



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102091329 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201110032529. 8

(22) 申请日 2011. 01. 30

(73) 专利权人 哈药集团生物疫苗有限公司

地址 150069 黑龙江省哈尔滨市香坊区哈平
路新发屯

(72) 发明人 姜力 藏玉婷 柴华 王彬 王琪
任德强 戴秀莉 张智明 武佳斌
张明艳 张婷婷

(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

代理人 孙皓晨 余光军

(51) Int. Cl.

A61K 39/23 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101947318 A, 2011. 01. 19, 权利要求 1 -

6, 说明书第 1 - 7 页 .

CN 101851609 A, 2010. 10. 06, 说明书摘要、
权利要求 1.

CN 101947318 A, 2011. 01. 19, 权利要求 1 -
6, 说明书第 1 - 7 页 .

CN 101745106 A, 2010. 06. 23, 全文 .

审查员 张蕊

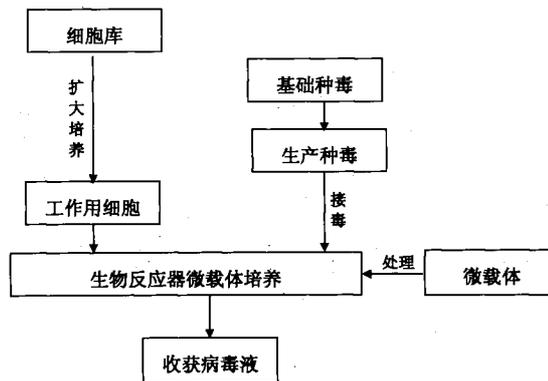
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

猪细小病毒灭活疫苗的制备方法及其产品

(57) 摘要

本发明公开了猪细小病毒灭活疫苗的制备方法,包括:(1)将猪细小病毒弱毒株接种 ST 细胞,培养得到生产种毒;(2)将处理后的微载体加入到生物反应器中的细胞生长液中,搅拌;(3)将 ST 细胞接入到生物反应器中的微载体中进行细胞的繁殖培养;(4)将猪细小病毒生产种毒感染生物反应器中悬浮培养的 ST 细胞进行病毒的繁殖培养;(5)收获繁殖的病毒液,灭活,配苗,即得。本发明方法细胞维持时间长,细胞活力高、活细胞密度大,有利于病毒的持续繁殖,所制备的病毒液病毒滴度高。本发明方法的生产过程衔接紧密、顺畅,规模放大容易,猪细小病毒的收获方便,质量稳定,可显著降低生产成本、有效提高疫苗产量和质量。



1. 一种猪细小病毒灭活疫苗的制备方法,包括:(1) 将猪细小病毒(Porcineparvovirus)弱毒株接种 ST 细胞,培养得到生产种毒;(2) 将预处理后的微载体按照每升细胞生长液中含有 5-7g 的微载体的配比比例加入到细胞生长液中,搅拌,搅拌速度为 40rpm,搅拌时间为 30min;(3) 将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 50rpm;(4) ST 细胞密度达 1×10^7 /mL 时,将猪细小病毒生产种毒以感染复数为 0.01MOI 感染生物反应器中悬浮培养的 ST 细胞,搅拌,采用灌注培养法进行病毒的繁殖培养;(5) 收获繁殖的病毒液,灭活,配苗,即得;

其中,所述的微载体为 Cytodex-1 型微载体;所述的预处理方式包括:硅化、水化和平衡;

其中,步骤(4)中所述的灌注培养的温度为 35°C ,培养液的 pH 值为 7.4,搅拌速度为 50-60rpm;

所述的猪细小病毒弱毒株是猪细小病毒弱毒 L 株,其微生物保藏号是:CGMCC No. 3352。

2. 按照权利要求 1 所述的制备方法制备得到的猪细小病毒灭活疫苗。

猪细小病毒灭活疫苗的制备方法及其产品

技术领域

[0001] 本发明涉及一种兽用活疫苗的制备方法,尤其涉及一种猪细小病毒灭活疫苗的制备方法以及由该方法制备得到的猪细小病毒灭活疫苗,属于猪细小病毒灭活疫苗的制备领域。

