[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710186677.9

[43] 公开日 2008 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 101200705A

[22] 申请日 2004.3.1
[21] 申请号 200710186677.9
分案原申请号 200480005848.8
[30] 优先权
[32] 2003. 3. 3 [33] GB [31] 0304799.0
[71] 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司
地址 比利时里克森萨特
[72] 发明人 B·G·L·埃尔茨
Y·J·M·希斯莱因
M· –M·J·贡泽
I·S·L·克诺特 C·马格托

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 黄可峻

权利要求书 4 页 说明书 32 页

[54] 发明名称

无动物细胞培养方法

[57] 摘要

本发明涉及在没有一级动物来源的外源成分的条件下培养动物，优选人二倍体贴壁依赖性细胞的方法，并且涉及基本上不含一级动物来源的外源成分的、适合执行所述方法的细胞培养基。 具体地讲，本发明涉及包括至少一种，更优选若干种，无外源动物的生长因子的细胞培养基。 本发明还涉及在本发明的培养基中培养动物，优选人二倍体贴壁依赖性细胞的方法，包括将非动物来源的胰蛋白酶代用品用于使细胞传代。 本发明还涉及生产病毒，和人病毒疫苗等的方法。

1.缺少一级动物来源的外源成分的细胞培养基，包括

i）选自下组的至少一种非动物二级来源的外源生长因子：EGF，FGF，三-碘-L tyronine 和氢化可的松，和；

ii）非动物二级来源的 IGF-1 和/或胰岛素中的至少一种。

2. 如权利要求 1 的细胞培养基，其中，所述培养基包括两种或两种以上选自下组的非动物二级来源的外源生长因子：EGF，FGF，三-碘-L tyronine 和氢化可的松，以及非动物二级来源的 IGF-1 和/或胰岛素中的至少一种的组合。

3. 如权利要求 2 的细胞培养基，其中，所述培养基包括非动物二级来源的 EGF，FGF，三-碘-L tyronine 和氢化可的松以及非动物二级来源的 IGF-1 和/或胰岛素中的至少一种的组合。

4. 如权利要求 1-3 中任意一项的细胞培养基，其中所有成分都是非动物一级和二级来源的。

5. 如权利要求 1-4 中任意一项的细胞培养基，还包括非动物来源的蛋白质水解产物。

6. 如权利要求 5 的细胞培养基，其中，所述蛋白质水解产物来自小麦。

7. 如权利要求 1-5 中任意一项的细胞培养基，其中，所述细胞培养基适合培养动物，优选人二倍体贴壁依赖性细胞。

8. 如权利要求 1-6 中任意一项的细胞培养基，其中，当 EGF 存在时，其浓度大约为 0.00001 - 0.3 mg/l；当 FGF 存在时，其是 bFGF 形式的，浓度大约为 0.00001 -0.1 mg/l；当三-碘-L tyronine 存在时，其浓度大约为 0 - 1 mg/l；当氢化可的松存在时，其浓度大约为 0 - 10 mg/l；当 IGF-1 存在时，其浓度大约为 0.00001 - 5 mg/l；当胰岛素存在时，其浓度大约为 0.1 - 1000 mg/l。

9. 如权利要求 1-8 中任意一项的细胞培养基，其中，所述培养基是新鲜培养基和条件培养基的混合物。

10. 一种动物，优选人类二倍体贴壁依赖性细胞系，适合在权利要求 1-9 中任意一项的培养基中生长。

11. 一种动物，优选人类二倍体贴壁依赖性细胞系，适合在权利要求 1-9 中任意一项的培养基中生产生物学产物 。

12. 如权利要求 1 的细胞系，其中，所述生物学产物是病毒。

13. 如权利要求 10-12 中任意一项的细胞系，选自下组：MRC-5，WI-38，TIG-1，TIG-7，FRhL-2，MRC-9，IMR-90 和 IMR 91。

14. 一种生产条件培养基的方法，包括将权利要求 1-8 中任意一项的新鲜培养基与动物或优选人类二倍体贴壁依赖性细胞组合，以便产生条件培养基。

15. 一种生产动物或优选人类二倍体贴壁依赖性细胞的方法，包括：

a）将所述细胞接种在权利要求 1-9 中任意一项的细胞培养基中，并且让所述细胞附着在基质上；

b）收获从步骤 a）得到的条件培养基，并且从所述基质上分离所述细胞层，并且用非动物来源的蛋白酶解离细胞，以便形成细胞悬浮液；

c）将步骤 b）的细胞悬浮液接种到装在包括附着支持物的培养装置中的所述培养基中，使得细胞附着；和

d）在相同的培养基中生长所述细胞。

16. 如权利要求 15 的方法，还包括冷冻在步骤 b）中收获的细胞，以便产生细胞库。

17. 如权利要求 15 或 16 的方法，其中， 用于步骤 a）和 c）中的任意一个步骤的所述细胞培养基是：i）条件培养基 或 ii）新鲜培养基或 iii）条件培养基和新鲜培养基的混合物。

18. 如权利要求 17 的方法，其中，所述条件培养基是按 1:0 - 0:1 的比例（新鲜：条件）用新鲜培养基稀释。

19. 如权利要求 17 的方法，其中，所述条件培养基是按 7:1 - 1:7 的比例（新鲜：条件）用新鲜培养基稀释。

20. 如权利要求 17 的方法，其中，所述条件培养基是按 3:1 - 1:3 的比例（新鲜：条件）用新鲜培养基稀释。

21. 如权利要求 17 的方法，其中，所述条件培养基是按 3:1 的比例（新鲜：条件）用新鲜培养基稀释。

22. 如权利要求 15-21 中任意一项的方法，其中所述用于步骤 b）的非动物来源的蛋白酶选自下组：半胱氨酸内肽酶，中性真菌蛋白酶，中性细菌蛋白酶或丝氨酸蛋白酶。

23. 如权利要求 22 的方法，其中，所述丝氨酸蛋白酶是重组胰蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。

24. 如权利要求 22 的方法，其中，所述半胱氨酸内肽酶 选自下组：无花果蛋白酶，茎菠萝蛋白酶，和猕猴桃碱。

25. 一种在权利要求 1-9 中任意一项的培养基中生产动物或优选人类贴壁依赖性细胞培养物的方法，所述方法包括用非动物来源的蛋白酶对所述细胞培养物进行传代的步骤。

26. 如权利要求 25 的方法，其中，所述非动物来源的蛋白酶选自下组：半胱氨酸内肽酶，中性真菌蛋白酶，中性细菌蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。

27. 如权利要求 26 中任意一项的方法，其中，所述半胱氨酸内肽酶选自下组：无花果蛋白酶，茎菠萝蛋白酶，和猕猴桃碱。

28. 如权利要求 14-27 中任意一项的方法，其中，所述细胞培养物 是 MRC-5，WI-38，TIG-1，TIG-7，FRhL-2，MRC-9，IMR-90 和 IMR 91 细胞的培养物。

29. 一种在权利要求 1-9 中任意一项的细胞培养基中，在动物或优选人类二倍体贴壁依赖性细胞培养物中生产病毒的方法，所述方法包括：

a）用病毒感染所述细胞

b）繁殖所述病毒，和

c）收获所述病毒。

30. 如权利要求 29 的方法，其中，所述细胞培养基是如在权利要求 17-21 的任意一项中进一步限定的。

31. 如权利要求 29 或 30 的方法，还包括对收获的病毒进行一个或多个纯化步骤。

32. 如权利要求 29-31 中任意一项的方法，其中，所述病毒是由 MRC-5，WI-38，TIG-1，TIG-7，FRhL-2，MRC-9，IMR-90 和 IMR 91 细胞生产的。

33. 如权利要求 29-32 中任意一项的方法，其中，所述病毒选自下组：HAV，脊髓灰质炎病毒，HSV，CMV，EBV，风疹病毒，副粘病毒科，如腮腺炎病毒，VZV。

34. 一种生产病毒疫苗的方法，包括将权利要求 29-33 的病毒与

可以药用的载体，赋形剂或佐剂混合。

35. 可以通过权利要求 29-33 中任意一项的方法获得的病毒群体。

36. 一种生产病毒疫苗的方法，包括将权利要求 34 的病毒群体与可以药用的载体，赋形剂或佐剂混合。

无动物细胞培养方法

本申请是申请日为 2004 年 3 月 1 日的发明创造名称为“无动物细胞培养方法”的中国专利申请（国家申请号为 No.200480005848.8，国际申请号为 PCT/EP2004/002067）的分案申请。

技术领域

本发明涉及用于在没有一级动物来源的外源成分的条件下培养动物，如哺乳动物的细胞的方法，具体地讲，用于培养动物，如哺乳动物或优选人，二倍体贴壁依赖性细胞，并且涉及基本上不含一级动物来源的外源成分的、适合执行所述方法的细胞培养基。具体地讲，本发明涉及包括至少一种，更优选若干种，无外源动物的生长因子的细胞培养基。所述培养基特别适合培养动物，如哺乳动物，或优选人类二倍体贴壁依赖性细胞，例如，与用于所述细胞类型的补充了合适血清的基础培养基具有等同的性能。本发明还涉及在本发明的培养基中培养动物，如哺乳动物，优选人二倍体贴壁依赖性细胞的方法，包括将非动物来源的胰蛋白酶代用品用于使细胞传代。本发明还涉及生产病毒，和人病毒疫苗等的方法。

背景技术

贴壁依赖性细胞，特别是二倍体贴壁依赖性细胞被用于多种方法中：用于大规模生物方法中生产保健品，如疫苗和重组蛋白，用于制备用来治疗人体损伤的人工组织，用于实验研究，用于体外毒理学研究，用于筛选和测试新的药物等。

