

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780001787.1

[43] 公开日 2009 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 101360820A

[22] 申请日 2007.1.3

[21] 申请号 200780001787.1

[30] 优先权

[32] 2006.1.4 [33] US [31] 60/756,419

[86] 国际申请 PCT/EP2007/000027 2007.1.3

[87] 国际公布 WO2007/077217 英 2007.7.12

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.30

[71] 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺斯州

共同申请人 巴克斯特保健股份有限公司

[72] 发明人 利奥波德·格里伯格

曼弗雷德·赖特 沃尔夫冈·蒙特

阿图尔·米特雷尔

[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

代理人 傅强国 涂 勇

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 7 页

[54] 发明名称

无寡肽的细胞培养基

[57] 摘要

本发明涉及无寡肽的细胞培养基，其包含至少 0.5mg/L 的多胺；本发明还涉及在所述包含至少 0.5mg/L 的多胺的无寡肽细胞培养基中培养细胞的方法。本发明还涉及在包含至少 0.5mg/L 的多胺的培养基中表达至少一种蛋白质的方法，并且涉及在包含至少 0.5mg/L 的多胺的培养基中制造至少一种病毒的方法。

1. 一种无寡肽的细胞培养基，其包含至少 0.5 mg/L 的多胺。
2. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，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、鸟氨酸及其组合物所构成的组。
3. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，其特征在于，所述多胺通过合成方式制造。
4. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，其特征在于，所述多胺以约 0.5~30 mg/L 的浓度存在于所述培养基中。
5. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，其特征在于，所述培养基不包含具有二十个以上氨基酸的寡肽。
6. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，其特征在于，所述培养基不包含具有三个以上氨基酸的寡肽，可选地包含谷胱甘肽。
7. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，其特征在于，所述培养基不包含具有两个以上氨基酸的寡肽，可选地包含谷胱甘肽和/或至少一种稳定形式的谷氨酰胺。
8. 如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，其特征在于，所述培养基以化学方法进行限定。
9. 一种用于培养细胞的方法，包括下述步骤：
 - (a) 提供如权利要求 1 所述的无寡肽的细胞培养基，以及
 - (b) 在培养基中增殖细胞从而形成细胞培养物。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述细胞选自于由哺乳动物细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、细菌细胞、和酵母细胞所构成的组。
11. 一种用于表达至少一种蛋白质的方法，包括下述步骤：
 - (a) 提供细胞培养物；
 - (b) 将至少一种包含编码至少一种蛋白质的序列的核酸序列导入所述细胞；
 - (c) 选择携带所述核酸序列的细胞；以及
 - (d) 在包含至少 0.5 mg/L 的多胺的培养基中表达细胞中的蛋白质。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述培养基是如权利要求 1 所述的无寡肽的培养基。

13. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述蛋白质选自于由凝血因子 VII、凝血因子 VIII、凝血因子 IX、vWF、ADAMTS13 和弗林蛋白酶所构成的组。

14. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述细胞是 CHO 细胞、293 细胞或 BHK 细胞。

15. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述细胞/蛋白质组合选自于由 CHO 细胞/凝血因子 VII、CHO 细胞/凝血因子 VIII、CHO 细胞/ADAMTS13、CHO 细胞/弗林蛋白酶、和 293 细胞/凝血因子 IX 所构成的组。

16. 一种用于生产至少一种病毒的方法，包括下述步骤：

- (a) 提供细胞培养物；
- (b) 用至少一种病毒感染所述细胞；
- (c) 选择受病毒感染的细胞；以及
- (d) 在包含至少 0.5 mg/L 的多胺的培养基中于细胞中增殖所述至少一种病毒。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述培养基是如权利要求 1 所述的无寡肽的培养基。

18. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述病毒选自于由痘病毒、冠状病毒、正粘病毒、副粘病毒、反向病毒、披膜病毒、黄病毒、肠道病毒、细小核糖核酸病毒、嵌沙样病毒、疱疹病毒、以及腺病毒所构成的组。

19. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述病毒选自于由牛痘病毒、SARS 病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、慢病毒、罗斯河病毒、西尼罗河病毒、黄热病毒、FSME 病毒、以及甲型肝炎病毒所构成的组。

20. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述细胞是 Vero 细胞或鸡胚细胞。

21. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述细胞/病毒组合选自于由 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/西尼罗河病毒、Vero 细胞/SARS 病毒、Vero 细胞/黄热病毒、鸡胚细胞/FSME 病毒、以及鸡胚细胞/修饰牛痘病毒安卡拉（MVA）所构成的组。

无寡肽的细胞培养基

技术领域

[001] 本发明涉及无寡肽的细胞培养基，其包含至少 0.5 mg/L 的多胺；本发明还涉及在所述包含至少 0.5 mg/L 的多胺的无寡肽细胞培养基中培养细胞的方法。本发明还涉及在包含至少 0.5 mg/L 的多胺的培养基中表达至少一种蛋白质的方法，并且涉及在包含至少 0.5 mg/L 的多胺的培养基中制造至少一种病毒的方法。

背景技术

[002] 为了培养细胞、特别是真核细胞、更具体地说哺乳动物细胞，存在一种固有观念，就是必须使用配有所需营养物质的专门培养基，这些营养物质用于细胞的有效生长并用于生产生物制品，尤其是生物药物，例如诸如重组体蛋白、抗体、病毒、病毒抗原以及病毒状颗粒。为了有效地生产所述生物制品，重要的是达到最佳细胞密度以及本身提高的蛋白质表达，以便获得最大的产率。

