

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01812787.8

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100475955C

[22] 申请日 2001.6.22 [21] 申请号 01812787.8

[30] 优先权

[32] 2000.6.23 [33] US [31] 60/213,665

[86] 国际申请 PCT/EP2001/007121 2001.6.22

[87] 国际公布 WO2001/098517 英 2001.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.14

[73] 专利权人 WYETH 公司

地址 美国新泽西

[72] 发明人 R·H·齐尔瑞洛 S·希莫里奇

[56] 参考文献

A serum - free medium for the culture of insect cells and production of recombinant proteins.
HINK W F. IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol. 27A . 1991

审查员 王慧梅

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程 泳

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 1 页

[54] 发明名称

大规模昆虫细胞培养的成本有效性培养基

[57] 摘要

描述了一种无血清的昆虫细胞培养基，该培养基以较商业上可获得的培养基低很多的成本，提供了在所支持的最大细胞密度上和在这些细胞中昆虫病毒的复制上的改进。也描述了一种改进的制备脂质乳剂的方法，该乳剂易于按比例扩大并可制取一种具更长保存期的更稳定的乳剂。

1. 一种大规模生产用于细胞培养基的脂质乳剂的方法，该方法包括：

a) 将 2.5g/L 的 Tween 80、1.0g/L 的鳕鱼肝油脂肪酸甲酯、0.45g/L 的胆固醇和 0.2g/L 的 α -生育酚混合，

b) 加热所述混合物至 50℃-60℃，

c) 用磁力搅拌棒持续搅拌所述混合物直至固体溶解并得到液相，

d) 继续加热并混合所述混合物，同时缓慢加入 0.5ml 水，接着加入 1.3ml 丙醇，

e) 将所述混合物冷却至室温，

f) 边混合边加入 1.7ml 丙醇，再次得到液相，

g) 边混合边逐滴加入 8.3ml 水或 1% Pluronic F-68 水溶液，

h) 增加搅拌速率，再加入 0.8ml 水或 1% Pluronic F-68 水溶液，

i) 边搅拌边缓缓加热所述混合物 15 分钟，同时保持温度低于 40℃，

j) 再加入水或 1% Pluronic F-68 水溶液以增加混合物体积至 1.0L。

2. 依照权利要求 1 的方法，其中水相不含有乳化剂或表面活性剂。

3. 依照权利要求 1 生产的脂质乳剂。

大规模昆虫细胞培养的成本有效性培养基

本发明涉及发酵和细胞培养，更特定地，涉及其中使用的细胞培养基和浓缩的脂质乳剂。

许多生物技术方面的新近进展，如病毒杀虫剂、经由昆虫细胞系的重组产品等，都需要大规模的体外细胞培养，这反过来又需要相当多的细胞培养基。不幸的是，发现于常规的细胞培养基中的血清和血清白蛋白是有问题的，并且对大规模罐发酵而言成本上是不允许的。迄今在现有技术中描述的无血清的其他选择方法在量大时也是很昂贵的。

大多数商业上可获得的培养基的主要问题是需要向培养基提供大量的血清成分（一般5-20%），由于血清的高价格和有限制的可获得性，这就造成了一个显著的限制因子。此外，在培养基中动物血清和/或血清白蛋白的使用从生产的观点看也是有问题的，这是因为血清中未鉴定的蛋白质的存在可使得下游产品纯化的努力复杂化，并且其中污染的动物病毒可造成严重的安全问题。类似的，在这些材料中发现的未鉴定的蛋白质也向较小规模的实验努力中引入了多余的变量。更进一步地，血清本身的质量在每一批都有变化，这就引入了污染的危险，这些危险必须由科学家或生产工程师针对血清的每一变化来研究和解决。

与细胞培养基中血清和/或血清白蛋白的使用有关的另一个问题涉及它们作为脂质成分载体的常规角色，这是大多数细胞培养工作的基本要求。因为直接将脂质加入培养基是不现实的（由于脂质的低溶解性），所以一般将脂质与血清成分一起以水溶性脂蛋白的形式加入。作为选择的，可将脂质结合到白蛋白成分上从而加入到培养基中。考虑到关于这些材料的使用有上述一些困难，然而提供一种不需要血清或白蛋白的合适的脂质乳剂将是有利的。Iscove, “无血清培养基中淋

巴细胞和造血细胞的培养 (Culture of Lymphocytes and Hematopoietic Cells in Serum-Free Medium), ”在 Barnes 等人, *Methods for Serum-Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells*, pp. 169-85 (1984) 中。尽管现有技术已经描述了用微乳剂来向常规的昆虫无血清培养基中供应必需的脂质 (Maoiella 等人 *Bio/Technology*, 6: 1406 (1988)), 但已证明这些现有技术的乳剂因为各种原因而不能令人满意, 包括高的生产成本和短期的稳定性。

因此, 所需要的是一种以相当低的成本提供细胞生长所需的基本的营养的、生物的和生物物理的必需品的细胞培养基。对大规模罐发酵而言, 理想的培养基可提供细胞生长和最大细胞密度的极好的性能, 并且也易于从相对较少数量的低成本成分制备得来。优选地, 该培养基应该不含血清。也需要的是可以以生物可利用的形式提供关键的脂质的浓缩脂质乳剂, 但消除了对如血清、血清白蛋白或其他来自培养基的蛋白质之类的脂质载体的需要。

