



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102816732 B

(45) 授权公告日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201210224401. 6

C12R 1/91 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 28

C12R 1/93 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6210 2012. 06. 14

(56) 对比文件

CN 101760442 A, 2010. 06. 30, 全文.

(73) 专利权人 北京健翔和牧生物科技有限公司

地址 100176 北京市大兴区亦庄经济开发区  
康定街 6 号保吉安大厦 2 层

专利权人 山西隆克尔生物制药有限公司

黄锭. 用于流感疫苗生产的 MDCK 细胞无血清  
单细胞悬浮培养体系的开发. 《中国优秀硕士学  
位论文全文数据库(基础科学辑)》. 2010, A006-99  
页.

(72) 发明人 张澍 吕宏亮

黄锭等. 犬肾细胞 MDCK 无血清贴壁及单细胞  
悬浮培养. 《生物工程学报》. 2011, 第 27 卷 (第  
4 期), 645&#8722

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理  
有限责任公司 11139

652.

代理人 孙皓晨

审查员 郭磊

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010. 01)

C12N 7/00 (2006. 01)

A61K 39/145 (2006. 01)

A61P 31/16 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系及其  
在培养流感病毒、生产流感病毒疫苗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一株适应全悬浮培养的 MDCK  
细胞系及其在培养流感病毒、生产流感病毒疫苗  
中的应用,属于生物技术领域。本发明的一株适应  
全悬浮培养的 MDCK 细胞系,命名为 MDCK-ZL2012,  
其菌种保藏编号为 :CGMCC No. 6210。本发明还提  
供了利用所述的细胞系培养流感病毒的方法。本  
发明所提供的 MDCK 细胞系实现了 MDCK 细胞在无  
血清培养基中的全悬浮培养,因而采用本发明的  
MDCK 细胞系进行流感病毒的培养,一方面增加了  
流感抗原病毒的产量,降低了流感病毒生产的成  
本,另一方面也降低了培养流感病毒时的外源因  
子污染的风险和在疫苗使用引起的应急反应,也  
使后续病毒处理如澄清、微滤、超滤、纯化等步骤  
更加简单易行。

CN 102816732 B

1. 一株适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系,命名为 MDCK-ZL2012,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其菌种保藏编号为 :CGMCC No. 6210。

2. 权利要求 1 所述的 MDCK 细胞系在培养流感病毒中的应用。

3. 权利要求 1 所述的 MDCK 细胞系在生产流感病毒疫苗中的应用。

4. 一种培养流感病毒的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)将权利要求 1 所述的 MDCK 细胞系接种于无血清培养基中进行悬浮培养,得到 MDCK 细胞悬浮培养液;

(2)当 MDCK 细胞悬浮培养液中的细胞密度达到  $1.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^7$  个 /ml 时,按照 MOI 0.01-0.1 接种流感病毒;

(3)病毒液在 32℃ 培养 3-4 天收获病毒上清液,即得流感病毒液。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于所述的流感病毒为人流感病毒、马流感病毒、禽流感病毒、猪流感病毒或犬流感病毒。

## 适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系及其在培养流感病毒、生产流感病毒疫苗中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种 MDCK 细胞系及其应用,特别涉及一种适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系及其在培养流感病毒、生产流感疫苗中的应用。本发明属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 流感病毒疫苗的制备经过了从动物组织器官到细胞培养的规模化发展过程,动物流感病毒的培养也经历了从鸡胚向哺乳细胞大规模培养,从哺乳动物细胞的微载体悬浮培养到全悬浮培养,从动物源血清的培养到无动物源血清或成分的培养的发展过程,并结合离心纯化以及柱层析纯化,使动物流感病毒或抗原生产方法的可控性提高,也减少了疫苗注射引起的应急反应。从采用的培养基上看,无动物源血清或成分的培养基使得在病毒培养或疫苗生产中遭受外源污染的风险降低。

[0003] 尽管这样,常用的用于培养流感病毒的细胞系仍存在各种缺点,因此仍无法满足目前生产流感病毒疫苗的需求,例如 MDCK 具有致癌性, Vero、PER-C6 的病毒产量较低。因此研究一种安全,高产的细胞基质将是现行流感疫苗工艺研究的重要问题。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一株适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系,还提供了利用所述的细胞系培养流感病毒的方法。

