

第四章 动物细胞培养制药工艺

4.1 制药动物细胞

4.2 动物细胞的生产特征

4.3 动物细胞培养基制备

4.4 动物细胞培养技术

4.5 重组人红细胞生成素的生产工艺

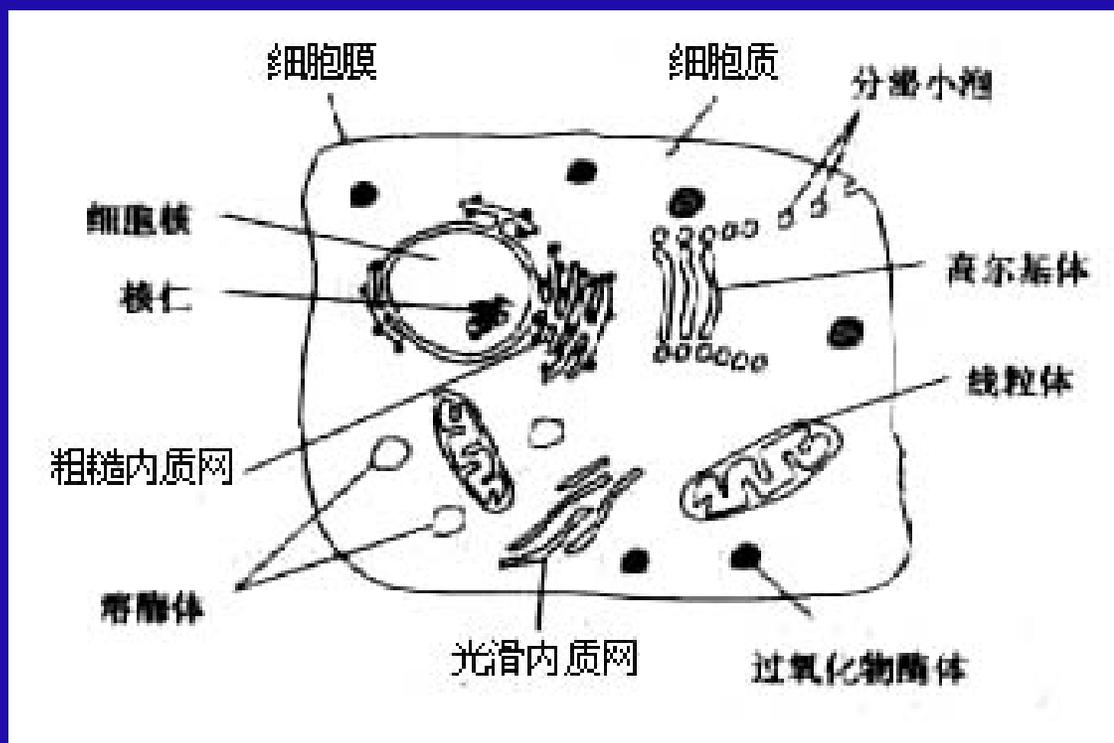
4.1 制药动物细胞

- ∩ 动物细胞的结构与功能
- ∩ 制药动物细胞的种类
- ∩ 生产用细胞系

4.1.1 动物细胞的结构与功能

1. 形态特征

- Ω 细胞膜
- Ω 细胞质
- Ω 细胞核
- Ω 没有细胞壁
- Ω 亚细胞器



2、动物细胞培养的代谢特征

葡萄糖和谷氨酰氨：能量和合成代谢的前体。

葡萄糖限制：通过增加谷氨酰氨消耗得以补偿，反之亦然。

葡萄糖代谢：糖酵解为主，生成丙酮酸和乳酸，乳酸分泌到胞外并在培养液中积累。另一条途径为TCA循环，彻底氧化产生 CO_2 和水。一小部分为戊糖磷酸途径，生成4、5、7碳糖和NADPH。

