

計畫編號：DOH95-DC-1408

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

以無血清微載體細胞培養量產新型流行性感冒疫苗

研 究 報 告

執行機構：財團法人國家衛生研究院

計畫主持人：李敏西

研究人員：吳夙欽 胡勇誌 曾郁霽 翁彩娟 陳玉暄 吳佳翰 趙欣如

周愛湘 陳豪勇 莊再成

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目錄

1、封面

2、目錄

3、摘要

4、本文

(1)、前言

(2)、材料與方法

(3)、結果

(4)、討論

(5)、結論與建議

(6)、重要研究成果及具體建議

(7)、參考文獻

(8)、圖表

中文摘要

本計畫研究目的在建立微載體與生物反應器之細胞高密度懸浮培養技術，以應用於新型流感疫苗之生產。本中心自食工所取得MDCK細胞，此細胞在含血清的培養下其細胞數分別為 10^7 cells/T75及 10^8 cells/roller bottle，已在MDCK細胞比較六種無血清培養(Plus MDCK, PAA, VP-SFM, ExCELL, OptiPro, PFM)，其中以Plus MDCK和OptiPro生長情形較好。使用含血清的培養基及無血清培養基OptiPro，已完成Bioreactor 1 L試產，無血清培養基Plus MDCK正試產中。試產之疫苗原液已完成純化及不活化，正以SRD進行HA抗原量檢測，將於十一月中旬完成後，進行小鼠致免疫力試驗，預計於十二月中旬完成抗體檢驗。

由 UK NIBSC 得到的疫苗種株(NIBRG-14)在胚胎蛋及 MDCK 細胞培養的效價為 $10^{7\sim8}$ TCID₅₀/ml，在 Vero 細胞的效價較低(約為 10^6 TCID₅₀/ml)，在 T25 培養瓶進行 Vero 細胞馴化，經過三次繼代培養及二次 plaque purification，已篩選出高成長病毒株，病毒效價可達 10^8 TCID₅₀/ml。以 NIBSC 的 NIBRG14 標準抗血清進行 HI test 確定其抗原性並無改變。分析其 HA 和 NA 蛋白質的序列，並將之和 A/Vietnam /1194/2004(H5N1)臨床分離株進行比對，在 HA 蛋白質胺基酸序列 323-328 的位置，Vero 馴化過的病毒具有 4 個刪除，代表仍維持減毒基因型。而 NA 蛋白質的部分沒有任何胺基酸序列的改變。其他 6 段序列正在進行核酸序列定序中。馴化過病毒將利用微載體進行試產。

Abstract

Egg-based technology has been used to manufacture seasonal influenza vaccines for decades, but it is labor-intensive and lacks of flexibility. Therefore, cell-based technology is becoming attractive for production of influenza vaccines, especially for pandemic influenza H5 vaccines which require a large supply in a short time. In addition, supply of chicken eggs may not be available during an influenza H5 pandemic which is highly pathogenic to chickens. Microcarrier and bioreactor technology have been widely used in cell culture systems. The present study was conducted to establish the microcarrier systems for cell-based production of influenza H5 vaccines. The H5 vaccine strain, NIBRG-14 was obtained from a WHO reference lab (NIBSC, UK), which is an attenuated reassortant virus containing 2 surface genes (modified HA & NA) from A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) and 6 internal genes from the egg-high growth A/PR/8/34 (H1N1). The NIBRG-14 can grow efficiently in eggs and MDCK cells. Therefore, we first used MDCK cells to grow NIBRG-14 in microcarrier and 100mL spinner flask, then scaled up to 1L in bioreactor. In the bioreactor, the virus titer can reach $10^{8\sim 9}$ TCID₅₀/ml. These materials have been purified and inactivated and will be used to immunize mice for evaluating immunogenicity as soon as the HA antigen content is measured. In addition to MDCK cells, Vero cells have also been used to grow the NIBRG-14. Since the NIBRG-14 can not efficiently grow in Vero cells, we first tried to adapt the NIBRG-14 in Vero cells. After several passage and plaque purifications, one virus clone was selected and can grow to the similar virus titer of MDCK-grown NIBRG-14 (10^8 TCID₅₀/ml).

本文

(1) 前言

大部分哺乳動物細胞為貼附依賴性細胞(anchorage-dependent cells)，需要附著在間質表面纔能生長。1967 年由 Van Wezel 首先開發微載體技術來培養附著性動物細胞的培養，初期的微載體採用 DEAE 交聯葡聚糖(dextran)當作材質，其後更有交聯葡聚糖偶合膠原(collagen)、明膠(gelatin)塗覆、纖維素(cellulose)、聚苯乙烯(polystyrene)、苯乙烯-二苯乙烯及玻璃材質等來製作。市售的微載體以瑞典 Pharmacia 生技公司生產之 Cytodex 系列，最為廣泛使用。最初開發的微載體因不具孔隙性，細胞僅能於表面上生長，微載體僅能提供局限的單位體積細胞生長空間。為了能提高培養時的細胞密度，於是進一步開發了多孔隙的微載體。由於其內部孔隙能提供更多細胞生長的空間，因此單位體積細胞生長密度也隨之增加。除此之外，在孔隙內生長的細胞，因為沒有直接接觸到外界流體的剪應力作用，細胞生長受到更好的保護。另一方面多孔隙的微載體亦可應用於培養親貼覆性(anchorage-preferring) 細胞：例如生產重組蛋白的 BHK 或 CHO 細胞，或是懸浮型細胞如生產單株抗體的融合瘤細胞。雖然這些細胞能貼覆或自由懸浮生長，但因多孔隙微載體內細胞生長的環境受外界流體的直接剪應力作用為少，同時在進行連續灌注培養時亦能當成有效的細胞滯留裝置，以提高細胞密度。因此應用微載體進行高密度灌注式細胞培養法，是一種有效縮小反應器所需體積的製程方法，同時也是一種十分符合經濟效應的生產方法。

