

综述

哺乳动物细胞生产人用灭活疫苗相关技术进展

白仲虎¹ 李昕然¹ 王荣斌¹ 刘学荣² 安芳兰² 张云德² 刘秀霞¹ 刘春立¹ 杨艳坤^{1*}¹江南大学, 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122; ²中农威特生物科技股份有限公司, 兰州 730046)

摘要 疫苗作为预防多种疾病的主要手段, 具有接种方便、安全有效、副作用小等优点。随着人们防疫意识的提高, 疫苗需求量的日益增长, 疫苗产业亟需增强目前的生产能力、降低成本价格。与此同时, 国内外药品监管机构也对疫苗产品的质量提出更高的要求。该文分别从哺乳动物细胞培养和疫苗质量控制的角度, 回顾了国内外工业化疫苗生产技术, 分析了动物细胞培养的现状和疫苗生产中质量的控制策略, 并提出人用灭活疫苗生产技术的发展方向。

关键词 疫苗生产; 细胞培养; 工艺开发; 质量控制; 生物制药

Review of Industrialized Production Technology of Human Inactivated Vaccine Based on Mammalian Cell Culture

BAI Zhonghu¹, LI Xinran¹, WANG Rongbin¹, LIU Xuerong², AN Fanglan², ZHANG Yunde², LIU Xiuxia¹, LIU Chunli¹, YANG Yankun^{1*}¹National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;²China Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co., Ltd, Lanzhou 730046, China)

Abstract Vaccine has been recognized as the principal method of preventing many diseases for its superiority, such as easy to vaccinate, high efficiency, less side effects, etc. People's increasing awareness on importance of epidemic prevention leads to elevate demand for vaccines, which requires larger capacity and lower cost of vaccine industrial production. Meanwhile, the large demand makes drug supervision organizations pay more attention to the quality of vaccines. Based on the situation, the review summed up the development of vaccines production technology, analyzed the current situation of cell culture and quality control strategy of vaccines production, and put forward the developing direction of production technologies for human inactivated vaccine.

Keywords vaccine production; cell culture; process development; quality control; biopharmaceutics

自1796年英国人Edward Jenner首次发现用于预防天花的牛痘疫苗以来, 疫苗的发展已经历了200多年的历史。据世界卫生组织的统计数据, 疫苗每年

可以挽救约600万人。作为一种经济、高效、安全、方便的疾病预防手段, 它被认为是20世纪公共卫生领域最重要的成就之一。现今, 人用疫苗种类主要

收稿日期: 2019-03-22 接受日期: 2019-05-08

国家自然科学基金(批准号: 31570034)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2015AA020802)和江苏省普通高校学术学位研究生科技创新计划(批准号: KYLX16_0807)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0510-85329306, E-mail: yangyankun@jiangnan.edu.cn

Received: March 22, 2019 Accepted: May 8, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570034), National High Technology Research and Development Program of China (Grant No.2015AA020802), and Research Innovation Program for College Graduates of Jiangsu Province (Grant No.KYLX16_0807)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85329306, E-mail: yangyankun@jiangnan.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-09 15:49:51 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190909.1549.002.html>

包括灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗、重组疫苗和DNA疫苗等^[1]。其中, 较早开发的灭活疫苗, 现今仍占据着市场的重要份额。基于动物细胞培养的灭活疫苗生产, 其主要过程为活病毒通过哺乳动物细胞为基质进行繁殖、扩增, 在病毒收获后将其灭活成为没有感染活性的全病毒颗粒疫苗。其主要生产过程可分为两个阶段, 一是细胞培养阶段、二是病毒培养阶段。如何把握好生产阶段中细胞与环境、病毒与环境及细胞与病毒之间的关系, 是疫苗生产开发过程中的关键问题。该文分别从动物细胞培养和疫苗质量控制两个方面着手, 对基于动物细胞培养人用灭活疫苗工业化生产技术进行综述, 并对现阶段疫苗生产现状提出可执行方案。

