# 120L 反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒技术介绍

——中国系（C 系）猪瘟兔化弱毒

默克密理博北京清大天一科技有限公司

## 一、 技术背景

利用 ST 传代细胞系生产的猪瘟病毒活疫苗，已经在国内生产、销售，并已形成猪瘟活疫苗（传代细胞源）质量标准（暂行）。

目前，该生产工艺是采用传统的转瓶培养 ST 细胞工艺，即种子脾毒或细胞毒接种已形成单层的转瓶 ST 细胞，每 4—5 天收获一次毒液，基本等同于当前转瓶培养牛睾丸原代细胞生产猪瘟病毒工艺；因不同转瓶均是独立的细胞培养单元，每瓶的细胞质量、病毒产量和滴度都不同，导致疫苗批间差大，而且操作劳动强度大，隐性污染引起高内毒素等缺点。

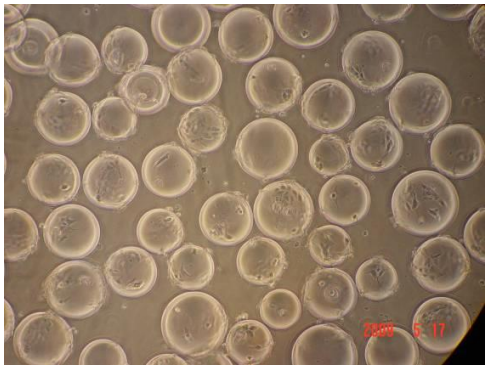
反应器微载体培养 ST 细胞的猪瘟病毒工艺，微载体提供了更大的细胞贴壁表面积，不仅能提高 ST 细胞密度，提高病毒滴度，而且反应器能自动监控细胞生长或病毒繁殖时的最适生化条件，每批反应器生产上清的病毒滴度均一，疫苗批间小、质量稳定。

MMBS 研发了适用于反应器微载体培养 ST 细胞的个性化细胞培养基、120L 反应器微载体培养 ST 细胞技术、120L 反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒等技术，为反应器微载体生产猪瘟活疫苗技术的产业化奠定了扎实的基础。

## 二、 工艺技术

反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒工艺：利用 ST 细胞专用培养基，血清（BVDV 抗体阴性）浓度可降低至 5%，从液氮中复苏 ST 细胞，方瓶、转瓶培养扩增种子细胞，直接消化 15L 转瓶的 ST 细胞，将种子 ST 细胞接种到 120L 反应器中，进行微载体悬浮培养，待 ST 细胞生长至选择合适密度，接种猪瘟种毒，不断地收获病毒上清。

图 1 和图 2 分别表示了反应器微载体培养 ST 细胞工艺过程的接种细胞 24hr 后以及接种病毒前的照片。反应器中的微载体浓度为 3g/L 时，细胞密度可以达到 $1\times10^6$cells/ml 以上，收获的病毒上清大于 200000 家兔感染量/ml。图 3 和图 4 是接种一定量猪瘟病毒后，连续维持 25 天的 ST 细胞照片：多次收毒后，维持 25 天的微载体上 ST 细胞仍贴壁良好，形态饱满。



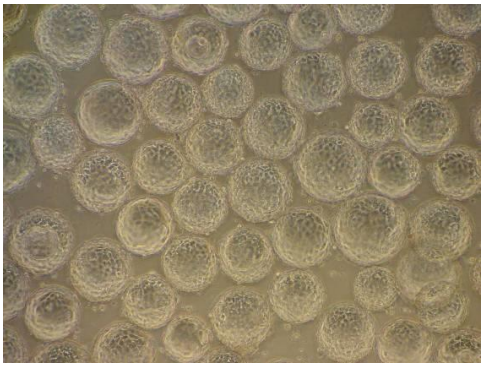
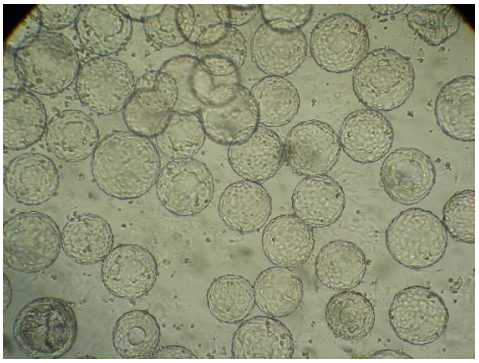


