论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0496-03

用生物反应器制备乙脑灭活疫苗的研究

衡 燮,温嘉纳,李 佳,李桂兰,奚光跃,周 健,姬 光,任邦彦,谭振国,孙明波 (中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所,昆明 650118)

摘 要:目的 用生物反应器制备乙脑纯化灭活疫苗。**方法** 用搅拌式生物反应器培养Vero细胞,接种并培养乙型脑炎病毒,将收获的病毒液进行灭活和纯化。**结果** 细胞密度都增至2.4×10^6 ml^{-1}以上,病毒滴度都>7.25 $lgLD_{50}$/ml。**结论** 用生物反应器制备乙脑灭活纯化疫苗的工艺合理,可以生产出高滴度的乙型脑炎病毒液。

关键词:乙型脑炎病毒疫苗;生物反应器;纯化;灭活

中图法分类号:R329.7;R512.32;R94 **文献标识码**:A

Preparation of inactivated Japanese encephalitis virus vaccine in bioreactor

HENG Xie, WEN Jia-na, LI Jia, LI Gui-lan, XI Guang-yue, ZHOU Jian, JI Guang, REN Bang-yan, TAN Zhen-guo, SUN Ming-bo (Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: Objective To develop a novel procedure for production of purified inactive Japanese encephalitis virus vaccine in bioreactor. Methods Japanese encephalitis viruses were inoculated and cultivated after the propagation in Vero cells in bioreactor. Results The cell density reached above 2.4×10^6 cell/ml and Japanese encephalitis virus titer achieved above 7.25 $lgLD_{50}$/ml. Conclusion The procedure of production of Japanese encephalitis virus vaccine in bioreactor is a feasible way to produce high-titer viruses.

Key words: Japanese encephalitis virus vaccine; bioreactor; purification; inactivation

流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis 简称乙脑)是由乙脑病毒引起的中枢神经系统急性传染病[1],病死率约30%。乙脑病毒属黄病毒科黄病毒属病毒,病毒颗粒呈球形,直径约40 nm[2]。乙脑病毒抗原较稳定,较少变异,至今只发现一个血清型[3]。本病目前尚无特效治疗,注射乙脑疫苗是预防和控制乙脑流行的最有效手段[4,5]。

目前生产和应用的乙脑疫苗主要有四种:一种是鼠脑纯化疫苗,已在亚洲许多乙脑流行国家广泛应用,但鼠脑纯化疫苗价格贵,副反应大[6]。另3种是地鼠肾细胞灭活疫苗、地鼠肾细胞减毒活疫苗和Vero细胞灭活疫苗,地鼠肾细胞减毒活疫苗($SA14_{14-2}$)[7,8]是中国独创的一种乙脑疫苗,经多年观察,该疫苗不但安全,而且免疫性、保护性和持久性均良好[9,10],此3种疫苗大多采用转瓶生产工艺,生产规模受到限制。微载体发酵罐技术现已被广泛应用,由于Vero细胞繁殖快,可在微载体生物反应器中进行工业化大生产,细胞、抗原产量高,成本较低。鉴于这些优势,我们对应用生物反应器培养Vero细胞制备乙脑灭活疫苗的工艺进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

非洲绿猴肾细胞Vreo细胞(源自美国ATCC)141代。乙脑病毒P3株(源自中国药品微生物制品检定所)将其适应Vero细胞后建立工作种子库。病毒培养液使用M199,细胞培养液使用MEM(Minimum Essenial menium,Sigma)加10%牛血清,调pH至7.2。(荷兰Applikon)7L搅拌式生物反应器。Phamacia Cytodex-1微载体。使用Sepharose 6FF进行凝胶过滤和DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在生物反应器中加入细胞培养液、接种Vreo细胞,设定生物反应器培养条件为pH 7.2,温度37 ℃,溶氧50%,搅拌速度50 r/min。每天取样进行细胞计数,4 d后结束细胞培养,细胞数增至2.4×10^6 ml^{-1}以上。共培养了3批(批号分别为2005001、2005002、2005003)。

