

· 综 述 ·

提高病毒疫苗抗原产量的策略

谢利豹, 李永锋, 张玲楷, 仇华吉

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150069

谢利豹, 李永锋, 张玲楷, 等. 提高病毒疫苗抗原产量的策略. 生物工程学报, 2017, 33(8): 1213-1223.

Xie LB, Li YF, Zhang LK, et al. Strategies for producing high-yield viral vaccine antigens. Chin J Biotech, 2017, 33(8): 1213-1223.

摘 要: 疫苗接种是预防传染病的一种重要策略。然而, 目前许多疫苗在生产过程中存在抗原产量偏低的问题, 由此导致疫苗的生产成本较高、有效抗原含量低和免疫效果差等问题。为此, 研究人员尝试了不同策略来提高病毒疫苗抗原的产量, 以改进疫苗的质量并降低生产成本。文中总结了近年来提高疫苗中病毒抗原产量的主要方法, 包括改造病毒基因、改善病毒对细胞的适应性、优化抗原表达体系、改进疫苗生产工艺等方面。并分析了不同策略的优点和存在的问题, 提出了提高疫苗抗原产量的一些设想。

关键词: 病毒疫苗抗原, 疫苗生产, 高产毒株

Strategies for producing high-yield viral vaccine antigens

Libao Xie, Yongfeng Li, Lingkai Zhang, and Huaji Qiu

Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: Vaccination is an important strategy to prevent infectious diseases. However, low antigen yield of vaccine producing strains may lead to high cost of vaccines, low antigen production and vaccine failure. In recent years, many efforts have been made to improve the antigen yield of many vaccines. This mini-review summarizes various methods for increasing the antigen yield for vaccine production, including genetic modification of viruses, improvement of the adaptation of viruses to cells, and optimization of antigen expression systems and manufacturing procedures. Furthermore, we discuss the advantages and the problems of current strategies, as well as indicate the perspectives.

Keywords: viral vaccine antigen, vaccine production, high-yield virus strain

Received: October 17, 2016; **Accepted:** February 6, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31630080).

Corresponding author: Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-51051708; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 31630080) 资助。

网络出版时间: 2017-07-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170705.1003.002.html>

疫苗接种是预防病毒感染最有效的策略之一^[1],但是许多病毒疫苗在生产中存在抗原产量偏低的问题,这大大增加了生产成本,从而导致疫苗的使用受到限制。尤其是当疾病暴发时没有足够的疫苗对人类和动物进行免疫,而造成疾病的流行。2009年H1N1流感暴发时,人们深刻认识到高产的流感疫苗株对于疫苗高效生产是必不可少的^[2]。此外,反向遗传操作技术已广泛用于RNA病毒的研究,然而由于获得的一些病毒滴度较低,一定程度上限制了该技术的应用,如由cDNA克隆拯救的猪瘟疫化弱毒疫苗株的滴度只有 10^4 TCID₅₀/mL^[3]。因此,提高病毒疫苗抗原产量对于疫病的防控具有十分重要的意义。本综述对近几年国内外在提高病毒疫苗抗原产量上采取的策略和存在的问题进行了评述,并对未来的研究提出了展望。

为了提高病毒疫苗抗原产量,科研人员从不同方面进行了努力。总的来说,提高病毒疫苗抗原产量的策略主要有以下几类。

1 对病毒基因的改造

病毒的复制和组装等生命过程都是由病毒的遗传信息调控的。因此,可以通过反向遗传学技术和经典基因重组技术对病毒的遗传信息进行改造以改变病毒的生长特性,从而研发高产量的疫苗^[4](表1)。

1.1 随机传代获得突变基因

病毒在传代过程中其基因可能发生突变,而其中某些突变有可能会使病毒获得高产特性。

有囊膜的RNA病毒具有高度有序的结构^[5]。水泡性口炎病毒(VSV)是负链RNA病毒,其基因组可以编码膜糖蛋白、基质蛋白和衣壳蛋

白。然而当甲病毒RNA复制子只表达VSV膜糖蛋白时,它能够形成具有自我复制和感染性的病毒样颗粒,但这个病毒颗粒由于缺少衣壳蛋白,其复制水平较低。在经过多次传代后,研究者获得了高滴度的甲病毒RNA复制子。通过分析病毒基因组发现,病毒样颗粒的复制酶基因发生了突变。进一步研究发现,其中一个突变产生的晚期结构域基序对于高滴度病毒样颗粒的产生是必需的^[6],并且该病毒样颗粒具有免疫原性但无致病性,因此具有作为疫苗的潜力。

