

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/25

C12N 7/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00133104.3

[43] 公开日 2001 年 8 月 15 日

[11] 公开号 CN 1307902A

[22] 申请日 1993.6.3 [21] 申请号 00133104.3

分案原申请号 93106673.5

[30] 优先权

[32] 1992.6.4 [33] US [31] 893,295

[32] 1992.6.4 [33] US [31] 894,039

[71] 申请人 麦克公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 P·J·普罗沃斯特 D·L·克拉

P·A·弗里曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 用疫苗预防水痘的方法

[57] 摘要

以较高的 VZV 产量制备活的减毒水痘——带状疱疹病毒疫苗。该新方法使活 VZV 疫苗的大量制备更为实用。另外,最佳单层细胞培养条件提供了一种提高单层细胞密度的方法,该方法可用于提高病毒疫苗的产量。根据该方法,在常规培养容器中通常获得接近 500,000 个细胞/cm² 的细胞密度。

ISSN 1000-8427 4

权 利 要 求 书

1. 含有减毒水痘 - 带状疱疹病毒的疫苗的使用方法, 该方法包括施用免疫有效量的疫苗以预防水痘, 所述病毒是用如下方法制备的:

a. 在足以使细胞高度复制的高营养条件下, 将选自人二倍体细胞的 VZV 易感染细胞培养至在单层培养物中会合, 并供给不能代谢的二糖;

b. 在尽可能接近会合点时, 用实用范围内尽可能高感染复数的 VZV 感染细胞感染步骤(a)培养的细胞;

c. 将 VZV 感染培养物在高营养状态下维持 22 - 96 小时, 并在感染性 VZV 产量达到峰值时收集;

d. 在收集 VZV 感染细胞前, 用任选含有溶酶体营养剂如氯化铵或氯喹的生理溶液洗涤 VZV 感染培养物;

e. 将 VZV 感染细胞收集到最小体积的稳定溶液中, 并且或者立即破碎细胞, 或者冷冻这些细胞供以后破碎;

f. 破碎 VZV 感染细胞以最适地释放细胞结合的 VZV, 并除去细胞碎片, 以提供无细胞 VZV 制备物;

其中 VZV 易感染细胞是 MRC - 5 细胞, 减毒 VZV 是水痘 - 带状疱疹病毒的 Oka 株, 培养温度是在 30 - 37°C 之间, 二糖是以 20 - 60 mM 提供的蔗糖; 培养温度是 35°C, 感染复数是 1:25 和 1:625 之间, 溶酶体营养剂是以 20 - 50mM 提供的氯化铵或以 230μM 提供的氯喹。

2. 含有减毒水痘 - 带状疱疹病毒的疫苗的使用方法, 该方法包括施用免疫有效量的疫苗以预防水痘, 所述病毒是用如下方法制备的:

a. 培养 VZV 易感染细胞至会合, 其中所说培养包括:

1) 细胞植入期;

2) 在实用范围内尽可能大体积的基本培养基或较小体积的高营养培养基中进行的细胞生长期;

3) 感染前期, 包括使细胞与无毒的不能代谢的二糖接触;

b. 在尽可能接近会合点时, 用实用范围内尽可能高感染复数的减毒 VZV 感染细胞感染步骤 a 培养的细胞;

c. 将 VZV 感染培养物维持于大体积的基本培养基或较小体积

的加富培养基中 22 - 96 小时, 达到峰值 VZV 产量;

d. 在收集前用任选含有溶酶体营养剂的生理溶液洗涤 VZV 感染培养物;

e. 用以下方法收集 VZV 感染培养物:

- 5 1) 移出液体;
- 2) 加入最小体积的稳定剂溶液;
- 3) 刮落或用化学方法释放 VZV 感染细胞;
- 4) 任选地将释放出的 VZV 感染细胞在 -70°C 下冷冻;

10 f. 破碎释放出的 VZV 感染细胞以最适地释放细胞结合的 VZV, 并除去细胞碎片, 并任选地冻干无细胞 VZV 或以液体冷冻形式贮存;

15 其中 VZV 易感染细胞是 MRC-5 细胞, 减毒 VZV 是水痘 - 带状疱疹病毒的 Oka 株, 培养温度是在 $30 - 37^{\circ}\text{C}$ 之间, 二糖是以 $20 - 60 \text{ mM}$ 提供的蔗糖; 培养温度是 35°C , 感染复数是 $1:25$ 和 $1:625$ 之间, 溶酶体营养剂是以 $20 - 50\text{mM}$ 提供的氯化铵或以 $230\mu\text{M}$ 提供的氯喹。

3. 权利要求 1 的方法, 其中高营养培养基是任选地添加 $0.02 - 0.4\text{mg/ml}$ 大豆类脂的 SRFE-2, 并且病毒是通过声波处理或 DOUNCE 匀浆或两者并用而从细胞中释放出来的。

20 4. 含有减毒水痘 - 带状疱疹病毒的疫苗的使用方法, 该方法包括施用免疫有效量的疫苗以预防水痘, 所述病毒是用如下方法制备的:

a. 培养 MRC-5 细胞至会合, 其中所述培养包括:

- 25 1) 在 EBME 中的细胞植入期;
- 2) 在添加了 0.2mg/ml 大豆类脂的 SRFE-2 中于细胞植入 3 天后开始的细胞生长期;

3) 感染前期, 包括在感染前 24 - 96 小时使 MRC-5 细胞与 $20 - 50\text{mM}$ 蔗糖接触;

30 b. 在尽可能接近会合点时, 用实用范围内尽可能高感染复数的减毒 VZV 感染 MRC-5 细胞感染步骤 (a) 培养的细胞;

c. 将 VZV 感染培养物维持 37 - 96 小时, 并在 VZV 产量峰值时收集;

d. 用任选添加 $1 - 100\text{mM}$ NH_4Cl 或氯喹的磷酸盐缓冲盐水洗涤培养物;

- e. 用以下方法收集 VZV 感染 MRC-5 细胞:
- 1) 除去液体;
 - 2) 加入最小体积的任选含有 1 - 100mM NH_4Cl 或 230 μM 氯喹的稳定剂;
- 5 3) 刮落或用化学方法释放细胞;
- 4) 任选地将释放出的 VZV 感染细胞冷冻于 -70°C ;
- f. 用以下方法破碎释放出的 VZV 感染细胞:
- 1) DOUNCE 匀浆;
 - 2) 沉淀细胞碎片, 保留上清液;
- 10 3) 声波处理沉淀并再次沉淀;
- 4) 合并步骤 f-2 和 f-3 的上清液;
- g. 将步骤 (f) 产品稀释于稳定剂中并将产品分装成单位剂量供冻干并于 4°C 或更低温度贮存, 以便在以后使用时能达到每剂量不低于 1000PFU.
- 15 5. 一种培养单层细胞的方法, 该方法包括:
- a. 将细胞原液接种在培养容器中的基本培养基或加富培养基中, 并使细胞植入 24 - 72 小时;
 - b. 从步骤 a 的培养物中移出培养基, 并用添加了最适浓度的类脂并任选含有血清添加剂的新鲜加富培养基代替;
- 20 c. 在补充了类脂的加富培养基中培养细胞培养物;
- d. 在培养 24 - 72 小时后, 任选地用不添加类脂的新鲜培养基代替步骤 c 的培养基。
6. 权利要求 5 的方法, 其中加富培养基是任选补充了胎牛血清的 SRFE-2, 类脂添加剂的浓度为 0.02mg/ml 至 0.4mg/ml, 细胞是
- 25 MRC-5、WI-38 或非洲绿猴肾二倍体细胞。
7. 用于培养细胞单层培养物的组合物, 该组合物包含补充了 0.02 - 0.4mg/ml 类脂的 SRFE-2 培养基。

说明书

用疫苗预防水痘的方法

本申请是申请日为 1993 年 6 月 3 日, 申请号为 93106673.5, 发明名称为“制备减毒水痘-带状疱疹病毒疫苗的方法”的发明专利申请的分案申请。

水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 引起水痘和带状疱疹。水痘是一种发生在无 VZV 免疫性个体上的高度传染性疾病。90% 以上的人口在生命的头二十年受到传染。该疾病严重威胁免疫抑制者和成年人。在许多病例中, VZV 潜伏于背根神经节细胞中。VZV 从潜伏态重新激活时则出现了带状疱疹, 这是一种痛苦的慢性病。

通过免疫接种预防水痘是人们期望的目标, 预计将实现用活的减毒水痘疫苗进行普遍的儿童免疫接种。现有技术已报道了 VZV 在各种细胞培养系统中的繁殖以及将活的减毒无细胞 VZV 用作为疫苗。美国专利 3, 985, 615 描述了在豚鼠的初生胚细胞中制备适于用作疫苗的减毒的 VZV Oka 株。美国专利 4, 008, 317 描述了在 WI-38 细胞中培养 VZV 的温度敏感性突变体以用作为疫苗稳定剂。用于维持活 VZV 的组合物如 SPGA, 也是本领域内已知的。

VZV 疫苗的商品化生产受到的主要限制是从本领域内已知的细胞培养系统中获得无细胞 VZV 的产量。使用本发明的新方法可以将无细胞 VZV 的产量提高约 5-20 倍。

因此, 本发明是一种高产量的制备活的减毒无细胞 VZV 疫苗的方法。

通常, 本领域已知的单层细胞培养方法产生约 80, 000 至 160, 000 个细胞/cm² [Mann, Dev. Biol. Stand. 37, 149-152 (1977); Wood

和 Minor, Biologicals 18, 143 - 146 (1990)]。这些单层培养物只能生长到有限的密度,因而阻碍了用单层细胞培养物生产病毒抗原。

过去提高细胞培养物密度的努力已转向用专门的灌注培养容器将饱和密度提高到约 1×10^6 个细胞/ cm^2 [Mann, Dev. Biol. Stand. 37, 149 - 152 (1977)]。本发明提供了独特的提高细胞产量的方法,但使用了现存的细胞培养系统。

本发明提供了一种方法,它可以使附着细胞生长至比迄今为止可能达到的密度高得多的密度,从而使在用于生产疫苗的细胞单层上培养的病毒达到更高的产量。

本发明涉及用于单层细胞培养的新方法以及在该方法中使用的新组合物。该方法需要使用与基本培养基不同的加富培养基,并在该加富培养基中补充最适浓度的类脂。根据本发明方法,使用含有 SRFE-2 并补充了约 0.02 - 0.4g/ml 大豆类脂的新生长培养基,可使单层细胞培养密度大大提高。由此获得的提高了密度的单层细胞可用于改进病毒抗原的生产以制备抗病毒疫苗。