1.2.2 病毒培养 细胞培养结束后,停止搅拌,将生物反应器中的细胞培养液排放,加入病毒培养液和乙脑P3株工作种子继续培养。设定生物反应器培养条件为pH 7.4,温度35 ℃,溶氧20%,搅拌速度50 r/min,每天取样测病毒滴度,第3天

基金项目:云南省科技计划项目基金(2004PY02-11)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Yunnan Province (2004PY02-11)

作者简介:衡 燮,女,辽宁省沈阳市人,主管技师,主要从事病毒疫苗方面的研究,电话:(0871)8333472

通信作者:孙明波,电话:(0871)8333472

收稿日期:2007-07-05;修回日期:2008-01-21

开始灌流收获病毒液,6 d 后结束培养。

1.2.3　灭活　　在病毒收获液中加甲醛,使其最终浓度为 1/2 000,放 22 ℃灭活,每天取样,灭活 10 d 后,放 4 ℃保存。

1.2.4　超滤浓缩　　灭活后的病毒液用截留相对分子质量为 100 000的超滤膜浓缩。

1.2.5　纯化

1.2.5.1　凝胶过滤　　取病毒浓缩液加入 Sepharose 6FF 层析柱中,收集第 1 峰(抗原活性峰)。

1.2.5.2　离子交换　　将凝胶过滤收集的病毒液加入 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱中,收集第 1 峰。

2　结果

2.1　细胞培养

每天取样细胞计数的结果见图 1。经过4 d 的培养,2005001 批的细胞数增至 $2.40\times10^{6}\,ml^{-1}$,2005002 批的细胞数增至 $4.70\times10^{6}\,ml^{-1}$,2005003 批的细胞数增至 $3.65\times10^{6}\,ml^{-1}$。

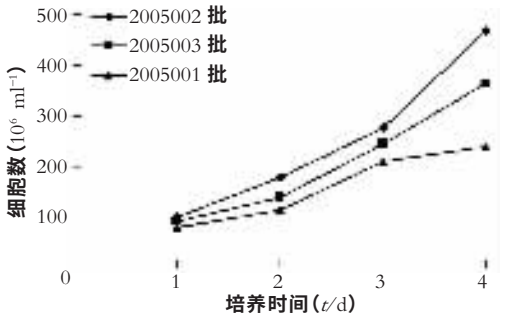


图 1　细胞生长曲线图

2.2　病毒培养

第 3 天开始灌流并收获病毒液,病毒滴度(LD_{50})用小鼠接种法测定[11]。3 批收获的病毒液的体积和滴度的结果见表 1。

表 1　3 批病毒收获液的体积和滴度

批号	体积(L)		滴度($LgLD_{50}$/ml)
	开始	结束	
2005001	4.0	12	7.25
2005002	4.0	11	7.87
2005003	4.0	10	7.65

2.3　灭活

样品经小鼠脑内盲传 3 代,证实无活的乙脑病毒存在。

2.4　纯化

浓缩病毒液经第 1 步凝胶过滤后收集第 1 峰(抗原活性峰),大部分杂蛋白在抗原活性峰后才洗脱下来,经过这步可将大部分杂蛋白去除(图 2)。将第 1 步收集的抗原活性峰上离子交换柱,收集第 1 峰,大部分 DNA 在第 1 峰后用 NaCl 才洗脱下来,经该步离子交换后可将大部分 DNA 去除(图 3)。3 批病毒收获液纯化前、浓缩后、纯化后血凝效价、DNA 含量和蛋白含量见表 2。