[0005] 具体的,本发明采用了以下技术手段:

[0006] 本发明的一株适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系,命名为 MDCK-ZL2012,分类命名为狗肾细胞,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址在北京市朝阳区北辰西路 1 号院中科院微生物研究所,其菌种保藏编号为:CGMCC No. 6210,保藏日期为 2012 年 6 月 14 日。

[0007] 本发明还提供了所述的 MDCK 细胞系在培养流感病毒和生产流感病毒疫苗中的应用。

[0008] 本发明的一种培养流感病毒的方法,其特征在于包括以下步骤:

[0009] (1)将所述的 MDCK 细胞系接种于无血清培养基中进行悬浮培养,得到 MDCK 细胞悬浮培养液;

[0010] (2)当 MDCK 细胞悬浮培养液中的细胞密度达到  $1.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^7$  个/ml 时,按照 MOI 0.01-0.1 接种流感病毒;

[0011] (3)病毒液在 32℃ 培养 3-4 天收获病毒上清液,即得流感病毒液。

[0012] 在本发明中的一种培养流感病毒的方法中,其特征在于所述的流感病毒为人流感病毒、马流感病毒、禽流感病毒、猪流感病毒或犬流感病毒。

[0013] 与现有技术相比,本发明的有益之处在于:

[0014] 1、本发明的一种适应全悬浮培养的细胞系能够在无其它任何载体的情况下实现

细胞的悬浮培养,因此实现了细胞培养密度的最大化,也减少了细胞培养的体积,减少了后续处理的劳动强度,使得各个细胞的产能等同或高出一般的贴壁培养,故而使生产流感病毒的效率提高,减少了时间和成本。

[0015] 2、本发明的一种细胞系能够在无动物源性的血清或成分的培养基中生长,因而降低了培养动物流感病毒时的外源因子污染的风险和在疫苗使用引起的应急反应,也使后续病毒处理如澄清、微滤、超滤、纯化等步骤更加简单易行,减少了工作量,更易纯化。

#### 附图说明

[0016] 图 1 为 MDCK-ZL2012 的细胞生长曲线图;

[0017] 图 2 为不同感染复数接种流感病毒后流感病毒复制的情况。

#### 具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0019] 本实施例涉及的材料来源:

[0020] 1、细胞:MDCK 细胞购自 ATCC;

[0021] 2、病毒:禽流感病毒 H5N2、禽流感病毒 H1N1, A/ 盐山 /01/2012H5N1、A/ 唐山 /02/2012, H5N1A/ 邢台 /03/2012 购自中国疾病预防控制中心病毒病控制所。

[0022] 培养基 MEM HAM 和 F12 培养基购买自 Invitogen 公司,酵母或豆类提取物购买自 Invitogen 公司

[0023] 实施例 1 适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系的制备

[0024] 1、MDCK 细胞在无血清或无动物源性的成分的培养基进行适应和驯化,培养基是 MEM HAM 和 F<sub>12</sub> 培养基的混合物,其中加入 1.5g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 无机盐以及 4.0g/L (0.5-8g/L 都可)的酵母或豆类提取物。

[0025] 2、MDCK 细胞以方瓶、转瓶按照 1:4 或 1:6 的方式扩大培养,37℃培养 5~6 天,氧饱和度和 20%。

[0026] 3、传代 2-4 代,得到明显适应无血清培养的 MDCK 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶 +0.02% 的 EDTA 在室温消化分散。

[0027] 4、分散后的 MDCK 细胞生长推迟,代次周期延至 7-9 天,传至 30-50 代次细胞趋于稳定,细胞生长曲线如图 1 所示。

[0028] 5、生物反应器中细胞培养密度的测定(个 /ml)。

[0029] 用胰酶消化细胞培养液并用细胞计数器对细胞密度进行测定,实验共进行了 3 次,其结果如表 1 所示:

[0030] 表 1 全悬浮细胞培养密度的测定

[0031]

