

为了庆祝国家兽用生物制品工程技术研究中心成立十周年，同时配合农业部和江苏省人民政府联合主办的“中国江苏·现代农业科技大会”，“第四届动物疫苗与免疫佐剂技术沙龙”12月2-3日在南京召开。参会代表408名，分别来自中国、美国、加拿大、德国的45个科研机构 and 85个兽用生物制品生产企业。

2日上午，会议在我院科技会堂隆重开幕。国家兽用生物制品工程技术研究中心主任、江苏省农业科学院院长易中懿研究员致开幕词，介绍了“中心”十年发展历程和我院基本情况。黄俊副院长出席开幕式。“中心”常务副主任侯继波研究员主持开幕式。

夏咸柱院士、刘秀梵院士、张改平院士和金宁一院士作主旨报告，国家兽用生物制品工程技术研究中心常务副主任侯继波研究员、中国兽医药品监察所长才学鹏研究员、农业部兽医政处长谷红研究员、加拿大萨斯喀彻温大学 Andrew Allan Potter 教授、德国柏林自由大学 Nikolaus Osterrieder 教授、美国帕斯适宜卫生科技组织陈德祥研究员、复旦大学王宾教授、国家生化工程技术研究中心（北京）副主任杜显光研究员、山东滨州牧医研究院院长沈志强研究员、北京大北农集团赵亚荣博士、河北农业大学王家鑫教授、中国农业科学院兰州兽医研究所常惠芸研究员作专题报告。会议秉承“促进技术进步，加速产业升级”的宗旨，推进“产、学、研、用”合作互赢、共同发展，现场精彩纷呈、答疑互动气氛热烈。同期，召开国家兽用生物制品工程技术研究中心技术委员会会议和国家公益性行业（农业）科研专项项目“动物疫苗制剂及下游工艺技术研究及示范”研究进展交流与成果展示会。

## 第四届动物疫苗与免疫佐剂技术沙龙



畜禽具有大群饲养（封闭群体）、群体健康，经济性突出（干预的成本-效益分析，疫苗的价格和投放的支出）和生产饲养的阶段性的三个特点，因此除了安全性和免疫效力外，新疫苗研发的早期就必须考虑：1、新疫苗是否适合大群投放，有没有相应的投放器具？2、新疫苗采用的生产工艺和流程，根据疫苗使用对象，经济上的可行性。3、新疫苗适合在畜禽生产的哪个阶段使用？例如禽用疫苗是否可在出壳前或出壳时使用？

研发更安全、更高效的新疫苗是我们的目标，要认识到：1、疫苗病毒在野外有返强的例子，如新城疫 I 系苗（Mukteswar 株）和高致病性 PRRS 活疫苗株；2、增添对疫苗免疫效力评价的新内容，除了考量临床保护效力外、增加疫苗免疫对强毒攻击后的消除能力（强毒载量和维持时间）；3、通过疫苗种子，载体技术、佐剂和免疫调节剂等研发高效、持续时间长的疫苗；4、研发多联或多价疫苗、广谱疫苗；5、大力研发细菌性疫苗；6、研发用于疾病根除计划、清除强毒感染能力强的疫苗。

## 第四届动物疫苗与免疫佐剂技术沙龙



### 动物疫病免疫防控制剂的研究

世界动物卫生组织（OIE）列出的、2016年1月1日生效的最新法定动物传染病共118种，其中能感染多种物种的25种，牛病14种、羊病和马病各11种、禽病13种、猪病6种，人兽共患病共有69种。动物疫病防控关系到养殖业发展、关系到食品安全、关系到公共卫生安全、关系到国家生物安全、关系到社会和谐稳定，疫苗免疫是动物疫病防控的关键。

疫苗研制与检验是一项系统工程，包括菌/毒种选育与构建工程、免疫原高效培养制造工程、免疫原纯化与检验工程、佐剂与保护剂、疫苗制造与检验工程、免疫途径与程序和动物免疫安全与效力检验工程。其中，利用反向遗传学等技术，对病原体进行进一步改造，不断减低其毒力、提高免疫效果和交叉保护能力，同时筛选可在细胞高滴度生长的毒种是当前疫苗研究的方向，在禽流感、狂犬病、口蹄疫等多种重大疫病疫苗研发上取得成功。



