



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102657859 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201210155083. 2

C12N 7/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 05. 17

C12N 7/06 (2006. 01)

C12R 1/93 (2006. 01)

(71) 申请人 肇庆大华农生物药品有限公司

地址 526000 广东省肇庆市大旺经济开发区
丰盈工业园内

申请人 广东大华农动物保健品股份有限公
司

(72) 发明人 陈瑞爱 徐家华 施维松 张冬霞
汤钦

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所 (普通合伙) 44288

代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.

A61K 39/145 (2006. 01)

A61P 31/14 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽
流感疫苗的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法, 包括如下具体步骤: 选择种细胞; 转瓶繁殖细胞传代; 收获转瓶中的细胞; 细胞接种; 生物反应器培养接种细胞; 接种禽流感病毒; 禽流感病毒繁殖; 收集禽流感病毒液; 对禽流感病毒细胞液进行灭活; 制备禽流感细胞苗; 禽流感细胞苗免疫。该方法克服传统工艺生产禽流感疫苗, 生产周期长、批间差异大、内毒素含量高、受胚蛋供应的影响, 也克服片状载体难于放大的影响。制备的禽流感病毒疫苗产品批间差异小, 无细菌污染, 产品内毒素含量低, 产品甲醛含量也低, 质量稳定, 生产周期短, 易于放大。

1. 利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法,其特征在于,包括如下具体步骤

1:选择导入载体所需要的种细胞 MDCK 或者 Vero ;

2:转瓶繁殖细胞传代的方法:首先复苏步骤 1 所选择的种细胞到 T225 的细胞瓶中,生长 48h 左右,按照 1:4 的比例进行传代;然后把 4 个长满细胞的 T225 细胞瓶中的细胞传到 1 个 15L 转瓶进行培养;48 小时左右按照 1:4 或 1:3 的比例进行细胞传代培养;

3:收获转瓶中的细胞:将步骤 2 所得细胞用 PBS 洗涤 2-3 次,然后加入胰酶-EDTA 溶液消化;15L 转瓶加入 100-150ml 胰酶-EDTA 溶液,其它类型的转瓶按照类似比例添加胰酶-EDTA 溶液消化,然后收集细胞;

4:收获的细胞计数后,按照每个微载体添加 5-20 个细胞的比例进行细胞接种;每升培养基中加入 2-10 克微载体;

5:生物反应器培养接种细胞:

生物反应器培养细胞的培养基为 MEM (Hyclone);血清使用浓度为 7-10%;CO₂ 通气量为 5-10%;溶氧量为 40-60% 的溶液饱和溶氧量;温度为 37°C;搅拌速度为 30-55 转/分,pH 为 6.8-7.4;90-95% 以上的微载体在细胞接种后 48-72h 期间能够达到接种禽流感病毒的要求;

6:步骤 5 培养的细胞达到接种禽流感病毒的要求后,接种禽流感病毒,方法如下:

6.1) 清洗微载体:先沉淀长满细胞的微载体,然后用 PBS 清洗清洗微载体;

6.2) 病毒接种:然后加入禽流感病毒-MEM 溶液进行病毒接种,病毒接种过程中培养基的体积为生物反应器工作的体积 1/4-1,病毒接种剂量为 0.00001-1.0MI₀,接种过程中不加血清;

6.3) 孵育禽流感病毒与细胞:禽流感病毒接种后,向生物反应器中补足生物反应器正常工作所需要的培养基,在禽流感病毒与细胞孵育的过程中,轻轻搅拌微载体使细胞与禽流感病毒充分接触,搅拌速度为 30-45 转/分,禽流感病毒与细胞孵育时间为 0.5-10 小时;

7:禽流感病毒繁殖 病毒繁殖培养基为 MEM (Hyclone); CO₂ 通气量为 5-10%;溶氧量为 40-60% 的溶液饱和溶氧量;温度为 37°C;搅拌速度为 30-45 转/分,pH 为 6.5-7.2;病毒繁殖的时间为 24-72h;

8:离心收集步骤 7 所得禽流感病毒液,离心速度为 3000-4500 转/分,离心时间为 20-30 分钟;

