

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.07

生物反应器悬浮培养 Vero 细胞 制备水貂犬瘟热活疫苗

冯二凯¹,程悦宁¹,罗国良¹,易立¹,王振军¹,郭利¹,陈立志²,程世鹏^{1*}

(1.中国农业科学院特产研究所,长春 130112; 2.吉林特研生物技术有限责任公司,长春 130122)

[收稿日期] 2019-04-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0041-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为实现利用生物反应器制备规模化、自动化生产水貂犬瘟热 Vero 活疫苗,在 7 L 生物反应器中悬浮培养 Vero 细胞,并考察培养基、细胞初始接种密度、培养方式、病毒感染复数和感染时间等参数对细胞增殖、病毒滴度以及细胞代谢的影响。结果显示,在含有 5 g/L 微载体的 DMEM 培养基中接种 Vero 细胞(30~40 cells/球),设定 pH、温度、溶氧值和转速分别为 7.2、37 ℃、50%和 55 r/min,培养方式为批次培养(0~48 h)+灌流培养(48~96 h)组合方式,培养 Vero 细胞 3~4 d 或细胞密度达到 200 cells/球以上时,按照 MOI=0.0001~0.001 吸附接毒,调低温度(33 ℃)继续培养 100~120 h,即可获得高滴度病毒液($10^{6.5} \sim 10^{7.2}$ TCID₅₀/0.1 mL),经无菌检验合格后,配制水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV3-CL 株,悬浮培养),疫苗符合《中国兽药典》三部(2015 版)的规定。试验建立了 7 L 生物反应器悬浮培养 Vero 细胞制备水貂犬瘟热活疫苗的新工艺,为进一步规模化生产奠定了基础。

[关键词] Vero 细胞;大规模培养;微载体;悬浮培养;生物反应器

Suspension Culture of Vero Cells in Bioreactor for Preparation of Mink Canine Distemper Attenuated Live Vaccine

FENG Er-kai¹, CHENG Yue-ning¹, LUO Guo-liang¹, YI Li¹, WANG Zhen-jun¹,
GUO Li¹, CHEN Li-zhi², CHENG Shi-peng^{1*}(1. *Institution of Special Animal and Plant Science of Chinese Academy of Agriculture Science, Jilin 130112, China;*2. *Jiling Teyan Biotechnology Co., Ltd, Changchun 130122, China)**Corresponding author: CHENG Shi-peng, E-mail: tcscsp@126.com*

Abstract: In order to develop a new process for preparing of mink canine distemper attenuated live vaccine (CDV3-CL Zhu) in a bioreactor, Vero cell, as a cellular matrix were cultured in a 7 L bioreactor. The pH, temperature, dissolved oxygen (DO) and stirring speed were maintained at the value of 7.2, 37 ℃, 50% and 55 r/min, respectively. The effect of culture mode, initial inoculum density and cell medium on growth rate and density of cell were investigated. In addition, the effect of multiplicity of infection (MOI) and time of infection

基金项目:吉林省科技发展计划(20150204073NY);吉林省“双十”重大科技攻关(20150201006NY)

作者简介:冯二凯,博士研究生,从事毛皮动物疫苗悬浮培养工艺开发。

通讯作者:程世鹏。E-mail: tcscsp@126.com

(TOI) on the titer of virus liquids were also studied. After a series of experiments, the results indicated that culture Vero cell in DEME containing 5 g/L microcarriers with batch plus perfusion culture mode for 3~4 d or the cell density reached above 200 cells per microcarrier, stopped the stir and canine distemper virus were inoculated into bioreactor under a MOI of 0.0001~0.001, turn down the temperature and continue to culture for another 100~120 h, the semi-vaccine product with highest virus titer of $10^{7.2}$ TCID₅₀/0.1 mL were collected, which was almost 30 times higher than that in rolling bottle. So, the procedure for production of mink canine distemper attenuated live vaccine (CDV3-CL Zhu) in Vero cells on microcarriers in a bioreactor was successfully developed, which laid a foundation of further large-scale culture of CDV and development of vaccine.