1 动物细胞培养

动物细胞培养技术始于19世纪后期, 至今已发展100年有余。20世纪中叶, 该项技术首次被用于生产病毒疫苗^[2]。近年来, 随着动物细胞培养技术的日益标准化、自动化和规模化发展, 其已被广泛应用于疫苗(如: 狂犬病疫苗、甲型肝炎疫苗、流感疫苗等)制备、蛋白类药物(如: 促红细胞生成素和各种治疗用单克隆抗体等)表达、基因治疗、干细胞移植、人造组织器官构建等各个领域, 它已成为现代生物科学研究和生物医学研究与开发的有力工具。哺乳动物细胞培养作为病毒繁殖的载体在灭活疫苗生产中发挥着至关重要的作用, 培养过程中细胞的密度和状态对疫苗产品的质量及产量均有重要影响。

1.1 疫苗生产细胞系

在疫苗生产细胞系的选择中, 犬肾上皮(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞、非洲绿猴肾(Verda Reno, VERO)细胞和人二倍体细胞最为常见。同时, 人们还在积极地驯化可悬浮培养的MDCK、VERO细胞系及其他细胞系, 例如: Crucell公司的人PER-

C6细胞、人源胚胎肾细胞(human embryonic kidney, HEK293)、ProBioGen公司研制的鸭AGE1.CR细胞、Vivalis公司的鸭EB66细胞。

1.1.1 VERO细胞系 1962年, Yasumura等首次从非洲绿猴肾细胞中分离并培养出VERO细胞系。现今, 它是国内外各监管机构最普遍接受的疫苗生产连续细胞系。与其他疫苗生产细胞系相比, 它具有如下特点: (1)来源方便, 易培养; (2)由于本身存在干扰素缺陷型, 导致它对大部分病毒敏感性较强^[3-4]且病毒增殖滴度高^[5-7]; (3)一定代次内无致瘤性, 生物安全性高; (4)成功被应用于微载体培养技术, 可实现高密度规模化生物反应器的培养^[8-9]。基于上述优点, VERO细胞已被广泛应用于各类成品疫苗的生产当中。目前, 得到批准用VERO细胞生产的疫苗有流感疫苗^[10]、乙型肝炎疫苗^[11]、甲型肝炎疫苗^[12-13]、狂犬病疫苗^[14]和脊髓灰质炎疫苗^[15](表1)。

1.1.2 MDCK细胞系 1958年, Madin等^[16]成功从犬肾细胞中分离出MDCK细胞系, 并进行了离体培养, 该细胞系为单层贴壁依赖型。目前主要应用于流感疫苗的生产当中。与其他疫苗生产细胞系相比, MDCK细胞具有可进行全悬浮培养以及安全性方面的优势。诺华生物制药公司已成功将其驯化成无血清全悬浮细胞系, 并在2007年应用于流感疫苗Optaflu的生产当中。安全性方面, MDCK细胞系仅支持人源病毒的复制, 这大大降低了成品疫苗的潜在副作用。同时, 虽然在下游工艺中进行了严格的分离纯化等步骤, 但通过临床数据显示MDCK细胞系仍存在一定的致瘤性。

1.2 动物细胞悬浮培养

动物细胞不同于植物细胞及微生物细胞, 它没有细胞壁, 所以在悬浮培养时对搅拌桨的剪切力更加敏感, 环境要求也更为苛刻。传统的动物细胞在方瓶和滚瓶中培养, 该技术已十分成熟, 但病毒产

表1 VERO细胞系生产人用灭活疫苗汇总

Table 1 Summary of human inactivated vaccine based on VERO cells

公司 Corporation	疫苗 Vaccine
Baxter	Influenza
Baxter	Hepatitis A
Nederlands Vaccine Institute	Polio
Aventis	Japanese encephalitis
GSK	Polio

量低、生产成本低、劳动强度高,使其不能满足现代疫苗生产的要求。20世纪60年代,首次出现细胞悬浮培养技术。这项技术是从转瓶的贴壁细胞培养发展而来,可实现在生物反应器中进行高密度、大规模的动物细胞培养。该技术进行疫苗生产,不仅能够大大提高疫苗产量,还能有效地控制疫苗质量。依据细胞是否贴壁可将培养方式分为:全悬浮培养和微载体悬浮培养两种。

