



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101979518 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201010513449. X

CN 101851610 A, 2010. 10. 06,

(22) 申请日 2010. 10. 15

审查员 李肖菓

(66) 本国优先权数据

201010166552. 1 2010. 05. 10 CN

(73) 专利权人 普莱柯生物工程股份有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛南新区政和路  
15号

(72) 发明人 张许科 孙进忠 乔荣岑

(74) 专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营

(51) Int. Cl.

C12N 7/00(2006. 01)

C12N 7/02(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101804203 A, 2010. 08. 18,

CN 101695573 A, 2010. 04. 21,

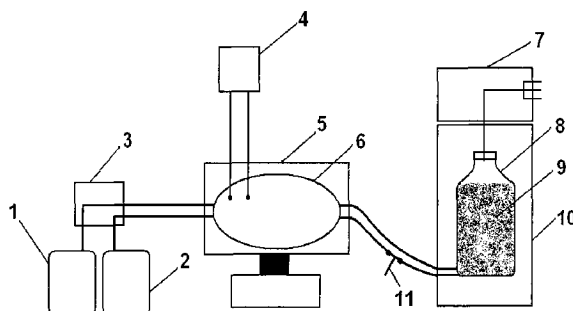
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种制备伪狂犬病病毒的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用潮汐式生物反应器培养传代细胞生产基因缺陷型伪狂犬病毒的方法:(1) 复苏细胞进行传代培养;(2) 应用特定生物反应器和载体系统进行细胞的高密度培养,让细胞在载体上贴附,让培养基循环、充氧、调控 pH 值和葡萄糖;(3) 应用生物反应器进行病毒感染,更换成病毒培养基,接入病毒,让病毒在细胞上吸附完全;(4) 特定的条件培养、扩增病毒;(5) 收获病毒,实现大规模生产。



1. 一种伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 细胞的接种:将 Vero 细胞、MDBK 细胞、BHK-21 细胞中的一种接种到潮汐式生物反应器载体罐 (8) 内添加的载体 (9) 上,进行细胞的吸附培养;

2) 在细胞的吸附培养结束后进行细胞的扩增培养;

3) 将伪狂犬病毒接种到扩增培养的细胞上,进行病毒的吸附培养;

4) 在病毒的吸附培养结束后进行感染细胞的培养;

其中步骤 1) 至 4) 中的培养在潮汐培养条件下进行,所述潮汐培养条件是通过泵出或泵入载体罐 (8) 中的培养液以间歇性淹没与暴露载体实现的;以及

5) 收获含有伪狂犬病毒的培养液,其中,所述收获培养液为自病毒接种之时算起的第 2 ~ 4 天开始第 1 次收集,以后每间隔 2 ~ 4 天收获 1 次,共收获 2 ~ 4 次,每次收获时,将培养液袋中的培养液全部收集到病毒收集桶,再将新配制的细胞维持液泵入到培养液袋中继续下一轮感染细胞的培养和培养液的收集;

其中,所述步骤 1) 中吸附培养和步骤 2) 中扩增培养使用的培养液为细胞生长液,其中所述的细胞生长液由细胞培养液加 3% ~ 5% (V/V) 的牛血清组成;所述步骤 3) 中的病毒吸附培养和步骤 4) 中的感染细胞的培养使用的培养液为细胞维持液,所述的细胞维持液由细胞培养液加 0.5% ~ 1.5% (V/V) 的牛血清配制而成;细胞培养液为 MEM 培养液、DMEM 培养液、EMEM 培养液和 199 培养液、1640 培养液、 $\alpha$ -MEM 培养液中的任意一种;所述的牛血清为胎牛血清、新生牛血清或小牛血清。

2. 根据权利要求 1 所述的伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,所述载体罐 (8) 与装有培养液的培养液袋 (6) 以能够将培养液袋内的培养液泵入载体罐中和能将载体罐内的培养液泵入培养液袋中的方式相联通。

3. 根据权利要求 1 所述的伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,所述载体罐中的载体由选自聚丙烯、藻素酸、聚酯纤维、明胶、聚酰胺、聚乙烯醇、聚苯乙烯、聚氨酯、碳氟聚合物以及陶瓷中的一种或多种制成。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,所述的潮汐式生物反应器载体罐容积为 2 ~ 100L。

5. 根据权利要求 1 所述的伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,在步骤 3) 中的病毒接种按照感染复数为 0.0001 ~ 1 进行。

6. 根据权利要求 1 所述的伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,所述细胞为选自 Vero 细胞和 MDBK 细胞中的一种。

7. 根据权利要求 1 所述的伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,在步骤 1) 中以  $4.0 \times 10^7$  个细胞 / 克载体的细胞密度接种细胞。

## 一种制备伪狂犬病病毒的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种伪狂犬病病毒的生产方法,更具体地说,本发明涉及一种利用哺乳动物细胞在潮汐式生物反应器的载体罐中大规模生产伪狂犬病病毒的方法。

### 背景技术

[0002] 伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是多种动物共患的传染病,引起家畜和野生动物急性致死性的传染病,以发热、奇痒和脑脊髓炎为主要症状,猪是其自然易感宿主,主要引起妊娠母猪流产、死胎和木乃伊胎,仔猪感染主要是神经症状,成年猪则以隐性感染为主,该病已成为种猪繁殖障碍综合症的主要病因。疫苗免疫是防制伪狂犬病的根本措施,现在用得较多的是灭活苗、弱毒疫苗和基因缺失苗。弱毒苗和灭活苗在预防控制伪狂犬病方面虽然能起一定的作用,但弱毒活疫苗有返强和散毒的危险,灭活疫苗虽然安全性较好,但其免疫效率却较低,剂量大,有副作用,而且不能提供血清学标志进行鉴别诊断。基因缺失疫苗免疫原性强、持久稳定,安全性好无致癌性、接种方便安全,还能提供血清学标志的鉴别标志。遗憾的是目前三种疫苗的生产主要依靠转瓶生产,甚至仍在利用鸡胚成纤维原代细胞进行生产。