[003] 细胞培养基配方已经补充有许多添加剂，包括不明确的组分，像胎牛血清（FCS）、数种动物衍生蛋白和/或牛源蛋白质水解物、以及来源于植物或者酵母的蛋白质水解物。

[004] 通常，血清或者血清衍生物比如诸如白蛋白、转铁蛋白或者胰岛素，可能包含不希望有的、可以污染细胞培养基的试剂和由此得到的生物制品。另外，需要对人血清衍生物添加剂进行所有已知病毒的测试，包括可以经血清传播的肝炎病毒和艾滋病病毒 HIV。而且，牛血清和其衍生物承担着牛海绵样脑病 BSE 污染的风险。此外，所有的血清衍生物可能会被未知的物质污染。当在细胞培养基中使用来源于人或动物的血清或者蛋白质添加剂时，特别是如果该细胞被用于制造给药于人的药物或疫苗时，存在许多的问题（例如，不同批次的组合物品质发生变化，并且存在支原体、病毒或牛海绵样脑病 BSE 的污染风险）。

[005] 所以，人们进行了许多尝试，以提供有效的宿主体系和培养条件，其不需要血清或者其他的动物性蛋白质化合物。

[006] 基于来源于植物或酵母的蛋白提取物，已开发了这样的无血清培养基。例如，人们熟知的用于发酵工艺并且可以增强许多在合成培养基上不易生长的微生物、酵母和真菌的生长的大豆水解物。专利 WO 96/26266 描述到，大豆粉的木瓜蛋白酶消化液是碳水化合物的提供源和氮源，并且许多组分可以用于组织培养。Franek 等（生物技术进展（2000）16，688 - 692）

描述了限定的大豆和小麦水解物肽组分的生长和生产率促进效果。

[007] WO 96/15231 公开了一种无血清培养基,由合成的最低必需培养基和酵母提取物组成,用于脊椎动物细胞的增殖和病毒的生产工艺。在 WO 98/15614 中公开了一种培养基配方,其由包含大米肽和酵母提取物及其酶消化液的基础细胞培养基和/或植物脂类组成,用于动物细胞的生长。WO 01/23527 公开了一种培养基,其包含精制的大豆水解物,用于重组细胞的培养。WO 00/03000 公开了一种培养基,其包含大豆水解物和酵母提取物,但还需要重组体形式的动物性蛋白质比如生长因子的存在。

[008] 欧洲]专利 EP-A-0 481 791 描述了一种生物化学限定的用于培养工程菌 CHO 细胞的培养基,其不含由动物源分离的蛋白质、脂类和碳水化合物,其还包括重组胰岛素或者胰岛素类似物、1 %~0.025 % w/v 的木瓜蛋白酶消化的大豆蛋白胨和腐胺。专利公开 WO 98/08934 描述了一种无血清真核细胞培养基,其包含:水解大豆肽(1~1000 mg/L), 0.01~1 mg/L 的腐胺,和多种动物衍生组分包括白蛋白、胎球蛋白、各种激素及其他蛋白质。在上下文中,应当注意,已知标准培养基像 DMEM/Ham's F12 中包含 0.08 mg/L 浓度的腐胺。

[009] 然而,植物和/或酵母水解物是寡肽和其他未知组分及杂质的不明确的混合物。另外,市场上可买到的许多水解物的品质变化极大。其结果是,在重组体蛋白或者病毒产品的生产中有很大的变化(高达 3 倍的变化),这与使用的许多水解物(“批间偏差”)有关。这种不利因素影响到细胞的增殖以及各细胞的蛋白表达。

[010] 总之,现有技术中已知的培养基补充了来源于动物、植物或酵母的蛋白质或多肽提取物;补充了重组形式的蛋白质,例如诸如胰岛素、类胰岛素生长因子或者其他生长因子。

[011] 所以,为克服上述问题,人们很需要一种不含动物、植物和真菌蛋白和/或寡肽的细胞培养基。另外,目前还有一种需要,是提高表达的重组体蛋白产量或者任何其他的表达产品的产量,并且提供一种最佳的细胞培养基,用于生产生物制品比如人用药物或者疫苗。

发明内容

[012] 本发明的一个目的在于提供一种无寡肽的细胞培养基。本发明的另一目的在于提供在所述培养基中培养细胞的方法、以及有效表达重组体蛋白的方法,和/或有效生产病毒的方法。

[013] 本发明的另一个目的在于除去动物、植物和/或酵母衍生水解物,从而提供不包含任何添加的补充蛋白质或寡肽的培养基。

[014] 发明人惊讶地发现,在细胞培养基中添加至少 0.5 mg/L 的多胺可以带来有益效果,不仅会促进细胞生长而且会提高单位细胞的蛋白质和/或病毒表达量。甚至在无寡肽的培养基中也可以取得所述料想不到的有益效果。

[015] 进一步地,根据本发明的无寡肽培养基使得细胞生长保持一致,并且可以提高预期产物特别是靶蛋白质比如重组体蛋白和/或病毒的产量,而与任何蛋白质水解物的品质或批次变化无关。细胞培养基中特定浓度多胺的具体补充具有提高细胞生长率、细胞比生产率和细胞最终密度的作用。

[016] 因此,与本技术领域已知的培养基相比,根据本发明的培养基更有利于重组体蛋白表达、病毒生产和细胞生长速度。另外,根据本发明的无寡肽培养基免除了在细胞培养基中添加蛋白质水解物。

