

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510030198.9

[43] 公开日 2006年5月31日

[11] 公开号 CN 1778902A

[22] 申请日 2005.9.29

[21] 申请号 200510030198.9

[71] 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市梅陇路 130 号

[72] 发明人 谭文松 朱明龙 周燕 华平
牛红星

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司
代理人 罗大忱

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

适用于多种动物细胞大规模培养的无血清培养基

[57] 摘要

本发明公开了一种适用于多种动物细胞大规模培养的无血清培养基。其特点是以 DMEM/F12 作为基础培养基，在其基础上添加了多种生长因子、激素、必需氨基酸和微量元素，具有(1)能支持多个细胞株或细胞系的生长；(2)在细胞生长、产物表达方面与含血清培养基接近或相当；(3)支持细胞的长期传代培养；(4)含有较低浓度的蛋白质，有利于产物的分离纯化，提高产品的品质；(5)价格低廉，适合于大规模工业化生产等特点。最重要的是，本发明所形成的无血清培养基适用于多个细胞株或细胞系的连续灌注培养，可获得较高的细胞密度和产物浓度，显著提高生产过程效率和产品产率。

1. 一种适用于多种动物细胞大规模培养无血清培养基，其特征在于，是以重量比为 1:1 的 DMEM 和 F12 为基础培养基，添加胰岛素、转铁蛋白、乙醇胺、丙酮酸钠、白蛋白、 β -巯基乙醇、微量元素、激素和必需氨基酸等成分组成。

2. 根据权利要求 1 所述的无血清培养基，其特征在于，所说的基础培养基为标准的商业培养基，培养基中所含的组分和含量参照 SIGMA 公司产品目录中公布的配方。

3. 根据权利要求 2 所述的无血清培养基，其特征在于，微量元素选自 Mn 和/或 Mo 和/或 Ni 和/或 Se 和/或 Si 和/或 Sn 和/或 V。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的无血清培养基，其特征在于，激素选自氢化可的松、地塞米松、雌二醇或孕酮。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的无血清培养基，其特征在于，所添加的必需氨基酸包括精氨酸、门冬氨酸、门冬酰胺、半胱氨酸、胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

6. 根据权利要求 5 所述的无血清培养基，其特征在于，最终形成的培养基组分和含量如下：

成分	中文化学名称	
无机盐(mg/L)		
CaCl ₂	氯化钙	116.60
CuSO ₄ ·5H ₂ O	硫酸铜	0.0013
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	硝酸铁	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸亚铁	0.417
KCl	氯化钾	311.80
MgCl ₂	氯化镁	28.64
MgSO ₄	硫酸镁	48.84
NaCl	氯化钠	6995.50
NaHCO ₃	碳酸氢钠	2440
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	磷酸二氢钠	62.50
Na ₂ HPO ₄	磷酸氢二钠	71.02

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸锌	0.432
L-氨基酸 (mg/L)		
Alanine	丙氨酸	4.45
Arginine·HCl	精氨酸	147.5-210.5
Asparagine·H ₂ O	门冬酰胺	7.5-67.5
Aspartic acid	门冬氨酸	6.65-26.6
Cysteine·H ₂ O	半胱氨酸	17.56-35.12
Cystein·2HCl	胱氨酸	31.29-62.58
Glutamic acid	谷氨酸	7.35-29.4
Glutamine	谷氨酰胺	584-1168
Glycine	甘氨酸	18.75-37.5
Histidine·HCl·H ₂ O	组氨酸	31.48-104.93
Isoleucine	异亮氨酸	52.4-131.0
Leucine	亮氨酸	58.95-157.2
Lysine·HCl	赖氨酸	91.25-182.5
Methionine	甲硫氨酸	16.39-59.6
Phenylalanine	苯丙氨酸	33.0-82.5
Proline	脯氨酸	17.25-34.5
Serine	丝氨酸	26.25-94.5
Threonine	苏氨酸	53.55-95.2
Tryptophan	色氨酸	8.16-51.0
Tyrosine·2Na·2H ₂ O	酪氨酸	55.79-139.5
Valine	缬氨酸	52.65-117.0
Vitamins/cofactors(mg/L)		
Biotin	生物素	0.0035
Pantothenate·Ca	泛酸钙	2.24
Choline·Cl	胆碱	8.98
Folic acid	叶酸	2.65
Inositol	肌醇	12.60
Niacinamide	烟酰胺	2.02
Pyridoxine·HCl	维生素 B6	2.031
Riboflavin	核黄素	0.219
Thiamine·HCl	硫胺	2.17
Thymidine	胸苷	0.365
Vitamin B ₁₂	维生素 B12	0.68
微量元素 (mg/L)		
Na ₂ SeO ₃	亚硒酸钠	0.0008-0.0035
MnSO ₄ ·4H ₂ O	硫酸锰	0.00008-0.0008
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	硅酸钠	0.002-0.01
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	钼酸氨	0.0017-0.017