背景技术

[0002] 猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)可引起猪的繁殖障碍,主要表现为胎儿和胚胎的感染和死亡,而母体通常并不表现临床症状。血清学阴性母猪主要在妊娠的前半期经口鼻感染病毒,结果免疫机能不全的胎儿经胎盘受到感染,从而导致发病。经检查得知在世界各地的猪群中,该病毒是普遍存在的,在大多数猪场呈地方性流行。此病流行很广,在欧、美、亚及大洋洲很多国家均有报道。我国的各省市相继分离到猪细小病毒,血清阳性率很高。本病对养猪业的危害极大。由于PPV目前尚无有效的药物治疗方法,因此,该病的预防免疫就显得更为重要。

[0003] 体外培养的动物细胞有两种类型,一种是非贴壁性细胞,培养时不贴附于支持物上,而呈悬浮状态生长,胞体为圆形。来源于血液、淋巴组织的细胞,多数肿瘤细胞和部分转化细胞属于这一类型,其培养方式类似微生物培养方式;另一种是贴壁依赖性细胞,培养时能贴附在支持物表面生长。当细胞贴附在支持物上后,会迅速铺展,然后开始有丝分裂,进入对数生长期,数天后可长成致密的细胞单层。成纤维细胞、上皮细胞以及Vero细胞、BHK细胞、ST细胞等大多数动物细胞都属于此类型。目前中国生物制品生产上培养贴壁依赖性细胞如Vero、ST细胞等多采用传统转瓶培养或静置培养,该工艺因具有技术成熟投资量小的特点而被广泛应用,但其生产中细胞所能增殖的区域仅限于培养瓶的有限面积,培养的环境条件难以监测和控制,因此细胞密度低,而且劳动强度大,操作过程不易控制,发生污染,疫苗产量及质量受到极大限制。

[0004] 1967年, Van Wezal首次开发了微载体系统,创建了生物反应器微载体培养细胞工艺,使动物细胞培养进入高密度培养阶段。微载体是直径为60-50 μ m的微珠。由于微载体本身所占体积和质量不大,但有很大的有效面积可供细胞附着,大大提高了生产效率。微载体最早使用的材料是离子交换凝胶(DEAE-SephadexA-50),轻微搅动即可悬浮于培养基中。这种载体对细胞具有一定毒性,并且对培养液pH值也有一定影响。后来根据细胞生长特点,对微载体进行了改良,使其带有电荷或其它介质,更利于细胞的附着和生长。目前微载体已有葡聚糖微载体、聚苯乙烯微载体、中空玻璃微载体、交联明胶微载体、纤维素微载体、聚苯烯酰胺微载体等多种不同制造材料类型。其中,使用较多的是Cytodex型系列微载体(Cytodex1, Cytodex2, Cytodex3),它们都是带有不同基团的葡聚糖交联而成的大分子。Cytodex1整个载体带有正电荷,用于传代细胞如Vero、CHO细胞的培养;Cytodex2仅表面带有正电荷;Cytodex3不带电荷,其外表被胶原层包裹,胶原是豚鼠皮肤的提取物,同样适于细胞的附着生长。第一个工业化应用微载体的是1980年Meignier等用于口蹄疫病毒疫苗的制造,及后来的小儿麻痹疫苗的生产制造。

[0005] 采用生物反应器 / 微载体系统培养动物细胞, 细胞贴附于微载体上, 悬浮于培养基中, 逐渐分裂生长成单层细胞。该培养模式把单层培养和悬浮培养融合起来, 具有以下优点:

[0006] (1) 表面积 / 体积比大, 单位体积培养细胞的产率高。如 1mg Cytodex1 微载体表面积可达 5-6cm², 较传统的单层细胞培养面积大大增加。

