

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101065480 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 200580036744.8

C12N 1/20(2006.01)

(22) 申请日 2005.10.12

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

10/976,399 2004.10.29 US

WO 2004005493 A1, 2004.01.15, 全文.

WO 0111021 A1, 2001.02.15, 全文.

WO 0123527 A1, 2001.04.05, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.04.26

FR 2196386 A1, 1974.03.15, 全文.

EP 0481791 A2, 1992.04.22, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/010973 2005.10.12

WO 0224876 A2, 2002.03.28, 全文.

KWON MI SUN ET AL. Use of plant-derived

(87) PCT申请的公布数据

W02006/045438 EN 2006.05.04

protein hydrolysates for enhancing growth

of Bombyx mori (silkworm) insect cells

in suspension culture. BIOTECHNOLOGY AND

APPLIED BIOCHEMISTRY 42, 2005, 421-7.

(73) 专利权人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺斯州

专利权人 巴克斯特保健股份有限公司

审查员 张颖慧

(72) 发明人 利奥波德·格里尔博格

曼弗雷德·赖特尔 沃尔夫冈·蒙特

弗里德里希·多尔纳

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国

(51) Int. Cl.

C12N 5/02(2006.01)

C12N 1/16(2006.01)

C12N 7/02(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 6 页

(54) 发明名称

用于细胞培养的无动物蛋白培养基

(57) 摘要

本发明涉及无动物蛋白的细胞培养基,其包含多胺和植物和/或酵母衍生水解物。本发明还涉及无动物蛋白培养的工艺,其中细胞在该培养基中于不添加补充性动物蛋白的条件下进行培养、增殖和传代。这些工艺适用于培养细胞,例如重组细胞或感染了病毒的细胞,并且适用于通过细胞培养工艺来生产生物制品。

1. 一种无动物蛋白的细胞培养基,其包含至少一种多胺和至少一种来源于由植物和酵母所构成组中的蛋白质水解物,其中所述多胺以 0.5mg/L ~ 30mg/L 的浓度存在于所述培养基中。

2. 如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,其特征在于,所述多胺以 0.5mg/L ~ 10mg/L 的浓度存在于所述培养基中。

3. 如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,其特征在于,所述多胺选自于由尸胺、腐胺、亚精胺、精胺、胍基丁胺、鸟氨酸、及其组合所构成的组。

4. 如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,其特征在于,所述多胺是浓度为 0.5mg/L ~ 10mg/L 的腐胺,所述蛋白质水解物是浓度为 0.05% w/v ~ 5% w/v 的大豆水解物。

5. 如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,其特征在于,所述多胺来源于非蛋白质水解物源。

6. 如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,其特征在于,所述培养基中所有所述蛋白质水解物的总浓度为 0.05% w/v ~ 5% w/v。

7. 如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,其特征在于,所述蛋白质水解物来源于选自于由谷物和大豆所构成的组中的植物。

8. 一种用于培养哺乳动物细胞的方法,其包括下述步骤:

(a) 提供如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基,以及

(b) 在所述培养基中使细胞增殖以形成细胞培养物。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,通过选自于由分批培养、补料分批培养、灌流培养、以及恒化培养所构成的方法组中的方法来培养所述细胞。

10. 一种用于表达靶蛋白的方法,其包括下述步骤:

a) 提供在如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基中生长的哺乳动物细胞的培养物;

b) 将包含用于编码所述靶蛋白的序列的核酸序列导入所述细胞;

c) 选取带有所述核酸序列的细胞;以及

d) 选择性诱导所述细胞表达所述靶蛋白。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物细胞分别为用于生产重组凝血因子 VIII 的 CHO 细胞;用于生产重组红细胞生成素的 BHK 细胞;或者用于生产人源抗体的转化埃-巴氏病毒的、无限增殖化的人 B 细胞。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,通过选自于由分批培养、补料分批培养、灌流培养、以及恒化培养所构成的方法组中的方法来培养所述细胞。

13. 一种用于生产病毒的方法,其包括如下步骤:

a) 提供在如权利要求 1 所述的无动物蛋白的细胞培养基中生长的哺乳动物细胞的培养物;

b) 用病毒感染所述细胞;

c) 选取所述病毒感染的细胞;以及

d) 培养所述细胞以繁殖所述病毒。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物细胞是 Vero 细胞,而所述病

毒选自于由减毒牛痘、牛痘、甲型肝炎、流感病毒、西尼罗病毒、SARS 病毒所构成的组；或者所述哺乳动物细胞是鸡胚细胞，而所述病毒是 FSME 病毒。

15. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，通过选自于由分批培养、补料分批培养、灌流培养、以及恒化培养所构成的方法组中的方法来培养所述细胞。

用于细胞培养的无动物蛋白培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及无动物蛋白的细胞培养基,其包含多胺和植物和 / 或酵母衍生的水解物。本发明还涉及无动物蛋白的培养工艺,其中细胞在培养基中不添加补充性动物蛋白的条件下进行培养、增殖和传代。这些工艺适用于培养细胞,例如重组细胞或感染了病毒的细胞,以及用于通过细胞培养工艺来生产生物制品。

背景技术

[0002] 为培养细胞,特别是真核细胞,更具体地讲是哺乳动物的细胞,始终需要使用特定的培养基,以得到利于细胞有效生长和生产预期蛋白质或病毒所需要的生长营养物质。为有效地生产生物制品例如病毒或重组蛋白,获得最佳的细胞密度并且增加蛋白质表达本身从而获得最大的产率是很重要的。

[0003] 细胞培养基配方中添加了某一范围内的添加剂,包括不确定的组分如胎牛血清(FCS)、几种动物衍生蛋白和 / 或牛源蛋白水解物。

[0004] 通常,血清或血清衍生的物质,如白蛋白、转铁蛋白或胰岛素,可能包含能污染细胞培养物及由此获得的生物制品的多余物质。此外,必须对人血清衍生添加物进行测试,检测所有已知的能通过血清传染的病毒包括肝炎和 HIV。此外,牛血清及其衍生产品也有受到 BSE(牛海绵状脑病,疯牛病)污染的风险。此外,所有血清衍生产品都可能被未知的成分污染。在细胞培养中血清或蛋白添加剂是来自于人或其它动物源的情况下,特别在细胞用于生产人用药物或疫苗情况下,存在许多问题(例如不同批次的组合物品质不同,以及被支原体、病毒或 BSE 污染的风险)。

[0005] 于是,人们进行了许多的尝试以提供不需要血清或其他动物蛋白组合物的有效寄主系统和培养条件。简单的无血清培养基典型地包括基础培养基、维生素、氨基酸的有机盐或无机盐、以及任意的添加剂组分以生产营养性复合物。

