

建立以30公升生物反應器量產重組蛋白抗原之技術平台

薛凱仁、胡曉明、陳懷星、朱純燕*

*國立屏東科技大學、動物疫苗科技研究所

信箱: cychu@mail.npust.edu.tw

電話: (08)770-3202#5330

一、源起

次單位疫苗已成為新一代疫苗開發之重點項目，為解決工業化生產之瓶頸，需建立以大腸桿菌高密度發酵量產基因工程蛋白之表現系統。本技術可應用於生產疫苗用抗原之重組蛋白，達到高體積產率、高生長速率、高產物濃度以及低原料成本，並同時縮短重組蛋白之生產時間，發展為低成本之疫苗用抗原之技術平台。本技術開發選用豬鏈球菌 (*Streptococcus suis*; *S. suis*) 重組蛋白為模式抗原之主要原因，乃因本病為人畜共通傳染疾病之一，根據行政院家畜衛生試驗所於2008年進行台灣豬場呼吸道病原分析，發現細菌性疾病佔第一名為豬鏈球菌高達80%。本菌依莢膜表面多醣體 (cps) 之不同，已被證實共有33種血清型之多，感染豬隻會引起關節炎、腦膜炎、敗血症等症狀甚至造成突發性死亡，已成為養豬產業經濟損失之重要病因之一。由於目前台灣缺乏豬鏈球菌疫苗，又受限於血清型太多之開發瓶頸，導致防疫上困難重重，急須發展有效疫苗以預防本疾病之發生。

二、設計概念

工業用酵素與醫療用蛋白常選擇大腸桿菌 (*E. coli*) 作為重組蛋白的生產系統，主要是 *E. coli* 的生理及代謝機制已被研究得相當透徹，且運用在生物技術上也較為成熟。目前發展商品化重組次單位疫苗最大瓶頸在於製程量產技術，由於傳統細菌性生產重組蛋白抗原大多以10 L玻璃搖瓶為主，因受限於培養空間、養份消耗、代謝產物累積且又無法供應氣體，並不適合長期培養與大規模量產。因此，需發展具有效率之量產技術作為降低成本之生產平台。

三、技術開發

利用30公升先導型生物反應器培養大腸桿菌，隨後以饋料批次培養模式提高生產效率，並探討醋酸鹽與氧氣在整個發酵過程中的關係、培養基的組成份及細菌生長條件，進而增加豬鏈球菌重組蛋白 rSao 之產量，作為可發展為生產低成本疫苗用抗原之產業化技術平台，並選用不同分段之豬鏈球菌重組蛋白抗原，試製成不同組合之次單位疫苗，接種於動物進行一系列之免疫分析與效力評估試驗。

四、技術競爭

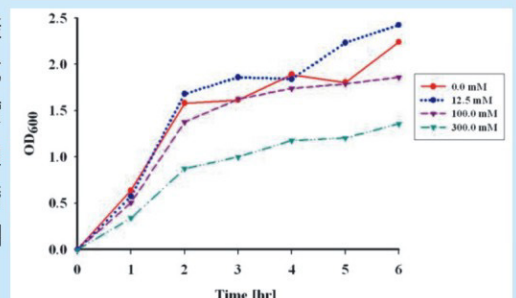
文獻指出豬鏈球菌表面蛋白 Sao (surface antigen one) 為一重要抗原，且能被28種不同血清型所辨識，是發展為跨血清型抗原之最佳候選抗原。本研究已成功表現 Sao 重組蛋白 (rSao)，並以先導型30公升生物反應器量產抗原，經西方墨點法證實能夠被 *S. suis* 攻毒後的豬血清所辨識。於小鼠試驗中，免疫rSao 全長組較其他各組及不免疫對照組，可有效提升抗體力價 ($p < 0.01$)，並耐過血清型第1型之攻毒，證實 rSao 對於不同血清型之豬鏈球菌具交叉保護作用，由上述結果顯示 rSao 具有發展為次單位疫苗之潛力。經由本計畫產業化之研究成果，除了可以申請專利、發表論文於期刊、並可技術轉移至動物疫苗產業，取得商品化之成果嘉惠於畜牧業者。

五、研發成果

已成功將細菌性抗原由基因選殖、目標蛋白小量表現提升為以先導工廠級發酵槽之量產技術 (圖一)，並改良培養基成份及培養條件 (圖二)，及確立發酵槽之培養參數條件 (圖三)，以提高目標蛋白之產量。為改善重組蛋白之表現量，先利用電腦軟體分析及篩選所需之抗原片段 (圖四)，並利用基因工程技術選殖與分別表現Sao全長、Sao N端及Sao