本发明通过提供一种低成本、无血清细胞培养基而解决了现有技术的问题, 该培养基包含具有游离氨基酸和维生素新颖配方的修饰的基础培养基、替代传统的血清成分的蛋白胨成分和脂质乳剂成分。

大多数常规细胞培养基的起点是一种基本的基础培养基, 一般包含水溶液形式的氨基酸、矿物质、糖类和无机盐的确定的混和物以及维生素、有机酸和/或合适的缓冲液。对大多数常规的培养基而言, 将适当的动物血清或血清白蛋白以及脂质成分加入到该基本的基础培养基而制得支持细胞生命、生长和繁殖以及病毒复制和重组体或病毒产物的表达所必需的完全培养基。

考虑到与血清或血清白蛋白的使用相联系的成本和问题, 在现有技术中在用其他蛋白质替换物替换血清成分方面已经做了一些尝试。例如, 美国第 5, 024, 947 号专利 (此处引用其公开内容作为参考) 公布了一种无血清培养基, 它由 1) 常规的基础培养基, 2) 脂质混和物, 和 3) 蛋白胨成分组成, 其中蛋白胨成分中水解的蛋白质产物目的是要替代一般发现于血清或白蛋白中的蛋白质。尽管可以支持昆虫细胞

生长到与含血清培养基同等的密度，但是'947号专利包括了昂贵的成分（如羟脯氨酸和有机酸），并且不能支持细胞的生长和病毒感染细胞密度至足够高的水平以使得能经济地生产。因此，在培养基的性能和总成本两个方面都仍需改进。

令人惊讶地，本发明者发现基本的基础培养基中的另一种昂贵成分（游离氨基酸）当用相应的较大量的不太贵的维生素、糖类和蛋白胨替代时也可以相当地减少甚至除去。所做的该项修饰不损害培养基的性能。事实上，在本发明的无血清培养基上生长的昆虫细胞得到了两倍于'947号专利所报道的最大细胞密度并且以很高的细胞密度支持增殖性病毒的感染。因此，本发明的无血清完全培养基提供了与现有技术中描述的无血清组合物相比较而言额外的成本的节省，同时提供了极好的结果。

本发明也提供了一种生产细胞培养基脂质成分的新颖的方法，以及从而制得的改进的脂质乳剂，用于细胞培养基（如上面所述的无血清培养基）的大规模制备。现有技术，如在美国第5,372,943号专利中描述的（此处引用其公开内容作为参考），需要剧烈的搅拌如声处理或旋涡来制备乳剂。相反地，本发明采用一个可自发制得浓缩的脂质乳剂的选择性的加热步骤，从而消除了与将大量液体剧烈搅拌相联系的显著的生产成本。遵循本发明的方法，当脂质成分单独被加热并于环境温度加入少量的水时乳剂就自发形成了。采用持续的搅拌对于减小所得乳剂的液滴大小是有利的。

因此，由于对大量液体的声处理或旋涡不是必需的，本发明的脂质乳剂提供了可观的成本的节省并且大大地简化了大规模培养基的制备。遵循申请专利的方法得到的改进的乳剂与现有技术制得的乳剂相比展示了极好的稳定性。正如此处所公布的，该改进的乳剂具有至少6个月的保存期并且在该保存期内保持有生物活性。可将这些脂质乳剂与本发明的无血清培养基有利地联合使用。

本发明改进的无血清培养基的优选实施方案包含修饰的基础培养基，其中加入了蛋白胨成分、脂质成分和保护成分。修饰的基础培养

基和附加的成分一起提供了支持细胞生命、生长和繁殖所必需的基本营养成分。

基础培养基提供了无机盐、糖类、氨基酸、维生素、有机酸和/或缓冲液的营养混和物。现有技术讲授了基于确定的配方的商业上可获得的基础培养基的使用[参见如专栏7-8美国第5,024,947号专利]，该培养基一般包含游离氨基酸、游离有机酸和维生素的混和物。此处使用的短语“游离氨基酸”、“游离有机酸”和“游离维生素”是指单独的氨基酸、有机酸和维生素的纯化的制剂，该制剂可以从许多公司购买到，如 Sigma Chemical Company of St. Louis, Missouri。这些游离氨基酸、有机酸和维生素制剂或者是从天然来源纯化而来，或者是以基本上纯化的形式大量制备的，并独立于任何来源于完全培养基中蛋白胨成分的氨基酸和/或维生素而常规地加入到基本的基础培养基中。特别的，游离氨基酸代表了现有技术中描述的基本的基础培养基的一个高成本成分。

与现有技术不同，本发明的基础培养基经修饰以使得与常规的培养基制备物相比较而言显著地减少了昂贵的游离氨基酸的量，如 L-精氨酸的盐酸盐，L-天冬氨酸，L-天冬酰胺，L-半胱氨酸，L-谷氨酸，L-谷氨酰胺，L-甘氨酸，L-组氨酸，L-异亮氨酸，L-亮氨酸，L-赖氨酸，L-甲硫氨酸，L-苯丙氨酸，L-脯氨酸，L-丝氨酸，L-苏氨酸，L-色氨酸，L-缬氨酸。令人惊讶地，本发明者发现可将最昂贵的游离有机酸如富马酸、苹果酸、琥珀酸和 α -酮戊二酸中的一个和羟脯氨酸，氨基酸羟脯氨酸从培养基中完全去除而没有坏的影响。由于该氨基酸的商业制备成本一般比最贵的纯化的氨基酸高 5 到 6 倍，因此去除羟脯氨酸就给大规模的生产带来了可观的成本的节省，而本发明涉及的游离氨基酸的总的减少也会带来可观的成本节省。