Key words: Vero cell; large scale culture; micro carriers; suspension culture; bioreactor

水貂犬瘟热(Mink canine distemper, CD)是由犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)引起一种高度接触性传染病^[1],与水貂阿留申病、细小病毒性肠炎并称为水貂养殖业的“三大杀手”,每年都给我水貂养殖企业或养殖户造成巨大的经济损失,严重威胁水貂养殖业健康发展^[2-4]。目前水貂犬瘟热没有特效的治疗药物,仅能通过疫苗免疫预防。中国农业科学院特产研究所先后研制了第一代水貂犬瘟热鸡胚成纤维细胞疫苗^[5]和第二代水貂犬瘟热活疫苗(传代细胞源)^[6],疫苗研制为有效控制我国毛皮动物犬瘟热疫情的发生和流行奠定了基础。但是,伴随着生物制品生产规模不断扩大,工艺水平不断提升,传统转瓶工艺已经不能满足现代疫苗企业的生产需求;另一方面,伴随着我国规模化养殖进程加速以及各种重大疫情频发的现实,疫病正在成为养殖产业的主要风险,一旦发生疫情,损失惨重。因此规模化养殖厂需要优质、高效疫苗^[5]。本研究在前期初步掌握 Vero 细胞悬浮培养工艺参数基础上^[7],继续优化细胞培养方式、病毒最佳感染复数以及病毒感染时间等参数,建立水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV3-CL 株)的悬浮培养制备工艺,研制新型水貂犬瘟热高质量疫苗。

1 材料与方 法

1.1 材 料 犬瘟热病毒(CDV3-CL 株, $10^{5.0}$ TCID₅₀/0.1mL),由中国农业科学院特产研究所鉴定和保存;Vero 细胞(CCL-81),购自 ATCC。新生牛血清(批号:20160405),由内蒙古金源康生物提

供;MEM(批号:1823760)、DMEM(批号:1693945)和 DMEM 低糖(批号:31600-091)由 Gibco 公司提供;DMEM/F12(批号:66005-050),由甘肃健顺生物提供;二氯二甲基硅烷(硅油;批号 F1721024)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。7L 生物反应器购自广州齐志生物工程股份有限公司。

1.2 反应器处理 于通风橱内,取少量硅油均匀涂抹反应器以及 2 L 蓝盖瓶内壁,倒置、自然晾干后,利用无水酒精中和,自来水冲洗 6~7 次,双蒸水洗涤 3 次,于 60 °C 烘箱内烘干备用。

1.3 微载体处理 取已硅化蓝盖瓶,称取适量微载体,按照 100 mL/g 微载体的比例加入无 Ca²⁺、Mg²⁺的 PBS,于 4 °C 浸泡过夜;弃 PBS 和漂浮微载体,按 200 mL/g 微载体的比例加入无 Ca²⁺、Mg²⁺的 PBS,校正电极、安装生物反应器、120 °C 高压灭菌 30 min,冷却至室温备用。

1.4 细胞培养及优化 以不同培养基(MEM、DMEM、DMEM(低糖)、DMEM/F12)以及不同初始接种密度接种生物反应器悬浮培养种子细胞,每天检测细胞密度、监测葡萄糖消耗量,根据葡萄糖消耗量和细胞生长情况,筛选合适的细胞培养基、初始接种密度以及合适的培养方式(批次、流加和灌注)。

1.5 病毒原液制备 以不同病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)(0.01、0.001、0.0001)的 CDV 分别接种悬浮培养种子细胞,测定不同 MOI 对 CDV 滴度的影响,确定最佳 MOI。接毒后每 24 h

取样测定 CDV 效价,确定最佳收获时间(TOI)。

1.6 工艺验证 采用确定的水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗悬浮培养工艺分别制备 3 批水貂犬瘟热病毒液,测定其病毒 TCID₅₀,验证工艺参数的稳定性。

1.7 病毒滴度测定 病毒滴度参照常方法测定,按照公式 Reed-Muench 法计算病毒样品的 TCID₅₀。

1.8 疫苗制备 利用验证后工艺参数制备配苗病毒液,无菌检验合格、配制、分装、冻干;按照《中国兽药典》第三部附录完成疫苗物理性状、无菌、支原体和外源病毒检验等。

2 结果

2.1 培养基对种子细胞、病毒增殖的影响 图 1 显示 4 种商业化培养均能支持 Vero 细胞生长,但 DMEM(低糖)、MEM 培养基在培养 72 h 后,细胞密度相对较低;而 DMEM、DMEM/F12 都能支持 Vero 细胞高密度培养,其中以 DMEM 培养基支持 Vero 细胞增殖效果最佳。