[0007] (2) 改良后的微载体无毒性, 其大小和表面性质更适宜细胞生长, 而且具有一定的透明度, 便于显微镜观察细胞生长情况。

[0008] (3) 微载体悬浮于培养基中, 细胞生长环境均一, 简化了培养条件的监测和控制, 同时培养基利用率高。

[0009] (4) 采样重演性好, 收获过程不复杂, 劳动强度小, 占用空间小, 操作简便, 所需人员少, 工艺容易放大生产。

[0010] 目前通过 ST 细胞静态培养增殖猪细小病毒 (PPV) 病毒液, 已被广泛应用, 然而目前所用转瓶系统培养 ST 细胞生产疫苗的工艺, 虽技术简单, 但劳动强度大, 即使简单的换液都需付出巨大的劳动, 且染菌风险大。应用生物反应器系统和微载体培养贴壁细胞具有高比表面积、细胞产量高, 悬浮培养系统便于监测、控制和取样, 生产规模容易放大, 不易染菌等优点, 工业上被广泛应用于生产如狂犬病毒、脊髓灰质炎病毒等疫苗。

[0011] 但是, 利用生物反应器系统和微载体培养 ST 细胞生产 PPV 疫苗存在着猪细小病毒液培养产量偏低、不易规模放大、成本过高、疫苗质量不稳定等缺陷, 这些缺陷严重影响或制约了该方法在实际生产中的应用, 有待改进。

发明内容

[0012] 本发明所要解决的技术问题是克服现有的猪细小病毒灭活疫苗的制备方法中所存在的猪细小病毒液培养产量偏低、不易规模放大、成本过高、疫苗质量不稳定等缺陷, 提供一种新的猪细小病毒灭活疫苗的制备方法, 该制备方法利用生物反应器微载体悬浮培养 ST 细胞高效生产猪细小病毒液, 对生产工艺参数进行了优化, 该方法具有所生产的猪细小病毒液病毒滴度高, 能够规模化工业生产、成本低、疫苗质量稳定等优点。

[0013] 本发明所要解决的技术问题是通过以下技术方案来实现的:

[0014] 一种猪细小病毒灭活疫苗的制备方法, 包括:(1) 将猪细小病毒弱毒株接种 ST 细胞, 培养得到生产种毒;(2) 将处理后的微载体加入到生物反应器的细胞生长液中, 搅拌;(3) 将 ST 细胞接入到生物反应器的微载体中进行搅拌, 进行细胞的繁殖培养;(4) 将猪细小病毒生产种毒感染生物反应器中悬浮培养的 ST 细胞, 进行病毒的繁殖培养;(5) 收获繁殖的病毒液, 灭活, 配苗, 即得。

[0015] 本发明制备方法中, 所述的猪细小病毒弱毒株可以是猪细小病毒弱毒 L 株, 其微生物保藏号是: CGMCC No. 3352;

[0016] 其中, 步骤 (2) 中所述的微载体可以是 Cyotdex 型系列微载体, 更优选为 Cytodex-1 型微载体, 所述的预处理方式包括: 硅化、水化和平衡;

[0017] 优选的, 步骤 (2) 中将预处理后的微载体按照每升细胞生长液中含有 5-7g 的微载体的配比比例加入到细胞生长液中; 步骤 (2) 中所述的搅拌速度优选为 40rpm; 所述的搅拌时间为 20-40min, 优选为 30min。

[0018] 本发明考察了 ST 细胞的不同培养方式对细胞密度的影响,实验结果发现,采用灌注培养的细胞密度明显高于批式培养的细胞密度,本发明在进行 ST 细胞培养时优选采用灌注培养的细胞培养方式。此外,在灌注培养中,本发明发现细胞接种浓度对于细胞的生长速度和稳定性等有显著影响,本发明通过大量的实验最终发现,当 ST 细胞以 1×10^5 /mL 浓度接种到生物反应器中的微载体上时,第 7 天细胞密度就可达 1×10^7 /mL,细胞状态稳定,维持时间长,利于病毒繁殖。