基于丙型肝炎病毒(HCV)JFH1株的感染性细胞培养物(HCVcc)系统对于HCV的研究至关重要。HCVcc系统虽然促进了HCV的研究,但是它不能产生形态学和疫苗研究所需的大量病毒粒子。Mathiesen等将HCVcc在Huh7衍生的肝癌细胞中连续传代产生了具有适应性突变的病毒准种,该适应性突变增强了病毒的组装、特异性感染及其在细胞间传播的能力,从而提高了病毒粒子的产量^[7]。

尽管研究证实,病毒可以通过连续传代的方式获得使其复制效率增强的突变,但是该策略具有不确定性和随机性。

1.2 利用易错PCR技术突变病毒基因

所谓易错PCR是指通过调整PCR反应条件增加突变频率,使得错误碱基以一定的频率随机掺入到扩增基因中,从而得到随机突变的DNA群体,最后用合适的载体克隆突变基因^[8]。在2009年A(H1N1)pdm09流感暴发时,急需在短期内生产足够的疫苗,而当时的技术不能满足此要求^[9]。为此,Ye等通过基于易错PCR的突变策略快速研发出了高产的流感疫苗候选株^[10]。

以上研究表明,血凝素与受体分子的紧密

结合可能是病毒高效复制的原因。根据该机制,可以利用易错 PCR 对其他病毒的受体结合蛋白基因进行突变,以获得可以更好结合细胞的突变体病毒,从而提高疫苗毒株的产量。例如,利用易错 PCR 对猪瘟病毒 E^{ns} 基因进行突变,可能会获得与硫酸乙酰肝素 (HS) 紧密结合的突变体病毒,从而提高猪瘟疫苗的滴度。

1.3 通过重组技术改变病毒骨架

流感病毒疫苗株在鸡胚中生长缓慢,造成疫苗生产费时费力^[11-13]。利用反向遗传操作技术将具有高产特性的流感病毒的内部基因作为骨架,将流行毒株的神经氨酸酶 (NA) 和血凝素 (HA) 基因作为外部基因来构建具有高产特性的疫苗株^[14]。非洲绿猴肾细胞 (Vero) 虽已获准用于疫苗生产^[15],但用其来生产 H5N1 高致病性禽流感疫苗时病毒滴度却偏低。鉴于 A/Yunnan/1/2005(H3N2) (YNVa) 毒株能够在 Vero 细胞中高效复制,Zhou 等通过反向遗传技

术用 H5N1[A/Anhui/1/2005(H5N1)]的 HA 和 NA 基因替换 YNVa 株的相应基因,获得了在 Vero 细胞中稳定复制和高产的重组病毒疫苗株^[16]。

该策略可以快速获得针对流行毒株的流感疫苗,即将流行毒株的 HA 和 NA 基因重组到高产毒株骨架上。但可能存在的问题是,由于流行毒株的 HA 和 NA 基因与高产毒株的骨架不匹配而无法获得重组病毒。

2 改善病毒对细胞的适应性

对于利用细胞培养生产的疫苗,改善病毒对细胞的适应性是提高疫苗产量的有效手段(表 2)。

2.1 过表达细胞受体

受体是介导病毒入侵细胞的细胞表面蛋白,其表达丰度的提高有利于病毒侵入细胞,从而提高病毒的滴度,因此构建过表达病毒受体蛋白的细胞系可作为提高病毒疫苗抗原产量的有效手段

表 1 对病毒基因的改造策略

Table 1 Strategies for modifying viral genes

策略	方法	实例	优点	缺点
随机传代获得突变基因	反向遗传学技术 经典基因重组技术	水泡性口炎病毒 ^[6]	简便	容易得到低产毒株; 具有不确定性
易错 PCR 技术突变病毒基因	易错 PCR 技术筛选高产毒株,定点突变构建高产毒株	流感病毒 ^[9]	省力且有效	无效突变较多
通过重组技术改变病毒骨架	反向遗传学技术 经典基因重组技术	流感病毒 ^[16]	有效性高	流行毒株的 HA 和 NA 与高产毒株的骨架可能不匹配

表 2 改变病毒对细胞适应性的策略

Table 2 Strategies for adapting viruses to specific cells

策略	方法	实例	优点	缺点
过表达宿主受体	过表达	猪瘟病毒 ^[17]	稳定有效	病毒受体具有复杂性与多样性
改造病毒结构蛋白	点突变	兔出血症病毒 ^[18]	简便稳定	不同病毒突变位点不同
降低细胞的干扰素应答	RNA 干扰	流感病毒 ^[23]	稳定有效	干扰 RNA 必须持续存在