9: 灭活步骤 8 所得禽流感病毒液中的禽流感病毒

使用甲醛灭活禽流感病毒,加入的甲醛终浓度为 0.01%-0.2%,灭活的时间为 24 小时,灭活的温度为 15-37°C;在灭活的过程中进行搅拌使甲醛与病毒混匀;

10:然后按照常规方法制备禽流感细胞苗,即按照油相:水相为 2:1 的体积比例制备疫苗,先把油相进行灭菌处理,然后把步骤 9 所得完全灭活的禽流感病毒液慢慢倒入搅拌中的油相,乳化制得疫苗;

11:禽流感细胞苗免疫 21 日龄的 SPF 鸡,免疫剂量为 0.3ml,免疫后 14 天、21 天分别采血进行测定血清中抗禽流感特异性抗体的滴度(HI)。

2. 如权利要求 1 所述的利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法,其特征在于,步骤 6.3 中,禽流感病毒与细胞孵育时间不低于 1 个小时。

3. 如权利要求 1 所述的利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法,其特征在于,步骤 7 中,病毒繁殖过程中,当病毒繁殖培养基 pH 低于 6.5 或者禽流感病毒 HA 价高于 9.0,就更换部分溶液。

4. 如权利要求 1 所述的利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法,其特征在于,所述微载体为 Cytodex I 或 hyclone。

利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及禽流感疫苗技术领域,具体地,涉及利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法。

背景技术

[0002] 过去我国一直通过鸡胚培养生产流感疫苗。由于鸡胚生产流感疫苗需要消耗大量鸡胚,生产周期长,易污染,不易于控制,而且每只受精鸡蛋一次只能注射一个病毒菌株,因此这种生产方法效率很低,不利于应对大规模的流感爆发。

[0003] 以哺乳动物细胞为基质制备疫苗具有无外源因子污染、易于规模化生产、能较好的维持病毒抗原稳定等优点。但是,仅仅依靠动物细胞培养生产病毒的量有限,因此将载体培养技术应用于禽流感疫苗的生产,无疑将既保持细胞培养的优势又克服了其生产产量有限的缺点。球形微载体在生物制药行业广泛使用。使用球形微载体培养细胞繁殖禽流感病毒生产疫苗具有以下优点:1)产品批间差异小;2)无细菌污染,产品内毒素含量低;3)产品灭活时,甲醛使用量低,因此产品甲醛含量也低;4)产品质量稳定,鸡免疫疫苗后应激小;5)生产周期短;6)易于放大;7)不受胚蛋供应的影响。

发明内容

[0004] 为此,本发明提供了一种利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法。该方法克服传统工艺生产禽流感疫苗,生产周期长、批间差异大、内毒素含量高、受胚蛋供应的影响,也克服片状载体难于放大的影响。制备的禽流感病毒疫苗产品批间差异小,无细菌污染,产品内毒素含量低,产品甲醛含量也低,质量稳定,生产周期短,易于放大。

[0005] 本发明的技术方案如下:利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法,包括如下具体步骤

[0006] 1:选择导入载体所需要的种细胞 MDCK 或者 Vero;

[0007] 2:转瓶繁殖细胞传代的方法:首先复苏步骤1所选择的种细胞到 T225 的细胞瓶中,生长 48h 左右,按照 1:4 的比例进行传代;然后把 4 个长满细胞的 T225 细胞瓶中的细胞传到 1 个 15L 转瓶进行培养;48 小时左右按照 1:4 或 1:3 的比例进行细胞传代培养;

[0008] 3:收获转瓶中的细胞:将步骤 2 所得细胞用 PBS 洗涤 2-3 次,然后加入胰酶-EDTA 溶液消化;15L 转瓶加入 100-150ml 胰酶-EDTA 溶液,其它类型的转瓶按照类似比例添加胰酶-EDTA 溶液消化,然后收集细胞;

[0009] 4:收获的细胞计数后,按照每个微载体添加 5-20 个细胞的比例进行细胞接种;每升培养基中加入 2-10 克微载体;

[0010] 5:生物反应器培养接种细胞;

[0011] 生物反应器培养细胞的培养基为 MEM (Hyclone);血清使用浓度为 7-10%;CO₂ 通气量为 5-10%;溶氧量为 40-60% 的溶液饱和溶氧量;温度为 37℃;搅拌速度为 30-55 转/分,

pH 为 6.8-7.4 ;90-95% 以上的微载体在细胞接种后 48-72h 期间能够达到接种禽流感病毒的要求 ;