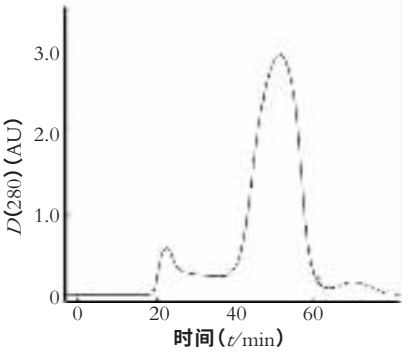


图 2　Sepharose 6FF 色谱图

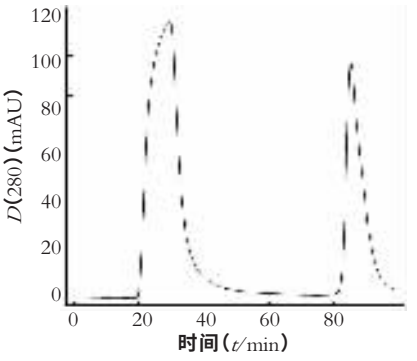


图 3　DEAE-Sepharose Fast Flow 色谱图

3　讨论

国内以 Vero 细胞制备乙脑疫苗大多采用转瓶生产工艺[12],由于受到转瓶表面积和培养条件的限制,生产规模受到限制。而用生物反应器进行生产,从结果看 3 批细胞数都增至 $2.4\times10^{6}\,ml^{-1}$ 以上,细胞倍增数在 2.05 以上,细胞产量高,抗原产量大,批间差异小,易于质量控制,成本较低,易于进行大规模生产。用生物反应器培养 Vero 细胞制备乙脑疫苗技术,可替代传统的转瓶培养工艺,提高生物制品质量,较大幅度降低生物制品制备成本。

由于乙脑 P3 株为有毒株,具有一定的感染性,因此用其制备灭活疫苗,必须彻底灭活病毒。用福尔马林灭活乙脑病毒,24 h 感染性滴度呈直线下降。在室温灭活 10 d,超时的灭活保证了疫苗的安全性。为提高免疫原性,减少或避免人体使用后全身或局部反应,

表 2　3 批病毒液后处理结果

批号	纯化前病毒收获液			病毒浓缩液			纯化后病毒收获液		
	DNA 含量(ng/ml)	血凝效价	蛋白含量(ng/ml)	DNA 含量(ng/ml)	血凝效价	蛋白含量(ng/ml)	DNA 含量(pg/ml)	血凝效价	蛋白含量(μg/ml)
2005001	50	1:16	>100	>50	1:1 024	>100	<10	1:128	44.8
2005002	50	1:32	>100	>50	1:2 048	>100	<10	1:256	59.6
2005003	50	1:32	>100	>50	1:2 048	>100	<10	1:256	49.0

对病毒抗原进行浓缩纯化,用两步纯化法,第 1 步用 Sepharose 6FF 层析柱去除大部分杂蛋白,再经过第 2 步 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱把与病毒发生吸附作用的小部分杂蛋白和大部分 DNA 去除。WHO 规程中规定的标准为 <10 ng/剂量,我们建立的病毒液后处理工艺 3 批病毒收获液的 DNA 残留量均 <10 pg/剂量,其 DNA 残留量大大低于规程要求。血凝效价在 1:128 以上,获得了高纯度的病毒原液,病毒原液经 8 倍稀释后,效价测定各项指标均达到乙脑疫苗规程的要求,为进一步研制高质量的乙脑疫苗及产业化打下了良好的基础。

参考文献:

[1] 俞永新. 流行性乙型脑炎的全球流行动态及控制策略[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(6): 567 - 569.

[2] Chambers T J, Nestorowicz A, Mason P W, *et al*. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties[J]. J Virol, 1999, 73(4): 3095 - 3101.

[3] Tsarev S A, Sanders M L, Vaughn D W, *et al*. Phylogenetic analysis suggests only one serotype of Japanese encephalitis virus[J]. Vaccine, 2000, 18 (Suppl 2): 36 - 43.

[4] Kurane I, Takasaki T. Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains[J]. Vaccine, 2000, 18 Suppl 2: 33 - 35.

[5] Hoke C H, Nisalak A, Sangawhipa N, *et al*. Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines[J]. N Engl J Med, 1988, 319(10): 608 - 614.

[6] 丁志芬. 流行性乙型脑炎疫苗[M]//卢锦汉, 章以浩, 赵 铠, 等. 医学生物制品学. 北京: 人民出版社出版, 1995: 528 - 538.

[7] 贾丽丽, 郑铮, 郭玉鹏, 等. 流行性乙型脑炎减毒活疫苗生产毒株(SA14-14-2)的稳定性研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1992, 5(4): 174 - 176.

[8] Wills M R, Sil B K, Cao J X, *et al*. Antigenic characterization of the live attenuated Japanese encephalitis vaccine virus SA14-14-2: a comparison with isolates of the virus covering a wide geographic area[J]. Vaccine, 1992, 10(12): 861 - 872.

