

微载体灌注培养制备 Vero 细胞狂犬病疫苗

乐威^{1,2}, 叶林柏^{1**}, 张捷^{1,2}, 刘静¹

(1. 武汉大学生命科学院病毒研究所, 湖北武汉, 430072; 2. 武汉生物制品研究所, 湖北武汉, 430060)

Preparation of Rabies Vaccine by Perfusion Culture of Vero Cells
on MicrocarriersYUE Wei^{1,2}, YE Lin-bai^{1**}, ZHANG Jie^{1,2}, LIU Jing¹

(1. Institute of virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, China)

Abstract: To establish a technique for preparing rabies vaccine by perfusion culture on microcarriers in bioreactor, a 5 litre bioreactor was filled with 199 cell culture medium which contains 10g/L of microcarriers. Then Vero cells were inoculated with a final cell density of 1×10^5 /mL. After 7 days of culture, cell density can reach $6 \sim 7 \times 10^6$ /mL, then rabies virus VaG strain was inoculated with a MOI of 0.01. After 24h inoculation, the cultured viruses were harvested continuously for 12 days. The titer of collected virus in the culture medium was about 6.0 to 8.5 logLD₅₀/mL. From these collected viruses, vaccines were prepared through the steps of concentration, inactivation and purification, The quality of these vaccines meets "The Chinese Requirements for Biologics Year 2000". This lab-scale method for preparing rabies vaccine by perfusion culture on microcarries is viable.

Key words: Bioreactor; Perfusion culture; Rabies Vaccine

摘要: 本文研究在生物反应器中用微载体连续灌注培养 Vero 细胞生产狂犬病毒制备技术。在 5L 体积的生物反应器中, 加入含 10g/L 微载体的 199 培养基, 接种 Vero 细胞至细胞浓度达到 1×10^5 /mL, 培养 7d 后细胞可生长至 $6 \sim 7 \times 10^6$ /mL, 然后以感染复数 (MOI) 为 0.01 接种狂犬病毒 VaG 株, 接种后 24h 开始收获, 连续收获 12d 左右, 收获的病毒滴度范围在 6.0~8.5log LD₅₀/mL, 收获的病毒原液经浓缩、灭活和纯化等步骤制备成疫苗, 各项质量指标均达到《中国生物制品规程》2000 年版要求。实验表明, 用生物反应器微载体灌注培养制备人用 Vero 细胞狂犬病疫苗小试工艺可行。

关键词: 反应器; 灌注培养; 狂犬病疫苗

中国分类号: R512.99

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0373-03

狂犬病疫苗是预防狂犬病的唯一有效手段。Vero 细胞是 WHO 推荐使用的人用疫苗生产基质^[1,2]。目前国内 Vero 细胞制备狂犬病疫苗均采用转瓶生产工艺, 由于受到转瓶表面积和培养条件的限制, 细胞密度低, 劳动强度大, 操作过程易污染, 疫苗质量难以得到保证。自从 60 年代微载体生物反应器培养技术建立以来, 国外许多国家对其在疫苗生产中的应用进行了广泛研究, 有多家研究机构对贴壁依赖性细胞用生物反应器分批式培养(batch)、流加式培养(Fed-batch culture)和反复分批式培养等

方法培养进行了研究^[3,4], 但很少将灌注培养(Perfusion culture)方法全面用于疫苗生产。灌注培养是一方面新鲜培养基不断加入反应器, 另一方面又将反应器液体不断取出, 使培养环境相对稳定, 不仅大大提高了细胞生长密度而且有助于产物的纯化^[5]。我们对生物反应器灌注培养技术应用于狂犬病疫苗生产作了进一步研究, 取得了很好的效果。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞

收稿日期: 2004-01-12, 修回日期: 2004-03-15

作者简介: 乐威 (1969-), 男, 湖北省籍, 在职研究生, 主要从事生物制品研究。

** 通讯作者。Corresponding Author. Tel: 027-87682372, E-mail: linbaiye@hotmail.com.

Vero 细胞来源于武汉大学生命科学院病毒研究所 140 代细胞, 将该细胞连续传代至 165 代进行致肿瘤实验其结果为阴性。细胞培养液为含 10% 小牛血清的 199。

1.2 毒种

狂犬病毒 aG 株 (豚鼠脑) 来源于武汉生物制品研究所, 该毒株为世界卫生组织认可的狂犬病毒固定毒株, 并于 1980 年开始用于狂犬病疫苗的生产。VaG 株为狂犬病毒 aG 株在 Vero 细胞上连续适应传代而得。生物反应器细胞培养至一定浓度接种病毒, 维持液为含 0.4% 人白蛋白的 199。

1.3 生物反应器

B.Braun 生物反应器, 工作容积 3.5L。培养时微载体浓度 10g/L, pH 控制在 7.2, 温度 37℃, 溶解氧 (DO) 值设为 50, 搅拌速度 30~50r/min。

1.4 微载体

Pharmacia Cytodex-1。微载体水化处理方法是使用无钙镁 PBS 洗涤 2 次, 37℃ 浸泡 2h, 121℃ 高压灭菌 30min, 置 4℃ 贮存待用, 使用前用细胞培养液洗涤 2 次。

1.5 疫苗制备

细胞培养至一定密度接种病毒, 将收获的病毒原液超滤浓缩后, 按 1:4000 的终浓度加入 β-丙内酯灭活。灭活后的浓缩液经 3000r/min 离心 30min, 取上清过分子筛, 收集第一峰, 加入人白蛋白和氢氧化铝, 即制成精制狂犬病疫苗。

1.6 病毒滴定

用小鼠脑内接种法进行^[6]。

1.7 效力测定

用 NIH 法进行^[6]。

2 结果

2.1 细胞培养及细胞接种浓度

分别用 1×10^4 /mL、 1×10^5 /mL 和 1×10^6 /mL 的细胞浓度接种反应器, 观察发现细胞在接种 6h 后, 90% 细胞贴附上微载体, 并开始伸展; 24h 内生长缓慢; 第二天后细胞生长速度加快。随着细胞增殖速度增加, 灌注量也随之适当增加, 在我们实验灌注培养的条件下, 细胞的形态一直保持较好。 1×10^5 /mL 接种浓度的第 7d 细胞密度达 $6 \sim 7 \times 10^6$ /mL, 细胞状态稳定, 维持时间长, 利于病毒生产; 而接种浓度为 1×10^4 /mL 的 12d 细胞密度才能达到高峰; 接种 1×10^6 /mL 浓度的 3d 细胞密度即达高峰, 但细胞老化快, 部分提前脱落, 不利于病毒生产。细胞增殖曲线见图 1。

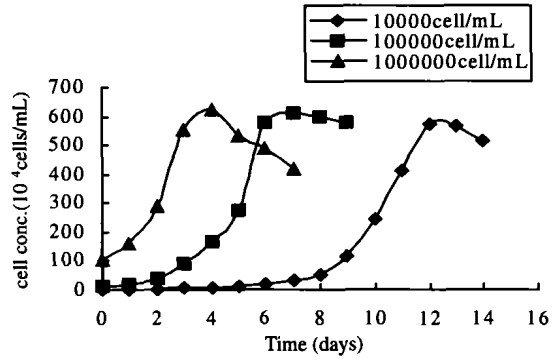


图 1 不同细胞接种量的细胞增殖曲线

Fig. 1 The multiplication curve of cell in different inoculation

2.2 病毒感染复数对毒力的影响

以 1×10^5 /mL 细胞密度接种反应器, 于第 7 天细胞密度达 6×10^6 /mL 左右时接种病毒, 接种前洗涤 2~3 次后换用维持液。病毒感染复数分别为 0.01 和 0.001, 取样测定毒力发现, 毒力高峰出现在 3~7d, 以后逐渐下降。两种感染复数的毒力差别不显著, 0.01MOI 的毒力整体水平略高于 0.001MOI, 且毒力高峰较早于后者, 结果见图 2。