建立微載體培養系統，首先的條件是細胞必須能成功的貼覆在微載體上，然後細胞才能繼續繁殖生長。就細胞貼覆階段而言，除了細胞數目與微載體的濃度外，不同材質微載體也會影響細胞貼覆的情況。以 Cytodex 1 來說，每個微載體僅需貼覆上 4-5 個 Vero 細胞就能在 20 升攪拌槽成功的繁殖生長(Liau *et al.*,1996)。然而若以多孔隙明膠塗覆的微載體系統，至少需要三倍高的細胞接種量(Ng *et al.*,1996)。細胞貼覆微載體的機制，主要是細胞膜與微載體表面電核密度相互作用的結果(Himes and Hu, 1987)。然而在大型生物反應器培養系統中，細胞貼覆微載體的速

率也由於培養液體積的擴大，細胞與微載體碰撞頻率減低而變慢(Wu *et al.*, 1997; Wu and Huang, 2000; Wu and Huang, 2002)。同樣的生物反應器攪拌方式也發現能增進細胞貼覆微載體的速度(Shiragami *et al.*, 1997)。因此，生物反應器操作方式往往也直接影響到細胞貼覆微載體的成功率。這類相關產程技術的開發從一般轉動瓶(roller bottle)的培養方式進步至微載體(microcarrier)懸浮培養，使得能應用到發酵工業常用的攪拌型生物反應器(stirred tank)中，進一步利於產程放大(scale up)及產品確效(validation)。目前疫苗工業所用動物細胞生物反應器，用於生產小兒麻疹疫苗與狂犬病疫苗，已達數千公升以上的規模(Montagnon, 1988)。以微載體懸浮培養生產 tPA 或 urokinase-type plasminogen activator(uPA)的製程技術，具備有利於反應器進行連續灌注培養及提高培養細胞密度等優點(Takagi and Ueda, 1994; Jo *et al.*, 1998)。

目前微載體細胞培養的技術除了進一步提高細胞密度外，建立無血清微載體培養也是最重要的工作。傳統所用細胞培養基含 5-10%牛、羊或馬的血清，其品質無法固定(batch to batch variation)，同時這些血清仍有可能成為其他污染來源的疑慮。自 1993 年來在英國發現新型的庫賈氏病患者海綿樣腦病變與具有傳染性牛隻的狂牛症十分有關，其病因乃是源自傳染性普恩蛋白(prion)。傳染性普恩蛋白其結構十分穩定，能長時間存在而不會失去活性，因此無法輕易從下游純化程序中去除。美國 FDA 目前對生物製劑品(biologics)的規範，決大部份細胞培養製程必須使用無血清培養法的才可能被核准。因此，無血清培養基的使用，儼然已成為一種趨勢。

目前動物細胞培養用無血清培養基主要至是針對一般能單獨懸浮生長的細胞如 CHO 細胞、NS0 細胞、BHK 細胞、293 細胞和 PER.C6 細胞等，然而針對微載體培養的細胞所開發的無血清培養基相對的較少。由於利用微載體培養細胞的第一步必須使細胞能成功貼覆在微載體的表面。然而在血清培養基的條件下，細胞生長於微載體上的條件較差，需要添加一些如 fibronectin、laminin、vitronectin 等貼覆蛋白與細胞上受體作用來加強細胞貼覆(Casnocha and Wolfe, 1999)。另一方

面，細胞生長所須生長訊息，主要由血清中的荷爾蒙與生長因子如胰島素、IGF 與 EGF 等來提供，目前也可以利用添加其 Analog 分子來取代(Casnocha and Wolfe, 1999)。另一個無血清培養基的重要成份是添加一些 如白蛋白、轉鐵蛋白與膽固醇分子等(Casnocha and Wolfe, 1999)。目前利用添加< 90 微g/L 重組生長因子蛋白與其他非動物性蛋白開發成功的 M-VSFM 無血清培養基，已能培養 Vero 細胞、BHK 細胞和 MDCK 細胞等貼覆性細胞(Butler et al., 2000)。最近並以此無血清培養基，應用於微載體培養 Vero 細胞生產治癌型里奧病毒(Butler et al., 2000)、去活化日本腦炎病毒疫苗(Wu et al., 2002)與去活化腸病毒 71 型疫苗(Wu et al., 2004)。

Vero 及 MDCK 細胞已被廣泛應用於開發季節性流感疫苗(Audsey et al., 2004; Ghendon et al., 2005)，且在歐洲取得上市許可。但是目前的 2004 年 H5 流感原型疫苗株(A/Vietnam/1194/2004 及 A/Vietnam/1203/2004)的六段內部基因是來自已在胚蛋調適過的 A/PR/8/1934(H1N1)病毒，因此在 Vero 及 MDCK 細胞的產量並未達到最佳狀況。最新研究顯示，胚蛋調適過的 H2 流感病毒，在 Vero 細胞經過 20 次繼代培養，可大幅增加其病毒培養(Romanora et al., 2004)。