附图说明

图 1 为一图,显示了 GD8/6 细胞在 BAV 培养基中培养时,在培养期间内 2.0 mg/L 腐胺二盐酸盐的添加对体积 FVIII-CoA 生产率的影响,其中,体积 FVIII-CoA 生产率表示为[单位 U/升 L/天 D],培养时间表示为[天]。箭头处为: 11 天,腐胺二盐酸盐的添加量为 (2.0 mg/L)。

图 2 为一表,显示了 GD8/6 细胞在 BAV 培养基中培养时,视需要与铁 (II) 和铜 (II) 的附加补充组合使用的腐胺的添加共同对体积生产率 (QP, 表示为[单位 U/升 L/天 D]) 和细胞比生产率 (qp, 表示为[mU/10⁶ 个细胞/天])、以及比生长速率 μ (d⁻¹, 表示为单位生长率/天) 的影响比较。

图 3 为一表,其显示了 GD8/6 细胞在 BAV 培养基中培养时,腐胺和/或鸟氨酸对比生长速率 (μ 绝对值、 μ 相对值) 和细胞比生产率 (qp 绝对值, 表示为[mU/10⁶ 个细胞/天; qp 相对值, 表示为%) 的影响的比较。

图 4 为一表,显示了 GD8/6 细胞在 BAV 培养基中培养时,腐胺和精胺对比生长速率 (μ 绝对值, μ 相对值) 和细胞比生产率 (qp 绝对值, qp 相对值) 的影响的比较。

图 5 是一表,显示了 GD8/6 细胞在 BAV 培养基中培养时,腐胺和乙醇胺对比生长率 (μ 绝对值, μ 相对值) 和细胞比生产率 (qp 绝对值, qp 相对值) 的影响比较。

图 6 所示为一图,描述了 3.6 mg/L 腐胺二盐酸盐的添加对平均 MVA 病毒滴度的影响,其中滴度表示为[TCID₅₀/mL x 10⁸]; -: 未添加腐胺; Putr: 添加了 3.6 mg/L 的腐胺二盐酸盐。

图 7 所示为一图,描述了各种浓度的腐胺二盐酸盐的添加对平均 MVA 病毒滴度的影响,其中用[mg/L]表示浓度; 用[TCID₅₀/mL x 10⁸]表示滴度。

具体实施方式

[017] 本发明的一个方面涉及一种包含至少 0.5 mg/L 的多胺的无寡肽细胞培养基。

[018] 除非另作说明，本申请文件中的浓度值指的是游离碱形式的组分浓度。

[019] 术语“多胺”指的是源于生物的多胺的任何基团，其是芳香族或者阳离子氨基酸衍生的有机聚阳离子。多胺由碳、氮和氢组成，并且包含两个以上氨基基团。多胺具有一个以上正电荷和疏水性构架。该术语包含，例如，选自尸胺、腐胺、亚精胺、精胺、胍基丁胺、鸟氨酸及其组合物的分子。在本发明的一个具体实施方式中，无寡肽的培养基包含鸟氨酸、或腐胺、或精胺、或其组合物。

[020] 在根据本发明的无寡肽的细胞培养基的另一个实施方式中，多胺来源于非蛋白质水解物的提供源。在一种实施方式中，多胺通过合成方式制造。

[021] 在本发明的一个具体实施方式中，多胺浓度至少为约 0.5 mg/L；在另一个实施方式中，多胺浓度至少为约 1 mg/L；在另一种实施方式中，多胺浓度至少为约 2 mg/L；在再一个实施方式中，多胺浓度至少为 5 mg/L；在另一个实施方式中，多胺浓度至少为 8 mg/L；并且在又一种实施方式中，多胺浓度至少为 10 mg/L。

[022] 在本发明的一个具体实施方式中，培养基中的多胺浓度范围为约 0.5~30 mg/L，在另一个实施方式中为约 0.5~20 mg/L，在又一种实施方式中为约 1.0~20 mg/L，在再一种实施方式中为约 2.0~20 mg/L，在另一种实施方式中为约 2~10 mg/L，在再一实施方式中为约 2~8 mg/L，并且在另一种实施方式中为约 2~5 mg/L。

[023] 如上所述浓度是纯多胺的各自浓度。如果使用多胺衍生物或包含化合物的多胺，那么多胺基团的浓度在上述特定范围内。例如，2 mg/L 腐胺二盐酸盐相当于约 1.095 mg/L 的腐胺浓度（无 2HCl）。

[024] 根据本发明的术语“无寡肽的细胞培养基”，指的是无蛋白质的培养基，其不包含寡肽比如来源于蛋白质水解物的寡肽。在一种实施方式中，培养基不包含具有二十个以上氨基酸的寡肽。在本发明的一个实施方式中，培养基不包含具有十五个以上氨基酸的寡肽。在本发明的另一个实施方式中，培养基不包含具有十个以上氨基酸的寡肽。在一种实施方式中，培养基不包含具有七个以上氨基酸的寡肽；在另一个实施方式中，培养基不包含具有五个以上氨基酸的寡肽；在再一个实施方式中，培养基不包含具有三个以上氨基酸的寡肽。根据本发明的另一个实施方式，培养基不包含具有两个以上氨基酸的寡肽。

[025] 根据本发明的培养基可以可选地包含谷胱甘肽和/或至少一种稳定形式的谷氨酰胺，例如，L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。在此使用的术语“谷胱甘肽”描述了一种由氨基酸谷氨酸、半胱