[0019] 本发明人通过大量的实验发现,搅拌速度对于细胞的贴壁影响非常大。本发明通过大量的实验发现,步骤 (3) 中所述的搅拌采用以下搅拌速度时最有利于细胞的贴壁:首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 1-3 分钟,再将转速调整为 50-60rpm;更优选为:首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 1-3 分钟,再将转速调整为 50rpm。

[0020] 其中,步骤 (3) 中所述的培养温度优选为 37°C ,培养液的 pH 值优选为 7.0。

[0021] 本发明还发现,步骤 (4) 中猪细小病毒生产种毒感染细胞的剂量对于病毒液的病毒滴度有着一定的影响,本发明通过实验筛选发现,将猪细小病毒生产种毒以感染复数为 0.001MOI、0.01MOI、0.05MOI 感染生物反应器中悬浮培养的 ST 细胞有利于提高病毒液的病毒滴度,尤其是将猪细小病毒生产种毒以感染复数为 0.01MOI 感染生物反应器中悬浮培养的 ST 细胞进行灌注培养法培养可以有效提高病毒液的病毒滴度。其中,所述步骤 (4) 中所述的灌注培养温度优选为 35°C ,培养液的 pH 值优选为 7.4,所述的搅拌速度为 50-60rpm。

[0022] 本发明根据 ST 细胞生长代谢及病毒增殖的特点,对搅拌式生物反应器灌注培养技术应用于猪细小病毒疫苗生产进行研究,对各技术参数进行优化和筛选,使细胞增殖时培养环境稳定,并在接种病毒后细胞仍能得到足够的营养和平衡的环境;同时乳酸和氨等有毒代谢产物得以不断排除,本发明方法的细胞维持时间长,细胞活力高 ($\geq 90\%$)、活细胞密度大 ($\geq 1 \times 10^7$ cells/mL),有利于病毒的持续繁殖,所制备的猪细小病毒 TCID₅₀ $\geq 10^{8.0}$ 。生产过程衔接紧密、顺畅,规模放大容易,生产周期短,占用场地小,环境污染少且易于处理,猪细小病毒的收获方便质量易于实现均衡稳定,可显著降低生产成本、提高疫苗产量和质量。

附图说明

[0023] 图 1 本发明生物反应器微载体培养 ST 细胞生产猪细小病毒病毒液的工艺流程图。

具体实施方式

[0024] 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。

[0025] 实验材料:

[0026] 1. 细胞:ST 细胞(购自中国兽医药品监察所)。

[0027] 2. 毒种:猪细小病毒 L 株,保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,微生物保藏号:CGMCC No. 3352。

[0028] 3. 微载体:Cytodex-1, Pharmacia 公司产品。

[0029] 4. 试剂:活细胞计数试剂盒 (CCK-8),日本同仁化学研究所产品。

[0030] 实施例 1:微载体的处理

[0031] 1. 硅化:取数 ml 硅油,将搅拌瓶内壁浸湿,回收多余的硅油,烘干搅拌瓶后,用自来水洗九次,双蒸水洗三次,烘干备用。

[0032] 2. 水化:按培养的终体积称取微载体适量,使微载体 Cytodex1 的终浓度为 3mg/ml,放入搅拌瓶中,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -PBS 100ml/g,室温浸泡过夜或 37℃ 浸泡 3hr,弃去 PBS,再用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -PBS 50ml/g 洗一次,弃去,最后加入无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -PBS 50ml/g,高压灭菌,115℃,10psi,15min。