本計畫將先對 H5 流感原型病毒株在 Vero 及 MDCK 細胞進行調適，並選殖出高感度的疫苗種株，同時建立高感度無血清培養微載體懸浮量產技術，以提高病毒產量，然後進行動物致免疫力及保護力試驗，計畫在三年內完成臨床前試驗。

(2)、材料與方法

選殖高產量的流感 H5 疫苗種株

- 1) 疾病管制局目前已取得 2 株流感 H5 原型疫苗株(Vietnam1194 及 Vietnam1203)，初步在 MDCK 及 Vero 細胞培養的 HA 效價遠低於在蛋胚的效價，為了提高在 MDCK 及 Vero 細胞的產量，此二種病毒將在 MDCK 及 Vero 細胞進行繼代培養，然後以蝕斑純化(plaque purification)選殖出高產量的疫苗種株(Romanova et al., 2004)。
- 2) 對照抗原和分離株 HA 力價測定：以 96 孔微量測定盤進行試驗，分裝 25 μ L PBS 至第 2~第 12 孔 (A~H 列)，第 1 孔 (A1~F1) 分別加 50 μ L 分離株病毒液或對照抗原，G 及 H 列的第 1 孔不加抗原液，H 列做為血球對照用，所以 H 列第 1 孔加 50 μ L PBS。由第 1 孔開始進行 25 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 25 μ L，再加 25 μ L PBS 至每一孔。全盤每孔加 25 μ L 火雞紅血球懸浮液，輕拍盤子使混合均勻，在室溫中放置約 40 分鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄，血球與病毒（或抗原）完全凝集記為“+”，不完全凝集記為“+”，血球完全沉降者記為“-”。將盤子傾斜，觀察血球淚滴狀流下，流下之速度與血球對照相同者表示血球完全沉降。完全凝集之病毒（或抗原）最高稀釋倍數，即代表病毒（或抗原）之 HA 力價。
- 3) 製備 HI 試驗用標準抗原液及迴歸力價測定：先計算進行 HI 試驗所需 HA 單位抗原液總量後，將已知力價之病毒（或抗原）以 PBS 稀釋為 4 HAU / 25 μ L 濃度，置於 4 $^{\circ}$ C 備用，稀釋好的抗原液僅限於當日使用。再進行第二次 HA 試驗，迴歸檢測稀釋後抗原力價，檢測結果應在前三孔呈現 HA。如果力價不對，HA 多一孔則再將抗原等量稀釋二倍，HA 少一孔則需再加入等量的抗原，使抗原濃度增加一倍。
- 4) 血球凝集抑制試驗：分裝 25 μ L PBS 至 B~H 列的第 1~12 孔，分別加

50 μ L H5 標準抗血清至 A 排各孔，由第 1 孔開始進行 25 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 25 μ L。每孔加入 25 μ L 4 HAU 病毒或抗原，在室溫感作 15 分鐘。每孔再加 25 μ L 火雞紅血球懸浮液，輕微振盪混勻後，靜置室溫中約 40 分鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄。可以完全抑制 4HAU 抗原的血清最高稀釋倍數即為 HI 力價。每一血清均採重複二列之序列稀釋，一列供檢測分離株病毒用，一列做為陽性抗原對照用。最後兩列 G 及 H 列作為紅血球對照用，以 PBS 取代血清稀釋及抗原添加。若有抗原與抗體反應，則血球凝集被抑制。同樣將盤子傾斜判讀，血球完全凝集記為”+”，不完全凝集記為”+”，完全抑制凝集記為”-”。完全抑制凝集之最高血清稀釋倍數，即代表抗體之 HI 力價。單株抗體部分，規劃使用 Chemicon 或 Dako 公司之商品化產品。

- 5) 單向輻射狀免疫擴散法 (single radial immuno-diffusion assay): 將抗流感病毒之抗體添加入洋菜膠內以鑄作平板，將所鑄作之平板置入小孔洞以利檢測樣品添加。試驗進行時，將多重稀釋之標準品與檢測物規劃至少二重複的實驗組加入小孔洞中，隔天將平板取出，並以 Commassie Blue 染色。將檢測物與標準品擴散程度之比較，以評估樣品中抗原量之多寡。

高密度無血清微載體懸浮培養與生物反應器培養技術

- 1) 首要實施的研究課題是從不同形式微載體篩選出合乎培養出高密度 MDCK 細胞的微載體，主要以(1)表面型微載體與(2)多孔隙微載體兩種不同型式微載體，在 100 mL 懸浮瓶中比較以含血清與無血清培養基培養 Vero 及 MDCK 細胞的差異性。疾病管制局擁有確效過的 Vero 細胞庫，因此，Vero 細胞將自疾病管制局取得。目前國內尚未有確效過的 MDCK(Madin-Darby canine kidney) 細胞庫，因此，MDCK 細胞將購自食