[0012] 6 :步骤 5 培养的细胞达到接种禽流感病毒的要求后,接种禽流感病毒,方法如下 :

[0013] 6.1) 清洗微载体 :先沉淀长满细胞的微载体,然后用 PBS 清洗清洗微载体 ;

[0014] 6.2) 病毒接种 :然后加入禽流感病毒 -MEM 溶液进行病毒接种,病毒接种过程中培养基的体积为生物反应器工作的体积 1/4-1,病毒接种剂量为 0.00001-1.0MI0,接种过程中不加血清 ;

[0015] 6.3) 孵育禽流感病毒与细胞 :禽流感病毒接种后,向生物反应器中补足生物反应器正常工作所需要的培养基,在禽流感病毒与细胞孵育的过程中,轻轻搅拌微载体使细胞与禽流感病毒充分接触,搅拌速度为 30-45 转 / 分,禽流感病毒与细胞孵育时间为 0.5-10 小时 ;

[0016] 7 :禽流感病毒繁殖病毒繁殖培养基为 MEM (Hyclone) ;CO₂ 通气量为 5-10% ;溶氧量为 40-60% 的溶液饱和溶氧量 ;温度为 37℃ ;搅拌速度为 30-45 转 / 分,pH 为 6.5-7.2 ;病毒繁殖的时间为 24-72h ;

[0017] 8 :离心收集步骤 7 所得禽流感病毒液,离心速度为 3000-4500 转 / 分,离心时间为 20-30 分钟 ;

[0018] 9: 灭活步骤 8 所得禽流感病毒液中的禽流感病毒

[0019] 使用甲醛灭活禽流感病毒,加入的甲醛终浓度为 0.01%-0.2%,灭活的时间为 24 小时,灭活的温度为 15-37℃ ;在灭活的过程中进行搅拌使甲醛与病毒混匀 ;

[0020] 10 :然后按照常规方法制备禽流感细胞苗,即按照油相 :水相为 2 :1 的体积比例制备疫苗,先把油相进行灭菌处理,然后把步骤 9 所得完全灭活的禽流感病毒液慢慢倒入搅拌中的油相,乳化制得疫苗 ;

[0021] 11 :禽流感细胞苗免疫 21 日龄的 SPF 鸡,免疫剂量为 0.3ml,免疫后 14 天、21 天分别采血进行测定血清中抗禽流感特异性抗体的滴度(HI)。

[0022] 较佳地,步骤 6.3 中,禽流感病毒与细胞孵育时间不低于 1 个小时 ;

[0023] 较佳地,步骤 7 中,病毒繁殖过程中,当病毒繁殖培养基 pH 低于 6.5 或者禽流感病毒 HA 价高于 9.0,就更换部分溶液。

[0024] 所述微载体为 Cytodex I 或 hyclone。

[0025] 本发明的有益效果为 :本发明所述利用球形微载体生物反应器培养细胞生产禽流感疫苗的方法,禽流感病毒滴度(HA) 不低于 9.0,比传统细胞繁殖禽流感病毒的方法,禽流感病毒滴度(HA) 提高了不低于 2 倍 ;与传统鸡胚生产禽流感疫苗相比,生产周期缩短一半以上,是一个值得推广应用的方法。

具体实施方式

[0026] 实施例 1 :微载体生物反应器悬浮培养繁殖 H5 亚型禽流感灭活疫苗

[0027] 1 :选择导入载体所需要的种细胞 MDCK ;

[0028] 2 :转瓶繁殖细胞传代的方法 :首先复苏步骤 1 所选择的种细胞 MDCK 到 T225 的细胞瓶中,生长 48h 左右,按照 1 :4 的比例进行传代 ;然后把 4 个长满细胞的 T225 细胞瓶中的细胞传到 1 个 15L 转瓶进行培养 ;48 小时左右按照 1 :3 的比例进行细胞传代培养 ;该过程

中使用的培养基为 MEM,血清为胎牛血清,使用量为 7% ;

