权 利 要 求

1. 一种无血清悬浮细胞生产慢病毒的方法，其特征在于，包括步骤：

(a) 提供一种用于生产慢病毒的包装细胞的种子液，所述的包装细胞是悬浮生长的包装细胞；

(b) 将所述种子液接种于置于培养容器中的第一培养液中，获得第一培养物，其中，所述的第一培养液是无血清的细胞培养液，并且接种密度为 1×10^6-5×10^6细胞/ml，并且第一培养液的体积为 3-100 升；

(c) 对所述第一培养物进行包装细胞的传代培养，其中，传代培养的条件设定为在温度为 30~38° C，溶氧为 35~55%，CO_2浓度为 2~10%和 pH 6.9-7.4 下进行，并且在所述传代培养过程中，监控所述第一培养物的实时 pH 值，并基于所述实时 pH 值对溶氧和/或 CO_2浓度进行控制，从而维持 pH 在 6.9-7.4 之间；

(d) 当满足换液触发条件时，启动换液操作，

其中，所述的换液触发条件包括：

(s1) 实时 pH≤6.9，较佳地≤7.0，较佳地≤7.05；

(s2) 通过调控氧气、空气、氮气和/或 CO_2浓度，实时 pH 值仍呈现下降趋势；和

(s3) 传代培养时间≥72 小时；

其中，所述换液操作包括：将位于所述培养物的无细胞清液从所述培养容器中排出，其中排出清液前所述培养物的体积为 Vq1，而排出清液后所述培养物的体积为 Vh1，则 Vq1/Vh1 之比为 3-15；然后，向所述培养容器中补加培养液，形成包装细胞培养物；

(e) 重复步骤(c)和(d) n 次，n 为 1、2、或 3 次；

(f) 当满足转染触发条件时，启动转染操作，

其中，所述的转染触发条件包括：

(t1) 细胞总量为 0.05~2×10^{11}个细胞；

(t2) 细胞密度为 0.5~5×10^6个细胞/ml；

(t3) 细胞活率≥90%；和

(t4) 总的培养时间≥72 小时；

其中，所述的转染操作包括：将用于生产所述慢病毒的生产质粒与转染试剂混合后，加入所述培养容器，从而导入所述的包装细胞，形成经转染的包装

细胞；

(g) 任选地进行转染后换液；

(h) 对经转染的包装细胞进行培养，其中，培养的条件设定为在温度为30~37° C，溶氧为35~55%，CO_2浓度为2~10%和pH 6.9-7.4下进行，并且在所述传代培养过程中，监控所述第一培养物的实时pH值，并基于所述实时pH值对溶氧和/或CO_2浓度进行控制，从而维持pH在6.9-7.4之间；

(i) 当满足换液触发条件时，启动收获与换液操作，

其中，所述的换液触发条件包括：

(s1) 实时pH≤6.9；

(s2) 通过调控氧气、空气、氮气和/或CO_2浓度，实时pH值仍下降；和

(s3) 传代培养时间≥72小时；

其中，所述换液操作包括：将位于所述培养物的无细胞的含病毒的料液进行回收，其中回收料液前所述培养物的体积为Vq2，而回收清液后所述培养物的体积为Vh2，则Vq2/Vh2之比为3-15；

(j) 重复步骤(h)和(i) m次，m为1、2、或3次，其中在重复之前，向所述培养容器中补加培养液，形成转染细胞培养物；

(k) 将各次回收的回收液进行合并，获得经合并的含病毒的清液；和

(l) 对所述的经合并的含病毒的清液进行纯化处理，从而得到经纯化的慢病毒载体；

其中，在上述所有步骤中采用的培养液均为无血清的细胞培养液。

2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述的步骤(c)和/或(h)中，在摇动条件下进行培养。

3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，在步骤(c)和/或(h)中，将pH维持在7.0-7.35之间。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在步骤(d)和/或(i)中，将Vq1/Vh1之比为5－10。

5. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(c)、(d)、和(e)的总时间为72-216小时。

6. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，在步骤(f)中，采用的多质粒转染包括三质粒转染、四质粒转染。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的培养容器是一次性培

养容器。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，经合并的含病毒的清液中含有的病毒总数为 1×10^{12}Tu。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的包装细胞是人胚胎肾上皮细胞。

10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在步骤(1)中，所述的纯化包括：超滤和层析。