品工業研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI) 。ATCC 編號：CCL-34。細胞購來的繼代數為 55 代。含血清 MDCK 細胞的培養基為 DMEM (Dulbecco's modified Eagle Media, Cat NO. 12800-017, GibcoBRL USA), 其中添加胎牛血清 (Fetal bovine serum; Cat No. 26140-079, GibcoBRL USA)。無血清 MDCK 細胞培養基為 OPTIPRO(Cat No. 12309, GibcoBRL USA) 與 Plus MDCK(Cat No. SFM110, Cescobio Taiwan)。以含血清培養基培養細胞時, 將細胞於面積 150cm^2 組織培養盒(tissues-flask, T-flask, Corning)中的培養基移去, 以磷酸生理緩衝溶液(PBS, phosphate buffer saline; NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)沖洗 T-flask 二次後移去。加入 1 倍之 trypsin-EDTA(0.05% trypsin 0.53mM EDTA.4Na; Cat No. 25300 GibcoBRL USA)8ml 於 150T-flask 中, 置入 37°C , 5% CO_2 二氧化碳細胞培養箱 10 分鐘作用。待細胞脫落後添加 12ml 新鮮培養基, 以吸量管沖吸細胞液使細胞分散, 並取樣 1ml 做細胞計數。將 40ml 新鮮培養基加入一新的 T-flask, 再加入 2×10^6 細胞, 最後將 T-flask 置於二氧化碳培養箱繼續培養。每 3 天繼代培養一次。以無血清培養基培養細胞時, 在加入 trypsin 使細胞脫落後, 需先添加 4ml 的 Trypsin inhibitor, 再加入 8ml 新鮮培養基。取樣後將剩下之細胞液以 1000rpm 離心 5 分鐘, 將上清液移除後加入 20ml 新鮮培養基, 再以吸量管沖吸細胞液使細胞分散, 接種細胞於 T-flask 即可。

- 2) 微載體製備及細胞培養：MDCK 細胞懸浮培養於為載體系統中。其中傳統型實心 Cytodex1(Amersham Biosciences), 表面包覆膠原蛋白實心微載體 Cytodex3(Amersham Bioscience), 孔洞型微載體 Cytopore2(Amersham Biosciences), 帶有正電荷實心微載體 plastic plus (Solluhill)的製備方式如說明書所示。先秤取所需要的微載體克數, 加入含磷酸根緩衝溶液的血清瓶膨脹至少 3 小時(Cytopore2 只需在磷酸生理溶液膨脹 10 分鐘, plastic

plus 只需在二次水中膨脹 10 分鐘)，再以高壓蒸氣滅菌 121°C ，15 分鐘。室溫冷卻後移除磷酸生理緩衝溶液，再加入預熱至 37°C 培養的細胞培養基混合靜置 5 分鐘後移除培養基。將微載體以培養基混合，加入懸浮瓶中。在細胞準備方面，將 T-flask 上的細胞以 trypsin-EDTA 作用使其脫落。以適當之細胞濃度，與培養基一起加入懸浮瓶中。再添補新鮮之培養機至總體積為 70 ml。細胞培養於 37°C ，5% CO_2 細胞培養箱中，調整攪拌速度為 40rpm，24 小時後再加入 30ml 新鮮培養基並將轉速調整為 60rpm。細胞培養過程根據培養基內葡萄糖與乳酸濃度（前者 $<1\text{ g/L}$ ，後者 $>2\text{ g/L}$ ）再換 60%培養基溶液，且每 24 小時取樣算細胞密度。

- 3) 細胞生物反應器培養-灌注式培養：將細胞生物反應器置入內建式 spinfilter (B. Braun Biotech)，並將最適之細胞接種密度、微載體及其培養濃度，以氣壓之接種方式，送入已含 Sigmacote (SIGMA, Cat SL-2) 之 2 L 反應器 (B. Braun Biotech) 內，其工作體積為 1 L，期間之溶氧量由空氣幫浦供給；pH 值以 CO_2 或是 NaHCO_3 (88 g/L) 作為調控維持至 6.9~7.2；溫度以反應器夾套循環系統進行控制維持於 37°C ；培養基灌注式流率視葡視葡萄糖與乳酸濃度（前者 $<1\text{ g/L}$ ，後者 $>2\text{ g/L}$ ）。
- 4) 細胞計數-靜態培養細胞計數：將 150CM^2 組織培養盒的細胞用 trypsin-EDTA 作用使細胞脫落後，將細胞均勻打散並取樣至 1.5 毫升的離心管中，用 trypan blue exclusion method 的方法計數細胞。步驟為，取 50 μl 的細胞溶液和 50 μl 的 trypan blue 染劑混合，已經死亡的細胞會被 trypan blue 染上藍色，存活的細胞則不會被染色。在顯微鏡下使用 hemacytometer 計數。
- 5) 胰蛋白酶酵素細胞計數法：取 1 ml 之均勻樣品，待微載體沉降之後 將上清液保存於 -20°C 以作代謝分析。加入 1 ml 10X trypsin-EDTA，放置 37°C 培養箱 10 分鐘後，於血球計數器上計算細胞數。
- 6) 試產不活化流感 H5 原型疫苗：將馴化過的疫苗種株感染細胞，在第 24、

48、72、96 及 120 小時收集細胞培養上清液，測量活病毒及 HA 效價，以決定最佳收成時間。收成時間決定以後，接著進行原型疫苗試產，然後以福馬林進行不活化，最後以 SRD 測量抗原濃度。根據以往新型流感疫苗臨床試驗，全病毒不活化疫苗比裂解不活化疫苗雖然疼痛副作用的比例較高，但免疫效果較佳且生產成本較低(Hehme et al. 2002)，因此本研究將採用全病毒不活化疫苗。

