

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.08

基于 MDCK 悬浮细胞生产禽流感疫苗的放大工艺开发

代俊, 刘旭平, 周燕

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

[收稿日期] 2017-02-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0046-06 [中图分类号] S852.5

[摘要] 为放大流感疫苗生产工艺至 1500 L 反应器规模, 通过冷模实验研究了不同体积反应器条件下的混合时间、流体剪切力、体积氧传递系数和二氧化碳传递系数的区别。在 1500 L 反应器中进行培养时, 转速为 60 r/min, 深层通气速率控制在 22.5 L/min 能够较好的满足供氧需求和提高 CO₂ 的移除效果, 同时也避免了剪切力对细胞的损伤。在 1500 L 反应器中病毒感染细胞 60 h 后, 病毒滴度为 2¹¹ HA units/25 μL, 单位细胞病毒产量 (Svy) 为 13145.05 virions/cell, 2 L 反应器的 Svy 为 13298.70 virions/cell, 两者仅相差 1.16%。

[关键词] 流感疫苗; MDCK 细胞; 生物反应器; 冷模实验; 放大

Development of Scale up for the Production of Influenza Vaccine Based on MDCK Suspension Cells

DAI Wei-jun, LIU Xu-ping, ZHOU Yan

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Corresponding author: LIU Xuping, E-mail: xupingliu@ecust.edu.cn

Abstract: In order to scale up the flu vaccine production to 1500 L animal cell culture bioreactor, cold form experiment was carried out in 1500 L bioreactor, including mixing time, liquid shear force, volumetric oxygen transfer coefficient and volumetric carbon dioxide transfer coefficient. When cultured in a 1500 L bioreactor, agitation speed and aeration rate was 60 r/min, and 22.5 L/min, respectively, which could meet the oxygen requirement, improve the effect of CO₂ remove and reduce the shear force on cells. Virus-infected cells after 60 h in a 1500 L bioreactor, the virus titer was 2¹¹ HA units/25 μL, the specific virus yield (Svy) was 13298.70 virions/cell, which is the difference of 1.16% in 2 L bioreactor.

Key words: influenza vaccine; MDCK cell; bioreactor; cold form experiment; scale up

传统的流感疫苗是基于鸡胚工艺生产, 然而由于其成本高、产量有限、生产周期长等缺点, 已慢慢被淘汰^[1]。近年来, 基于动物细胞培养的生产工艺

已经可以取代鸡胚培养工艺, 并逐渐成为生产流感疫苗最主要的主流技术。一些欧美国家, 已经批准基于动物细胞培养生产的流感疫苗上市^[2-4]。

作者简介: 代俊, 硕士研究生, 从事动物细胞的培养研究。

通讯作者: 刘旭平。E-mail: xupingliu@ecust.edu.cn

MDCK细胞最适于生产甲型流感病毒和乙型流感病毒的三种细胞之一^[5-6],可以生产安全有效的人用和兽用疫苗,具有很高的产毒能力。而随着病毒类疫苗的市场需求量的不断扩大,产能不足使得动物细胞大规模高密度培养显得更为重要。在摇瓶到大型生物反应器的放大过程中,混合和气液传质是最关键的问题。与微生物发酵不同,动物细胞培养既涉及 O_2 的供应速率,又涉及过量 CO_2 积累后的移除速率。 O_2 和 CO_2 传递表现出不同的特征,但两者又都受搅拌转速、深层通气速率、温度、装液量、气泡直径的影响,且在不同尺寸反应器内表现出不同的特征。因此,有必要对其进行详细的研究,通过揭示两者的气液传质规律,指导生物反应器内氧供应和二氧化碳移除策略及生物反应器的放大。