自 1918 年青岛商品检验局血清所成立至今，我国兽用生物制品发展已有百年历程，猪瘟疫苗、牛瘟疫苗的成功研制成为我国乃至世界兽用疫苗史上的典范。病原模式和危险模式识别理论为免疫佐剂研发指明方向，2011 年诺贝尔生理医学奖明晰先天免疫启动的关键细胞-树突细胞，关键分子-TLR 受体，开启了免疫佐剂研究的黄金时代。国家兽用生物制品工程技术研究中心先后研发出多种纳米颗粒佐剂，免疫保护效力、持续期和交叉保护显著提升，主要包括口蹄疫、禽流感、猪 PCV2、PRV 和 PEDV 等多种疫苗的免疫增强剂。

细胞悬浮培养、抗原纯化和耐热保护技术研究获得突破。Marc145、Vero 和 DF-1 细胞的微载体悬浮培养工艺全面优化，PK15、MDCK、BHK21、ST 和 Sf9 细胞实现自悬浮培养。抗原纯化 GEM 技术为原始创新，实现口蹄疫病毒、猪圆环病毒、猪蓝耳病毒、猪流行性腹泻病毒和猪瘟 E2 蛋白等抗原的一次低速离心分离纯化工艺。研制成功无明胶、无蛋白耐热冻干保护剂配方，应用真空泡沫干燥工艺，实现 NDV 和 PRRSV 活疫苗的常温保存（12 个月以上）。

## 第四届动物疫苗与免疫佐剂技术沙龙



2016年我国兽用生物制品投产企业89家，生产线498条（其中悬浮培养生产线22条），生产总值146.52亿元，平均毛利率62.96%。近十年注册产品330个，其中疫苗213个，禽用制品133个，猪用制品84个，批准文号1826个。

技术发展层面，一是**理论创新**。重要动物疫病病原学、流行病学研究及信息库，深入研究慢性疫病的发病机理和动物生物制品创制的分子基础；二是**技术创新**。着重开展疫苗种毒和抗原设计构建及其制备技术，动物疫病诊断新技术，动物疫病免疫治疗技术，本动物攻毒效检的替代检验技术和免疫佐剂/增强剂等技术研究；三是**产业化生产工艺技术创新**。包括抗原表达工艺技术，生物合成技术，细胞改造工程技术，传代细胞大规模悬浮培养工艺技术，细菌发酵培养工艺技术，大规模抗原浓缩纯化工艺技术；四是**新产品研发**。填补防疫空白的疫苗需要尽快改进，研发区别感染和免疫的标记疫苗，一针多防的多联多价灭活疫苗。



《兽药注册评审工作程序》发生显著变化，一是**申报资料技术评审**：在原来初审、复审基础上增加终审环节。评审中心对评审会议提出的评审意见进行审核并提出技术终审意见和结论；二是**兽药质量标准复核**：1、兽药质量标准复核前，评审中心以书面形式通知中监所和申请人。2、中监所根据评审意见，按照《兽药注册办法》等相关规定进行兽药质量标准复核，在规定时限内将检验报告报农业部兽医局，将质量标准复核意见报评审中心。3、中监所在收到评审中心复核检验通知后 6 个月内未收到复核样品或相关资料、材料不全导致无法开展检验的，应向评审中心说明具体情况，评审中心根据说明对该项注册申请按自动撤回处理；三是**审批**：农业部兽医局根据评审中心的技术评审终审意见和结论以及中监所的复核检验结论，经局务会集体审议，提出审批方案。建议予以批准的，报分管部领导审批。