1.2.1 全悬浮细胞培养 1962年, Capstick等^[17]针对细胞乳仓鼠肾细胞21(baby hamster kidney 21, BHK-21)进行悬浮培养研究,并在1965年将其应用在微生物发酵罐中,完成了首个全悬浮细胞兽用疫苗的生产^[18]。自此全悬浮细胞培养技术凭借其诸多优点,成为蛋白及疫苗制造行业的研究热点。全悬浮细胞培养技术的最大优点是可用于传统搅拌型发酵罐进行大规模培养,通过对罐体内环境进行精细的工艺控制,从而获得大产量、高质量的蛋白及疫苗产品。其在蛋白表达领域贡献尤为突出,研究人员研发出多个优秀的细胞系,如:小鼠骨髓瘤NS0细胞(mouse myeloma line, NS0)和中华仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cell, CHO)等。在人用灭活疫苗方面,现只有MDCK细胞实现了通过全悬浮细胞培养的方式进行疫苗生产^[19-21]。

1.2.2 微载体悬浮培养 在疫苗生产中,研究者发现有些细胞系被驯化成悬浮细胞后,其性状会发生一定的改变,不再适合于疫苗的生产。微载体细胞悬浮培养技术通过将贴壁细胞系依附于微载体的方式,使贴壁细胞可悬浮培养。该方式绕过了传统的全悬浮细胞的驯化过程及性状改变问题,为细胞的悬浮培养提供了新思路、新方法。该系统于1967年由van Wezel^[22]首次发表。1981年,VERO细胞受到WHO的批准,可作为人用疫苗的生产基质。微载体悬浮技术较普通的静置培养方式有着诸多的优点:(1)大大增加了比表面积,有效节约空间;(2)应用于生物反应器中,更易于培养条件的精准控制;(3)易于放大,人力成本低等。疫苗的生产及研究中广泛使用该技术,特别是:MDCK细胞、MRC-5细胞、BHK细胞等,其中VERO细胞的应用最为广泛也最为成功。美国百特生物科技公司(Baxter)在其流感疫苗的生产当中,已成功实现了6000 L生物反应器规模的VERO细胞微载体培养。

1.3 个性化细胞培养基

对于现阶段疫苗生产而言,传统的DMEM等商

业化培养基,已不能满足大规模疫苗生产的需求。商业化培养基主要存在价格昂贵、不利于产业化生产以及不能满足个性化营养需求等缺点。同时,培养基中血清的添加虽然能满足细胞培养营养需求,但其成分不明确、容易污染等缺点不易被广泛接受。因此,个性化无血清培养基的研究和应用已成为工业疫苗生产的必要途径。开发最适合其细胞特性的个性化细胞培养基,并应用于疫苗的生产,可有助于病毒滴度的提高及疫苗质量的改善。

1.3.1 无血清培养基的开发 细胞培养基作为细胞培养过程中的重要介质,直接影响生物制品的产量、质量和安全。众所周知,细胞在培养过程中所需的营养成分众多,据已公开的商业无血清培养基配方,通常会包括50~100种物质。主要包含以下几大类:糖类、氨基酸、维生素、脂类、核酸、无机盐、微量元素和剪切力保护剂等。如何快速有效地进行无血清培养基的开发,已成为基于细胞培养生物药物研发的研究重点。无血清培养基的开发方法主要包括3种:(1)培养过程分析方法,该方法主要通过疫苗生产过程中的细胞培养基进行营养物质及代谢产物的检测,从而有效地从微观角度洞察细胞培养环境,并依据培养过程中营养物质的消耗量对无血清培养基成分进行调整;(2)分子生物技术方法,该技术主要通过对细胞基因和蛋白质进行分析和定量从而更好地了解细胞培养过程中的物质代谢流,其主要包括基因芯片技术、定量PCR技术及双向凝胶电泳分离技术等;(3)统计学方法,应用统计学方法配合商业化的设计软件,是现阶段细胞培养基开发过程中最常见有效的手段^[23-24],该方法可在短时间内完成对培养基中各营养因素的高通量筛选及精细优化,大大缩减细胞培养基开发的时间及资金成本。

1.3.2 疫苗生产中的特殊添加物 除被广泛认知的细胞物质需求外,开发有针对性的营养物的添加,可作为疫苗生产过程中的核心竞争力。病毒疫苗生产的培养基设计开发必须同时考虑到细胞生长和病毒感染复制的双重需求。Liu等^[25]研究了钙离子的浓度及加入时间对腺病毒滴度及细胞分散性的影响,当钙离子浓度大于1 mmol/L时由于细胞的聚集影响了病毒的感染效率,在病毒感染12 h后加入钙离子可有效改善这一状况,并且发现0.1至2.0 mmol/L钙离子浓度的加入可有效改善“细胞浓度效应”。黄锭^[26]