本文通过冷模实验对反应器内部流体混合、流体剪切和气液传质特性进行考察,在此基础上选取关键放大参数,将 2 L 反应器细胞培养和接毒工艺放大至 1500 L 规模,并将两者最后的血凝值(HA)和单细胞病毒产量 S_{vy} 相比较,为流感疫苗工艺放大提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 细胞株、培养基和病毒株 实验所用细胞株为本实验室对贴壁型 MDCK 细胞进行驯化得到的悬浮型 MDCK 细胞株。培养基为 Driving-M MDCK 细胞无血清培养基,购自上海倍谱基生物科技有限公司。病毒株为 H9 亚型禽流感病毒株,由肇庆大华农生物药品有限公司提供,实验环境为 P2 实验室。

1.2 冷模实验材料 1 mol/L NaOH 溶液、1 mol/L HCl 溶液。测试培养基:LB 培养基。

1.3 冷模实验测定方法

1.3.1 混合时间测定方法 反应器内混合特性常用混合时间 t_{mix} 表征,即反应器内流体混合均匀性达到 95% 所需的时间^[7]。将 LB 培养基加入到反应器内,控制一定条件。在反应器的顶部和底部对角位置分别装上一个 pH 电极,稳定时记录初始值 pH_i 。

本实验从反应器的上端(远离 pH 电极)迅速加入 V_0 体积的示踪剂(1 mol/L NaOH, $V_0 < 0.5\% V$),

分别记录反应器上下 pH 随时间的变化。pH 电极记录下的原始数据用公式(1)进行归一化处理,其中 $H(t)$ 为标准化 pH, $pH(t)$ 为实时 pH, pH_i 为初始 pH 值, pH_f 为最终 pH。当反应器内的流体完全混合均匀,则稳定后的 $H(t)$ 值为 1.0。实际上,当 $H(t) = 1.0 \pm 0.5$ 时,即可认为混合均一。

$$H(t) = \left| \frac{pH(t) - pH_i}{pH_f - pH_i} \right| \quad (1)$$

t_1 、 t_2 分别表示上下两个电极测得混合均匀度达 95% 时所需的时间,混合时间 t_{mix} 可表示

$$t_{mix} = (t_1 + t_2) / 2 \quad (2)$$

在反应器内加入等量 1 mol HCl,调整测试培养至初始状态;重复实验。

按照上述方法,分别测定不同操作条件下的 t_{mix} 。

1.3.2 体积氧传质系数($k_L a$)的测定^[7-8] 校正溶氧电极。将测试培养基加入到反应器内,设置一定操作参数。底层通氮气,排净培养基中的氧气(实际只需 $DO < 10\%$ 即可)。转换到深层通气为空气,记录不同时刻的 DO,直至 $DO > 60\%$ 后结束实验,绘制 $DO-t$ ($10\% \leq DO \leq 60\%$) 曲线。通过以下公式计算气液传质系数 $k_L a$:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (3)$$

积分,得

$$\ln \frac{(C^* - C_0)}{(C^* - C_t)} = k_L a t \quad (4)$$

其中, C_0 为初始氧浓度, C_t 为 t 时刻的氧浓度, C^* 为饱和氧浓度。

利用对 t 做曲线,斜率即为 $k_L a$ 。

1.3.3 剪切力,涡流尺寸,叶端速率的计算 剪切力和涡流尺寸的计算公式如下^[9]:

$$\varepsilon = \frac{N_p N^3 D^5}{V}, \varepsilon_i = N_p N^3 D^2 \quad (5)$$

$$\tau^k = \rho_L (\varepsilon v)^{1/2}, \tau_i^k = \rho_L (\varepsilon_i v)^{1/2} \quad (6)$$

$$\eta = (v^3 / \varepsilon)^{1/4}, \eta_i = (v^3 / \varepsilon_i)^{1/4} \quad (7)$$

当 $V = D^3$ 时, ε_i 、 τ_i^k 和 η_i 分别为局部能量耗散率、局部剪切力和局部湍流尺寸。式中, ε 为单位体积内的能量耗散率 (W/kg), V 为反应器中的液