另外，依照本发明，当通过加入大量的不昂贵的维生素如硫胺素、核黄素、烟酸、维生素 B6、叶酸、维生素 B12、生物素、泛酸、胆碱、对氨基苯甲酸、肌醇，糖类如葡萄糖以及蛋白胨如水解乳白蛋白（例如 Edamin S，得自 Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri，美

国), 酵母提取物如 Yeastolate (例如 TC Yeastolate, (Difco, 美国)), 牛肝消化物如 Panmede (Paines & Byrnes, Ltd., 英国), 酪蛋白 (caseine) 消化物如 Bactocasitone (Difco, 美国), 胰蛋白胨磷酸肉汤和许多植物产品水解物中的任一种 (例如来自大米、小麦或大豆的 Hy Pep 产品, Quest International) 而使得细胞的接种密度增加时, 可以显著地减少并可从配方中去除其他单独的有机酸的纯化制剂, 如富马酸、苹果酸、琥珀酸和 α -酮戊二酸。因而, 在一个优选实施方案中, 本发明的无血清培养基包含具有少量的游离氨基酸和其他有机酸如富马酸、苹果酸、琥珀酸和 α -酮戊二酸的基础培养基, 其中在加入蛋白胨成分之前基本的基础培养基中游离氨基酸的总浓度在基本的基础培养基中优选地在约 0.1 到 6 g/l 的范围内, 更优选地在约 0.5 到 5 g/l, 最优选地在约 1 到 2 g/l。相比较而言, 常规基础培养基如 Weiss 等人的 IPL-41 培养基 (Weiss 等人, *In Vitro* 17: 495-502 (1981)) 具有约为 13 g/l 的游离氨基酸总浓度。

为了进一步改进细胞的生长并补偿游离氨基酸的减少, 本发明的基础培养基具有比在现有常规技术的基础培养基中发现的高得多的游离维生素的总浓度。商业无血清昆虫培养基中可获得的维生素的主要部分是通过蛋白胨成分提供的, 一般是通过组织培养级 (TC) 的 Yeastolate (或其他酵母提取物)。然而 TC Yeastolate 是一种相对较昂贵的蛋白胨, 且事实上可以在高浓度时抑制细胞生长。因此, 本发明的基本的基础培养基中高浓度的游离维生素的使用代表了对现有技术的重要的改进, 特别是因为加入少量的维生素比加入额外的含有等量维生素的 TC Yeastolate 要便宜。当培养基以罐发酵所需要的大量生产时这就带来相当多成本的节省。因此, 在依照本发明的基础培养基中, 加入蛋白胨成分之前基本的基础培养基中游离维生素的总浓度优选在约 0.02 到 0.1 g/l 的范围内, 更优选地在约 0.04 到 0.08 g/l, 最优选地在约 0.05 到 0.07 g/l。相比较而言, 在基础培养基如 Weiss 等人的 IPL-41 培养基的常规配方中游离维生素的总浓度为 0.02 g/l 的级别。

因此, 在本发明的基础培养基中, 游离氨基酸对游离维生素的比值将在约 1:0.01 到 1:0.1 的范围内, 通常在约 1:0.02 到 1:0.08, 更通常在约 1:0.03 到 1:0.07, 最优选地在约 1:0.03 到 1:0.05。然而, 如在下面实验部分提供的生长数据所显示的那样, 对基础培养基基本成分的显著的替换并没有对完全培养基的性能产生不利影响。

当然, 每一单独氨基酸和维生素的相对浓度可以依照特定细胞系的需要进行调整。例如, 尽管谷氨酰胺对许多昆虫细胞系而言都是必需的, 但在本领域众所周知, 一些细胞系在没有谷氨酰胺时也可以生长并能够用前体来合成谷氨酰胺。参见 Mitsuhashi, *Appl. Entomol. Zool.* 22: 533-36 (1987)。因此, 依赖于培养基的预定用途, 本领域的技术人员可以很容易地调整单独的游离氨基酸和维生素的浓度以适应各种昆虫细胞系的已知特征。

本发明的无血清完全培养基进一步包含蛋白胨成分, 该蛋白胨也补偿了基本的基础培养基中游离氨基酸的减少, 还提供了对血清或白蛋白的替代物。术语“蛋白胨”意指水解的蛋白质产物, 一般地指天然蛋白质经酸或酶部分水解所得的平均分子量在约 5 到 30 kD 的蛋白质裂解产物混和物。可选择地, 用来联合制备蛋白胨成分的单独蛋白胨部分将经超滤或类似步骤预先纯化, 去除任何残留的蛋白酶、内毒素或其他可潜在地干涉培养基上生长的昆虫细胞表达的重组产物的纯化和使用的高分子量的产物。

因此预期用于本发明的蛋白胨可以很容易地与由血清、血清白蛋白等提供的高分子量的蛋白质区分开来, 后者已从本发明的培养基中去除了。培养基中蛋白胨的总浓度将依赖于许多因素, 例如所使用的特定的蛋白胨组分、要培养的细胞系的特征、给定的蛋白胨对细胞生长产生毒性或抑制作用的浓度等, 每一蛋白胨部分的最佳浓度都以经验来确定。一般地, 在本发明无血清完全培养基中蛋白胨的总量在约 8 到约 30 g/l 的范围内, 更通常地为约 12 到约 24 g/l。