通常，贴壁依赖性细胞是在含有血清或作为血清代用品的动物来源的成分，如牛血清白蛋白（BSA）或蛋白质水解产物的培养基中培养的。血清或动物来源的成分还用在细胞转种和细胞低温贮藏期间。血清是代谢物，激素，维生素，铁（转铁蛋白），转运蛋白，附着因子（例如，粘连蛋白），扩散和生长因子的主要来源。它是很多动物细胞培养物在体外生长所需要的。另外，血清起着抗多种干扰和毒性作用，如 pH 改变，重金属离子的存在，蛋白质水解活性，或内毒素的缓冲剂的作用。白蛋白是血清的主蛋白成分，并且能产生若干种作用，这些作用导致了细胞在培养物中的生长和维持：它起着多种小分子的载体蛋白的作用，并且起着脂肪酸的转运蛋白的作用，这些脂肪酸是细胞所必需的，但是在非结合形式下是有毒的。

二倍体贴壁依赖性细胞通常在塑料表面，玻璃表面或微载体上生

长。所述细胞通过诸如粘连蛋白的附着因子附着和扩散（F. Grinnel & M. K. Feld Cell，1979，17，117-129）。胰蛋白酶是在细胞传代期间用于细胞脱离的最常见的动物来源的成分之一（M. Schröder & P. Friedl，Methods in Cell Science，1997，19，137-147；O. W. Mertens，Dev Biol Stand.，1999，Vol 99，pp 167-180）。在细胞脱离之后，必须通过血清或大豆胰蛋白酶抑制剂对它进行抑制，以便避免细胞损伤。在脱离之后，细胞以低密度接种在新的表面上，在这里，它们能够增殖，并且形成汇合的细胞层，然后进行下一次转种。对粘附细胞进行传代的目的是增殖，并且获得足够数量的细胞，以便实施上述方法。

有多种与将血清和动物来源的成分用于上述方法中相关的缺陷，主要是它们的成本，它们的组成在不同批次之间的波动性，它们与被外来制剂污染的较高风险相关性，以及随后在后续处理中遇到的难题（例如，纯化，以便消除血清-蛋白或所述导入的动物来源的蛋白）。另外，据报导无血清培养基不适合贴壁依赖性二倍体细胞（O. W. Mertens，Dev Biol Stand.，1999，Vol 99，pp 167-180；O. W. Merten，Dev. Biol. 2002，101，233-257）。

业已开发出了用于培养贴壁依赖性细胞具体地讲，用于培养二倍体贴壁依赖性细胞的多种低血清或无血清培养基配方。（M. Kan & I. Yamane，Journal of Cellular Physiology，1982，111，155-162；S. P. Forestell 等 Biotechnology and Bioenineering，1992，Vol 40，pp 1039-1044）。用所述培养基进行的尝试一直是令人不满意的，主要是因为未转化过的二倍体贴壁依赖性细胞需要相当复杂的无血清培养基，这些培养基补充了若干种生长因子和激素，并且还因为对于所述细胞的生产过程来说，通常至少在生物物质生产阶段使用血清（O. W. Merten，Dev. Biol. 2002，101，233-257）。另外，所述培养基仍然含有动物来源的成分，如 BSA，蛋白质水解产物，生长因子，转运蛋白，氨基酸，维生素等。在开发用于贴壁依赖性细胞的完全不含动物来源的成分的培养基配方方面所做的努力非常有限。根据报导，大部分无动物的配方不能够支持与用血清观察到的生长速度相当的细胞生长速度，并且只能够在出现早期衰老之前进行几个转种步骤（B.J. Walthall & R. Ham Experimental Cell Research （1981）134 303-

311）。另外，来自贴壁依赖性细胞的原代细胞培养物几乎总是与使用动物来源的蛋白酶，主要是丝氨酸-蛋白酶分离细胞层或组织相关，因此，涉及到由外来病毒污染所述细胞培养物的危险，并且导致细胞生长的不可接受的波动性，因为不同批次之间的蛋白酶的酶活性有所不同。例如，将猪/牛胰蛋白酶用于传代贴壁依赖性细胞培养物是众所周知的技术（O. W. Mertens，Cytotechnology，2000，34，181- 183）。

因此，在二倍体贴壁依赖性细胞培养物领域，需要开发基本上不含，优选完全缺乏动物来源的成分，并且，适合执行二倍体贴壁依赖性细胞培养物的方法的培养基，所述培养基与补充了合适血清的细胞类型的基础培养基具有等同的性能，所述性能是指，例如，与用含有血清的方法获得的细胞具有等同的细胞生长速度，衰老，细胞形态学，病毒或蛋白生产。

发明内容

业已发现使用基本上不含一级动物来源的外源成分并且包括至少一种非动物二级来源的外源生长因子的细胞培养基，可以有利地取代常规培养基和无血清培养基，已知这些培养基含有来自外源一级和/或二级动物来源的成分。

业已发现，细胞培养方法涉及使用所述培养基，并且还包括对动物，如哺乳动物，或优选人类细胞，优选贴壁依赖性细胞传代一次或多次，传代是在存在不是来自动物来源的蛋白酶代用品的条件下进行的，并且还能够以与用传统方法获得的水平相当的水平完成，传统方法是使用补充了合适血清的细胞类型的基础培养基进行的。

因此，第一方面，本发明涉及基本上不含，优选缺少一级动物来源的外源成分的细胞培养基，其中包含至少一种，优选一种以上选自下组的非动物二级来源的外源生长因子：EGF，FGF，三-碘-L tyronine 和氢化可的松以及非动物二级来源的 IGF-1 和/或胰岛素中的至少一种。所述培养基适合培养动物，如哺乳动物，或优选人类贴壁依赖性细胞，优选二倍体细胞，例如，与补充了合适血清的细胞类型的基础培养基具有等同的性能。

本发明的培养基任选还包括非动物来源的蛋白质水解产物。优选存在所述蛋白质水解产物。蛋白质水解产物优选是小麦水解产物。

另外，本发明涉及将所述培养基用于培养动物，如哺乳动物，或优选人类贴壁依赖性细胞，优选贴壁依赖性二倍体细胞，所述细胞具有与补充了合适血清的细胞类型的基础培养基获得的细胞等同的性能。

我们业已出乎意料地确定了本发明的培养基特别适合培养动物，如哺乳动物，或优选人类贴壁依赖性细胞，特别是贴壁依赖性二倍体细胞，例如，与用补充了动物来源的成分如血清的细胞类型的基础培养基获得的性能相当的性能（例如，细胞生长速度，衰老，细胞形态学，病毒或蛋白生产）。

因此，本发明特别涉及在本发明的细胞培养基中生产动物，如哺乳动物，或优选人类贴壁依赖性细胞，优选二倍体细胞的方法，所述方法包括:

a）将所述细胞接种在上文所述的培养基中，并且让所述细胞附着在基质上;

b）收获来自步骤 a）的条件培养基，并且从它的基质上分离细胞层，并且用非动物来源的蛋白酶解离细胞，以便形成细胞悬浮液;

c）将步骤 b）的细胞悬浮液接种到装在包括附着支持物的培养装置中的所述培养基中，使得细胞可以附着; 和

d）在所述培养基中生长所述细胞。

可以重复 b）- d）若干次。

所述方法还可任选地包括冷冻从步骤 b）中收获的细胞的步骤，以便产生细胞库。

业已发现，在不含外源的动物来源的成分的培养基中培养细胞之前，所述用于生产细胞的方法不需要任何适应步骤，并且，所述细胞的衰老不受该适应步骤缺乏的影响。

因此，本发明的另一方面是提供细胞系，具体地讲，提供动物，如哺乳动物，或优选人类二倍体贴壁依赖性细胞系，它适合在本发明的培养基中生长，并且具体地讲，提供细胞系，特别是提供动物，如哺乳动物，或优选人类二倍体贴壁依赖性细胞系，它适合生产生物学活性产物，优选病毒，特别是用作疫苗的活病毒。

本发明还涉及在适合病毒生产的细胞培养基中，在动物，如哺乳动物或优选人类贴壁依赖性细胞中生产病毒的方法，所述培养基缺少

一级动物来源的成分，并且包括至少一种非动物二级来源的外源生长因子，并且任选包括一种非动物来源的蛋白质水解产物，所述方法包括以下步骤：

a）用所述病毒感染所述细胞

b）繁殖所述病毒，和

c）收获所述病毒。

所述方法可以包括对收获的病毒进行一个或多个纯化步骤。所述病毒能够与可以药用的载体，赋形剂和/或佐剂适当地配制成疫苗。

详细说明

在特别优选的实施方案中， 本发明的细胞培养基是基本上不含，优选完全缺乏一级动物来源的外源成分的，优选它不含一级和二级动物来源的外源动物来源的成分。所述培养基适当地适合培养动物，如哺乳动物，或优选人贴壁依赖性细胞，特别是贴壁依赖性二倍体细胞，例如，其性能，例如，细胞生长速度，细胞形态学，衰老或病毒生产，与用补充了合适血清的细胞类型的基础培养基获得的细胞的性能相当。例如，用于动物，如哺乳动物或优选人类细胞的基础培养基可以从 ATCC 目录中查阅到，并且，在表 1 中另外提供了用于特定细胞类型的基础培养基的例子。用于比较目的的血清通常是牛血清，特别是胎牛血清。因此，最好在与表 1 所示基础培养基进行比较时评估等同性，并且该基础培养基含有牛血清，通常其浓度为 10% v/v。