GCP 的政策解读。1、自 2018 年 1 月 1 日起，未经农业部监督检查或监督检查不合格的兽药安全性评价单位，其完成的研究、试验数据资料不能用于兽药注册申请。2、具备兽药安全性评价资质的单位既可以对本单位新制品进行评价，亦可承接外单位的委托评价。首次开展评价工作前需向农业部报告，并接受农业部的监督检查。3、兽用生物制品试验项目包括安全性试验和有效性试验。有效性试验包括：常规效力试验以及诊断制品的灵敏性、特异性等，免疫制品的临床免疫效力、治疗制品的临床疗效、体内诊断制品的临床检测试验。

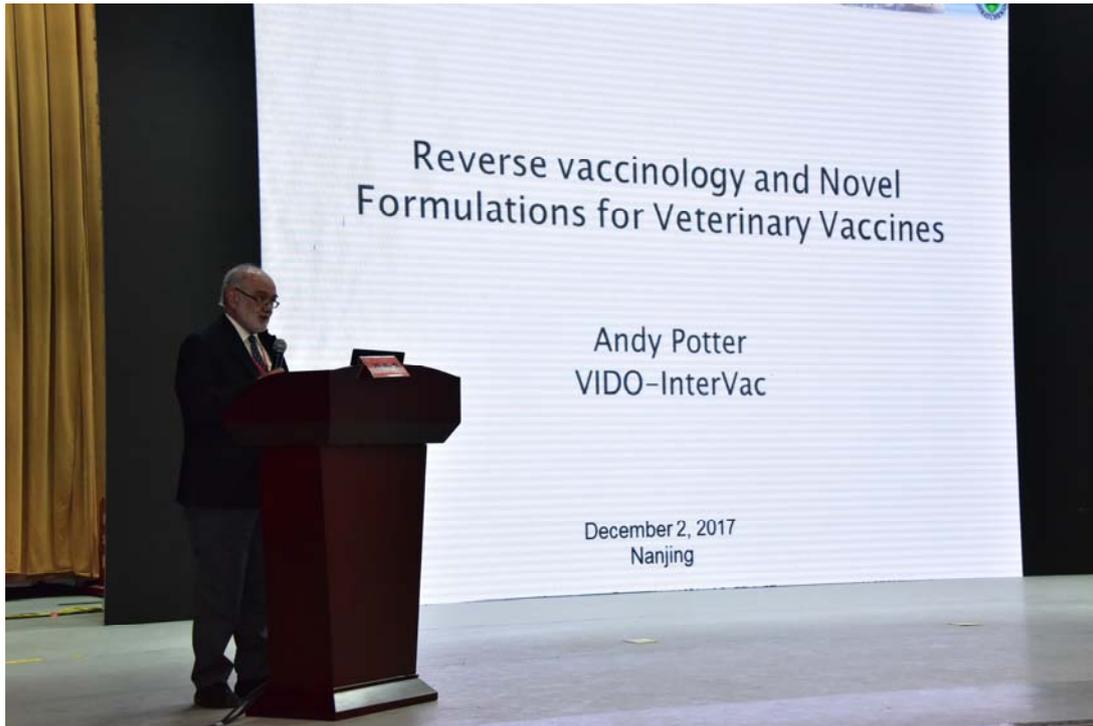
## 第四届动物疫苗与免疫佐剂技术沙龙



新概念疫苗应以疫苗和动物协调的根本要求进行设计，遵循安全、高效和不浪费免疫能力的原则，达到精确极致（位点、结构、启动）、纯化和微量（微克级）。具体地说，抗原结构设计应最大限度诱导保护性免疫反应，最大限度降低无关反应；抗原表达和组装应最大限度保证其结构正确和构象正确；疫苗设计开始就应考虑简便、高效的纯化方案。应用水稻成功制备猪瘟超级疫苗，1/9 粒米生产的抗原（0.5 微克）免疫猪，提供 3 个月以上的免疫保护，充分体现超级微量、超级反应性、超级持续期、超级简化的免疫程序。