批次	1	2	3
起始浓度	$8.2 \times 10^5$	$11.2 \times 10^5$	$15.5 \times 10^5$
培养后培养	$9.5 \times 10^6$	$25 \times 10^6$	$32 \times 10^6$

[0032] 经筛选,最后得到了一株适应全悬浮无血清培养的 MDCK 细胞系,命名为 MDCK-ZL2012,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其菌种保藏编号为:CGMCC No. 6210,保藏日期为 2012 年 6 月 14 日。

[0033] 实施例 2 MDCK-ZL2012 生产流感病毒的滴度测定

[0034] MDCK-2012 细胞系在无血清或无动物源性的成分的培养基中(培养基是 MEMHAM 和 F<sub>12</sub> 培养基的混合物,其中加入 1.5g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 无机盐以及 0.5-8g/L 的酵母 或豆类提取物),在 37℃,10%CO<sub>2</sub> 的培养条件下,采用转速为 30-50rpm 的转瓶培养细胞 3-4 天至单层,倒掉培养基,用含有 2mg/ml 双抗以及 3 μg/ml 胰酶-EDTA 的无血清培养基重悬细胞,全悬浮无血清培养 MDCK 细胞分散至 24 孔板,以 MOI0.01-0.1 接种禽流感病毒 H5N1 的病毒悬液,不同感染复数接种流感病毒后流感病毒复制的情况如图 2 所示,留有未加病毒液的孔作为空白,34℃ 培养 5 天,每孔取 300-400 μl 至 Eppendorf 管,加入冷的 PBS 至 1ml,5000rpm 离心 5 分钟,弃去上清,沉淀加入 100ml 冷的预侵液,4℃ 放置 20-25 分钟,加入 900 μl 预冷 PBS,5000rpm 离心 5 分钟,弃去上清,用 350 μl 的冷的染色液(PBS,1%BSA,0.1% NaAzide,5 μl IFIC 标记的流感蛋白抗体)重悬沉淀在 4℃ 放置 20-30 分钟,用 1ml 预冷的 PBS 洗涤 1-2 次,用细胞固定液 1ml 洗涤 1-2 次,在 4℃ 贮存或黑暗中保存 1 周,用流式细胞仪测定病毒滴度,共进行 3 批次实验,结果如表 2 所示,或将病毒上清液液氮快速冷冻传 -80℃ 保存。

[0035] 表 2 禽流感病毒滴度

[0036]

	批次 1	批次 2	批次 3
细胞密度(个/ml)	$8 \times 10^6$	$10 \times 10^6$	$30 \times 10^6$
病毒滴度 TCID <sub>50</sub> /0.1ml	7.5	8.3	9.4

[0037] 实施例 3 流感病毒感染 MDCK-ZL2012 细胞的噬斑分析

[0038] 将实施例 2 制备得到的流感病毒 H5N1 的病毒上清液 10 倍稀释后接种长成单层的 MDCK-ZL2012 细胞 6 孔板(培养基采用 DMEM+2Mm1-谷氨酰胺),37℃ 培养 1 小时后,用 PBS 洗涤 3 次,加入琼脂糖混合液(1.2ml 2.5% 琼脂糖、1.5ml 2 倍浓缩的 MEM,3 μl 的 200mM L-谷氨酰胺,24 μg 的胰酶-EDTA,250ml PBS)在 10%CO<sub>2</sub>,37℃,适宜湿度下,培养 3-4 天,观察噬斑并计数,该实验说明流感病毒在经驯化适应的 MDCK 细胞上的生长适应,形成单一的噬斑。

[0039] 实施例 4 采用商用生物反应器悬浮培养 MDCK-ZL2012 生产流感病毒

[0040] 无血清培养基:MEM HAM 和 F12 培养基的混合物,其中加入 1.5g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 无机盐以及 0.5g/L 的酵母或豆类提取物。

[0041] 无血清培养基高压或过滤除菌,传代 45 代后的 MDCK-ZL2012 细胞接种于 100ml 的无血清培养基中,放入细胞瓶,悬浮细胞以 40rpm 搅拌 1 分钟,37 摄氏度 培养 3 小时,后加入 200ml 无血清培养基,37℃,培养 3-5 天。