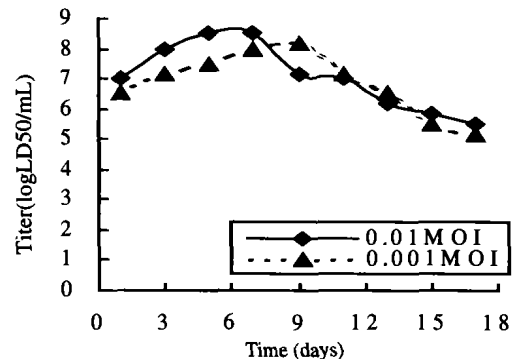


图 2 不同感染复数的病毒增殖曲线

Fig. 2 The multiplication curve of virus in different inoculation

2.3 灌流体积

培养细胞过程中监测葡萄糖含量, 每天检测细胞数量, 根据葡萄糖的消耗量和细胞生长情况调节灌注速度, 灌注体积为 0~3 个工作体积/d, 一般整个细胞培养灌注约 8 个工作体积。接种病毒后, 调节灌注速度和收获速度, 总共可收获 18 个左右工作体积的病毒液, 培养过程中葡萄糖消耗量曲线见图 3, 结果总结见表 1。

表 1 反应器灌注量

Table 1 Volume of perfusion	
Time after inoculation	
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Volume of harvest(L)	3.5 7 7 7 7 5 5 5 4.2 4.2 3.5 3.5
Titer of virus	7.0 8.0 8.0 8.5 8.67 8.5 8.5 8.0 7.17 7.17 7.0 6.17

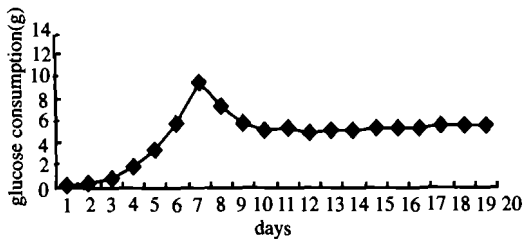


图3 葡萄糖消耗量曲线
Fig. 3 Glucose consumption curve

2.4 纯化

收集的病毒液用 10 万分子量超滤膜浓缩 15~20 倍,按 1:4000 加入 β -丙内酯,混匀 4℃放置 24 小时,间歇振荡,37℃水浴水解 2 小时。再经 Sepharose 4 Fast Flow 分子筛纯化,紫外监测结果见图 4,收集第一峰为抗原。

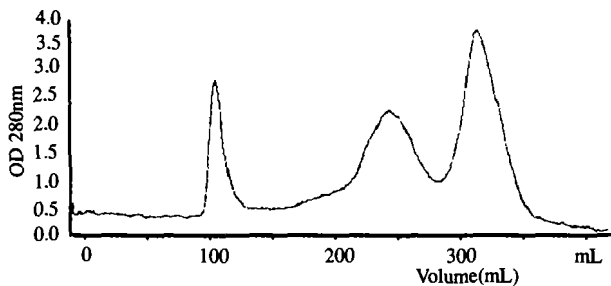


图4 柱层析图谱
Fig. 4 Chromatographic profile

2.5 疫苗制备及质量

以 1×10^5 /mL 细胞密度接种反应器,将细胞培养至 6×10^6 /mL 左右时接种病毒,感染复数为 0.01,于感染的第 2 天开始收获,测定收获毒力发现第 12 天仍大于 $6.0 \log LD_{50}$ /mL,第 13~18 天低于 $6.0 \log LD_{50}$ /mL。将收获的毒力大于 $6.0 \log LD_{50}$ /mL 病毒原液浓缩、灭活、离心,用分子筛纯化,加入保护剂等制成疫苗。制备的 2 批疫苗半成品质量检定结果见表 2。