发现, 在培养基中加入0.7 mmol/L的丁酸钠可有效提高流感病毒在MDCK细胞中的扩增效率, 其HA滴度提高量可达50%左右。有研究表明, 在病毒培养基中添加DMSO、乙醇、TSA(trichostatin A)及N-甲基天冬酰胺等物质可提高病毒滴度^[27-28]。

1.4 动物细胞规模化培养

现今, 基于细胞培养生产蛋白及疫苗产业在生物放大方面日趋成熟, 其主要归功于: (1)分子生物学的进步使得以动物细胞为宿主表达蛋白及病毒水平的快速提升, 所以单培养批次的产量与收率与培养体积的关联度下降; (2)一次性细胞培养生物反应器的成熟应用, 其生产体积已超过1 000 L。但随着产业化的提升和对产品要求的提高, 成功、有效的过程放大研究依然是疫苗研发行业的关键性一环, 尤其是基于微载体细胞培养过程的放大。这主要由于它是一个多相的生物过程, 不同规模生物反应器内的搅拌剪切力、流体力学特征、涡旋尺度、气液交换的细微变化, 都可能被成集放大进而影响细胞及病毒的培养。

1.4.1 生物反应器放大策略 细胞培养的放大过程, 通常先在小型生物反应器中测定标准操作参数, 例如pH、溶解氧(dissolve oxygen, DO)、温度和接种密度范围等, 然后再进行规模放大。为了保证产量与质量的稳定性, 需要在大规模动物细胞培养中保持与原始过程相同的微环境。然而, 由于搅拌式生物反应器中气固液三相系统的复杂性, 端流区域中未知的流体特征以及细胞与环境之间的相互作用机制尚未完全了解, 细胞培养生物放大过程没有一个普遍适用的标准。常用的放大准则有以下几种。(1)几何相似准则, 根据几何相似的标准对生物反应器进行放大。(2)体积传质系数(KLa)相似准则, 由于氧的低溶解度, 大型生物反应器内的氧转移能力必须与细胞所需氧气的量相匹配。细胞密度越高, 氧转移能力的要求也就越高。因此, 在许多放大的成功案例中均依据了KLa的相似原则^[29-30]。(3)叶端速度相似准则: 在搅拌式生物反应器中, 一方面要避免搅拌桨和涡流对细胞造成机械性损伤, 另一方面充分的搅拌可以确保罐体内足够的均一性。因此, 叶端速度常常被选择作为放大的准则。Chalmers等^[31]研究发现, 哺乳动物细胞能耐受的最大叶端速率为2 m/s。(4)单位体积能量输入(P/V)相似准则: 来自搅拌和深层通气的能量输入及其在周围流体中的能量消散对反应

器内的混合效果和流体力分布具有显著影响。因此, 在生物放大的研究过程中单位体积能量输入也是重要标准之一^[32]。

1.4.2 缩小模型的建立 由于在生产规模生物反应器上进行实验成本高、效率低, 建立可代表生产规模工艺过程的缩小模型, 日益成为规模化工工艺过程研究关注的重点。建立可靠的缩小模型, 可以反映大规模反应器内的细胞培养情况, 据此方法实现对大规模反应器的高通量工艺优化。缩小模型的建立方法, 除了依据传统的混合时间等同策略、体积能量输入等同策略及体积传氧系数(kLa)等同策略外, 还可使用计算流体力学(computational flow dynamics, CFD)的模拟分析技术, 研究在不同规模的动物细胞反应器内细胞培养液的精细流体特征及变化规律, 进行更精准的流体参数分析。随着微型生物反应器技术的发展, 现已有建立15 000 L生产规模的15 mL微型生物反应器缩小模型的成功案例^[33]。有效的生产规模反应器的缩小模型, 其价值在于使政府监管机构能够承认通过高通量、小规模细胞培养过程获得的过程数据, 以及模拟cGMP环境中的工业规模生产数据, 以实现加速产品开发、降低开发成本的目的^[34-35]。