之一。本实验室之前发现了猪瘟病毒吸附受体 LamR,用表达 LamR 的慢病毒转染 PK-15 细胞,能够提高病毒的滴度^[17]。然而,许多病毒的受体不止一个,并且一些病毒的特异性受体尚未确定,这无疑阻碍了此策略的实际应用。

2.2 改造病毒结构蛋白

通过对兔出血症病毒衣壳蛋白 (VP60) 表面可变区域突变,产生了一个可被细胞膜整合蛋白识别的 RGD 序列,获得了可在 RK-13 细胞中有效复制的兔出血症病毒突变株,突破了该疫苗研发的瓶颈。对于一些无有效体外培养体系的病毒,可以利用该原理对病毒进行改造,获得可在体外培养细胞中繁殖的突变体病毒^[18]。

2.3 降低细胞的干扰素应答

细胞的免疫应答可以抑制病毒复制,而使抗原的表达量降低,因此可以通过降低细胞免疫应答的能力来促进病毒的复制和抗原的表达。近些年,尽管 MDCK 和 Vero 细胞已被允许用于生产流感疫苗^[18-20],但产量不尽如人意。有学者证实,表达 *siat7e* 的 MDCK 细胞系能够产生比亲本细胞更多的 HA 抗原^[21]。研究发现,流感病毒已经进化出多个策略来逃避细胞监控体系的抗病毒策略,特别是逃避 I 型干扰素系统^[22]。因此 Hamamoto 等设想,如果利用 RNA 干扰技

术来抑制与干扰素通路有关的功能基因,有可能提高流感疫苗在 MDCK 细胞中的增殖滴度。作者发现用 siRNA 降低 IRF7 (可以调节 I 型干扰素基因和 I 型干扰素刺激基因的转录) 的表达可以将流感疫苗的产量提高 3-4 倍,而用 shRNA 降低 IRF7 能够将产量提高 2-8 倍^[23]。

研究报道降低干扰素应答所用的方法是使用 siRNA 或 shRNA,而干扰 RNA 必须持续存在才能达到干扰效果。但如果利用 CRISPR/Cas9 技术对干扰素基因进行敲除,则能达到一劳永逸的效果。

3 优化抗原表达体系

对抗原表达体系的优化包括优化抗原基因密码子、表达载体以及表达系统三个方面 (表 3)。

3.1 优化抗原基因密码子

密码子使用偏好性与基因表达水平密切相关,被认为是提高重组蛋白表达量的重要手段之一。

基于猪圆环病毒 2 型 (PCV2) Cap 蛋白的亚单位疫苗能够有效控制 PCV2 感染。但未经修饰的 Cap 基因在毕赤酵母中的表达效率很低,经过密码子优化后, Cap 蛋白可得到高效表达^[24]。

表 3 优化抗原表达体系

Table 3 Optimization of the antigen expression systems

策略	方法	实例	优点	缺点
优化病毒基因密码子	反向遗传学技术	猪圆环病毒 2 型 ^[24,26]	容易维持性状、便于扩大生产	潜在的生物安全问题
优化抗原表达载体	反向遗传学技术	肠道病毒 71 型 ^[35]	诱导的抗体具有广谱中和活性	需要寻找合适的表达载体
更换抗原表达系统	瞬时表达	猪流行性腹泻病毒 ^[43]	高产、稳定	筛选表达系统费时、费力

Wu 等前期研究发现在大肠杆菌中表达的 Cap 蛋白能够形成病毒样颗粒^[25]。通过密码子优化可以提高重组蛋白表达量,因此 Wu 等对 PCV2 Cap 基因进行了密码子优化,同样是在不改变 Cap 蛋白氨基酸序列的前提下,将 Cap 基因密码子突变为大肠杆菌优先使用的密码子^[26],进而提高了蛋白抗原的表达量。

3.2 优化抗原表达载体

不同载体表达的重组蛋白具有不同的免疫原性和表达效率,因此在表达抗原时可以尝试不同的表达载体。

由于流感病毒的表面抗原血凝素和神经氨酸酶的变异频率较高,流感病毒流行株每一到两年就会发生明显改变,因此需要及时更换相应的疫苗^[27]。有效的解决办法就是研发可以在体外表达系统中快速、稳定生产的重组疫苗,其中最前景的保守抗原是跨膜蛋白 M2 的胞外域 M2e。M2e 只有 24 个氨基酸,它的序列非常保守^[28]。虽然 M2e 的免疫原性较差,但是却可以通过与佐剂结合或形成多聚体分子来提高免疫原性^[29]。研究表明将抗原和细菌的鞭毛蛋白融合能够有效增强抗原的免疫原性。2015 年 Mardanova 等构建了以鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白为载体的重组蛋白,利用两种基于植物病毒的表达系统将目标蛋白在本氏烟草中表达,其能够在小鼠体内诱导高水平的抗 M2e 特异性抗体^[30]。