[0033] 3. 平衡:弃去搅拌瓶中的 PBS,加入高糖细胞生长液 100ml/g,室温过夜,临用前再用上述培养液洗一次。

[0034] 实施例 2:生物反应器微载体培养 ST 细胞

[0035] 1、细胞复苏:从液氮罐中取出 ST 细胞冻存管,迅速放入盛有 36℃ -37℃ 水中,摇动冻存管,尽快解冻;用吸管吸出细胞悬液,装入无菌离心管中,补加 10ml 细胞生长液(含 5% 小牛血清的 MEM 培养液),吹打使细胞悬浮;将细胞悬液离心,1000rpm 离心 10 分钟,弃上清;加入细胞生长液适当稀释后,移入细胞培养瓶中,置 37℃ 培养箱培养,6 小时后更换细胞生长液一次,再继续培养。

[0036] 2、细胞的传代与培养:取生长良好的致密单层 ST 细胞,吸出细胞生长液,用 PBS 洗涤 1-2 次;再加入浓度为 0.25% 的胰酶消化液,37℃ 消化 5 分钟,待细胞层松散、细胞圆缩时,吸出细胞消化液,加入少量细胞生长液吹打细胞,制成均匀细胞悬液,将适量细胞悬液移入灭菌细胞瓶,每瓶补加适量生长液,置 37℃ 恒温培养,形成良好细胞单层时,用于继续传代或接种于生物反应器中进行微载体悬浮培养。

[0037] 3、细胞毒种的繁殖:用维持液(1% 小牛血清的 MEM 培养液)将猪细小病毒 L 株毒种按 1-5% 比例接种到步骤 2 形成的细胞单层培养,细胞 70-100% 病变时收获病毒液;再将此病毒液作为种毒,在细胞上继续进行传代复壮,作为生产种子。

[0038] 4、ST 细胞在生物反应器中的微载体悬浮培养:生物反应器(B. Braun 公司, BiostatUD50 生物反应器)按总体积的 50-70% 加入无菌细胞生长液(5% 小牛血清的 MEM 培养液),且每升无菌细胞生长液中按 5-7g/L 浓度加入微载体,启动生物反应器,40rpm 搅拌 30min 后,取步骤 2 中培养好的 ST 细胞单层,用 EDTA-胰酶细胞消化液制备细胞悬液,细胞计数后按 1×10^5 个/ml 的密度接种到生物反应器中,调整转速为 80rpm 搅拌 1-3 分钟,再将转速保持为 50rpm,反应器温度逐步调整至 37℃,反应液的 pH 值控制为 7.0,一直保持该条件进行细胞培养。

[0039] 应用活细胞计数试剂盒 (CCK-8) 测定细胞活力,经测定活细胞密度 $\geq 1 \times 10^7$ cells/mL,细胞活力 $\geq 90\%$ 。

[0040] 5、制苗毒液的繁殖:接种后的第 7 天,微载体上的细胞长满 80-90%,空球率低于 5%,满球率大于 85%,培养细胞处于对数生长期,且细胞计数达到 1×10^7 cells/mL 以上;此时,将罐体温度调整为 35℃,用正压排出罐中液体,加入 2L PBS 洗涤细胞,搅拌 10 分钟后排出,重复洗涤 2 次。再用蠕动泵加入适量毒种,并补足维持液至工作体积。

[0041] 将步骤 3 中获得的猪细小病毒病毒液以感染复数为 0.01MOI 直接感染 ST 细胞,控制搅拌速度为 50-60rpm。接毒后每隔一定时间取生物反应器中的微载体,用显微镜观察细

胞病变情况,并检测样品 TCID₅₀;当为载体上的细胞全部脱落,且 OD 值呈明显上升趋势,停止反应器搅拌,待微载体全部沉到反应器底部后,收获上清和微载体。经检测,本实施收获的猪细小病毒 TCID₅₀ $\geq 10^{8.0}$;作为对照,应用细胞转瓶生产猪细小病毒 TCID₅₀ $\leq 10^{7.0}$ 。

[0042] 6、收获病毒液的处理:病毒液和微载体经 3 次冻融后,离心去除细胞碎片,置 -20℃ 保存备用。

[0043] 上述方案中,生物反应器参数调节:

[0044] 1) 温度:ST 细胞增殖培养时控制温度设定为 37℃,接种 PPV 后控制温度设定为 35℃。

[0045] 2) pH 值:ST 细胞增殖培养时控制 pH 设定为 7.0,接种病毒液后控制 pH 设定为 7.4。pH 波动为 ± 0.1 。

[0046] 3) 溶氧:培养初期使用压缩空气调节溶氧值,控制溶氧设定为 60%。溶氧波动为 $\pm 10\%$;培养中后期,当细胞密度大于 10^6 cells/mL 时,使用氧气和氮气调节溶氧值,控制溶氧设定为 50%。溶氧波动范围为 30% -80%。

[0047] 4) 灌流量:每天取样测定罐体收集液的葡萄糖浓度,以葡萄糖残余浓度为参考调整液体的灌流量。

[0048] 实施例 3:猪细小病毒病灭活苗的制备

[0049] 1、收获病毒液毒价测定:将实施例 2 中收获的细胞病毒液混合后取样,测定毒价,收获的猪细小病毒 TCID₅₀ $\geq 10^{8.0}$;而应用细胞转瓶生产(对照)猪细小病毒 TCID₅₀ $\leq 10^{7.0}$ 。

[0050] 2、灭活:按病毒液总量的 0.02% 向病毒液中加入二乙烯亚胺溶液,充分振荡后,于 30℃、100r/min 摇床上灭活 72h,然后加入 1% 硫代硫酸钠溶液,终止灭活。并作无菌检验及灭活检验。

[0051] 3、油佐剂灭活疫苗的配制:按照注射用白油 94 份、司本 -80 6 份和硬脂酸铝 1.5 份的比例配制油相;按照 96ml 抗原加入 4ml 吐温 -80 及 0.01% 加入硫柳汞的比例配制水相;水相和油相按照 1 : 1.5 比例进行乳化,制成油包水单相苗。

[0052] 试验例 1 生物反应器微载体培养 ST 细胞生产猪细小病毒病毒液的各工艺参数的优化试验

[0053] (1) 搅拌速度对细胞贴壁的影响

[0054] 设置了 6 组试验:

[0055] 试验 1 组:将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 40rpm;

[0056] 试验 2 组:将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 50rpm;

[0057] 试验 3 组:将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 60rpm;

[0058] 试验 4 组:将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 80rpm;

[0059] 试验 5 组:将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 100rpm;

[0060] 试验 6 组:将 ST 细胞按密度 1×10^5 个 /ml 接入到生物反应器的微载体中进行培养,首先在转速为 80rpm 的速度下搅拌 3 分钟,再将转速调整为 150rpm;

[0061] 对 6 组的细胞贴壁情况进行监测,取样进行细胞计数,结果显示,搅拌速度对细胞贴壁影响很大,试验 2 组 (50rpm) 最有利于细胞贴壁,当搅拌速度达 150rpm 左右时,细胞几乎不贴壁。

[0062] 表 1 不同转速的游离细胞数比较

[0063]

时间 (min)	游离细胞 (10^5 /ml)					
	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组	试验 5 组	试验 6 组
0	1.39	1.37	1.39	1.38	1.40	1.38
30	1.29	1.12	1.25	1.31	1.33	1.34
60	1.13	1.01	1.11	1.17	1.16	1.28
90	1.02	0.86	0.96	1.08	1.07	1.27
120	0.91	0.71	0.89	1.01	1.00	1.24
150	0.79	0.52	0.72	0.91	0.88	1.23
180	0.67	0.41	0.61	0.74	0.72	1.21
210	0.56	0.36	0.49	0.69	0.70	1.18
240	0.47	0.23	0.41	0.64	0.63	1.16

[0064] (2) ST 细胞批式培养和灌注培养比较

[0065] 以细胞浓度为 1×10^5 /mL 接种生物反应器,分别用批式培养法和灌注培养法培养,每天取样测微载体上细胞数,结果显示灌注培养的细胞密度明显高于批式培养。