氨酸和甘氨酸组成的三肽，包括氧化型谷胱甘肽，即，二硫化谷胱甘肽，其为在氧化过程中通过在半胱氨酸巯基侧链之间的二硫键形成的谷胱甘肽二聚物。

[026] 在本发明的实施方式中，无寡肽的细胞培养基不包含具有三个以上氨基酸的寡肽，但可可选地包含谷胱甘肽。

[027] 在另一个实施方式中，无寡肽的细胞培养基不包含具有两个以上氨基酸的寡肽，但可可选地包含谷胱甘肽和/或至少一种稳定形式的谷氨酰胺。

[028] 在根据本发明的培养基中，要避免的典型的蛋白和/或寡肽是那些在血清和血清衍生物中发现的蛋白和/或寡肽，比如，诸如白蛋白、转铁蛋白、胰岛素或其他的生长因子、以及其重组体形式、或者是源于植物或酵母水解物的寡肽或其超滤形式。

[029] 根据本发明的无寡肽的培养基可以基于任何通常为本领域的技术人员所熟知的基础培养基，比如 DMEM、Ham's F12、Medium 199、McCoy 或 RPMI。该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、以及碳氢化合物源，各个成分的含量应能维持细胞的培养，所述含量通常已为本领域的技术人员所熟知。该培养基可以包含辅助性物质，比如，缓冲物质例如碳酸氢钠、抗氧化剂、抵消机械应力的稳定剂、或蛋白酶抑制剂。视需要，可以添加非离子型表面活性剂例如聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物和/或混合物（例如 Pluronic F68®, SERVA 公司）。

[030] 在根据本发明的培养基的实施方式中，多胺控制着 DNA 合成和 RNA 合成、和/或细胞增殖、和/或细胞分化、和/或细胞膜稳定性、和/或抗氧化性 DNA 保护。

[031] 在一种实施方式中，向无寡肽的细胞培养基中添加至少 0.5 mg/L 的多胺提高了在培养细胞中的蛋白质和/或病毒表达。在另一个实施方式中，通过向无寡肽的细胞培养基中添加至少 0.5 mg/L 的多胺，可以将培养细胞中的蛋白质表达或者病毒滴度提高至少 50%。在再一个实施方式中，所述提高是至少 60%。在又一个实施方式中，通过向无寡肽的细胞培养基中添加至少 0.5 mg/L 的多胺，将细胞比生产率提高至少两倍；在另一个实施方式中，细胞比生产率提高至少三倍。在再一个实施方式中，添加至少 0.5 mg/L 的多胺会导致蛋白质表达和/或病毒滴度提高到至少 400%；在另一个实施方式中，提高到至少 500%；在另一个实施方式中，提高到至少 600%；在另一种实施方式中，提高到至少 700%。

[032] 在一种实施方式中，通过向无寡肽的细胞培养基中添加至少 0.5 mg/L 的多胺，培养细胞的比生长速率可以被提高。在另一种实施方式中，所述比生长速率可以被提高 10%。在再一个实施方式中，所述比生长速率可以被提高 20%。在又一个实施方式中，所述比生长速率可以被提高 50%。在另一种实施方式中，所述比生长速率可以被提高 70%。在另一个实施方

式中,所述比生长速率可以被提高 80%。在再一个实施方式中,所述比生长速率可以被提高 90%。在又一个实施方式中,所述比生长速率可以被提高 100%。

[033] 在本发明的另一个实施方式中,对培养基以化学方法进行限定。在此使用的术语“以化学方法进行限定”指的是,培养基不包含任何不明确的补充物,比如,诸如动物组成部分、器官、腺体、植物、或酵母的提取物。因此,需要对以化学方法进行限定的培养基各组分进行精确地限定。

[034] 本发明进一步涉及一种培养细胞的方法,包括下述步骤:

- (a) 提供根据本发明的无寡肽的细胞培养基,以及
- (b) 在培养基中增殖细胞从而形成细胞培养物。

[035] 本发明不局限于任何类型的细胞。细胞类型的例子包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、鸟类的细胞、细菌细胞、和酵母细胞。该细胞可以是例如干细胞、或用重组基因表达用载体转化的重组细胞、或者用制造病毒产物用病毒转染的细胞。该细胞也可以是,例如,生产所研究蛋白质的未进行重组转化的细胞,例如产生抗体的 B 细胞,其可以例如通过类似 Epstein Barr 病毒感染的病毒感染而转化成无限增殖状态。该细胞也可以是例如初级细胞,例如鸡胚细胞、或者原发细胞系。用于体外病毒生产的细胞是有用的。有用的细胞的具体例子包括: 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、Per C6 细胞、和鸡胚细胞。

[036] 根据本发明使用的细胞可以通过例如选自于分批培养、补料分批培养、灌注培养、和恒化培养的方法进行培养,所有这些方法通常是本技术领域所熟知的。

[037] 本发明进一步涉及一种用于表达至少一种蛋白质比如异源蛋白或自体蛋白、或重组体蛋白的方法,包括下述步骤:

- a) 提供细胞培养物;
- b) 将包含编码至少一种蛋白质的序列的至少一种核酸序列导入所述细胞;
- c) 选择携带所述核酸序列的细胞;以及
- d) 在包含至少 0.5 mg/L 的多胺的培养基中表达细胞中的蛋白质。

[038] 在本发明的一种实施方式中,步骤 d) 的培养基是根据本发明的无寡肽的培养基。在本发明的另一种实施方式中,步骤 a) 的细胞培养物已经在根据本发明的无寡肽的细胞培养