[0006] 已知大豆水解物适用于发酵工艺并能促进许多需要复杂营养的生物、酵母和真菌的生长。WO 96/26266 描述了大豆粉的木瓜酶消化物是碳源和氮源,并且许多成分可用于组织培养。Franek 等人 (Biotechnology Progress (2000) 16, 688-692) 描述了规定的大豆水解物多肽组分对生长和产率的促进作用。

[0007] WO 96/15231 公开了一种用于脊椎动物细胞的增殖和病毒生产工艺的无血清培养基,其包含合成的最低必需培养基和酵母提取物。WO 98/15614 公开了一种培养基配方,其由包含大米多肽和酵母提取物及其酶解物的基础细胞培养基、和 / 或用于培养动物细胞的植物油脂构成。WO 01/23527 公开了一种用于培养重组细胞的包含纯化大豆水解物的培养基。WO00/03000 公开了一种培养基,其不仅包含大豆水解物和酵母提取物,而且需要含有重组体形式的动物蛋白,如生长因子。

[0008] EP-A-0481791 描述了一种用于培养基因工程 CHO 细胞的生化定义的培养基,其不含从动物源分离的蛋白质、油脂和碳水化合物,但包含重组胰岛素或胰岛素类似物、1%~0.025% w/v 的木瓜酶解大豆蛋白胨以及腐胺。WO 98/08934 描述了一种无血清真核细胞

培养,其包含水解的大豆多肽(1-1000mg/L)、0.01 ~ 1mg/L的腐胺以及各种动物源组分,包括白蛋白、胎球蛋白、各种激素和其他蛋白质。在本文中,还应注意,已知腐胺以0.08mg/L的浓度包含于标准的培养基如DMEM/Ham's F12中。

[0009] 然而,在本技术领域已知的培养基通常营养不足和/或必须补充动物源蛋白质补充剂或重组体形式的蛋白质,如胰岛素、类似生长因子的胰岛素或其他生长因子。

[0010] 因此,目前需要提高表达的重组蛋白质或任何其他表达产品的产率、以及细胞的比生长速率,并提供完全不含动物蛋白的最佳的细胞培养基,用于生产生物制品,比如用作人用药品或疫苗。

[0011] 基于大豆蛋白胨提取物(也称为“大豆水解物”),人们已开发出无动物蛋白的培养基。然而,商业提供的各批次大豆水解物的品质差别很大,于是在重组蛋白质或病毒产品的生产中,因使用的各批次大豆水解物的差异(“lot-to-lot variation,批间偏差”)而导致较大的变化(变化因子可达到3)。此缺陷影响了细胞增殖以及各个细胞的蛋白质表达。

[0012] 于是,人们需要完全不含动物蛋白且克服了至少一个上述问题的无动物蛋白的细胞培养基。

发明内容

[0013] 本发明的一个目的是提供一种无动物蛋白的细胞培养基,其不包含任何添加的补充性动物源蛋白质和/或重组动物蛋白,这使得细胞有效地生长,特别是使单位细胞以表达量恒定的品质来生产蛋白质。本发明的另一目的是提供一种用于培养细胞的方法,以及一种用于有效地表达重组蛋白的无动物蛋白的方法。

[0014] 本发明的另一目的是减少植物和/或酵母衍生水解物,从而克服对预期的重组体或病毒产品生产产率产生不利影响的抑制作用。我们意外地发现水解物是导致产品中出现批间偏差的原因。

[0015] 根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基包含至少一种多胺和植物和/或酵母衍生水解物,其中多胺优选来源于非蛋白质水解物源。

[0016] 我们意外地发现,将至少一种多胺,特别是腐胺,添加到无动物蛋白的细胞培养基中,产生了有益的效果,它不仅促进了细胞生长,而且特别是促进了单位细胞的蛋白质表达,尤其是单位细胞的重组蛋白质表达。

[0017] 此外,根据本发明的无动物蛋白的培养基使得无动物蛋白的细胞培养基中的细胞稳定地生长,并提高预期产品特别是靶蛋白比如重组蛋白质的产率,不依赖于蛋白质水解物,特别是植物的水解物品质或批次变化。用多胺和植物和/或酵母衍生水解物对细胞培养基进行特定的补充,将协同性地起到提高细胞生长率、细胞比产率以及最终细胞密度的作用。

[0018] 于是,与在本技术领域已知的培养基相比,根据本发明的无动物蛋白的培养基有利于重组蛋白质表达和细胞生长。此外,根据本发明的无动物蛋白的培养基能够减少添加到给定体积的细胞培养基中的蛋白质水解物的量。

附图说明

[0019] 图 1 是用于比较培养细胞用培养基的函数 (A) 和 (B) 的示意图, (A) 中所示为 GD8/6 细胞的 FVIII-CoA 容量产率 (volumetric FVIII-CoA productivity, 表示为 $[U/L/D] = FVIII \text{ CoA 单位} / \text{每升反应器容积} / \text{每天}$), (B) 中所示为 GD8/6 细胞的比生长速率 (μ , 表示为 $[d^{-1}] = 1/\text{天}$), 培养基中添加了不同批次 (K119-1、K138-1、M022963、M024423、M022453) 的大豆水解物 (0.4% (w/v))。

[0020] 图 2 所示为表格, 用于比较在具有不同大豆水解物浓度的培养基中生长的 GD8/6 细胞的 FVIII-CoA 容量产率。

[0021] 图 3 是用于比较 (A) 不含腐胺的条件下与 (B) 含 1mg/L 的腐胺二盐酸盐的条件下 GD8/6 细胞的 FVIII-CoA 容量产率的示意图, FVIII-CoA 容量产率为培养细胞用培养基的函数, 培养基中添加 5 种不同批次 (K119-1、K138-1、M022963、M024423、M022453) 的大豆水解物 (0.25% (w/v))。

[0022] 图 4 是用于比较 (A) 不含腐胺的条件下与 (B) 含 1mg/L 的腐胺二盐酸盐的条件下 GD8/6 细胞的比生长速率的示意图, 比生长速率为培养细胞用培养基的函数, 培养基中添加 5 种不同批次 (K119-1、K138-1、M022963、M024423、M022453) 的大豆水解物 (0.25% (w/v))。

[0023] 图 5 是示意表, 用于比较在具有 5 种不同挑选批次 (K119-1、K138-1、M022963、M024423、M022453) 的大豆水解物 (0.4% (w/v) 或 0.25% (w/v)) 的培养基中生长的 GD8/6 细胞的 FVIII-CoA 容量产率 (QP[U/L/D]) 和比生长速率 ($\mu [d^{-1}]$) 以及它们的标准偏差与在具有相同的大豆水解物 (0.25% (w/v))、含 1mg/L 的腐胺二盐酸盐及不含腐胺二盐酸盐的培养基中的对应量。