[0029] 3:收获转瓶中的细胞:将步骤 2 所得细胞用 PBS 洗涤 2-3 次,然后加入浓度为 0.25% 胰酶-EDTA 溶液 125ml 消化,收集细胞;

[0030] 4:收获的细胞计数后,选用的微载体为 Cytodex 1,按照每个微载体添加 5-20 个细胞的比例进行细胞接种;每升培养基中加入 4 克微载体;

[0031] 5:生物反应器培养细胞的条件为:

[0032] 选用 7.5L 的 NBS 生物反应器,其工作体积为 5L,培养细胞的培养基为 MEM (Hyclone);血清使用浓度为 10%;CO₂ 通气量为 10%;溶氧量为 40% 的溶液饱和溶氧量;温度为 37℃;搅拌速度为 40 转/分,pH 为 6.8;细胞培养时间为 64h,90% 以上的微载体上面长满了细胞就可以接种病毒了;

[0033] 6:步骤 5 培养的细胞达到接种禽流感病毒的要求后,接种禽流感病毒,方法如下:

[0034] 6.1) 清洗微载体:先沉淀长满细胞的微载体,然后用 PBS 清洗清洗微载体;

[0035] 6.2) 病毒接种:然后加入禽流感病毒-MEM 溶液进行病毒接种,病毒接种过程中培养基的体积为生物反应器工作的体积 1/4-1,病毒接种剂量为 0.01MIO,接种过程中不加血清;

[0036] 6.3) 孵育禽流感病毒与细胞:禽流感病毒接种后,向生物反应器中补足生物反应器正常工作所需要的培养基,在禽流感病毒与细胞孵育的过程中,轻轻搅拌微载体使细胞与禽流感病毒充分接触,搅拌速度为 40 转/分,禽流感病毒与细胞孵育时间为 2 小时;

[0037] 7:禽流感病毒繁殖病毒繁殖培养基为 MEM (Hyclone);CO₂ 通气量为 10%;溶氧量为 60% 的溶液饱和溶氧量;温度为 37℃;搅拌速度为 45 转/分,pH 为 7.2;病毒繁殖的时间为 56h;

[0038] 8:离心收集步骤 7 所得禽流感病毒液,离心速度为 3000 转/分,离心时间为 30 分钟;其禽流感病毒液收获量为 12L,HA 价大于 9.0;

[0039] 9:灭活步骤 8 所得禽流感病毒液中的禽流感病毒

[0040] 使用甲醛灭活禽流感病毒,加入的甲醛终浓度为 0.01%,灭活的时间为 24 小时,灭活的温度为 37℃;在灭活的过程中进行搅拌使甲醛与病毒混匀;

[0041] 10:然后按照常规方法制备禽流感细胞苗,即按照油相:水相为 2:1 的体积比例制备疫苗,先把油相进行灭菌处理,然后把步骤 9 所得完全灭活的禽流感病毒液慢慢倒入搅拌中的油相,乳化制得疫苗;

[0042] 11:禽流感细胞苗免疫 21 日龄的 SPF 鸡,免疫剂量为 0.3ml,免疫后 14 天、21 天分别采血进行测定血清中抗禽流感特异性抗体的滴度(HI)。其结果(如表 1)表明,14 天平均抗体浓度大于 5.0,21 天平均抗体滴度(HI)大于 7.5,28 天平均抗体滴度(HI)大于 8.0。

[0043] 表 1:SPF 鸡接种 H5 亚型禽流感细胞灭活疫苗的抗体变化情况

[0044]

鸡的种类	数量	免疫剂量	抗体水平 (HI)		
			14 天	21 天	28 天
SPF 鸡	10	0.3ml	5.5	7.5	8.0

[0045]	SPF 鸡	10	0.3ml	5.2	7.6	8.2
	SPF	10	0 ml	0	1	0

[0046] 实施例 2 :微载体悬浮培养繁殖 H9 亚型禽流感病毒

[0047] 1 :选择导入载体所需要的种细胞 MDCK ;

[0048] 2 :转瓶繁殖细胞传代的方法 :首先复苏步骤 1 所选择的种细胞 MDCK 到 T225 的细胞瓶中,生长 48h 左右,按照 1 :4 的比例进行传代 ;然后把 4 个长满细胞的 T225 细胞瓶中的细胞传到 1 个 15L 转瓶进行培养 ;48 小时左右按照 1 :4 的比例进行细胞传代培养 ;该过程中使用的培养基为 MEM,血清为胎牛血清,使用量为 7-10% ;