体体积(m^3), ρ_L 为液体密度(kg/m^3), N_p 为功率准数, N 为转速(s^{-1}), D 为搅拌桨直径(m), ν 为流体的运动粘度(m^2/s)。

$$U_T = \pi N D \quad (8)$$

其中, U_T 为叶端速率, N 为转速。

1.3.4 CO_2 传质系数的测定^[7-8] 先通 CO_2 至反应器内 $pCO_2 > 150$ mmHg。改通空气并开始计时。记录 pCO_2 随时间的变化曲线。直到 $pCO_2 < 100$ mmHg 停止实验。

CO_2 气液传质系数的计算方法与 O_2 相似, 公式为:

$$-\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (9)$$

其中, C^* 为饱和二氧化碳浓度。

1.4 细胞培养

1.4.1 种子细胞复苏 取出液氮罐中冻存的悬浮 MDCK 种子细胞, 置于 $37^\circ C$ 水浴槽中快速孵化, 离心弃上清, 使用新鲜无血清培养进行细胞重悬, 以 $0.8 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ cells/mL 的密度在 125 mL 的摇瓶内复苏。每隔 48 h, 使用新鲜培养基以 1:3~1:4 (V/V) 比例进行稀释传代。

1.4.2 2 L 反应器种子培养 取对数生长期的全悬浮 MDCK 细胞, 以 2.0×10^6 cells/mL 的活细胞密度接种至反应器, 培养体积为 2 L。反应器操作如下, pH 为 7.0, DO 为 40% 空气饱和度, 温度为 $37^\circ C$, 搅拌转速为 120 r/min。当密度达到 8.0×10^6 cells/mL 时, 种子细胞悬液以 1:3~1:4 (V/V) 比例稀释, 放大到下一级种子细胞反应器中。30 L 反应器种子由 2 L 反应器提供, 200 L 反应器由 30 L 反应器提供, 500 L 反应器种子由 200 L 反应器提供, 1500 L 反应器种子由 500 L 反应器提供。

1.4.3 反应器接毒培养 当细胞培养至 $9.0 \times 10^6 \sim 10.0 \times 10^6$ cells/mL 时, 添加新鲜的 Driving-M MDCK 细胞无血清培养基, 使细胞密度维持在 6.0×10^6 cells/mL, 并且按照 $MOI = 0.001$ 接入病毒种子液进行培养。TPCK-胰酶终浓度为 $5 \mu g/mL$ 。同时, 反应器的参数也进行变化, 温度为 $34^\circ C$, pH 为 7.2 ± 0.2 。培养过程中, 每隔 24 h 取样计数, 培养悬液经 10000 r/min 离心 5 min 后取上清于 $-20^\circ C$ 保

存, 用于病毒滴度检测。

1.5 病毒滴度测定 测定流感病毒血凝滴度 (HA 滴度) 所用血凝板是“U”形底 96 微孔反应板自左至右各孔以微量移液器加入 25 μL 生理盐水; 于左侧第 1 孔加 25 μL 病毒样品, 混匀后吸 25 μL 至第 2 孔, 依次 2 倍比系列稀释至第 11 孔, 吸弃 25 μL , 第 12 孔为无病毒阴性对照; 自右至左 (防止窜孔) 依次向各孔加入 1.0% (V/V) 鸡红细胞悬液 (约 5×10^7 cells/mL) 25 μL , 振荡混匀, 室温静置 30 min 左右后观察结果。

1.6 单位细胞产毒量的计算 单位细胞的产毒量 (S_{vy}) 表征单个细胞的产毒能力^[10], 通过以下公式计算:

$$S_{vy} = \frac{RBC \times HA}{X_v} \quad (10)$$

其中, RBC 是鸡红细胞的密度 (RBC/mL), HA 是病毒的血凝值 (HA units/25 μL), X_v 是活细胞密度 (10^6 cells/mL)。