7) 小鼠致免疫力研究：最近 H2 及 H5 原型疫苗臨床試驗證實「添加輔佐劑的不活化疫苗比未添加輔佐劑的不活化疫苗免疫效果較佳」(Hehme et al. 2004; Nicholson et al. 2001)，本研究將評估輔佐劑(Aluminum)的效果。血清抗體目前是評估不活化流感疫苗的標準方法，因此本研究將測量血清 HI 及中和抗體。

(3)、結果

1. 無血清培養之建立：本中心自食工所取得 MDCK 細胞，此細胞在含血清的培養下其細胞數分別為 10^7 cells/T75 及 10^8 cells/roller bottle，已在 MDCK 細胞比較六種無血清培養(Plus MDCK, PAA, VP-SFM, ExCELL, OptiPro, PFM)，其中以 Plus MDCK 生長情形最好 (10^7 cells/T75 及 10^8 cells/roller bottle)。

2. 國際上常用三種微載體來進行細胞培養：Cytodex1，Cytodex3 及 Cytopore2。其中 Cytodex1 已被使用於疫苗的生產，因此本研究選擇 Cytodex1。使用含血清的培養基，在 100 ml spinner flask 以微載體 Cytodex1 培養 MDCK 細胞，比較三種不同微載體濃度 (2g/L、5g/L 及 10g/L) 下細胞之繁殖效率。結果發現 5g/L 的微載體濃度下，MDCK 細胞有較佳的繁殖效率，感染 NIBRG-14 之後第 24、48、72 及 96 小時，病毒 HA 效價分別為 <2、1024、2048 及 2048/50 μ l。以 1L 生物反應

器測試 NIBRG-14 生長曲線，細胞培養第六天細胞總數可達約 3×10^8 以上(約為 30 個 roller bottle 所產生之細胞數)。感染 NIBRG-14 之後第 24、48、72 小時，病毒 HA 效價分別為 <2、4096、4096 及 4096/50 μ l，TCID₅₀ 分別為 3.16×10^6 /ml、 1×10^8 /ml、 5.7×10^7 /ml 與 1.4×10^7 /ml(圖一)，HA 抗原量分別為 <5、5.64、11.74 及 7.68 μ g/ml。因此選定收取病毒液的時間為 72 小時。以 1L 生物反應器試產 NIBRG-14，收取之病毒液 HA 效價為 2048/50 μ l，TCID₅₀ 效價為 10^8 /ml，經過純化及不活化後之 HA 效價為 4096/50 μ l。使用無血清培養基 OptiPro，先在 100 ml spinner flask 以 5g/L 微載體完成試產，然後放大至 1L 生物反應器試產 NIBRG-14，細胞培養第六天細胞總數可達約 1×10^8 以上(約為 10 個 roller bottle 所產生之細胞數)。感染 NIBRG-14 之後第 24、48、72 小時，病毒 HA 效價分別為 <2、4096 及 4096/50 μ l，TCID₅₀ 分別為 3.16×10^7 /ml、 1.65×10^9 /ml 與 5.62×10^8 /ml，經過純化及不活化後之 HA 效價為 8192/50 μ l(表一)。目前正以無血清培養基 PlusMDCK 進行試產中。

3. 小鼠致免疫力試驗：已完成純化及不活化之疫苗原液，正以 SRD 進行 HA 抗原量檢測，將於十一月中旬完成後，進行小鼠致免疫力試驗，預計於十二月中旬完成。

4. 流感疫苗株馴化及選殖：由 UK NIBSC 得到的疫苗種株(NIBRG-14)在胚胎蛋及 MDCK 細胞培養的效價為 10^{7-8} TCID₅₀/ml，在 Vero 細胞的效價較低(約為 10^6 TCID₅₀/ml)，在 T25 培養瓶進行 Vero 細胞馴化，經過三次繼代培養，逐漸增加到

10^7 TCID₅₀/ml (表二)。將第三次繼代培養的病毒進行 plaque purification，挑選病毒效價較高的三株病毒株 (clone 9、clone 15、clone 16)，並進行第二次 plaque purification，在經過 6 well plate amplify 後，將病毒液進行 plaque assay，觀察到病毒 plaque 的大小為一致，但 clone 9 的 plaque 較小 (圖二)。將這三株病毒繼續在 T25 flask 進行培養，三株病毒的效價分別為 7.5×10^5 、 1×10^7 、及 1.78×10^7 TCID₅₀/ml，選擇 clone 16 繼續在 T75 flask 進行不同 MOI 的試驗，並觀察 growth curve (圖三)，病毒效價約可達到 10^{7-8} TCID₅₀/ml。將 clone 16 病毒株在 T75 flask 大量培養，共分裝 120 管冷凍小管，此批病毒 HA 效價為 512 /50 μ l，TCID₅₀ 效價為 3.16×10^8 /ml。