肠道病毒 71 型 (EV71) 是手足口病的病原。体外表达的病毒样颗粒能够有效预防该病的发生,是很有前景的候选疫苗^[31-32]。Chung 等构建的杆状病毒表达载体 Bac-P1-3CD (在 polh 和 p10 启动子后有 P1 和 3CD 基因) 产生了 EV71 病毒样颗粒。该颗粒免疫小鼠后能够诱导有效的、持久的、具有交叉保护的体液免疫应

答^[33],然而由于病毒样颗粒的产量较低限制了其应用^[34]。为此 Chung 等在前人的基础上,构建了在较弱启动子控制下的 3CD 基因表达载体,结果显示,Bac-P1-I3CD 和 Bac-P1-C3CD 重组体在 Sf9 细胞中能够产生大量的病毒样颗粒^[35]。作者同时优化了生产条件,包括宿主细胞 (Bac-P1-C3CD 感染 Sf9)、细胞浓度 (4×10^6 细胞/mL)、培养模式 (生物反应器)、溶氧量 (DO=30%),使细胞外病毒样颗粒产量最高达到了 64.3 mg/L 左右,大约是用 Bac-P1-3CD 感染、用 Sf9 细胞转瓶培养生产的病毒样颗粒 (1.5 mg/L) 的 43 倍。与热灭活的 EV71 相比,Chung 等研发的病毒样颗粒不但可以诱导产生相同的 IgG 滴度,而且还可以诱导产生高滴度的中和抗体。更为重要的是,Bac-P1-3CD(C2 基因亚型)的病毒样颗粒诱导产生的抗体能够中和与 EV71 同源的 C2 基因型和非同源的 B5 基因型的病毒样颗粒。然而,Bac-P1-I3CD(IE-1) 和 Bac-P1-C3CD(CMV) 在 Hi-5 细胞中的产量很低,表明同样的策略和病毒设计在不同的昆虫细胞中并不通用。

3.3 更换抗原表达系统

细菌、昆虫、酵母、哺乳动物细胞等表达系统对不同抗原的表达效率不同。因此在表达抗原时,应该尝试不同的表达系统,选择表达量较高的系统来生产病毒抗原。

猪流行性腹泻病毒是有囊膜的单股正链 RNA 病毒,易感猪,往往导致仔猪的高传染性流行性腹泻^[36]。20 世纪 70 年代在欧洲第一次出现该病,1978 年在比利时第一次分离到猪流行性腹泻病毒^[37],包括美国、加拿大和中国在内的许多国家均暴发过该病^[38-40]。然而,现在市场上尚无有效的疫苗^[41]。

猪流行性腹泻病毒的纤突蛋白 N 端亚基是

病毒与细胞受体结合的位点，并且包含多个中和抗体位点^[42]。因此，Makadiya 等期望通过用重组的纤突蛋白免疫母猪来达到保护仔猪的目的。为了提高纤突蛋白的表达量，作者检测了3种不同的真核表达系统：酵母、昆虫和哺乳动物细胞（HEK293T）。结果表明，利用 HEK293T 细胞表达的蛋白量最大，并且后续试验证明表达的重组蛋白有望作为一种亚单位疫苗^[43]。

4 改进疫苗生产工艺

对基于细胞培养生产的疫苗而言，通过改善细胞培养工艺可以有效提高疫苗产量（表4）。

4.1 更换细胞培养反应器

细胞培养反应器为细胞生存、繁殖提供必要的场所。有的培养反应器能使细胞尽可能接触培养液，而有的培养反应器能为细胞提供更多氧气。

日本脑炎是在亚洲流行非常广的疾病，其病原是黄病毒科黄病毒属成员日本脑炎病毒^[44-45]，目前尚无药物可治，疫苗接种是唯一的控制策略。最初日本脑炎病毒疫苗是用小鼠大脑制备的，由于用小鼠脑培养的疫苗容易导致急性播散性脑脊髓炎，因此使用细胞生产疫苗是非常有必要的。在用细胞制备此疫苗时，由于氧气传送有限，导致疫苗产量较低。为了克服这个

问题，科研人员研发了不同类型的生物反应器，如填充床反应器、中空纤维和填充床反应器、流化床反应器与摆动式反应器^[46]。但是仍然存在疫苗产量较低的问题。

文献报道称，用摆动式生物反应器 BelloCell（图1）培养 Vero 细胞可以提高细胞密度和病毒产量。用微载体进行转瓶培养（500 mL）的细胞数为 9.0×10^8 ，PFU 为 2.98×10^{11} ；而用 BelloCell 进行培养（500 mL）细胞数可达 2.8×10^9 ，PFU 可达 6.91×10^{11} ^[47]。Toriniwa 等用这个方法提高了日本脑炎疫苗的滴度。