2 结果与分析

2.1 生物反应器中流体的混合时间 $26.7^\circ C$ 50 r/min 条件下 1500 L 反应器的混合时间如图 1 所示。从中可以看出当碱加入反应器时, 顶部的 pH 会有一个突跃, 随后下降, 而底部的 pH 反应较慢但一直持续上升, 直至达到均匀。顶部与底部的混合时间差异明显, 顶部的混合时间为 32 s, 底部的为 63 s。

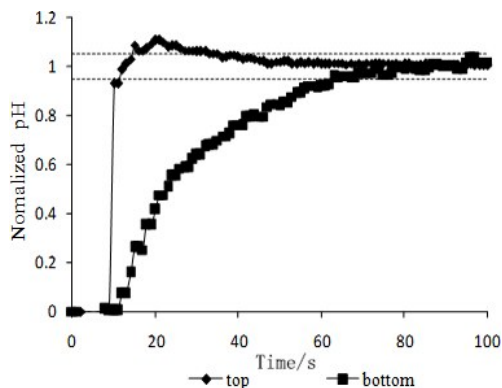


图 1 1500 L 反应器中混合时间测定曲线

Fig 1 Representative normalized pH(H) response curves from the top and bottom probes in 1500 L bioreactor during the mixing time experiment

根据式(2)可知,在该条件下混合时间为47.5 s。同理测定了不同转速下的混合时间,其结果如下表1,可以发现顶部的混合时间都小于底部的混合时间随着搅拌转速的提高,单体体积输入功率(P/V)增加,加速流体的混合,混合时间变短。

表 1 不同搅拌转速下顶部和底部混合时间差异
Tab 1 Difference of top and bottom mixing time under different agitation speed

$N/(r \cdot \min^{-1})$	t_1/s	t_2/s	t_{mix}/s
20	98	193	145.5
40	40	146	110.5
50	32	63	47.5
70	7	44	25.5

t_1 、 t_2 分别表示上下两个电极测得混合均匀度达 95% 时所需的时间,混合时间 $t_{\text{mix}} = (t_1 + t_2) / 2$

2.2 生物反应器的流体剪切 随着搅拌转速的提高,反应器内流体剪切力 τ^k 增加, η 涡流尺寸减小。研究报道,剪切力大于 1 N/m^2 就会对细胞造成损伤,而湍流尺寸接近或者小于细胞直径时,将会对细胞产生损伤^[11]。因此,通过提高搅拌转速对混合效果进行改善,还要考虑流体剪切力和涡流尺寸分布。

通过计算,得到200 L、500 L和1500 L反应器内局部剪切力和湍流尺寸的分布如图2所示。随着搅拌转速的提高,流体局部剪切力增大。当500 L和1500 L反应器的搅拌转速为100 r/min 时,流体

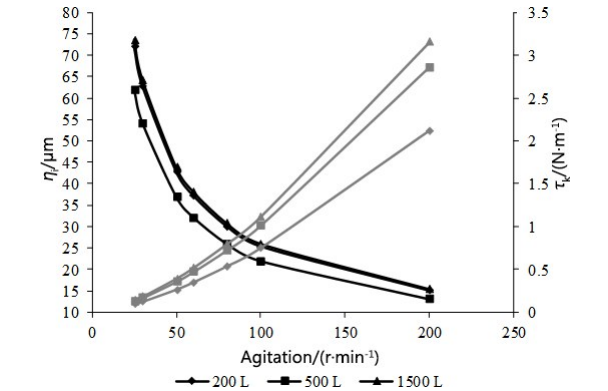


图 2 搅拌转速对局部Kolmogorov剪切力和涡旋尺度的影响
Fig 2 Influence of agitation speed on Kolmogorov shear stress and eddy size

局部剪切力已经大于 1 N/m^2 ,继续提高搅拌转速可能对细胞造成损伤。而200 L反应器100 r/min条件下剪切力仍在细胞可承受的范围内,为 0.749 N/m^2 。哺乳动物细胞直径一般在 $10 \sim 20 \text{ }\mu\text{m}$,当湍流尺寸接近 $20 \text{ }\mu\text{m}$ 时就有可能对细胞造成损伤^[11]。本实验中200 L、500 L和1500 L反应器在搅拌转速为150 r/min 时局部湍流尺寸均已小于 $20 \text{ }\mu\text{m}$,因此,实际操作时搅拌转速不应超过150 r/min。