图 2 显示不同培养基条件下对悬浮细胞进行接毒后的病毒滴度情况,从中可以看出 DMEM 培养条件下的 CDV 增殖效果最佳。

2.2 初始接种密度对种子细胞增殖以及培养方式的影响 图 3 是不同初始接种密度对种子细胞培养密度及培养周期的影响。细胞接种后 24 h, 60 cells/球实验组的细胞密度略有下降,与 39 cells/球实验组基本持平,但高于 20 cells/球实验组;细胞接种后 48 h,细胞密度迅速上升,60 cell/球实验组细胞密度最高,39 cells/球次之,20 cells/球最低;培养至 72 h,60 cells/球和 39 cells/球实验组的细胞密度可达到 200 cells/球以上,满足了接毒要求;而初始接种密度为 20 cells/球时,需要一直培养至 144 h,才满足接毒要求。不同初始接种密度不仅影响培养细胞的密度和培养周期,而且还影响细胞培养的方式。以 60 cells/球接种时,细胞在接种后 24 h 即出现葡萄糖浓度不足,不得不改用灌流方式培养;而以 20 cells/球接种时,细胞培养周期延长,虽然前期不需要灌流,但是后期也需要长时间的灌流培养才能获得满足接毒要求的细胞密度;而以 39 cells/球接种时,在 0~48 h 仅批培养即可;48 h~72 h 采用灌流方式让细胞快速增殖,以满足反应器接毒需求。