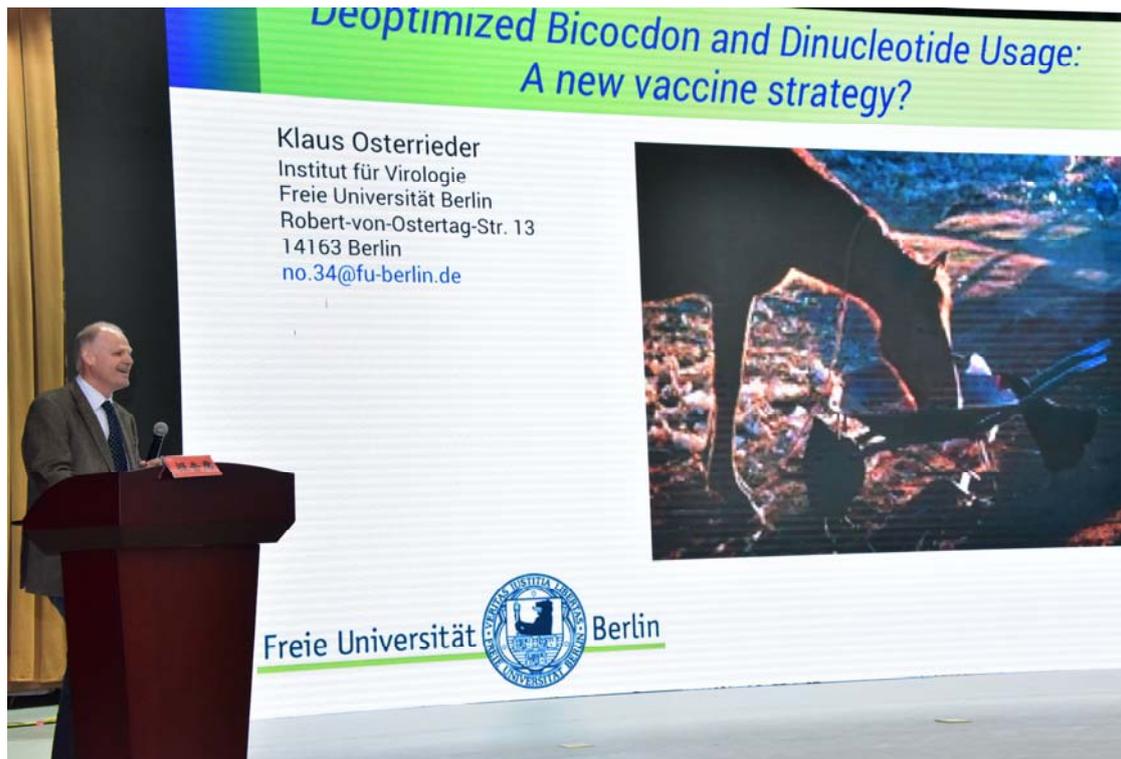


550 种哺乳动物中存在 32 万种病毒，疫苗在疫病防控中具有重要的作用。传统疫苗技术平台不断升级，新疫苗研究活跃，新疫苗品种不断上市，疫苗监督能力提升，国外疫苗迅猛涌入是中国疫苗研发的机遇和挑战。新型疫苗的研发包括遗传重组疫苗，免疫原性好；合成肽、亚单位、VLP 疫苗，安全性好；基因缺失疫苗，复制能力、免疫应答和生产工艺与常规活疫苗相同；基因重组载体疫苗，载体容量大、稳定易操作。新型疫苗构建时要注意，病原特性与免疫保护、生命组学与构建优化、常规疫苗与新型疫苗的取长补短、免疫程序与有效免疫、载体免疫与安全性、生态环境与遗传操作等综合因素。



#### 反向疫苗学和兽医疫苗新型制剂

反向疫苗学的基础是病原致病机理与功能、粘附与定植、毒力因子和免疫保护机制，优点是快速识别靶标抗原，避免抗原选择过程人为偏差，不需要微生物体培养和广泛存在的动物模型可依赖。以牛传染性胸膜肺炎（CBPP）亚单位疫苗的研发为例，应用生物信息技术筛查出 985 个相关基因，其中胞外蛋白 271 个，决定制备 82 个候选抗原(黏附率 $\geq 0.5$ )。根据出现频率、血清反应性、诱导 IFN- $\alpha$  能力、交叉反应性进行排序分组，5 个蛋白为一组进行免疫保护测试，目前已得到 8 个蛋白组成的疫苗，具有较好的保护性。在佐剂方面，研发成功三联佐剂，具备抗原递送、靶向和免疫刺激的功能。