[0003] 传统的转瓶培养模式具有结构简单,投资少,技术成熟,放大只需简单的增加转瓶数量等优点。但也有其缺点:(1) 作坊式生产,劳动强度大,占地空间大,单位体积提供细胞生长的表面积小;(2) 细胞生长密度低,产量低;(3) 收获病毒液后,后续混合,存在批间差,均一性不好;(4) 培养时各项监测和控制环境条件受到限制等。另外,因鸡胚原材料的差异导致鸡胚成纤维原代细胞批间差异较大,造成伪狂犬病毒滴度不高,批间差异大,给疫苗的产量和效力的提高带来困难。因此,本领域中仍迫切需要能够进一步改善生产病毒疫苗的方法。

[0004] 猪伪狂犬病毒具有广泛嗜性,除了能在鸡胚成纤维原代细胞增殖,还能在多种组织细胞上增殖。但对不同的细胞具有不同的敏感性。中国专利 CN101695572A 公开了利用猪睾丸细胞系 ST、猪肾细胞系 PK15 或猪肾 IBRS-2 大规模生产伪狂犬活疫苗的方法。该发明提到了三种传代细胞用来培养伪狂犬病毒:猪睾丸细胞系 ST、猪肾细胞系 PK15 和 IBRS-2,其中 PK15 细胞极易受猪圆环病毒 I 型的持续污染,目前国内难以找到未受污染的细胞株,显然这存在着很大的安全隐患,特别是用来生产活疫苗,所以,至今国内未有利用 PK15 细胞培养病毒进而生产活疫苗的行政许可。伪狂犬病毒在 ST 细胞上增殖要比 PK15 慢(郝鹏等. PK15、ST 细胞增殖伪狂犬弱毒效果的比较. 首届中国兽药大会-兽医生物制品学、兽医微生物学学术论坛论文集(2008). 339-340),目前也有大量使用 IBRS 细胞进行伪狂犬病毒培养的报道,病毒增殖后的滴度也未降低,但 IBRS 细胞分裂增殖慢(见网址:<http://biology.dctt.net/showarticle.asp?articleid=26989>),几乎比 Vero 细胞慢一倍,这大大提高了生产成本,降低了生产效率。Vero 细胞经过全面的研究鉴定,Vero 细胞具有遗传学稳定,没有外源因子污染和无致瘤性的优点,完全符合世界卫生组织(WHO)关于用于生物制品的传代细胞的规程要求,已被 WHO 批准可用做疫苗生产基质。本发明采用 Vero 细

胞可以解决目前生产伪狂犬病毒使用的上述传代细胞存在的问题。

[0005] 另外 BHK-21 细胞和 MDBK 细胞也可用来繁殖伪狂犬病毒,目前有利用 Vero、BHK-21、MDBK 细胞增殖伪狂犬病毒报道(王岩等,PK15、Vero、BHK、CEF 细胞增殖猪伪狂犬病病毒的比较,安徽农业科学,2007,35(18):5432,5445;王树成等,用 PK15、Vero、MDBK 三种细胞增殖伪狂犬病病毒的比较,畜牧与兽医,1996,28(2):80),这些报道仅是关于实验室阶段利用细胞瓶进行伪狂犬病毒增殖的相关研究,不能直接放大,更不能达到工业化生产的要求。国内外有利用 Vero 细胞生产乙脑病毒疫苗和狂犬疫苗的专利和报道。至今未见把 Vero 细胞、MDBK 细胞、BHK-21 细胞等传代细胞利用生物反应器进行进行伪狂犬病毒大规模生产的报道。

[0006] 中国专利 CN101695572A 公开了大规模生产伪狂犬活疫苗的方法,采用的是 TideCell 潮汐式生物反应器,Batch 式培养。本发明也采用潮汐式生物反应器,但采用了更有生物安全保障的细胞,并采用 Fed-Batch 式培养,通过优化参数实现高滴度多次收获病毒液,大大提高了病毒的产量,进而在制备疫苗的后工艺中,不但提高了疫苗产量,也可大量减少残余细胞宿主蛋白、残余细胞 DNA、残余牛血清等异源物质的含量,进一步提高了疫苗接种的安全性,也更能够符合 WHO《使用动物细胞生产生物制品规程》的要求和市场需求。

## 发明内容

[0007] 本发明试图提供一种伪狂犬病病毒的大规模生产方法,它既能解决传统的转瓶培养模式在病毒生产中存在的病毒产量低,病毒滴度不高,批间差异大的缺点,又能消除现有潮汐式生产方法中所生产的病毒在后续生产活疫苗时存在的安全隐患,并通过优化参数实现了高滴度多次收获病毒液,大大提高了病毒的产量。

[0008] 因此,本发明提供了一种伪狂犬病病毒的大规模生产方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0009] 1) 细胞的接种:将哺乳动物细胞接种到潮汐式生物反应器载体罐(8)内添加的载体(9)上,进行细胞的吸附培养;

[0010] 2) 在细胞的吸附培养结束后进行细胞的扩增培养;

[0011] 3) 将伪狂犬病毒接种到扩增培养的细胞上,进行病毒的吸附培养;

[0012] 4) 在病毒的吸附培养结束后进行感染细胞的培养;和

[0013] 5) 收获含有伪狂犬病毒的培养液,

[0014] 其中步骤 1) 至 4) 中的培养在潮汐培养条件下进行,所述潮汐培养条件是通过泵出或泵入载体罐(8)中的培养液以间歇性淹没与暴露载体实现的。

[0015] 优选的是,该方法中所述的载体罐(8)与装有培养液的培养液袋(6)以能够将培养液袋内的培养液泵入载体罐中和能将载体罐内的培养液泵入培养液袋中的方式相联通。