NH ₄ VO ₃	钒酸氨	0.00006-0.0006
NiCl ₂ ·6H ₂ O	氯化镍	0.00002-0.00024
SnCl ₂ ·2H ₂ O	氯化锡	0.00002-0.00023
其它成分(mg/L)		
Glucose	葡萄糖	1000-7200
Na Hypoxanthine	次黄嘌呤	2.39
Linoleic acid	亚油酸	0.042
Lipoic acid	硫辛酸	0.105
Phenol red	酚红	8.10
Sodium Putrescine·2HCl	腐胺	0.081
Pyruvate·Na	丙酮酸钠	220.00
胰岛素		5-10
转铁蛋白		5-10
白蛋白		0-100
激素 (mg/L)		
氢化可的松		0.036-0.362
地塞米松		0.039-0.392
孕酮		0.006-0.031
雌二醇		0.0027-0.027
B-巯基乙醇		0.61-1.83
乙醇胺		1.22-12.2

7. 根据权利要求 1~5 任一项所述的无血清培养基的应用, 其特征在于, 用于杂交瘤细胞、rCHO 细胞或 293 细胞的传代培养和高密度连续灌注培养。

适用于多种动物细胞大规模培养的无血清培养基

技术领域

本发明涉及动物细胞大规模高密度培养过程中用于生产抗体、疫苗、基因重组蛋白等生物产品的无血清培养基。

技术背景

动物细胞培养已经被广泛应用于生产各类生物活性物质如单克隆抗体、病毒疫苗、病毒载体、免疫调节因子、生长因子、特定肿瘤抗原以及各种基因重组蛋白质药物等，传统培养过程中通常需要添加一定量（5%—10%）的牛血清，血清中含有细胞生长所需的生长因子、激素、载体蛋白、贴壁因子、微量元素以及其它的营养物质，可以极大地促进细胞的生长和产物的表达。

然而，血清的应用也带来很多缺点：

- (1) 血清易受病毒、支原体或其它病原体的污染；
- (2) 不同批号血清间差异造成产品批次间的差异；
- (3) 大量血清蛋白的存在增加了下游分离纯化的难度，使其成本升高，回收率降低；
- (4) 部分血清蛋白难以通过分离纯化手段彻底去除，严重影响产品的最终质量。

为了克服血清所带来的各种缺点，八十年代起就有许多研究者从事无血清培养基的研究开发工作，Darfler 等开发了 CITTL 无血清培养基，它以 DMEM/F12 (1: 1) 为基础培养基，添加 1.5mg/L 的胰岛素，3.0mg/L 的转铁蛋白，2nmol/L 的睾酮，5mg/L 的过氧化氢酶，1.5mg/L 的 β -甘油磷酸，0.5mg/L 的二亚油酰磷脂胆碱，用于杂交瘤细胞的培养；Murakami 等开发了 DMEM/F12-ITES 无血清培养基，它是在 DMEM/F12 的基础上添加了 5mg/L 的胰岛素，2—35mg/L 的转铁蛋白，20 μ mol/L 乙醇胺，1nmol/L 亚硒酸钠，该培养基被广泛应用于培养杂交瘤细胞。

另外，美国专利 U.S.P. 5,063,157 所涉及的无血清培养基用于哺乳动物细胞悬浮培养，在基础培养基中添加了转铁蛋白、胰岛素、蛋白胍、beta-D-xylopyranose derivative、硒和多胺，是一款低蛋白培养基；美国专利 U.S.P. 4,443,546 则是另一款类似的低蛋白培养基；美国专利 U.S.P. 4,657,866 涉及一种全部组分明确（chemical defined medium）的合成培养基用于培养动物和人的一些细胞系；欧洲专利 E.P. 481,791 公开一种用于