2 疫苗生产过程质量控制策略

由于疫苗本身具有生物学活性, 生产过程复杂, 生产周期长, 产品需低温、无菌等特点, 这意味着疫苗的生产过程复杂, 产品质量存在较高风险。在疫苗的生产和研究过程中, 一些被忽视的副作用(如致癌性)逐渐凸显出来, 针对此问题我们需要在疫苗的生产过程中对潜在的质量风险实现严格、有效的工艺控制。与此同时, 国内外的质量监管部门也在不断地对疫苗产品质量提出更高的要求。因此国内外各大疫苗生产公司也在提高对疫苗的生产标准和质量控制, 甚至会以牺牲产能为代价以达到质量要求。

2.1 人用灭活疫苗的质量要求

人用疫苗的应用相较于兽用疫苗, 其在疫苗副作用和潜在危害等方面的把控更加具体细化。因此人用疫苗有着更为严格的产品质量要求。表2为依据国内外药典对现阶段人用灭活疫苗产品质量的分类汇总。可以看到除免疫原性检测外, 其他均为疫苗安全性检测, 其要求之严种类之多对疫苗从业者来说既是挑战也是目标。

表2 人用灭活疫苗产品质量汇总

Table 2 Summary of human inactivated vaccine quality

质量分类 Quality classification	检测种类 Detection type	定量方法 Quantitative method
Effectiveness	Immunogenicity	Animal toxic attack experiment
Safety	Host DNA	DNA probe hybridization
	Host protein	Elisa
	Total protein	Lowry method
	BSA residue	Elisa
	Antibiotics residue	Elisa
	Sterility test	Cultivation method
	Thermal stability	Thermal stability experiment
	Bacterial endotoxin	Gel limit experiment
	Heat source	Animal experiment
	Abnormal toxin	Animal experiment
	Exogenous viral facotr	Animal experiment

2.2 QbD理念驱动下的疫苗生产过程的开发

近年来,随着细胞生物学、分子生物学、代谢工程等基础科学的发展,再加上高通量分析技术和在线检测技术的进步,生物过程工程研究得到显著发展。因此,国际上的药品监管机构,如美国FDA和欧盟EMA,都对生物医学工艺工程的开发及产品质量进行了更加严格的控制。其核心是以“质量源于设计(quality by design, QbD)”原则驱动生物过程的发展^[36-39]。在这种新方法和理念下,疫苗产品的生产者首先要了解最终端用户对产品质量的要求,以该质量标准作为目标函数进行生产工艺的开发。其主要步骤可总结为:(1)确定疫苗产品的关键质量参数(critical quality attributes, CQAs)及质量标准;(2)了解每个工艺参数对CQAs的影响,并进行失败模式和影响分析(failure mode and effect analysis, FEMA),从而确定出潜在关键工艺参数(critical process attributes, CPAs);(3)以实验设计(design of experiment, DoE)和多变元分析(multivariate analysis, MVA)为手段,通过软件分析了解输入工艺与输出质量的相互作用;(4)依据产品质量标准确定生产工艺参数的合理范围,这些范围可组成疫苗生产过程的“设计空间”;(5)在“设计空间”内确定出日常的“操作空间”,并对其进行验证。需要强调的是,在一轮的生产工艺开发过后,对日常生产过程的检测分析可能会对某个工艺参数的认识发生改变,或是需要对质量要求进行重新定义,并进入新一轮产品工艺开发。所以以

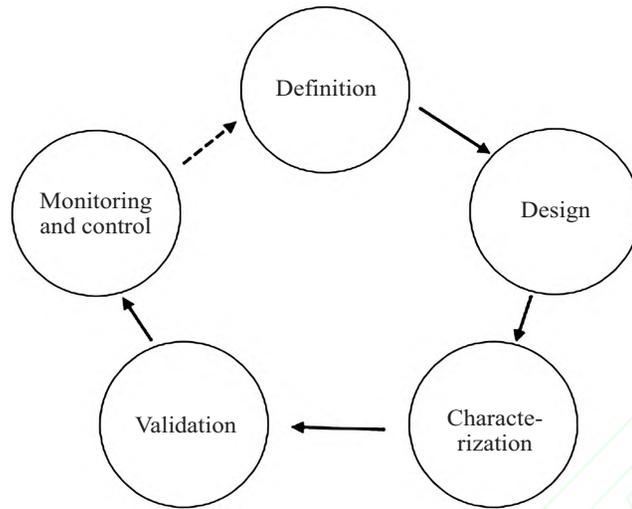
QbD理念为驱动的疫苗产品工艺开发,是一个需要不断对生产工艺进行改进的循环过程,从而达到我们对产品质量的动态需求。如图1所示,其可概括为:定义、设计、表征、验证、监控、再定义的往复过程。最终通过这一过程明确CPAs与CQAs之间的内部联系,以实现疫苗产品质量水平及稳定性的有效控制^[40-41]。以QbD为驱动疫苗研发过程的核心理念是以产品质量和稳定性为最高目标,实施疫苗生产过程研发和产品质量控制。