适用于本发明的蛋白胨是商业上可获得的, 包括水解乳白蛋白(例如 Edamin S, 得自 Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, 美

国), 酵母提取物如 Yeastolate(例如 TC Yeastolate(Difco, 美国)), 牛肝消化物如 Panmede (Paines & Byrnes, Ltd., 英国), 酪蛋白消化物如 Bactocasitone (Difco, 美国), 胰蛋白胨磷酸肉汤和许多植物产品水解物中的任一种(例如来自大米、小麦或大豆的 Hy Pep 产品, Quest International)。蛋白胨成分的一个优选实施方案包含 TC Yeastolate、水解乳白蛋白, 或两者的组合。在一个特别优选的并可做模范的实施方案中, 蛋白胨成分包含 yeastolate 和水解乳白蛋白的混和物, 两者浓度均在约 6 到 14 g/l 之间, 更通常地在约 7 到 13 g/l, 优选地在约 8 到 12 g/l。

本发明无血清培养基可进一步包含溶解于有机溶剂中的脂质乳剂成分。现有技术讲授了用高能量输入、旋涡的方法组合这些成分而使得脂质溶液在 PluronicF-68 保护剂的 10%的水溶液中乳化[参见例如 '943 号专利, col. 6, 11. 21-31]。然而不幸的是, 该方法难以实施, 并且自身不能按比例增加以制得用于 1,000L 到 10,000L 制造水平的大量的乳剂。本发明通过供应形成脂质微乳剂的低成本的、易于按比例扩大的配方和方法而解决了这些问题。如此形成的乳剂更加稳定且具有较现有技术的乳剂长的保存期。

依照本发明, 本发明的脂质乳剂包含如现有技术描述的(有一定的更改) 脂肪酸、类固醇、脂溶性维生素和有机溶剂的混合物。在本发明的脂质乳剂中, 脂肪酸包括脂肪酸烷基酯, 和更优选的多不饱和脂肪酸烷基酯如多不饱和脂肪酸甲酯。脂肪酸酯具有 C_{12} 到 C_{22} 的链长, 优选地为 C_{13} 到 C_{19} 。烷基成分为 C_{1-4} 烷基(甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基), 其中甲基是最优选的。多不饱和脂肪酸甲酯的特别优选的混和物是由鱼肝油提供的, 更优选地是由也含有维生素 A 的鳕鱼肝油提供的。通过用纯的油酸脂肪酸甲酯代替鳕鱼肝油也可以将配方简化。类固醇优选地为固醇, 如羊毛甾醇、豆固醇、谷固醇和胆固醇, 并且在一个特别优选的实施方案中为胆固醇, 而脂溶性维生素选自 phyllochinon(维生素 K1)、menachinon(维生素 K2)、2-甲基萘醌(维生素 K3)、麦角钙化醇(维生素 D) 胆钙化醇(维生素

D2)、麦角钙化醇(维生素 D3)、视黄醇(维生素 A)、 α -生育酚(维生素 E)以及 α -生育酚的非乙酰化形式,其中 α -生育酚(维生素 E)的非乙酰化形式是最优选的。另外,尽管描述了多种醇(C_1 到 C_6 烷基醇(alkohols))在现有技术中的使用,但本发明的乳剂的优选的有机溶剂为正丙醇、异丙醇或两者的混和物,其中正丙醇是最优选的。

多不饱和脂肪酸烷基酯(优选的为甲基烷基酯如鳕鱼肝油)优选地在完全培养基中终浓度为 1 mg/l 到 50 mg/l 存在;类固醇(优选地为固醇,更优选地为胆固醇)优选地为 2 mg/l 到 7 mg/l 的浓度;脂溶性维生素(优选的为非乙酰化的 α -生育酚)优选地为 0.5 mg/l 到 4 mg/l 的浓度;以及醇(优选的为正丙醇)优选地为 0.001% 到 0.01% 的浓度,更优选地为 0.002% 到 0.005%,最优选地在 0.0025% 到 0.0035% 之间。依赖于所选择的溶剂、要生长的细胞类型等,选择了对细胞生长无毒性并无抑制作用的有机溶剂的终浓度。

在与水相混和以及随后制备脂质微乳剂之前,在将上述成分组合后得到的脂质相中一般包含表面活性剂。优选地,该表面活性剂是阴离子表面活性剂,通常为磷脂或非离子聚合物表面活性剂,通常为聚山梨酸酯,优选地为聚山梨酸酯 20 或聚山梨酸酯 80(商业上可获得的如 Tween 80, ICI Americas Inc., Wilmington, Delaware, 美国)。

依照本发明的方法,将上述脂质加入到丙醇中并加热到 40°C 至 70°C 的温度,优选地为 50°C 至 60°C,同时持续搅拌至得到无水的脂质相。然后将一份或多份少量等份的水加入到脂质相,同时持续搅拌,并将混和物冷却至室温。尽管乳剂一般自发形成,但通常需要搅拌以减小液滴的大小以使其可过滤除菌。脂质相对水相体积的比值在约 3:0.4 到 3:0.6 的范围内。约 3:0.5 (v/v) 的比值是优选的。如需要可加入额外的有机溶剂以维持液相。然后在持续搅拌中可以向浓缩的乳剂中缓缓加入大量的水或 1% 的 Pluronic F-68 以使其可以长期保存。

重要地并且与现有技术(参见 '943 号专利, cols. 6-8)的讲授相反的,本发明者确定水相中更高浓度的保护剂或其他乳化剂的存在事实上使脂质微乳剂不稳定并且大大减少了该乳剂在加入到基础培养