CHO 细胞的无血清培养基，它含有水、渗透压调节剂、缓冲剂、糖、氨基酸、铁、生长因子和其它必需成分。

目前，已有大量的商业化无血清培养基被开发并应用于各类动物细胞培养，如 GIBCO 公司用于杂交瘤细胞的 CD Hybridoma 培养基、Hybridoma-SFM 培养基、PFHM-II Protein-free 培养基，用于 CHO 细胞的 CD CHO 培养基、CHO-s-SFM II 培养基；SIGMA 公司的 Hybri-Max 等等。

上述无血清培养基都有各自的优点，大都能很好地支持细胞的生长，但同时它们也存在很多缺点：

- (1) 因价格昂贵，只适合实验室小规模使用；而不适合大规模生物反应器；
- (2) 培养基没有针对细胞进行优化，所支持的细胞密度较低，导致生产过程产率不高；
- (3) 有些培养基虽然能很好地支持细胞生长，但往往会导致细胞表达产物的能力降低，甚至丧失；
- (4) 培养基对细胞有很高的特异性，通常一种培养基只适合一个细胞株或细胞系，而不适合其它的细胞株或细胞系。

发明内容

本发明需要解决的技术问题在于公开一种适用于多种动物细胞大规模培养而无血清培养基，以克服现有技术存在的上述缺陷。

本发明的适用于多种动物细胞大规模培养而无血清培养基是以重量比为=1：1 的 DMEM 和 F12 的为基础培养基，添加胰岛素、转铁蛋白、乙醇胺、丙酮酸钠白蛋白、 β -巯基乙醇、微量元素、激素、必需氨基酸等成分；

培养基 DMEM 和 F12 的组分在 GIBCO 或 SIGMA 公司产品目录上均已公开，有关人员可参阅，本发明不再赘述，可采用商业化的产品，如 GIBCO 或 SIGMA 公司的产品；

本发明最终形成的无血清培养基的组分和含量如下：

成分	中文化学名称	生产厂商	
无机盐(mg/L)			
CaCl ₂	氯化钙	SIGMA	116.60
CuSO ₄ ·5H ₂ O	硫酸铜	SIGMA	0.0013

Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	硝酸铁	SIGMA	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸亚铁	SIGMA	0.417
KCl	氯化钾	SIGMA	311.80
MgCl ₂	氯化镁	SIGMA	28.64
MgSO ₄	硫酸镁	SIGMA	48.84
NaCl	氯化钠	SIGMA	6995.50
NaHCO ₃	碳酸氢钠	SIGMA	2440
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	磷酸二氢钠	SIGMA	62.50
Na ₂ HPO ₄	磷酸氢二钠	SIGMA	71.02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸锌	SIGMA	0.432
L-氨基酸 (mg/L)			
Alanine	丙氨酸	SIGMA	4.45
Arginine·HCl	精氨酸	SIGMA	147.5-210.5
Asparagine·H ₂ O	门冬酰胺	SIGMA	7.5-67.5
Aspartic acid	门冬氨酸	SIGMA	6.65-26.6
Cysteine·H ₂ O	半胱氨酸	SIGMA	17.56-35.12
Cystein·2HCl	胱氨酸	SIGMA	31.29-62.58
Glutamic acid	谷氨酸	SIGMA	7.35-29.4
Glutamine	谷氨酰胺	SIGMA	584-1168
Glycine	甘氨酸	SIGMA	18.75-37.5
Histidine·HCl·H ₂ O	组氨酸	SIGMA	31.48-104.93
Isoleucine	异亮氨酸	SIGMA	52.4-131.0
Leucine	亮氨酸	SIGMA	58.95-157.2
Lysine·HCl	赖氨酸	SIGMA	91.25-182.5
Methionine	甲硫氨酸	SIGMA	16.39-59.6
Phenylalanine	苯丙氨酸	SIGMA	33.0-82.5
Proline	脯氨酸	SIGMA	17.25-34.5
Serine	丝氨酸	SIGMA	26.25-94.5
Threonine	苏氨酸	SIGMA	53.55-95.2
Tryptophan	色氨酸	SIGMA	8.16-51.0
Tyrosine·2Na·2H ₂ O	酪氨酸	SIGMA	55.79-139.5
Valine	缬氨酸	SIGMA	52.65-117.0
维生素/辅酶(mg/L)			
Biotin	生物素	SIGMA	0.0035
Pantothenate·Ca	泛酸钙	SIGMA	2.24
Choline·Cl	胆碱	SIGMA	8.98
Folic acid	叶酸	SIGMA	2.65
Inositol	肌醇	SIGMA	12.60
Niacinamide	烟酰胺	SIGMA	2.02
Pyridoxine·HCl	维生素 B6	SIGMA	2.031
Riboflavin	核黄素	SIGMA	0.219