[0016] 优选的是,该方法中所述的载体罐中的载体由选自聚丙烯、藻素酸、聚酯纤维、明胶、聚酰胺、聚乙烯醇、聚苯乙烯、聚氨酯、碳氟聚合物以及陶瓷中的一种或多种制成。

[0017] 更优选的是,该方法中所述的载体罐中的载体占载体罐容积的 40%~100%(V/V)。

[0018] 最优选的是,该方法中所述的潮汐式生物反应器载体罐容积为 2~100L。

[0019] 优选的是,该方法中所述的伪狂犬病毒是选自伪狂犬病病毒强毒株、伪狂犬病病

毒基因缺失株和伪狂犬病病毒弱毒株中的一种。

[0020] 更优选的是,该方法中所述的伪狂犬病病毒为选自伪狂犬病病毒强毒株 Fa 株、Ea 株、伪狂犬病病毒基因缺失株 Fa(TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>) 株、Ea(TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>) 株、伪狂犬病病毒弱毒株 Bartha 株、Bartha-K61 株、Bucharest 株、BVK 株中的一种。

[0021] 最优选的是,该方法中所述的伪狂犬病病毒为选自伪狂犬病病毒基因缺失株 Fa(TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>)、Bartha-K61 株和 BVK 株中的一种。

[0022] 优选的是,该方法中所述的在步骤 3) 中的病毒接种按照感染复数 (M. O. I.) 为 0.0001 ~ 1 进行。

[0023] 优选的是,该方法中所述的哺乳动物细胞为选自 Vero 细胞、BHK-21 细胞、MDBK 细胞、ST 细胞、PK15 细胞和 IBRS 细胞中的一种。

[0024] 更优选的是,该方法中所述的哺乳动物细胞为选自 Vero 细胞、BHK-21 细胞和 MDBK 细胞中的一种。

[0025] 优选的是,该方法中所述的在步骤 1) 中以  $8.5 \times 10^6 \sim 4.0 \times 10^7$  cells/g 载体的细胞密度接种细胞。

[0026] 优选的是,该方法中所述的在步骤 2) 中的细胞扩增培养达到  $5.5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$  cells/g 载体的细胞密度时进行步骤 3) 所述的病毒接种。

[0027] 优选的是,该方法中所述的步骤 1) 中所述的吸附培养和步骤 2) 中所述的扩增培养使用的培养液为细胞生长液,其中所述的细胞生长液由细胞培养液加 3% ~ 5% (V/V) 的牛血清组成;步骤 3) 中所述的病毒吸附培养和步骤 4) 中所述的感染细胞的培养使用的培养液为细胞维持液,所述的细胞维持液由细胞培养液加 0.5% ~ 1.5% (V/V) 的牛血清配制而成。细胞培养液为 MEM 培养液、DMEM 培养液、EMEM 培养液和 199 培养液、1640 培养液、 $\alpha$ -MEM 培养液中的任意一种。所述的牛血清为胎牛血清、新生牛血清或小牛血清。

[0028] 更优选的是,该方法中所述的步骤 1) 中所述的吸附培养和步骤 3) 中所述的病毒吸附培养设定载体罐与培养液袋的换液量为载体罐容积的 5% ~ 20% (V/V),载体罐中培养液的液面上下行速度均为 0.5 ~ 50L/分钟,液面在载体上下端点停滞时间均为 0 ~ 150 分钟,该吸附培养程序运行 60 ~ 240 分钟,步骤 2) 中所述的扩增培养和步骤 4) 中所述的感染细胞的培养设定换液量为载体罐容积的 70% ~ 95% (V/V),载体罐中液面上下行速度均为 0.5 ~ 50L/分钟,液面在反应器上下端点停滞时间均为 0 ~ 150 分钟。

[0029] 优选的是,该方法中所述的步骤 5) 中所述的收获含有伪狂犬病毒的培养液为在步骤 4) 所述的感染细胞的培养过程中,自病毒接种之时算起的第 2 ~ 4 天开始第 1 次收集,以后每间隔 2 ~ 4 天收获 1 次,共收获 2 ~ 4 次,每次收获时,将培养液袋中的培养液全部收集到病毒收集桶,再将新配制的细胞维持液泵入到培养液袋中继续下一轮感染细胞的培养和培养液的收集。

[0030] 优选的是,该方法中所述的在步骤 1) 至 4) 的培养过程中控制葡萄糖含量范围为 0.5 ~ 5g/L。

[0031] 更优选的是,该方法中所述的步骤 1) ~ 2) 中所述的培养在温度 36.5°C ~ 37.5°C, pH 值调节 7.0 ~ 8.0,溶氧调节 10% ~ 80%,二氧化碳浓度为 0% ~ 10% 的条件下进行,步骤 3) ~ 4) 中所述的培养在温度 36.5°C ~ 37.5°C, pH 调节 7.1 ~ 7.5,溶氧调节 25% ~ 80%,二氧化碳浓度为 0% ~ 10% 的条件下进行。

[0032] 优选的是,本发明采用伪狂犬病毒种在 Vero 细胞上进行传代适应后,提高了细胞对病毒的敏感性,然后将在 Vero 细胞适应的伪狂犬病毒种接种到生物反应器中,在生产过程中调节各种控制参数,如恒温振荡箱的搅拌速度、pH 值、DO 值、灌流速度、优化接种病毒的感染复数 (M. O. I.), 同时,还要掌握好接种病毒时细胞的密度和接毒时间等,使病毒在高密度的生物反应器中高效繁殖,并连续灌流收获病毒,从而实现连续收获,并能进一步提高病毒的滴度。

[0033] 在发明中,术语病毒感染复数 (M. O. I., multiplicity of infection) 是指病毒感染细胞的研究中感染时病毒与细胞数量之比。

