# 120L 反应器微载体培养 Vero 细胞制备人用狂犬病毒技术

## 一、技术背景

人用纯化狂犬疫苗（Vero细胞）1985年在法国最先上市，因其安全有效，自1992年起被WHO推荐使用的人用狂犬疫苗，并且国外生产过程普遍采用反应器细胞培养工艺。当前，我国狂犬病疫苗普遍仍采用转瓶培养Vero生产工艺，仅2－3家企业采用生物反应器培养Vero细胞生产狂犬疫苗，更多的尚处于研发阶段。

转瓶培养 Vero 生产狂犬病毒工艺是将狂犬病毒株（CTN 株、aG 株等）接种转瓶中单层生长的 Vero 细胞，用含人白的维持液维持培养，每隔 3－5 天收获一次，一般收 2－3 次，经合并、灭活及纯化后制苗。因每个转瓶都是独立的细胞培养单元，每瓶的细胞质量、病毒产量和滴度都不同，导致疫苗批间差大，隐性污染引起高内毒素、DNA 残留超标等缺点，而且劳动强度大，生产效率低。

反应器微载体培养 Vero 细胞生产狂犬病毒工艺，不仅能自动监控细胞生长或病毒繁殖时的最适生化条件，提高 Vero 细胞密度和病毒滴度，而且良好的过程控制和操作程序更易实现 DNA 残留符合规程要求，疫苗质量稳定、批间小。辽宁成大和广州诺诚采用的 14L 或者 30L 反应器生产狂犬病毒工艺，已取得良好的经济效益和社会效益。

MMBS 已成功开发了反应器微载体培养 Vero 细胞专用培养基、120L 反应器微载体高密度培养 Vero 细胞技术、120L 反应器微载体培养 Vero 细胞生产狂犬病毒工艺等产业化关键技术，并已成功实施了该项目的技术转让。

## 二、工艺技术

120L 反应器微载体培养 Vero 细胞生产人用狂犬病毒工艺：将种子批 Vero 细胞从液氮中复苏，分别经方瓶、转瓶或小反应器的扩增培养，消化转瓶细胞或者小反应器微载体细胞，接种至 120L 反应器，控制一定的溶氧、pH 值、温度等工艺参数进行细胞培养。待 Vero 细胞生长至合适密度，换液后按一定的 MOI（病毒感染复数）接种狂犬病毒种毒，控制合适的温度、溶氧、pH 值等工艺参数，适时连续收获狂犬病毒上清,用以制苗。

图 1 表示了 120L 反应器微载体培养 Vero 细胞的照片，微载体培养的 Vero 细胞密度≥$5\times10^6$cells/ml。120L 反应器收获的狂犬病毒滴度一般在 7.0-8.0

logLD$_{50}$/ml，甚至更高。120L 反应器收获的病毒收获液抗原总量≥800 个 15L 转瓶 3 次收获病毒收获液抗原总量。

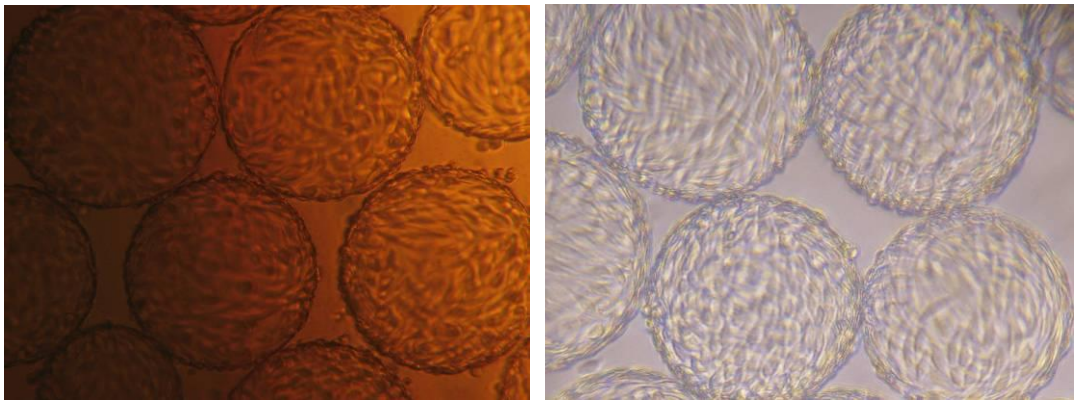
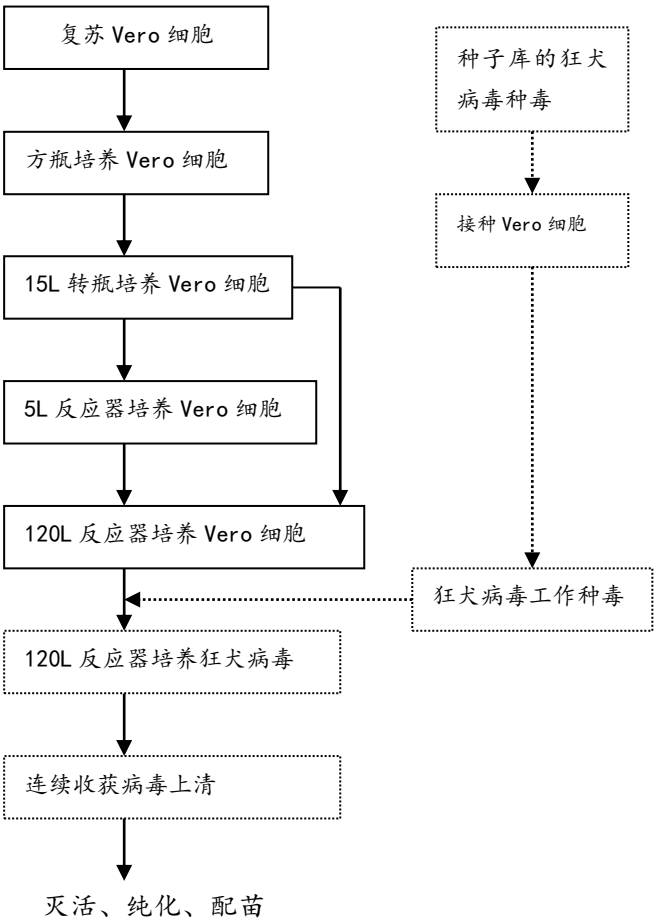


图1 120L反应器微载体培养Vero细胞照片

## 三、工艺流程



## 四、项目技术资料

1. 120L反应器微载体培养Vero细胞生产狂犬病毒工艺总结报告
2. 120反应器微载体培养Vero细胞生产狂犬病毒工艺操作规程
3. 120L反应器微载体培养Vero细胞生产狂犬病毒工艺技术要点
4. 120L反应器细胞培养操作记录
5. 120L反应器病毒培养操作记录
6. 病毒培养检测报告