Thiamine·HCl	硫胺	SIGMA	2.17
Thymidine	胸苷	SIGMA	0.365
Vitamin B ₁₂	维生素 B12	SIGMA	0.68
微量元素 (mg/L)			
Na ₂ SeO ₃	亚硒酸钠	SIGMA	0.0008-0.0035
MnSO ₄ ·4H ₂ O	硫酸锰	SIGMA	0.00008-0.0008
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	硅酸钠	SIGMA	0.002-0.01
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	钼酸氨	SIGMA	0.0017-0.017
NH ₄ VO ₃	钒酸氨	SIGMA	0.00006-0.0006
NiCl ₂ ·6H ₂ O	氯化镍	SIGMA	0.00002-0.00024
SnCl ₂ ·2H ₂ O	氯化锡	SIGMA	0.00002-0.00023
其它成分(mg/L)			
Glucose	葡萄糖	SIGMA	1000-7200
Na Hypoxanthine	次黄嘌呤	SIGMA	2.39
Linoleic acid	亚油酸	SIGMA	0.042
Lipoic acid	硫辛酸	SIGMA	0.105
Phenol red	酚红	SIGMA	8.10
Sodium Putrescine·2HCl	腐胺	SIGMA	0.081
Pyruvate·Na	丙酮酸钠	SIGMA	220.00
胰岛素		SIGMA	5-10
转铁蛋白		SIGMA	5-10
白蛋白		SIGMA	0-100
激素 (mg/L)			
氢化可的松		SIGMA	0.036-0.362
地塞米松		SIGMA	0.039-0.392
孕酮		SIGMA	0.006-0.031
雌二醇		SIGMA	0.0027-0.027
B-巯基乙醇		SIGMA	0.61-1.83
乙醇胺		SIGMA	1.22-12.2

本发明的培养基的制备方法是十分简单的，可采用常规的方法将上述组分溶解无热源超纯水即可制备而成。

本发明的培养基可用于杂交瘤细胞、rCHO 细胞、293 细胞等细胞系或细胞株的传代培养和高密度连续灌注培养。它具有以下优点：

1. 能支持多个细胞株或细胞系的生长；
2. 在细胞生长、产物表达方面与含血清培养基接近或相当；
3. 支持细胞的长期传代培养；

4. 含有较低浓度的蛋白质，有利于产物的分离纯化，提高产品的品质；
5. 价格低廉，适合于大规模工业化生产；

最重要的是，本发明所形成的无血清培养基适用于多个细胞株或细胞系的连续灌注培养，可获得较高的细胞密度和产物浓度，能显著提高生产过程效率和产品产率。

附图说明

图 1 为 HB58 杂交瘤细胞连续灌注培养的细胞生长与产物表达曲线。

图 2 为 CHO 细胞连续灌注培养的细胞生长与产物表达曲线。

图 3 为批培养中 293 细胞的生长曲线。

具体实施方式

实施例 1

本发明所述的无血清培养基可用于杂交瘤细胞的高密度连续灌注培养，培养基的组成成分如下：

成分	中文化学名称	
无机盐(mg/L)		
CaCl ₂	氯化钙	116.60
CuSO ₄ ·5H ₂ O	硫酸铜	0.0013
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	硝酸铁	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸亚铁	0.417
KCl	氯化钾	311.80
MgCl ₂	氯化镁	28.64
MgSO ₄	硫酸镁	48.84
NaCl	氯化钠	6995.50
NaHCO ₃	碳酸氢钠	2440
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	磷酸二氢钠	62.50
Na ₂ HPO ₄	磷酸氢二钠	71.02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸锌	0.432
L-氨基酸 (mg/L)		
Alanine	丙氨酸	4.45
Arginine·HCl	精氨酸	210.5
Asparagine·H ₂ O	门冬酰胺	7.5
Aspartic acid	门冬氨酸	26.6
Cysteine·H ₂ O	半胱氨酸	17.56
Cystein·2HCl	胱氨酸	31.29