### 密码子去优化构建新型高效的减毒活病毒疫苗

以鸡马立克氏病（MDV）的 UL30 基因为例，密码子去优化的研发思路是先把靶标基因平均分为三段，分别进行密码子去优化，密码子最优化和密码子中性化，构建了系列重组病毒。通过对获得的重组病毒的生长特性和对实验动物的致病力的研究，发现了密码子去优化对 MDV 的致弱作用。报告中分析了密码子去优化导致致病力下降的可能机理，对病毒致弱新方法拓展了新的思路。



#### 兽用疫苗新型佐剂和配方：机遇与挑战

佐剂通过激活先天性免疫影响获得性免疫反应。1925年 Gaston Ramon 发现一些物质可以增强抗原的免疫反应,佐剂研究已有近百年历史。1926年 Alexander Glennie 发明铝胶佐剂,1937年 Jules T. Freund 发明油乳佐剂 (CFA 和 IFA), 上世纪 80 年代起发现分子佐剂, 如 TLR 受体激动剂 PolyI:C 等。近十多年来研究成功不少佐剂, 如基于角鲨烯的佐剂 MF59、AS03 和 AF3 等, 也出现了一些联合佐剂, 如铝胶和 MPL 组成的 AS02, 脂质体、MPL 和 QS21 组成的 AS01 等。目前通过 IL-4、IL-5 调节 Th2 和 IL-12、IFN- $\gamma$  调节 Th1 机制的佐剂都已商品化, 调节 Treg、Tc1 和 Th17 途径的佐剂尚处研发当中。新型佐剂研发方向: 取代不可代谢的矿物油、粒径控制在 50-100nm 和 dmLT。



佐剂用以促进免疫反应强度和质​​量，免疫应答不强造成免疫失败，其原因除抗原外，共刺激因子、细胞因子、负反馈等因素都与佐剂相关。理想人用免疫佐剂可选用临床药物（老药新用），其成本低、易在细胞和动物中评价。分别对 Levamisole、Cimetidine、Praziquantel、Bupivacaine 和 Amiloride 进行了佐剂效能进行了评价。成功应用 GM-CSF 促进 DC 细胞成熟，用于治疗性乙肝疫苗，显著促进了 HBeAg 和 HBsAg 的清除。



寡糖作为生物信息分子参与细胞粘附、免疫应答、信号转导、代谢调节一系列重要分子识别和细胞识别过程，寡糖的序列结构决定其生物学功能。多糖及其衍生物作为疫苗佐剂具备生物相容性和生物可降解性的优势。与多糖相比，寡糖分子量小、易溶于水、天然来源、易被机体吸收、结构清晰、易质量控制和良好的免疫增强能力，是天然糖类疫苗佐剂开发的趋势之一。甲壳素寡糖通过 TLR4 样受体使小鼠树突状细胞 MHC II、CD86 表达增加，TNF- $\alpha$  表达量升高，促进 CD4+T 细胞增殖，抑制多种炎性介质对细胞造成的炎症损伤，具有显著的佐剂增强活性，值得进一步开发。不同结构的壳寡糖具有抑制菌膜活性，结合微流控芯片、等温扩增技术，用于户外病原快检仪器的研发。



黏膜免疫在抵抗外来病原入侵中占有极其重要的地位，黏膜免疫系统集中了整体免疫系统 50%以上的淋巴组织和 80%的免疫细胞，95%以上的动物疫病是通过呼吸道和消化道粘膜等感染的。将疫苗放入气溶胶发生器中雾化，雾滴吸入气管后爆裂成 1-5 个微米的微颗粒，粘膜附着率高，促进呼吸道黏膜产生黏膜免疫。畜禽呼吸频率 15-30 次/分钟，每次呼吸肺泡内气体的更新率为 10-15%，喷雾免疫需持续 1 分钟左右。该免疫技术便于操作，避免了使用和处理针头和注射器的风险，省工省力省事省时。气雾免疫成功应用于多种活疫苗免疫，包括猪肺炎支原体活疫苗(RM48 株)、猪链球菌活疫苗、巴氏杆菌活疫苗、大肠杆菌活疫苗、仔猪副伤寒活疫苗、流行性腹泻疫苗、伪狂犬病基因缺失疫苗、猪瘟活疫苗和猪蓝耳活疫苗。