猪瘟兔化弱毒疫苗（C 株）是控制猪瘟最有效的疫苗，最初是在家兔脾脏中生产的。然而，这种动物组织生产的疫苗存在许多问题：家兔的质量难以控制、需要大量的劳动力、存在家兔污染物的威胁等。目前已经用细胞系生产出了安全有效的猪瘟疫苗。2012 年，Wu 等研发了一种新型的潮汐式培养系统用于生产猪瘟疫苗^[48]。该培养系统分为两个阶段：液体培养阶段和气体培养阶段。其基本原理是：在液体培养阶段，细胞从培养基中吸收营养物质；而气体培养阶段，细胞暴露在空气中以获得氧气。由于在 500 mL 反应器中获得的细胞密度是转瓶培养的 11 倍，猪瘟疫苗的滴度获得了大幅提高。

表 4 改进疫苗生产工艺的策略

Table 4 Strategies for improving vaccine manufacturing procedures

策略	方法	实例	优点	缺点
更换细胞	用摆动式生物反应器	日本脑炎病毒 ^[47]	可以应用于生	所用细胞要能在
培养反应器	BelloCell 培养 Vero 细胞；潮汐式培养系统	猪瘟病毒 ^[48]	产其他疫苗	该培养系统中生长
高密度	优化培养条件	狂犬病病毒 ^[54]	可以应用于生	所用细胞要能在
细胞培养			产其他疫苗	该培养系统中生长
优化疫苗	更换培养基并优化离心条件	新城疫病毒 ^[55]	效率高	只适用于新城疫
纯化工艺				病毒

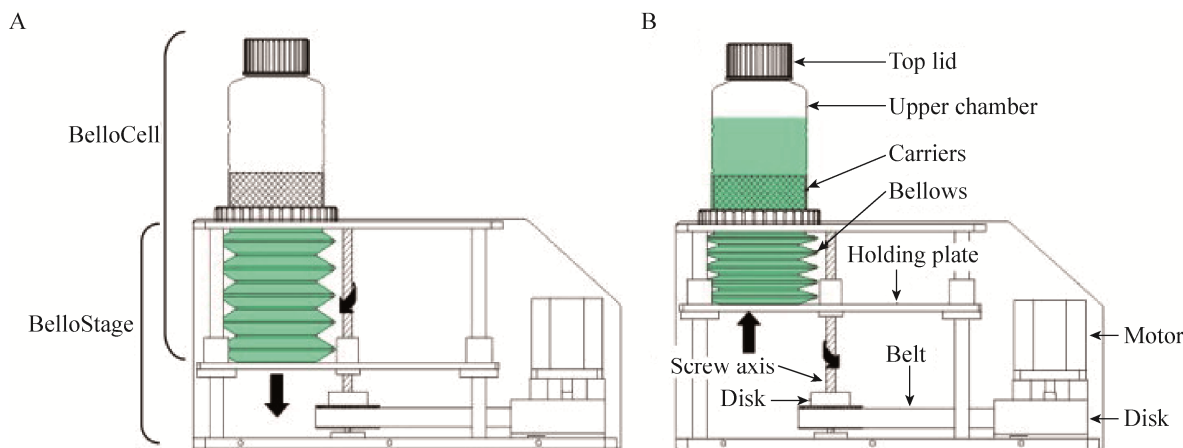


图1 BelloCell 细胞培养系统工作原理^[47] (A: 支持平台下降使得培养液进入底层的波纹管中, 因此使得载体暴露于空气中; B: 一段时间之后, 支持平台上升使得培养液淹没载体)

Fig. 1 Working principles of the BelloCell system^[47]. (A) The descending movement of the holding plate drops the medium onto the lower bellows, thus exposing the carrier to air for oxygen transfer. (B) After a time delay, the ascending movement of the holding plate lifts the bellows and raises the medium level to submerge the carrier, thus allowing nutrient transfer.