[0024] 图 6 是示意表, 用于说明来自不同厂商的大豆水解物 (在细胞培养基中为 0.4% (w/v)) 中的平均腐胺浓度。

[0025] 图 7 是示意表, 用于比较仅含大豆水解物 (0.4% (w/v)) 与含大豆水解物 (0.25% (w/v)) 和 1.8mg/L 的腐胺二盐酸盐对分泌单克隆抗体的 ARH77 细胞中的容量产率 (volumetric productivity) (用 QP 表示, $[mg \text{ IgG1} / \text{每升反应器体积} / \text{每天}]$) 和细胞的比产率 ($qp [\mu g \text{ IgG1} / 10^6 \text{ 个细胞} / \text{天}]$) 的影响。

[0026] 图 8 是示意图, 用于比较仅含大豆水解物 (0.25% (w/v)) 与含大豆水解物 (0.25% (w/v)) 和 1mg/L 腐胺 (1.8mg/L 的腐胺二盐酸盐) 对重组 BHK 细胞的红细胞生成素 (EPO) 比产率 (EPO 产品 (单位) / 葡萄糖消耗量 (g)) 的影响。

[0027] 图 9 是示意表, 用于比较在较宽浓度范围 (0 ~ 18mg/L) 内腐胺、鸟氨酸以及精胺对在 BAV 培养基中培养的 GD8/6 细胞比生长速率 (μ 绝对值, μ 相对值) 和细胞比产率 (Qp 绝对值, Qp 相对值) 的影响, 该 BAV 培养基包含 0.0% 的大豆水解物并不含胺类、或者包含 0.25% 低浓度的大豆水解物并添加有上述浓度范围的多胺。BAV-SP 0.25% 是指包含 0.25% 大豆水解物的 BAV 培养基, BAV-SP 0.4% 是指包含 0.4% 大豆水解物的 BAV 培养基, BAV w/o 大豆不含多胺是指既不含大豆水解物也不含多胺的 BAV 培养基。

具体实施方式

[0028] 本发明一方面涉及一种无动物蛋白的细胞培养基, 其包含至少一种多胺和植物和/或酵母衍生水解物, 水解物的浓度被充分地降低从而避免水解物潜在的抑制作用。

[0029] 术语“多胺”是指任何由碳、氮、以及氢构成,并包含两个或多个氨基基团的有机化合物组。例如,该化合物组包括选自于由尸胺、腐胺、亚精胺、精胺、胍基丁胺、以及鸟氨酸所构成的物质组中的分子。

[0030] 除非另有说明,否则本文中的浓度值是指游离碱形式的组分。

[0031] 在无动物蛋白的细胞培养基的一个优选实施方式中,存在于培养基中的多胺的浓度范围为约 0.5mg/L ~约 30mg/L,进一步优选为约 0.5mg/L ~约 20mg/L,更进一步优选为约 0.5mg/L ~约 10mg/L,更优选为约 2mg/L ~约 8mg/L,最优选为约 2mg/L ~约 5mg/L。

[0032] 在优选实施方式中,无动物蛋白的细胞培养基中植物和 / 或酵母衍生蛋白质水解物的总浓度为约 0.05% ~约 5% (w/v),进一步优选为约 0.05% ~约 2% (w/v),更进一步优选为约 0.05% ~约 1% (w/v),更优选为约 0.05% ~约 0.5% (w/v),最优选为约 0.05% ~约 0.25% (w/v);即,如果培养基包含植物和酵母衍生蛋白质水解物,那么总浓度通过培养基中包含的各个蛋白质水解物组分的浓度值相加来计算。

[0033] 本发明中的术语“无动物蛋白的细胞培养基”是指不包含来源于更高级多细胞非植物真核生物的蛋白质和 / 或蛋白质组分的培养基。要避免包含的典型蛋白质是在血清和血清衍生物中发现的那些蛋白质,例如白蛋白、转铁蛋白、胰岛素和其他生长因子。无动物蛋白的细胞培养基也不含任何纯化的动物衍生产品和重组体动物衍生产品、以及蛋白质消化物及其提取物或油脂提取物或其纯化组分。动物蛋白和蛋白质组分不同于从植物例如大豆、以及低级真核生物中获得的非动物蛋白、小分子多肽和低聚肽(通常为 10 ~ 30 个氨基酸的长度),其中低级真核生物例如是能包含在根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基中的酵母。

[0034] 根据本发明的无动物蛋白的培养基可以基于任何基础培养基,例如技术人员熟知的 DMEM、Ham' s F12、Medium199、McCoy 或 RPMI。基础培养基可以包含许多成分,包括氨基酸、维生素、有机盐和无机盐、碳源、以一定含量存在的维持细胞培养的各种为本技术领域技术人员所熟知的成分。培养基可以包含辅助性物质,比如碳酸氢钠类的缓冲剂、抗氧化剂、抗机械剪切的稳定剂、或蛋白酶抑制剂。视需要,可以添加作为消泡剂的非离子型表面活性剂,例如聚乙二醇和聚丙二醇的混合物(例如 Pluronic F68®, SERVA)。

[0035] 根据本发明的无动物蛋白的培养基中使用的多胺可以选自于由尸胺、腐胺、亚精胺、精胺、胍基丁胺、鸟氨酸、以及它们的组合所构成的物质组。最优选无动物蛋白的培养基中包含鸟氨酸、腐胺和精胺。

[0036] 在无动物蛋白的培养基的优选实施方式中,多胺调控 DNA 与 RNA 的合成、细胞增殖、细胞分化、细胞膜稳定化、和 / 或抗氧化的 DNA 保护。腐胺、亚精胺、精胺、以及鸟氨酸是显示这些功能的多胺例子。多胺的另一例子是尸胺。

[0037] 在根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基的另一优选实施方式中,多胺来源于非蛋白质水解物源。

[0038] 在无动物蛋白的细胞培养基的另一优选实施方式中,存在于培养基中的多胺浓度范围为约 0.5mg/L ~约 30mg/L,进一步优选为约 0.5mg/L ~约 20mg/L,更进一步优选为约 0.5mg/L ~约 10mg/L,更优选为约 2mg/L ~约 8mg/L,最优选为约 2mg/L ~约 5mg/L,存在于培养基中的植物和 / 或酵母衍生蛋白质水解物的浓度范围为约 0.05% ~约 5% (w/v),进一步优选为约 0.05% ~约 2% (w/v),更进一步优选为约 0.05% ~约 1% (w/v),更优选为约