表 1

细胞类型	基础培养基*	血清
MRC-5（ATCC CCL-171）	极限必需培养基（MEM-Eagle）或 M199	胎牛血清，10%
AGMK	极限必需培养基（MEM-Eagle）或 M199	胎牛血清，10%
VERO（ATCC CCL-81）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，10%
MDCK（ATCC CCL-34）	ATCC 培养基 Ham's F12K	胎牛血清，10%
CHO（ATCC CCL-61）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，10%
WI-38（ATCC CCL-75）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，10%
DBS-FRhL-2（ATCC CCL-160）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，10%
MRC-9（ATCC CCL-212）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，10%
IMR-90（雌性，ATCC CCL-186）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，10%
IMR-91（雄性，National Insitute of Aging-NIA）	极限必需培养基（MEM-Eagle）	胎牛血清，15%

*按照 ATCC 或 NIA 的说明，补充了氨基酸和维生素的基础培养基

"细胞生长速度"表示细胞从细胞库中解冻和它们的衰老之间的细胞生长的平均速度。它是用群体加倍（PD）/天表示的，并且是通过计算在细胞解冻和它们的衰老之间群体加倍的次数与细胞解冻和它们的衰老之间的持续时间（用天表示）的比例获得的。本发明的等同的细胞生长速度，表示细胞生长速度为用在补充了合适血清的细胞类型的基础培养基（通常补充了浓度为 10%的牛血清（用作对照））获得

的生长速度的至少 80%，优选 90%，更优选至少 95%或更高。最优选的是细胞生长速度高于用在含有血清的培养基中培养的细胞获得的速度。

"细胞形态学"表示通过光学显微术评估的细胞的形态学。形态学方面的等同的性能表示所述细胞保留了在存在牛血清的条件下培养时所出现的形态学。作为例子，MRC-5 细胞在本发明的培养基中培养之后，保留了它们的成纤维细胞性质。

"衰老"表示在均匀的，固定次数的群体加倍（群体加倍水平，PDL）之后出现的细胞复制能力的丧失，通常被称作海弗利克极限（Harry Rubin，Nature Biotechnology，2002，20，675-681）。本发明的等同的衰老表示衰老至少为在补充了合适血清，通常是浓度为 10% 的牛血清（用作对照）的细胞类型的基础培养基中培养的细胞获得的衰老的至少 70%，优选 90%，更优选至少 95%或更高。最优选的衰老是以高于用在含有血清的培养基中培养的细胞获得的 PDL 发生的。通常，对于 MRC-5 细胞来说，优选的是，对于在存在上文所述的血清的条件下培养的细胞来说，获得了大约 PDL60 和大约 PDL75 之间的衰老。

"贴壁依赖性动物细胞"或"贴壁依赖性人细胞"表示在来自动物或人组织的细胞系或细胞中建立的细胞，它需要固体支持物，以便生长并且正常地扩增。所述固体支持物基本上是生长表面，如塑料或玻璃表面。合适的固体支持物的例子有：陪替氏培养皿，组织培养烧瓶，细胞工厂，滚瓶或微载体。对于本发明的目的来说，所述表面是没有用动物来源的任何蛋白或用来自所述蛋白的肽包被过的。所述细胞附着并且通过附着扩散，即通过分泌它们的自分泌附着因子。优选的贴壁依赖性细胞是二倍体细胞。二倍体贴壁依赖性细胞的非限定性例子可以从 ATCC 目录（WI 38：CCL-75，MRC-5：CCL-171，IMR-90：CCL-186，DBS-FRhL-2：CCL- 160，MRC-9：CCL-212）或 NIA 目录（TIG-1 和 TIG-7，为了 NIA Aging Cell Repository 开发的，TIG-1 保存编号 AG06173 ；IMR-91：191 L）中查阅到。优选的细胞是 MRC-5，WI-38，FRhL-2，MRC-9，最优选的细胞系是 MRC-5。

"基本上不含...的培养基"用于表示培养基，它包括新鲜培养基和条件培养基，它缺少血清以及任何一级动物来源的外源成分（例如

BSA）。所述新鲜培养基或条件培养基可以含有二级动物来源的微量的外源成分。"不含动物来源的成分的培养基"表示缺少血清和一级动物来源的（例如 BSA）和二级动物来源的任何外源成分的培养基。一级动物来源的外源成分包括，例如，来自牛（包括小牛），人（如人血清白蛋白- HSA）或猪来源的成分。二级动物来源的成分被定义为这样的成分，这些成分是在它们的生产步骤之一中与动物来源的产物接触的成分。具体地讲，常用的来自二级动物来源的成分是重组生长因子，如胰岛素，EGF 和 FGF 和 IGF-I。这些可以在大肠杆菌中生产的重组生长因子与用于发酵饲养和/或酶促裂解的牛或猪的成分接触。微量的来自二级动物来源的成分的范围为低于 1%，优选低于 0.5%，更优选低于 0.01%，最优选低于 0.001%，最优选不存在（0%）。基础无血清培养基和无动物来源的成分的培养基可以通过商业渠道获得或可以通过混合每一种成分制备。它们是用非动物来源的生长因子适当补充过的。根据本发明，优选使用这样的培养基，它完全不含动物来源的外源成分。尽管完全不含动物来源的外源成分的培养基是优选的实施方案，上述所有成分都可以被二级动物来源的成分（如上文所述的生长因子，小麦蛋白胨，氨基酸，蛋白酶等）所取代，而又不会对所述方法的性能产生任何影响。

"动物来源"或"动物来源的"表示哺乳动物，例如人，以及非哺乳动物，如昆虫，鱼，禽类，两栖类和爬行类。

术语"外源的"用于表示非动物来源的成分，与细胞分泌的"内源"成分不同，它是被添加到所述培养基中的。因此，比较而言，术语"内源的"表示由细胞合成并且分泌（自分泌）的成分，它导致了细胞在合适基质上的附着，扩散和生长（粘连蛋白，胶原，蛋白聚糖，生长因子...）（M. R. Koller & E. T. Papoutsakis，Bioprocess Technol.，1995，60，61-110）。

所述细胞培养基优选缺少一级动物来源的外源成分，并且包括至少一种非动物二级来源的外源生长因子，优选至少两种，更优选至少三种或三种以上生长因子。细胞培养基适当地包括选自下组的至少一种非动物二级来源的外源生长因子：EGF，FGF，三-碘-L tyronine 和氢化可的松和非动物二级来源的 IGF-1 和/或胰岛素中的至少一种。所述培养基适当地包括 EGF，FGF，三-碘-L tyronine 和非动物二级

来源的氢化可的松和非动物二级来源的 IGF-1 和/或胰岛素中的至少一种的组合。术语"生长因子"表示蛋白，肽，或多肽，或多肽的复合物，包括细胞因子，它们是细胞生长所必需的，可以在培养过程中由细胞产生，并且可以影响它自身和/或多种其他相邻的或远处的细胞，例如，促进细胞附着和生长。某些，而不是全部生长因子是激素。示例的生长因子是胰岛素，胰岛素样生长因子（IGF），包括 IGF-1，表皮生长因子（EGF），成纤维细胞生长因子（FGF），包括碱性 FGF（bFGF），粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF），粒细胞集落刺激因子（G-CSF），转化生长因子 α（TGF α），血小板衍生的生长因子（PDGFs），神经生长因子（NGF），角质细胞生长因子（KGF），VEGF，转化生长因子 β（TGF β），白介素-8（IL-8），白介素 6（IL-6），三-碘-L tyronine 和氢化可的松。优选的生长因子包括，例如 EGF，FGF（优选 bFGF），IGF-1 或胰岛素，三-碘-L tyronine 和氢化可的松，并且可以单独使用或者优选组合使用。优选的培养基包括非动物来源的 EGF，FGFb，IGF-1 或胰岛素，三-碘-L tyronine 和氢化可的松。更优选的是本发明的细胞培养基的所有成分，如在表 3 中所列举的成分都是非动物一级和二级来源的。

在更优选的实施方案中，所述培养基还包括非动物来源的蛋白质水解产物，优选植物或酵母来源的蛋白质水解产物。"蛋白质水解产物"或"蛋白胨"表示正如本领域技术人员所公知的，蛋白质水解产物的纯化制剂或它的粗制级份，因此它是不含蛋白的。术语不含蛋白意在表示不含任何有功能活性的蛋白，不过，不排除非功能性肽，因为这些肽可能精确地由蛋白质水解产物产生。特别合适的水解产物级份包括小麦蛋白胨蛋白质水解产物，例如由分子量最高为 10 000 道尔顿的肽组成的酶促消化物，所述肽的 80%的大部分为 300 - 1000 道尔顿。在使用时，蛋白质水解产物在培养基中的浓度为 0-10 g/L，在使用时优选为 1-5 g/L，特别优选 2.5 g/L。具体地讲，所述蛋白质水解产物来自植物（例如，水稻，玉米，小麦，大豆，豌豆，棉花，马铃薯）或酵母。本发明优选的植物蛋白质水解产物是小麦蛋白胨蛋白质水解产物。

或者，本发明的细胞培养基表示"新鲜培养基"，"条件培养基"，或这两种培养基的混合物。"新鲜培养基"表示通过商业渠道获得的或

用各种成分制备的任何细胞培养基，业已将它用于培养任何细胞。根据本发明的优选方面，新鲜培养基表示通过商业渠道获得的培养基或用上述各种成分制备的培养基。就是说，根据本发明，它缺少一级来源的动物成分并且业已补充了上文所述的至少一种非动物二级来源的外源生长因子，并且任选地，但是优选地补充了非动物来源的蛋白质水解产物，如小麦蛋白质水解产物。