表2 半成品质量检定结果
Table 2 The quality tests of semis

Lot No.	Potency (IU/mL)	Total protein (μ g/mL)	Residual calf serum (ng/mL)	Residual DNA (ng/mL)
1	5.63	73.25	25	<10
2	4.89	66.12	12.5	<10

3 讨论

生物反应器微载体批式法培养细胞,由于培养环境不稳定,细胞密度远远低于灌注法^[7];为了提供稳定的基本培养条件,国内现行反应器培养多采用增加培养基或部分换液的流加法和反复分批法,但细胞代谢旺盛时,这些方法仍不能及时补充营养、有效清除代谢产物。本研究采用的灌注培养法,营养物质不断补充,代谢产物不断去除,使细胞处

于一种稳定的营养状态,大大提高细胞密度。

本文研究的狂犬病疫苗生产工艺,不仅采用灌注法高密度培养细胞,在病毒繁殖过程中仍采用灌注方法。通过调节灌注流量,不仅在细胞增殖时稳定培养环境,而且在接种病毒后细胞仍能得到足够的营养和平衡的环境;同时反应器中病毒浓度得到调节,利于病毒繁殖。

本项实验显示,5L 生物反应器细胞接种量在 10^5 /mL 左右时,细胞生长 6~7d 后密度可达 6×10^6 /mL,以 0.01MOI 感染病毒,连续 12d 收获病毒液,其毒力仍在 $6.0 \log LD_{50}$ /mL 以上。细胞增殖培养过程中,随着细胞数量的增大,灌注速度加快;接种病毒后,由于细胞被感染和部分老化脱落,代谢速度减缓,需逐步降低灌注速度。试制的 2 批疫苗中,连续收获病毒原液 11~12d,经浓缩、灭活、离心等处理,再进一步用分子筛提纯,疫苗成品效价分别为 5.63IU/mL 和 4.89IU/mL,残余牛血清蛋白含量小于 50ng/mL, Vero 细胞 DNA 含量小于 10ng/mL,各项检定指标均符合《中国生物制品规程》2000 年版要求。

研究表明,生物反应器灌注培养法可用于 Vero 细胞狂犬病疫苗的生产。一个工作容积为 3.5L 的生物反应器的细胞数相当于 100 个 3L 转瓶的细胞数,由于生物反应器提供了有利于细胞生长的稳定的 pH 环境,营养均匀充足,而且乳酸和氨等有毒代谢产物得以不断排除,因此细胞维持时间长,有利于病毒的持续繁殖,在同一后处理条件下,一个工作容积为 3.5L 的生物反应器的狂犬病疫苗产量相当于 150 个 3L 转瓶的产量。此外该方法生产疫苗所需人员和 GMP 生产车间面积大大低于转瓶的疫苗生产,可极大地降低疫苗生产成本,因此该研究的小试工艺具进一步放大生产的可行性。

参考文献

- [1] Requirement for use of Animal cell as in vitro substrates for the production of biologicals[S]. WHO(Final Draft)RBS,1996, 50.
- [2] Requirement for continuous cell line used for biologicals productions[S]. WHO TRS, 1987, 745.
- [3] 曾蓉芳, 宋家骊, 顾 鸣, 等. Vero 细胞狂犬病疫苗的研制[J]. 中国病毒学, 1997, 12(1): 43-49.
- [4] 顾悦翔, 梁 本, 褚菊仁, 等. Vero 细胞微载体悬浮培养制备人用狂犬病疫苗的研究[J]. 中国生物制品学 1992, 5(3): 100-102.
- [5] 刘国诠 耿信笃 苏天升, 等. 生物工程下游技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002, 12.
- [6] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程 2000 版[M]. 北京: 化工工业出版社, 2000, 6
- [7] Nahapetian AT, Thomas J N, Thilly W G. Optimization of environment for high density Vero cell culture[J] Cell Sci, 1986, 81: 63-103.