此外,搅拌桨叶端速率对细胞的损伤作用也不可忽视。动物细胞能耐受的叶端速率一般不大于 2 m/s ^[12]。由图3可知,2 L和30 L反应器内搅拌转速达到200 r/min 时, U_T 均未超过细胞的耐受极限。但是200 L、500 L和1500 L反应器内搅拌转速分别在130 r/min、100 r/min 和70 r/min 时, U_T 已经接近 2 m/s 。这些搅拌转速可以作为反应器操作过程中设定的极限值,所以1500 L生物反应器内最大搅拌转速不能超过70 r/min。

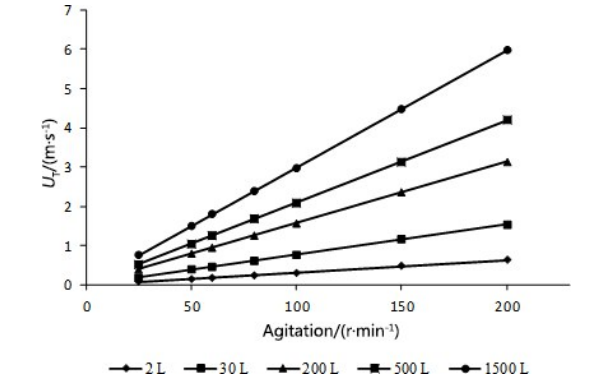


图 3 搅拌转速对搅拌桨叶端速率的影响
Fig 3 Influence of agitation speed on impeller tip speed

2.3 深层通气和搅拌转速对体积氧传质速率的影响 从图4看出,随着深层通气的增加, k_La 大致呈现下降趋势。这是由于实验所用的 microsparger,通气量较大时,气泡发生聚并,反而减小了气泡的表面积,从而使得 k_La 减小。所以在选用 microsparger 作为鼓泡环的时候要选择合适的通气量。同时,随着搅拌转速的提高,传质系数不断增大。这主要是因为:①搅拌转速的提高加强了流体湍流特性,使液膜厚度变薄,从而减小了传质阻力,强化了传质;

②对于深层通气而言,搅拌转速的提高还会延长气泡在反应器内的停留时间,从而增大了气液接触面积,起到了提高传质系数的作用。

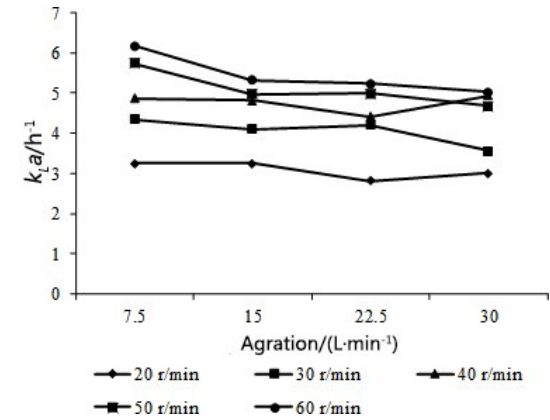


图 4 深层通气速率和搅拌转速对 k_La 的影响

Fig 4 Influence of aeration rate and agitation speed on k_La

2.4 小泡在大型反应器对气液传质的影响 在 1500 L 生物反应器中固定搅拌转速为 60 r/min,用 microsparger 进行深层通空气,研究深层通气速率对 CO₂ 的移除速率的影响,结果见图 5。可以看出,通气速率从 7.5 L/min 增加到 22.5 L/min, pCO_2 的移除速率随着增加,但是到 30 L/min 时 pCO_2 移除速率反而降低。在 20~60 r/min 都出现这种现象。这是因为:①通气量增大,气泡在 microsparger 开孔处产生聚并现象导致速率的下降;②在 1500 L 反应器中液面高度接近 2 m,从 microsparger 出来的气泡较小,在上升过程发生溶解导致速率的变慢。