全球动保市场约为 100 亿美元，其中伴侣动物用占 33%、牛羊用占 29%、猪用占 26%、禽用占 12%。我国畜禽养殖量居世界第一位，勃林格殷格翰（Boehringer-Ingelheim）、诗华（Ceva）、礼来（Eli Lilly and Company）、诺华（Novartis）、拜耳（Bayer）、硕腾（Zoetis）和默沙东（MSD）等跨国公司先后在中国建立研发中心，联苗、重组疫苗、自动化免疫设备等技术创新是未来的发展趋势。饲养管理水平提高、疫病爆发、大规模死亡罕见的规模化养殖模式，治疗性药物销售减少、预防用药和保健药品使用增加、疫苗市场急剧扩大的动物保健，工艺技术向国际看齐、诊断试剂尚需突破的产品研发是兽用生物制品行业新时代特征。“从猪场中来、到猪场中去”的本地（菌、虫）毒株、全球采购材料、现代化的 GMP 设施、人员技术国际化将把中国兽用疫苗的研发进入国际领先地位。

## 第四届动物疫苗与免疫佐剂技术沙龙



树突状细胞是 FMDV 抗原提呈的途径。甘露糖受体和清道夫受体是 BMDC 识别并摄取 FMDV 抗原的主要模式识别受体。摄取抗原被 Hsp90 从内吞小体转运至细胞质基质，被蛋白酶体降解，启动抗原交叉提呈途径。溶酶体降解 FMDV 抗原，促进 T 细胞分化为 Th1 和 Th17 效应细胞。内吞小体再循环是 BMDC 对 T 细胞发挥旁位活化作用的重要机制。甘露糖受体和清道夫受体对 VP1-VP4 的识别抑制 Th1 应答。

肥大细胞在抗 FMDV 感染中的发挥重要作用。清道夫受体识别 VLP 引起肥大细胞脱颗粒，甘露糖受体、TLR2 和 TLR4 识别 VLP 引起肥大细胞分泌蛋白质分子。VLP 活化的肥大细胞上清液直接启动脾脏初始 B、T 淋巴细胞增殖。

巨噬细胞参与 FMDV 模式识别与应答。早期 IL-6 和 IL-10 的分泌受到抑制，后期通过 SR 识别 FMDV 被激活，分泌 IL-13、IL-15、IL-17、IL-17BR 和 G-CSF。巨噬细胞分泌大量 IL-21 和可溶性 TNF- $\alpha$  受体，不利于 DC 成熟和 Th1 应答建立。巨噬细胞通过 SR 识别 FMDV 而所启动的免疫应答不利于免疫记忆建立。番泻苷可作为重组口蹄疫病毒蛋白疫苗的佐剂。



FMD 多表位疫苗研究技术平台已基本成熟。猪 FMD (O 型) 多表位疫苗已获得临床批件, 正在进行临床试验。实现 E.coli 可溶性高效表达, 中间试制产量是实验室的 10 倍左右, PD<sub>50</sub> 为 10 以上, 最小免疫剂量为 25 微克/头份。猪口蹄疫 A 型, 牛羊口蹄疫 A 型、O 型、Asia1 型多表位疫苗及双价疫苗研发进展顺利。成功建立口蹄疫溯源标记研究技术, 实现 O、A 型和 3ABC-iPOCT 抗体检测和 O、A 抗原检测; 建立了口蹄疫抗体化学发光 CLIA 技术平台, 实现口蹄疫 3ABC-CLIA 和口蹄疫 3ABC+2C-CLIA, O 型、A 型抗体检测。