



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104293729 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410051586. 4

(22) 申请日 2014. 02. 14

(71) 申请人 上海美百瑞生物医药技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区蔡伦路 780 号  
715 室

(72) 发明人 陈亮 都业杰

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效的无血清培养基

(57) 摘要

本发明属于动物细胞培养技术领域,具体涉及一种无血清培养基。本发明公开了一种高效的无血清培养基,其成分主要包括:氨基酸,无机盐,缓冲体系,维生素,微量元素,碳源,脂类物质。本发明的培养基成分可以在成分的种类上与目前商业化的培养基相类似,但各组分的含量是经过长期的研究获得的,各种营养成分含量均得到优化,且各营养成分得到平衡,不含有重组蛋白的化学成分限定的培养基系统可以极大提高 CHO 的生长,提高表达量,极大降低的培养基的成本,有利于重组蛋白质质量的工艺稳定。

1. 一种高效的无血清培养基,其特征在于其由下列物质组成:

天冬氨酸 6.0-10.0mM;苏氨酸 1.5-2.0mM;丝氨酸 2.0-3.0mM;  
谷氨酸 6.0-8.0mM;缬氨酸 3.0-4.0mM;半胱氨酸 0.5-1.0mM;  
甲硫氨酸 1.2-1.5mM;异亮氨酸 2.5-3.0mM;亮氨酸 2.5-3.0mM;  
酪氨酸 0.6-1.0mM;苯丙氨酸 0.5-1.0mM;色氨酸 0.5-1.0mM;  
赖氨酸 2.2-2.5mM;组氨酸 1.2-1.5mM;精氨酸 1.5-1.8mM;  
脯氨酸 3.5-4.0mM;甘氨酸 0.5-1.0mM;丙氨酸 0.4-1.0mM;  
天冬酰胺 6.0-10.0mM;  
生物素 0.001-1.005mM;肌醇 0.1-0.2mM;叶酸 0.01-0.02mM;  
烟酸 0.03-0.05mM;吡洛醇 0.007-0.01mM;叶黄素 0.0005-0.001mM;  
硫铵 0.007-0.01mM;维生素 B12 0.0003-0.0009mM;  
泛酸钙 0.01-0.03mM;磷酸二氢钠 2.0-3.0mM;丙酮酸钠 1.0-2.0mM;  
氯化钙 0.2-0.4mM;氯化镁 0.4-0.6mM;氯化钠 8.0-10.0mM;  
氯化钾 0.5-1.0mM;硫酸镁 0.5-1.0mM;碳酸氢钠 10.0-20.0mM;  
硫酸钾 1.0-2.0mM;.  
腐胺 0.01mM;乙醇胺 0.1mM;亚油酸 0.001mM;  
柠檬酸铁 10mg / L;硫酸铜 0.00005-0.0001mM;硫酸锌 0.0005-0.001mM;  
硒酸钠 0.00001-0.0001mM;氯化铝 0.000005-0.00001mM;  
碘化钾 0.00004-0.00006mM;氯化钴 0.00003-0.00007mM;  
葡萄糖 30.0mM-50.0mM。

2. 如权利要求 1 所述的无血清培养基,其特征在于所述无血清培养基还含有保护细胞免受剪切力伤害的表面活性剂,其含量为 0.5-2.0g / L。

3. 如权利要求 2 所述的无血清培养基,其特征在于所述表面活性剂为嵌段式聚醚 F68,其含量为 1.0-2.0g / L。

4. 如权利要求 1 所述的无血清培养基,其特征在于所述无血清培养基还含有 1.0-2.0mg / L 酚红。

5. 如权利要求 1 所述的无血清培养基,其特征在于所述无血清培养基中谷氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸浓度均为 6mM。

## 一种高效的无血清培养基

### 技术领域

[0001] 本发明属于动物细胞培养技术领域,具体涉及一种无血清培养基。

### 背景技术

[0002] 培养基是指可以维持动物细胞,微生物细胞,植物细胞等在体外生长的一种液体或者固体介质。本专利设计的领域是用于培养动物细胞尤其是 CHO 悬浮细胞的液体培养基。目前用于动物细胞的培养基按照动物培养基的发展历程可以分为:含血清的培养基,低血清培养基,无血清培养基(含有一些植物水解物等成分补确定的培养基),化学成分确定的培养基(化学成分确定,但可能含有一些重组蛋白)及不含有重组蛋白的化学成分确定的培养基,其中不含有重组蛋白的化学成分确定的培养基是培养基开发的最高级阶段。经过基因工程改造的 CHO 细胞可以在培养基中生长同时高效地分泌重组蛋白药物,从而实现高水平地表达抗体及其他重组蛋白。