基之前可保存的时间。因此本发明的方法和配方解决了现有技术中商业脂质乳剂的重要问题，现有技术中商业脂质乳剂一般只有几天长的保存期，必须在使用前立即购买或制备。依照本发明的优选实施方案，加入到水相成分中的乳化剂的浓度将小于约 2%，更优选地小于约 1%，最优选地是不向脂质乳剂的水相成分中加入额外的乳化剂。这些化合物在总培养基中的有利效果可通过将它们分别地加入到完全培养基中获得，以避免它们在乳剂成分中造成的稳定性问题。

在这方面可以将微乳剂直接加入到基础培养基中并与完全培养基一起过滤除菌，或独自过滤除菌，并在黑暗处冷藏保存至少一个月，通常可达 6 个月。该方法具有下列优势，即不需特殊设备就可以按比例增大到任何所需的量，容易操作以及得到具有长保存期的乳剂，也就是所有为生产目的而减少培养基配方成本所需的特征。

为了多种目的，也可向本发明中无血清完全培养基中加入额外的成分，例如，在搅拌的和/或喷射(sparged)的细胞培养中有助于防止细胞损伤的保护性成分。该保护性成分优选地包含环氧丙烷和环氧乙烷的嵌段共聚物（聚环氧丙烷聚环氧乙烷缩合物），更优选地为 Pluromic 多元醇，例如得自 BASF Wyandotte Corp. (Parsippany, New Jersey, 美国)的 Pluronic F68 和 F88。其他可用作保护成分的合适材料包括羟乙基淀粉、甲基纤维素、羧基甲基纤维素、葡聚糖硫酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、菲可、藻酸和聚丙二醇。如在上文提到的，依照本发明的方法优选地将保护成分单独地加入到完全培养基中而不是如在现有技术中建议的那样与脂质成分联合加入。

本发明的培养基也可含有其他水溶性成分，例如胰岛素(可以加强糖类吸收)，运铁蛋白(可转运铁)，痕量元素如硒，过氧化氢酶(作为过氧化反应保护剂)，乙醇胺(可作为脂质前体)，类固醇激素如睾丸素，甲状腺激素如三碘甲腺原氨酸，核酸前体如次黄嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷、脱氧腺苷和脱氧胞苷，以及在常规的用于细胞培养的补充了血清的培养基或无血清培养基中含有的其他营养成分。

制备培养基的方法并不是关键性的。例如，培养基可以通过下面

所述方法制得,即将所有成分及附加物先以各自的合适浓度溶解于水,然后加压使溶液通过一个薄膜滤器过滤而制得无菌的培养基。如上文提到的,当为了表达重组体或病毒产物而培养昆虫细胞时,培养基中的蛋白胨成分将优选地预先纯化以使以后的纯化更容易,例如通过预过滤,随后用具有比需收集的任何重组体或病毒产物小的分子量界限的膜进行超滤。

用本发明的培养基培养细胞的方法也不是关键性的。以与常规培养基大约相同的条件用本发明的培养基培养细胞。通常,在本发明无血清培养基中生长的细胞是在一定温度范围并在对所选择的特定细胞系合适的条件下培养的。例如,草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞,优选的为 Sf9 细胞,是在约 20℃ 至约 28℃ 温度范围内培养的,其中培养基的 pH 值优选地保持在约 6 到约 7 的范围内,更优选地在约 6.2 到约 6.4。有些情况下使细胞生长在通气良好的环境中是有利的,即在搅拌的和/或喷射的培养中。参见,如国际申请号 PCT/US90/03756 (以国际公布号 W091/00341 发表),其公开内容此处整体引用。

通常,如果昆虫尤其是鳞翅目昆虫的细胞可以成功地在其中使用了血清、白蛋白或其他蛋白质脂质载体或其他非蛋白质脂质载体的培养基中生长,那么该细胞可在本发明的培养基中生长,其中的血清或蛋白质脂质载体被蛋白胨所替换,提供了一种脂质微乳剂,并可选择性地加入其他必需的激素和生长因子。例如,有许多种商业上可获得的用于昆虫细胞培养的培养基,它们包含下列商业上可获得的基础培养基,例如 TC10 (无胰蛋白肉汤) [可购自微生物协会 (Microbiological Associates); 参见 Gardiner 等人, *J. Invert. Pathol.*, 25: 363 (1975)], Grace 的 *Antheraea* 培养基 [Vaughn 等人, *TCA Manual*, 3(1) (1976); Yunker 等人, *Science*, 155: 1565-1566 (1967)], Marks 的培养基 M20 [Vaughn 等人, *TCA Manual*, 3(1) (1976); Marks, 在 Kruse 等人 (eds), *组织培养方法及应用 (Tissue Culture Methods and Applications)*, pp. 153-156 (1973)], Goodwin 的 IPL-52 培养基 [Goodwin 等人, *In Vitro*, 11: 369-378 (1975)],

Goodwin 的 IPL 培养基[Goodwin 等人, 在 Kurstak 等人 (eds.), *体外无脊椎动物系统 (Invertebrate Systems In Vitro)* (1980)], Goodwin 的 IPL-76 蛋白胨培养基[Goodwin 等人, 同前; Goodwin 等人, *In Vitro*, 14: 485-494 (1978)], Hink 的 TNMFH 培养基 (经修改的) [Hink, *Nature* (London), 226: 466-467 (1970)], Hansen 的培养基 S-301[Hansen, 在 Maramorosch (ed.), *无脊椎动物组织培养研究应用 (Invertebrate Tissue Culture Research Applications)*, pp. 75-99 (1976)]; Vaughn 等人, TCA Manual, 3 (1) (1976)], 及上文讨论的 IPL-41 培养基[Weiss 等人, *In Vitro*, 17 (6): 495-502 (1981)]。