2.3 疫苗生产工艺在线分析技术

现如今,随着过程分析技术(process analytical technology, PAT)的进步,对疫苗生产过程进行多参数实施监控的技术日渐成熟^[42]。针对多参数在线检测的大数据分析,可通过应用MVA软件,将多维参数降至一个主元参数(principle component, PC),从而实现多参数实时数据的简化处理。在有了一定成功生产批次的积累后,以历史批次数据库为依据可建立批次MVA模型,以该模型为标准有助于提高控制偏差的发现率,及时对工艺参数进行调整可避免造成更大的损失。Largoni等^[43-44]利用simca软件通过MVA的手段实现了对疫苗产品质量的预测。通过利用PAT和MVA等技术,对细胞及病毒培养过程进行实时的监控及分析,可保证疫苗生产过程的稳定性和产品质量。

3 结语和展望

至今,疫苗仍是人类预防疾病的强有力手段,



实线箭头代表必要步骤, 虚线箭头代表可能发生的步骤。

The solid line arrows represent the necessary steps and the dashed line arrows represent the steps that may occur.

图1 QbD过程优化策略主体技术路线

Fig.1 Main technology process of optimization strategy by QbD principle

疫苗产业也是医疗卫生事业和生物技术产业的重点发展领域之一。随着人类生活质量的普遍提高和疾病预防意识的普及, 国内外的疫苗市场必将继续扩大。2012年, 诺华公司宣布美国FDA已批准人用流感疫苗Fluxelvax的上市, 这是通过动物细胞培养技术生产灭活疫苗发展历程中的一个关键时间节点。现今, 细胞分子改造和高通量细胞克隆筛选技术的不断提高, 将会不断推动疫苗生产细胞系种类的多样化和成熟性。基于DoE软件和病毒生物学机制的研究, 疫苗个性化培养基也将被不断改善, 更加适合细胞和病毒的生长。一次性生物反应器的发展以及基于微反应器的平行细胞培养技术的进步, 会大大推动疫苗生产的规模和稳定性。在疫苗质量控制方面, 首先基于疫苗的结构和免疫学研究, 建立起更多的质量控制标准和检测方法。在QbD理念的驱动下, 不断完善疫苗生产工艺, 提高对疫苗产品质量的控制力。疫苗生产多培养参数的在线检测与分析, 为疫苗产品的生产工艺控制和质量预测提供了有效手段。随着研究人员对病毒与细胞相互作用理解的加深、对细胞培养过程中营养及代谢产物的监控手段的逐渐丰富以及在生产中控制质量的理念日益加深, 我们有理由相信, 未来将会陆续有多个基于动物细胞培养的人用疫苗产品获得批准生产。同时, 随着国内外疫苗产业的进步与交流, 国际先进的疫苗生产技术必将推动着我国疫苗产业向规模化、标准

化的方向改进和完善。

参考文献 (References)

