

Application of Automatic System for the Preparation and Delivery of Sterile Solutions in Varicella Vaccine Production

Bo Zheng^{1,2}, Chen Liang¹, Zhongfeng Ma³, Zhongliang Ma^{1*}

¹School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai

²Shanghai Institute of Biological Products Co., Ltd., Shanghai

³Binhai Foma Pharmaceutical Chemical Co. Ltd., Yancheng Jiangsu

Email: patrickzhhb@163.com, *zlma@shu.edu.cn

Received: Nov. 2nd, 2015; accepted: Nov. 18th, 2015; published: Nov. 27th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: Application of automatic system for the preparation and delivery of sterile solutions in varicella vaccine production meets the demand of scale production of varicella vaccine by use of cell factory. And it reduces differences between batches. **Methods:** The solutions for varicella vaccine passage are prepared by automatic system or manual operation mode. It is compared in cell growth, operating time, and product test of the two modes. **Results:** In the case of the same amount of cell recovery, almost no differences between the varicella vaccine production batches can be found, and it takes shorter operation time in use of automatic operation system than the manual operation mode. And the detection of indicators is qualified. **Conclusion:** The use of automatic system to prepare and deliver sterile solutions in varicella vaccine production can improve the homogeneity between vaccine batches, reduce labor intensity, shorten operation time, reduce transportation and other intermediate links, and decline the risk of contamination, which is able to meet the requirements for varicella vaccine cell factory scale production.

Keywords

Automatic System for the Preparation and Delivery of Solutions, Varicella Vaccine, Clean in Place, Sterilization in Place

*通讯作者。

自动化溶液配制输送系统在水痘疫苗生产中的应用

郑波^{1,2}, 梁辰¹, 马中锋³, 马中良^{1*}

¹上海大学生命科学学院, 上海

²上海生物制品研究所有限责任公司, 上海

³滨海福马生物医药公司, 江苏 盐城

Email: patrickzhhb@163.com, *zlma@shu.edu.cn

收稿日期: 2015年11月2日; 录用日期: 2015年11月18日; 发布日期: 2015年11月27日

摘要

目的: 应用自动化系统配制输送用于生产水痘疫苗的无菌溶液, 以满足水痘疫苗细胞工厂的规模化量产需求, 减少批间差异。**方法:** 将采用自动化系统配制输送用于水痘疫苗的传代制备所需溶液, 与人工操作方式进行对照, 比较两种操作方式的细胞生长情况、操作时间等, 并对制备的疫苗原液进行相关检定。**结果:** 在同样细胞复苏量的情况下, 采用自动化操作系统比人工操作生产的水痘疫苗批间差异小, 操作时间短, 且相关检测指标均合格。**结论:** 利用自动化溶液配制输送系统制备用于生产水痘疫苗的无菌溶液, 提高了批间均一性, 降低人工劳动强度, 缩短操作时间, 减少转运等中间环节, 降低污染风险, 可满足水痘疫苗细胞工厂的大规模生产。

关键词

自动化溶液配制输送系统, 水痘疫苗, 在位清洗, 在位灭菌

1. 引言

水痘是由水痘-带状疱疹病毒(Varicella Zoster Virus, VZV)引起的急性呼吸道传染病, 具有高度传染性, 常见于儿童, 发热伴全身瘙痒性皮炎、斑疹、丘疹和水疱疹是其主要临床特征[1]。自 1974 年 Oka 株水痘减毒活疫苗(Varicella Attenuated Live Vaccine, VarV)问世以来, 已在众多国家陆续开展接种并取得了明显的保护效果。国外研究表明, 1~12 岁儿童接种 1 剂 VarV 的疫苗保护率为 90.2%~94.4%, 接种 2 剂的保护效果为 96.4%~98.3%。而且近年来研究发现, 国产水痘疫苗在中国人群中的安全性和免疫效果良好, 与进口疫苗差异无统计学意义[2]-[6]。