5. Vero 細胞馴化流感疫苗株之抗原性及核酸序列分析：將 Vero 細胞馴化病毒株 clone 9、15、16 和購自 NIBSC 的 NIBRG14 標準抗血清進行 HI test 確定其抗原性，發現三個 clone 之 HI 效價與 egg 和 MDCK 培養之 NIBRG14 病毒效價只有兩倍差異 (400 vs. 800)。分析 Vero 細胞馴化病毒株 clone 9、15、16 之 HA 和 NA 蛋白質的序列，並將之和 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)臨床分離株進行比對。在 HA 蛋白質胺基酸序列 323-328 的位置，Vero 馴化過的病毒具有 4 個刪除，代表仍維持減毒基因型。而 NA 蛋白質的部分沒有任何胺基酸序列的改變。其他 6 段序列正在進行核酸序列定序中。

(4)、討論

本中心目前已可以用滾動瓶來緊急生產 NIBRG14 流感疫苗，不過滾動瓶的技術需

要密集的人力，相對地，以生物反應器進行 1L 產能來生產 NIBRG-14 的結果發現，1L 產能所得到的細胞總數約為 30 個滾動瓶的產量，待疫苗液 HA 抗原量完成測試後，即可知相對的產能及成本。

本研究發現含血清培養基有較佳之細胞—微載體貼附力，並達到較高之細胞濃度。然無血清培養基的病毒產量卻比含血清培養基產量較高，以滾動瓶生產也有類似現象，值得進一步研究。

以 Vero 細胞馴化 NIBRG14 病毒的結果，顯示馴化過之 NIBRG14 病毒可以由 Vero 細胞生產高濃度之病毒液，其效價和由胚胎蛋和 MDCK 細胞培養出的病毒效價相似，並且抗原性反應和 HA、NA 蛋白質胺基酸序列分析的結果發現和原始病毒株沒有太大差異，此外 Vero 細胞已廣泛應用於其他人用疫苗的生產，因此可以考慮以此馴化後的 H5N1 疫苗株在 Vero 細胞生產 NIBRG14 模擬疫苗 (mock-up vaccine)。NIBRG14 的 HA 基因型是 clade 1，世界衛生組織目前鼓勵各國疫苗廠，利用 clade 2 的 H5N1 疫苗株(例如：A/Indonesia/5/2005)生產模擬疫苗，因此本計畫將繼續針對 A/Indonesia/5/2005 進行馴化。

(5)、結論與建議

1. 本研究顯示利用微載體及生物反應器來生產 NIBRG14，在 1L 的產能時技術上可行，未來應考慮放大產能至 5L。
2. 放大產能時，需要大量的細胞來接種微載體時，可能需要新的技術來克服

(例如微載體細胞轉移技術)。

3. 本研究顯示在胚胎高成長之NIBRG14可以在Vero細胞中進行馴化，應考慮以此馴化後之疫苗株在Vero細胞生產臨床試驗材料。
4. 繼續針對A/Indonesia/5/2005(H5N1)在Vero細胞進行馴化，進一步證實此技術的可行性。

(6)、重要研究成果與具體建議

疾管局的Vero細胞庫已進行過確效，因此可考慮以本研究馴化後之NIBRG14疫苗株在Vero細胞生產臨床試驗材料及儲備疫苗原液。

(7)、參考文獻

- Balkovetz DF, Gerrard ER Jr, Li S, Johnson D, Lee J, Tobias JW, Rogers KK, Snyder RW, Lipschutz JH. Gene expression alterations during HGF-induced dedifferentiation of a renal tubular epithelial cell line (MDCK) using a novel canine DNA microarray. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Apr;286(4):F702-10.
- Butler M, Burgener A, Patrick M, Berry M, Moffatt D, Huzel N, Barnabe N, Coombs K. (2000) Application of a serum-free medium for the growth of Vero cells and the production of reovirus. *Biotechnol Prog* 16: 854-858.
- Casnocha SA, Wolfe RA. Media, Animal Cell Culture. In *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. Edited by MC Flickinger and SW Drew. John Wiley & Sons, Inc. (1999) Vol. 3, pp1660-1676.
- Frazatti-Gallina NM, Mourao-Fuches RM, Paoli RL, Silva ML, Miyaki C, Valentini EJ, Raw I, Higashi HG. (2004) Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 23(4): 511-7.
- Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, Taubenberger JK,

- Bumgarner RE, Palese P, Katze MG, Garcia-Sastre A. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10736-41.
- Geiss GK, An MC, Bumgarner RE, Hammersmark E, Cunningham D, Katze MG. Global impact of influenza virus on cellular pathways is mediated by both replication-dependent and -independent events. *J Virol*. 2001;75(9):4321-31.
- Genzel Y, Ritter JB, Konig S, Alt R, Reichl U. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. *Biotechnol Prog*. 2005;21(1):58-69
- Genzel Y, Behrendt I, Konig S, Sann H, Reichl U. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. *Vaccine*. 2004 Jun 2;22(17-18):2202-8.
- Ghendon YZ, Markushin SG, Akopova II, Koptiaeva IB, Nechaeva EA, Mazurkova LA, Radaeva IF, Kolokoltseva TD. Development of cell culture (MDCK) live cold-adapted (CA) attenuated influenza vaccine. *Vaccine*. 2005;23(38):4678-84.
- Hehme N, et al. (2004) Immunogenicity of a monovalent, aluminum-adjuvanted influenza whole virus vaccine for pandemic use. *Virus Research* 103:163-171.
- Himes, V.B., Hu, W. S. (1987) Attachment and growth of mammalian cells on microcarriers with different ion exchange capacities. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 1155-1163.
- Liau, M.-Y., Hsiun, D.-Y., Li, S.-Y., Horng, C.-B., Wu, S.-C. (1996) Large-scale Vero cell culture on microcarriers in a twenty-liter stirred tank fermentor. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 29, 143-152.
- Mohler L, Flockerzi D, Sann H, Reichl U. (2005) Mathematical model of influenza A virus production in large-scale microcarrier culture. *Biotechnol Bioeng*. 90(1):46-58.
- Montagnon, B.J. (1988) Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality of VERO cell line. *Dev. Biol. Std.* 70, 27-47.