[0042] 培养 5 天后采用搅拌培养,并且每三天后换液或灌注培养,经 20 天后,液体变黄,细胞生长。当细胞密度达到  $10 \times 10^5$  后,接种  $10^7 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  的禽流感病毒,  $32^\circ\text{C}$ , 溶解氧 25%,  $\text{pH} 7.0 \sim 7.2$  培养,培养过程按一定量加入胰蛋白酶,3 天后,收获病毒液。培养的禽流感病毒滴度见表 3:

[0043] 表 3MDCK 的全悬浮培养的禽流感病毒的滴度

[0044]

	批次 1	批次 2	批次 3
H5N1 滴度 ( $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ )	6.7	7	8.3
H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> ( $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ )	5.8	6.5	7.2

[0045] 实施例 5 禽流感病毒疫苗的制备

[0046] 将实施例 4 制备得到的禽流感病毒经  $\beta$ -丙内酯或 1/2000 福尔马林溶液灭活,用乳化剂司本,矿物油,吐温 -80 混合物乳化,制成每剂  $60 \mu\text{l}$ ,灭活前含  $10^8 \text{EID}_{50}/\text{ml}$  病毒抗原。

[0047] 实施例 6 致肿瘤性研究

[0048] MDCK-ZL2012 细胞和 MDCK 细胞扩增培养至  $1.5 \times 10^6$  个,低速离心移去培养基,用 PBS 重悬细胞使细胞至  $1.0 \times 10^8$  个 /ml,经 10 倍稀释使细胞达到 100 个 /ml,注射 5 只一组的裸鼠,皮下注射 0.1ml,同时设立一组对照注射 0.1ml 的灭菌 PBS,每周观察肿瘤形成, <10mm 的肿瘤肉眼观察,大于 10mm 的用尺测量,采用 50% 肿瘤形成剂量  $\text{TPD}_{50}$  计算。结果如表 4 所示。

[0049] 表 4 肿瘤形成量

[0050]

细胞	注射后的时间					
	5	10	15	20	25	30
MDCK	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.2
MDCK-ZL2012	4.5	3.8	3.6	3.5	3.8	3.3

[0051] 实施例 7MDCK-ZL2012 的生长型

[0052] 每个 125ml 通气摇瓶接种  $1.5 \times 10^5/\text{ml}$  的细胞悬液 40ml,总计 3-5 个,按 120rpm 转动,采用计数器进行每天细胞计数。结果如表 5 所示。

[0053] 表 5 细胞密度

[0054]

	时间 (小时)							
	0	20	40	60	80	100	120	140
细胞总数	$2.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$

[0055] 实施例 8 经细胞或鸡胚培养的流感病毒血凝效价

[0056] 使用禽流感病毒分别接种 MDCK-ZL2012 以及鸡胚,进行血凝效价的测定,结果如

表 6 所示：

[0057] 表 6 经细胞或鸡胚培养的血凝效价比较

[0058]

病毒株	细胞血凝效价		鸡胚血凝效价
		HAU/50 $\mu$ l	HAU/50 $\mu$ l
A/盐山/01/2012 H5N1		1024	512
A/唐山/02/2012 H1N1		512	256
A/邢台/03/2012 H5N1		2048	1024

[0059] 实施例 9 流感病毒在 MDCK-ZL2012 细胞上的抗原稳定性

[0060] 流感病毒经 3-5 代后进行 HA 抗原的基因序列测定和血凝抑制抗体反应(HAI), HAI 用 96 孔板、0.5% 的鸡血细胞、4HAU 的流感病毒抗原进行。结果如表 7、表 8 所示：

[0061] 表 7 流感病毒在 MDCK-ZL2012 细胞上传 3 代的序列

[0062]

病毒株	氨基酸取代	位置
A/盐山/01/2012 H5N1	D→E	188
A/唐山/02/2012 H1N1	N/O	441
A/邢台/03/2012 H5N1	T/A	412

[0063] 表 8 细胞流感和鸡胚流感的血凝抑制效价比较

[0064]