[0066] (3) 不同细胞接种浓度对细胞增殖情况的影响

[0067] 分别用 1×10^4 /mL、 1×10^5 /mL 和 1×10^6 /mL 的细胞浓度接种生物反应器,观察发现细胞在接种 6 小时后,90% 细胞贴附上微载体,并开始伸展;24 小时内生长缓慢;第二天后细胞生长速度增快。随着细胞增殖速度增加,灌注量也随之调节增加,在我们实验灌注培养的条件下,细胞的形态一直保持较好。 1×10^5 /mL 接种浓度的第 7 天细胞密度达 1×10^7 /mL,细胞状态稳定,维持时间长,利于病毒繁殖;而接种浓度为 1×10^4 /mL 的培养 12 天细胞密度才能达到高峰;接种 1×10^6 /mL 浓度的培养 3 天细胞密度即达高峰,但细胞老化快,部分提前脱落,不利于病毒生产。

[0068] 表 2 不同细胞接种量的细胞增殖情况

[0069]

时间(天)	细胞密度 (cell/ml)		
	接种 1×10^4 /mL 组	接种 1×10^5 /mL 组	接种 1×10^6 /mL 组
0	1×10^4 /mL	10×10^4 /mL	100×10^4 /mL
1	3.2×10^4 /mL	22×10^4 /mL	220×10^4 /mL
2	7.3×10^4 /mL	37×10^4 /mL	501×10^4 /mL
3	15×10^4 /mL	112×10^4 /mL	910×10^4 /mL
4	21×10^4 /mL	285×10^4 /mL	600×10^4 /mL
5	32×10^4 /mL	598×10^4 /mL	540×10^4 /mL
6	38×10^4 /mL	764×10^4 /mL	510×10^4 /mL
7	47×10^4 /mL	1010×10^4 /mL	430×10^4 /mL
8	159×10^4 /mL	688×10^4 /mL	359×10^4 /mL
9	240×10^4 /mL	652×10^4 /mL	140×10^4 /mL
10	381×10^4 /mL	582×10^4 /mL	-
11	627×10^4 /mL	420×10^4 /mL	-
12	855×10^4 /mL	259×10^4 /mL	-
13	621×10^4 /mL	-	-
14	536×10^4 /mL	-	-

[0070] (4) 病毒感染复数对病毒滴度的影响

[0071] 以 1×10^5 /mL 细胞密度接种反应器, 于第 7 天细胞密度达 1×10^7 /mL 左右时接种病毒, 接种前洗涤 2-3 次后换用维持液。病毒感染复数分别为 0.001MOI、0.01MOI 和 0.05MOI, 取样测定 TCID50 发现, TCID50 高峰出现在 3-7 天, 以后逐渐下降。0.001MOI、0.01MOI 和 0.05MOI 感染复数的 TCID50 差别不显著, 其中 0.01MOI 的 TCID50 整体水平略高于 0.001MOI 及 0.05MOI。

[0072] 表 3 不同病毒感染复数对病毒滴度的影响

[0073]

时间(天)	TCID50		
	0.001 MOI	0.01 MOI	0.05 MOI
1	6.1	6.6	6.9
2	6.8	7.5	8.1
3	7.2	8.1	8.5
4	7.5	8.4	8.2
5	7.6	8.5	7.9
6	7.9	8.0	7.7
7	8.1	7.6	7.1
8	7.5	7.2	6.4
9	6.8	6.5	6.0
10	6.3	6.2	5.9
11	6.2	6.0	5.0
12	5.8	5.9	4.9
13	5.6	5.5	4.6
14	5.3	5.1	4.4
15	4.7	4.6	4.2