本发明的培养基不仅适用于细胞的生长, 而且也适用于生产有用的生理活性物质如干扰素、淋巴因子和抗体。通过杆状病毒表达载体系统 (BEVS) 在昆虫细胞中表达的异源蛋白质在 Summers 等人的 *Banbuty 报道: 环境中遗传改变了的病毒 (Banbuty Report: Genetically Altered Viruses in the Environment)*, 22: 319-329 (1985) 中有概述。然而, 受益于本公开内容的本领域的技术人员将会认识到依照本发明许多其他的重组蛋白质可以由动物、植物和/或微生物细胞制得。可做模范的重组蛋白质包括但不限于集落刺激因子(例如除了别的以外的长 (Jong) 型和短型 CSF-1 或 M-CSF, 6-CSF, GM-CSF 和白介素-3), 修饰的尿激酶原或尿激酶, 组织纤溶酶原激活物 (TPA), TPA-尿激酶杂交体, 毒性蛋白质如蓖麻毒蛋白毒素全体、蓖麻毒蛋白 A 链、含有蓖麻毒蛋白 A 的产物, 以及干扰素 α 、 β 和 γ 和它们的杂交体, 白细胞介素, 肿瘤坏死因子, 促红细胞生成素 (erythropoietin) 和其他造血 (hematopoietic) 生长因子, 人生长激素, 以及猪、牛和其他生长激素, 表皮生长因子, 胰岛素, B 型肝炎疫苗, 单纯疱疹病毒糖蛋白疫苗, 超氧化物歧化酶, 凝血因子 VIII, 凝血因子 VIII C, 心房钠尿肽, 猫白血病毒疫苗, 例如 gp70 多肽、抗体分子的轻链和重链, 凝集素如 Ricin communis agglutinin (RCA)、白喉毒素、gelonin、来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的外毒素 (exotoxin),

来自 *Phytolacca americana* (PAP I, PAP II 和 PAP-s) 的毒性蛋白质, 来自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的杀虫蛋白质, 许多酶例如 CAT, 以及无数的其他杂合蛋白质。

尽管此处描述的示例性实施方案更特定地适用于昆虫细胞培养, 本发明预期具有申请专利的特征的培养基可有利地用于几乎任何细胞类型的培养。这些细胞可以是动物、微生物或植物来源的。如果是动物细胞, 它们可以来自脊椎动物或无脊椎动物。优选地, 这些细胞是那些可以制造重组体、病毒的和/或天然的产物的细胞。示例性的脊椎动物细胞是哺乳动物细胞, 例如淋巴细胞、成纤维细胞、上皮细胞、卵巢细胞、及它们的转化的细胞、各种贅生性细胞及其杂交瘤。更特定的哺乳动物细胞例子包括中国仓鼠卵巢细胞, Epstein-Barr 病毒 (EBV) -转化的人类类淋巴母细胞细胞系如 UMCL 和 C51804, 人伯基特氏淋巴瘤衍生的 Namalwa 细胞, 鼠淋巴样细胞衍生的骨髓瘤 SPI 细胞, 人成纤维细胞如 HEL 和 IMR-90, 人肿瘤 (rumor) 衍生的表皮细胞如 HeLa-S3 Hep-2 和 KB, 人原代培养细胞, 大鼠吉田肉瘤细胞, 人成纤维细胞 BHK-21, 鼠成纤维细胞 3T3, 鼠淋巴瘤细胞 YAC-1, 人/小鼠杂交瘤如可生产抗 LPS 的 IgM 的 (ATCC No. HB 8598) 稳定的细胞系 D-234-4-27-8 和可生产针对人成纤维细胞干扰素的单克隆抗体的杂交瘤 [如美国系列号 325,969(1981年11月30日申请)所描述的]。

示例性的无脊椎动物细胞是昆虫细胞, 优选地是用野生型病毒或重组的杆状病毒感染后分别可以生产病毒的或重组体产物的细胞, 并且这些细胞显示可以在含有血清、白蛋白、其他蛋白质和/或其他脂质载体的培养基中生长、繁殖和表达重组体和/或病毒产物。这样的昆虫细胞系包括家蚕 (*Bombyx mori*), 烟毒蛾 (*Lymantria dispar*), 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*), *Helicoverpa zea* 和草地夜蛾。[一般性参见 Granados 等人 (eds.), *The Biology of Baculoviruses* (CRC Press 1986); Vaughn, *Adv. Cell. Cult.*, Maramorosch (ed.), *Invert. Tissue Culture*; Research Applics., p. 295 (1976); 和 Vaughn, 在 Barigozzi (eds.) *Proceedings of Internatl. Collq. Invert.*

Tissue Culture, (2nd, Tremezzo, 1967), p. 119 (1968).]