病毒株	免抗流感血清	
	细胞抗原	鸡血抗原
A/盐山/01/2012 H5N1	1024	2048
A/唐山/02/2012 H1N1	256	512
A/邢台/03/2012 H5N1	512	1024

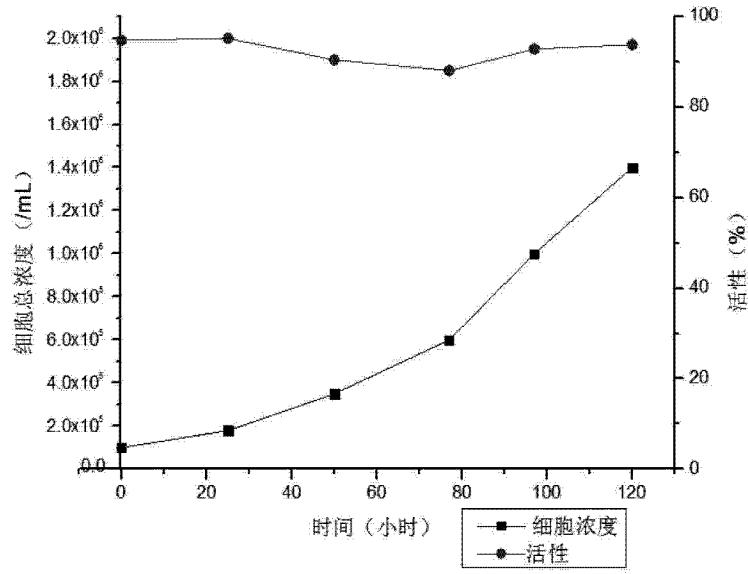


图 1

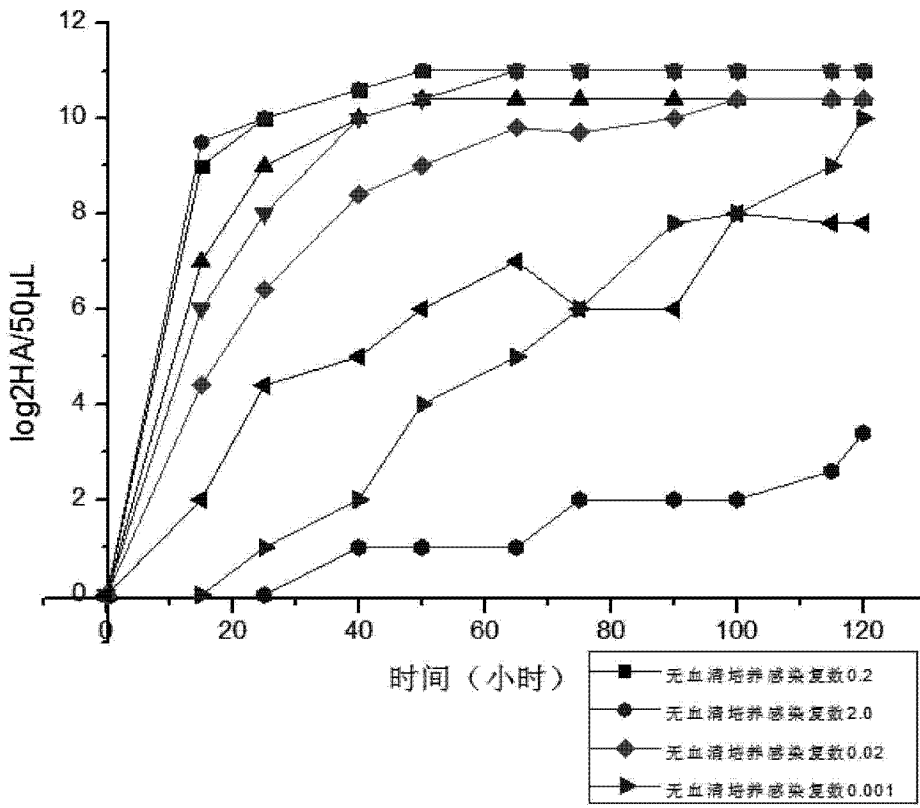


图 2