基中进行过培养。在另一个实施方式中，步骤 a) 至 d) 在根据本发明的无寡肽的细胞培养基中进行。

[039] 该包含至少一种蛋白质编码序列的核酸序列可以是载体。该载体可以通过病毒传递，或者可以是质粒。该用于编码蛋白质的核酸序列可以是特异基因或其生物学功能部分。在一种实施方式中，该蛋白质至少是凝血因子如 Factor VIII 的生物学活性部分，或者至少是包含在红血球和血管生成素的产物中的蛋白质例如促红细胞生成素的生物学活性部分，或者是单克隆抗体。

[040] 在一种实施方式中，所述核酸序列包含编码至少一种蛋白质的序列，该蛋白质选自于由凝血因子 VII、凝血因子 VIII、凝血因子 IX、vWF、ADAMTS13 和弗林蛋白酶所构成的组。

[041] 在本发明的一种实施方式中，该核酸还包括其他适合于控制蛋白质表达的序列，比如启动子序列、增强子、TATA 框、转录起始位点、多聚接头、限制酶切位点、聚 A 序列、蛋白质加工序列、选择性标记等，它们通常已为本领域的技术人员所熟知。

[042] 在本发明的一个具体实施方式中，细胞选自于由 CHO 细胞、293 细胞、和 BHK 细胞所构成的组。

[043] 根据本发明的另一个实施方式，可以用重组载体转化下述细胞系以便用于表达各产物：用于生产重组凝血因子例如 Factor VII、和/或 Factor VIII、和/或单克隆抗体的 CHO 细胞；用于生产重组红细胞生成素的 Epstein Barr 病毒转化 BHK 细胞；用于人抗体生产的无限增殖人 B 细胞。有用的细胞/蛋白质组合例如是：CHO 细胞/凝血因子 VIII、CHO 细胞/凝血因子 VII、CHO 细胞/ADAMTS13、CHO 细胞/弗林蛋白酶、和 293 细胞/凝血因子 IX。

[044] 在本发明的另一个实施方式中，与通过不在本发明培养基中培养的细胞进行的蛋白质表达相比，至少一种通过在根据本发明的培养基中培养的细胞所进行的蛋白质表达得到提高。在另一个实施方式中，所述表达提高至少 10%；根据另一种实施方式，提高至少 50%。

[045] 本发明还涉及一种用于生产至少一种病毒或病毒的至少一部分的方法，包括下述步骤：

- a) 提供细胞培养物；
- b) 用至少一种病毒感染该细胞；
- c) 选择受病毒感染的细胞；以及
- d) 在包含至少 0.5 mg/L 的多胺的培养基中于细胞内增殖至少一种病毒。

[046] 在本发明的一种实施方式中，步骤 d) 的培养基是根据本发明的无寡肽的培养基。在本发明的另一种实施方式中，步骤 a) 的细胞培养物已经在根据本发明的无寡肽的细胞培养

基中进行过培养。在另一个实施方式中，步骤 a) 至 d) 在根据本发明的无寡肽的细胞培养基中进行。

[047] 用于根据本发明的方法中的病毒可以是任何病毒，例如：痘病毒，比如牛痘或者减毒牛痘病毒；冠状病毒，例如 SARS 病毒；正粘病毒，例如流行性感冒 A 或 B 病毒；副粘病毒；反向病毒，例如慢病毒；披膜病毒，例如罗斯河病毒；黄病毒，例如西尼罗河病毒，黄热病毒，或者 FSME 病毒（即蜱传脑炎病毒）；肠道病毒，例如甲型肝炎病毒；细小核糖核酸病毒；嵌沙样病毒；疱疹病毒；或者腺病毒。在本发明的一个实施方式中，病毒是修饰牛痘病毒安卡拉（MVA）。该病毒可以根据本发明进行增殖，用于各疫苗的生产。

[048] 病毒可以是野生型-病毒、减毒病毒、重排病毒、或重组细胞病毒或其组合物，例如减毒体和重组体。另外，可以使用感染性核酸克隆，以代替用病毒感染细胞的所用实际病毒子。也可以使用裂解的病毒子。

[049] 可以使用用于生产病毒的方法来生产包含病毒、病毒抗原或病毒类颗粒的免疫原组成物。

[050] 用于根据本发明的生产病毒的方法中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、和酵母细胞所构成的组。在一种实施方式中，用于根据本发明的生产病毒的方法中的细胞选自于由 Vero 细胞和鸡胚细胞所构成的组。

[051] 用于生产病毒或病毒一部分的细胞与病毒的有用组合是，例如：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/西尼罗河病毒、Vero 细胞/SARS 病毒、Vero 细胞/黄热病毒、以及鸡胚细胞/FSME 病毒。在本发明的一种实施方式中，细胞/病毒组合是鸡胚细胞/修饰牛痘病毒安卡拉（MVA）。

[052] 有用的培养方法包括分批培养、补料分批培养、灌注培养和恒化培养。

[053] 以下用实施例进一步阐明本发明，但并不限制本发明。

实施例

实施例 1: BAV 培养基的制备

用包含无机盐、氨基酸、维生素及其他组分的基本 DMEM/Ham's F12 (1:1) 培养基（Life technologies 公司，32500 粉末），制备无寡肽的培养基（BAV 培养基）。还添加了 L-谷氨酰胺（600 mg/L）、抗坏血酸（20 μ M）、乙醇胺（25 μ M）、Synperonic®（SERVA）（0.25 g/L）、亚硒酸钠（50 nM）。另外将下述必需氨基酸补充至细胞培养基：一水 L-天冬酰胺 20 mg/L、一水 L-半胱氨酸盐酸盐 15 mg/L、L-胱氨酸二盐酸盐 20 mg/L、L-脯氨酸 35 mg/L、L-色氨酸 20 mg/L。