[0003] 目前市场上,各个大型培养基公司均推出了各种不同水平的 CHO 细胞培养基。几个大公司包括 Gibco, Hyclone, Invrinc, Millipore, Sartorius 等均推出了相应的 CHO 培养基。目前各个公司顶级的培养基产品为化学成分确定的培养基。相对于含不确定成分的无血清培养基,成分确定的培养基具有质量可控,成分明确,生产的蛋白药物批次稳定性好。化学限定培养基已经是生物制药未来的不二选择。含有重组蛋白的化学成分确定的培养基具有成本高等不足,除去培养基中的重组蛋白包括胰岛素,IGF, HSA,不降低表达量是将来培养基的最终发展方向。

### 发明内容

[0004] 本发明目的在于彻底克服从培养基中除去这些重组蛋白同时维持 CHO 细胞的正常生长及高水平的表达量,最终开发出了一种可用于培养 CHO 细胞的不含有重组蛋白的化学成分确定的培养基。

[0005] 本发明公开了一种高效的无血清培养基,其成分主要包括:氨基酸,无机盐,缓冲体系,维生素,微量元素,碳源,脂类物质,及其他成分,其特征在于其由下列物质组成:

[0006] 天冬氨酸 6.0-10.0mM;苏氨酸 1.5-2.0mM;丝氨酸 2.0-3.0mM;

[0007] 谷氨酸 6.0-8.0mM;缬氨酸 3.0-4.0mM;半胱氨酸 0.5-1.0mM;

[0008] 甲硫氨酸 1.2-1.5mM;异亮氨酸 2.5-3.0mM;亮氨酸 2.5-3.0mM;

[0009] 酪氨酸 0.6-1.0mM;苯丙氨酸 0.5-1.0mM;色氨酸 0.5-1.0mM;

[0010] 赖氨酸 2.2-2.5mM;组氨酸 1.2-1.5mM;精氨酸 1.5-1.8mM;

[0011] 脯氨酸 3.5-4.0mM;甘氨酸 0.5-1.0mM;丙氨酸 0.4-1.0mM;

[0012] 天冬酰胺 6.0-10.0mM;

[0013] 生物素 0.001-1.005mM;肌醇 0.1-0.2mM;叶酸 0.01-0.02mM;

[0014] 烟酸 0.03-0.05mM;吡洛醇 0.007-0.01mM;叶黄素 0.0005-0.001mM;

[0015] 硫酸 0.007-0.01mM;维生素 B 120.0003-0.0009mM;泛酸钙 0.01-0.03mM;

- [0016] 磷酸二氢钠 2.0-3.0mM ;丙酮酸钠 1.0-2.0mM ;氯化钙 0.2-0.4mM ;
- [0017] 氯化镁 0.4-0.6mM ;氯化钠 8.0-10.0mM ;氯化钾 0.5-1.0mM ;
- [0018] 硫酸镁 0.5-1.0mM ;碳酸氢钠 10.0-20.0mM ;硫酸钾 1.0-2.0mM ;
- [0019] 腐胺 0.01mM ;乙醇胺 0.1mM ;亚油酸 0.001mM ;
- [0020] 柠檬酸铁 10mg / L ;硫酸同 0.00005-0.0001mM ;硫酸锌 0.0005-0.001mM ;
- [0021] 硒酸钠 0.00001-0.0001mM ;氯化铝 0.000005-0.00001mM ;
- [0022] 碘化钾 0.00004-0.00006mM ;氯化钴 0.00003-0.00007mM ;葡萄糖 30.0mM-50.0mM。
- [0023] 在一些实施方案中,所述无血清培养基还含有保护细胞免受剪切力伤害的表面活性剂,其含量为 0.5-2.0g / L ;其中优选为 1.0-2.0g / L 嵌段式聚醚 F68 (PF-68)。
- [0024] 在一些实施方案中,所述无血清培养基还含有 1.0-2.0mg / L 酚红。
- [0025] 在一些实施方案中,所述无血清培养基中谷氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸浓度均为 6mM。
- [0026] 本发明的培养基成分可以在成分的种类上与目前商业化的培养基相类似,但各组分的含量是经过长期的研究获得的,各种营养成分含量均得到优化,且各营养成分得到平衡,不含有重组蛋白的化学成分限定的培养基系统可以极大提高 CHO 的生长,提高表达量,极大降低的培养基的成本,有利于重组蛋白质质量的工艺稳定。