0.05%~约0.5% (w/v), 最优选为约0.05%~约0.25% (w/v)。

[0039] 优选根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基中使用的植物衍生蛋白质水解物选自由谷类水解物和/或大豆水解物所构成的物质组。大豆水解物可以是高度纯化的大豆水解物、纯化的大豆水解物或粗制大豆水解物。

[0040] 术语“水解物”包括任何植物的酶解物或酵母提取物。水解物可以进一步被酶消化, 例如用木瓜酶消化, 并且/或通过自溶、热分解和/或质壁分离来形成。根据本发明使用的水解物还可来自商品, 比如购自 Quest International、Norwich、NY、OrganoTechnie、S. A. France、德国的 Deutsche Hefewerke 有限公司、或 DMV Intl. Delhi、NY 中的 HyPep 1510[®]、Hy-Soy[®]、Hy 酵母412[®]和 Hi 酵母444[®]。酵母提取物和大豆水解物来源也已在 WO 98/15614、W000/03000、WO 01/23527 和 US 5, 741, 705 中被公开。

[0041] 由于杂质会影响有效地培养细胞, 故优选对粗制成分进行纯化来获得水解物。通过超滤或葡聚糖凝胶层析, 例如用葡聚糖凝胶 25 或葡聚糖凝胶 G10 或等效材料、离子交换层析、亲和层析、空间排阻层析或反相层析进行纯化。组分包含规定分子量的水解物, 其分子量优选高达约 1000 道尔顿, 更进一步优选高达到约 500 道尔顿, 最优选高达约 350 道尔顿。优选至少 90% 的水解物的分子量高达约 1000 道尔顿。水解物的平均分子量优选在约 220~约 375 道尔顿之间。水解物的 pH 值应在约 6.5~约 7.5 的范围内。优选氮的总含量在约 5%~约 15% 之间, 优选灰分含量高达约 20%。优选游离的氨基酸含量在约 5%~约 30% 之间。优选内毒素的含量低于约 500U/g。

[0042] 本发明还提供一种方法, 其将至少一种多胺添加到包含植物和/或酵母衍生蛋白质水解物的无动物蛋白细胞培养基中, 从而提高培养细胞中的蛋白质表达率。根据本发明的优选实施方式, 存在于培养基中的多胺总浓度范围为约 0.5mg/L~约 30mg/L, 进一步优选为约 0.5mg/L~约 20mg/L, 更进一步优选为约 0.5mg/L~约 10mg/L, 更优选为约 2mg/L~约 8mg/L, 最优选为约 2mg/L~约 5mg/L。优选多胺选自由尸胺、腐胺、亚精胺、精胺、胍基丁胺、鸟氨酸、以及它们的组合所构成的物质组。优选存在于培养基中的植物和/或酵母衍生蛋白质水解物的浓度范围为约 0.05%~约 5% (w/v), 进一步优选为约 0.05%~约 2% (w/v), 更进一步优选为约 0.05%~约 1% (w/v), 更优选为约 0.05%~约 0.5% (w/v), 最优选为约 0.05%~约 0.25% (w/v)。

[0043] 本发明还涉及一种用于培养细胞的方法, 其包括下述步骤:

[0044] (a) 提供根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基, 以及

[0045] (b) 使培养基中的细胞增殖以形成细胞培养物。

[0046] 在优选实施方式中, 无动物蛋白的细胞培养基包含至少一种多胺和植物和/或酵母衍生水解物。优选多胺来源于非蛋白质水解物源。

[0047] 本发明不限于任何类型的细胞。在本发明的优选实施方式中, 使用的细胞是, 例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、细菌细胞、酵母细胞。细胞可以是, 例如干细胞或重组基因表达载体转化的重组细胞、或用于生产病毒产品的病毒转染细胞。细胞还可以是, 例如不进行重组转化而产生有益蛋白质的细胞, 例如产生抗体的 B 细胞, 该细胞可以通过病毒例如埃-巴氏病毒 (Epstein Barr Virus) 感染的感染而转变成无限增殖的状态。细胞还可以是, 例如初级细胞比如鸡胚细胞、或初级细胞系。优选细胞用于体外生产病毒。在优选实施方式中, 细胞可以是 BSC 细胞、LLC-MK 细胞、CV-1 细胞、COS 细胞、VERO 细胞、MDBK 细

胞、MDCK 细胞、CRFK 细胞、RAF 细胞、RK 细胞、TCMK-1 细胞、LLCPK 细胞、PK15 细胞、LLC-RK 细胞、MDOK 细胞、BHK-21 细胞、CHO 细胞、NS-1 细胞、MRC-5 细胞、WI-38 细胞、BHK 细胞、293 细胞、RK 细胞、以及鸡胚细胞。

[0048] 根据本发明,使用的细胞可以通过选自于由本领域中众所周知的分批培养、补料分批培养、灌流培养、以及恒化培养所构成的方法组中的方法来培养。

[0049] 本发明还涉及一种用于表达靶蛋白比如异源蛋白或同源蛋白或重组蛋白的方法,其包括下述步骤:

[0050] a) 提供在根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基中生长的细胞的培养物;以及

[0051] b) 将包含编码靶蛋白的序列的核酸序列导入细胞中;

[0052] c) 选取带有核酸序列的细胞;以及

[0053] d) 选择性地诱导细胞表达靶蛋白。

[0054] 在优选实施方式中,无动物蛋白的细胞培养基包含至少一种多胺和植物和/或酵母衍生水解物。优选多胺来源于非蛋白质水解物源。

[0055] 包含编码靶蛋白的序列的核酸序列可以是载体。载体可以是病毒或质粒。编码靶蛋白的序列可以是特定的基因或其生物功能部分。在优选实施方式中,靶蛋白至少是凝血因子如因子 VIII (Factor VIII) 中的生物活性部分、或至少是包含在红细胞和血管生成素比如红细胞生成素中的蛋白质中生物活性部分,或者是单克隆抗体。

[0056] 优选核酸还包含适于调控靶蛋白表达的其他序列,例如本技术领域的技术人员所熟知的作为增强子的启动子序列、TATA 盒 (TATA boxes)、转录起始位点、多接头、限制性位点、多 A 序列 (poly-A-sequences)、蛋白质加工序列、选择性标记等。

[0057] 最优选的是用于表达各个产品的重组载体转化的下述细胞系:用于生产重组凝血因子 VIII 的 CHO 细胞、用于生产重组红细胞生成素的 BHK 细胞、转化的埃-巴氏病毒、用于生产人源抗体的无限增殖化的人 B 细胞。

[0058] 本发明还涉及一种用于生产病毒或病毒中一部分的方法,其包括下述步骤:

[0059] a) 提供在根据本发明的无动物蛋白的细胞培养基中生长的细胞的培养物;以及

[0060] b) 用病毒感染细胞;

[0061] c) 选取病毒感染的细胞;以及

[0062] d) 培养细胞以繁殖病毒。

[0063] 在优选实施方式中,无动物蛋白的细胞培养基包含至少一种多胺和植物和/或酵母衍生水解物。进一步优选多胺来源于非蛋白质水解物源。

[0064] 根据本发明的方法中所使用的病毒可以是任何致病病毒,哺乳动物病毒,优选人的病毒,例如用于天花疫苗的牛痘病毒或减毒的牛痘病毒、冠状病毒,优选例如用于制造 SARS 疫苗的 SARS 病毒,正粘病毒,优选例如用于制造流感疫苗的流感病毒,副粘病毒、逆转录病毒、流感 A 或 B 病毒、罗斯河病毒 (Ross River virus)、黄病毒,优选例如用于制造各种疫苗的西尼罗病毒 (West Nile virus) 或 FSME 病毒 (即蜱传脑炎病毒)、细小核糖核酸病毒、沙粒病毒、疱疹病毒、痘病毒或腺病毒。

[0065] 病毒可以是野生型病毒、减毒病毒、重排病毒 (reassortant virus) 或重组病毒或其组合体,例如减毒与重组病毒。此外,可以使用传染性核酸克隆代替使用实际的病毒体使细胞受病毒感染。还可以使用裂解病毒体。

[0066] 用于表达蛋白质或制造病毒的方法可以用于生产包含病毒或病毒抗原的免疫组合物。

[0067] 用于制造病毒的方法中所使用的细胞可以选自于由哺乳动物细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、细菌细胞、以及酵母细胞所构成的物质组。优选细胞通过选自于由分批培养、补料分批培养、灌流培养、以及恒化培养所构成的方法组中的方法来进行培养。

[0068] 优选用于制造病毒或病毒中一部分的带病毒细胞的组合物是 Vero 细胞 / 减毒牛痘、Vero 细胞 / 牛痘、Vero 细胞 / 甲型肝炎、Vero 细胞 / 流感病毒、Vero 细胞 / 西尼罗病毒、Vero 细胞 / SARS 病毒、鸡胚细胞 / FSME 病毒。

[0069] 本发明还涉及一种用本发明的无动物蛋白的细胞培养基来培养细胞以表达靶蛋白的方法。

[0070] 根据下述实施例进一步说明本发明,但本发明并不限于此。

[0071] 实施例

[0072] 实施例 1 (BAV 培养基)

[0073] 用添加了无机盐、氨基酸、维生素及其它组分 (Life technologies, 32500 Powder) 的 DMEM/HAM's F12 (1 : 1) 基础培养基来制备无动物蛋白的培养基。还添加了 L- 谷氨酰胺 (600mg/L)、抗坏血酸 (20 μ M)、乙醇胺 (25 μ M)、Synperonic® (SERVA) (0.25g/L)、亚硒酸钠 (50nM)。此外,向细胞培养基中添加了必需氨基酸。此外,添加了浓度在 0.0% ~ 1.0% 范围内变化的大豆水解物 (来自 Quest Technologies 公司, 纽约或 DMV 国际公司, 纽约) 以及浓度变化的多胺 (0 ~ 10mg/L) (图 1 ~ 9)。

[0074] 实施例 2

[0075] 重组哺乳动物细胞的细胞培养物 (如稳定表达因子 VIII 的 CHO 细胞即 GD8/6 细胞) 在 10 升生物反应器中用恒化培养基进行悬浮培养。培养条件恒定地保持为 37°C、20% 的氧饱和度以及 pH 7.0 ~ 7.1。恒定地向培养物中补加添加了实施例 1 中限定的 0.1 ~ 1.0% 大豆水解物和 / 或 0 ~ 1mg/L 腐胺二盐酸盐的 BAV 培养基 (参照图 1 ~ 5)。

[0076] 在 37°C、不控制 pH 和 pO₂ 值的条件下,采用分批重复补料的方式,用 GD8/6 细胞在有效容积为 200ml 的 Techne 公司的转瓶中进行悬浮培养的小规模实验。向培养物中补加实施例 1 中限定的未添加水解物和多胺的 BAV 培养基、或补加添加了 0.1 ~ 0.4% 大豆水解物和 / 或 0 ~ 18mg/L 腐胺二盐酸盐、鸟氨酸盐酸盐、精胺四盐酸盐 (等同于 0 ~ 10mg/L 不带盐酸基的多胺) 的 BAV 培养基 (参照图 9)。

[0077] 实施例 3 (参照图 1 ~ 5、7、以及 9)

[0078] 通过用 Schärfe 等人描述的 CASY® 细胞计数器 (Biotechnologie in LaborPraxis 10 : 1096-1103 (1988)) 计数,或者通过在用 NucleoCounter® (Chemometec 公司, 得克萨斯) 计数并紧接着进行柠檬酸提取和细胞核荧光染色,来确定悬浮细胞或固定化细胞的细胞数。根据在一定的时间间隔 (t) 内,恒化培养中悬浮细胞处于稳定期时的细胞密度 (X_t) 和 / 或稀释率 (D) 的增加来计算比生长速率 (μ) :

[0079]
$$\mu = D + \ln(X_t/X_0) / t$$

[0080] 实施例 4

[0081] 凝血因子 VIII (FVIII) 的活性 (参照图 1 ~ 5 和 9) 通过显色试验 (Chromogenic 公司, 瑞典) 来测量。红细胞生成素的活性 (参照图 8) 与单克隆抗体的滴度 (参照图 7)

通过 ELISA 测试系统来测量。

[0082] 根据每天每升反应器体积内产生的活度单位量或抗原滴度的数值 (U/L/d 或 mg/L/d) 来计算各个生产体系的容量产率。

[0083] 细胞的比产率定义为每日每一一定量的细胞所产蛋白质的单位含量 (U 或 μg) (参照图 7 和 9), 或者为单位细胞消耗的 D-葡萄糖所产生的蛋白质的单位含量 (U) (参照图 9)。

[0084] 实施例 5

[0085] 用含 0.4% (w/v) 不同批次大豆水解产物的 BAV 培养基来培养 GD8/6 细胞。不同批次之间的 FVIII 容量产率在约 600 ~ 1800U/L/d 范围内变化, 比生长速率在 0.35 ~ 0.52 $\mu\text{[d}^{-1}\text{]}$ 范围内变化 (比较图 1)。这说明 0.4% 浓度的各批次大豆水解物不能使 GD8/6 细胞恒定地生长, 这可能是由于包含在大豆水解物中的抑制物质影响了比生长速率 (μ) 之故。