4.2 高密度细胞培养

对于利用细胞生产的疫苗, 高密度细胞培养无疑也是提高疫苗产量的有效策略之一。目前可以用人胚肺成纤维细胞、鸡胚细胞和 Vero 细胞生产安全有效的狂犬病疫苗。而 Vero 细胞被认为是生产狂犬病疫苗的最适基质^[49]。然而, 许多发展中国家由于无力进口昂贵的细胞苗, 而只能使用劣质的组织苗^[50]。为了降低狂犬病疫苗的生产成本, 研究者采取不同策略来提高疫苗产量。Trabelsi 等研发了一个基于高浓度细胞培养的策略来优化疫苗生产。首先, 作者用田氏 L8 试验设计优化了细胞在转瓶培养中的生长, 分析了葡萄糖、谷氨酰胺和微载体的最适浓度。在此基础上, 作者还优化了病毒感染复数, 最后使疫苗滴度达到 8.0×10^7 FFU/mL^[51]。但是, 使用血清培养 Vero 细胞存在许多劣势: 1) 引起过敏反应的潜在风险; 2) 血清的质量不稳定,

可能存在细菌、支原体、病毒等污染物; 3) 高质量的血清价格较高^[52-53]。为了避免这些不利条件, Frazatti-Gallina 等使用无血清培养基来培养 Vero 细胞, 利用该细胞生产狂犬病疫苗。商业化的 Vero 细胞狂犬病疫苗 (Verorab) 和人体双倍体细胞狂犬病疫苗 (HDCV) 在小鼠体内产生的中和抗体平均值分别为 6.54 和 9.36 IU/mL, 而利用无血清培养细胞生产的狂犬病疫苗免疫后产生的中和抗体滴度可达 10.3–34.6 IU/mL^[54]。

4.3 优化疫苗纯化工艺

经过优化细胞培养反应器、高密度细胞培养, 可以有效提高疫苗产量。然而对于某些抗原含量要求较高的疫苗而言, 如果没有高效的纯化和浓缩工艺, 那么疫苗的效力仍难以得到保障。

Arifin 等通过优化细胞培养和病毒离心分离过程提高了新城疫疫苗的产量。首先, 作者

测试了 Vero 细胞在不同培养基中的生长情况, 结果发现, 在 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基中细胞密度最大可以达到 1.93×10^6 个/mL; 然后用微载体在搅拌式生物反应器中生产新城疫病毒; 最后作者通过优化病毒样品的浓度、离心的温度和时间, 获得了高滴度的病毒^[55]。

总之, 改进疫苗生产工艺尤其是细胞培养的策略, 或者是优化整个生产过程, 可以有效提高疫苗产量。

5 问题与展望

5.1 问题

接种疫苗有助于人类和动物更好地抵御病原微生物的侵害。在疫苗出现之初, 许多疫苗是通过将毒株在异源动物体内传代适应所得, 如猪瘟兔化弱毒疫苗。但是用动物体生产疫苗存在传播病原的潜在风险。目前, 用细胞生产疫苗更加安全、稳定、可控。不过, 改造病毒基因和提高病毒对细胞的适应性这两种策略, 大部分还处于实验室研究阶段, 没有成为商业化疫苗。其原因是一些策略实现难度较大: 例如许多病毒的特异性受体还没有得到鉴定; 敲除细胞内干扰素通路相关分子策略尚未应用于生产实践, 主要由于目前对病毒与宿主细胞内干扰素通路相互作用的研究还处在发展阶段, 对其作用机制了解甚少。虽然许多策略在实验室研究中行之有效, 但是仍然存在如下问题: 1) 具有不确定性。通过改变病毒骨架研发高产流感疫苗株时, 如果 HA 和 NA 与骨架病毒的 6 个基因片段不兼容, 就很难产生高产种子毒株, 而且该方法不能通过选择基因片段来产生高产毒株^[9]。2) 随机性和潜在的危险性。经典基因

重组技术制造高产流感疫苗, 是将流感疫苗株和具有高产特性的骨架毒株共同感染鸡胚, 之后随机传代来筛选高产种子毒株, 这项技术的成功具有随机性, 而且耗时耗力, 甚至有可能产生高致病性的毒株。而对生产工艺改进的策略应当更加贴近生产, 才可能得到实际应用。虽然改进生产工艺是个不错的选择, 但是我们需要尝试不同的条件来逐一优化, 不仅费时费钱, 而且对于以细胞生产的疫苗, 一种细胞的最适生产条件往往不能直接移植到另一种细胞上, 因此其不具有普遍性。

5.2 展望

对病毒的吸附、入侵、复制、装配、释放等整个复制周期以及病毒与宿主之间相互作用进行更加深入的研究, 有利于开发新的提高病毒疫苗抗原产量的策略。了解流感病毒 HA 和 NA 基因为什么能够和高产毒株骨架相适应, 也许可以帮助解决某些流感病毒的 HA 和 NA 不能和高产毒株的骨架相适应的问题, 从而可利用高产毒株骨架制备各种不同的高产毒株。