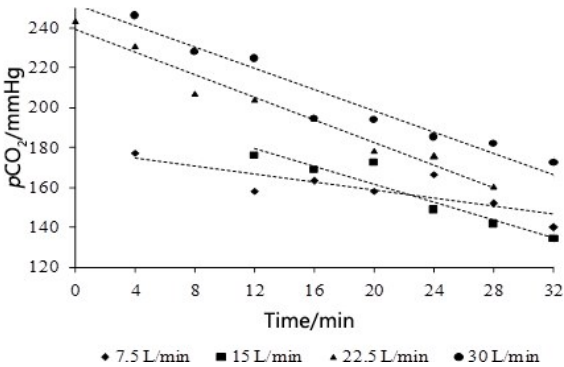


图 5 深层通气对二氧化碳移除速率的影响

Fig 5 Influence of aeration rate on CO₂ remove rate

通过式(9) 计算得到了不同搅拌转速、不同深层通气量条件下 $k_La_{CO_2}$,如图 6 所示。结果表明,深层通气对改善二氧化碳的移除效果不明显,当转速为 30 r/min 和通气速率为 15 L/min 时, $k_La_{CO_2}$ 最大为 1.3 h⁻¹。所以在用 microsparger 作为鼓泡环时并不是搅拌转速越大通气速率越快,二氧化碳的移除效果越好。

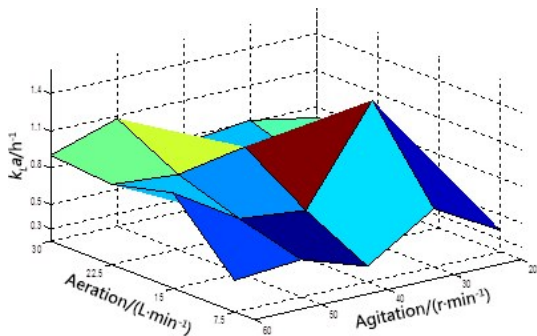


图 6 搅拌转速通气速率对 CO₂ 移除速率的影响

Fig 6 Influence of agitation speed and aeration speed on CO₂ remove rate

2.5 反应器病毒增值结果 根据上述研究结果,在 1500 L 反应器中进行培养时,转速为 60 r/min,深层通气速率控制在 22.5 L/min,能够较好的满足供氧需求和提高 CO₂ 的移除效果,同时也降低了剪切力对细胞的损伤。

病毒感染细胞 24 h、48 h 和 60 h 后,病毒滴度分别为 2⁹、2¹¹和 2¹¹ HA units/25 μL;单位细胞的病毒产率 S_{vy} 为 13298.70 virions/cell,与 2 L 反应器单位细胞病毒产率仅相差 1.16% (图 7)。因此,可以认为 2 L 反应器接毒结果顺利放大到 1500 L 反应器,工艺从 2 L 实验室规模成功放大到 1500 L 规模。

3 结 论

混合与传质是细胞培养过程中的两大问题,是细胞培养过程中重要的环节,反应器的混合传质的效果直接影响细胞培养过程。本文通过冷模实验对 1500 L 反应器的混合和传质进行了测定,结果表明大罐中存在混合不均一现象,提高转速能加快液体的混合;随着反应器规模的增大,流体剪切力