当用于制备特定疫苗时,本发明是一种用于生产大批量可用于预防水痘的活的减毒无细胞 VZV 疫苗的方法,该方法包括:在使 VZV 产量和稳定性最高的条件下,在细胞培养物中最适地繁殖 VZV 并收集该病毒。该最佳方法的步骤包括:

a. 利用大培养体积或加富培养基,并供应不能代谢的二糖如蔗糖,将选自人二倍体细胞如 MRC-5 的 VZV 易感染细胞在单层培养中培养至会合;

b. 在尽可能接近会合点时,用实用范围内尽可能高感染复数的 VZV 感染细胞感染步骤(a)培养的细胞;

c. 将 VZV 感染培养物在高营养状态下维持约 22 - 96 小时, 并在 VZV 产量达到峰值时收集;

d. 在收集 VZV 感染细胞前, 用任选含有溶酶体营养剂如氯化铵或氯喹的生理溶液洗涤 VZV 感染培养物;

e. 将 VZV 感染细胞收集到最小体积的稳定溶液中, 并且或者立即破碎细胞, 或者冷冻这些细胞供以后破碎;

f. 破碎 VZV 感染细胞以最适地释放细胞结合的 VZV, 并除去细胞碎片, 以提供无细胞 VZV 制备物。

图 1. 在添加蔗糖的培养基中 VZV PFU 的产量。

图 2. 无细胞 VZV 抗原的产量。

图 3. -20°C 或 4°C 时 VZV 在 SPGA 稳定剂中的稳定性。

图 4. 用不同的培养基获得的 VZV PFU 产量。

图 5. 输入的细胞结合感染复数对无细胞 VZV 产量的影响。

本发明涉及在单层培养中培养细胞的方法。本发明的目的在于提高附着培养细胞的密度。通过提供补充了最适浓度的类脂的加富生长培养基达到了上述目的。通过在本发明的新的培养基 - 类脂组合中培养本发明的单层培养物, 可以大大提高病毒噬斑形成单位 (PFU) 或病毒抗原的产量。因此, 使用本发明的细胞培养方法有益于甲型肝炎病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、风疹、轮状病毒、麻疹、脊髓灰质炎、流行性腮腺炎和其他病毒的疫苗。

用于该方法的一种优选的加富培养基是 SRFE - 2 (可从 SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, S2138 或从 Serva Fine Chemicals, Heildelberg, Germany 47523 购买)。Weiss 等人 [In Vitro 16 (7), 616 - 628, (1980)] 描述了该培养基。按本文所述相同方式使

用的其他等价培养基或组成略有变化的 SRFE - 2, 是本发明的自然延伸。

在本发明中使用许多已知类脂添加剂中的任何一种都具有突出优点。例如, 发现成年牛血清的富含胆固醇的类脂 (SIGMA CHEMICAL CO. catalog# L-4646)、EX-CYTE 类脂 I 或极低内毒素 (VLE) 类脂 (MILES Inc., catalog# 's 82-004-7 至 8 和 82-019-1) 是有益的加富培养基添加剂。一种优选的类脂添加剂是可从 Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis IN, catalog# 1074 482 买到的大豆类脂提取物。Iscoe 和 Melchers [J. al. Exp. Medicine, 147, 923-933, (1979)] 描述了该物质或类似物质可替代 B-淋巴细胞培养中的血清。在这篇文献和 Boehringer Mannheim 公司的产品目录中, 都没有提示大豆类脂添加剂可用于添加加富培养基。按照这些文献, 类脂是用作为基本培养基中的血清替代物。而在本发明中使用的类脂是一种加富培养基添加剂。另外, 按照已公开的文献, 类脂的使用浓度约为 $10-100 \mu\text{g/ml}$ 。根据本发明, 这些类脂的最佳使用浓度比文献中或制造商建议的浓度高 2-3 倍。再者, 本发明中使用的类脂添加剂在添加血清时仍可使用, 而不是代替血清的添加。

在本发明方法中, 将 MRC-5 细胞、WI-38 细胞、非洲绿猴肾异倍体细胞或另一种用于繁殖病毒的细胞类型接种在培养容器中。在本领域内已知的基本培养基如 EMEM 或 EBME, 或在加富培养基如无类脂添加剂的 SRFE-2 培养基中, 完成起始细胞植入期。还可以供应约 10% 的胎牛血清 (FCS)、抗生素如新霉素 (约 $50 \mu\text{g/ml}$ 就足够) 和 L-谷氨酰胺 (约 2mM)。将细胞在细胞和病毒允许的温度

下 (通常约 34 - 37°C, 优选约 35°C), 根据所要制备的病毒培养若干天。

在细胞已明显地附着并在单层培养中旺盛生长之后, 除去基本培养基或加富培养基, 用补充了最佳浓度类脂的新鲜加富培养基替代。

再培养一个阶段后, 可再一次除去培养基并用不含类脂添加剂的新鲜加富培养基替代。发现在细胞已经接近或达到会合后提供类脂具有逆生产作用, 会降低最大细胞产量。

在准备将已培养好的单层细胞用病毒接种物感染时, 除去类脂添加剂, 并将病毒原种导入一批新鲜的加富培养基中。这后一批培养基不含类脂, 可使细胞生长延长而不产生上面提到的类脂诱导的细胞减少问题。

完成上述过程后, 细胞和病毒的产量大大提高。例如, 在 MRC-5 细胞上培养水痘病毒时, 与在基本培养基或单独的 SRFE-2 培养基上培养 MRC-5 细胞时相比较, VZV PFU 产量大大提高。同样, 按这种新方法培养时, 用于水痘生长或风疹病毒生产的 WI-38 细胞的生长密度要高得多。

当用于生产特定疫苗时, 本发明新方法包括: 在使病毒产量和稳定性最佳的条件下, 在细胞培养物中繁殖 VZV, 并收集得到的 VZV。对 VZV 的生产所述的优点适用于其他有被膜病毒的生产, 包括除 VZV 以外的疱疹病毒、麻疹、流行性腮腺炎或风疹病毒的生产。

本发明的最终目标是提供一种能有效地生产用作疫苗的 VZV 的方法。根据该方法的每一步骤最佳化时最终获得的无细胞 VZV 的产量来衡量该方法的成功与否。根据最终的无细胞 VZV 制备物的感

染效价来测定产量。利用 Krah 等人 (J. Virol. Methods, 1990, 27: 319-326) 描述的琼脂糖覆盖法或液体覆盖法获得水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 制备物的感染效价。简言之, 该方法包括: 将易于受 VZV 感染的 MRC-5 细胞培养至旺盛复制状态, 即培养至细胞约有 50-80% 会合。然后将病毒以最小体积量覆盖在细胞单层上, 使其附着到细胞上, 然后加入另一些生长培养基。在生长若干天后, 使细胞与一种蛋白质染色剂接触, 并计数透明区域即噬斑。因此, 对于一种已知体积的病毒接种物, 每毫升的噬斑形成单位 (PFU) 数目是病毒产量的可靠尺度。如再乘上由任何给定病毒制备物得到的无细胞病毒的总体积, 则可计算出 PFU 的总数。

由于检测方法本身的可变性, 通过任何特定方法的最佳化获得的 PFU 数的提高, 都是以对某种最佳化程度较差的方法步骤的比例来表示的。因此, 所报道的成倍增加的病毒产量消除了 PFU 检测方法本身的任何可变性。最终, 本文所描述的方法步骤可使 VZV 产量比用本领域已知方法获得的产量累计提高约 16-20 倍。在文献中没有报道这种成倍提高, 因此这是对 VZV 疫苗制备领域的重要贡献。

由于 VZV 噬斑检测需要耗费大量时间, 因而特别不便于在进行过程中进行控制。利用快速的 VZV 抗原 ELISA 可以测定 VZV 抗原的量, 从而能够监测活水痘疫苗制备期间病毒的生长。另外, 该检测方法可用于估测澄清的、声波处理过的大批量疫苗中 VZV 抗原的量, 也许还可用于测定灌装疫苗冻干管中的抗原。简言之, 进行上述检测的方法是: 与抗 VZV 血清溶液一起保温测试样品中的 VZV 抗原。使剩余的游离抗体结合到固定于 ELISA 微量滴定板上的 VZV 抗原上。能结合到板上的抗体的量与测试样品中抗原的量成反比。通

过与一种酶联抗人抗体和合适的底物反应而生成可用分光光度法定量测定的有色产物,从而定量测定该板上结合的抗体。

通常, VZV 抗原 ELISA 和 VZV 噬斑检测应得到相关数据,但是应牢记, VZV 抗原检测法既检测不能存活的 VZV 也检测活 VZV。由于尚未证明被杀死的 VZV 产生的免疫应答与活的减毒病毒产生的应答同样有效,因而噬斑检测是测定 VZV 疫苗的病毒接种物剂量的关键性检测法。但是,抗原检测法的价值在于,该方法提供了施用于 VZV 疫苗受体的总抗原量的度量;该方法比 PFU 检测更快速,因而可在制备过程中监测 VZV 的产生;并且它至少与 VZV PFU 产量的峰值点相关,因而可供估测最佳收集时间。

采用下面的各个临界参数可使本发明方法更为成功,所有这些参数都在本发明范围内:

a. 利用大培养体积或加富培养基使细胞达到高度复制,并供给不能代谢的二糖如蔗糖,将选自人二倍体细胞如 MRC-5 的 VZV 易感染细胞培养至在单层培养中会合:

可以使用本领域内已知用于制备 VZV 的许多不同细胞培养系统中的任何一种。例如,非洲绿猴肾异倍体细胞、WI-38 细胞、MRC-5 细胞、以及许多其他细胞类型都曾用于该目的。我们一直用可用于生产人用疫苗的 MRC-5 细胞。但是,如果使用除 MRC-5 外的产量特别高的细胞系,可能会使无细胞 VZV 产量提高至超出本文报道的范围,这也是不足为怪的。只要这样一种细胞系适合用于本方法,本发明就包括这种方法对这种细胞的应用。

将在 35°C 和 5% CO₂ 气氛下,在含有 2% 或 10% 胎牛血清的伊格尔氏最低基本培养基 (EMEM) 中培养的亚会合或会合的 MRC-5

细胞单层中的无细胞活病毒产量进行比较,表明了细胞会合对无细胞 VZV 噬斑形成单位(PFU)产量的影响(见实施例 2,表 I)。

利用会合的细胞单层可使无细胞 PFU/ml 比采用亚会合单层感染获得的产量提高约 2-3 倍,不论亚会合培养物正在旺盛增殖(10%血清)与否(2%血清)。因此,在疫苗制备方法中会合但不是旺盛增殖的细胞对于提高 VZV 产量似乎是必需的。

病毒生长期间胎牛血清的百分含量看来对无细胞 PFU 产量没有大的影响。例如,一般情况下,在细胞生长期提供约 10% 的 FCS,而在该方法的病毒生长期则提供约 2% 的 FCS,无论细胞生长和病毒培养使用的是如 EMEM 或 EBME 的基本培养基还是如 SRFE-2 的加富培养基。

除了 FCS 和培养基外,通常向细胞培养和病毒生长培养基中加入一种抗生素(如 $50 \mu\text{g/ml}$ 新霉素)和谷氨酰胺(约 2mM)。

1. 细胞植入阶段:

将 MRC-5 或其他二倍体细胞接种到细胞培养容器(培养瓶、摇瓶,或这些培养容器的功能等同物)中,使细胞的初始浓度为约 $10,000$ 至 $40,000$ 个细胞/ cm^2 。将添加了约 10% 胎牛血清,并充有 5% CO_2 气体的生长培养基供给细胞,并在约 $30-37^\circ\text{C}$,优选约 35°C 下培养。