当前, 我国的水痘疫苗生产多采用 Roux 瓶、转瓶工艺[7]-[10]或采用细胞工厂工艺[11], 其生产用溶液的配制输送多采用人工操作的方式, 即配制、分装、灭菌、冷藏、转运至工艺生产区使用。仅上海生物制品研究所有限责任公司生产水痘疫苗时, 使用的是自动化溶液配制输送系统。人工操作方式虽满足了现有工艺的供给, 但仍存在人工劳动强度较高和批间差异大的问题, 特别是在供给 40 层细胞工厂规模化使用时, 这一问题更为突出。因此, 为了满足设计年产量逾千万支, 为了配合大规模地制备水痘疫苗, 我们使用了自动化系统来配制输送大量的无菌溶液, 以达到提高疫苗批间均一性, 降低人工劳动强度的目的[12]-[15]。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 细胞株

MRC-5 (ATCC, 美国菌种保藏中心); Oka 株水痘毒种(日本大阪大学微生物病研究会)。

2.1.2. 仪器与试剂

自动化配制输送系统(日本森松)

细胞工厂培养箱(Incubator, 美国 Thermofisher); 细胞工厂操震动器(Shaker, 美国 Thermofisher); 多层培养器显微镜观察装置(日本四国); 10 层、40 层细胞工厂(单层培养面积 632 cm^2 , NUNC); Roux 瓶(培养面积 300 cm^2)。MEM、胰蛋白酶(GIBCO); 氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(国药集团化学试剂公司); 胎牛血清(上海慧人生物科技工程研究所); 其他试剂均为市售分析纯。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养

将 24 代 MRC-5 细胞复苏后, 37°C 静置培养 3~5 d, 细胞株进行传代扩增, 对人工操作方式和应用全自动化系统方式配制输送无菌溶液 所 制备的细胞工厂细胞进行细胞观察、活细胞计数等对比。

2.2.2. 疫苗原液收获

细胞连续传代至 32 代接种相同 MOI 值的 32 代水痘 Oka 株工作毒种, 37°C 静置培养 2~3 d 收获感染细胞, 加适量稳定剂制成原液。

2.2.3. 疫苗原液检定

按照经国家食品药品监督管理局批准的水痘减毒活疫苗注册标准对两种方式制备的原液分别进行检定[16], 内容包括病毒滴度、无菌检查等。

3. 结果

3.1. MRC-5 细胞的生长情况比较

在人工操作方式和自动化操作方式这两种操作方式下传代的 MRC-5 细胞贴壁速度均较快, 所有细胞呈梭形, 胞质饱满, 轮廓清晰。

略有区别的是, 人工操作方式下细胞工厂中的 MEM 溶液颜色偏红, 细胞贴壁略不均匀; 自动化操作方式下培养的 MRC-5 细胞, 细胞生长略快, 同样培养时间内, 梭形细胞形成后贴壁的范围更大, 见图 1。

而且自动化操作方式下培养的 MRC-5 细胞, 进入对数生长期后活细胞计数结果为 $5.5 \times 10^6/\text{ml}$ 较人工方式的 $5.1 \times 10^6/\text{ml}$ 略高, 细胞生长略快。

3.2. MRC-5 细胞接种水痘病毒后的状态比较

两种操作方式培养的 MRC-5 细胞在病毒感染均呈现均匀致密单层, 呈融合状, 轮廓清晰; 略有区别的是, 使用人工方式配制输送的溶液培养的细胞工厂中的, 珠状病毒数略少, 见图 2。

3.3. 不同操作方式完成各工序情况的比较

在同等条件下, 应用自动化系统相比人工操作方式, 有着以下诸多的优越性, 见表 1:



Figure 1. Growth state of MRC-5 cells in each mode: (a) Cells in manual operation; (b) Cells in automotive operation system