进一步,可以在本发明的培养基中生长的昆虫细胞优选地来自可作为杆状病毒表达载体系统或其他野生型病毒的宿主的昆虫纲中的任意目,但优选地来自双翅目或鳞翅目。据报道约有 300 种昆虫物种有核型多角体病毒(NPV)病,其中的绝大多数(243)是从鳞翅目分离出来的。[Weiss 等人,大规模杆状病毒繁殖的培养方法(Culture Methods for Large-Scale Propagation of Baculoviruses),在 Granados 等人(eds.),杆状病毒的生物学:卷二 昆虫控制的实际应用(The Biology of Baculoviruses: Vol. II Practical Application for Insect Control), pp. 63-87 在 p:64 (1986)。]来自下列昆虫的昆虫细胞系是可做模范的:苹果蠹蛾(*Carpocapsa pomonella*)(优选地为细胞系 CP-128);粉纹夜蛾(优选地为细胞系 TN-368);苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*);草地夜蛾(优选地为细胞系 Sf9);烟毒蛾;甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*); *Aedes albopictus*;花旗松毒蛾(*Orgyia pseudotsugata*),松柏锯角叶蜂(*Neodiprion sertifer*); *Aedes aegypti*; *Antheraea eucalypti*; *Gnorimoschema opercullela*;大蜡螟(*Galleria mellonella*); *Spodoptera littoralis*;黄猩猩果蝇(*Drosophila melanogaster*);美洲棉铃虫(*Heliothis zea*);甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*); *Rachiplusia ou*;印度谷螟(*Plodia interpunctella*);桑灯蛾(*Amsacta moorei*);八字地虎(*Agrotis c-nitrum*),苹卷叶蛾(*Adoxophyes orana*),黄地老虎(*Agrotis segetum*),家蚕,苹果巢蛾(*Hyponomeuta malinellus*),苜蓿粉蝶(*Colias eurytheme*),黎豆夜蛾(*Anticarsia gemmetalis*),黑腿绒茧蜂(*Apanteles melanoscelus*),豹灯蛾(*Arctia caja*),和烟毒蛾。优选的昆虫细胞来自草地夜蛾,尤其优选地是细胞系 Sf9(ATCC CRL 1711)。其他草地夜蛾细胞系如 IPL-Sf21AE III 在 Vaughn 等人, In Vitro, 13: 213-217 (1977) 中有描述。

在本发明的培养基中培养的优选昆虫细胞系适合于许多昆虫病原病毒如细小核糖核酸病毒、细小病毒、昆虫痘病毒、杆状病毒和弹状

病毒的繁殖, 其中来自于杆状病毒种组的核型多角体病毒 (NPV) 和颗粒体症病毒 (GV) 是优选的。进一步优选地是 NPV 病毒如那些来自 *Autographa* spp., *Spodoptera* spp., *Trichoplusia* spp., *Rachiplusia* spp., *Galleria* spp. 和 *Lymantria* spp. 的。更优选地是杆状病毒株系苜蓿银纹夜蛾 NPV (AcNPV), *Rachiplusia* ou NPV, 大蜡螟 NPV 和 AcNPV 的任意菌斑纯化的株系如 E2, R9, S1, M3, 这些株系的检定和描述见 Smith 等人, J. Virol, 30: 828-838 (1979); Smith 等人, J. Virol, 33: 311-319 (1980); 和 Smith 等人, ViroL, 89: 517-527 (1978)。

实施例

下列实施例用于阐明本发明的某些优选实施方案和方面, 不应该解释为限制了它的范围。

在随后的实施例公开内容里, 采用了下列缩写: eq (当量); M (摩尔/升); μ M (微摩尔/升); N (当量的); mol (摩尔); mmol (毫摩尔); μ mol (微摩尔); nmol (纳摩尔); g (克); mg (毫克); kg (千克); μ g (微克); L (升); ml (毫升); μ L (微升); cm (厘米); mm (毫米); μ m (微米); nm (纳米); EC (摄氏度); h (小时); min (分钟); sec (秒); msec (毫秒)。

下面描述的单个材料购自 Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, 而 TC Yeastolate, DF5577-08 除外, 它得自 VWR Scientific, Brisbane, California。

实施例 1

无血清培养基的制备

利用在表 1 中所列的成分和量制备了本发明无血清培养基的特定实施方案, 标记为 EM028。

表 1

成分	浓度 (g (ml) /l)
CaCl ₂	0.5
50X 主要盐类	20 ml
500X 次要盐类	2 ml
Difco yeastolate	8 g
Edamin S	10 g
50X 维生素	20 ml
葡萄糖	7.5 g
谷氨酰胺	2 g
33X 氨基酸	30 ml
脂质乳剂	11 ml
10% Pluronic F-68	10 ml
NaHCO ₃	0.7 g

(X=稀释倍数)

脂质乳剂以如下面实施例 2 所述的方法制备。液体浓缩物以表 2 到表 4 所列的成分及量而制得。浓缩物和粉末状成分按上面表 1 所列的顺序加入 800 ml 水中。将最终混和物的 pH 值调到 6.3 并将体积加至 1 升。

表 2

50X 维生素	
成分	浓度 (mg/l)
硫胺素	32.64
核黄素	89.6
烟酸	576
维生素 B6	92
叶酸	11.88
维生素 B12	15
生物素	11.896
泛酸	361.6
胆碱	1908
对氨基苯甲酸	16
肌醇	20

表 3

50X 主要盐类	
成分	浓度 (50x g/l)
KCl	65.65
MgSO ₄ (无水的)	46.17
NaCl	150.31
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	58.00

表 4

500X 次要盐类	
成分	浓度 (500x mg/l)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	76.68
CuCl ₂ · 2H ₂ O	108.58
MnCl ₂ · 4H ₂ O	38.82
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1469.85
ZnCl ₂	603.64
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	20.00