- Nicholson KG, et al. (2001) Safety and immunogenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97(H5N3) vaccine: a randomized trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet* 357;1937-43.
- Ng., Y.C., Berry, J.M., Bulter, M. (1996) Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. *Biotechnology and Bioengineering* 50, 627-635.
- Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine*. 2001;19(17-19):2716-21.
- Romanova J, et al. (2004) Live cold-adapted influenza A vaccine produced in Vero cell line. *Virus Research* 103:187-193.
- Shiragami, N., Hakoda, M., Enomoto, A., Hoshino, T. (1997) Hydrodynamic effect on cell attachment to microcarriers at initial stage of microcarrier culture. *Bioprocess Engineering* 16, 399-401.
- Takagi, M., Ueda, K. (1994) On-line determination of optimal time for switching from growth phase to production phase in tissue plasminogen activator production in a microcarrier cell culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(6), 655-658.
- Voeten JT, Brands R, Palache AM, van Scharrenburg GJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Claas EC. Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine*. 1999;17(15-16):1942-50.
- Wu, S. C., Hsieh, W. C., Liao, M.-Y. (1998) Comparisons of microcarrier cell culture processes in one hundred mini-liter spinner flask and fifteen-liter bioreactor cultures. *Bioprocess Engineering* 19, 431-434.
- Wu, S. C. (1999) Influence of hydrodynamic shear stress on microcarrier-attached cell growth: cell line dependency and surfactant protection. *Bioprocess Engineering* 21, 201-206.
- Wu, S.-C., G. Y.-L. Huang (2000) Hydrodynamic shear forces increase Japanese encephalitis virus production from microcarrier-grown Vero cells. *Bioprocess Eng.*

23, 229-233.

Wu SC, Huang GYL. (2002) Stationary and microcarrier cell culture processes for propagating Japanese encephalitis virus. *Biotechnol. Prog.* 18: 124-128.

Wu SC, Liu CC, Lian WC (2004) Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine* 22, 3858-3864.

(8)、圖表

表一、利用微載體及 MDCK 細胞以生物反應器試產 NRBRG-14

Working volume (L)	1	1	1
Medium	DMEM +5%FBS	DMEM +5%FBS	OptiPro
Total Cell number	3.63×10^9	3.38×10^9	1.11×10^9
Harvest HA titer	4096	2048	2048
Harvest TCID50	1×10^8	4.33×10^8	1.65×10^9
Bulk HA titer (volume)	< 4*	4096 (50 ml)	8192 (50 ml)
Bulk HA by SRD	< 4*	$31.56 \mu\text{g/ml}$	$43.56 \mu\text{g/ml}$