植入细胞的体积可以小到完全覆盖静置培养中的细胞所必需的体积。可使用的体积与表面积的比例是每 cm^2 生长表面约 0.5ml 培养基。当细胞在摇瓶中培养时,每 850cm^2 加 125ml 培养基可能就足够了,但优选约 $425\text{ml}/\text{cm}^2$ 。

本领域内已知的用于细胞培养的市售基本培养基,如伊格尔氏

最低基本培养基 (EMEM) 或添加了厄尔氏盐的伊格尔氏基本培养基 (EBME), 可以添加约 10% FCS 而用于细胞植入期。或者, 在该阶段使用更丰富的培养基也较为有利。从 SIGMA 公司得到的 SRFE 培养基 [Weiss, et al., *In Vitro* 16 (7), 616 - 628 (1980)] 是一种加富培养基, 在该阶段使用该培养基可能较为有利, 但对于该方法的此阶段来说, 加富培养基并不关键。

2. 细胞生长期:

在该方法的此阶段提供足够的营养以确保细胞生长至高度会合是关键。这可通过提供大体积的基本培养基或较小体积的加富培养基来实现。细胞在约 30 - 37°C, 优选约 32 - 35°C 下培养。

在有足够时间供细胞附着和细胞生长后, 移走并更换培养基, 然后继续培养, 这样可重新供给细胞养料。通过吸出或倾析, 或任何其他不损害细胞单层完整性的方法都可以移走培养基。对于如上所述植入的 MRC-5 细胞来说, 可以在细胞导入培养容器中约 72 小时后更换培养基。

更换培养基的体积可以与用于细胞植入期的体积相同。但是, 优选的是, 在细胞生长期提供的体积大于植入阶段使用的体积。当细胞是在基本培养基如 EMEM 或 EBME 加 FCS 中培养时, 这一点尤其重要。大培养体积是确保细胞获得足够营养的一条途径。

如果生长期供应的培养基是加富培养基, 则可降低对大体积的要求。达到该目的的一种特别优选的培养基是 SRFE-2 (SIGMA)。在该阶段使用加富培养基而不是基本培养基, 可以大大地提高会合时细胞单层的密度。细胞密度的提高又提高了可从在加富培养基中培养的感染细胞培养物获得的 VZV 的产量。例如, 在细胞生长期使

用加富培养基使最终 VZV 产量比该阶段在基本培养基中培养细胞时获得的产量提高约 2-4 倍。

在一个优选实施方案中, 用类脂补充 SRFE-2。许多类脂添加剂中的任何一种都可使用。例如, 发现来自成年牛血清的富含胆固醇的类脂 (SIGMA CHEMICAL CO.)、EXCYTE 类脂 I 或极低内毒素 (VLE) 类脂 (MILES) 是有益的加富培养基或基本培养基添加剂。已证明商品大豆类脂 (Boehringer Mannheim, 也可参阅 Iscove et al., J. Exp. Med. 147, 923-933 (1978)) 以约 0.2mg/ml 的浓度添加时是很好的添加剂。利用 SRFE-2 加类脂和 FCS 已达到接近约 500,000/cm² 的细胞密度。不论细胞是在基本培养基还是在加富培养基中生长, 提供类脂都可使 VZV 产量提高。商品原料以 20mg/ml 类脂、100mg/ml 牛血清白蛋白原液供应。该材料可方便地以 1:100 最终稀释度使用。如果在细胞生长期用约 0.2mg/ml 大豆类脂添加 SRFE-2, 则最终 VZV 产量比单独用 EMEM 获得的 VZV 产量提高约 9 倍, 比单独用 SRFE-2 培养基时提高约 3.3 倍。

3. 感染前期

我们发现, 在 VZV 感染前, 使培养细胞与最适浓度的不能代谢的无毒二糖接触, 可以进一步提高最终的 VZV 产量。一个十分成功的实施方案是在将细胞导入培养容器中后约 72 小时, 优选在用 VZV 感染培养物前约 24-96 小时, 供给约 20-60mM 蔗糖。实际上, 在上述步骤 2 的新加培养基中加入约 50mM 蔗糖就能满足这些要求, 并且可以减少使该步骤有效进行所需的许多无菌操作及前面同时进行的一些步骤。

其他二糖, 包括乳糖、纤维二糖和麦芽糖, 也可以提高最终 VZV

产量,但蔗糖是优选的。所测试的单糖如果糖和核糖,不能提高 VZV 产量(核糖甚至是有毒的)。看来,二糖在生长中的细胞的溶酶体中被浓缩,使溶酶体膨胀形成液泡 [De Courcy and Storrie, Exp. Cell Res. 192. 52 - 60 (1991)]。二糖对 VZV 产量的这种影响可能是由于溶酶体对 VZV 的损伤减弱。除了二糖,预计三糖和四糖也具有有益的作用,因为 Cohn 和 Ehrenreich [J. Exp. Med. 129, 201 - 222 (1969)] 在给巨噬细胞供应这些较高级的糖或蔗糖时,只要这些糖不被细胞代谢,则也观察到相同的出现液泡现象。

b. 在尽可能接近会合点时,用实用范围内尽可能高感染复数的 VZV 感染细胞感染步骤(a)培养的细胞:

通过反复试验,我们发现,按平均数计算,与用 VZV 感染刚会合的细胞时相比,在会合后将细胞放置 48 小时仅产生约 50% 的 VZV PFU/ml。因此,使 VZV 接种物导入的时间尽可能接近会合点是很重要的。遗憾的是,会合是一种随培养基类型、所培养的细胞类型和所使用的其他培养条件而变化的参数。对于上述步骤(a)(1)中植入的 MRC-5 细胞,通常是在达到会合点时感染细胞。

优选的水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 是在美国专利 3, 985, 615 中描述的并在 ATCC 保藏的 Oka 减毒病毒株。该病毒适合在豚鼠胚细胞培养物和人二倍体肺成纤维细胞培养物 (例如 MRC-5 细胞) 中生长。

可以如下制备活的感染性水痘感染细胞: 以约 1: 125 的感染复数感染 MRC-5 细胞,维持该感染细胞以使病毒复制,用胰蛋白酶处理这些细胞,并立即用释放出的细胞作为操作种细胞或贮存起来供以后使用 and 进行 PFU 定量,贮存方法是: 加入冷冻保护剂如

DMSO 或甘油, 以约 10^7 个细胞/ml 的浓度缓慢冷冻。可将冷冻的 VZV 感染细胞原液解冻, 并加到会合的细胞培养物中以起动 VZV 感染。

或者, 可以按 Hondo 等 [Archiv für die gesamte Virusforschung 40, 397 - 399 (1973)] 描述的方法将 VZV 感染细胞冻干, 该方法允许冻干接种物在 4°C 下长期贮存。也可以使用无细胞 VZV 作为接种物, 但由于收集时病毒产量有损失, 使用细胞结合的接种物是优选的。

制备病毒感染细胞原液的另一种可行方法是: 在植入生产细胞前起动细胞生长以生产种病毒。在用 VZV 感染的细胞感染种细胞时, 可以开始植入生产细胞, 以便在种病毒达到峰值 VZV 效价的同时达到会合。不是最合适但较为方便的是, 将种细胞和大批细胞都同时植入小体积的培养基中 (约 $125\text{ml}/850\text{cm}^2$ 摇瓶)。在生长约 2-3 天后, 将生产 VZV 种病毒的摇瓶体积增加到约 425ml , 或换上加富培养基, 以使其生长到会合。将生产细胞保留于小体积的基本培养基 (包含约 10% FCS) 中使其处于相对休眠的状态, 直至用 VZV 感染细胞感染操作用种细胞前约 2 天。在这时, 将生产细胞的体积增加到约 425ml , 或换上加富培养基, 例如添加了最适量的大豆类脂和胎牛血清的 SRFE-2。然后使生产细胞生长至高度会合。在给生产细胞更换培养基两天后, 用 VZV 感染的细胞以 1:125 或更高的感染复数感染正处于会合点的操作用种细胞, 并使 VZV 复制继续进行约 2-3 天。当种培养物中 VZV 产量达到峰值时, 生产细胞也应已达到会合。然后收集种细胞, 加入到生产细胞中。

不论怎样安排生产种子的时间, 在 VZV 感染后的合适时间, 将

培养基从 VZV 感染种培养物中吸出, 通过用胰蛋白酶处理 (约 0.25% 胰蛋白酶) 或其他非破坏性方法收集 VZV 感染种细胞, 以已知的感染复数感染生产细胞培养物。

Schmidt, N. S. 和 Lennette, E. H. [Infection and Immunity 14, 709 - 715 (1976)] 注意到了高感染复数对高 VZV 产量的重要性, 但没有与低感染复数感染进行严格的比较。本发明对此进行了精确的比较。

从细胞培养物中移走生长培养基, 并用含有已知量的按上述方法制备的 VZV 感染细胞的新鲜培养基替代, 从而用 VZV 感染细胞。最好滴定病毒原液的水痘噬斑形成单位 (PFU), 并计数受体细胞, 以便定量测定感染复数。感染复数以接种物中 VZV 感染细胞与培养物中未感染单层细胞数的比例来表示。例如, 1:10 的感染复数高的, 而 1:625 是低的。高感染复数是所希望的, 但实际上低至 1:125 的感染复数就可获得良好的 VZV 产量。

当感染复数在 1:7 和 1:625 之间时, 在最高感染复数时产生约 500,000 PFU/ml, 在最低感染复数时产量降至约 100,000 PFU/ml (见实施例 5 的表 3)。感染复数越高, 到达 PFU 峰值需要的培养时间越短, 产量越高。例如, 根据感染复数和收集时间, 最终 PFU 可达到约 5 倍的范围。

c. 将 VZV 感染培养物在高营养状态下维持约 22-96 小时, 并在 VZV 产量达到峰值时收集:

在感染后将 VZV 感染细胞继续培养约 22-96 小时。在该病毒生长阶段保持足够的营养是关键。最好是, 或者提供大培养体积的基本培养基如加有约 2-10% FCS 的 EMEM, 或者提供较小体积的加

富培养基。最优选的是,提供未补充类脂添加剂而加了2-10%FCS的SRFE-2。已注意到在该阶段加入类脂会降低VZV产量。

在感染后培养的22-96小时期间,VZV在已感染的细胞中进行复制,并传播开来而感染邻近的细胞。但是,老的感染细胞不会产生可回收的无细胞PFU。VZV生长曲线和随后的下降可能很陡。因此,正确地选择收集时间是达到最大感染性VZV产量的关键参数,通过对每一次生产操作输入的感染复数、营养和培养时间都进行严格的控制,可以精确地重复这一参数。另外,由于感染性VZV产量与VZV抗原的产量相关,至少直到开始出现病毒死亡的时刻为止,可以使用快速VZV抗原ELISA选择最适收集时间(见图5)。