- 1 赵明东, 杨喻然. 人用疫苗与人工免疫. 生物学教学 (Zhao Migdong, Yang Yuran. Human vaccine and artificial immunity. *Biology Teaching*) 2019; 44(3): 75-6.
- 2 Kretzmer G. Industrial processes with animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59(2/3): 135-42.
- 3 Rhim JS, Schell K, Creasy B, Case W. Biological characteristics and viral susceptibility of an african green monkey kidney cell line (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132(2): 670-8.
- 4 Barrett PN, Terpening SJ, Snow D, Cobb RR, Kistner O. Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases. *Expert Rev Vaccines* 2017; 16(9): 883-94.
- 5 Abbate T, Dewasme L, Vande Wouwer A. Variable selection and parameter estimation of viral amplification in vero cell cultures dedicated to the production of a dengue vaccine. *Biotechnol Prog* 2019; 35(1): e2687.
- 6 Hoeksema F, Karpilow J, Luitjens A, Lagerwerf F, Havenga M, Groothuizen M, *et al.* Enhancing viral vaccine production using engineered knockout vero cell lines-a second look. *Vaccine* 2018; 36(16): 2093-103.
- 7 Liu CC, Wu SC, Wu SR, Lin HY, Guo MS, Yung-Chih Hu A, *et al.* Enhancing enterovirus A71 vaccine production yield by microcarrier perfusion bioreactor culture. *Vaccine* 2018; 36(22): 3134-9.
- 8 Mattos DA, Silva MV, Gaspar LP, Castilho LR. Increasing vero viable cell densities for yellow fever virus production in stirred-tank bioreactors using serum-free medium. *Vaccine* 2015; 33(35): 4288-91.
- 9 Wu CY, Lin YW, Kuo CH, Liu WH, Tai HF, Pan CH, *et al.* Inactivated enterovirus 71 vaccine produced by 200-L scale serum-