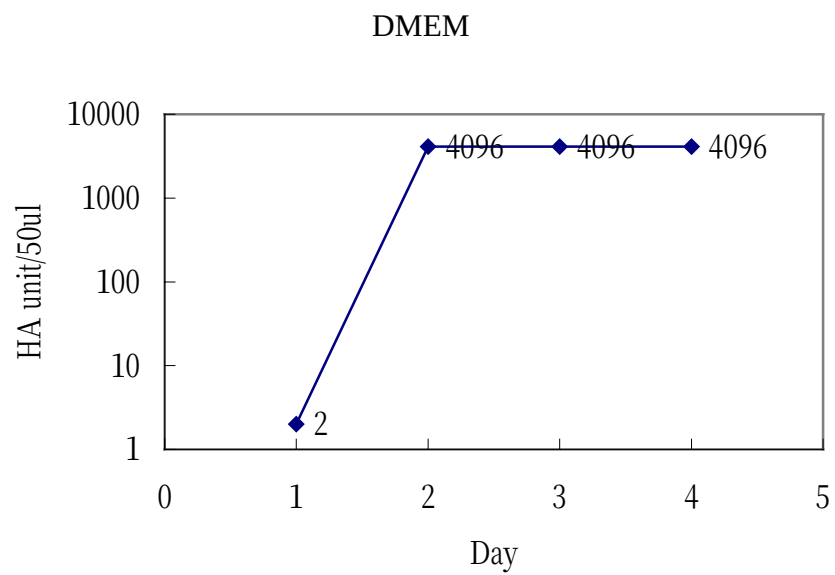
*病毒效價在不活化之後消失

表二、1L 生物反應器與 200ml 旋轉瓶病毒生產之比較

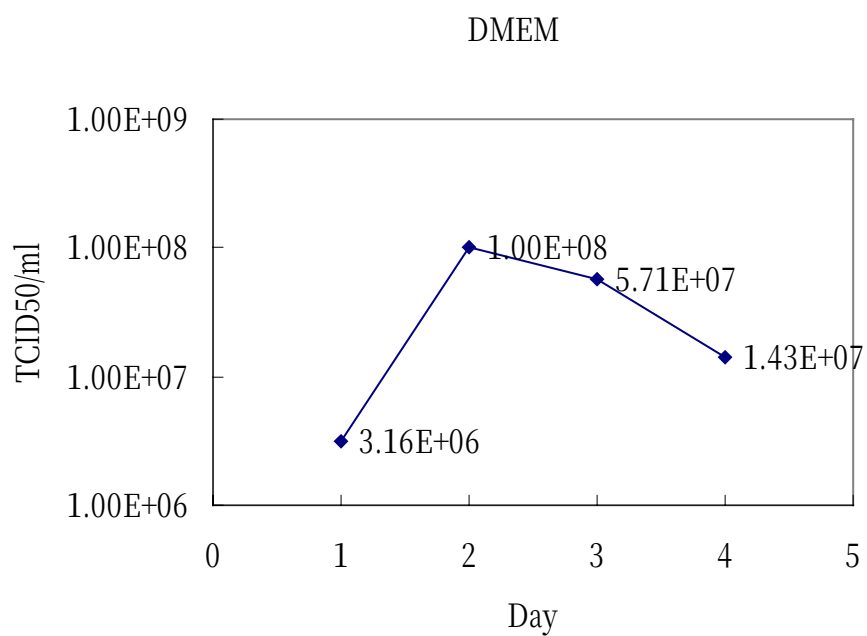
生產系統	總細胞數	總 HA 含量	培養基使用量
1L 生物反應器	3.38×10^9	$2099 \mu\text{g}$	5L
200ml 旋轉瓶 (RB)	1×10^8	$114.2 \mu\text{g}$	400ml/RB $\times$ 18RB=7.2L
1L 生物反應器 /200ml 旋轉瓶	34	18	69.4%

圖一、NIBRG14 病毒以 MDCK 細胞於生物反應器試產之生長曲線

a. HA 效價



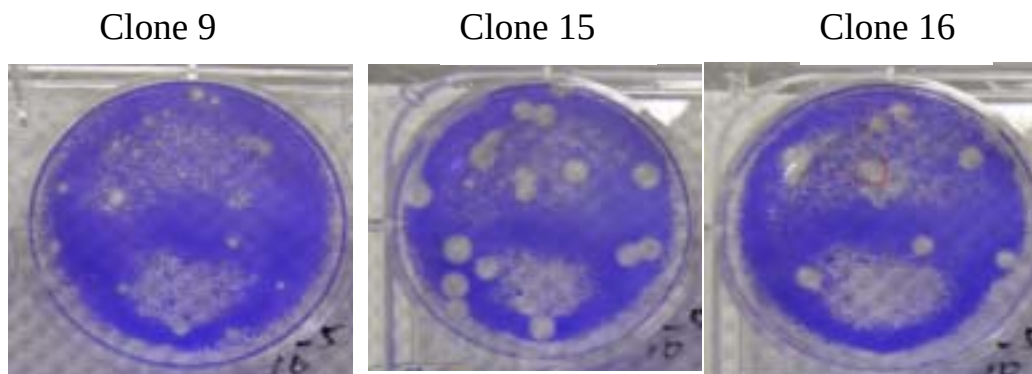
b. TCID₅₀ 效價



表三、NIBRG14 病毒在 Vero 細胞馴化之病毒效價

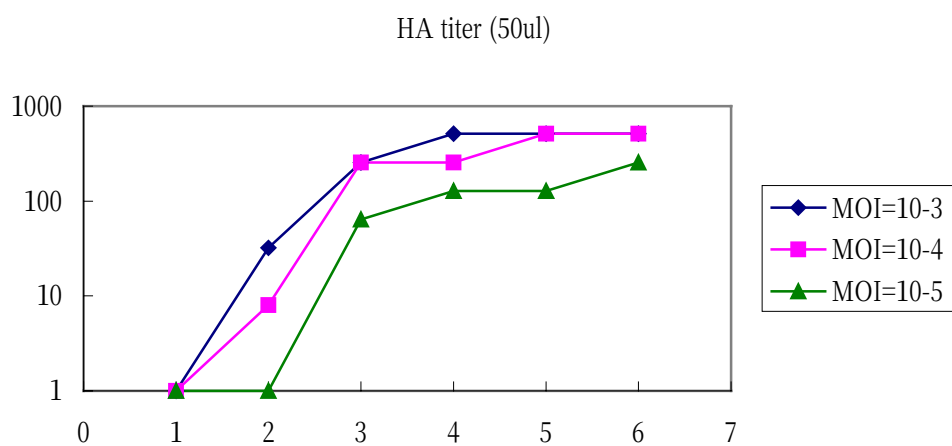
Passage	MOI (TCID ₅₀)	Day post infection	TCID ₅₀ /ml(MDCK)	TCID ₅₀ /ml (Vero)
P0			3.2E+07	3.16E+06
P1	0.001	7	3.98E+02	1.78E+07
P2	0.004	6	4E+03	1.78E+08
P3	6	4	3.98E+04	3.16E+07
P4	10.5	3	3.16E+02	3.16E+05

圖二、Vero 馴化病毒之 plaque assay 結果



圖三、Vero 細胞馴化病毒在 T75 flask 中培養之生長曲線

a. HA 效價



b. TCID50 效價