Glutamic acid	谷氨酸	14.7
Glutamine	谷氨酰胺	1168
Glycine	甘氨酸	18.75
Histidine·HCl·H ₂ O	组氨酸	104.93
Isoleucine	异亮氨酸	131.0
Leucine	亮氨酸	157.2
Lysine·HCl	赖氨酸	182.5
Methionine	甲硫氨酸	16.39
Phenylalanine	苯丙氨酸	82.5
Proline	脯氨酸	34.5
Serine	丝氨酸	26.25
Threonine	苏氨酸	53.55
Tryptophan	色氨酸	51.0
Tyrosine·2Na·2H ₂ O	酪氨酸	139.5
Valine	缬氨酸	117.0
Vitamins/cofactors(mg/L)		
Biotin	生物素	0.0035
Pantothenate·Ca	泛酸钙	2.24
Choline·Cl	胆碱	8.98
Folic acid	叶酸	2.65
Inositol	肌醇	12.60
Niacinamide	烟酰胺	2.02
Pyridoxine·HCl	维生素 B6	2.031
Riboflavin	核黄素	0.219
Thiamine·HCl	硫胺	2.17
Thymidine	胸苷	0.365
Vitamin B ₁₂	维生素 B12	0.68
微量元素 (mg/L)		
Na ₂ SeO ₃	亚硒酸钠	0.0016
MnSO ₄ ·4H ₂ O	硫酸锰	0.00016
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	硅酸钠	0.005
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	钼酸氨	0.0034
NH ₄ VO ₃	钒酸氨	0.00012
NiCl ₂ ·6H ₂ O	氯化镍	0.0001
SnCl ₂ ·2H ₂ O	氯化锡	0.0001
其它成分(mg/L)		
Glucose	葡萄糖	6300
Na Hypoxanthine	次黄嘌呤	2.39
Linoleic acid	亚油酸	0.042
Lipoic acid	硫辛酸	0.105

Phenol red	酚红	8.10
Sodium Putrescine·2HCl	腐胺	0.081
Pyruvate·Na	丙酮酸钠	220.00
胰岛素		5
转铁蛋白		10
白蛋白		100
激素 (mg/L)		
氢化可的松		0.036
地塞米松		0.039
孕酮		0.006
雌二醇		0.0027
B-巯基乙醇		0.61
乙醇胺		12.2

将上述组分混合并溶解无热源超纯水，即可获得培养基。

将 HB58 杂交瘤细胞（从 ATCC 获得）在本发明所述的无血清培养基中传代适应后，在 BF-2（德国 B.BRAUN 公司）2 升生物反应器中接种，接种密度 2.0×10^5 cells/ml，培养 56 小时后开始灌注，灌注速率为 0.5 (1/day)，灌注培养基即为本发明所述的无血清培养基，培养至 200 小时后细胞密度维持在 1.2×10^7 cells/ml 左右，单克隆抗体浓度维持在 500mg/L 左右（见图 1），与普通培养基批培养的结果相比，细胞密度和单抗浓度均提高 8 倍以上。图中，曲线 1 为活细胞密度，曲线 2 为总细胞密度，曲线 3 为单抗表达量。

实施例 2

本发明所述的无血清培养基可用于 rCHO 细胞的高密度连续灌注培养，培养基的组成成分如下：

成分	中文化学名称	
无机盐(mg/L)		
CaCl ₂	氯化钙	116.60
CuSO ₄ ·5H ₂ O	硫酸铜	0.0013
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	硝酸铁	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸亚铁	0.417
KCl	氯化钾	311.80
MgCl ₂	氯化镁	28.64
MgSO ₄	硫酸镁	48.84
NaCl	氯化钠	6995.50
NaHCO ₃	碳酸氢钠	2440
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	磷酸二氢钠	62.50