[0034] 术语溶氧 (DO) 指培养液中溶解氧饱和度。

[0035] 术语 CO<sub>2</sub> 浓度指载体罐中 CO<sub>2</sub> 占混合气体的体积百分比。

[0036] 技术效果

[0037] 本发明采用了传代细胞,尤其是采用了 Vero 细胞,具有遗传学稳定,没有外源因子污染和无致瘤性的优点。本发明反应器系统培养的伪狂犬病毒数量和滴度明显高于转瓶培养,因此在制备疫苗的后工艺中,不但提高了疫苗产量,也可大量减少残余细胞宿主蛋白、残余细胞 DNA、残余牛血清等异源物质的含量,进一步提高了疫苗接种的安全性,也更能够符合 WHO 《使用动物细胞生产生物制品规程》的要求和市场需求。

#### 附图说明

[0038] 图 1 为 Vero 细胞接种 1 天时载体上的显微照片;

[0039] 图 2 为 Vero 细胞培养至第 3 天时载体上的显微照片;

[0040] 图 3 为伪狂犬病毒接种 9 天时载体上的显微照片;

[0041] 图 4 为潮汐式生物反应器结构示意图。其中,各个标记分别为 1 进料桶、2 收料桶、3 自动馈料仪、4pH/DO 监控器、5 恒温振荡箱、6 培养液袋、7 电脑控制器、8 载体罐、9 载体、10 恒温培养舱、11 进 / 取样管。

#### 具体实施方式

[0042] 本发明的方法对于所用的设备、装置或仪器没有特殊要求,其可在各种类型的潮汐式生物反应器中进行。虽然本申请具体实施例中采用的潮汐式生物反应器是购自赛宇细胞科技股份有限公司的 TideCell 生物反应器,但是本领域技术人员在阅读了本说明书的描述后可以预计到,其他潮汐式生物反应器(无论大小)也能适用于本发明的方法。因伪狂犬病毒能在多种组织细胞上增殖,但对不同的细胞具有不同的敏感性,因此,本发明的较佳实施方案中,选择使用的是 BHK-21 细胞、MDBK 细胞,更佳的是 Vero 细胞。

[0043] 本发明实施例中采用的潮汐式生物反应器结构如图 4 所示。其中,各个标记分别为 1 进料桶、2 收料桶、3 自动馈料仪、4pH/DO 监控器、5 恒温振荡箱、6 培养液袋、7 电脑控制器、8 载体罐、9 载体、10 恒温培养舱、11 进 / 取样管。

[0044] 较佳地,本发明实施例中采用了依据潮汐原理而设计的高密度细胞培养系统,即 TideCell 潮汐式生物反应器,该生物反应器的各部分功能及工作原理如下:

[0045] 载体罐放置于恒温培养舱中,恒温培养舱为载体罐提供一个恒温的环境。载体罐是细胞培养与病毒增殖的场所,细胞贴附生长在载体罐内部的载体上,当培养液袋内的培

养液泵入载体罐时,载体罐内的培养液液面上升并淹没细胞,向细胞供给养分,并将细胞的新陈代谢产物从细胞上去除。当载体罐内的培养液泵入培养液袋时,载体罐中的培养液液面随之下降,细胞露出,进行通风供氧。间歇淹没与暴露载体床的培养方式使载体上的细胞能够得到足够的营养和氧气,同时产生的代谢废物能够有效地被排出去。

[0046] 载体罐的盖子上装有数根管道,这些管道的作用包括:人工手动方式向载体罐内注入液体(如接种细胞悬液等)或排出载体罐内的液体;由电脑控制器控制向载体罐注入气体,气体通常是压缩空气、氧气及 CO<sub>2</sub> 三种的混合物,三种气体在混合物中的比例可以自动调节控制,以适应细胞培养需要。电脑控制器可自动控制混合气体向载体罐内的注入与排出,并为潮汐提供动力。

[0047] 培养液袋用以盛装培养液,并通过两条管道与载体罐底部相通,两条管道分别为液体灌流通道,通过与载体罐之间的液体流动,从而完成潮汐过程。培养液在潮汐过程中的灌流速度可通过电脑控制器进行调整。培养液的换液量是指在一次潮汐过程中,泵入或泵出载体罐的液体量,换液量的大小决定了载体罐内液面顶部和底部所处的位置。

[0048] 在培养液袋与载体罐之间相连通的管道上设有进/取样管,可使用无菌注射器通过进/取样管对培养液进行取样,用以检测其中的葡萄糖含量及病毒含量等指标。葡萄糖的添加:若葡萄糖低于规定标准,则根据葡萄糖测定仪测定培养液中剩余葡萄糖的含量,及培养液的总体积计算出需补加的葡萄糖量,利用无菌注射器抽取配制的葡萄糖溶液从进/取样管中注射到载体罐与培养液袋之间的导管中,葡萄糖溶液随着载体罐的换液得以从导管进入培养液袋并做进一步混匀。

[0049] 恒温振荡箱通过加热与振荡,来维持培养液袋内培养液温度的恒定及成分的匀质性。

[0050] pH/DO 监控器可以监测培养液袋内培养液的酸碱度(pH值)及溶氧(DO),并通过注入碱性溶液(NaOH 或 NaHCO<sub>3</sub> 溶液)将培养液的 pH 值控制在合适范围内。

[0051] 收料桶及进料桶均通过自动馈料仪与培养液袋相连,培养液袋内的培养液需要进行收获时,可通过自动馈料仪进入收料桶,而进料桶内的培养液则可以通过自动馈料仪对培养液袋进行补充。

[0052] 在本发明实施例中,所用的生物反应器的载体罐体积为 2~100L,电脑控制器可以调节控制多种参数,如潮汐过程中载体罐内培养液的潮汐速率及频率、恒温培养舱的温度、溶氧、CO<sub>2</sub> 浓度等。

[0053] 本发明实施例所用的载体由聚丙烯与藻素酸等材料制成。本领域细胞培养常用的其他材质制作的载体如:聚酯纤维载体、明胶载体、聚酰胺载体、聚乙烯醇载体、聚苯乙烯载体、聚丙烯载体、聚氨酯载体、碳氟聚合物载体以及陶瓷载体等,均可使用本发明之方法生产伪狂犬病病毒。