许多病毒基因组的非编码区与病毒的复制密切相关, 因此如果对其进行改造, 有望获得高滴度的疫苗株; 虽然许多病毒的特异性受体尚未被确定, 但可构建过表达已知通用受体的细胞系, 例如在广泛用于疫苗生产的 Vero 细胞上过表达 HS 等通用受体, 可以提高病毒抗原产量; 腺病毒甲病毒复制子嵌合载体或许可以应用于除猪瘟病毒外其他病毒保护性抗原基因的高效递送和表达; 而在利用细胞生产疫苗时, 细胞培养环节可以相互借鉴, 我们可以开发出一套最优化的细胞培养系统用于多种疫苗的生产。此外, 除了提高疫苗抗原的产量, 还可以提高其质量 (特别是免疫原性)。

REFERENCES

- [1] Zhao WH, Yang WZ. Vaccine might be an important means of chronic disease prevention and control. *Chin J Prev Med*, 2015, 49(8): 675–676 (in Chinese).
赵文华, 杨维中. 疫苗或可成为慢性病防控的重要手段. *中华预防医学杂志*, 2015, 49(8): 675–676.
- [2] Johnson A, Chen LM, Winne E, et al. Identification of influenza A/PR/8/34 donor viruses imparting high hemagglutinin yields to candidate vaccine viruses in eggs. *PLoS ONE*, 2015, 10(6): e0128982.
- [3] Zou XQ, Zhao QZ, Fan YF, et al. Construction of the full length infectious cDNA clones of CSFV C strain and virus rescue. *Sci Agric Sin*, 2011, 44(2): 409–416 (in Chinese).
邹兴启, 赵启祖, 范运峰, 等. 猪瘟病毒 C 株全长 cDNA 感染性克隆的构建及病毒拯救. *中国农业科学*, 2011, 44(2): 409–416.
- [4] Robertson JS, Nicolson C, Harvey R, et al. The development of vaccine viruses against pandemic A (H1N1) influenza. *Vaccine*, 2011, 29(9): 1836–1843.
- [5] Rossmann MG. Structure of viruses: a short history. *Q Rev Biophys*, 2013, 46(2): 133–180.
- [6] Rose NF, Buonocore L, Schell JB, et al. *In vitro* evolution of high-titer, virus-like vesicles containing a single structural protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): 16866–16871.
- [7] Mathiesen CK, Prentoe J, Meredith LW, et al. Adaptive mutations enhance assembly and Cell-to-Cell transmission of a high-titer hepatitis C virus genotype 5a Core-NS2 JFH1-Based recombinant. *J Virol*, 2015, 89(15): 7758–7775.
- [8] Cirino PC, Mayer KM, Umeno D. Generating mutant libraries using error-prone PCR//Arnold F H, Georgiou G, eds. *Directed Evolution Library Creation*. Totowa: Humana Press, 2003, 231: 3–9.
- [9] Chen Z, Wang W, Zhou H et al. Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *J Virol*, 2010, 84(1): 44–51.
- [10] Ye J, Wen F, Xu Y, et al. Error-prone PCR-based mutagenesis strategy for rapidly generating high-yield influenza vaccine candidates. *Virology*, 2015, 482: 234–243.
- [11] Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*, 2003, 21(16): 1776–1779.
- [12] Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*, 1999, 73(11): 9679–9682.
- [13] Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, et al. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology*, 2007, 366(1): 23–27.
- [14] Nicolson C, Major D, Wood JM, et al. Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine*, 2005, 23(22): 2943–2952.
- [15] Barrett PN, Portsmouth D, Ehrlich HJ. Developing cell culture-derived pandemic vaccines. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12(1): 21–30.
- [16] Zhou F, Zhou J, Ma L, et al. High-yield production of a stable Vero cell-based vaccine candidate against the highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(4): 850–854.
- [17] Chen J, He WR, Shen L, et al. The laminin receptor is a cellular attachment receptor for classical swine fever virus. *J Virol*, 2015, 89(9): 4894–4906.
- [18] Zhu J, Wang B, Miao Q, et al. Viral genome-linked protein (vpg) is essential for translation initiation of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0143467.
- [19] Doroshenko A, Halperin SA. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu® (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8(6): 679–688.
- [20] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, et al. A novel mammalian cell (Vero) derived influenza virus vaccine: development, characterization and industrial scale production. *Wien Klin Wochenschr*, 1999, 111(5): 207–214.
- [21] Chu C, Lugovtsev V, Golding H, et al. Conversion of MDCK cell line to suspension culture by