对于在感染后约72小时收集的VZV感染MRC-5细胞,如果前面的每一步骤都是最佳的(即在加富培养基中生长并在感染前使细胞与50mM蔗糖接触72小时),则无细胞VZV的最终产量比在基本培养基中生长并在48小时时收集病毒获得的产量提高约16倍,比在96小时时收获产量提高更多(见实施例8,图1)。在感染后48小时收集病毒时在上述最佳条件下VZV的产量仅比在基本培养基中生长时的产量提高约4倍,但仍比在基本培养基中96小时收集时的产量大大提高。因而,在加富培养基中病毒产量高得多,病毒死亡大大减少,病毒产量并不随时间而陡降。在加富培养基中感染复数的关键性也降低。

d. 在收集VZV感染细胞前,用任选含有溶酶体营养剂如氯化铵或氯喹的生理溶液洗涤VZV感染培养物:

为了从培养基中除去血清、类脂和细胞碎片,用不会裂解细胞的生理缓冲液洗涤单层培养物。磷酸盐缓冲盐水对此很适用。可将细胞

洗涤几次,并通过倾析、吸出或任何其他方法移去洗涤溶液,只要不破坏单层的完整性就可以。

如果采用化学方法从培养容器中释放出细胞,应将这些细胞通过离心而浓缩,并用起稳定作用的溶液替代生理缓冲液。

已发现在收集细胞前提供氯化铵或氯喹可提高最终 VZV 产量。Kielian 等人 [EMBO J. 5, 3103 - 3109 (1986)] 利用氯化铵控制细胞内含物的内部 pH 值,在这些内含物内感染性病毒明显地度过了其某部分胞内生活。使细胞与溶酶体营养剂接触后 VZV 产量提高的机理可能与诱导出了较不苛刻的内含物环境有关。因此,在感染前供给细胞无毒的、不能代谢的二糖如蔗糖,以及使细胞与氯化铵或氯喹接触,可能也以类似的机理起作用。无论如何,经验已证实了下列结论: 当在细胞破碎前提供终浓度为 1 - 100mM (最优选的是在 20 - 50mM 范围) 的氯化铵,并优选在约 4°C 供给约 25 - 50 分钟时,可以提高最终的 VZV 产量。浓度约 230 μ M 的第二种溶酶体营养剂即氯喹,也同样提高 VZV PFU/ml 的回收率。

e. 将 VZV 感染细胞收集到最小体积的稳定溶液中,并且或者立即破碎细胞,或者冷冻这些细胞供以后破碎:

一旦 VZV 感染细胞已经洗涤,如果生长容器允许,可用刮擦法收集细胞,或用化学方法分离细胞。由于一旦细胞破碎残留的酶会降低病毒的产量,因而酶促释放细胞不太令人满意。如上面指出的,如果将细胞释放到生理盐水中,可通过离心浓缩细胞,并用最小体积的 VZV 稳定溶液代替生理盐水。体积与细胞生长表面积合适比例为约 40ml 稳定剂/850cm²。

病毒稳定剂是本领域内已知的。例如,在美国专利 3,985,615 中

建议用溶于磷酸盐缓冲盐水中的 5% 蔗糖作稳定剂，而其他报告中推荐了更复杂的稳定剂如 SPGA。

在将 VZV 感染细胞重新悬浮于稳定剂溶液中后，可立即破碎细胞，或在制备大量 VZV 的情况下，冷冻于 -70°C 供以后操作。如果立即破碎细胞，每 cm^2 培养细胞的 VZV 产量会略高一些，但冷冻步骤通常不会导致产量损失高于立即操作所得产量的 10%。

f. 破碎 VZV 感染细胞以最适地释放细胞结合的 VZV，并除去细胞碎片，以提供无细胞的 VZV 制备物：

如上面所述，在破碎前最好先从细胞中移走培养基并用最小体积的 VZV 稳定剂代替，在该稳定剂中刮出细胞或用其他方法释放细胞。将细胞悬浮液冷却到 $0-4^{\circ}\text{C}$ ，然后利用合适的方法破碎细胞，例如声波处理、DOUNCE 匀浆、比 DO UNCE 更容易测量的其他类型的剪切力，或这些技术的组合。

我们已经证实，单独的声波处理不能使无细胞 VZV 达到最佳回收率。事实上，如果以 DOUNCE 匀浆法作为起始破碎步骤，接着离心，保留该上清液作为上清液 I，接着将沉淀用声波处理并离心获得上清液 II，则可以大大提高破碎得到的 VZV 产量。上清液 I 和上清液 II 的总产量比单独用声波处理作为破碎技术得到的产量高四倍。

在细胞破碎后，通过离心、过滤，或本领域已知的任何其他方法除去细胞碎片，而不损害 VZV。然后用稳定剂溶液稀释无细胞病毒制备物，再分装供作为疫苗使用。对于长期贮存来说，优选一种本领域已知的方法将 VZV 冻干。

概括地讲，与在基本培养基中培养细胞时的 VZV 产量相比，采

用该方法的最佳步骤使潜在产量提高的近似值报告如下:

方法步骤	PFU提高倍数
培养基/添加剂	
1. 感染复数	2-5
2. 细胞会合	2-3
3. SRFE-2培养基+类脂	2-3
4. 感染前期加蔗糖	2-5
5. 最适培养基体积	1-2
培养基/稳定剂添加剂结合使用 和最适感染条件时的 净潜在提高	
	≥ 8
摇瓶中3、4和5组合 观察到的提高	
	16
6. 联合使用剪切/声波处理法 释放细胞结合的VZV	1.5
相对于非最佳方法的总的 潜在提高	
	≥ 18

该方法对疫苗生产的实用性:

已证实了减毒无细胞 VZV 作为疫苗预防水痘的实用性。多次临床实验已经结论性地证明这种实用性, 并且这样的证明现已是现有技术的一部分 [见例如 Pediatrics 88 (3), 604 - 607 (1991); Pediatrics 87, (5), 604 - 610 (1991)]。因而, 本发明对该领域的重大贡献是提供了高产量地制备活的减毒 VZV 的高效方法。根据本发明制备的病毒可以按照本领域已知的方法配制成疫苗, 并按照现在

已完善的方案给药。例如,可将本发明的活的减毒无细胞 VZV 产品稀释到稳定剂中,装瓶,并以单位剂量冻干,这样,在贮存于约 4℃或更低时,在使用时有效剂量约为 1000PFU。根据本发明方法制备的 VZV 疫苗可以单位剂量制剂用于接种人体,诱导出免受 VZV 毒性株感染的保护性免疫应答。优选的是,通过皮下或肌肉给药时最小剂量为约 2000PFU/ml (1000 PFU/0.5ml 剂量)。已施用过的剂量高至总共 15,000 至 20,000PFU,并且是能够接受的。

通过提供生产减毒 VZV 病毒的最佳方法,本发明使人们有可能应用本领域已知方法配制供增强抗 VZV 免疫应答以预防水痘的疫苗。

下面提供的实施例是为了说明本发明而不应误认为是限制发明范围。

实施例 1

测定 VZV 产量的分析方法

利用 Krah 等人(J. Virol. Methods, 1990, 27: 319 - 326)描述的琼脂糖覆盖法或液体覆盖方法,估测水痘-带状疱疹病毒(VZV)制备物的感染效价。该分析方法如下进行:

将 MRC-5 细胞以在 5ml 体积的添加了 100mg/L 半乳糖、50 μ g/ml 新霉素、2mM L-谷氨酰胺的 BME (添加了汉克斯氏平衡盐溶液的伊格尔氏基础培养基) 中 6×10^5 个细胞的浓度接种于 60mm 组织培养平板上,并于 5% CO₂ 气氛中于 35℃ 下培养。在培养 24-48 小时后,细胞达到 50-80% 会合。吸出生长培养基,并用稀释于适当病毒稀释液如 SPGA 缓冲液或液体维持培养基 (LMM) 中的 100 μ l VZV 溶液感染细胞。SPGA 缓冲液含有 7.5% (W/V) 蔗糖、

11mM 磷酸钾、0.1% (W/V) 谷氨酸钠和 1% 人血清白蛋白。使病毒在 5% CO₂ 气氛中于 35°C 附着至少 1 小时。然后用 5ml 琼脂糖覆盖培养基 (AOM) 或液体维持培养基 (LMM) 覆盖 VZV 感染细胞培养物。琼脂糖覆盖培养基是二种溶液即液体覆盖培养基 (LOM) 和琼脂糖溶液的混合物。LOM 含有添加了厄尔氏盐的基本必需培养基 (MEM)、2% 热失活的胎牛血清、50 μg/ml 硫酸新霉素以及 2mM L-谷氨酰胺。琼脂糖溶液的制备方法是：将 100ml MEM 中的 4.5 克低胶凝温度琼脂糖在 121°C 加热 15 分钟，并使该溶液冷至 45°C。AOM 的制备方法是：将 1 倍体积的琼脂糖溶液与 4 倍体积的 1.25 倍浓缩的 LOM 在 45°C 下混合。将平板冷却至 23 - 25°C 使 AOM 固化。培养该培养物使之显示噬斑。6 - 7 天后，用 5ml 磷酸盐缓冲盐水覆盖加了 LOM 的平板，并用玻璃巴氏吸管吸其边缘以便松散和移出琼脂糖。从加了 LMM 的平板上吸出培养基，用溶于乙醇 - 1% 乙酸中的 0.2% (W/V) 考马斯蓝 R - 250 溶液染色细胞，从而显现噬斑。噬斑数取 4 - 5 个平行平板的平均值，并表示为每毫升的噬斑形成单位 (PFU/ml)。

由于该分析方法具有潜在的可变性，VZV 产量的提高是相对于在非最佳条件下进行同样的分析时的结果而报道的。

实施例 2

感染时的细胞会合程度对 VZV 产量的影响

以 4×10^6 个细胞/150cm² 的浓度涂布 MRC5 细胞，并在 10% 胎牛血清 (FCS) 存在下使之在补充了伊格尔氏基础培养基 (EBME) 的厄尔氏盐中生长 3 天。当达到约 12×10^6 个细胞/150cm² 的亚会合细胞密度时，用补充了 2% FCS 或 10% FCS 的新鲜 EBME 更换细胞培

培养基。此时使亚会合细胞在有或无 VZV 感染 (感染复数 = 1: 125) 的情况下进一步生长, 并在 48 小时后监测细胞密度和病毒产量的提高。发现 2% FCS 中的未感染细胞的密度仅提高 33%, 而在 10% FCS 中则提高 92%。感染培养物中细胞数目没有增加。如表 I 所示, 不论是补充最小量 (2%) 还是最大量 (10%) 的 FCS, 培养物中细胞复制的能力都不影响亚会合细胞的病毒产量。