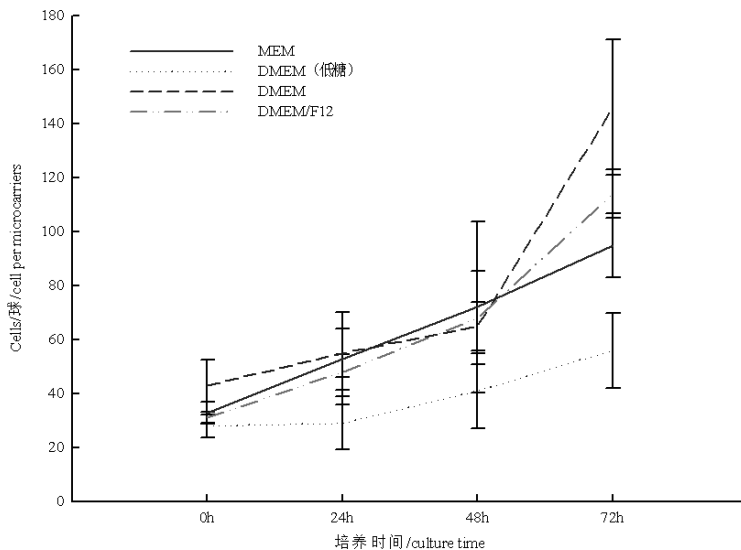


图 1 不同培养基支持 Vero 细胞增殖效果

Fig 1 The influence of medium on the proliferation of Vero cell

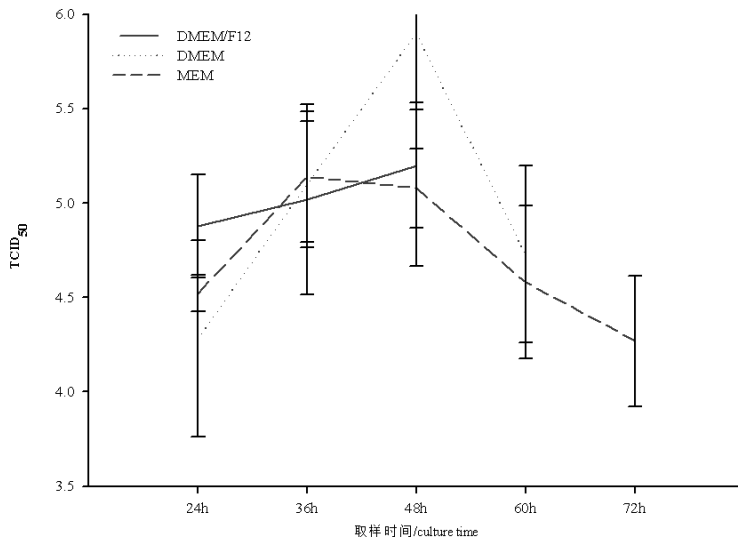


图 2 不同培养基支持水貂犬瘟热增殖效果

Fig 2 The influence of medium on the proliferation of canine distemper virus

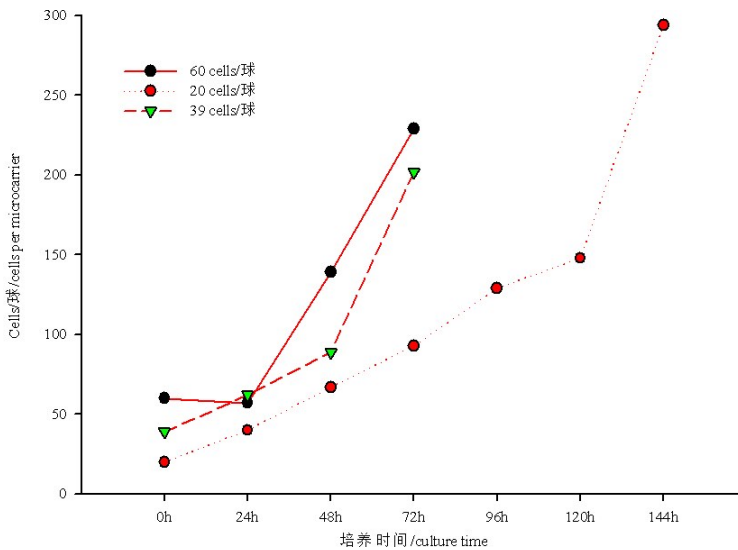


图 3 初始接种密度对 Vero 细胞增殖的影响

Fig 3 The effect of the initial inoculation density on the proliferation of Vero cell

2.3 培养方式对 Vero 细胞增殖的影响 图 4 直观地显示了培养方式对 Vero 细胞增殖的影响。相对于批次培养, DMEM(批次+灌流), DMEM/F12(批次+灌流), 甚至 MEM(批次+灌流), 均可以显著提升 Vero 细胞的细胞密度; 其中 DMEM(批次+灌流), DMEM/F12(批次+灌流)均可以在培养第 72 h 范围内使 Vero 细胞满足接毒要求。

2.4 最佳 MOI 和 TOI 确定 图 5 显示的是不同感染复数 MOI 对 CDV 滴度的影响。过高的 MOI(0.01

和 0.04), 导致细胞快速从微载体上脱落(48 h), 病毒滴度较低(图 5C 和 5D), 说明 MOI 能够直接影响病毒增殖效率。当 MOI 为 0.0006 和 0.0003 时, 病毒增殖时间延长, 均可以获得较高地的 CDV 增殖效价, 其中 MOI = 0.0006 效价最高, 达到 $10^{7.2}$ TCID₅₀/0.1mL(图 5A), 病毒的峰值均出现在 120 h 左右(图 5A 和 B), 所以确定 CDV 的最佳 MOI 为 0.0001~0.001, 确定 CDV 的最佳 TOI 在 100~120 h 之间。