[0054] 本发明实施例所用的病毒株包括伪狂犬病病毒基因工程株、弱毒株、强毒株等,均可使用本发明的方法进行大规模培养。本发明实施例所用的病毒株采用的毒株分别为:伪狂犬病病毒强毒株 Fa 株(购自中国兽医药品监察所)、Ea 株(购自中国兽医药品监察所);伪狂犬病病毒缺失株 Fa(TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>)(该毒株参见中国专利 CN101186902A,该毒株以保藏编号 V200002 保藏于中国典型培养物典藏中心(CCTCC),Ea 株(TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>)(该毒株参见中国专利 CN1523103A,该毒株以保藏编号 0907 保存于 CGMCC);伪狂犬病病毒弱毒株 Bartha

株（购自中国兽医药品监察所）、Bartha-K61 株（购自中国兽医药品监察所）、Bucharest 株（购自中国兽医药品监察所）、BUK 株（中国兽医药品监察所）。传代细胞使用的 Vero 细胞，来源于美国典型培养物典藏中心（ATCC），传代数 124，保藏号为：CCL-81。

[0055] 为使本发明更加容易理解，下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围，下列实施例中未提及的具体实验方法，通常按照常规实验方法进行。

[0056] 实施例 1 利用 Vero 细胞在潮汐式生物反应器中连续生产伪狂犬病病毒

[0057] 生物反应器：TideCell 生物反应器，购自赛宇细胞科技股份有限公司。

[0058] 载体：BioNOC II 载体，购自赛宇细胞科技股份有限公司。

[0059] CVD 细胞核计数试剂盒：购自赛宇细胞科技股份有限公司，货号 AB0100，批号 3007。

[0060] 葡萄糖测定仪：购自赛宇细胞科技股份有限公司。

[0061] 伪狂犬病毒：Bartha-K61 株（购自中国兽医药品监察所）。

[0062] 培养基：DMEM 培养基购自 GIBCO 公司（货号：12800-082，批号：1309922）。

[0063] 胰酶：购自 BD-Difco 公司（货号：215250，批号：5213753）。

[0064] 胎牛血清：购自 PAA 公司（货号：A 15-151，批号：A64905-0972）

[0065] 葡萄糖：购自 SIGMA 公司（货号：7021，批号：MFCD00063774）。

[0066] 碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ )：购自 SIGMA 公司（货号：S-4019）。

[0067] 1) 细胞的复苏培养：先进行细胞的复苏，将一支工作细胞库中的 Vero 细胞（该细胞株以保藏编号 CCL-81 保藏于美国典型培养物典藏中心（ATCC）具体可见 ATCC 网页：<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-81&Template=cellBiology>）从液氮中取出，把细胞悬液加入到方瓶中，利用细胞生长液（先按照说明书把 DMEM 培养基配成细胞培养液，每 1L DMEM 细胞培养液中加入 40ml PAA 胎牛血清即为细胞生长液）进行培养，每 3 天传代 1 次，具体为，把已培养 3 天的细胞瓶中的细胞生长液倒掉，利用消化液（称取 8g  $\text{NaCl}$ 、4g  $\text{KCl}$ 、10g 葡萄糖、2g  $\text{EDTA-2Na}$ 、5.8g  $\text{NaHCO}_3$  和胰酶 5g 溶于 800ml 超纯水中，最后加超纯水定容至 1L 过滤除菌）消化完全后，将细胞悬液与细胞生长液（配方如上所述）按 1：3 的比例重悬进行分散。当利用方瓶培养一定数量后，再利用转瓶进行传代培养，方法与方瓶一样。

[0068] 2) 生物反应器中细胞的接种：称取 BioNOC II 载体 600g（体积为 10L）倒入 10L 载体罐中，加入 9.5L PBS 缓冲液（0.01mol/L，pH7.2，称取 8g  $\text{NaCl}$ 、0.2g  $\text{KCl}$ 、1.44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.24g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，溶于 800ml 蒸馏水中，用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.2，最后加蒸馏水定容至 1L，121℃ 高压蒸气灭菌 30 分钟，室温保存）至完全浸没载体过夜，将载体罐连同载体以蒸汽高温高压（121℃）灭菌 30 分钟，然后利用双耳球把载体罐中的 PBS 缓冲液泵出。把转瓶培养的 Vero 细胞利用消化液（配方如上所述）消化分散，用细胞生长液（配方如上所述）重悬后，按照  $1.5 \times 10^7$  cells/g 载体的终密度接入 10L 载体罐中，并补加细胞生长液至 8.0L，将载体罐放入 37℃ 恒温培养舱中。把 50L 无菌培养液袋置入恒温搅拌箱中，把 50L 细胞生长液（配方如上所述）泵入无菌培养液袋中，恒温搅拌箱的温度设为 37.0℃，搅拌速度 45 转/分，再通过导管把载体罐与培养液袋进行连接，启动细胞吸附程序：设定换液量为 1L，载体罐中培养液的液面上下行速度均为 2600ml/分钟，液面在反应器上下端点（上下端

点为载体罐内的液面在潮汐过程中所能达到的最高点和最低点,随着换液量的大小不同而不同。)停滞时间为 30/20s,该程序运行 180min。利用葡萄糖测定仪测定生长液中的葡萄糖含量,若葡萄糖低于 1g/L 则利用无菌注射器抽取 30% 的葡萄糖溶液(称取 30g 葡萄糖完全溶解于超纯水中,定容至 100ml,过滤除菌)控制葡萄糖含量范围 1g/L ~ 3g/L。利用 7.5% NaHCO<sub>3</sub>(称取 7.5g NaHCO<sub>3</sub> 完全溶于超纯水中,定容至 100ml,过滤除菌)由 pH 监控器自动调节 pH 值 7.2±0.2,溶氧自动控制 65%,二氧化碳浓度自动调节 5.0%。