将其他细胞培养物在 10% FCS 中再培养 2 天达到约 20×10^6 个细胞/150cm² 培养瓶 (会合条件), 并将培养基换为补充了 2% FCS 或 10% FCS 的新鲜 EBME, 并用 VZV (感染复数 1: 125) 感染或不进行感染。48 小时后监测细胞密度和病毒产量的提高。发现在 2% FCS 中未感染细胞的密度没有提高, 而在 10% FCS 中细胞密度仅提高约 15%。因而没有一种状态能使细胞大量复制。在 2% 或 10% FCS 中病毒产量相似, 都比亚会合时感染的细胞中的产量提高约 3 倍 (见表 I)。这样便可以确认, 为得到最佳产量的无细胞 VZV, 使用刚会合的细胞单层优于使用旺盛复制的亚会合细胞单层。

表 I

感染时细胞 单层的状态	病毒生长 期间%FCS	无细胞		病毒生长期 间潜在的 细胞复制
		PFU/ml		
		实验		
		A	B	
		—	—	
亚会合	2	44,000	30,000	33%
	10	33,000	27,000	92%
刚会合	2	119,000	117,000	0%

实施例 3

刚会合和长久会合细胞培养物中 VZV 产量的比较

将 MRC-5 细胞以约 26,500 个细胞/cm² 的浓度接种于摇瓶 (850cm²) 中。所有细胞都在含有 10% (V/V) 胎牛血清 (FCS₁₀) 的 EBME 培养基中, 在 5% CO₂ 气氛中于 35°C 培养。根据用 VZV 感染的时间将培养瓶分为两组。I 组细胞培养五天, 此时细胞单层会合。这时除去培养基, 以感染复数为 1:125 的细胞结合 VZV 感染细胞, 并将细胞悬浮于 EMEM + 2% FCS 中。加入另一些培养基, 将细胞再培养 48 小时。II 组细胞在以 1:125 的感染复数感染前再维持 48 小时。

如下测定 I 组和 II 组细胞的 VZV 产量: 从摇瓶中移出培养基, 并用磷酸盐缓冲盐水淋洗细胞, 在等体积稳定剂中用玻璃珠擦落细胞, 并冷却至 4°C。通过声波处理破碎冷细胞悬液。通过低速离心 (325xg 离心 10 分钟) 除去病毒中的细胞碎片, 保留病毒上清液。通过噬斑分析测定 VZV 的产量。如表 2 所示, 用 VZV 感染刚会合的细胞单层时产量提高将近 2 倍。

表 2

	实验 1	实验 2
条件		PFU/ml
刚会合	121,000	190,000
长久会合	82,000	85,000

实施例 4

培养体积对 VZV PFU/ml 产量的影响:

在 850cm² 摇瓶中将 MRC-5 细胞 (一千万个) 接种于 125ml 体积的含 10% FCS、50 μ g/ml 新霉素和 2mM L-谷氨酰胺的 EBME 中, 在 35°C 下培养 3 天。加入 300ml 新鲜培养基, 将培养物在 35°C 下再培养 4 天。然后移去培养基, 用 125 或 425ml 含 2% 热失活 FCS、50 μ g/ml 新霉素和 2mM L-谷氨酰胺的 EMEM 替代。加入 VZV 感染 MRC-5 细胞 (感染复数约为 1: 125), 给培养物充 5% CO₂, 在 35°C 下再培养 46 小时。除去培养基, 用 100ml 体积的 PBS 洗涤细胞 4 次, 借助玻璃珠将细胞擦落于 43ml 体积的稳定剂中。在 -70°C 冷冻细胞。通过声波处理制备无细胞病毒。用 VZV 噬斑分析法测定澄清 (通过离心) 的声波处理液中感染性病毒的数量。

结果:

培养基体积 (ml)	VZV PFU/ml
125	55, 000; 45, 000
425	153, 000; 103, 000

* 二个平行培养物的结果

结论: 使用较高的培养基体积使 MRC-5 细胞培养物中感染性 VZV 的产量提高约 2 倍。

实施例 5

VZV 感染复数对 VZV PFU/ml 产量的影响:

将 MRC-5 细胞接种于摇瓶中并培养至会合。除去生长培养基并以不同感染复数用 VZV 感染细胞。定期收集并如实施例 1 进行分析, 用噬斑分析法测定感染细胞培养物中 VZV 的产量。如表 3 和图

5 所示, 采用较高的感染复数时无细胞感染性 VZV 的回收率较高, 并在较短的培养时间内就能达到这一回收率。用较高的感染复数也可以更快地达到峰值抗原水平。在感染复数很低如 1:625 时, 抗原的产生推迟并且不是最佳的。

表 3 输入的细胞结合感染复数对单层
MRC-5 培养物中无细胞 VZV 产量的影响

感染复数	无细胞 VZV 效价 (PFU/ml) $\times 10^{-3}$			
	收集时间			
	22 小时	37 小时	42 小时	60 小时
1:25	100	450	50	未测
1:125	未测	150	325	100
1:625	未测	未测	100	90

实施例 6

-20°C 时 VZV 在稳定剂中稳定性的增加

在 SPGA 中对感染细胞培养物进行声波处理, 并用磷酸盐缓冲盐水洗涤。然后通过声波处理释放出细胞结合的病毒, 并离心去除细胞碎片。将无细胞病毒的浓度调至已知的 PFU/ml 浓度, 并冻干稳定剂中病毒的等分样品, 贮存于 4°C 或 -20°C。在总共 14 个月内, 每隔

一个月取样使其复原,并测定剩余的 PFU/ml 效价。该实验的结果示于图3 中。

很明显,贮存于 -20°C 达到的 VZV 稳定性大大优于贮存于 4°C 时的稳定性。

实施例 7

在细胞生长的感染前期加入蔗糖的量
及时间的选择对最终 VZV 产量的影响:

1. 细胞植入阶段:

以 120,000 个细胞/ml 的浓度 (总共为 600,000 个细胞) 将 MRC-5 细胞植入 60mm 平板中的 EBME 培养基中,并在 5% CO_2 气氛下 35°C 培养。该培养基含有 10% FCS、 $50\mu\text{g/ml}$ 新霉素、 2mM L-谷氨酰胺。

2. 细胞生长/感染前期:

在植入后第 3 天细胞会合。吸出 48 个平板中的植入培养基,并用 8ml 体积的生长培养基替代,该培养基含有 EBME 或 SRFE-2,并补充了 10% FCS、 $50\mu\text{g/ml}$ 新霉素、 2mM L-谷氨酰胺和 0.2mg/ml 大豆类脂/ 1mg/ml BSA,并含有或不含有 50mM 蔗糖。在加入新鲜的生长培养基后,将细胞在 5% CO_2 中在 35°C 下再培养 3 天。

3. VZV 感染:

然后移出每个平板中的培养基,用 8ml EMEM 代替 EBME,用 8ml SRFE-2 代替 SRFE-2 加大豆类脂。将所有平板中的 FCS 降低至 2%,但其他的添加剂:新霉素、谷氨酰胺和蔗糖,与生长期相

同。然后在每块平板加入在含 2% FCS、新霉素、谷氨酰胺的 EMEM 中以 1:16 稀释的 VZV 感染细胞 (47,000PFU/ml) 333 μ l。

使 VZV 在 5% CO₂ 中于 35°C 下复制 2 天, 然后每个不同条件移出两块平板的培养基。用 PBS 洗涤细胞 4 次。将细胞刮落到每平板 1.2ml 冰冷稳定剂中。将由平行平板得到的收集物合并于 50ml 锥形离心管中, 并于 -70°C 下冷冻。

在 VZV 感染后的第三、第四和第五天, 每个条件取两个平板重复进行前一自然段描述的相同步骤, 并将每两个平板为一组的收集物合并后贮存于 -70°C。

以后将按上述方法制备的每一种细胞收集物解冻, 利用喇叭形超声仪将每一管在冰上声波处理 30 秒, 并在 4°C 下以 1000xg 离心 10 分钟而使之澄清。移出上清液等份样品用于进行噬斑分析。按实施例 1 描述的方法进行噬斑分析, 结果示于图 1。

图 1 中提供的资料证实了几点结论:

1. 在感染前用 50mM 蔗糖培养细胞对最终 VZV 产量十分有利。如果在感染前用蔗糖处理细胞, 则在每一种培养基, 即 EMEM 或 SRFE-2 中, VZV 产量都较高。在感染后 72 小时, 按 PFU 测定结果计算, 在 SRFE-2 中培养的与蔗糖接触的细胞的 VZV 产量, 比在不含蔗糖的基本培养基中的细胞的 VZV 产量约高 16 倍!

2. 供应加富培养基 (在细胞生长期供给 SRFE-2 加大豆类脂, 在病毒生长期供给 SRFE-2) 有利于 VZV 产量, 但和蔗糖的作用合在一起, 可使产量再提高一个数量级。因而, 看来加富培养基与蔗糖的作用协同起作用。

3. 收集 VZV 的时间是非常重要的。甚至在最佳培养条件即

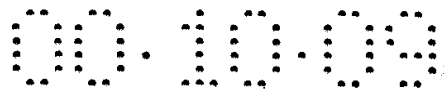
SRFE-2 和蔗糖等, 感染后48 小时也没有达到峰值 VZV 产量。此时产量仅比基本培养基产量增加 4 倍。但是, 感染后 72 小时 VZV 产量约提高 16 倍。

在另一些实验中, 如果在感染时而不是在感染前 72 小时加入 50mM 蔗糖, 则不能使 VZV 产量增加同样多, 从而表明了一个长感染前期对胞内蔗糖积累的重要性。我们还发现, 加入 25mM 或 100mM 蔗糖不如加 50mM 蔗糖好。同样的近似浓度也适用于乳糖、纤维二糖和麦芽糖。

实施例 8

多个强化方法参数对 VZV 产量的影响:

进行一个摇瓶试验以测定各种方法参数变化 (培养基、添加蔗糖、稳定剂中加 NH_4Cl 、用匀浆法或声波处理法从细胞中释放出病毒) 对无细胞 VZV PFU 产量的影响。将培养物以 80×10^3 个细胞/ml 植入每摇瓶中的 125ml 含 10% FCS 的 EBME 中。用 EBME 将体积调至 425ml, 或换用 SRFE + 大豆类脂培养基, 用在 125 (“小体积”) 或 425 (“大体积”) ml EMEM 或 SRFE 培养基 (无大豆类脂) 中的操作种 VZV 感染。这些培养基改变/感染时间的选择描述于实施例 7 中。在感染前不同时间 (感染前 96 或 24 小时, 或在感染时), 加入 50mM 蔗糖。在感染前加蔗糖的培养物在病毒感染培养基中也加蔗糖。以 1:15 的近似感染复数用 EMEM 培养物中的 VZV 感染细胞感染所有培养物, 46 小时时将培养物收集于含 20mM NH_4Cl (N) 或不含任何添加剂的感染后稳定剂中。所有样品都冷冻于 -70°C , 随后通过声波处理或 DOUNCE 匀浆从细胞中释放病毒。在 1000xg 离心 10 分钟使所有样品澄清。



经声波处理的样品获得的 PFU 结果给出下列结论:

1. 使用“大”体积的 EMEM 培养基使 VZV PFU 提高 2 倍。使用 SRFE 时, 本试验和其他一些试验表明, 在接近“小”培养基体积时获得最佳 PFU 产量。在某些情况下, 在“大”体积培养基时产量受到抑制。