除谷氨酰胺外的氨基酸依照下面表 5 制得:

表 5

33X 氨基酸	
成分	浓度 (500x g/l)
L-精氨酸的盐酸盐	4.00
L-天冬氨酸	6.50
L-天冬酰胺	7.39
L-半胱氨酸 2HCl	0.65
L-谷氨酸	7.50
L-甘氨酸	1.00
L-组氨酸 F. B.	1.00
L-异亮氨酸	3.75
L-亮氨酸	1.25
L-赖氨酸的盐酸盐	3.50
L-甲硫氨酸	-5.00
L-苯丙氨酸	5.00
L-脯氨酸	2.50
L-丝氨酸	2.00
L-苏氨酸	1.00
L-色氨酸	0.50
L-缬氨酸	2.50
L-酪氨酸 2Na-2H ₂ O	1.82

将上述除酪氨酸之外的氨基酸以上面表 5 所给的顺序加入到 900 ml 水中。如果合理长的时间内个别氨基酸未能溶解, 可加入 6N HCl 直到 pH 值为 1.7。当所有其他氨基酸都加入了以后, 将酪氨酸溶解于 50 ml 水中并缓缓加入到前述混合物中。然后将终体积调节至 1 升。

实施例 2

脂质乳剂的制备

表 6

成分	数量 (g/l)
鳕鱼肝油脂肪酸甲酯	1.0
胆固醇	0.45
α -生育酚	0.2
Tween 80	2.5

将表面活性剂和脂质成分加入到一个大玻璃烧杯中并缓缓加热至约 50℃ 到 60℃。用磁搅拌棒持续搅拌混和物直至固体溶解并得到液相。当继续加热并混合时, 缓缓加入 0.5 ml 水, 随后加入 1.3 ml 丙醇。将混和物冷却至室温, 然后边混合边加入另外 1.7 ml 丙醇, 再次得到液相。然后, 边混合边将 8.3 ml 水或水中的 1%Pluronic F-68 逐滴地加入。提高搅拌速度并加入 0.8 ml 水或 1% Pluronic。将混和物边搅拌边缓缓加热 15 分钟 (温度保持在 40℃ 以下), 并加入水或 1%Pluronic 使体积增加至 1.0L。为了保存乳剂以备以后的使用, 将乳剂过滤除菌并冷藏。

实施例 3

脂质乳剂的长期稳定性

表 7 展示了用本发明中描述的程序制备的脂质乳剂的长期稳定性。给出了生长在三个不同批次的 EM28 培养基上的 Sf9 细胞所得的最大细胞密度和 AcMNPV PIB 的生产。批次 10 和 11 是用 7 个月长的分别含有鳕鱼肝油脂肪酸甲酯或纯油酸脂肪酸甲酯的脂质乳剂制成的。所有其他溶液均为新鲜配制的。批次 12 是用新鲜配制的溶液和脂质乳剂 (该脂质乳剂含有鳕鱼肝油脂肪酸甲酯) 制成的。为了病毒的生产,

将培养物以 1.8×10^6 细胞/毫升的密度感染。

表 7

EM28 批次	最大细胞密度 (细胞/毫升)	病毒的生产 (PIBs/ml)
批次 10	10.5×10^6	1.2×10^8
批次 11	10.3×10^6	1.0×10^8
批次 12	10.3×10^6	1.0×10^8

实施例 4

PIBs 的生产

表 8 阐明了在商业上可获得的无血清昆虫培养基 (Excell 401, JRH Biosciences, Lanexa, Kansas) 或者含有或不含有脂质微乳剂的 EM028 培养基中生长的 Sf9 细胞中 AcMNPV 杆状病毒多角包涵体 (polyhedral occlusion bodies) (PIBs) 的生产。细胞在摇瓶中以 2.4×10^6 细胞/毫升的密度感染。

表 8

使用的培养基	病毒的生产 (PIBs/ml)
商业的无血清培养基	4.0×10^7
不含有脂质乳剂的 EM028	5.0×10^6
含有脂质乳剂的 EM028	1.5×10^8

从上述结果很显然得知生长在本发明的低成本的无血清培养基中的细胞可以得到优于现有技术中描述的无血清培养基配方 (图 1) 的细胞密度。本发明的培养基也支持杆状病毒以低成本在高密度细胞培养中繁殖性地复制。另外, 实施例 3 展示了依照本发明生产的脂质乳剂的优良的稳定性。

本说明书中提及的出版物和专利申请表明了本发明所属领域的熟

练的技术人员的技术水平。所有出版物和专利申请在此处以相同的程度被引入作为参考，就如同每一单独的出版物或专利申请是特定地和单独地被引用作为参考。

尽管前述的发明通过说明和实施例为阐明和理解的目的已经相当详细地作了描述，但是很显然在所附的权利要求的范围内仍然会有某些改变和更改。例如，在表 1-6 中提出的单独成分的相对量可由本领域的技术人员依照感兴趣的特定细胞系的特定需要而作修改，该需要对本领域的技术人员而言是熟知且易于利用的。通常，在上面表 1-6 中列举的特定的量可以在高约 50% 的范围内变动，更优选地，是在高约 20% 的范围内。

附图简述

图 1 图解说明了草地夜蛾 Sf-9 细胞在 EM028 低成本的无血清培养基中的生长与在一般的商业上可获得的无血清昆虫培养基中生长的对比。