#### 附图说明

[0027] 图 1 不同谷氨酸,天冬酰胺,天冬氨酸浓度对细胞抗体表达量的影响 ;

#### 具体实施方式

[0028] 除非另有指示或定义,否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义,该含义将为本领域技术人员所了解。

[0029] 参考例如标准手册,为进一步详细描述在本发明的实践中所使用的常规技术,实践者可参看有关细胞生物学、组织结构学以及胚胎学的标准的教科书及评论。包括 Teratocarcinomas and embryonic stem cell :A practical approach [E. J. Robertson 编, IRL 出版有限公司,1987] ;Guide to techniques in Mouse Development [P. M. Waserman 等编,学术出版社,1993] ;Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro [M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225 :900,1993] ;Properties and uses of Embryonic Stem Cells :Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy [P. D. Rathjen 等, Reprod. Fertil. Dev. 10 :31,1998]。

[0030] 细胞生物学、蛋白质化学、和抗体技术可以在“蛋白科学中的当前方案, [J. E. Colligan 等编辑, Wiley & Sons]、“细胞生物学中的当前方案” [J. S. Bonifacino 等, Wiley & Sons] 和“免疫学功时当亦方案” [J. E. Colligan 等编辑, Wiley & Sons] 中找到。与本发明相关的试剂、克隆载体、和基因操作试剂盒可从商业供应商那得到,例如 BioRad、Stratagene、Invitrogen、ClonTech 以及 sigma-Aldrich 公司。

[0031] 细胞培养方法通常在“动物细胞培养:基本技术手册”最新版本 (R. I. Freshney 编辑, Wiley & Sons) ;“细胞培养一般技术” (M. A. Harrison 和 I. F. Rae, 剑桥大学出版) ;

和胚胎干细胞：方法和操作规定”（K. Turksen 编辑，Humana 出版）中有描述。组织培养基和试剂可从商业供应商那得到，例如 Gibco / BRL、Nalgene-Nunc International、Sigma Chemical Co.、以及 ICN Biomedicals。以及本文中引用的一般现有技术；

[0032] 此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中，引用的其他参考文献。以下结合具体实施例，进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0033] 实施例 1、无血清培养基的制备

[0034] 表 1. 无血清培养基配方

[0035]

氨基酸	浓度 (mM)	维生素部分	浓度 (mM)	其他成分	浓度 (mM)
天冬氨酸	6.0-10.0	生物素	0.001-1.005	腐胺	0.01
苏氨酸	1.5-2.0	肌醇	0.1-0.2	乙醇胺	0.1
丝氨酸	2.0-3.0	叶酸	0.01-0.02	亚油酸	0.001
谷氨酸	6.0-8.0	烟酸	0.03-0.05	柠檬酸铁	10mg/L
缬氨酸	3.0-4.0	吡洛醇	0.007-0.01	硫酸铜	0.00005-0.0001
半胱氨酸	0.5-1.0	叶黄素	0.0005-0.001	硫酸锌	0.0005-0.001
甲硫氨酸	1.2-1.5	硫铵	0.007-0.01	硒酸钠	0.00001-0.0001
异亮氨酸	2.5-3.0	维生素 B12	0.0003-0.0009	氯化铝	0.000005-0.00001
亮氨酸	2.5-3.0	泛酸钙	0.01-0.03	碘化钾	0.00004-0.00006
酪氨酸	0.6-1.0	大量元素	浓度 (mM)	氯化钴	0.00003-0.00007
苯丙氨酸	0.5-1.0	磷酸二氢钠	2.0-3.0	葡萄糖	30.0-50.0
色氨酸	0.5-1.0	丙酮酸钠	1.0-2.0		
赖氨酸	2.2-2.5	氯化钙	0.2-0.4		
组氨酸	1.2-1.5	氯化镁	0.4-0.6		
精氨酸	1.5-1.8	氯化钠	8.0-10.0		
脯氨酸	3.5-4.0	氯化钾	0.5-1.0		
甘氨酸	0.5-1.0	硫酸镁	0.5-1.0		
丙氨酸	0.4-1.0	PF-68	1.0-2.0g/L		
天冬酰胺	6.0-10.0	碳酸氢钠	10.0-20.0		
谷氨酰胺	0	硫酸钾	1.0-2.0		