2. NH_4Cl 对 PFU 的高回收率不是关键。

3. 对于 EBME/EMEM, 蔗糖使 PFU 产量提高 2 倍, 而对于 SRFE 培养物则提高 5 倍。这里似乎有加入蔗糖的时间对 PFU 的影响。在本实验的另一部分中, 未加蔗糖的 SRFE + 大豆/SRFE 培养物, PFU 产量是 94×10^3 , 而分别在感染时、感染前 24 小时、以及感染前 96 小时加蔗糖的培养物, 产量分别为 296×10^3 、 427×10^3 和 671×10^3 。

4. 经蔗糖处理的培养物比不含蔗糖的相同培养物的细胞病变效应小得多。在另一个实验中, 经蔗糖处理的培养物在感染后 1 星期仍没有显示出退行性细胞病变效应, 而相应的无蔗糖对照则完全溶解。因此, 经蔗糖处理的细胞可能在延长的培养时间内 (超过摇瓶实验中的 46 小时收集) 积累了更多的 VZV (抗原, 尤其是 PFU)。

5. 由于是在 SRFE 培养基中培养细胞, 本实验中未调整感染复数以在感染时达到较高的细胞密度, 所以如果这个参数取最佳值, 可以获得更大的 PFU 产量。

实施例 9

通过机械剪切、声波处理及其组合获得的无细胞 VZV 的产量

利用生产 VZV 的多种不同的条件进行类似于实施例 8 中所述实验的大规模实验。在该实验中分析一个新的参数, 即破碎细胞的方

式。将只进行 DOUNCE 匀浆、只进行声波处理、以及 DOUNCE 匀浆和声波处理相结合获得的无细胞 VZV 产量进行比较, 结果在后面报告。所报道的 VZV 培养条件用于在基本培养基 (EBME/EMEM) 或高营养培养基 (在感染前期 SRFE - 2 加大豆类脂 / SRFE - 2 + 50mM 蔗糖) 中培养的细胞。按实施例 8 中描述的方法培养细胞并收集, 并按实施例 1 中描述的分析方法测定 VZV PFU/ml。

表 4

无细胞 PFU/ml ($\times 10^{-3}$)

条 件	DOUNCE	声波处理 DOUNCE 沉淀	总数	只声波 处理
EBME/EMEM	42	7	49	38
EBME/EMEM	64	4	66	46
SRFE - 2 + 蔗糖	154	47	201	42

由这些数据可见, 当将机械剪切与声波破碎细胞结合使用时, VZV 产量可获得明显提高。

实施例 10

应用 SRFE - 2 培养基和大豆类脂添加剂提高 MRC - 5 细胞中活水痘疫苗的回收率:

将 MRC - 5 细胞接种于 25cm^2 T 形瓶的 EBME 中, 并在 35°C 下培养 3 天。移去培养基, 并用 12.5ml 的新鲜 EMEM 培养基, 或添加了 10% FCS、新霉素、谷氨酰胺并且不含大豆类脂或含 1: 200 稀释的类脂的 SRFE - 2 培养基代替。将培养物在 35°C 下再培养 3 天。

然后移出培养基，并在细胞中加入 VZV 感染 MRC-5 细胞以及 12.5ml 体积的含有 2% 胎牛血清、新霉素、谷氨酰胺的 EMEM 或 SRFE-2。标示为“SRFE-2”的培养条件是在细胞培养和病毒培养期间加 SRFE-2。“SRFE+大豆”条件是指样品在细胞培养期间加 SRFE-2 培养基和大豆类脂的 1:200 稀释液，但在病毒培养期间只加 SRFE-2 培养基。培养 48 小时后，移出培养基，用 5ml 体积的 PBS 洗涤细胞 4 次，并将细胞刮落至 1.2ml 体积的稳定剂中。将来自二个平行培养瓶的样品合并，并冷冻于 -70°C 。随后解冻后，通过声波处理破碎细胞，经离心 ($1000\times g$ 10 分钟) 澄清，并将上清液冷冻于 -70°C ，供以后进行病毒感染效价分析。结果示于图 4。结论：用 SRFE-2 培养基代替 EMEM 可使活水痘的回收率提高 2.5 倍。在细胞培养期间使用补充了大豆的 SRFE-2，可使病毒回收率再提高 2.7 倍，比利用 EMEM 病毒培养方法获得的结果净提高 7 倍。

实施例 11

用于 VZV 抗原定量分析的竞争性 ELISA:

由于 VZV 噬斑分析耗时长，因而不能很好地控制其过程。一种快速 VZV 抗原 ELISA 法可以测定 VZV 抗原的量，从而能够在活水痘疫苗制备期间监测病毒的生长。另外，这种检测方法可用来估测澄清的、经声波处理的大批量疫苗中 VZV 抗原的量，并潜在地可用于测定灌装疫苗冻干管中的抗原。简言之，进行该分析的方法是：用抗 VZV 血清溶液培养受试样品中的 VZV 抗原。使剩余的游离抗体与固定于 ELISA 微量滴定板上的 VZV 抗原结合。能够与滴定板结合的抗体的量与受试样品中抗原的量成反比。与一种酶联抗人抗体和合适的底物反应而生成能通过分光光度法定量测定的有色产物，从

而定量测定结合到滴定板上的抗体。

VZV 抗原 ELISA 和 VZV 噬斑分析通常应得到相关数据, 但应牢记, VZV 抗原分析既检测不能存活的 VZV 也检测活 VZV。由于尚未证明被杀死的 VZV 产生的免疫应答与活的减毒病毒产生的应答同样有效, 因而噬斑分析是测定制备 VZV 疫苗的病毒接种物剂量的关键性分析法。但是, 抗原分析法也是有价值的, 因为它提供了给予 VZV 疫苗受体的抗原总量的量度。

测试步骤:

1. 用来自 VZV 感染或未感染 MRC-5 细胞的糖蛋白涂布 ELISA 平板, 其上用含 0.1% NaN_3 的 1% 牛血清白蛋白 [组分 V, #A-9647, Sigma] 涂布以减少抗体对平板的非特异性吸附。各行用 VZV 或对照抗原交替涂布 (即 A、C、E 和 G 行涂 VZV 糖蛋白, 而 B、D、F 和 H 行涂未感染 MRC-5 糖蛋白抗原)。

2. 在 12×75mm 试管或小管中将已澄清 (3250g-分钟) 的受试抗原稀释于稳定剂中。将标准病毒抗原制备物 (由斑点印迹检测到 26 单位/ml VZV 抗原) 以 1:10 稀释, 然后以 1:1.25 倍连续稀释以提供 2.6、2.1、1.7、1.3、1.1、0.9 单位/ml 抗原浓度。还可包括其他稀释液以提供 0.7 和 0.5 单位/ml 的抗原。利用这一系列稀释液可以制做用于测定受试样品中抗原量的标准曲线。

3. 将人抗 VZV 血清在稳定剂中稀释到最终所需稀释度的二倍。

4. 将 300 μl 体积的经稀释的抗原分装到小管中, 与 300 μl 稀释的抗 VZV 血清混合, 并在 35°C 下培养 15-22 分钟。对照含有人抗 VZV 和稀释剂 (无抗原)。

5. 从每个血清-抗原混合物中取 $100\mu\text{l}$ 等份试样, 加到 2 个平行的 VZV 糖蛋白涂布孔和 2 个 MRC-5 糖蛋白涂布孔中 (每个样品四个孔) (例如: 样品 1 在第 1 列 A、B、C 和 D 行; 样品 2 在第 2 列 A、B、C 和 D 行; 等等)。

6. 将平板在 35°C 下培养 15 ± 1 分钟, 以使游离抗体 (没有与溶液中抗原复合) 结合至固定于平板上的病毒抗原上。

7. 洗掉未结合的抗体, 向孔中加入碱性磷酸酶结合的羊抗人 IgG 以检测结合的人抗体。

8. 在 35°C 下培养 15 ± 1 分钟后, 洗掉未结合的结合物。通过与溶于二乙醇胺缓冲液中的磷酸对硝基苯酯底物在 35°C 下保温 15 分钟而检测结合的结合物。

9. 加入 $50\mu\text{l}$ /孔 3M NaOH 终止底物反应后, 利用微量滴定板分光光度计定量测定显色反应 (405nm 处的 OD 值)。

试验结果的计算和解释:

1. 分别计算平行的 VZV 和 MRC-5 涂布孔的平行 OD 值的平均值。经验证明, 在不同的样品和稀释液之间 MRC-5 OD 值是一致的。因此, 计算整个平板的 MRC-5 值的平均值, 并用于校正一级抗体或结合物与未感染细胞提取物的非特异性结合。分别从每个 VZV OD 平均值中减去 MRC-5 OD 平均值, 得出 VZV 特异性 OD (ΔOD) 值。

2. 制做测定抗原量的标准曲线:

将标准曲线 ΔOD 值相对于已知抗原浓度 (VZV 单位数/ml) 制图。将数据输入合适的制图程序 (例如: Cricket Graph version 1.3, Cricket Software, Malvern, PA), 鉴别曲线的线性部分 (必须包含

至少 4 个点), 得到“直线拟合公式”($Y = a + bx$)。

3. 计算受试样品中的抗原量:

由直线拟合公式得出 a 和 b 的值, 而 $y(\Delta OD)$ 是已知的。然后可计算出剩下的代表单位/ml 抗原的未知数 x , 并用相同的样品稀释液进行校正, 得到未稀释样品的抗原浓度。示范性的一般计算方法如下:

样品抗原	稀释度	ΔOD	单位/ml 抗原	单位/ml
稀释液			(由直线公式计算)	(校正)
A	1:2	Y	$x = (y - a) / b$	

(x) (稀释因子)

所报道的抗原浓度是用 ΔOD 值在标准曲线的线性部分内的稀释度最小的样品得到的。

实施例 12

VZV 抗原 ELISA 以及与 VZV PFU 产量的比较:

根据实施例 11 所述的 VZV 抗原 ELISA 法分析实施例 7 中得到的无细胞 VZV 样品, 该样品的 PFU/ml 产量示于图 1 中。该分析的结果示于图 2 中。

值得注意的是, 根据图 1 的数据, PFU/ml 在下降, 但即使如此, 在 96 小时 VZV 抗原也继续上升。也应注意, 在 SRFE-2 + 大豆 + 蔗糖中的 VZV 抗原量无论如何也没有接近 EMEM 中抗原量的 16 倍(图 2), 而活的无细胞 VZV PFU/ml 却接近(图 1)。从这一比较看来, 蔗糖的作用是在感染后 72 小时维持活 VZV 的主要因素。

实施例 13

利用 SRFE-2 培养基和大豆类脂添加剂促进 MRC-5 细胞的

生长

在 25cm^2 T 形瓶中的 12.5ml 体积的 EBME 中以 53,000 个细胞/ml 浓度接种 MRC-5 细胞,并在 35°C 培养。EBME 中含有 10% FCS、 $50\mu\text{g/ml}$ 新霉素和 2mM L-谷氨酰胺。2-3 天后,除去培养基,并用 12.5ml 的新鲜培养基或含 10% FCS、 $50\mu\text{g/ml}$ 新霉素、 2mM L-谷氨酰胺以及不同量大豆类脂的 SRFE-2 培养基代替(替换 2)。未稀释的大豆类脂含有 20mg/ml 类脂和 100mg/ml 牛血清白蛋白。