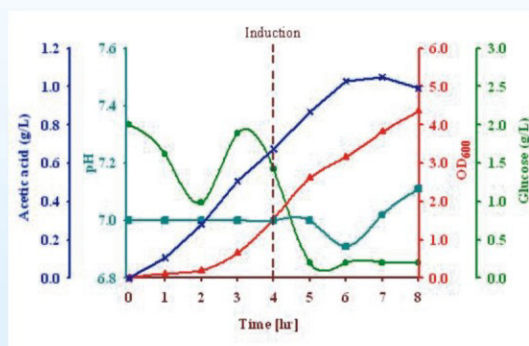
圖一 細菌性抗原選殖及重組蛋白量產技術平台



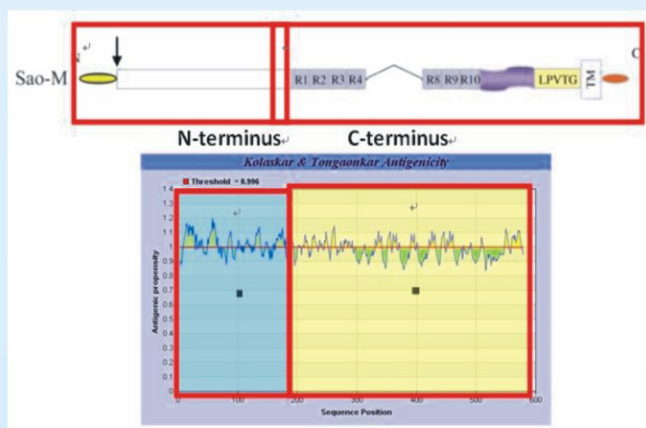
圖二 不同氮源濃度饋料對細菌生長的影響

C端(圖五),再與佐劑混合試製為重組次單位疫苗,分別為(A) rSao-全長組、(B) rSao-N端組、(C) rSao-C端組、(D) 空載體、(E) 對照組,以小鼠進行抗原性及效力分析。將上述疫苗分別以肌肉注射0.2 mL免疫小鼠,2週再後以血清1型P1進行腹腔攻毒,每日觀察計算存活率,結果rSao 全長組為80%,C端組為40%,N端組、空載體及對照組均為0%(圖六)。分析小鼠IgG 血清抗體結果顯示,免疫14天後再補強注射一次,免疫全長組及C端組較其他三組具顯著性差異($p<0.05$)(圖七)。

本研究已成功以30公升生物反應器量產豬鏈球菌Sao重組蛋白並建立量產技術平台,成果已辦理技術移轉、申請專利及進行新藥查驗登記作業程序,可望應用於動物疫苗之重組蛋白量產製程,達到產品一致化及降低生產成本之目標,協助本國動物疫苗產業之技術升級及進軍國際市場。



圖三 生物反應器參數之設定



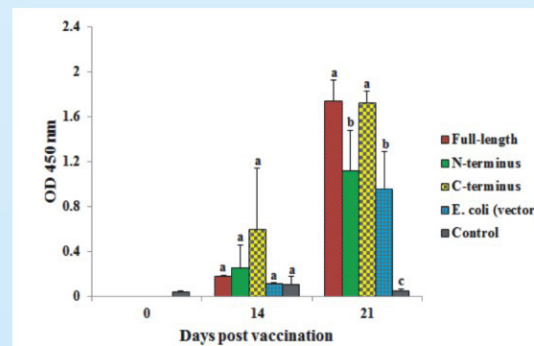
圖四 利用IEDB (Immunoepitope database) 預測Sao之N端及C端抗原性位置



圖五 以SDS-PAGE分析表現rSao蛋白分子量。F:全長(110 KDa)、N端(58 KDa)及C端蛋白(67 KDa)

隻數	Dead	Alive	Survival Rate
rSao 全長	1	4	80 %
rSao N端	5	0	0 %
rSao C端	3	2	40 %
pET32a 載體	5	0	0 %
對照組	5	0	0 %

圖六 免疫小鼠攻毒後之存活率。(A)rSao全長組、(B)rSao-N端組、(C)rSao-C端組、(D) 空載體及 (E)對照組。以肌肉注射試製疫苗0.2mL, 2週後以血清型第1型P1株行腹腔攻毒。



圖七 小鼠免疫後IgG抗體之分析。Full-length: 全長蛋白、N-terminus: N端蛋白、C-terminus: C端蛋白、Vector:空載體、Control:不免疫對照組。以肌肉注射試製疫苗0.2 mL, 14天後再補強注射一次

六、致謝

本研究感謝國科會之經費補助,計畫編號為NSC99-2324-B-020-001-MY2。

七、參考文獻

- 1.朱純燕*、許世芳、黃瑞豪、徐榮彬、薛凱仁。2009。以多引子聚合(西每)連鎖反應快速偵測台灣南部豬鏈球菌之血清型及毒力相關基因。臺灣獸醫學雜誌。35(2) 107-114.
- 2.Li Y, Martinez G, Gottschalk M, Lacouture S, Willson P, Dubreuil JD. Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infection and immunity* 74:305-312, 2006.
- 3.Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, Dubreuil JD, Willson P. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clin Vaccine Immunol* 14:937-943, 2007.