实施例 2：测定细胞数

可以用如 Schaerfe 等在文献 *Biotechnologie in LaborPraxis* 10: 1096-1103 (1988)中所述的 CASY®细胞计数器通过计数确定悬浮细胞或固定化细胞的细胞数；也可以通过柠檬酸萃取和细胞核荧光染色、接着用 NucleoCounter® (Chemometec 公司，丹麦)通过计数来测定细胞数。根据某一时间段(t)内悬浮细胞恒化培养物稳态下的细胞密度(Xt)增加值和/或稀释率(D)，按照下述公式计算出比生长速率(μ)：

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

实施例 3：FVIII 活性的测定

通过显色分析(Chromogenic, 瑞典)测量凝血因子 VIII(FVIII)的活性(参见图 1 至 5)。

实施例 4：体积生产率(QP)和细胞比生产率(qp)的计算

由生产体系中每天每升反应器体积产生的活性单位量(U/L/d)计算出体积生产率(QP)。

细胞比生产率(qp)被定义为每天每细胞数的蛋白特定生产量(U 或者 μ g)。

实施例 5：细胞大规模培养条件

将重组体哺乳动物细胞(例如稳定表达 Factor VIII 的 CHO 细胞，比如 GD8/6 细胞)的细胞培养物加入 10 L 生物反应器，在恒化培养基悬浮液中生长。恒定保持培养条件为 37 °C、氧饱和度 20%、并且 pH 7.0 至 7.1。培养基中恒定补料 BAV 培养基。

实施例 6：多胺的添加对 FVIII 表达的影响

如实施例 5 中描述的那样，将 GD8/6 细胞加入 10 L 生物反应器，在恒化培养基中进行培养。连续进料 BAV 培养基培养 11 天后，导致生产率降低至 100U/L/d。通过添加腐胺二盐酸盐(2 mg/L)，体积 FVIII 表达量提高 800% (参见图 1)。因此，对于 GD8/6 细胞系而言，腐胺可以清楚地确定为细胞特异表达的驱动因子。

实施例 7：多胺和铁(II)及铜(II)的添加对 FVIII 表达的影响

如在实施例 5 中描述的那样，将 GD8/6 细胞在 10 L 生物反应器中进行恒化培养，直至平均生产率为 271 U/L/D，同时细胞比生产率和比生长速率较低。通过添加腐胺二盐酸盐(2 mg/L)，FVIII 表达量增加到 870 U/L/D，这主要是因为细胞比生产率被提高。以不同于原来包含在大豆水解物中的典型浓度而额外补充的铁(II)和铜(II)导致了比生长速率提高大约至 0.60 d^{-1} ，并且可以实现将细胞的比生产率提高至高于 $1700 \text{ mU}/10^6$ 个细胞/天。在这些条件下，高于 2685 U/L/D 的体积生产率被获得。进一步地，细胞密度的提高导致体积生产率超过 3000 U/L/D。在可比的发酵条件下，使用包含培养基的大豆水解物时的最大体积生产率是 2000~2500 U/L/D，表明仅包含腐胺和 2 种附加金属离子的以化学方法进行限定的培养基优于

以前该工艺中任何包含被研究的培养基配方的大豆水解物（参见图 2）。

实施例 8：细胞小规模培养条件

在工作容积为 200 mL 的 Techne 旋转烧瓶中，在 37°C，不控制 pH 和 pO_2 的条件下，以分批补料形式用 GD8/6 细胞进行悬浮培养的小规模实验。该培养基中供给如上限定的 BAV 培养基，另外补充有腐胺二盐酸盐、鸟氨酸盐酸盐、精胺四盐酸盐、或乙醇胺、或其组合物，补充物的浓度范围为 0-18 mg/L（相当于 0-10 mg/L 的非盐酸盐形式的生物胺（参见图 3 至 5）。

实施例 9：数种多胺和多胺组合物的添加对 FVIII 表达的影响

将如在实施例 8 中描述的用 BAV 培养基培养的 GD8/6 细胞进行离心，接着转移到工作容积为 200 mL 的 Techne 旋转烧瓶中，并且用限定的培养基以约 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/mL 的细胞密度培养，该培养基中补充有如图 3、4 和 5 中所示的乙醇胺、腐胺、鸟氨酸、和/或精胺。作为生物胺路径中腐胺的前体的鸟氨酸可以以依赖浓度的方式部分地代替腐胺。将不同浓度的鸟氨酸添加至包含腐胺二盐酸盐的培养基中，导致比 FVIII 生产率和比生长速率的额外提高（参见图 3）。然而，不是根据本发明的多胺的乙醇胺，既不能以任何研究的浓度代替腐胺，而且在包含腐胺的培养基中乙醇胺浓度的提高也不能导致体积生产率和比生长速率的显著提高（参见图 5）。在相似条件下的进一步实验显示，作为生物胺路径中的另一个中间体的精胺也可以以依赖浓度的方式代替腐胺（参见图 4）。

实施例 10：多胺的添加对 MVA 病毒生产的影响

将鸡胚的初级细胞培养物加入 Techne 旋转烧瓶（工作容积 200 mL），使用未补充或补充了 3.6 mg/L 腐胺二盐酸盐的无肽的培养基（FM 培养基）进行培养。

用包含无机盐、氨基酸、维生素及其他组分的基本 M199 培养基（Life technologies 公司，31150 粉末），制备了 FM 培养基。还添加了 $NaHCO_3$ （添加量 4.4 g/L），硫酸庆大霉素（50 μ g/L）和硫酸新霉素（50 μ g/L）。