[9] 周立本, 贾丽丽, 许先兰, 等. 流行性乙型脑炎减毒活疫苗大面积接种后安全性和流行病学效果的 5 年观察[J]. 中华流行病学杂志, 1999, 20(1): 38 - 41.

[10] Tsai T F, Yu Y X, Jia L L, *et al*. Immunogenicity of live attenuated SA14-14-2 Japanese encephalitis vaccine--a comparison of 1- and 3-month immunization schedules[J]. J Infect Dis, 1998, 177(1): 221 - 223.

[11] 流行性乙型脑炎灭活疫苗制造及检定规程[S]//中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程. 2000 年版. 北京: 化学工业出版社, 2000: 118 - 123.

[12] 丁志芬, 石慧颖, 庞成华, 等. 转瓶培养非洲绿猴肾传代细胞生产纯化流行性乙型脑炎疫苗的研究[J]. 中华医学杂志, 1998, 78(4): 261 - 262.

(编辑 邓强庭)

(上接 495 页)

3 讨论

支气管哮喘的发病涉及多种炎性细胞和细胞因子[3]。近年来,血小板与哮喘的关系逐步受到医学界的重视。特别在小儿,随着血细胞分析仪的不断更新,PLT、MPV、PDW 和 P-LCR 等参数受到大家的关注。血小板大多数来源于骨髓成熟巨核细胞,少数来自肺泡内巨核细胞,其中 PLT 是反映血小板生成与衰亡的指标, MPV、PDW 是反映血小板大小或体积及其差异程度的参数,P-LCR 是大血小板占血小板总数的百分比,综合分析血小板各项参数之间的关系,能准确评估血小板代谢状态。

本研究显示儿童哮喘急性发作期 PLT 增加,MPV、PDW 和 P-LCR 减低,缓解期各项指标均已恢复,与叶松道等[4]研究结果一致。提示儿童哮喘急性发作时血小板质量发生了变化。

CD62p、CD63 均为血小板膜糖蛋白,是血小板粘附、聚集及释放功能的分子基础,分别存在于静息血小板细胞质内颗粒膜及溶酶体膜上,当血小板被激活时,血小板内颗粒与血小板膜整合,CD62p、CD63 表达于血小板表面,故 CD62p、CD63 是血小板活化的膜标志物[5]。

本研究显示,儿童哮喘急性发作期 CD62p 、CD63 阳性表达率明显增加,随病情的缓解血小板活化水平明显下降与正常对照组比较无显著差异,提示儿童哮喘发作时存在血小板活化,CD62p、CD63 在哮喘的发病过程中可能起了作用。

有研究表明 CD62p 与哮喘患者 PEV_1% Pred 呈显著负相关[6],但儿童,特别是婴幼儿哮喘目前缺乏好的监控方法,我们的研究还提示哮喘患儿 CD62p、CD63 的阳性表达与 PLT 呈显著正相关,而血小板参数的测定简单易行,不需要专用仪器,动态观察血小板各参数变化可能有助于病情监测。

因此,儿童哮喘急性发作期试行抗血小板治疗可能能为哮喘治疗提供一定的途径,值得临床进一步研究。

关键词: 哮喘;儿童;血小板

中图法分类号: R725.622.5 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 卓致远, 黄 茂. 血小板激活因子与支气管哮喘[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(1): 26 - 28.

[2] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘防治常规 (试行)[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2): 100 - 106.

[3] 徐孝华, 杭 果. 293 例哮喘患儿变应原分析[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(4): 119 - 120.

[4] 叶松道, 苏士海, 陶洪群. 支气管哮喘患儿血小板 5 项参数检测的临床意义[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(3): 222.

[5] Sedlmayr P, Grosshaupt B, Muntean W. Flow cytometric detection of intracellular platelet antigens[J]. Cytometry, 1996, 23(4): 284 - 289.

[6] 雷 伟, 黄建安, 於葛华, 等. 血小板源性 CD40L、CD62P 在哮喘患者外周血中的表达及其临床意义[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(1): 8 - 11,15.

(编辑 郭建秀)