"条件培养基"用于表示业已被一种细胞培养物利用的培养基，并且被另一种培养物再利用。该条件培养基包括第一种培养物对内源生长刺激物质，内源附着因子和特殊内源营养物的释放。

因此，本发明的另一方面提供了一种生产条件培养基的方法，包括将本发明的新鲜培养基与动物或优选人类贴壁依赖性细胞组合，以便制备条件培养基。

除非另有说明，新鲜培养基，条件培养基，以及这两者的混合物被称作"培养基"。

表 2 表示添加到新鲜培养基中的生长因子和蛋白质水解产物的浓度范围和优选浓度。因此，添加到本发明的合适培养基中的生长因子的浓度由下面的表 2 所限定。

表 2

生长因子	优选浓度 (mg/升)	浓度范围 (mg/升)
EGF	0.005	0.00001- 0.3
FGFb	0.003	0.00001- 0.1
T3 (三碘 L-tyronine)	0.066	0 -1
氢化可的松	1	0-10
IGF-1 或胰岛素	0.1 5	0.00001-5 0.1-1000
小麦蛋白胨水解物	2500	0-10000

可以理解的是，根据培养的细胞类型和要获得的性能，本发明的新鲜培养基可任选地进一步补充常见于培养基中的并且是非动物来源

的成分。例如，合适的成分有氨基酸（包括非必需氨基酸），维生素，核苷酸/核苷，脂肪酸，抗生素和氧化稳定剂，它们都是非动物来源的。

合适的新鲜培养基是无动物标准培养基，如基于 DMEM 的培养基（高葡萄糖 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基），MEM（极限必需培养基 Eagle），培养基 199，RPM-I 1640，所有这些培养基都可以从以下等公司获得：Life-technologies-Gibco-BRL，BioWittaker，Sigma-Aldrich，并且用生长因子进一步适当地补充，并且任选用上述非动物来源的蛋白质水解产物补充。技术人员可以理解的是，起始培养基需要根据所培养的细胞类型选择。优选的商业渠道获得的新鲜培养基是 Ultra-MEM，可以从 BioWhittaker（目录号 12-745F）获得。另外，根据要培养的细胞类型，所述新鲜培养基是用每一种成分制备的无动物培养基，并且包括（并且穷举）糖类来源，无机盐成分，微量元素，氨基酸（包括非必需氨基酸），维生素，核苷酸/核苷，脂肪酸，抗生素，氧化稳定剂和水，适当地补充了非动物来源的外源生长因子，并且任选地，但是优选补充了上文所述的非动物来源的蛋白质水解产物。所述培养物的基本组成的例子在实施例 I 和表 3 中提供。

所述培养基适合培养动物，如哺乳动物或优选人类细胞，具体地讲，贴壁依赖性动物细胞。如哺乳动物细胞或优选人类细胞，优选贴壁依赖性二倍体细胞，它构成了本发明的另一方面。

在本发明的优选方面，还提供了用于在本发明的培养基中生产动物或优选人类贴壁依赖性细胞，优选二倍体细胞的方法，所述方法包括：

a）将细胞接种在所述培养基中，并且让所述细胞附着在基质上；

b）收获来自步骤 a）的条件培养基，并且从该基质上分离所述细胞层，并且用非动物来源的蛋白酶解离细胞，以便形成细胞悬浮液；

c）将步骤 b）的细胞悬浮液接种到装在包括附着支持物的装置中的培养基中，使得允许细胞结合；

d）在相同的培养基中生长所述细胞；

e）任选重复步骤 b）-d）。

所述方法可任选包括冷冻从步骤 b）中收获的细胞的步骤，以便产生细胞库。

用于步骤 b）的蛋白酶在处理之后任选被灭活。

根据细胞类型，以及要获得的所述细胞培养方法的性能，技术人员可以理解的是，所使用的培养基，特别是在步骤 a）和 c）中所使用的培养基还可以是新鲜培养基，或来自前面的培养物的条件培养基或新鲜培养基和条件培养基的混合物。在所述混合物中，新鲜培养基和条件培养基的比例为 1:0（100% 新鲜培养基）-0:1（100% 条件培养基）。所述条件培养基优选占培养基总体积的 0-大约 75%。新鲜培养基和条件培养基的优选比例为 1:1（50%新鲜培养基/50%条件培养基），更优选的比例为大约 7:1（87.5%新鲜培养基/12.5%条件培养基）- 1:7，更优选的比例为大约 3:1（75%新鲜培养基/25%条件培养基）- 1:3，最优选的比例为 3:1（75%新鲜培养基/25%条件培养基）。所述优选比例优选在整个培养过程中在每次更换培养基时保持。

所述蛋白酶是非动物来源的，就是说所述蛋白酶不是从动物来源中纯化的。所述蛋白酶可以来自重组来源，不过，优选来自细菌，酵母，或植物来源，合适的是来自非动物二级来源。来自重组来源的蛋白酶意在表示通过 DNA 重组技术生产的任何蛋白酶，并且涉及将微生物，例如细菌，病毒，酵母，植物等用于其生产。优选的蛋白酶包括：半胱氨酸内肽酶；中性真菌蛋白酶（来自 A. oryzae）；中性细菌蛋白酶（来自枯草芽孢杆菌）（参见 Brocklehurst，K. 等，Cysteine proteinases. In New Comprehensive Biochemistry Vol. 16，Hydrolytic Enzymes; Neuberger, A. & Brocklehurst ; K. , eds, pp. 39-158(1987) Elsevier，Amsterdam）；丝氨酸蛋白酶，如胰蛋白酶样蛋白酶（如 r 蛋白酶，购自 Invitrogen，3175 Staley Road，Grand Island，NY 14072. 供应商目录号 02-106）或重组胰蛋白酶（如 Trypzean，在玉米中生产的重组胰蛋白酶，Prodigen，101 Gateway Blvd，Suite 100 College Station，Texas 77845. 生产商代码：TRY）。来自胰蛋白酶样蛋白酶家族的蛋白酶通常出现在原核生物，动物和病毒中，令人吃惊的是，迄今为止没有在植物中发现。这些酶参与了多种生理学过程，其中最熟知的是消化，受精，血液凝固级联反应和发育过程。它们被认为偏离了共同的祖先蛋白。在文献中业已对这些酶进行了充分的披露（A. J. Greer，"Comparative modelling methods-application to the family of mammalian serine protease"Proteins，Vol. 7，p 317-334，1990）并且可以根据它们的结构划分成不同的家族（A. Sali & T. Blundell，

"definition of general topological equivalence in protein structures"J. Mol. Biol., 212, p 403-428, 1990）。合适的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶，如重组胰蛋白酶 或胰蛋白酶样蛋白酶。优选的蛋白酶是中性真菌蛋白酶或中性细菌蛋白酶。本发明的更优选的蛋白酶是半胱氨酸内肽酶。特别优选的半胱氨酸蛋白酶来自植物来源。来自植物的优选的半胱氨酸内肽酶选自下组：无花果蛋白酶（无花果乳胶的主要蛋白水解成分）（Liener, I.E. & Friedenson, B. Methods Enzymol, 1970, 19, 261-273），茎菠萝蛋白酶（从菠萝植物的茎中提取的），猕猴桃碱（从猕猴桃果实或猕猴桃中提取）和木瓜蛋白酶（从木瓜的乳胶中提取的）。在所述半胱氨酸蛋白酶中，无花果蛋白酶是特别优选的。

所述蛋白酶能够以任何合适的浓度使用，以便确保在合理的分离时间内进行有效的细胞解离（单一化的细胞）。

通过阅读实施例 II 所示的步骤能够更好地理解生产二倍体贴壁依赖性细胞的过程。简单地讲，所述细胞层来自解冻并且接种用于细胞培养的细胞或来自本发明的培养基中的以前的继代培养物。然后，在用于细胞分离的第一个步骤中，取出贴壁依赖性细胞培养物的培养基，并且保持以便用作接种步骤的条件培养基。所述细胞层优选是洗涤过的，是分离的，并且通过使用蛋白酶溶液和摇晃烧瓶解离成单个细胞。当细胞分离并且单一化时，收集细胞悬浮液，并且可用于细胞接种或细胞存库。当蛋白酶的活性对所述细胞系的培养物有毒时，任选用合适的蛋白酶抑制剂对它进行抑制。在用于细胞接种的第二个步骤中，以用于产生的细胞系的常见细胞密度将细胞接种在新的烧瓶中。然后，将培养基，优选新鲜培养基和条件培养基的混合物添加到新的烧瓶中。在用于细胞生长的第三个步骤中，在与用于细胞系生产的常用方法中的相同的温度和相同的气氛中培养新的细胞培养物。在步骤 1（细胞分离）之后可以将任选的第四个步骤用于细胞存库并且取代步骤 2（细胞接种）和 3（细胞生长）。该步骤是通过在不含动物来源的成分的，补充了常用于细胞系冷冻的常用无动物来源的防冻剂（通常是 DMSO 和甲基纤维素）的培养基中冷冻细胞进行的。

通常，细胞必须适应在不含外源动物来源的成分的培养基中生长，采用包括具有逐渐降低的所述成分的浓度的若干种培养物的预定策略，然后将它们的培养物放在完全不含外源动物来源的成分的培养基