在细胞开始植入后 6 天移出培养基,并用 12.5ml 体积含 2% FCS、 $50\mu\text{g/ml}$ 新霉素、 2mM L-谷氨酰胺的 EMEM,或补充了不同量大豆类脂的 SRFE-2 培养基代替。通过胰蛋白酶处理打散选定培养瓶中的细胞,并用血球计数器计数。在 35°C 继续培养 2 天后测定剩余培养物中的细胞数,结果概括于表 5 中。

表 5

利用 SRFE 培养基和大豆类脂提高 MRC-5 细胞的密度

	实验 1	实验 2
培养基		
EMEM (E)	2.3	1.5
SRFE (S)	4.0	3.8
S + 1:100 大豆	未测	7.6
S + 1:200 大豆	7.9	7.6
S + 1:500 大豆	5.9	3.7
S + 1:2000 大豆	5.0	3.8

培养基替换 1 = 在细胞植入后 2-3 天用补充了 10% FCS

的指定培养基代替原培养基。

培养基替换 2 = 在细胞植入后 6 天用补充了 2% FCS 的指定培养基代替原培养基。

结论：使用未补充类脂的 SRFE-2 可使细胞数比只用 EMEM 提高约 2 倍。用大豆类脂补充培养基可使细胞产量以剂量依赖性方式进一步提高。SRFE-2 培养基与约 200-400 μ g/ml 类脂结合使用获得最大细胞产量。

实施例 14

按照本发明方法培养 WI-38 细胞

以 53,000 个细胞/ml 浓度将 WI-38 细胞接种于 25cm² T 形瓶中的 12.5ml 体积的 EBME 中，该培养基含 10% FCS、50mg/ml 新霉素、和 2mM L-谷氨酰胺，并在 35°C 下培养。2 天后，移出培养基，用 12.5ml 补充了 50mg/ml 新霉素、2mM L-谷氨酰胺和 1:200 稀释的大豆类脂的 SRFE-2 培养基代替。对照组加入不含类脂添加剂的培养基。在 35°C 培养 5 天后，移出培养基，用胰蛋白酶处理法打散培养瓶中的细胞，并用血球计数器计数。其余的培养瓶再保持 3 天，然后计数细胞。结果概括如下：

表 6

细胞系	类脂添加剂	细胞数/瓶 $\times 10^{-6}$	
		5 天后	8 天后
1	-	4.2	4.8
	+	9.5	10.2
3	-	4.1	4.9
	+	9.3	12.5

结论: 用大豆类脂补充加富培养基使 WI-38 细胞产量提高约 2 倍。因而预计利用该细胞系生产 VZV 可达到与用 MRC-5 细胞类似的效果。

实施例 15

评价 MRC-5 细胞生长促进作用的步骤:

以约 53,000 个细胞/ml 将 MRC-5 细胞植入 25cm² T 形瓶中的 12.5ml 体积的 EBME 中, 该培养基含有 10% FCS、50 μ g/ml 硫酸新霉素(neo)和 2mM 谷氨酰胺(Gln)。在 35°C 培养 3 天后, 通常细胞单层达到约 50-75% 会合。移出培养基, 用 10-12.5ml 含有 10% FCS、50 μ g/ml neo 和 2mM Gln $\pm$ 大豆类脂或其他类脂的 SRFE-2 培养基代替, 并再将培养物在 35°C 培养。在不同时刻用胰蛋白酶处理细胞 (2.5ml 体积的 0.25% 柠檬酸盐胰蛋白酶溶液), 并用血球计数器计数, 从而测定细胞数。用 0.2% 锥虫蓝以细胞排除法监测细胞存活率。利用细胞计数推算出细胞浓度, 根据该浓度和细胞悬液总体积, 计算出每瓶中细胞产量。在某些实验中, 在培养基替换后 3-4 天将培养物移至含 2% FCS 的培养基中, 再培养 2 天后测定细胞数。

实施例 16

延长培养细胞与类脂添加剂接触时间的影响

将 MRC-5 细胞植入 T25 培养瓶中, 3 天后加培养基 (第一次更换培养基), 再培养 3 天后测定细胞数。更换培养基 $\pm$ 类脂 (第二次更换) 使其他 T25 瓶继续生长 2 天。用胰蛋白酶回收细胞。在 EBME 中植入并在 EMEM 中培养的细胞产量是 2.6×10^6 , 而在 SRFE-2 + 1: 100 稀释的大豆类脂中培养的细胞达到 6.6×10^6 和 7.7×10^6 。在 EBME/EMEM 中培养的细胞继续生长 2 天后的细胞数为每 T25

瓶 2.76×10^6 ，而在不添加大豆类脂的 EBME/SRFE-2 中继续生长 2 天后的细胞数为每 T25 瓶 9.2×10^6 和 7.88×10^6 。在 EBME/SRFE-2 + 1: 100 大豆类脂中培养的细胞产量仅为 2.48 和 2.28×10^6 个细胞。这些数据表明，可能是由于细胞死亡，延长与高浓度类脂接触时间(第二次更换培养基后约 5 天)最终可能会导致细胞产量降低。因而一般是给细胞更换不添加类脂的加富培养基。在病毒生长期启动后换用不含类脂的加富培养基尤其重要，因为类脂对病毒生长或在病毒进攻下细胞的继续存活可能有毒。

实施例 17

在加富培养基和基本培养基中不同类脂

浓度对细胞生长的影响:

按照与实施例 16 所述基本相同的用于 MRC-5 培养物的基本上相同的更换培养基/细胞定量操作, 获得如下的细胞产量(注意: 培养基描述后的“+”和“-”符号表示在第二次更换的培养基中存在或不存在所述量(mg/ml)的大豆类脂(sl.) 添加剂):

总的 T25 瓶中

培养基

MRC-5 细胞产量 $\times 10^6$

第二次更换培养基后天数

	3	5
EBME/EMEM (3 次实验)	4.3; 2.46; 1.52	2.94; 3.50
EBME/SRFE-2	3.80	
EBME/SRFE-2 - 0.4 sl.		13.69; 11.09
EBME/SRFE-2 + 0.4 sl.	11.7	11.65
EBME/SRFE-2 - 0.2 sl.	5.10	8.51; 6.27
EBME/SRFE-2 + 0.2 sl	7.62; 9.7	9.66

EBME/SRFE-2 - 0.1 s1.	3.52
EBME/SRFE-2 + 0.1 s1.	4.94
EBME/SRFE-2 - 0.04 s1.	3.10
EBME/SRFE-2 + 0.04 s1.	3.16
EBME/SRFE-2 - 0.01 s1.	2.90
EBME/SRFE-2 + 1:01 s1.	3.82

上面总结的数据通常与在实施例 16 中观察的结果相一致, 即延长细胞与高浓度类脂接触时间不是很有利的, 尽管实施例 16 中观察到的毒性效应在这些数据中较不明显。在较低类脂浓度时, 细胞与类脂接触较长的时间危害较小, 可能有利于提高每 cm^2 生长表面的细胞产量。

实施例 18

胎牛血清浓度对细胞产量的影响:

在本实验中测试在类脂添加剂存在时加入 2% 或 10% 胎牛血清的影响。将 MRC-5 细胞植入 EBME 中, 3 天后换用补充了不同量大豆类脂的 SRFE-2 培养基, 2 天后再换用与第一次更换的培养基含相同浓度类脂的 SRFE-2。对于补充了 0.1、0.2 和 0.4mg/ml 类脂的培养物, 10% FCS 中细胞产量分别是 9.5 、 11.3 和 12.2×10^6 。如果加入 2% FCS, 细胞产量分别是 6.5 、 8.8 和 3.2×10^6 。该实验指出了提供 FCS 添加剂以及类脂添加剂对细胞生长都有有益影响。提供足够的 FCS 添加剂可以减弱在较高的类脂浓度下细胞受到的任何毒性作用。

实施例 19

不同的类脂添加剂对 MRC-5 细胞生长的影响:

将 MRC-5 细胞植入 T25 瓶中的 EBME。在第 3 天, 给细胞换用含有 10% FCS 并添加了不同类脂添加剂的 SRFE-2 培养基。以

所指出的浓度提供 Boehringer Mannheim 大豆类脂、Sigma 来源于成年牛血清的富含胆固醇的类脂、或 Miles/Pentex EX - CYTE I 或 Very Low Endotoxin 牛脂蛋白。更换培养基后细胞数为 1.19×10^6 。五天后测定细胞数。在 EMEM 中细胞数为 2.97×10^6 ；在 SRFE - 2 或 SRFE - 2 + 0.4mg/ml、0.2mg/ml 和 0.1mg/ml 大豆类脂中分别得到 4.83、10.44、8.67 和 8.04×10^6 个细胞。在 1:50、1:100、1:200 的浓度下，EX - CYTE I 分别得到 5.37、4.80 和 4.74×10^6 个细胞。1:25、1:50、1:100 的 EX - CYTE VLE 分别得到 5.49、7.23 和 7.92×10^6 个细胞。1:25、1:50、1:100 的 Sigma 高胆固醇类脂分别得到 6.87、7.56 和 7.65×10^6 个细胞。Boehringer Mannheim 大豆类脂使细胞产量提高最多，但 EX - CYTE VLE 和 Sigma 类脂几乎同样有效。因此提高效果不是大豆类脂所独有的。