[0036] 按照表 1 配方将各组分溶于无热源超纯水中，过滤除菌即可制备出本发明的无血清培养基。

[0037] 实施例 2、优化谷氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸浓度对细胞生长的影响

[0038] 在按照表 1 维持培养基其他营养成分不变的同时，配制不同谷氨酸，天冬酰胺，天

冬氨酸浓度（表 2）相应的培养基。表达曲托珠单抗的 CHO 细胞株被按照  $5 \times 10^5$  细胞 / 毫升的浓度接种，在 37 度，110 转 / 分，二氧化碳浓度为 6.0% 条件下进行培养，当葡萄糖浓度低于 2 克 / 升，补糖到 8 克 / 升。培养 14 天，第 8 天细胞数达到最大值，其中 Asp10mM / Asn10mM / Glu3mM 产生最大的细胞密度  $8.16 \times 10^6$  细胞 / 毫升。Asp6mM / Asn6mM / Glu6mM 产生细胞密度  $7.08 \times 10^6$  细胞 / 毫升（表 2）。

[0039] 表 2

[0040]

编号	Asn (mM)	Asp (mM)	Glu (mM)	Max Cell $10^6$ cells/ml	活率%
1	10	10	6	7.88	99.0
2	0	10	6	1.26	96.8
3	10	0	6	7.71	99.2
4	0	0	6	0.92	92.5
5	10	10	3	8.15	99.4
6	0	0	3	0.89	91.1
7	0	10	3	1.13	94.4
8	10	0	3	5.23	80.7
9	6	6	6	7.08	99.2

[0041] 实施例 3 优化谷氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸浓度对细胞表达抗体的影响

[0042] 在按照表 1 维持培养基其他营养成分不变的同时，配制不同谷氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸浓度（表 2）相应的培养基。表达曲托珠单抗的 CHO 细胞株被按照  $5 \times 10^5$  细胞 / 毫升的浓度接种，在 37 度，110 转 / 分，二氧化碳浓度为 6.0% 条件下进行培养，当葡萄糖浓度低于 2 克 / 升，补糖到 8 克 / 升。培养 14 天，D14 天取样测定表达量，其中 Asp6mM / Asn6mM / Glu6mM 产生最高的表达量 720 毫克 / 升（图 1）。

[0043] 实施例 4 优化谷氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸浓度对细胞代谢的影响

[0044] 在按照表 1 维持培养基其他营养成分不变的同时，配制不同谷氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸浓度（表 2）相应的培养基。表达曲托珠单抗的 CHO 细胞株被按照  $5 \times 10^5$  细胞 / 毫升的浓度接种，在 37 度，110 转 / 分，二氧化碳浓度为 6.0% 条件下进行培养，当葡萄糖浓度低于 2 克 / 升，补糖到 8 克 / 升。培养 14 天，D14 天取样使用 Nova400 生化分析测定细胞代谢情况，结果见表 3 其中 Asp10mM / Asn10mM / Glu3mM 产生最低的铵离子浓度 2.09mM。Asp6mM / Asn6mM / Glu6mM 产生较低的铵离子浓度 2.71mM。

[0045] 表 3

[0046]