中（Chandler JP.，Am Biotechnol Lab 1990，8，18-28）。该适应步骤是确保正常细胞生长和典型的细胞形态学所必须的。

业已发现，用于生产本发明的细胞的方法在不含外源动物来源的成分的培养基中培养细胞之前不需要任何适应步骤，并且所述细胞的衰老不受该适应步骤的缺乏的影响。这是本发明的另外一个优点。实际上，通常的细胞生长和典型的细胞形态学保持了达到群体加倍水平（PDL）所需要的多个世代（群体加倍），相当于观察到所述细胞衰老时的 PDL 的 2/3。通常的细胞生长和典型的细胞形态学优选需要保持多个世代（群体加倍），以便达到观察到所述细胞衰老时的群体加倍水平（PDL）。观察到所述细胞衰老时的 PDL 相当于在含有动物来源的成分的通常的过程中所观察到的 PDL。例如，对于来自主细胞库（PDL 13）并且在本发明的培养基中培养的 MRC-5 细胞来说，在观察到细胞衰老之后，通常的细胞生长和典型的细胞形态学保持了超过 50 代（群体加倍）。

因此本发明还提供了适合在本发明的培养基中生长的细胞系，优选动物，如哺乳动物，更优选人二倍体贴壁依赖性细胞系。"适应的"表示典型的细胞生长和细胞形态学保持了多个世代，类似于用含有动物来源的成分的典型培养基观察到的那些，或者衰老的出现并不比使用传统培养基时出现的明显更快。另外，本发明还提供了适合在本发明的培养基中生产生物学活性产物，优选病毒的细胞系，优选动物，如哺乳动物，更优选人二倍体贴壁依赖性细胞系。

因此，在另一种实施方案中，本发明相应地还提供了在本发明的培养基中生产动物，如哺乳动物或优选人二倍体贴壁依赖性细胞培养物中生产重组蛋白或病毒的方法，所述方法包括用上述蛋白酶使所述细胞培养物传代。具体地讲，以低密度将贴壁依赖性细胞，通常是二倍体细胞接种在基本上不含动物来源的外源成分的营养培养基中，并且在它们业已扩增以便形成汇合层或多层之后，使它们分离，以便形成悬浮液，并且再次以低密度接种。用于分离和传代所述细胞的蛋白酶优选是非动物来源的，或来自重组来源，选自下组：半胱氨酸内肽酶，中性真菌蛋白酶，中性细菌蛋白酶或胰蛋白酶样蛋白酶。合适的蛋白酶是胰蛋白酶样蛋白酶，如 Trypzean 或重组胰蛋白酶，如 r 蛋白酶或半胱氨酸内肽酶，更优选无花果蛋白酶，茎菠萝蛋白酶和猕猴

桃碱。在所述半胱氨酸蛋白酶，无花果蛋白酶是特别优选的。

在优选实施方案中，本发明涉及在本发明的细胞培养基中，在动物如哺乳动物或优选人类贴壁依赖性细胞，优选二倍体细胞中生产病毒的方法：

a）用所述病毒感染所述细胞

b）繁殖所述病毒，和

c）收获所述病毒。

任选对收获的病毒进行一个或多个纯化步骤，本发明的另一方面是提供按本发明的描述所生产的病毒并且配制成免疫原性组合物，如疫苗，与可以药用的载体，赋形剂和/或佐剂混合。

根据细胞类型，以及要获得的病毒生产方法的性能，技术人员可以理解的是，用于在步骤 a）中接种细胞的培养基还可以是新鲜培养基或来自前面的培养物的条件培养基或新鲜培养基和条件培养基的混合物。优选的是，为了优化病毒生产，新鲜培养基和条件培养基的比例为 1:0（100% 新鲜培养基）- 0:1（100% 条件培养基）。所述条件培养基优选占培养基总体积的 0-大约 75 %。新鲜培养基和条件培养基的优选比例为 1:1（50%新鲜培养基/50%条件培养基），更优选大约 7:1(87.5%新鲜培养基/12.5%条件培养基)，最优选大约 3:1(75%新鲜培养基/25%条件培养基)。新鲜培养基和条件培养基的比例为 1:0（100% 新鲜培养基）是特别优选的。用于感染细胞和繁殖病毒的培养基可以与生长培养基相同，更优选它包括 25% w/v EGF，25% w/v bFGF 和 25% w/v T3，并且任选还补充了 20% w/v 蛋白质水解产物，优选小麦蛋白胨 E1（Organotechnie SA，France）。最优选的是，所述培养基不含任何蛋白质水解产物。

通过阅读在实施例 III 中所披露的步骤可以更好地理解病毒生产方法。

简单地讲，在用于病毒感染的第一个步骤中，按照所述方法在本发明的培养基中培养的贴壁依赖性细胞用合适的病毒感染，感染复数与用于病毒生产的常规方法的感染复数相同。在用于病毒繁殖的第二个步骤中，在与常用于病毒生产的方法中的相同的温度和相同的气氛下培养受感染的细胞。在第三个步骤中，在经历与常用于病毒生产的相同的繁殖时间之后收获病毒。所述病毒收获方法是按照常用于病毒

收获的方法进行的。有关用于病毒生产的一般培养条件参见甲型肝炎病毒培养方法（WO 95/24468），甲型肝炎病毒疫苗（WO 94/06446；A. Hagen J.，2000，Bioprocess Engineering 23，439-449）。

可以使用本发明的培养基和方法生产的病毒和人病毒疫苗的例子包括活的，减毒的，灭活的，重组修饰的病毒。具体地讲，用作疫苗的可以在贴壁依赖性细胞上繁殖的减毒病毒包括，但不局限于：腺病毒科（即腺病毒 1-49），疱疹病毒科（即 疱疹病毒 HSV，巨细胞病毒 CMV，水痘带状疱疹病毒 VZV，EB 病毒 EBV），黄病毒科（即登革热病毒，丙型肝炎病毒，日本脑炎病毒，黄热病病毒），痘病毒科（即牛痘病毒，猴痘病毒，痘苗病毒，天花病毒），小核糖核酸病毒科（即艾柯病毒，科萨奇病毒，甲型肝炎病毒，脊髓灰质炎病毒，鼻病毒），呼肠孤病毒科（即轮状病毒，科罗拉多蜱热病毒），披膜病毒科（即 东方马脑炎病毒，风疹病毒），肝 DNA 病毒科（即 乙型肝炎病毒），逆转录病毒科（即免疫缺陷病毒 HIV/SIV），副粘病毒科（即麻疹病毒，腮腺炎病毒，副流感病毒，呼吸道合胞病毒 RSV），棒状病毒科（即 狂犬病病毒，水泡性口炎病毒），正粘病毒科（即流感病毒），未分类的病毒（即戊型肝炎病毒，δ肝炎病毒），星状病毒科（即星状病毒），冠状病毒科（即冠状病毒），沙粒病毒科（即 Junin virus），Bunyaviridae（立夫特山谷热病毒）。在另一种实施方案中，用本发明的方法进行的病毒疫苗的生产包括生产在粘附细胞中表达的重组蛋白。优选的贴壁依赖性细胞包括，例如 AGMK，VERO，MDCK（犬上皮肾脏细胞），CEF（鸡，胚胎成纤维细胞）和 CHO（中国仓鼠卵巢）细胞，更优选的细胞是贴壁依赖性二倍体细胞，例如 MRC-5，WI-38，TIG-1，TIG-7，FRhL-2，MRC-9，IMR-90 和 IMR 91。MRC-5 是特别优选的细胞系。业已证实本发明的方法能成功地生产甲型肝炎病毒，腮腺炎病毒和 VZV。

根据本发明的优选方面，用下列任何病毒感染的细胞是优选的：肝炎，特别是 HAV，脊髓灰质炎病毒，HSV，特别是 HSV-1 和 HSV-2，CMV，EBV，风疹病毒，副粘病毒科（即 麻疹病毒，腮腺炎病毒，副流感病毒，呼吸道合胞病毒 RSV），VZV。

一般来说，启动主细胞库需要 15 代，并且为了生产工作细胞库需要 10 代。为了以 400 L 的规模进行平均批量培养需要至少大约 15 代。

从贴壁依赖性细胞系开始，并且使用本发明的培养基，可以按照相同的方案用大约 15 代制备主细胞库（MCB），并且用大约 10 代制备工作细胞库（WCB），因此，在不含外源动物来源的成分的培养基开发的条件下，用大约 15 代制备培养物。

本发明还涉及将上文所披露的培养基用于培养细胞，优选二倍体贴壁依赖性细胞，更优选真核细胞，最优选动物，如哺乳动物，或优选人类细胞的用途。本发明的另一个目的是提供细胞培养物，它包括本发明的培养基和细胞，优选二倍体贴壁依赖性细胞，更优选真核细胞，最优选动物，如哺乳动物或优选人类细胞。

本发明还涉及可以通过本文所限定的方法获得的病毒群体。它还涉及一种生产病毒疫苗的方法，包括将所述病毒群体与可以药用的载体，赋形剂或佐剂混合。

附图说明

图 1.在使用用于细胞分离的无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶和使用实施例 1.1 确定的培养基进行 MRC-5 细胞衰老试验期间的细胞密度。

图 2.在将无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶用于细胞分离和使用实施例 1.1 确定的培养基进行 MRC-5 细胞衰老试验期间的细胞存活力。

图 3.在将无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶用于细胞分离和使用实施例 1.1 确定的培养基进行 MRC-5 细胞衰老试验期间的细胞生长。

图 4. 在 MRC-5 细胞衰老试验期间使用实施例 I.1（单一成分）和实施例 I.2（补充过的超-MEM 培养基）确定的培养基获得的细胞密度的比较。

图 5.在 MRC-5 细胞衰老试验期间使用实施例 I.1（单一成分）和实施例 I.2（补充过的超-MEM 培养基）确定的培养基获得的细胞存活力。

图 6.在 MRC-5 细胞衰老试验期间使用实施例 I.1（单一成分）和实施例 I.2（补充过的超-MEM 培养基）确定的培养基获得的细胞生长。

图 7.通过将无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶用于细胞分离在 MRC-5 细胞上生产 HAV。