- free microcarrier bioreactor system provides cross-protective efficacy in human SCARB2 transgenic mouse. *PLoS One* 2015; 10(8): e0136420.
- 10 Fiore AE, Bridges CB, Katz JM, Cox NJ. *Vaccines*, 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc 2013, 257-93.
- 11 Halstead SB, Jacobson J, Dubischar-Kastner K. *Vaccines*, 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2013, 312-51.
- 12 Murphy TV, Feinstone SM, Bell BP. *Vaccines*, 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2013, 183-204.
- 13 黄腾, 李艳萍, 万宗举, 毛群颖, 高佳梅, 蔡祥勇, 等. 甲肝灭活疫苗(Vero细胞)在2岁以上中国健康人群的免疫原性和安全性研究. *应用预防医学* (Huang Teng, Li Yanping, Wan Zongju, Mao Qunying, Gao Jiamei, Cai Xiangyong, *et al.* Immunogenicity and safety of inactivated hepatitis A vaccines in Chinese healthy population over 2 years of age. *J Applied Prev Med* 2016; 22(3): 193-7+201.
- 14 Rupprecht CE, Plotkin SA. *Vaccines*, 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2013, 646-68.
- 15 Vidor E. *Vaccines*. In: Plotkin's *Vaccines*, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 2018, 841-65.
- 16 Madin SH, Darby NB Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958; 98(3): 574-6.
- 17 Capstick PB, Telling RC, Chapman WG, Stewart DL. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* 1962; 195: 1163-4.
- 18 Capstick PB, Garland AJ, Chapman WG, Masters RC. Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. *Nature* 1965; 205(976): 1135-6.
- 19 Pieler MM, Frentzel S, Bruder D, Wolff MW, Reichl U. A cell culture-derived whole virus influenza A vaccine based on magnetic sulfated cellulose particles confers protection in mice against lethal influenza A virus infection. *Vaccine* 2016; 34(50): 6367-74.
- 20 Kluge S, Genzel Y, Laus K, Serve A, Pflugmacher A, Peschel B, *et al.* Ezrin and HNRNP expression correlate with increased virus release rate and early onset of virus-induced apoptosis of MDCK suspension cells. *Biotechnol J* 2016; 11(10): 1332-42.
- 21 Wang H, Guo S, Li Z, Xu X, Shao Z, Song G. Suspension culture process for H9N2 avian influenza virus (strain Re-2). *Arch Virol* 2017; 162(10): 3051-9.
- 22 van Wezel AL. Growth of cell-strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature* 1967; 216(5110): 64-5.
- 23 Lee E, Lim ZR, Chen HY, Yang BX, Lam AT, Chen AK, *et al.* Defined serum-free medium for bioreactor culture of an immortalized human erythroblast cell line. *Biotechnol J* 2018; 13(4): e1700567.
- 24 Bruhlmann D, Sokolov M, Butte A, Sauer M, Hemberger J, Souquet J, *et al.* Parallel experimental design and multivariate analysis provides efficient screening of cell culture media supplements to improve biosimilar product quality. *Biotechnol Bioeng* 2017; 114(7): 1448-58.
- 25 Liu X, Zhao L, Wang Y, Zhang X, Tan W-S. Effects of calcium ion on adenovirus production with high densities of HEK293 cells. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2010; 15(3): 414-20.
- 26 黄锭. 基于MDCK细胞高密度培养的甲型流感病毒疫苗生产工艺开发与优化: 华东理工大学(Huang Ding. Development and optimization of influenza A virus propagation process based on high density MDCK cell culture system. East China University of Science and Technology) 2016.
- 27 Tsao YS, Condon R, Schaefer E, Lio P, Liu Z. Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells. *Cytotechnology* 2001; 37(3): 189-98.
- 28 Liu X, Wang Y, Niu H, Zhang X, Tan W-S. The improvement of adenovirus vector production by increased expression of coxsackie adenovirus receptor. *Biotechnol Lett* 2009; 31(7): 939-44.
- 29 Zhou Y, Han LR, He HW, Sang B, Yu DL, Feng JT, *et al.* Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by streptomyces kanasensis ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules* 2018; 23(1): E125.
- 30 Xu S, Hoshan L, Jiang R, Gupta B, Brodean E, O'Neill K, *et al.* A practical approach in bioreactor scale-up and process transfer using a combination of constant P/V and vvm as the criterion. *Biotechnol Prog* 2017; 33(4): 1146-59.
- 31 Chalmers J. Animal cell culture, effects of agitation and aeration on cell adaptation. *Encyclopedia of cell technology*, Hoboken: Wiley-Interscience 2000; 1: 41-51.
- 32 Tescione L, Lambropoulos J, Paranandi MR, Makagiansar H, Ryll T. Application of bioreactor design principles and multivariate analysis for development of cell culture scale down models. *Biotechnol Bioeng* 2015; 112(1): 84-97.
- 33 Janakiraman V, Kwiatkowski C, Kshirsagar R, Ryll T, Huang YM. Application of high-throughput mini-bioreactor system for systematic scale-down modeling, process characterization, and control strategy development. *Biotechnol Prog* 2015; 31(6): 1623-32.
- 34 Formenti LR, Norregaard A, Bolic A, Hernandez DQ, Hagemann T, Heins AL, *et al.* Challenges in industrial fermentation technology research. *Biotechnol J* 2014; 9(6): 727-38.
- 35 Joseph A, Goldrick S, Mollet M, Turner R, Bender J, Gruber D, *et al.* An automated laboratory-scale methodology for the generation of sheared mammalian cell culture samples. *Biotechnol J* 2017; 12(5).
- 36 Q8 (R2) Pharmaceutical development. US Food and Drug Administration ed, 2009.
- 37 Q9 Quality risk management. US Food and Drug Administration ed, 2006.
- 38 Q10 Pharmaceutical quality system. US Food and Drug Administration ed, 2008.
- 39 Q11 Development and manufacture of drug substances. US Food and Drug Administration ed, 2012.
- 40 Haas J, Franklin A, Houser M, Maraldo D, Mikola M, Ortiz R, *et al.* Implementation of QbD for the development of a vaccine candidate. *Vaccine* 2014; 32(24): 2927-30.
- 41 Agarabi CD, Chavez BK, Lute SC, Read EK, Rogstad S, Awotwe-Otoo D, *et al.* Exploring the linkage between cell culture process parameters and downstream processing utilizing a plackett-burman design for a model monoclonal antibody. *Biotechnol*

- Prog 2017; 33(1): 163-70.
- 42 易小萍. 动物细胞培养过程PAT和在线生物检测技术. 生物产业技术(Yi Xiaoping. PAT and on-line biological detection technology for animal cell culture. *Biotechnol and Business*) 2018; 1: 33-40.
- 43 Largoni M, Facco P, Bernini D, Bezzo F, Barolo M. Quality-by-Design approach to monitor the operation of a batch bioreactor in an industrial avian vaccine manufacturing process. *J Biotechnol* 2015; 211: 87-96.
- 44 Luttmann R, Borchert S-O, Mueller C, Loegering K, Aupert F, Weyand S, *et al.* Sequential/parallel production of potential malaria vaccines-a direct way from single batch to quasi-continuous integrated production. *J Biotechnol* 2015; 213: 83-96.

中国细胞生物学报