	Lac (g/l)	Gluc (g/l)	Glu (mM)	Gln (mM)	Na <sup>+</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM)
1	Low	9.8	3.2	2.3	99	4.1	14.2	2.09
2	Low	10.2	5.8	Low	109	3.9	13.9	Low
3	Low	9.9	2.8	3.1	103	4.2	15.6	3.82
4	Low	12.0	5.7	Low	108	3.6	16.4	Low
5	Low	9.5	2.9	1.8	106	4.1	12.3	2.8
6	Low	7.0	5.5	Low	107	4.0	13.9	Low
7	Low	12.1	5.9	Low	96	3.9	17.8	Low
8	Low	3.4	4.6	Low	114	3.8	19.1	Low
9	Low	13.1	1.8	2.9	103	3.7	15.6	2.71

[0047] 综合分析细胞密度,表达量,细胞代谢情况,最后选定 Asp6mM / Asn6mM / Glu6mM 为培养基配方中的最优化配方方案。

[0048] 实施例 5 优化后的化学成分限定的培养基与商业化培养基比较

[0049] 在按照表 1 维持培养基其他营养成分不变的同时将天冬氨酸,天冬酰胺,谷氨酸调整如下浓度 Asp6mM / Asn6mM / Glu6mM, 配制相应的培养基。表达曲托珠单抗的 CHO 细胞株被按照  $5 \times 10^5$  细胞 / 毫升的浓度接种,在 37 度,110 转 / 分,二氧化碳浓度为 6.0% 条件下进行培养,当葡萄糖浓度低于 2 克 / 升,补糖到 8 克 / 升。同时将细胞接种于目前市场上商业化的无血清培养基 CD-FORTI-CHO (Gibco 公司产品),用相同的条件进行培养。测定表达量,CD-FORTI-CHO 的表达量为 650mg / L,而用我们的培养基,细胞表达量为 750mg/l。因此,经优化后的培养基配方要好于目前商业化比较好的化学成分限定的培养基。

[0050] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。上文提及的每篇参考文献皆全文列入本文作为参考。

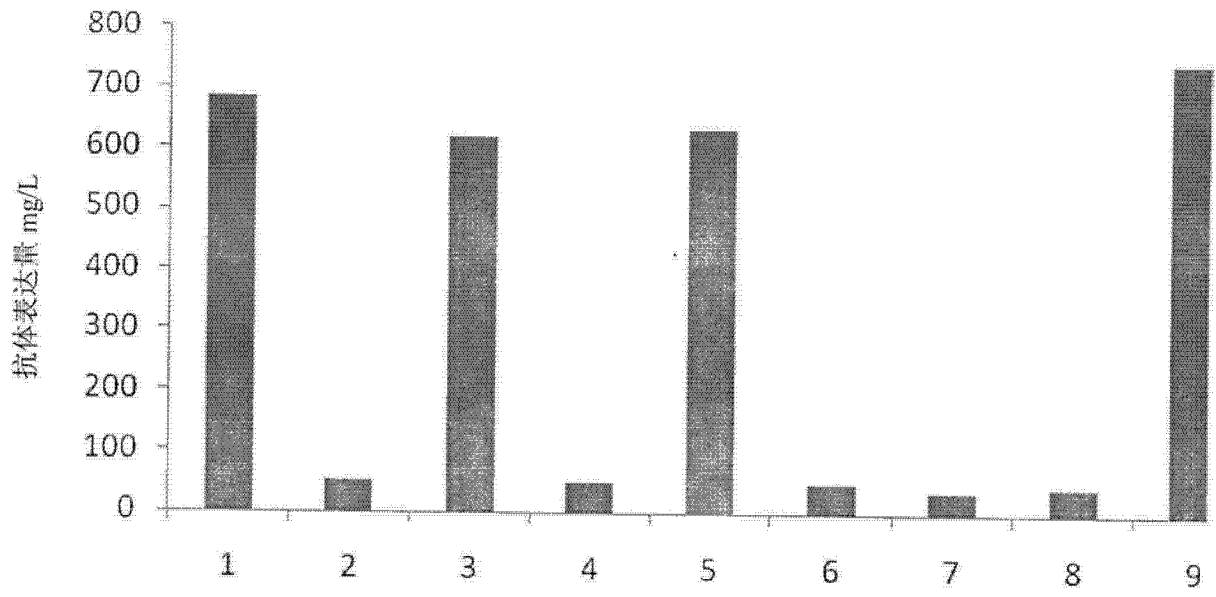


图 1