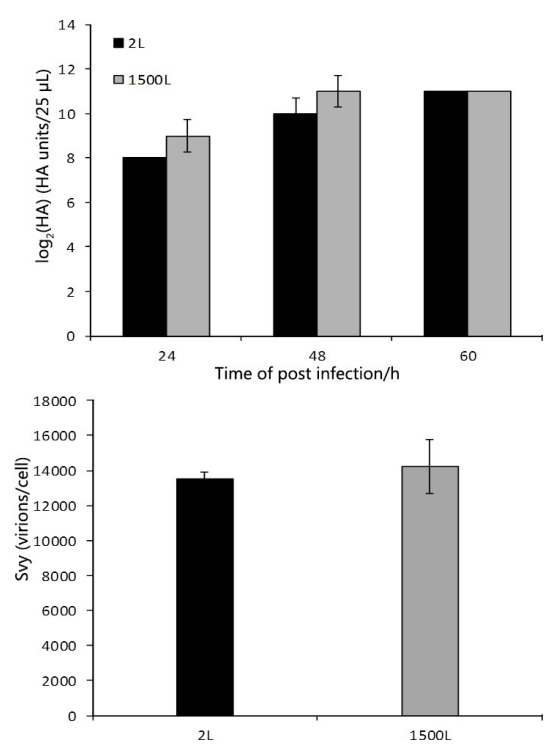


图 7 2 L 和 1500 L 反应器流感病毒增殖结果

Fig 7 Influenza virus production between 2 L and 1500 L bioreactor

和叶端速度也随之增大,所以在细胞培养过程中要选择合适的搅拌转速;由于鼓泡环为 microsparger, 体积氧传递系数 k_La 在一定范围内随着深层通气速率的提高而增加,当深层通气速率较大时, k_La 减小。同时,随着搅拌转速的提高,传质系数不断增大;深层通气速率和 CO_2 移除速率的关系并不呈线性关系,在实际生产中需要具体考察,选取合理的深层通气速率,满足 CO_2 移除要求。1500 L 反应器最终 HA 为 2^{11} HA units/25 μL ,单位细胞的病毒产量为 13298.70 virions/cell,与 2 L 反应器单位细胞病毒产率仅相差 1.16%,基本重现 2 L 反应器接毒结果。

参考文献:

[1] Shaozhen Feng, Peirong Jiao, Webao Qi, *et al.* Development and strategies of cell - culture technology for influenza vaccine [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89: 893-902.

[2] Youil R, Su Q, Toner T J, *et al.* Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines [J]. Journal of Virological Methods, 2004, 120(1): 23-31.

[3] Doroshenko A, Halperin S A. Trivalent MDCK cell culture - derived influenza vaccine Optaflu® (Novartis Vaccines) [J]. Expert Review of Vaccines, 2014, 8(6): 679-688.

[4] Hu A Y C, Tseng Y F, Weng T C, *et al.* Production of inactivated influenza H5N1 vaccines from MDCK cells in serum-free medium [J]. Plos one, 2011, 6(1): e14578.

[5] Madin S H, Darby Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1958, 98(3): 574-576.

[6] Rindler M J, Chuman L M, Shaffer L, *et al.* Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK) [J]. Journal of Cell Biology, 1979, 81: 635-648.

[7] Xing Z, Kenty B M, Li Z J, *et al.* Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large - scale bioreactors [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 103(4): 733-746.

[8] Mostafa S S, Gu X. Strategies for improved dCO_2 removal in large-scale fed-batch cultures [J]. Biotechnol Prog, 2003, 79: 45-51.

[9] Chisti Y. Animal cell culture in stirred bioreactors: Observations on scale-up [J]. Bioprocess Engineering, 1993, 9: 191-196.

[10] Bock A, Schulze - Horsel J, Schwarzer J, *et al.* High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production [J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(1): 241-250.

[11] 谭文松, 戴干策. 生物反应器中杂交瘤细胞的物理破损 [J]. 华东理工大学学报, 1996(3): 276-282.

Tan W S, Dai G C. Physical damage of hybridoma cells in bioreactor [J]. Journal of East China University of Science and Technology, 1996, (3): 276-282.

[12] Chalmers J. Animal cell culture, effects of agitation and aeration on cell adaptation [J]. Encyclopedia of Cell Technology, 2000, 1: 41-51.

(编 辑:李文平)