- transfecting with human *siat7e* gene and its application for influenza virus production. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(35): 14802–14807.
- [22] Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. Immunol Lett, 2009, 122(1): 1–11.
- [23] Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, et al. High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. PLoS ONE, 2013, 8(3): e59892.
- [24] Tu Y, Wang Y, Wang G, et al. High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(7): 2867–2875.
- [25] Wu PC, Lin WL, Wu CM, et al. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(6): 1501–1507.
- [26] Wu PC, Chen TY, Chi JN, et al. Efficient expression and purification of porcine circovirus type 2 virus-like particles in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 2016, 220: 78–85.
- [27] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Mol Biol Rev March, 1992, 56(1): 152–179.
- [28] Fiers W, De Filette M, El Bakkouri K, et al. M2e-based universal influenza A vaccine. Vaccine, 2009, 27(45): 6280–6283.
- [29] Liu W, Peng Z, Liu Z, et al. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. Vaccine, 2004, 23(3): 366–371.
- [30] Mardanova ES, Kotlyarov RY, Kuprianov VV, et al. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors. BMC Biotechnol, 2015, 15: 42.
- [31] Ramqvist T, Andreasson K, Dalianis T. Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(7): 997–1007.
- [32] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. Trends Microbiol, 2003, 11(9): 438–444.
- [33] Chung YC, Ho MS, Wu JC, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. Vaccine, 2008, 26(15): 1855–1862.
- [34] Chung YC, Huang JH, Lai CW, et al. Expression, purification and characterization of enterovirus-71 virus-like particles. World J Gastroenterol, 2006, 12(6): 921–927.
- [35] Chung CY, Chen CY, Lin SY, et al. Enterovirus 71 virus-like particle vaccine: improved production conditions for enhanced yield. Vaccine, 2010, 28(43): 6951–6957.
- [36] Cheun-Arom T, Temeeyasen G, Tripipat T, et al. Full-length genome analysis of two genetically distinct variants of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. Infect Genet Evol, 2016, 44: 114–121.
- [37] Pensaert MB, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol, 1978, 58(3): 243–247.
- [38] Chen Q, Li G, Stasko J, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 234–243.
- [39] Ojkic D, Hazlett M, Fairles J, et al. The first case of porcine epidemic diarrhea in Canada. Can Vet J, 2015, 56(2): 149–152.
- [40] Lin CN, Chung WB, Chang SW, et al. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013–2014. J Vet Med Sci, 2014, 76(9): 1297–1299.
- [41] Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. Clin Exp Vaccine Res, 2015, 4(2): 166–176.
- [42] Oh J, Lee KW, Choi HW, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike

- protein. *Arch Virol*, 2014, 159(11): 2977–2987.
- [43] Makadiya N, Brownlie R, Van Den Hurk J, et al. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virology*, 2016, 531: 57.
- [44] Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, et al. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia, 1995. *Med J Aust*, 1996, 165(5): 256–260.
- [45] Mackenzie JS, Johansen CA, Ritchie SA, et al. Japanese encephalitis as an emerging virus: the emergence and spread of Japanese encephalitis virus in Australasia//Mackenzie JS, Barrett ADT, Deubel V, eds. *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses*. Berlin Heidelberg: Springer, 2002, 267: 49–73.
- [46] Ala-Uotila S, Marjamäki A, Matikainen MT, et al. Use of a hollow fiber bioreactor for large-scale production of $\alpha 2$ -adrenoceptors in mammalian cells. *J Biotechnol*, 1994, 37(2): 179–184.
- [47] Toriniwa H, Komiya T. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. *Biologicals*, 2007, 35(4): 221–226.
- [48] Wu SC, Liao MY, Lin YC, et al. The feasibility of a novel bioreactor for vaccine production of classical swine fever virus. *Vaccine*, 2013, 31(6): 867–872.
- [49] Kumar AA, Rao YU, Joseph AL, et al. Process standardization for optimal virus recovery and removal of substrate DNA and bovine serum proteins in Vero cell-derived rabies vaccine. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(5): 375–383.
- [50] Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 2002, 20(25–26): 3155–3164.
- [51] Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, et al. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. *J Biotechnol*, 2006, 121(2): 261–271.
- [52] Fishbein DB, Yenne KM, Dreesen DW, et al. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study. *Vaccine*, 1993, 11(14): 1390–1394.
- [53] Froud SJ. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev Biol Stand*, 1999, 99: 157–166.
- [54] Frazzatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*, 2004, 23(4): 511–517.
- [55] Arifin MA, Mel M, Abdul Karim MI, et al. Production of Newcastle disease virus by Vero cells grown on cytodex 1 microcarriers in a 2-litre stirred tank bioreactor. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 586363. doi: 10.1155/2010/586363.

(本文责编 郝丽芳)