图 1. 两种操作方式下 MRC-5 细胞的生长状态: (a) 人工操作方式下的细胞; (b) 自动化操作系统方式下的细胞

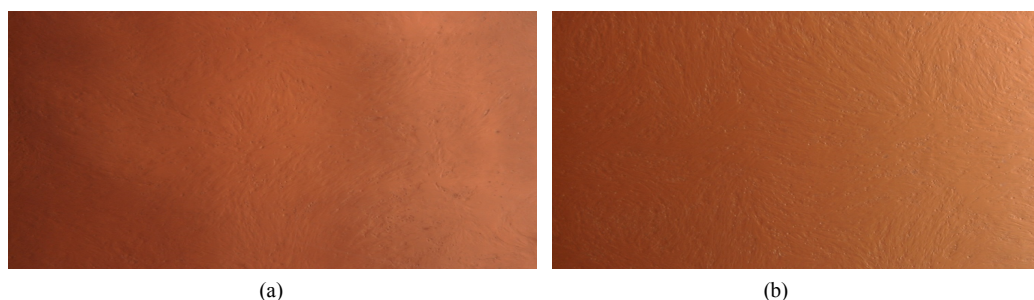


Figure 2. Growth state of MRC-5 cells seeded with varicella virus in each mode: (a) Cells in manual operation; (b) Cells in automotive operation system

图 2. 两种操作方式 MRC-5 细胞接种水痘病毒后的生长状态: (a) 人工操作方式下的细胞; (b) 自动化操作系统方式下的细胞

Table 1. Comparison with different operation and the completion of each step of the case

表 1. 同等条件下采用不同操作方式及完成各工序情况的比较

方式	人数	处理量	耗时	风险可控性					操作时间
				分装	灭菌	暂存	转运	使用	
人工操作	9	400 L	3 d	敞开瓶口	蒸汽灭菌柜灭菌	冷藏	经过非无菌环境	定量开瓶	定量更换供给
自动操作	3	800 L	2 d	封闭管路、无菌呼吸器、正压保护	在位灭菌、二次除菌过滤	保温	经过灭菌的输送管道	无菌对接	实时供给、无中断

1) 降本增效

应用自动化系统减少了人员数量，降低了人工成本和劳动强度；单批处理能力得到大幅提升；缩短了工时，增加了产能，便于调整工作计划。

2) 风险可控性

应用自动化系统提高了风险可控性，其提供多重灭菌保护，减少了污染风险，实现了无菌分装，便于无菌操作；自动化系统减少了非无菌环境转运、冷藏等中间环节，进一步降低了潜在风险。

3) 减少延迟时间

应用自动化系统缩短了工艺培养的换液等时间，有利于工艺培养物的生长。

自动化设备在规范化操作和可追溯性上有明显优势，符合生物制药发展趋势，安全可控，适合大规模疫苗生产，符合 GMP 规范要求。

Table 2. Virus titer
表 2. 原液病毒滴度

操作方式	批号	病毒滴度(1 gPFU·mL ⁻¹)
人工操作	S20140801	5.0
	S20140802	5.2
	S20140803	5.1
自动操作	S20140804	5.2
	S20140805	5.2
	S20140806	5.2

3.4. 原液病毒滴度比较

采用两种操作方式提供的无菌溶液制备的水痘原液，应用自动化配制输送系统的无菌溶液制备的原液滴度及均一性都略优于人工操作方式的。

原液病毒滴度，见表 2。

4. 讨论

鉴于自动化配制输送系统是一种制备无菌溶液的安全操作方式，具有良好的风险可控性，该技术已逐渐被越来越多的国内疫苗生产企业所接受，对企业扩大疫苗产量起到了重要作用[17]。由此可见，自动化系统的应用将会越来越广泛，并将迅速成为较成熟的技术手段满足规模化生产。

目前，制造无菌药品的自动化溶液配制输送系统，普遍采用人机界面固定工艺参数及程序流程，控制配制罐配制、管道输送等操作，利用在位清洗(CIP, Clean in Place)、在位灭菌(SIP, Sterilize in Place)技术，达到有效的清洗和可靠的灭菌目的[17][18]。在其设计、选型、验证等阶段，符合了预定的主要用途，满足了 2010 版 GMP 规范中[19][20]，保证了人用药品的“安全、有效、质量可控”的要求。并且可以根据具体工艺编制不同的程序，更好地满足工艺需求，更好地实现操作的自动化和标准化。