[0086] 实施例 6

[0087] 用包含不同浓度 (在 0.15 ~ 1.0% w/v 的范围内) 的批次为 M022257 的大豆水解物的 BAV 培养基来培养 GD8/6 细胞。FVIII 容量产率在 500U/L/d ~ 1100U/L/d 范围内变化, 于是在 0.4% (w/v) 的大豆水解物浓度下达到 1100U/L/d 的最佳产率 (参照图 2)。

[0088] 实施例 7

[0089] 分别用如实施例 5 中描述的包含 0.25% (w/v) 的 5 种不同批次大豆水解物的 BAV 培养基 (图 3A 和 4A)、和包含相同批次的 0.25% (w/v) 大豆水解物并补充添加了 1mg/L 腐胺二盐酸盐的 BAV 培养基 (图 3B 和 4B) 来培养 GD8/6 细胞。在包含 0.25% (w/v) 不同批次大豆水解物的 BAV 培养基中生长的细胞, 其 FVIII 容量产率在 1700U/L/d ~ 500U/L/d 范围内变化 (图 3A)。比生长速率在 0.58 ~ 0.24 $\mu\text{[d}^{-1}\text{]}$ 范围内变化, 这说明大豆水解物浓度的降低并没有提高细胞的生长率, 或使细胞的生长率更稳定 (图 4A)。

[0090] 相反, 当在包含 0.25% (w/v) 大豆水解物的 BAV 培养基中添加 1mg/L 的腐胺二盐酸盐时, 观察到在其内生长的细胞中, 其 FVIII 容量产率 (图 3B) 和比生长速率 (图 4B) 在相同批次的大豆水解物之间发生较小的变化。添加 1mg/L 的腐胺二盐酸盐基本上补偿了因大豆水解物浓度从 0.4% (w/v) 降低到 0.25% (w/v) 而导致的多胺的减小。由此可以推断, 不是因为多胺浓度本身, 而是因为添加多胺与降低大豆水解物浓度的组合效应才导致了使生长率和产率降低的抑制物质的减少 (见实施例 5)。此外, 添加腐胺还导致 FVIII 因细胞的 FVIII 比产率的增加而具有非正比增加的容量产率 (图 5)。

[0091] 于是, 向无动物蛋白的细胞培养基中添加腐胺不仅促进培养细胞的蛋白质表达率, 而且还降低了为获得相同细胞生长率而包含在培养基中的植物水解物含量。于是, 培养基更少受到植物水解物品质的批间偏差的影响, 从而使细胞的培养条件总体上得到改善。

[0092] 实施例 8

[0093] 图 5 包括对图 1、2 和 4 所示实施例的统计分析: 分别用包含 0.4% (w/v) 大豆水解物、或 0.25% (w/v) 大豆水解物、或 0.25% (w/v) 的大豆水解物和 1mg/L 的腐胺二盐酸盐的培养基来培养 GD816 细胞。根据选择的五个批次的大豆水解物 (K119-1、K138-1、M022963、M024423、M022453) 来计算标准偏差。具有 0.25% (w/v) 大豆水解物的容量产率和细胞的 FVIII 比产率及比生长速率低于具有 0.4% (w/v) 大豆水解物的对应项, 这证实了图 2 中描述的最佳条件。然而, 在包含 0.25% (w/v) 大豆水解物和 1mg/L 腐胺二盐酸盐的细胞培养

基中,容量产率和细胞的 FV111 比产率及比生长速率得到提高。此外,由 5 种不同批次大豆水解物中计算的标准偏差明显降低(参照图 5, $[QP[U/L/D] = \text{容量产率}; qp[mU/10^6 \text{ 个细胞} / \text{天}] = \text{细胞的比产率})$ 。

[0094] 实施例 9

[0095] 实施例 7 和 8 表明腐胺是一种促进细胞生长,更具体地讲是促进蛋白质表达的活性化合物。于是,用 HPLC 方法定量地分析来自 2 个不同供应商(Quest 和 DMV)的不同批次大豆水解物中的腐胺浓度,并进行统计学评估。当大豆水解物以 0.4% (w/v) 的浓度添加到培养基时,用来自两个供应商的大豆水解物制备的细胞培养基中腐胺的浓度约为 2.3mg/L(参照图 6)。

[0096] 实施例 10

[0097] 在将 ARH77 细胞(稳定地表达 hIgG 的人类淋巴母细胞的细胞系)固定于大孔隙微载体上后,于 37. C、pH7.0 ~ 7.2 以及 pO_2 为 20% ~ 80% 的空气饱和状态下,在装有包含 0.4% (w/v) 大豆水解物或 0.25% (w/v) 大豆水解物和 1.8mg/L 的腐胺二盐酸盐的 BAV 培养基的 80L 的搅拌槽式生物反应器中,用灌流培养法进行培养。根据用于表示各个培养基配方相对应的稳定状态的数据来计算数值平均值和标准偏差。在添加了 0.4% (w/v) 大豆水解物的 BAV 培养基中的 hIgG 容量产率/细胞比产率低于在添加了 0.25% (w/v) 大豆水解物和 1.8mg/L 腐胺二盐酸盐的 BAV 培养基中的对应量。该实验表明,根据本发明的培养基组合物还能够促进转化细胞系的单克隆抗体表达。此外,特定的培养基组合物还可用于灌流培养(参照图 7)。

[0098] 实施例 11

[0099] 重组 BHK 细胞在包含 5% (v/v) 胎牛血清的培养基中聚集生长。用无蛋白质的培养基洗涤细胞,接着在添加了 0.25% (w/v) 大豆水解物或 0.25% (w/v) 大豆水解物和 1.8mg/L 腐胺二盐酸盐的 BAV 培养基中培养 3 天(图 8)。由于在此实验中没有对细胞进行计数,故在三天后对葡萄糖消耗率(g/L)进行测量,从而确认在培养体系中的等同生物量。EPO 活性(mU/ml)与三天后的葡萄糖消耗量(g/L)相关。相对于仅添加 0.25% (w/v) 大豆蛋白质的培养基,添加腐胺使 EPO 产率增加了 16%。该实验还表明,根据本发明的培养基组合物能够促进不同的重组蛋白质的表达。