[0049] 3 :收获转瓶中的细胞 :将步骤 2 所得细胞用 PBS 洗涤 2-3 次,然后加入浓度为 0.25% 胰酶 -EDTA 溶液 125ml 消化,收集细胞 ;

[0050] 4 :收获的细胞计数后,选用的微载体为 hyclone,按照每个微载体添加 5-20 个细胞的比例进行细胞接种 ;每升培养基中加入 4 克微载体 ;

[0051] 5 :生物反应器培养细胞的条件为 :

[0052] 选用 7.5L 的 NBS 生物反应器,其工作体积为 5L,培养细胞的培养基为 MEM (Hyclone);血清使用浓度为 7% ;CO₂ 通气量为 5% ;溶氧量为 60% 的溶液饱和溶氧量 ;温度为 37℃ ;搅拌速度为 40 转 / 分,pH 为 7.4 ;培养时间为 70h ;

[0053] 6 :步骤 5 培养的细胞达到接种禽流感病毒的要求后,接种禽流感病毒,方法如下 :

[0054] 6.1) 清洗微载体 :先沉淀长满细胞的微载体,然后用 PBS 清洗清洗微载体 ;

[0055] 6.2) 病毒接种 :然后加入禽流感病毒 -MEM 溶液进行病毒接种,病毒接种过程中培养基的体积为生物反应器工作的体积 1/4-1,病毒接种剂量为 0.001MIO,接种过程中不加血清 ;

[0056] 6.3) 孵育禽流感病毒与细胞 :禽流感病毒接种后,向生物反应器中补足生物反应器正常工作所需要的培养基,在禽流感病毒与细胞孵育的过程中,轻轻搅拌微载体使细胞与禽流感病毒充分接触,搅拌速度为 40 转 / 分,禽流感病毒与细胞孵育时间为 2 小时 ;

[0057] 7 :禽流感病毒繁殖病毒繁殖培养基为 MEM (Hyclone);CO₂ 通气量为 5% ;溶氧量为 40% 的溶液饱和溶氧量 ;温度为 37℃ ;搅拌速度为 30 转 / 分,pH 为 6.5 ;病毒繁殖的时间为 56h ;

[0058] 8 :离心收集步骤 7 所得禽流感病毒液,离心速度为 3000 转 / 分,离心时间为 30 分钟 ;其禽流感病毒液收获量为 15L,HA 价大于 9.0 ;

[0059] 9: 灭活步骤 8 所得禽流感病毒液中的禽流感病毒

[0060] 使用甲醛灭活禽流感病毒,加入的甲醛终浓度为 0.01%,灭活的时间为 24 小时,灭活的温度为 37℃ ;在灭活的过程中进行搅拌使甲醛与病毒混匀 ;

[0061] 10 :然后按照常规方法制备禽流感细胞苗,即按照油相 :水相为 2 :1 的体积比例制备疫苗,先把油相进行灭菌处理,然后把步骤 9 所得完全灭活的禽流感病毒液慢慢倒入搅拌中的油相,乳化制得疫苗 ;

[0062] 11 :禽流感细胞苗免疫 21 日龄的 SPF 鸡,免疫剂量为 0.3ml,免疫后 14 天、21 天,28 天分别采血进行测定血清中抗禽流感特异性抗体的滴度(HI)。其结果(如表 2)表明,14

天平均抗体浓度大于 5.0, 21 天平均抗体滴度(HI) 大于 7.3, 28 天平均抗体滴度(HI) 大于 8.5

[0063] 表 2 :SPF 鸡接种 H9 亚型禽流感细胞灭活疫苗的抗体变化情况

[0064]	鸡的种类	数量	免疫剂量	抗体水平 (HI)		
				14 天	21 天	28 天
	SPF 鸡	10	0.3ml	4.9	7.3	8.5
	SPF 鸡	10	0.3ml	5.1	7.4	8.6
[0065]	SPF	10	0 ml	0	1	0

[0066] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,其架构形式能够灵活多变,可以派生系列产品。只是做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明由所提交的权利要求书确定的专利保护范围。