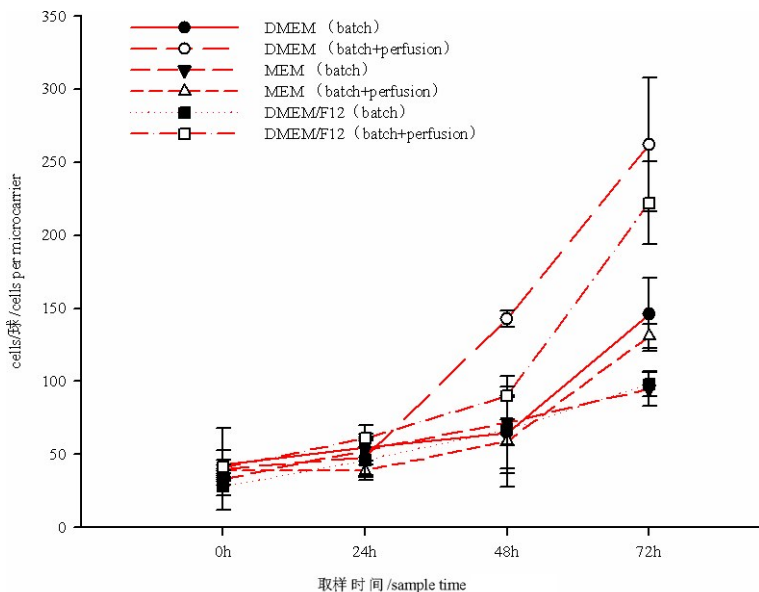


图 4 培养方式对 Vero 细胞增殖的影响

Fig 4 The influence of culture mode on the proliferation of Vero cell

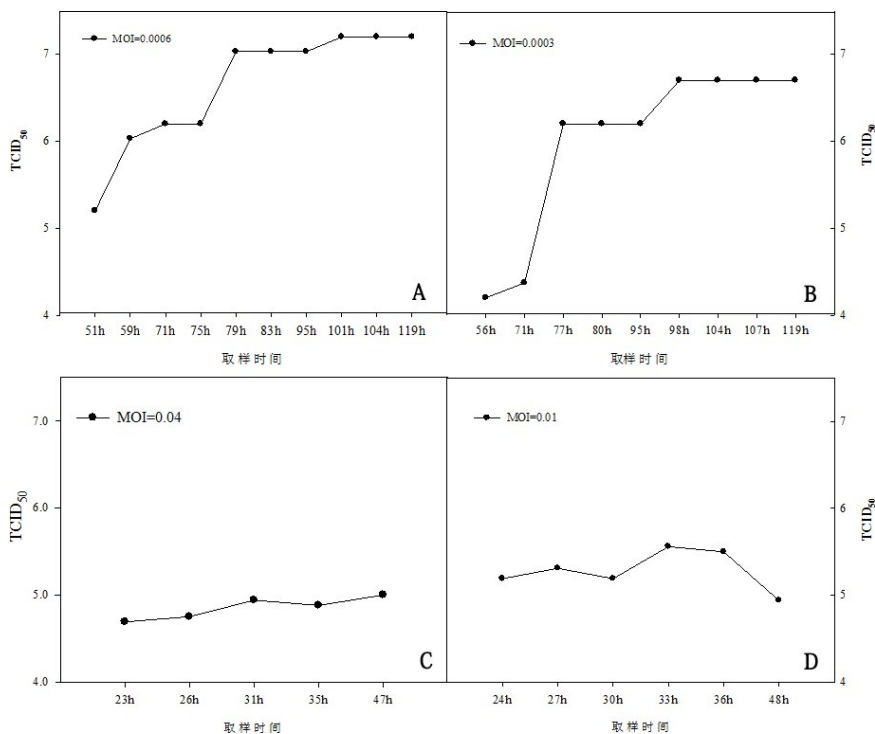


图 5 不同感染复数对 CDV 病毒效价的影响

Fig 5 The MOI effect on titer of CDV

2.5 工艺重复性验证 为了验证工艺的重复性, 利用建立的水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗悬浮培养工艺参数重复培养水貂犬瘟热病毒 (CDV3-CL 株)