图 8.通过将无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶用于细胞分离而扩增的

MRC-5 细胞的细胞存库期间的细胞密度。

图 9.通过将无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库期间的细胞存活力。

图 10.通过将无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库期间的细胞生长。

图 11.通过将 Trypzean（Prodigen）或 r 蛋白酶（Invitrogen）用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库期间的细胞密度。

图 12.通过将 Trypzean（Prodigen）或 r 蛋白酶（Invitrogen）用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库期间的细胞存活力。

图 13. 将 Trypzean（Prodigen）或 r 蛋白酶（Invitrogen）用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库期间的细胞生长。

将通过以下非限定性实施例对本发明进行进一步的说明。

实施例 I

I.1. 用各成分制备新鲜培养基

典型的优选新鲜培养基包括表 3 中所列举的常用成分的全部或大部分。根据本发明，可以用表 2 所列举的生长因子和蛋白质水解产物适当补充该培养基。

表 3-不含动物来源的成分的培养基

	浓度范围	优选浓度范围	优选浓度
成分	mg/L	mg/L	mg/L
NaH2PO4.H2O	60-280	80-150	99
Na2HPO4	20-400	25-50	35
NaCl	5000-8000	6000-7000	6760
KCl	180-600	250-400	349
AgNO3	0.000005-0.00004	0.000010-0.000060	0.000017
AlCl3.6H2O	0.000001-0.001	0.00008-0.000080	0.000012
Ba(C2H3O2)2	0.000001-0.002	0.00002-0.00003	0.0000255
CaCl2	100-760	150-250	155
CdCl2.2½H2O	0.000001-0.03	0.000009-0.00003	0.0000187
CoCl2.6H2O	0.000001-0.003	0.000001-0.00003	0.0000238
Cr2(SO4)3.XH2O (± 15 H2O)	0.000003-0.0004	0.0000005-0.000008	0.0000066
CuSO4.5H2O	0.00001-0.006	0.00009-0.0008	0.000637
Fe(NO3)3.9H2O	0.005-1	0.1-0.5	0.3773
FeSO4.7H2O	0.02-2	0.1-0.4	0.20433
GeO2	0.000001-0.0008	0.00001-0.0001	0.000053
H2SeO3	0.0001-0.02	0.0009-0.004	0.0016
Na2SeO3	*0.001-0.02*	*0.009-0.015*	*0.01*
KBr	0.0000001-0.0003	0.0000009-0.000003	0.0000012
KI	0.0000001-0.00009	0.000001-0.000004	0.0000017
MgCl2	5-150	10-50	14
MgSO4	20-150	50-100	72
MnSO4.H2O	0.000001-0.005	0.00001-0.00009	0.0000596
NaF	0.00001-005	0.000009-0.00009	0.000042
Na2SiO3.9H2O	0.001-0.2	0.01-0.1	0.07
NaVO3	0.00001-0.2	0.0001-0.0009	0.0003
(NH4)6Mo7O24.4H2O	0.00001-0.002	0.00009-0.0009	0.00062
NiSO4.6H2O	0.000001-0.0002	0.000009-0.00009	0.000065
RbCl	0.000001-0.0008	0.000009-0.00009	0.0000121

SnCl2.2H2O	0.00001-0.0009	0.000009-0.00009	0.0000552
ZnSO4.7H2O	0.01-0.6	0.09-0.4	0.2107
ZrOCl2.8H2O	0.00001-0.005	0.000009-0.00005	0.0000322
L－丙氨酸	5-50	10-25	14.43
L－精氨酸.HCl	60-500	100-150	106.5
L－天冬酰胺.H2O	2-180	2-50	3.675
L－天冬氨酸	5-90	10-50	17.96
L－半胱氨酸HCl.H2O	0.1-30	1-20	8.6583
L－半胱氨酸.2HCl	25-130	25-50	28.0721
L－谷氨酸	6-50	20-35	36.4364
甘氨酸	7-60	15-50	33.6924
L－组氨酸.HCl.H2O	15-70	20-50	26.2052
L－异亮氨酸	10-200	20-100	46.2413
L－亮氨酸	30-200	50-100	58.31
L－赖氨酸.HCl	30-240	50-100	79.07
L－甲硫氨酸	2-60	10-25	15.7976
L－苯丙氨酸	2-45	10-45	29.6352
L－脯氨酸	2-45	10-45	28.0623
L－丝氨酸	2-50	10-40	25.1174
L－苏氨酸	20-150	20-100	40.9444
L－色氨酸	3-25	5-15	9.3198
L－酪氨酸.2Na.2H2O	5-150	10-100	55.7718
L－缬氨酸	5-150	20-100	38.05
D－泛酸钙	0.01-3	0.9-2	1.1025
叶酸	0.01-20	0.9-5	1.3083
吡哆醛.HCl	0.001-4	0.001-0.02	0.01225
乙酸维生素A（视黄醇）	0.01-0.1	0.01-0.09	0.0686
维生素B（烟酸）	0.001-0.1	0.009-0.09	0.03725
维生素B1（硫胺素）.HCl	0.001-20	0.8-5	1.0682
维生素B2（核黄素）	0.001-5	0.01-0.5	0.1127
维生素B6（吡哆醇）.HCl	0.001-5	0.8-3	1.00695
维生素B12（氰钴胺素）	0.001-5	0.7-1	0.3332
维生素C（抗坏血酸）	0.001-30	0.01-0.09	0.0245
维生素D2（麦角钙化固醇）	0.001-0.1	0.01-0.07	0.049

维生素E（α－生育酚）	0.0001-0.1	0.001-0.009	0.0049
维生素H(D－生物素)	0.0001-0.5	0.001-0.009	0.006615
维生素K3（2－甲基萘醌）	0.0001-0.5	0.001-0.009	0.0049
胸苷	0.01-5	0.09-2	0.1764
腺苷5′三磷酸二钠	0.01-10	0.1-5	0.49
腺苷－5－磷酸	0.001-0.2	0.01-0.1	0.098
2－脱氧核糖	0.01-10	0.1-5	0.245
D－葡萄糖	1000-4000	1500-3000	2364
核糖	0.01-0.9	0.09-0.5	0.245
硫辛酸	0.001-0.7	0.01-1	0.05145
亚油酸	0.001-0.3	0.01-0.1	0.02058
腺嘌呤.H2SO4.H2O	1-10	2-6	4.9
氯化胆碱	0.1-10	2-6	4.6452
乙醇胺HCl	0.1-6	1-4	1.9
乙醇胺	0.0001-0.001 μl/L	0.0001-0.0009	0.0006μl/L
谷胱甘肽	0.001-0.1	0.009-0.08	0.0245
鸟嘌呤.HCl	0.01-0.6	0.09-0.3	0.147
次黄嘌呤	0.01-15	0.09-5	0.17346
次黄嘌呤Na	0.01-6	0.09-5	1.1711
L－肌醇	0.6-20	2-10	6.1495
丙酮酸Na	10-150	60-120	82
烟酰胺	0.1-15	0.9-4	1.00205
对氨基苯甲酸	0.001-0.3	0.01-0.1	0.0245
磷酸乙醇胺	0.1-3	0.9-2	1.2
腐胺.2HCl	0.001-0.09	0.01-0.06	0.03969
乙酸钠	10-50	15-35	24.5
胸腺嘧啶	0.01-0.4	0.05-0.3	0.147
尿嘧啶	0.01-0.4	0.05-0.3	0.147
黄嘌呤Na	0.01-0.5	0.08-0.3	0.16856
谷氨酰胺	50-300	100-300	292.2
NaHCO3	1000-2500	1000-1500	1170
HEPES	1700-7000	3000-6800	6670
果糖铁母液	50 μl/L to 1000 μl/L	80-200 μl/L	166.7 μl/LL

植物或酵母来源的水解产物，优选小麦蛋白胨	0-10000	1000-4000	2500

果糖铁母液	
成分	浓度* mg/L
FeCl3.6H20	2420
D－果糖	160000

*在上面的表 3 中，还将铁复合物（果糖铁）用作铁的来源，作为无机铁的补充。

I. 2. 用适当补充过的商业化培养基制备新鲜培养基

商业化培养基：Ultra-MEM 目录号 12-745F（还原的血清培养基，无蛋白基础培养基，不含 L-谷氨酰胺）可以从 BioWhittaker 获得。

所述基础培养基配方不含动物来源的成分，但是，是按照生产商的说明进行经典设计的，以便补充少量的血清（如低于 10%）和其他添加剂（ITES＝ 胰岛素（动物来源）+ 转铁蛋白（动物来源）+ 乙醇胺 + 硒）。业已在缺少推荐的来自动物来源的补充物（血清 和 ITES）的条件下使用了所述培养基。

业已用以下成分补充了该培养基，都不含来自一级和二级动物来源的成分：

1. IGF-1：0.1 mg/L

2. EGF：0.005 mg/L

3. bFGF：0.003 mg/L

4. 三碘-L-tyronine（T3）：0.066 mg/L

5. 小麦蛋白胨 E1：2.5 g/L

还含有

6. 果糖铁：0.1667 ml/L

7. 丙酮酸钠：0.055 g/L

业已添加了以下成分，以便优化在没有动物来源的成分的条件下进行的培养过程：

-谷氨酰胺：0.2922 g/L

- 葡萄糖：0.33 g/L

-硒（Na2SeO3）：0.01 mg/L

-乙醇胺：0.0006 µl/L

对来自无动物的细胞库（PDL 21）的 MRC-5 细胞进行解冻，并且按照在实施例 II 和 IV 中披露的方法培养，使用上述培养基，和以下继代培养方案：

· D7：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D12：以 1/4 的比例将细胞接种在 100 ml 由 25%的条件培养基组成的生长培养基中