用 MVA 病毒感染细胞培养物，并且在 TCID₅₀ 试验中分析上清液的病毒滴度。通过添加腐胺，平均病毒滴度（各样品 n=16 个）可以提高大约 50%（参见图 6）。

实施例 11：数个剂量的多胺的添加对 MVA 病毒生产的影响

将鸡胚的初级细胞培养物加入 Techne 旋转烧瓶（工作容积 200 mL），使用未补充或补充了 3.6 mg/L 和 9 mg/L 腐胺二盐酸盐的无肽的培养基（CEM 培养基）进行培养。

用包含无机盐、氨基酸、维生素及其他组分的基本 DMEM/Ham's F12 (1:1) 培养基（Life technologies 公司，32500 粉末），制备 CEM 培养基。还添加了 $NaHCO_3$ （2 g/L）、L-谷氨酰胺（600 mg/L）、抗坏血酸（20 μ M）、乙醇胺（25 μ M），Synperonic®（SERVA 公司）

(0.25 g/L)、亚硒酸钠 (50 nM)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (600 $\mu\text{g/L}$)、硫酸庆大霉素 (50 $\mu\text{g/L}$) 和硫酸新霉素 (50 $\mu\text{g/L}$)。另外将必需氨基酸补充至细胞培养基。另外将下述必需氨基酸补充至细胞培养基：一水 L-天冬酰胺 20 mg/L、一水 L-半胱氨酸盐酸盐 15 mg/L、L-胱氨酸二盐酸盐 20 mg/L、L-脯氨酸 35 mg/L、L-色氨酸 20 mg/L。

用 MVA 病毒感染细胞培养物，并且在 TCID₅₀ 试验中分析上清液的病毒滴度。通过添加 9 mg/L 腐胺，平均病毒滴度（各样品 n=4 个）可以提高大约 60%（参见图 7）。

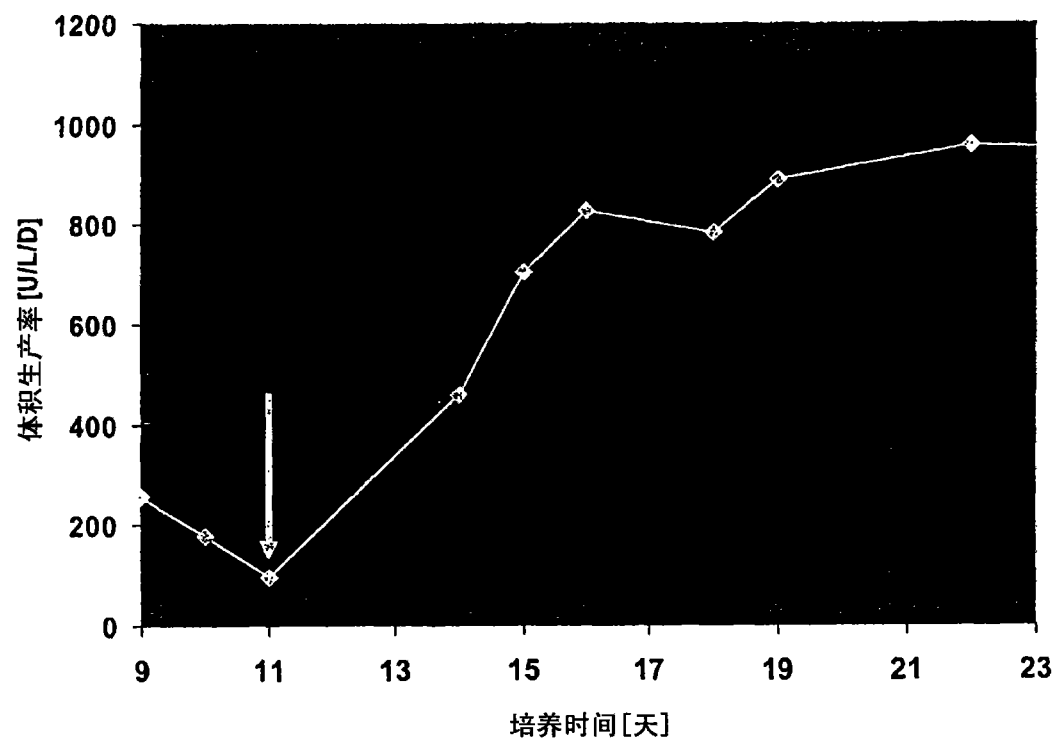


图 1

	QP [U/L/D]	qp [mU/10 ⁶ 个 细胞/天]	μ [d ⁻¹]
无补充物的 BAV 培养基	271	236	0.37
BAV 培养基+腐胺二盐酸盐 (2 mg/L)	870	671	0.41
BAV 培养基+腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +Fe (II) (添加 2.3×原浓度) +Cu (II) (添加 2.0×原浓度)	1393	958	0.59
BAV 培养基+腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +Fe (II) (添加 2.3×原浓度) +Cu (II) (添加 12.5×原浓度)	2685	1744	0.63
BAV 培养基+腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +Fe (II) (添加 2.3×原浓度) +Cu (II) (添加 12.5×原浓度) 随细胞密度增加	3107	1756	0.63

图 2

	qp 绝对值 [mU/10 ⁶ 个 细胞/天]	qp 相对值 [%]	μ 绝对值 [d ⁻¹]	μ 相对值 [%]
未添加生物胺的 BAV 培养基	172	100	0.19	100
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L)	697	405	0.34	179
鸟氨酸盐酸盐 (2 mg/L)	457	266	0.34	179
鸟氨酸盐酸盐 (10 mg/L)	587	341	0.37	195
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +鸟氨酸盐酸盐 (2 mg/L)	806	467	0.36	189
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +鸟氨酸盐酸盐 (10 mg/L)	1050	610	0.39	205