[0069] 3) 生物反应器中细胞的培养:细胞吸附程序结束后改为细胞培养程序:设定换液量为 9.0L,载体罐中培养液的液面上下行速度为 2000ml/min,液面在反应器上下端点(上下端点为载体罐内的液面在潮汐过程中所能达到的最高点和最低点,随着换液量的大小不同而不同)停滞时间为 40s/40s。培养期间,自接种细胞时算起,每 24 小时把 TideCell 载体罐的盖子打开利用载体取样器取载体 5 片,并把其分别放入 1ml 的 CVD 细胞核染色液中,37℃ 作用 1h 后利用细胞计数板计数,以了解细胞增殖情况;同时也每 24 小时通过进/取样管利用无菌注射器抽取少量培养液,采用葡萄糖测定仪测定培养液中葡萄糖含量。葡萄糖含量、pH 值、溶氧和二氧化碳浓度的参数设定同步骤 2)。载体与 Vero 细胞结合的电子显微镜照片参见图 1。可以看出, Vero 细胞培养至第 1 天,基本上全贴附于载体之上,细胞圆润长势良好,但细胞稍稀疏。

[0070] 4) 生物反应器中接种病毒:自细胞接种之时算起, Vero 细胞培养至第 3 天, Vero 细胞与载体结合的电子显微镜照片,如图 2 所示,细胞密度较高,紧密贴附于载体之上,且有大量细胞附着于载体缝隙中。此时细胞密度已达到  $6.0 \times 10^8$  cells/g 载体则开始接毒,先把载体罐中的培养液泵出,按照病毒与细胞的比即感染复数(M. O. I.) 为 0.001 接毒。然后往载体罐中补加细胞维持液(先按照说明书把 DMEM 培养基配成细胞培养液,每 1L DMEM 细胞培养液中加入 10ml PAA 胎牛血清即为细胞维持液)8.0L,同时把培养液袋中 50L 的细胞生长液泵出,再泵进 50L 的细胞维持液(配方如上所述)。启动病毒吸附程序:设定载体罐与培养液袋的换液量为 1L,载体罐中培养液的液面上下行速度均为 2500ml/分钟,液面在反应器上下端点(上下端点为载体罐内的液面在潮汐过程中所能达到的最高点和最低点,随着换液量的大小不同而不同。)停滞时间为 40s/10s,该程序运行 200min。利用 30% 的葡萄糖溶液(配方如上所述)控制葡萄糖含量范围 1g/L ~ 3g/L,利用 7.5% NaHCO<sub>3</sub>(配方如上所述)自动调节 pH 值 7.35±0.15,溶氧自动控制 40%,二氧化碳浓度自动调节 5.0%。

[0071] 5) 生物反应器中病毒的收获:病毒吸附程序结束后,仍运行步骤 3) 中的细胞培养程序。利用 30% 的葡萄糖溶液(配方如上所述)控制葡萄糖含量范围 1g/L ~ 3g/L,利用 7.5% NaHCO<sub>3</sub>(配方如上所述)自动调节 pH 值 7.25±0.15,溶氧自动控制 30%,二氧化碳浓度自动调节 1.0%。自接毒之时算起,分别于第 3、6、9 天收获病毒液。每次收获病毒液时,利用自动饲料仪先把培养液袋中 50L 的培养液(即病毒液)按照 5L/min 的流速收集到病毒收集桶,并于 -40℃ 冻存,再利用自动饲料仪把新配制的细胞维持液(配方如上所述)泵入到 50L 培养液袋中。最后一次收获时,载体罐中的载体连同其中的培养液(即病毒液)一起于 -40℃ 冻融 1 次收获。接毒后随着病毒的增殖 Vero 细胞病变逐渐加重,先后出现变圆从载体上脱落、萎缩、破碎的现象,持续关注至接毒后第 9 天细胞大量脱落,破碎附着在载体上,如图 3 所示。病毒液的病毒含量 TCID<sub>50</sub> 测定按照常规方法进行,比如可以按照文献方法进行(如参照中华人民共和国兽用生物制品规程,2000 年版附录 446 页),第 3、6、9 天

收获的病毒液的滴度分别为  $10^{9.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^{9.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^{9.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

[0072] Vero 细胞在利用其他体积的潮汐式生物反应器和其他伪狂犬病毒毒株时,细胞培养和病毒增殖情况基本相同,收获病毒也的滴度也无明显差异。

[0073] 实施例 2BHK-21 细胞在潮汐式生物反应器中连续生产伪狂犬病病毒

[0074] 细胞培养液:MEM 培养基购自 GIBCO 公司(货号:61100-087,批号:678277),按产品说明书所述配制成细胞培养液。

[0075] 牛血清:购自 Hyclone 公司(货号:SV30087.02,批号:NSK0069)

[0076] 伪狂犬病毒:Fa 基因缺失株(TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>)(该毒株参见中国专利 CN101186902A,该毒株以保藏编号 V200002 保藏于中国典型培养物典藏中心(CCTCC))。

[0077] 其他材料与试剂同实施例 1。

[0078] 本实施例采用的 BHK-21 细胞以保藏号 CCL-10 保藏于美国典型培养物典藏中心(ATCC)具体可见 ATCC 网页 <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-10&Template=cellBiology>,在本实例中采用载体罐为 10L 的 TideCell 生物反应器,该实施例的步骤、方法和参数与实施例 1 的步骤、方法和参数基本相同,使用的细胞生长液和细胞维持液中牛血清的配比也相同,不同之处在于,使用的细胞培养液和牛血清如上所述,BHK-21 细胞以  $1.3 \times 10^7$  cells/g 载体的密度接入反应器。实施例中病毒接种感染复数也为 0.001,潮汐式培养 9 天,每次收毒 50L,第 3、6、9 天收获潮汐式培养的病毒液,病毒滴度分别为  $10^{9.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^{9.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^{9.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