[0074] (5) 灌注培养葡萄糖消耗

[0075] 在培养过程中每天监测葡萄糖含量,发现接种细胞后的前3天,葡萄糖消耗量较低,随着培养时间的增长,细胞增殖速度加快,细胞数量增多,葡萄糖日消耗量也增大,到第6、7天当细胞密度达 1×10^7 /mL左右时,葡萄糖消耗量达到高峰。病毒感染细胞后,葡萄糖消耗量在感染后的2天内逐步降低,以后基本维持平衡,直至感染十几天后,消耗量才以较快速度降低。

[0076] (6) 灌注培养乳酸的产生

[0077] 在培养过程中通过对乳酸产生量的监测发现,乳酸产生量随细胞数量的增加而增加。接种细胞后的1-3天,乳酸生成量较小,pH值相对稳定。细胞进入生长对数期后,乳酸产生量加大,pH值下降较快,反应罐系统补充较多的碱,至第7天左右产生量达到高峰。感染病毒后,乳酸产生量在一定水平范围内降低,但仍维持在30mmol/天左右。

[0078] (7) 灌注培养氨的产生

[0079] 在培养过程中,随着细胞的生长代谢,氨会不断产生。在细胞增殖期间,产氨量逐步缓慢增加,感染病毒后氨的产生量仍保持相对稳定,在2.2mmol/天左右波动。

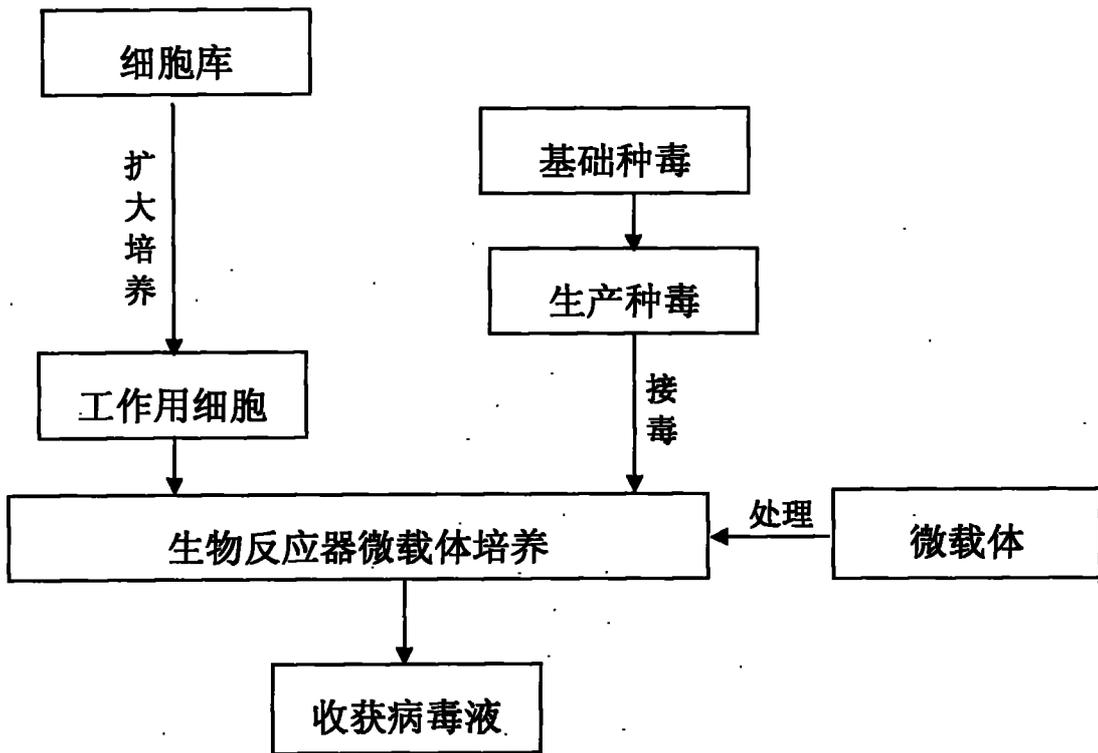


图 1