犬流感病毒H3亚型、猪流感病毒H1亚型、H3亚型、禽流感病毒H5亚型、H7亚型、H9亚型阳性血清进行HI试验。结果如表1,结果表明分离毒株对猪流感病毒H1亚型、H3亚型、禽流感病毒H5亚型、H7亚型、H9亚型阳性血清HI试验均为阴性反应(HI抗体效价小于1:10),对H3亚型犬流感病毒阳性血清HI试验为阳性反应(HI抗体效价为1:640)。

[0047] 表1 病毒特异性检验结果

血清组别		HI 抗体水平
犬流感病毒阳性血清		1:640
犬流感病毒阴性血清		<1:10
猪流感病毒 阳性血清	H1 亚型	<1:10
	H3 亚型	<1:10
禽流感病毒 阳性血清	H5 亚型	<1:10
	H7 亚型	<1:10
	H9 亚型	<1:10

[0049] 实施例2

[0050] 毒种的培养条件及灭活条件

[0051] (1) 最适接种剂量、温度与时间的选择:取10日龄鸡胚随机分成,15枚/组,分别经尿囊腔接种病毒含量 $10^{3.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ 、 $10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ 、 $10^{5.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ 的生产用毒,0.2mL/胚,分别置于37℃和35℃条件下培养,分别于48小时、64小时、72小时收获,测定不同组别鸡胚尿囊液的HA效价、收获量及病毒含量,确定接种剂量为 $10^4 \text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ 、最适培养温度为35℃、最适收获时间为48小时。

[0052] (2) 最佳灭活时间:按终浓度0.1%加入甲醛溶液,混匀后置4℃恒温灭活,分别于灭活后1~7日,取样品分别接种于10日龄SPF鸡胚5枚,0.2mL/胚,37℃孵育120小时后逐胚测定鸡胚尿囊液HA效价,需盲传一代,仍为阴性者,则为灭活完全,从而确定最佳灭活时间为7天。

[0053] 实施例3

[0054] 犬流感病毒H3亚型灭活疫苗的制备

[0055] (1) 接种:将H3亚型犬流感病毒经尿囊腔途径按照 $2 \times 10^4 \text{EID}_{50}$ /枚的剂量接种于10日龄SPF鸡胚,35℃孵育;

[0056] (2) 孵育和观察:接种后48小时内,每日照蛋1次,将48小时内死胚弃去,接种后48小时的活胚取出置于2~8℃冷却过夜6~18小时;

[0057] (3) 收获:将冷却的鸡胚取出,消毒气室部位卵壳,无菌剥除气室部卵壳,吸取尿囊液,离心取上清液存于2~8℃即为病毒原液;按照《中华人民共和国兽药典》二〇一五年版三部附录7规定的半数感染量测定方法进行病毒含量测定;(图3收获)

[0058] (4) 浓缩与洗涤病毒原液:将步骤(3)收获得到的病毒原液用合适孔径滤膜双重过滤,用超滤浓缩设备浓缩至原来体积的1/5,然后用等量pH值为7.0~7.2的PBS溶液洗涤,再进行浓缩,如此反复3次,得到浓缩病毒液;(图3浓缩洗涤)

[0059] (5) 灭活病毒:向步骤(4)所得的浓缩病毒液,加入浓缩病毒液总量(V/V)0.1%的灭活剂甲醛,在4℃振荡灭活7日;灭活完毕后,取样进行灭活检验,灭活后的病毒液置2~8℃保存应不超过12日;

[0060] (6) 柱纯化:将步骤(5)所得灭活好的浓缩病毒液经0.45μm滤膜过滤;将Capto Core 700装载至AKTA仪器,用5个柱体积PBS平衡Core 700,病毒液以1mL/min上样,收集流穿;将流穿效价高的样品(1:512和1:1024)进行合并,经0.22μm滤膜过滤除菌;用BCA法测定蛋白含量。(图3柱纯化后)

[0061] (7) 疫苗配制:先将步骤(6)所得抗原进行搅拌,与Montanide GEL02佐剂按合适比例混合(GEL02加入量为8%),以200r/min继续搅拌充分混匀,得到疫苗。

[0062] (8) 无菌检验:按《中华人民共和国兽药典》二〇一五年版三部附录规定的无菌检查法进行检验,应无细菌和霉菌生长。

[0063] 实施例4

[0064] 犬流感病毒H3亚型灭活疫苗免疫效力

[0065] (1) 按实施例3方法制备犬流感病毒H3亚型灭活疫苗。该灭活疫苗灭活检验、无菌检验测定均合格。该灭活疫苗的病毒含量、HA效价和总蛋白含量如下表2,达到合格标准。其中,总蛋白含量测定如图3,结果表明浓缩洗涤和灭活洗涤过程大大降低杂蛋白含量,使抗原纯度进一步提高。