[0079] BHK-21 细胞在利用其他体积的潮汐式生物反应器和其他伪狂犬病毒毒株时,细胞培养和病毒增殖情况基本相同,收获病毒也的滴度也无明显差异。

[0080] 实施例 3MDBK 细胞在潮汐式生物反应器中连续生产伪狂犬病病毒

[0081] 细胞培养液:MEM 培养基购自 GIBCO 公司(货号:61100-087,批号:678277),按产品说明书所述配制成细胞培养液。

[0082] 新生牛血清(GIBCO 公司生产,货号 16010-14,批号 693745)其

[0083] 他材料与试剂同实施例 1。

[0084] 本实施例中 MDBK 细胞(NBL-1)以保藏号 CCL-22 保藏于美国典型培养物典藏中心(ATCC)具体可见 ATCC 网页。<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-22&Template=cellBiology>。本实施例采用载体罐为 10L 的潮汐式生物反应器,采用的步骤、方法和参数与实施例 1 的步骤、方法和参数基本相同,采用的细胞生长液和细胞维持液也与实施例 1 中牛血清的配比相同,不同之处在于,使用的细胞培养液和牛血清如上所述,MDBK 细胞以  $1.5 \times 10^7$  cells/g 载体的密度接入反应器。实施例中病毒接种时感染复数为 0.001。潮汐式培养 9 天,每次收毒 50L,第 3、6、9 天收获潮汐式培养的病毒液,病毒滴度分别为  $10^{9.75}$ TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^{9.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^{9.8}$ TCID<sub>50</sub>/ml。

[0085] MDBK 细胞在利用其他体积的潮汐式生物反应器和其他伪狂犬病毒毒株时,细胞培养和病毒增殖情况基本相同,收获病毒也的滴度也无明显差异。

[0086] 实施例 4:转瓶培养与潮汐式生物反应器的比较

[0087] 材料与试剂同实施例 1。另外有:10L 转瓶购自四川万福玻璃仪器有限责任公司。

转瓶机（型号 ZP01）购自湖北省黄石市恒丰医疗器械有限公司。

[0088] 1) 在 10L 转瓶中生产伪狂犬病毒, 先将 Vero 细胞进行细胞的复苏、方瓶扩增培养, 具体方法如实施例 1 中的步骤 1), 再以终浓度为  $4.5 \times 10^4$  cells/ml 接种至 10L 转瓶, 加细胞生长液（配方如实施例 1 所述）至 3.0L。至 37°C 温室中于转瓶机上以 5 转 / 小时培养, 以此方式培养细胞至 2 天接种伪狂犬病毒, 接毒前, 先把 10L 转瓶中的细胞生长液倒掉, 然后按照以 0.001 的感染复数进行接毒, 补加细胞维持液至 3L, 至 37°C 温室中于转瓶机上以 10 转 / 小时培养, 此过程为病毒吸附 1 小时后, 1 小时后把转瓶机的转速改为 5 转 / 小时, 其他条件不变, 自接毒之时算起培养至第 3 天, 收获病毒液, 即 10L 转瓶连同其中的细胞、细胞维持液置 -40°C 冻融一次后完全收获, 测定病毒滴度 TCID<sub>50</sub>, 方法同实施例 1。

[0089] 2) 在载体罐为 10L 的生物反应器中生产伪狂犬病毒, 方法步骤同实施例 1。

[0090] 3) 实验结果: Vero 细胞在 10L 转瓶中培养伪狂犬病毒的滴度为  $10^{8.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml; 在 10L 反应器中培养的伪狂犬病毒, 3 次收获平均滴度为  $10^{9.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml。各项参数比较具体见表 1。

[0091] 表 1 两种培养方式比较

[0092]

	10L 转瓶	10L 生物反应器
表面积	2200cm <sup>2</sup>	1,440,000cm <sup>2</sup>
病毒液	2L / 瓶	50L / 瓶
收获次数	1	3
收毒时间	2 天	9 天
病毒滴度	$10^{8.8}$ TCID <sub>50</sub> /ml	$10^{9.8}$ TCID <sub>50</sub> /ml
总收获量	3L	150L

[0093] 本发明中, 采用 10L 转瓶培养中, Vero 细胞总数最高能达到  $6 \times 10^8$  cells, 仅收获 1 次, 收获伪狂犬病毒液 3L; 病毒滴度为  $10^{8.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml; 在 10L 生物反应器中, 细胞总数最高能达到  $4.5 \times 10^{10}$  cells; 能连续收获 3 次, 收获量为 150L, 平均病毒滴度  $10^{9.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml。经 10L 生物反应器培养后伪狂犬病毒增殖数量是 10L 转瓶培养的 500 倍。

[0094] 本发明提出了利用 Vero 细胞和潮汐式生物反应器大规模生产伪狂犬病毒的工艺, 连续收获 3 次, 病毒滴度可以达到  $10^{9.75}$  TCID<sub>50</sub>/ml 以上, 收获的病毒液的产量和病毒含量得到了很大提高, 具有广阔的应用前景。