图 1：反应器微载体上 ST 细胞（接种 24hr 后）图 2：反应器的微载体长满 ST 细胞（接毒前）



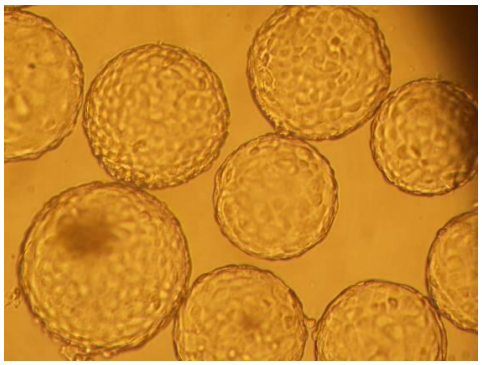
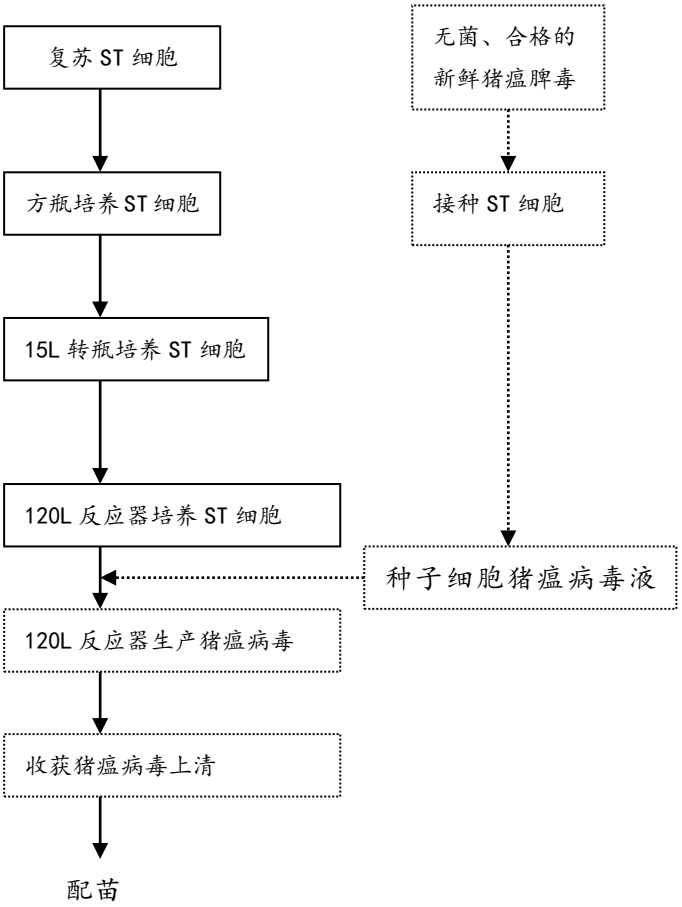


图 3：接毒后维持培养 25 天的 ST 细胞（100X ）图 4：接毒后维持培养 25 天的 ST 细胞(200X )

## 三、 工艺流程



## 四、 生产能力评估

一批疫苗生产能力： 120L 反应器的培养体积在 75L 左右，运行近一个月，收获 50 万 mL 的病毒液（约 20 万家兔感染量/ml），按现有规程可制备 1300 万头份苗：50÷(7500÷200000)=1300 万(头份)，即年产量 1300×11=14300 万（头份）

## 五、 项目验证

MMBS在受让方现场进行2个批次的120L反应器培养ST细胞生产猪瘟病毒工作，受让方协助MMBS进行必要准备工作（如清洗、准备、灭菌等），但不参与反应器的细胞和病毒培养工作，此阶段MMBS不向受让方提供工艺参数和技术资料。

每进行1批次的120L反应器培养ST细胞生产猪瘟病毒工作，双方技术人员按照合同约定，共同进行120L反应器的细胞液或者病毒液的取样，以及共同进行细胞密度/病毒滴度等规定项目的检定工作，形成双方确认的检测报告，并由受让方向MMBS出具盖章的该批120L反应器猪瘟病毒工作的验收报告。

## 六、 项目技术资料

1. 120L 反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒总结报告
2. 120L 反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒工艺规程
3. 120L 反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒操作规程
4. 120L 反应器微载体培养 ST 细胞生产猪瘟病毒技术要点
5. 120L 反应器细胞培养记录
6. 120L 反应器病毒培养记录

## 七、 培训

验证完成后，MMBS对受让方授权参加技术培训的人员进行理论培训及考核。

受让方技术培训人员考核通过后，在MMBS技术人员的指导下，独立完成120L反应器的细胞和猪瘟病毒培养的实际操作工作。

## 八、 技术转让费用

120L反应器微载体培养ST细胞生产猪瘟病毒工艺技术转让费用：400万元。详细情况双方签署《技术转让合同》约定。

## 九、 设备选择

受让方可选择MMBS120L反应器，价格140万元/台。其他厂家的适合微载体培养反应器也可以选择。