[0100] 实施例 12

[0101] 为证实在更宽浓度范围内腐胺、鸟氨酸和精胺(0 ~ 18mg/L 等同于 0 ~ 10mg/L 不带盐酸基的多胺)的特定作用,进行下述实验:在包含 0.25% 和 0.4% 不含多胺的大豆水解物的 BAV 培养基中、以及包含减小浓度的 0.25% 大豆水解物且具有上述浓度范围的多胺的 BAV 培养基中,将 G08/6 细胞以 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 个细胞/ml 的速率在 Techne 公司的转瓶中培养。与没有添加多胺的具有 0.25% 大豆水解物、或具有增加浓度的 0.4% 大豆水解物的培养基配方相比,在研究的浓度范围内的所有三种多胺均导致了细胞的比产率(表示为 $mU/10^6$ 个细胞/天)明显增加。细胞比产率的增加显然与增加的比生长速率无关,这证实了多胺对 G08/6 细胞的重组 FVIII 表达速率具有特定的影响(图 9)。

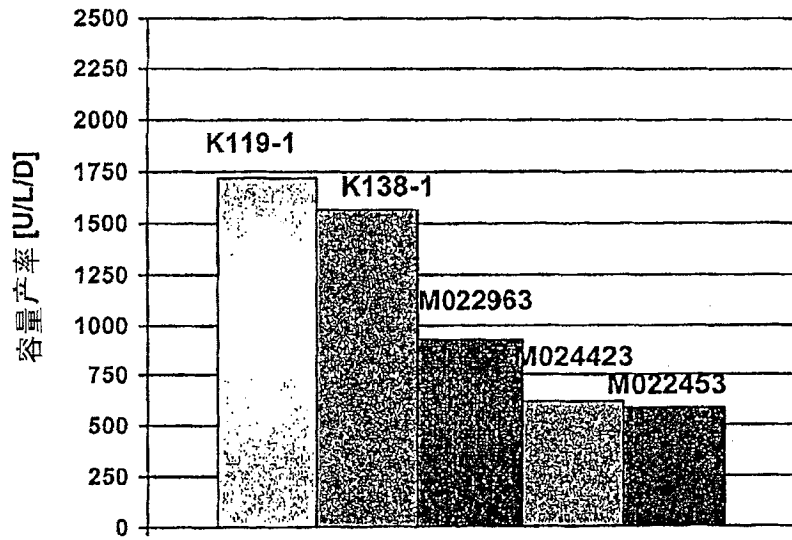


图 1A

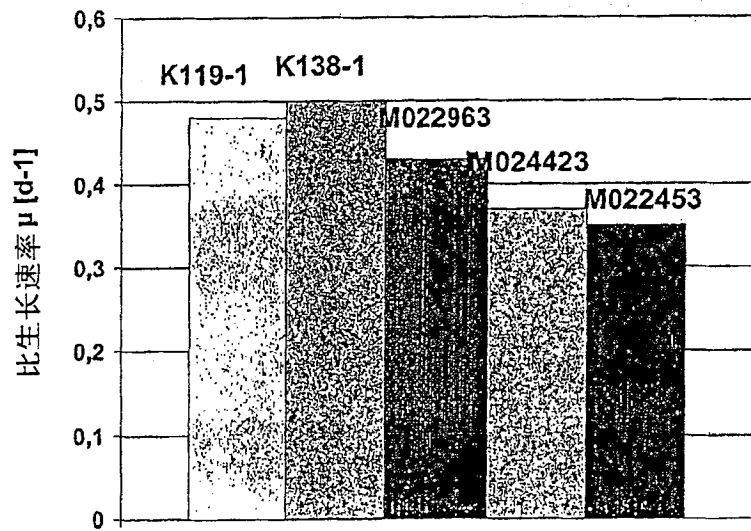


图 1B

大豆蛋白胨浓度 (%)	FVIII 产率 (U/L/D)
0.15	500~600
0.25	900~1,000
0.40	1,000~1,100
0.75	1,000~1,100
1.00	500~600