Na_2HPO_4	磷酸氢二钠	71.02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	硫酸锌	0.432
L-氨基酸 (mg/L)		
Alanine	丙氨酸	4.45
Arginine·HCl	精氨酸	168.4
Asparagine·H ₂ O	门冬酰胺	67.5
Aspartic acid	门冬氨酸	6.65
Cysteine·H ₂ O	半胱氨酸	17.56
Cystein·2HCl	胱氨酸	62.58
Glutamic acid	谷氨酸	7.35
Glutamine	谷氨酰胺	1168
Glycine	甘氨酸	37.5
Histidine·HCl·H ₂ O	组氨酸	47.22
Isoleucine	异亮氨酸	131.0
Leucine	亮氨酸	157.2
Lysine·HCl	赖氨酸	127.7
Methionine	甲硫氨酸	29.8
Phenylalanine	苯丙氨酸	33.0
Proline	脯氨酸	34.5
Serine	丝氨酸	94.5
Threonine	苏氨酸	95.2
Tryptophan	色氨酸	20.4
Tyrosine·2Na·2H ₂ O	酪氨酸	105.2
Valine	缬氨酸	93.6
Vitamins/cofactors(mg/L)		
Biotin	生物素	0.0035
Pantothenate·Ca	泛酸钙	2.24
Choline·Cl	胆碱	8.98
Folic acid	叶酸	2.65
Inositol	肌醇	12.60
Niacinamide	烟酰胺	2.02
Pyridoxine·HCl	维生素 B6	2.031
Riboflavin	核黄素	0.219
Thiamine·HCl	硫胺	2.17
Thymidine	胸苷	0.365
Vitamin B ₁₂	维生素 B12	0.68
微量元素 (mg/L)		
Na_2SeO_3	亚硒酸钠	0.0016
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	硫酸锰	0.00016
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	硅酸钠	0.005

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	钼酸氨	0.0034
NH_4VO_3	钒酸氨	0.00012
$\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	氯化镍	0.00004
$\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	氯化锡	0.00004
其它成分(mg/L)		
Glucose	葡萄糖	7200
Na Hypoxanthine	次黄嘌呤	2.39
Linoleic acid	亚油酸	0.042
Lipoic acid	硫辛酸	0.105
Phenol red	酚红	8.10
Sodium Putrescine·2HCl	腐胺	0.081
Pyruvate·Na	丙酮酸钠	220.00
胰岛素		10
转铁蛋白		10
白蛋白		100
激素 (mg/L)		
氢化可的松		0.036
地塞米松		0.039
孕酮		0.006
雌二醇		0.0027
B-巯基乙醇		0.61
乙醇胺		12.2

将 rCHO 细胞 (rCHO SS3 A2, 表达人抗凝血因子III) 在本发明所述的无血清培养基中传代适应后, 在 B.BRAUN 2 升生物反应器中接种, 接种密度 2.0×10^5 cells/ml, 培养 40 小时后开始灌注, 灌注速率为 0.58 (1/day), 灌注培养基即为本发明所述的无血清培养基, 培养至 255 小时后细胞密度维持在 $0.9-1.0 \times 10^7$ cells/ml 左右, 产物浓度维持在 350-380U/L 左右 (见图 2), 与普通培养基批培养的结果相比, 细胞密度和单抗浓度分别提高 6 倍和 5 倍。图中, 曲线 4 为活细胞密度, 曲线总细胞密度, 曲线 6 为产物表达量。

实施例 3

本发明所述的无血清培养基可用于 293 细胞的培养, 培养基的组成成分如下:

成分	中文化学名称	
无机盐(mg/L)		
CaCl_2	氯化钙	116.60
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	硫酸铜	0.0013

Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	硝酸铁	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸亚铁	0.417
KCl	氯化钾	311.80
MgCl ₂	氯化镁	28.64
MgSO ₄	硫酸镁	48.84
NaCl	氯化钠	6995.50
NaHCO ₃	碳酸氢钠	2440
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	磷酸二氢钠	62.50
Na ₂ HPO ₄	磷酸氢二钠	71.02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	硫酸锌	0.432
L-氨基酸 (mg/L)		
Alanine	丙氨酸	4.45
Arginine·HCl	精氨酸	168.4
Asparagine·H ₂ O	门冬酰胺	7.5
Aspartic acid	门冬氨酸	6.65
Cysteine·H ₂ O	半胱氨酸	17.56
Cystein·2HCl	胱氨酸	31.29
Glutamic acid	谷氨酸	7.35
Glutamine	谷氨酰胺	584
Glycine	甘氨酸	18.75
Histidine·HCl·H ₂ O	组氨酸	31.48
Isoleucine	异亮氨酸	54.47
Leucine	亮氨酸	59.05
Lysine·HCl	赖氨酸	91.25
Methionine	甲硫氨酸	29.8
Phenylalanine	苯丙氨酸	33.0
Proline	脯氨酸	34.5
Serine	丝氨酸	26.25
Threonine	苏氨酸	53.45
Tryptophan	色氨酸	20.4
Tyrosine·2Na·2H ₂ O	酪氨酸	55.79
Valine	缬氨酸	52.8
Vitamins/cofactors(mg/L)		
Biotin	生物素	0.0035
Pantothenate·Ca	泛酸钙	2.24
Choline·Cl	胆碱	8.98
Folic acid	叶酸	2.65
Inositol	肌醇	12.60
Niacinamide	烟酰胺	2.02
Pyridoxine·HCl	维生素 B6	2.031
Riboflavin	核黄素	0.219

Thiamine·HCl	硫胺	2.17
Thymidine	胸苷	0.365
Vitamin B ₁₂	维生素 B12	0.68
微量元素 (mg/L)		
Na ₂ SeO ₃	亚硒酸钠	0.0016
MnSO ₄ ·4H ₂ O	硫酸锰	0.00016
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	硅酸钠	0.005
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	钼酸氨	0.0034
NH ₄ VO ₃	钒酸氨	0.00012
NiCl ₂ ·6H ₂ O	氯化镍	0.00004
SnCl ₂ ·2H ₂ O	氯化锡	0.00004
其它成分(mg/L)		
Glucose	葡萄糖	3150
Na Hypoxanthine	次黄嘌呤	2.39
Linoleic acid	亚油酸	0.042
Lipoic acid	硫辛酸	0.105
Phenol red	酚红	8.10
Sodium Putrescine·2HCl	腐胺	0.081
Pyruvate·Na	丙酮酸钠	220.00
胰岛素		10
转铁蛋白		10
白蛋白		100
激素 (mg/L)		
氢化可的松		0.036
地塞米松		0.039
孕酮		0.006
雌二醇		0.0027
B-巯基乙醇		0.61
乙醇胺		12.2

将 293 细胞在本发明所述的无血清培养基中传代适应后，在 B.BRAUN 2 升生物反应器中接种进行批培养，接种密度为 2.45×10^5 cells/ml，由图 3 可以看出细胞的生长几乎看不到迟滞期，接种后即进入指数生长期，平均比生长速率为 0.46 day^{-1} ，最大活细胞密度为 11.0×10^5 cells/ml。图中，曲线 7 为活细胞密度，曲线 8 为活细胞比例。