图 3

	qp 绝对值 [mU/10 ⁶ 个 细胞/天]	qp 相对值 [%]	μ 绝对值 [d ⁻¹]	μ 相对值 [%]
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L)	2303	100	0.61	100
精胺四盐酸盐 (0.4 mg/L)	1331	58	0.59	97
精胺四盐酸盐 (2 mg/L)	2639	115	0.60	98
精胺四盐酸盐 (10 mg/L)	2651	115	0.59	97

图 4

	qp 绝对值 [mU/10 ⁶ 个 细胞/天]	qp 相对值 [%]	μ 绝对值 [d ⁻¹]	μ 相对值 [%]
标准 BAV 培养基 乙醇胺 (1.53 mg/L) 标准浓度=阴性对照	172	100	0.19	100
乙醇胺 (添加 3.83 mg/L)	188	109	0.23	118
乙醇胺 (添加 15.3 mg/L)	183	106	0.22	118
乙醇胺 (添加 38.3 mg/L)	171	100	0.23	125
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +乙醇胺 (添加 3.83 mg/L)	545	317	0.36	193
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +乙醇胺 (添加 15.3 mg/L)	609	354	0.32	173
腐胺二盐酸盐 (2 mg/L) +乙醇胺 (添加 38.3 mg/L)	553	322	0.32	172

图 5

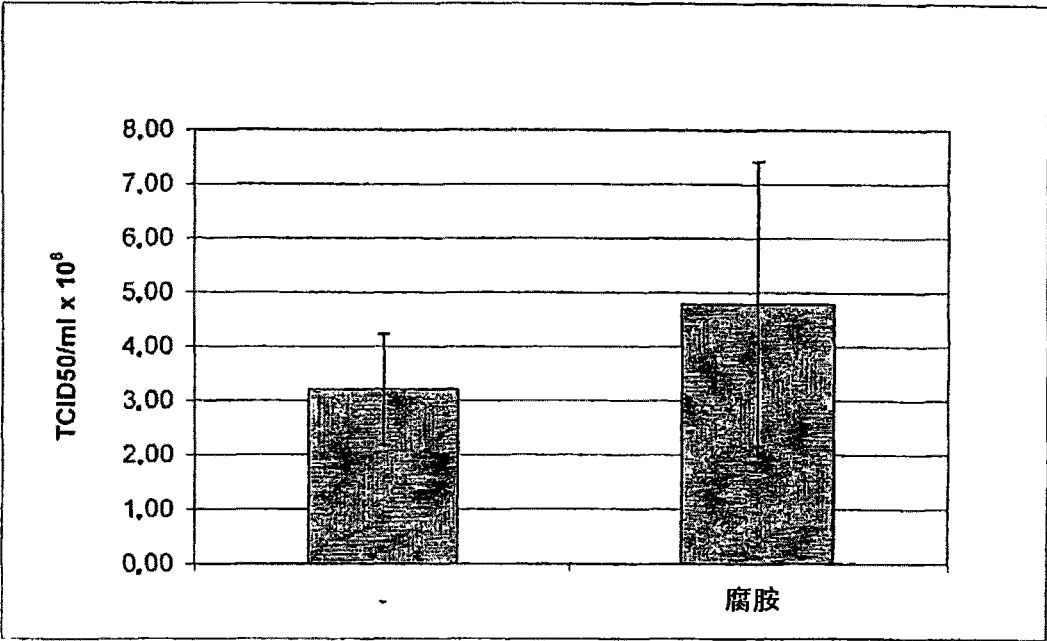


图 6

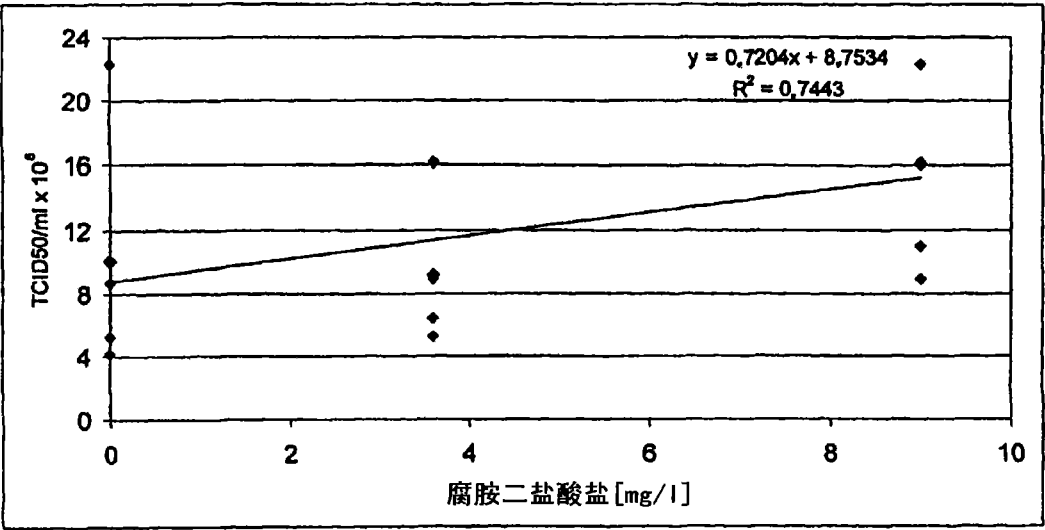


图 7