图 2

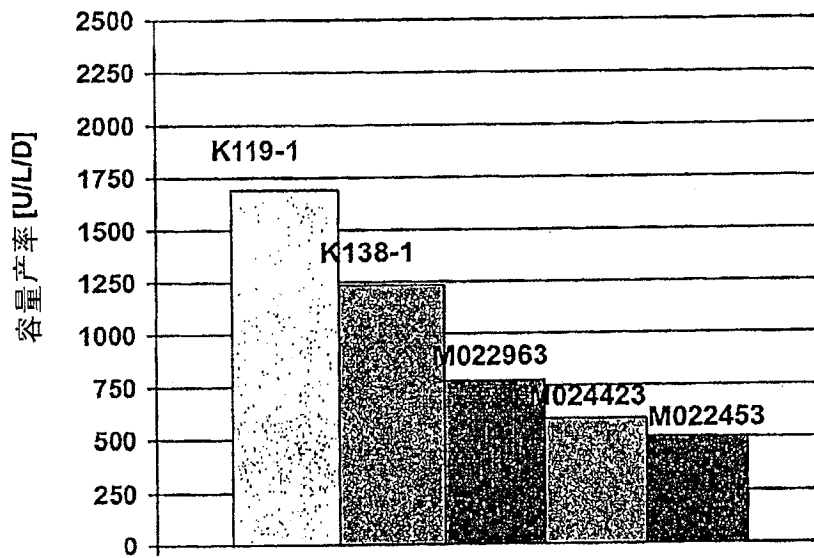


图 3A

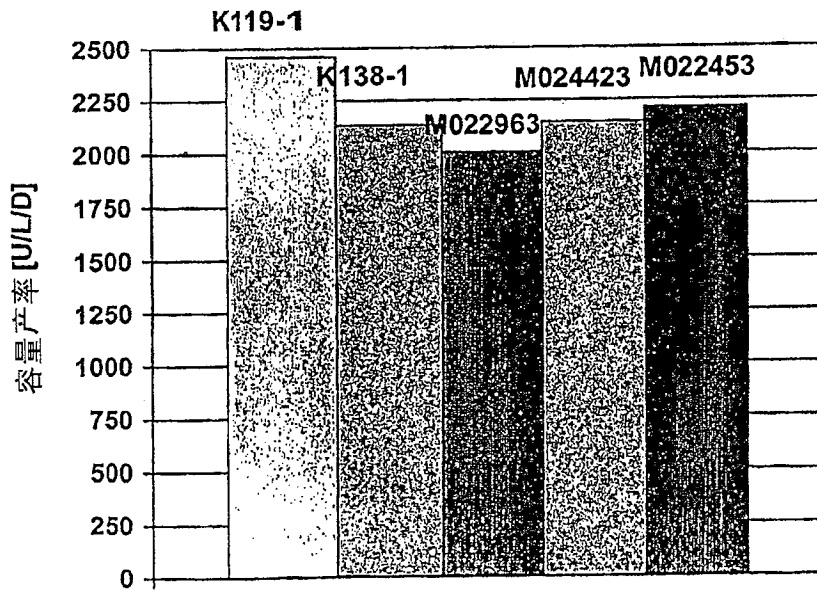


图 3B

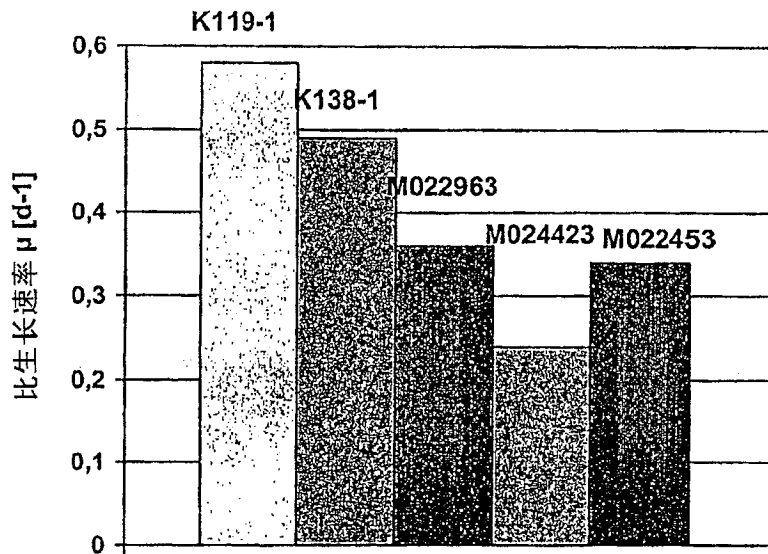


图 4A

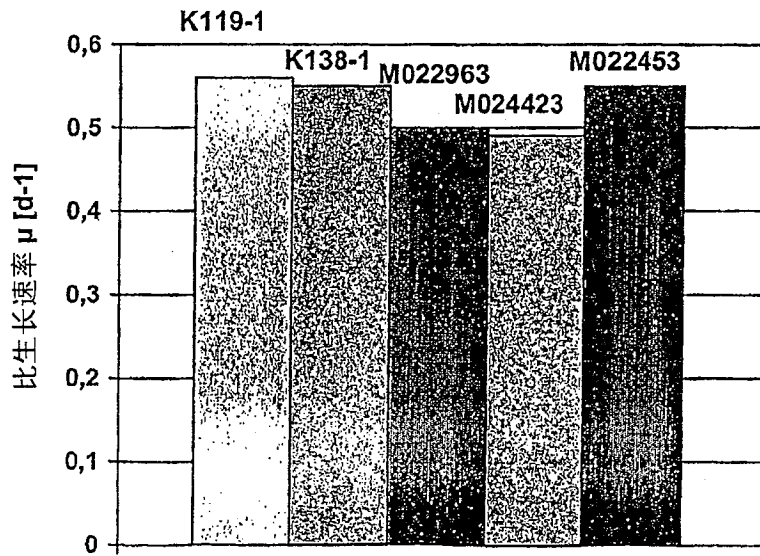


图 4B

平均值 +/- 标准偏差	0.4%大豆水解物	0.25%大豆水解物	0.25%大豆水解物+1 mg/L 的腐胺二盐酸盐
QP [U/L/D]	1083 +/- 531	959 +/- 497	2190 +/- 168
Qp [mU/10 ⁶ 个细胞 /天]	813 +/- 381	631 +/- 251	1473 +/- 79
μ [d ⁻¹]	0.43 +/- 0.07	0.40 +/- 0.13	0.53 +/- 0.03

图 5

	腐胺 [mg/L]	各批次平均
Quest Hy Pep 1510 总和	2.24	n = 20
DMV SE 50 MAF 总和	2.41	n = 6
Quest + DMV 总和	2.28	n = 26

图 6

平均值+/-标准偏差	0.4%大豆水解物	0.25%大豆水解物 + 1.8 mg/L 腐胺二盐酸盐
容量产率 QP [mg/L/D]	12.2 +/- 1.6	18.5 +/- 3.5
细胞比产率 qp[$\mu\text{g}/10^6$ 个细胞/天]	2.8 +/- 0.1	4.2 +/- 0.1

图 7

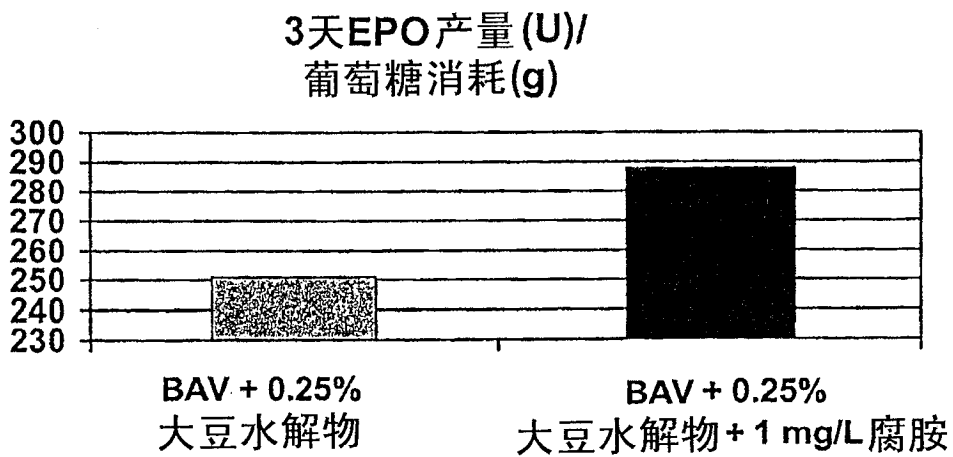


图 8

	Qp 的绝对值 [mU/10 ⁶ 个细胞/天]		μ 的绝对值 [d ⁻¹] [%]	μ 的相对 值 [%]
BAV-SP 0.25% 不含生物胺	504	100	0.359	100
BAV w/o 大豆 不含生物胺	236	47	0.299	83
BAV-SP 0.4% 不含生物胺	613	122	0.407	113
BAV-SP 0.25% 3.6 mg/L 腐胺二盐酸盐	910	180	0.283	79
BAV-SP 0.25% 18 mg/L 腐胺二盐酸盐	697	138	0.305	85
BAV-SP 0.25% 2.5 mg/L 鸟胺酸二盐酸盐	657	130	0.283	79
BAV-SP 0.25% 12.5 mg/L 鸟胺酸二盐酸盐	893	177	0.299	83
BAV-SP 0.25% 3.4 mg/L 精胺四盐酸盐	752	149	0.328	91
BAV-SP 0.25% 17 mg/L 精胺四盐酸盐	1034	205	0.372	104

图 9