实施例 20

利用高浓度的大豆类脂促进 MRC - 5 细胞生长

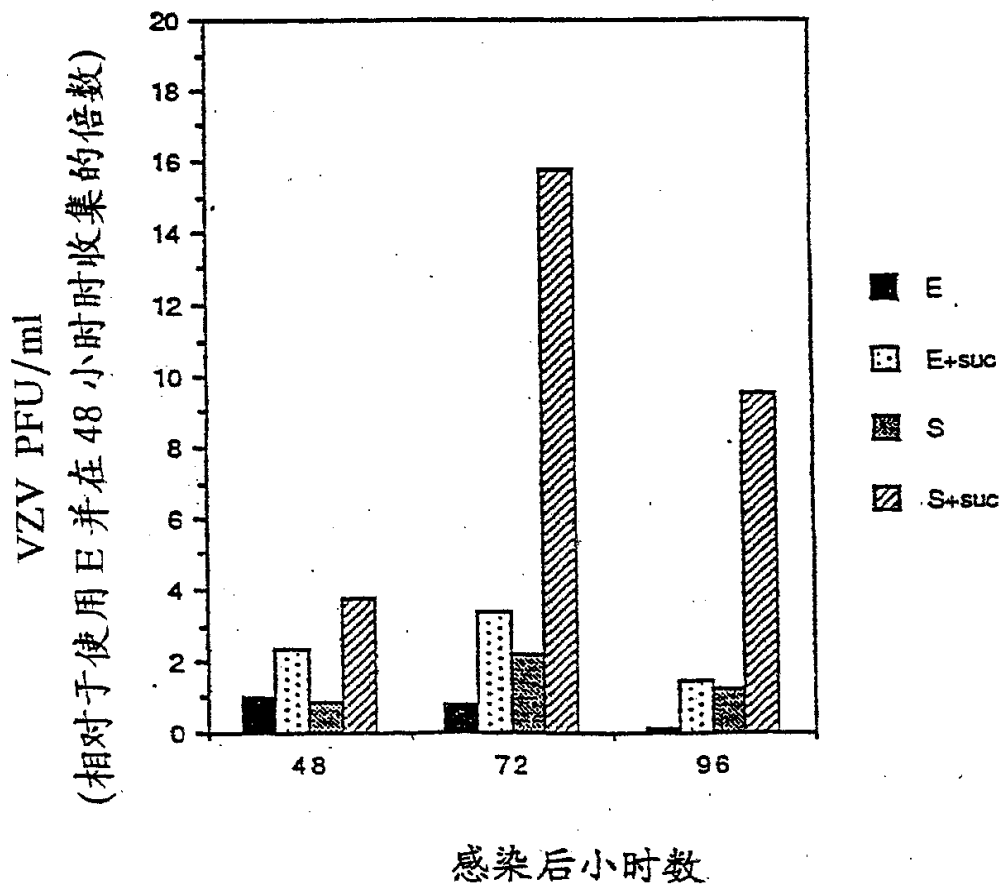
将 MRC - 5 细胞接种在 25cm^2 培养瓶中，并按实施例 13 方法在第 3 天和第 6 天更换培养基。EBME/EMEM、SRFE - 2 + 1/100 大豆类脂或 SRFE - 2 + 1/50 大豆类脂培养物第 6 天时每个瓶中细胞产量分别为 4.3×10^6 、 9.7×10^6 和 11.7×10^6 。所有培养物的细胞存活率都大于 99% (由锥虫蓝排除法判断)。换用培养基 ± 大豆类脂，再培养 2 天，测定细胞产量。这些培养物每瓶的细胞回收量为：二个平行的 EBME/EMEM 培养物为 2.9 和 3.5×10^6 ；换用同样培养基的 SRFE - 2 + 1/50 大豆类脂时为 11.65×10^6 ，而换用不含大豆类脂的 SRFE - 2 培养基的 SRFE - 2 + 1/50 大豆类脂培养物 (二个平行培

养物) 的产量为 13.69 和 11.09×10^6 个细胞; 换用同样培养基的 SRFE-2 + 1/100 大豆类脂为 9.66×10^6 , 而换用不含类脂的 SRFE-2 的二个平行培养物的产量为 8.51 和 6.27×10^6 个细胞。

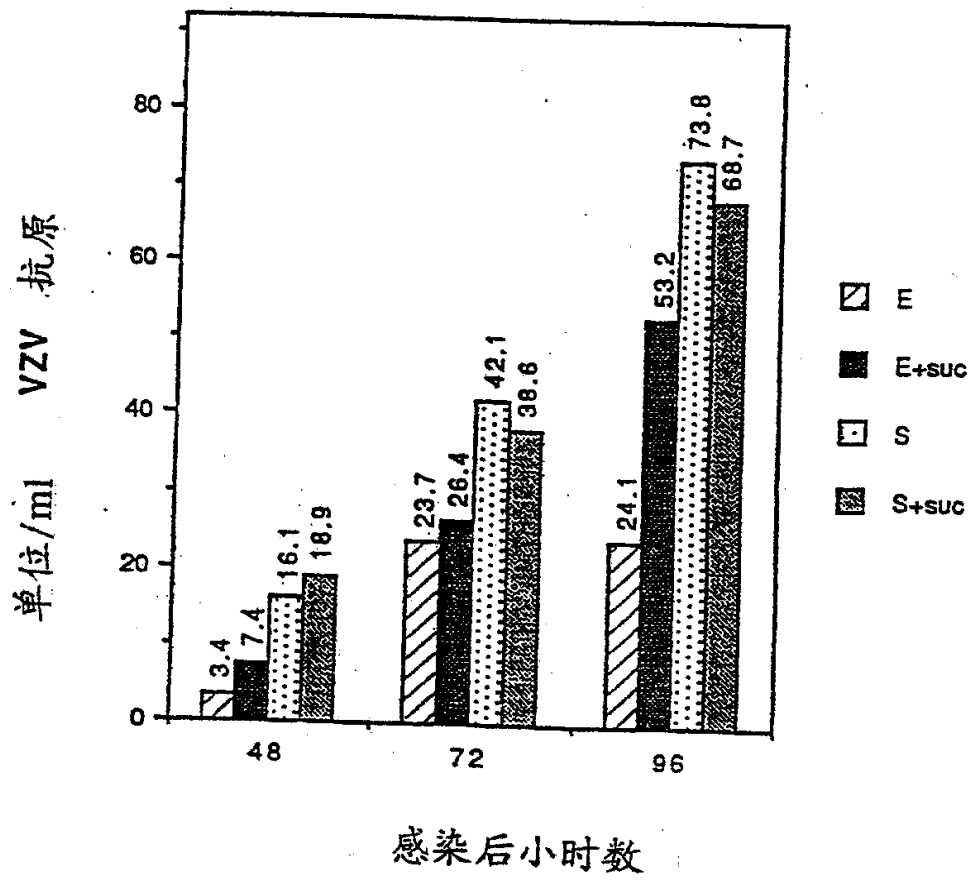
由该实验可见, 提高大豆类脂量可提高 MRC-5 细胞产量。利用 1/50 稀释的大豆类脂(所测试的最高浓度)获得最大细胞产量。在第二次更换的培养基中加入类脂能适度地提高细胞产量。但是, 该数据表明, 在第一次更换的培养基中使用 1/50 类脂可获得最大细胞产量。于是, 第二次更换的培养基中可以不加类脂添加剂。由于高浓度的类脂对病毒生产可能有害, 因而在病毒生长期间最好不加类脂。

图 I

补充了蔗糖的培养基中的 VZV PFU 产量



无细胞 VZV 抗原的产量

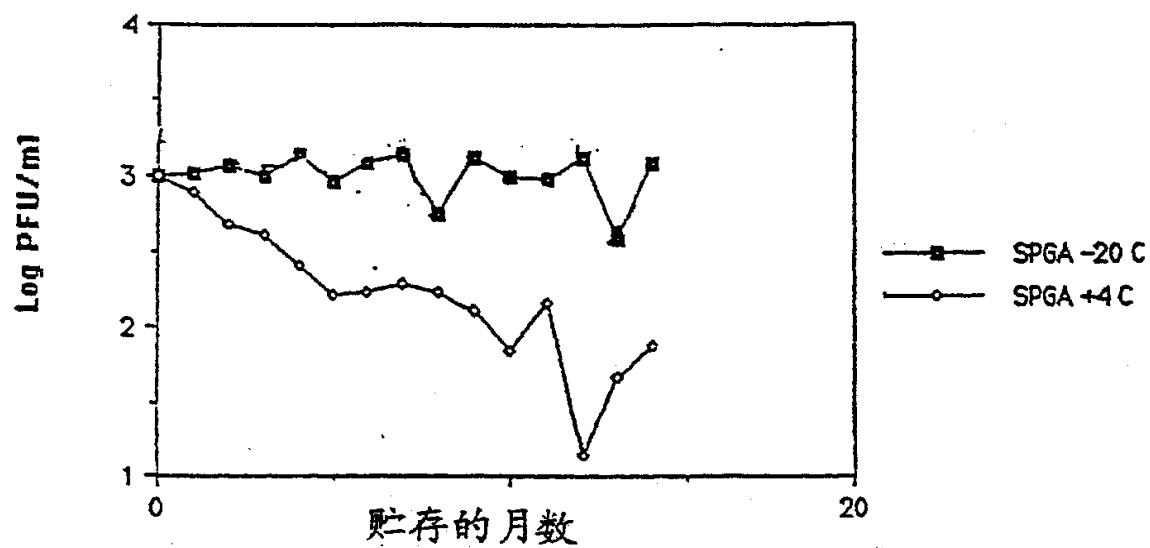


00-10-09

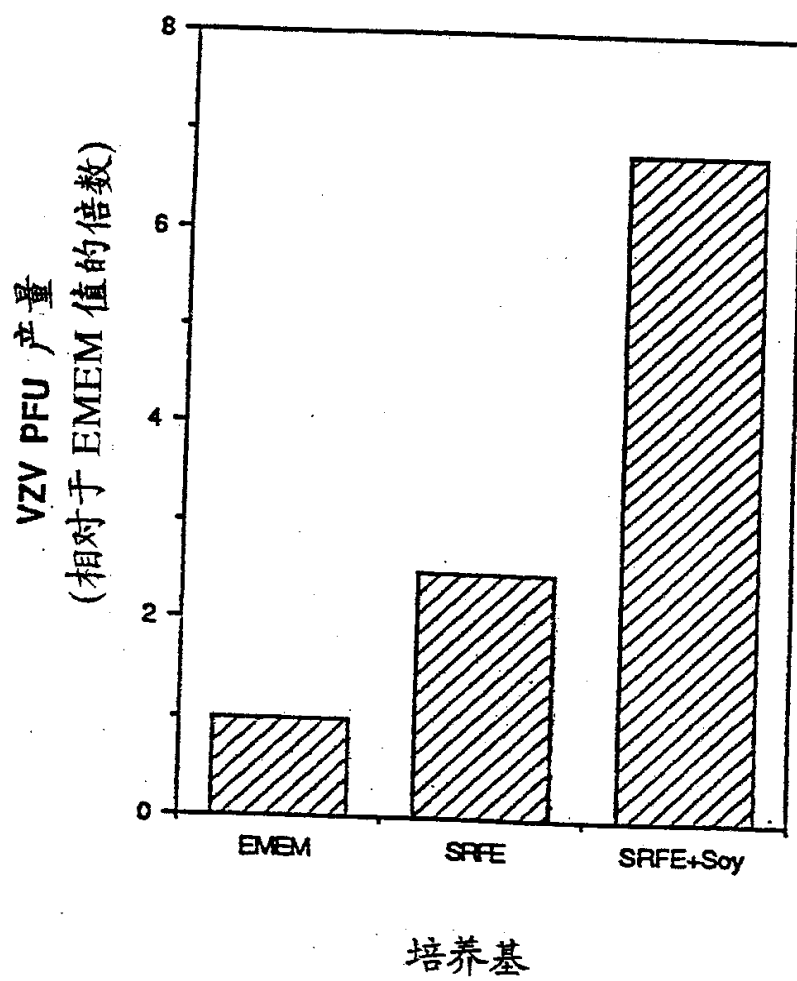
图

3

-20°C或4°C时 VZV 在 SPGA 稳定剂中的稳定性



利用不同的培养基获得的 VZV PFU 产量



输入的细胞结合的感染复数
对无细胞 VZV 产量的影响