· D16：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D21：重复从 D7 开始的方案

在±三个月的时间（例如 80 天）内，在 175 cm^2 T-烧瓶中培养细胞，直到衰老（± PDL 65）。在该方法中，细胞接种物并不固定于目标细胞密度上。作为对照进行的细胞计数，证实在出现衰老之前观察到的细胞接种物密度为 9000 细胞/cm^2 - 40000 细胞/cm^2。在培养 81 天之后，MRC-5 细胞达到了 PDL66，细胞生长速度为 0.57 PDL/天，此后观察到了衰老。在图 4，5 和 6 中所示出的结果与用在 1.2 部分所述的各成分制备的培养基观察到的结果相当，它在 81 天之后导致了大约 PDL 65 的衰老，并且细胞生长速度为大约 0.56 PDL。

与此同时，将来自该培养物的细胞用于按照在实施例 III 中披露的方法生产 HAV，使用与上文所述相同的培养基，所不同的是，EGF，bFGF 和 T3 浓度降低到在细胞生长培养基中的浓度的 25%，并且，所不同的是，小麦蛋白胨浓度降低到 0.5 g/L。病毒的收获是在培养开始之后 2 个月进行的。

实施例 II

用于在基本上不含任何来自动物来源的成分的培养基中生产动物或人贴壁依赖性细胞的方法。

步骤 1：细胞分离

取出在细胞培养烧瓶中生长的贴壁依赖性细胞培养物的培养基，并且保持在无菌容器中。这种回收的培养基被视为条件培养基，并且被用于接种细胞。用补充了 EDTA 的磷酸缓冲的盐溶液（PBS）洗涤所述细胞层 2 次，每升 PBS 大约 0.04 克-大约 1 克 EDTA，优选大约 0.2 克/L 的目标浓度是理想的。

一旦洗涤了所述细胞层，添加足够体积的蛋白酶溶液，以便覆盖整个细胞层。大约 0.01 ml/cm^2 -2 ml/cm^2，更优选 0.0333 ml/cm^2 的目标体积是理想的。该蛋白酶溶液是通过将所述酶溶解在补充了 EDTA 的 PBS 中制备的。每升 PBS 大约 0.02 克-大约 0.5 克的 EDTA，优选大约 0.1 克的目标是理想的。添加到 PBS/EDTA 中的蛋白酶的量是制备具有足够蛋白质水解活性的溶液，以便获得有效细胞分离所需要的用量。在以下情况下认为细胞分离是有效的：大部分细胞从烧瓶上分离下来，并且细胞聚集物在大约 5 分钟-大约 30 分钟，优选大约 12 分钟的预期目标时间之后解离成单个细胞。在下面列举了可用在贴壁依赖性细胞上的某些蛋白酶的酶活性，例如，但不局限于：

- 对于无花果蛋白酶来说，目标酶活性为大约 5.5 μUPABA/ml -大约 550 μUPABA/ml，优选大约 55 μUPABA/ml 是理想的（一个单位的 PABA 是在 37℃下水解 1 μmole 的 Na-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺/分钟的酶的活性（Methods in Enzymology Vol XIX Proteolytic enzymes p261-284）。

- 对于菠萝蛋白酶来说，目标酶活性为大约 0.001 明胶消化的单位（GDU）/ml -大约 0.1 GDU/ml，优选大约 0.01 GDU/ml 是理想的，（一个单位的 GDU 活性是在分析条件下从确定的明胶底物中释放 1 mg 氨基酸的酶的活性 9-（参考文献同上）。

- 对于来自 A. oryzae 的中性真菌蛋白酶来说，目标酶活性相当于大约 12.5 μg/ml 的蛋白量（1.25 μg/ml –大约 125 μg/ml，优选大约 12.5μg/ml 是理想的（按照生产商的说明，Lyven Zac Normandial，11 avenue du Pays de Caen 14460 Colombelles，France）。

- 对于来自枯草芽孢杆菌的中性细菌蛋白酶来说，目标酶活性相当于大约 150μg /ml（15μg /ml -大约 1.5 mg/ml，优选大约 150 μg/ml）的蛋白量是理想的（按照生产商的说明， Lyven Zac Normandial，11 avenue du Pays de Caen 14460 Colombelles，France）。

- 对于 Trypzean 来说，目标酶活性为大约 100 USP/ml -0.1 USP/ml，优选 1 USP/ml 是理想的（按照生产商 Prodigen 的说明，101 Gateway Blvd，Suite 100 College Station，Texas 77845. 生产商编码：TRY）。

- 对于 r 蛋白酶来说，对母液的大约 3 倍-大约 300 倍，优选 30 倍的目标稀释倍数是理想的（按照生产商 Invitrogen 的说明，3175 Staley Road，Grand Island，NY 14072. 供应商目录号 02-106）。

在观察到细胞分离时，轻柔摇晃烧瓶，并且将细胞悬浮液收集到无菌容器中。为了回收最多的细胞，用新鲜培养基漂洗所述烧瓶，以相同的方式将漂洗的培养基收集到无菌容器中，然后细胞悬浮液就可用于细胞接种步骤或细胞存库步骤。

步骤 2：细胞接种

在步骤 1 所述的细胞分离之后获得的贴壁依赖性细胞可以按照以下说明接种到新的烧瓶中：

- 接种细胞的密度与接种使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞培养物的常用方法的密度相同。例如，MRC-5 细胞是以大约 5000 细胞/cm^2 -大约 40000 细胞/cm^2 ，优选 7500 细胞/cm^2-25000 细胞/cm^2 的目标细胞密度接种的。

-在细胞接种之后添加到所述烧瓶中的生长培养基的体积与在使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞培养物的常规方法中添加的体积相同。所述生长培养基由新鲜培养基和条件培养基的混合物组成。所述条件培养基是在所述细胞分离步骤开始时回收的细胞培养基（参见步骤 1）。添加到所述新鲜培养基中的条件培养基的量取决于接种的细胞系。一般 0 %-大约 75 %的条件培养基的目标是理想的。举例来说，对于 MRC-5 细胞培养物来说，大约 10 % -大约 35 % 的条件培养基的目标是优选的，并且大约 0.025 ml/cm^2-大约 3 ml/cm^2 的培养基添加到所述烧瓶中是优选的。

步骤 3：细胞生长

接种到细胞培养烧瓶中的贴壁依赖性细胞是在用于使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞培养物的常规方法的相同温度培养的。例

如，对于 MRC-5 细胞培养来说，大约 30℃-大约 40℃，优选大约 37℃的目标温度是优选的。

接种到细胞培养烧瓶中的贴壁依赖性细胞是在与用于使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞培养物的常用方法相同的气氛中培养的。例如，MRC-5 细胞可以在有或没有 CO_2 对照，以及有或没有相对湿度对照的条件下接种的。

步骤 4: 细胞存库

对在步骤 1 所述的细胞分离之后获得的贴壁依赖性细胞进行冷冻，为了获得细胞存库，所采用的方法与用于使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞培养物的常用方法相同，不同之处在于以下各点:

细胞必须在不含动物来源的成分的培养基中冷冻，该培养基补充了相同的不含动物来源的防冻剂添加剂，与用于使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞冷冻的常用方法中的添加剂相同。例如，MRC-5 细胞是在不含动物来源的成分的培养基中冷冻的，该培养基中补充了理想目标浓度的大约 2.5 % -大约 12.5 % 的 DMSO，和理想的目标浓度的大约 0.01 % -大约 1 %的甲基纤维素。

实施例 III

在培养基中在动物或人贴壁依赖性细胞中生产病毒的方法

步骤 5: 病毒感染

以用于使用动物来源的成分的贴壁依赖性细胞培养物的常规方法相同的感染复数（MOI）感染贴壁依赖性细胞。例如，对于用甲型肝炎病毒（HAV）感染的 MARC-5 细胞来说，大约 0.005-大约 1 的 MOI 目标是理想的。在本文所披露的不含动物来源的成分并且补充了表 2 所示成分的培养基中感染细胞，为了进行病毒生产，任选使用蛋白质水解产物。

步骤 6: 病毒繁殖

在与用于使用动物来源的成分在贴壁依赖性细胞培养物上繁殖病毒的常用方法相同的温度下培养感染的贴壁依赖性细胞。例如，对于在 MRC-5 细胞上繁殖的 HAV 来说，大约 31℃-大约 33℃，优选 32℃的目标温度是理想的。在与用于使用动物来源的成分在贴壁依赖性

细胞培养物上进行繁殖的常规方法中使用的相同的气氛下培养感染过的贴壁依赖性细胞。例如，用 HAV 感染过的 MRC-5 细胞可以在有或没有 CO_2 对照以及有或没有相对湿度对照的条件下培养。

步骤 7：病毒收获

贴壁依赖性细胞的病毒感染和病毒收获之间的病毒繁殖时间与用于使用动物来源的成分在贴壁依赖性细胞培养物上进行病毒繁殖的常规方法的繁殖时间相同。例如，在 MRC-5 细胞上进行的 HAV 繁殖是在病毒感染之后大约 21-29 天时间完成的。

病毒收获方法与使用动物来源的成分的在贴壁依赖性细胞培养物进行病毒收获的常规方法相同。例如，在 MRC-5 细胞上生产的 HAV 的收获始于用 PBS 对细胞层进行两次洗涤，然后，通过细胞分离回收病毒，使用补充了 0.1 - 1 g/L 的 EDTA 的 PBS，然后通过冷冻进行细胞裂解。