3 次, 对每次获得的病毒液进行滴度测定, 结果如图 6 所示。从图中可以看出, 建立的工艺参数具有很好的重复性。

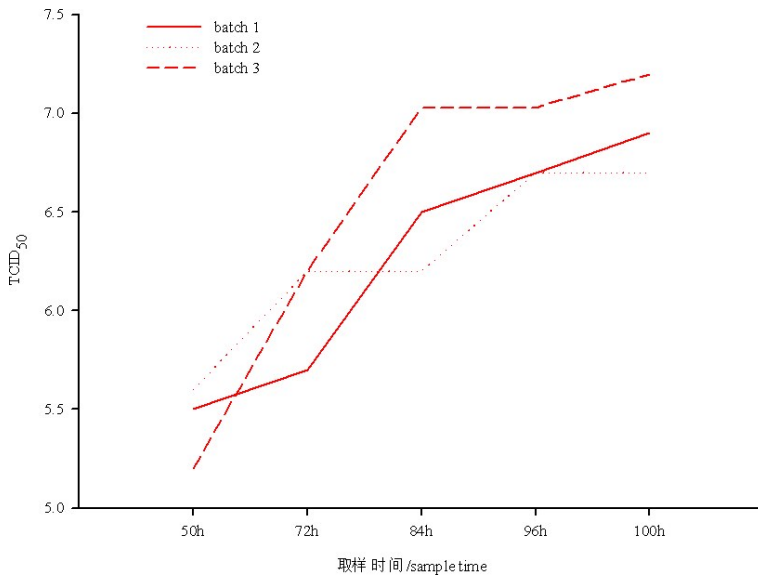


图 6 水貂犬瘟热 Vero 活疫苗悬浮工艺重复性验证

Fig 6 The repeatability test of the suspension culture craft for preparing mink canine distemper attenuated lived vaccine

3 讨论

毛皮动物养殖极易受到疫病威胁,急需高质量疫苗为行业健康发展保驾护航^[5]。然而目前毛皮动物疫苗大多采用转瓶工艺生产,需要使用高浓度血清,生产的疫苗批间差异大,无法满足市场对高质量疫苗的需求,亟需对疫苗的制备工艺进行升级换代。

本研究基于已有的水貂犬瘟热活疫苗(CDV3-CL株)的转瓶工艺参数,通过控制参数法对疫苗的悬浮培养制备工艺关键参数,例如培养基、初始接种密度、培养方式以及病毒 MOI 以及 TOI 等进行系统摸索和优化。以培养基为例,本研究发现所有培养基(MEM、DMEM、DMEM(低糖)、DMEM/F12)均可以维持 Vero 细胞悬浮培养,但它们所能支持 Vero 细胞增殖和病毒增殖的能力有差异:MEM 最弱,DMEM(低糖)次之,DMEM 最高(批次培养,图 1 和图 2);与夏德镇等^[7]报道略有不同,其利用 MEM 培养基通过灌流培养可以支持 3~20 g/L 微载体高密度培养 Vero 细胞,但最高密度出现时间在 120~140 h 之间。为了能在最短时间内获得较高的细胞密度,以便于与传统疫苗制备周期持平,试验选择了能够更好支持细胞增殖的

DMEM 作为生产培养基。

细胞初始接种密度高或低以及微载体用量也是悬浮工艺开发的关键参数,因为其不但影响细胞培养周期,而且影响细胞的培养方式。韩中山等^[8]在研究狂犬病毒悬浮制备工艺过程中,发现较高的初始接种密度会增加营养物质的消耗速率,需要通过灌流培养才能维持细胞增殖。本研究也有同样的发现,以 60 cells/球为例,在培养早期(24~36 h)就需要对细胞进行换液或灌流培养;而细胞初始密度为 20 cells/球时,虽然在培养早期不需要灌流培养,但其培养周期被延长至 144 h 才满足接毒要求,随着培养时间的延长也需要进行换液或灌流操作;此外,较高的细胞密度会增加初始细胞的用量,在规模化生产过程中会增加初级种子的用量以及操作步骤,增加污染风险。

培养方式对工艺的影响主要体现在营养物质工艺和代谢废物清除两个方面。批次培养模式提供的营养物质不足以支持细胞高密度、长期培养,并且会造成代谢废物积累。Trabelsi K 等^[9]在利用不同模式培养 Vero 细胞生产狂犬病毒过程中发现,其乳酸的积累要高于灌流培养,细胞密度却低于灌流培养。

病毒感染复数 (MOI) 及病毒感染时间 (TOI), 主要影响病毒的增殖以及病毒收获时间。不同的病毒的 MOI 和 TOI 也不尽相同。在本研究早期, 利用高 MOI (0.01 和 0.04) 感染 Vero 细胞, 细胞在 48 h 即几乎全部脱落 (数据未提供), 病毒未能得到很好增殖, 病毒滴度也较低 (图 3A); 当 MOI 调整为 0.0006 时, 病毒增殖周期从原来的 48 h 延长至 144 h, 病毒的滴度也大幅提升 ($10^{7.2}$), 较转瓶工艺提升了近 2 个滴度, 极大地提升了疫苗的制备效率, 降低了疫苗批次间的差异。