[0095] 利用 ST 细胞、PK15 细胞、IBRS 细胞进行上述实施例, 得出的结果一致。

[0096] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

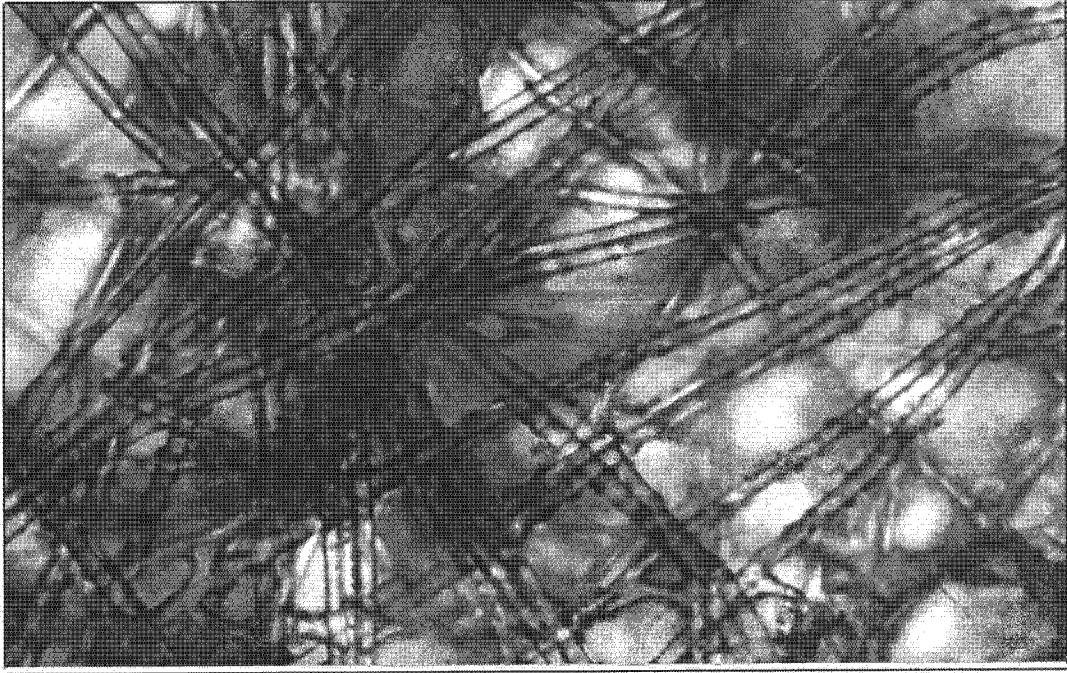


图 1



图 2

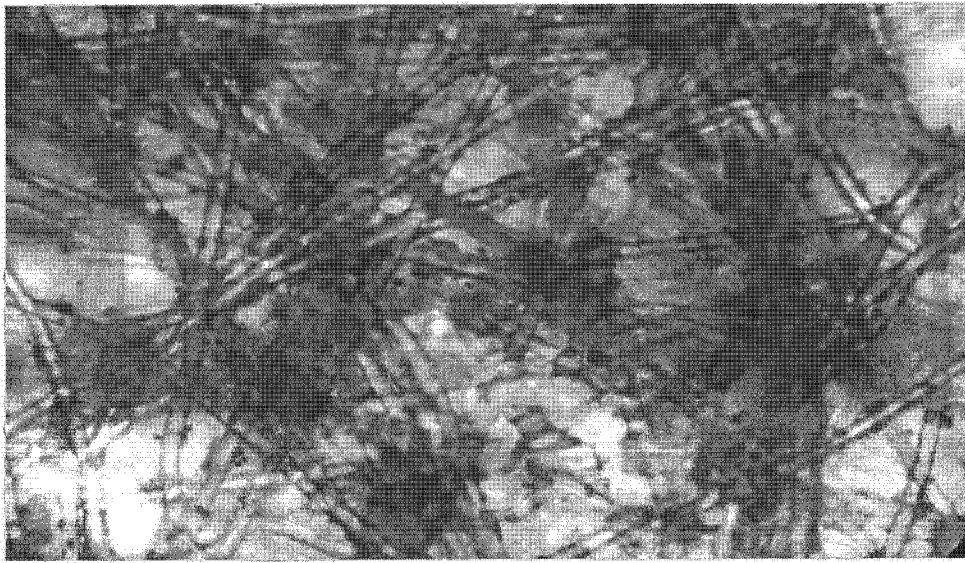


图 3

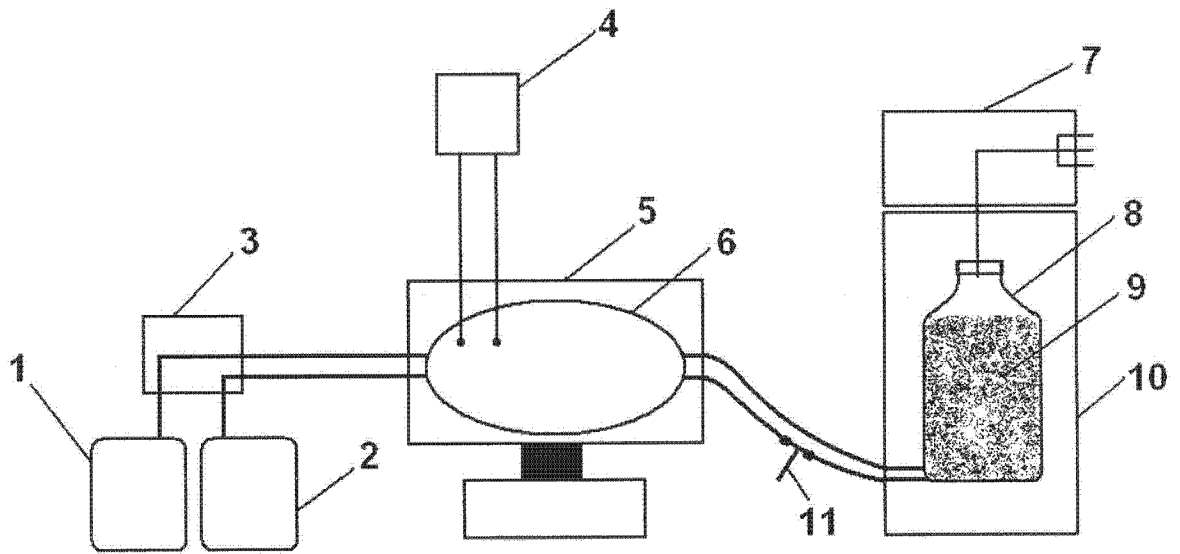


图 4