实施例 IV

培养 MRC-5 细胞，直到衰老，将无花果蛋白酶用于细胞分离（参见图 1，2 和 3）

用于 MRC-5 细胞衰老试验的小规模方法需要用在步骤 1-3 中披露的不含动物来源的成分的方法重复所述细胞生产方法，直到出现衰老。来自细胞库 PDL 21 的 MRC-5 细胞：不含动物来源的成分，对它进行解冻，接种到装有 100 ml 新鲜培养基的 Nunc T175 cm^2 烧瓶中，培养基按表 2 所述进行了适当的补充，并且在 37℃下进行培养。在 7 天之后，在 Nunc T-175 cm^2 烧瓶中，在 37℃下进行继代培养（参见步骤 1 - 3），将 4.2 ml 的酶活性为 45 μUPABA/ml 的无花果蛋白酶溶液用于细胞分离。继代培养是按照以下方法进行的：

· D7：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D12：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D17：以 1/4 的比例将细胞接种在 100 ml 由 25 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D21：重复从 D7 开始的方案

在该方法中，细胞接种物并不固定于目标细胞密度。作为对照进行的细胞计数，证实细胞接种物密度为 8000 细胞/cm^2 - 33000 细胞/cm^2 范围内。在培养 90 天之后，MRC-5 细胞达到了群体加倍水平 71，细胞生长速度为 0.56 PDL/天，此后观察到衰老。在图 1，2 和 3 中所示出的上述结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离和使用牛血清的方法观察到的结果相当（在 83 天之后出现了出现了大约 PDL 65 的衰老，并且细胞生长速度为大约 0.55 PDL/天(Wistrom C, Villeponteau. B. Exp. Gerontol, 1990; 25（2）: 97-105））。

实施例 V

培养 MRC-5 细胞直到衰老，将菠萝蛋白酶用于细胞分离（参见图 1，2 和 3）

该方法与实施例 III 所披露的方法相似，不同之处在于以下各点：

- 将酶活性为 0.01105 明胶消化的单位（GDU）/ml 的菠萝蛋白酶溶液用于细胞分离，以取代无花果蛋白酶溶液。

- 继代培养是按照以下方法进行的：

· D7：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D12：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D17：以 1/4 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D21：重复从 D7 开始的方案

作为对照进行的细胞计数，证实细胞接种物密度为 8000 细胞/cm^2 - 33000 细胞/cm^2 范围内。MRC-5 细胞在培养 82 天之后达到了群体加倍水平 67，细胞生长速度为 0.56 PDL/天，此后观察到了衰老。在图 1，2 和 3 中所示出的结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离 和使用牛血清的方法观察到的结果相当（83 天之后的衰老为 PDL 65，细胞生长速度 = 0.55 PDL/天（Wistrom C，Villeponteau. B. Exp. Gerontol, 1990; 25（2）: 97-105））。

实施例 VI

通过将无花果蛋白酶用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞上的 HAV 生产（参见图 7）

通过将无花果蛋白酶用于细胞分离，用培养的 MRC-5 细胞在 Nunc 细胞工厂（CF）中进行的 HAV 生产需要执行在实施例 II 中的步骤 5-7 所披露的方法。在 Nunc T175 cm^2 烧瓶中，扩增来自细胞库（PDL 21）的不含动物来源的成分的 MRC-5 细胞，然后在 CF 中扩增，直到群体加倍水平达到 36，该过程使用实施例 I 的步骤 1-3 所披露的方法（图 7）。用 HAV 母液接种物感染 MRC-5 细胞。所述接种物是在表 2 所示的培养基中制备的，目标 MOI 为 0.01。在感染之后，在 32℃下培养细胞 27 天，在 7，14 和 21 天之后更新培养基三次（图 7）。HAV 收获是在感染之后 27 天进行的，首先用 PBS 洗涤细胞层两次，然后用补充了大约 0.2 g/L 的 EDTA 的 PBS 分离细胞，并最终冷冻细胞。使用该方法获得的 HAV 总体的抗原效价为 250 -350 E. L. I. S. 单位（ELU）/0.1 ml。以上结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离和使用牛血清的方法观察到的结果相当（HAV 总体抗原效价= 250 ELU/0.1 ml）。

实施例 VII

通过将菠萝蛋白酶用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞上的 HAV 生产（参见图 7）

该方法与实施例 V 所披露的方法类似，所不同的是，将酶活性为 0.01105 明胶消化的单位（GDU）/ml 的菠萝蛋白酶溶液用于细胞分离，以取代无花果蛋白酶溶液。

用该方法获得的 HAV 的总体抗原滴度为 250 -350 E. L. I. S. 单位 /0.1 ml。该结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离和使用牛血清的方法观察到的结果相当（HAV 总体抗原滴度=250 ELU/0.1ml）。

实施例 VIII

通过将无花果蛋白酶用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库（参见图 8，9 和 10）

用于通过无花果蛋白酶扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库方法，需要重复所述细胞生产方法，使用实施例 I 的步骤 1-3 所披露的不含动物来源的成分的程序，直到达到选定的 PDL（PDL 21）。在该 PDL 下，按照实施例 I 的步骤 4 所披露的方法冷冻细胞。对来自细胞库（PDL 14）的含有血清的 MRC-5 细胞进行解冻，接种到装有 100 ml 在表 2 中所示出的 Nunc T175 cm^2 烧瓶中，并且在 37℃下培养。7 天之后，在 Nunc T-175 cm^2 烧瓶中，在 37℃下继代培养（参见步骤 1 - 3），将 4.2 ml 酶活性为 45 UPABA/ml 的无花果蛋白酶溶液用于细胞分离。继代培养是按照以下方法进行的：

· D7：以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D12：以 1/4 的比例将细胞接种在 100 ml 由 25%的条件培养基组成的生长培养基中

· D16：用 1/4 的比例进行细胞存库

在该方法中，细胞接种物并不固定于目标细胞密度。细胞计数结果如图 8，9 和 10 所示。16 天之后，MRC-5 细胞达到了 PDL 21。在该 PDL 下，在不含动物来源的成分的，补充了 7.5 % DMSO 和 0.1 % 甲基纤维素的培养基中冷冻 MRC-5 细胞。在解冻之后，所述 MRC-5 细胞表现出的存活力和细胞生长与在冷冻之前所观察到的结果相当（存活力大约为 90-95 % ，细胞生长速度> 0.55 PDL/天）（参见图 1，2 和 3）。以上结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离和使用牛血清的方法观察到的结果相当（存活力大约为 90-95 %，细胞生长速度= 0.55 PDL/天（Wistrom C，Villeponteau. B. Exp. Gerontol，1990；25（2）：97-105））。

实施例 IX

通过将菠萝蛋白酶用于细胞分离而扩增的 MRC-5 细胞的细胞存库（参见图 8，9 和 10）

该方法与实施例 VII 披露的方法类似，不同之处在于以下各点：

- 将酶活性为 0.01105 明胶消化的单位（GDU）/ml 的菠萝蛋白酶溶液用于细胞分离，以取代无花果蛋白酶溶液。

- 继代培养是按照以下方法进行的:

· D7: 以 1/4 的比例将细胞接种在 100 ml 由 25%的条件培养基组成的生长培养基中

· D11: 以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D16: 用 1/4 的比例进行细胞存库

细胞计数结果如图 8，9 和 10 所示。在 16 天之后所述 MRC-5 细胞达到了群体加倍水平为 21。在解冻之后，所述 MRC-5 细胞表现出的存活力和细胞生长与在解冻之前观察到的结果相当（存活力大约为 90-95 %，细胞生长速度> 0.55 PDL/天）（参见图 1，2 和 3）。以上结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离并且使用牛血清观察到的结果相当（存活力大约为 90-95 % ，细胞生长速度 = 0.55 PDL/天（Wistrom C，Villeponteau. B. Exp. Gerontol，1990; 25（2）: 97-105））。

实施例 X

将 Trypzean（Prodigen）或 r 蛋白酶（Invitrogen）用于细胞分离，培养 MRC-5 细胞直到衰老

进行 MRC-5 细胞衰老试验的小规模方法，涉及重复所述细胞生产方法，采用在实施例 II 的步骤 1-3 中所披露的不含动物来源的成分的程序，直到观察到衰老。来自不含动物来源的成分的大约 PDL 27 的细胞培养物的 MRC-5 细胞在 Nunc T175 cm^2 中进行繁殖，使用活性为 1 USP/ml 的 Trypzean 溶液或 r 蛋白酶（Invitrogen）溶液（用补充了 EDTA 的 PBS 稀释母液 30 倍，与用于细胞分离的溶液相同，参见步骤实施例 II 的步骤 1），按照以下方法进行:

· D0: 以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D5: 以 1/4 的比例将细胞接种在 100 ml 由 25%的条件培养基组成的生长培养基中

· D9: 以 1/8 的比例将细胞接种在 100 ml 由 12.5 %的条件培养基组成的生长培养基中

· D14: 重复从 D0 开始的方案

在该方法中，细胞接种物并不固定于目标细胞密度。作为对照样品进行的细胞计数，证实细胞接种物密度为 8000 细胞/cm^2 -30000 细胞/cm^2。在培养 61 天之后 MRC-5 细胞达到了超过 60 的 PDL，细胞生长速度为大约 0.56 PDL/天，此后观察到了衰老。在图 11，12 和 13 中所示出的结果与将猪胰蛋白酶用于细胞分离和使用牛血清的方法观察到的结果相当（在培养 83 天之后的衰老为大约 PDL 65，细胞生长速度为大约 0.55 PDL/天（Wistrom C，Villeponteau. B. Exp. Gerontol，1990；25（2）：97-105））。