综合考虑以上因素, 通过优化组合形成了适合水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗的悬浮制备工艺: 培养基选择 DMEM, 微载体用量规定为 5 g/mL, 细胞初始接种密度设定为 30~40 cells/球, 培养方式为批次+灌流培养, 培养细胞 72~96 h 左右或细胞密度达到 200 cells/球以上时, 以 MOI 为 0.0001~0.001 的比例接种水貂犬瘟热病毒 CDV3-CL 株, 调低培养温度 (33 °C) 继续培养 100~120 h, 收获病毒液, 即可用作配制疫苗的半成品。按照《中国兽药典》三部 (2015 版) 的规定完成半成品的相关检验, 即可稀释、分装、配苗。本研究为水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗规模化悬浮生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王胜乐, 王铁成, 冯娜, 等. 水貂犬瘟热动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11): 54-58.
Wang S L, Wang T C, Feng N, *et al.* The mink model establishment of canine distemper virus [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2012, 22(11): 54-58.
- [2] Zhao J J, Shi N, Sun Y, *et al.* Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected raccoon, dogs, foxes, and minks [J]. Antiviral Res, 2015, 122: 1-11.
- [3] Yi L, Cao Z, Tong M, *et al.* Identification of a novel linear B-cell epitope using a monoclonal antibody against the carboxy terminus of the canine distemper virus nucleoprotein and sequence analysis of the identified epitope in different CDV isolates [J]. Virol J, 2017, 14(1): 187.
- [4] Li S, Yi L, Cao Z, *et al.* Identification of linear B-cell epitopes on the phosphoprotein of canine distemper virus using four monoclonal antibodies [J]. Virus Res, 2018, 257: 52-56.
- [5] 程世鹏, 闫喜军, 吴威, 等. 犬瘟热弱毒株 CDV_3 生物学特性鉴定 [J]. 经济动物学报, 2004, 8(3): 142-145.
Cheng S P, Yan X J, Wu W, *et al.* Biological characters identification of attenuated virus strain 3 of canine distemper virus [J]. Journal of Economic Animal, 2004, 8(3): 142-145.
- [6] 中华人民共和国农业部公告第 1787 号 [EB/OL]. (2012-06-19) [2019-04-08]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/tzgg/gg/201206/t20120619_2765357.htm.
The 1787 announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [EB/OL]. (2012-06-19) [2019-04-08]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwlml/tzgg/gg/201206/t20120619_2765357.htm.
- [7] 冯二凯, 冷雪, 程世鹏, 等. 大规模细胞培养技术及其在兽用疫苗生产中的应用 [C]//中国毛皮动物科学研究进展-2014 年全国毛皮动物专业学术研讨会论文集. 吉林科学技术出版社, 2014: 177-180.
Feng E K, Leng X, Cheng S P, *et al.* Large-scale animal cell culture technology and its application in the field of veterinary vaccines production [C]//Progress in Chinese fur animal science research-Proceedings of the 2014 National Fur Animals Academic Symposium. Jilin Science and Technology Publishing house, 2014: 177-180.
- [8] 盛程程, 冯二凯, 任飞, 等. Vero 细胞生物反应器微载体悬浮培养工艺的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, (1): 186-189, 257-258.
Sheng C C, Feng E K, Ren F, *et al.* Microcarriers suspension culture of Vero cell in bioreactor [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018, (1): 186-189, 257-258.
- [9] 夏德镇, 杨志建, 周正, 等. 生物反应器培养 Vero 细胞生产肠道病毒 71 型 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(2): 256-259.
Xia D Z, Yang Z J, Zhou Z, *et al.* Production of enterovirus 71 in Vero cell grown on microcarriers in a bioreactor [J]. 2013, 26(2): 256-259.
- [10] 韩中山. 生物反应器培养 Vero 细胞制备狂犬病毒 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(3): 50-51.
Han Z S. Preparation of rabies virus through culture Vero cell in bioreactor [J]. Chinese Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013, 29(3): 50-51.
- [11] Trabe LS I, Rourou S, Loukil H, *et al.* Comparison of various culture modes for the production of rabies virus by Vero cells grown on microcarriers in a 2-1 bioreactor [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(4): 514-519.