从实验结果来看，采用自动化系统供给溶液更有利于细胞生长，其所制备的水痘原液病毒滴度比人工操作方式的制备的水痘原液略高，且均一性较好，批间差异小；使用过程安全可靠，提供多重无菌保证，风险可控。

综上所述，从我们的结果来看，利用自动化操作系统制备水痘疫苗所需溶液，实现了降本增效，为水痘疫苗生产的规模扩大提供了可靠的平台。

基金项目

抗肺癌药物的开发(校企合作)。

致 谢

本文在科研过程及写作中也得到了本单位王亮、马相虎等老师的帮助及上海大学刘山莉、沈忠明等老师的帮助。

参考文献 (References)

- [1] 许青, 徐爱强. 我国水痘流行病学分析与水痘疫苗免疫预防研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(10): 1093-1097.
- [2] Kattan, J.A., Sosa, L.E., Bohnwagner, H.D., et al. (2011) Impact of 2-Dose Vaccination on Varicella Epidemiology:

- Connecticut-2005-2008. *Journal of Infectious Diseases*, **203**, 509-512. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiq081>
- [3] 唐万琴, 张翔, 朱中奎, 等. 国产与进口水痘减毒活疫苗安全性和免疫效果 Meta 分析[J]. 中国学校卫生, 2014, 35(2): 237-242.
- [4] Vazquez, F.L., Torres, A., Blanco, V., *et al.* (2012) Comparison of Relaxation Training with a Cognitive-Behavioral Intervention for Indicated Prevention of Depression in University Students: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Psychiatric Research*, **46**, 1456-1463. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.08.007>
- [5] WHO (2014) WHO Model List of Essential Medicines.
- [6] Carrillo-Santistevé, P. and Lopalco, P.L. (2014) Varicella Vaccination: A Labourer's Take-Off. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**, 86-91. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12580>
- [7] 陈志慧, 王宪明, 殷月娣, 等. 水痘减毒活疫苗的研制及免疫效果观察[J]. 国际生物制品学杂志, 2006, 29(3): 97-100.
- [8] 王斐, 单雪峰, 戴长河, 等. 水痘减毒活疫苗生产工艺研究[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(10): 1175-1177.
- [9] 徐建军, 王宪明, 殷月娣, 等. 冻干水痘减毒活疫苗的生产工艺[J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(5): 297-298.
- [10] Hambleton, S. and Gershon, A.A. (2005) Preventing Varicella-Zoster Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, **18**, 70-80. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.1.70-80.2005>
- [11] 王亮, 杨月莲, 周锋, 等. 细胞工厂在水痘疫苗生产中的应用[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(10): 1178-1181.
- [12] 周妍, 仲宇航, 王云霞, 等. 细胞工厂制备冻干甲型肝炎减毒活疫苗猴体安全性和免疫原性研究[J]. 预防医学论坛, 2012, 18(7): 526-527.
- [13] 周妍, 王云霞, 仲宇航, 等. 细胞工厂制备冻干甲型肝炎减毒活疫苗的研究[J]. 预防医学论坛, 2012, 18(8): 595-597.
- [14] 李红芳, 赵祖波, 任红卫. 应用细胞工厂建立人用狂犬病疫苗连续培养多次收获工艺[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(6): 25-29.
- [15] 安红, 张海红, 王名强. 细胞工厂培养轮状病毒基因重配株 Ls(G3 型)条件的优化研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 41(1): 25-30.
- [16] WHO (1994) TRS Requirement for Varicella Vaccine (Live).
- [17] 陈月菊. 谈大容量注射剂配料系统质量风险及控制方法[J]. 企业科技与发展, 2011, 16(8): 46-47.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [19] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 药品 GMP 指南(无菌药品) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
- [20] 国家卫生部. 药品生产质量管理规范(2010 年修订) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.