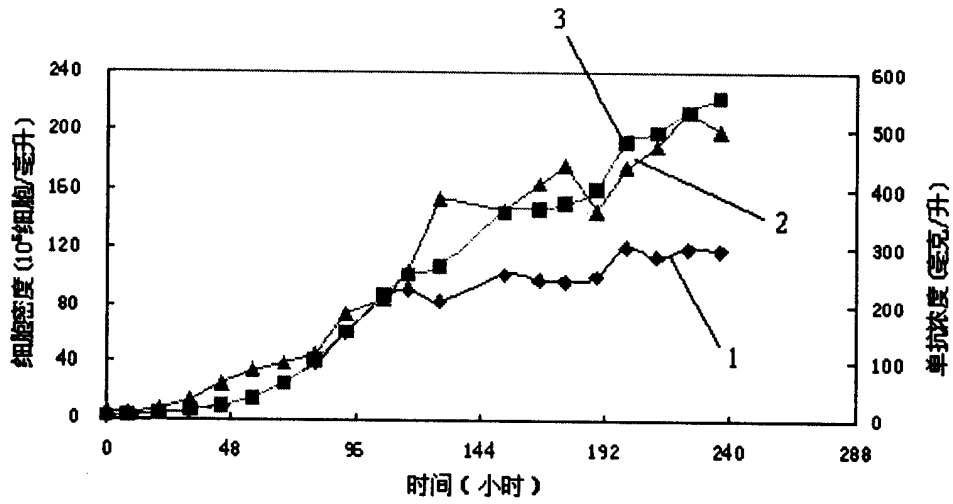


图 1

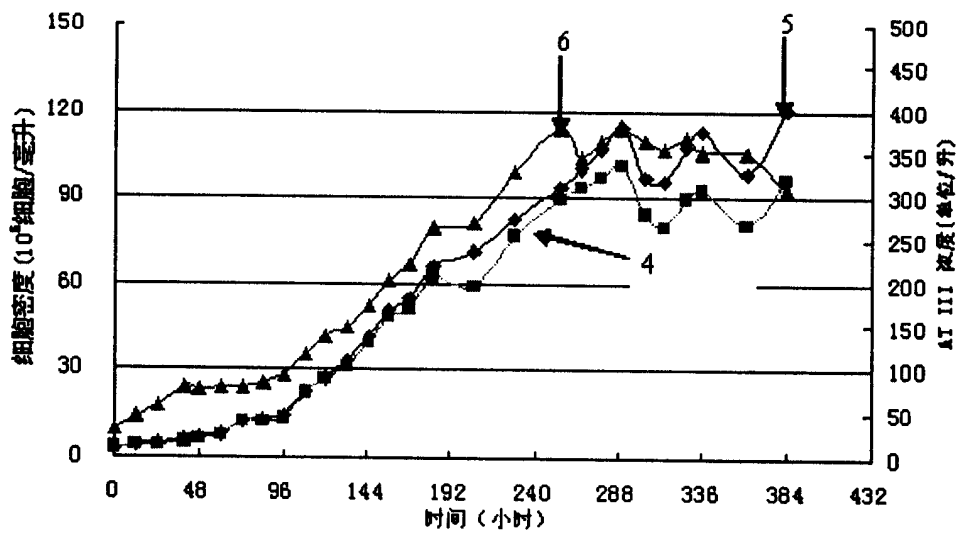


图 2

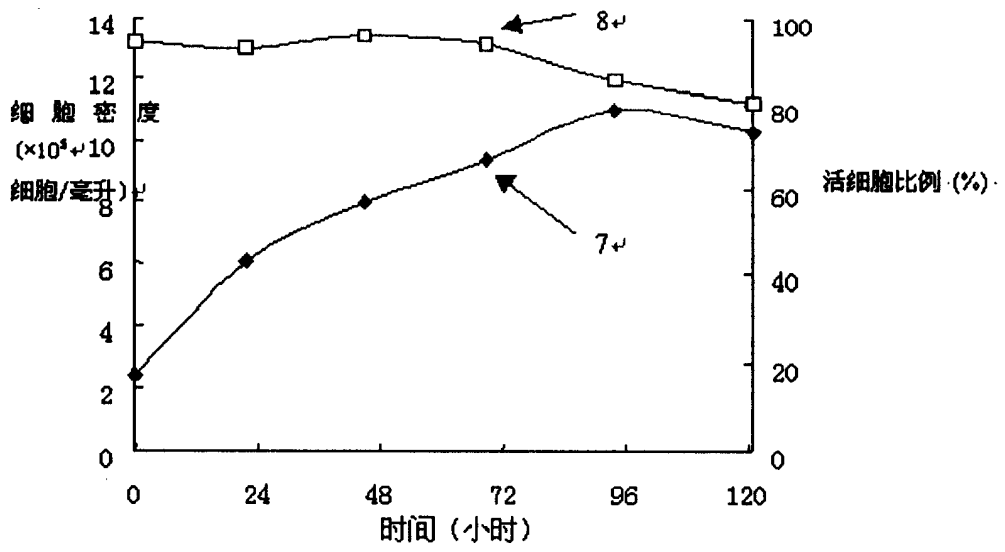


图 3