[0066] 表2 半成品(尚未进行乳化配苗)的病毒含量、HA效价和总蛋白含量

疫苗批次	收获病毒含量 (EID ₅₀ /0.1mL)	灭活抗原 HA 效价	浓缩洗涤后病毒	柱纯化后抗原总
			液总蛋白含量 (mg/mL)	蛋白含量 (μg/mL)
202001	10 ^{8.3}	1:1024	2.4	50

[0068] (2) 安全检验:采用2倍使用剂量免疫2只4~6月龄比格犬,连续观察14日,记录试验犬采食、饮水及临床情况。结果表明,制备的疫苗没有出现局部和全身不良反应。

[0069] (3) 效力检验:取4~6月龄比格犬5只,每只颈部皮下注射疫苗0.5mL,免疫28日后以相同剂量进行二次免疫,同时设对照5只;二免后14日,采血分离血清,进行HI抗体检测。结果如下表3,结果表明对照犬抗体均为阴性,免疫组抗体均为阳性。同时所有犬通过鼻内接种H3亚型犬流感病毒(约含 $1 \times 10^{7.0}$ EID₅₀),11日后剖检观察肺部病变,并取材研磨采用ELISA法进行IL-1β水平测定。结果对照犬5只均出现流鼻涕、咳嗽等临床症状,肺脏均出现严重病变;免疫组试验犬临床症状均正常,肺脏均未出现实变。免疫组肺部IL-1β显著低于对照组,提示IL-1β可反映犬流感的发病与保护情况。

[0070] 表3 HB株攻毒保护结果

批号	编号	HI 抗体效价 (攻毒前)	肺脏实变情况	IL-1 β /蛋白 (pg/mg)
202001	1	1:640	正常	100.31
	2	1:640	正常	99.89
	3	1:320	正常	33.35
	4	1:640	正常	38.59
	5	1:320	正常	65.83
	攻毒保护率	5/5		67.60
对照	6	<1:10	实变, 实变率 28%	1926.48
	7	<1:10	实变, 实变率 54%	1282.42
	8	<1:10	实变, 实变率 23%	1927.71
	9	<1:10	实变, 实变率 23%	1695.61
	10	<1:10	实变, 实变率 51%	106.57
	发病率	5/5, 平均实变率 35.8%		1387.76

[0072] 注:实变百分比计算方法为实变质量与整个肺脏质量之比。

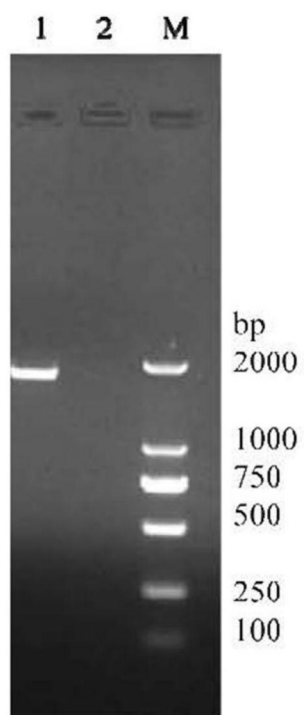


图1

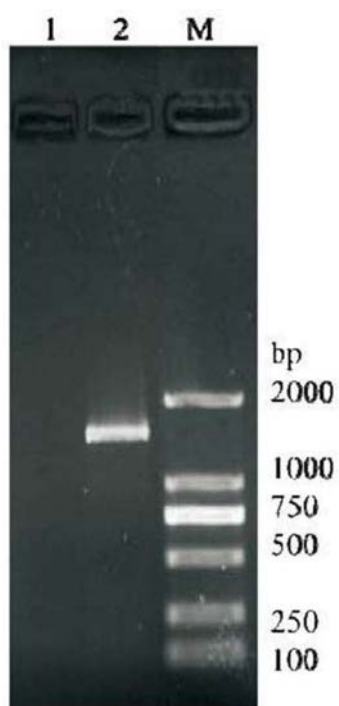


图2

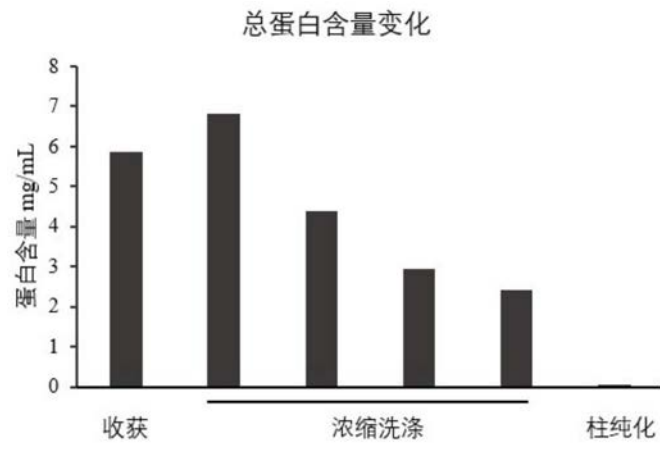


图3