中间产物进入脂肪酸代谢、核酸代谢和氨基酸代谢。

葡萄糖代谢旺盛，产生大量乳酸，对细胞有毒性。

Gln代谢：脱氨、转氨等作用，合成其他必需和非必需氨基酸。

Gln氮源，Gln受限，增加其他氨基酸消耗以补偿。

离体动物细胞系，转氨作用是主要代谢途径。谷氨酰胺在脱氨酶的催化下，脱氨产生氨，对细胞有毒性。

谷氨酰胺与丙酮酸发生转氨作用，生成丙氨酸，进入培养液并积累。

Gln能量：Glu转化为 α -酮戊二酸，进入TCA循环。

流加葡萄糖或谷氨酰胺，控制整个代谢过程，避免有毒废物的积累。

3、蛋白质糖基化与分泌表达

蛋白质合成场所：粗糙内质网上的核糖体

糖基化场所：内质网合成各种糖类，粗糙内质网腔内和高尔基体，加工修饰。

不同细胞系糖基化特征不同，选择适宜细胞系。

对于分泌型蛋白，分泌泡与细胞膜融合，释放到胞外，完成了蛋白质的分泌表达。

4.1.2 制药动物细胞的种类

目前用于制药的动物细胞有4类：

原代细胞系

二倍体细胞系

异倍体细胞系

融合的或重组的工程细胞系

细胞系分类

来源：原代细胞，传代细胞。

寿命：有限细胞系，无限细胞系。

染色体数目：二倍体细胞系，异倍体细胞系。

获得方式：工程细胞系，癌变细胞系。

生长特性：贴壁依赖型，非贴壁依赖型细胞系。

1. 原代细胞 primary cell

概念： 从动物体内直接分离得到的细胞。

特点： 生长分裂不旺盛，与体内细胞相似

应用： 药物检测实验，药理研究。

生产药品： 鸡胚细胞，兔或鼠肾细胞、淋巴细胞。

2. 传代细胞 passage cell

概念：原代细胞转接后培养的细胞。

特点：细胞分裂增殖旺盛，二倍体核型。

二倍体细胞系：原代细胞经过传代、筛选、克隆、纯化后，获得具有一定特征的细胞系。。

药品生产：WI—38、MRC—5、2BS等。

3. 有限细胞系Finite cell line

概念：生长和寿命有限的细胞系。二倍体细胞系

特点：多次传代培养，失去增殖能力，老化死亡。

寿命：取决于细胞来源的物种和年龄、器官。

人细胞最高培养次数为50—60代。

胚成纤维细胞：人，50代；鸡胚，30代；小鼠，8代。

4. 无限细胞系 Infinite cell line

概念：生长和寿命不受限制的细胞系，能连续传代培养。

连续细胞系：Continuous cell line

永久性细胞系：Immortal cell line

特点：细胞无限分裂，不具有接触抑制现象，不出现异常染色体。

理想的药物生产细胞系。

5. 工程细胞系

概念：

采用基因工程技术对宿主细胞的遗传物质进行了修饰改造或重组，获得具有稳定遗传的独特性状的细胞系。

方法：

正常细胞异倍体化；融合或重组。

6. 转化细胞系

概念：

染色体的断裂变成异倍体，失去了正常细胞的特点，而获得了无限增殖的能力。

特点：

长期培养，倍增时间短，对培养条件和生长因子等要求较低，适于大规模工业化生产。

4.1.3 生产用细胞系

1. 人源细胞系

Namalwa:

类淋巴母细胞，非整体，悬浮生长。

英国Wellcome公司：Sendai病毒诱导，大规模生产 α 干扰素，批准上市。产品逐渐淘汰。

动物细胞培养的应用

作为反应器用于制药：EPO，tPA

作为宿主细胞用于制药：病毒性疫苗

杂交瘤细胞：单克隆抗体，诊断、治疗

组织再生与器官移植（个体克隆）：

本身作为产品：皮肤移植，干细胞治疗

药学研究应用：分子与细胞药理、毒理、代谢

生命科学研究：器官发生，细胞、分子、遗传学

1. 人源细胞系

WI-38: Wistar Institute (WI), 二倍体成纤维细胞系, 寿命有限。贴壁生长, 对很多病毒敏感, 第一个被用于制备疫苗。

MRC-5: 二倍体成纤维细胞系, 生长较WI-38快, 对逆境有一定抗性, 用于制备疫苗。

2. 哺乳动物细胞系

CHO细胞: Chinese hamster ovary, 亚二倍体。

多种衍生突变株。

贴壁型生长, 也可悬浮培养, 对剪切力和渗透压有较高的忍受能力。

最为普遍和成熟表达糖基化蛋白药物的细胞。

药物: tPA、EPO、HBsAg、G-CSF、凝血因子VIII、DNA酶I

2. 哺乳动物细胞系

BHK—21: baby hamster kidney

成纤维样细胞，非整倍体，用于增殖病毒、制备疫苗和重组蛋白。

上市重组凝血因子VIII。

2. 哺乳动物细胞系

杂交瘤细胞：hybridoma

脾脏B细胞与骨髓瘤细胞的融合细胞

特点：无血清培养基中高密度悬浮生长，容易转染和生长，大量分泌和高效表达。

应用：抗体药物生产。

亲本鼠：小鼠，BALB/c；大鼠，Lou。

3. 鸡胚

流感疫苗

2005, Chiron's flu cell culture vaccine: Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell line:

Moving from egg-based to cell-based influenza vaccine production

4. 昆虫细胞系

Sf21: 秋粘虫 *Spodoptera frugiperda*。

Sf9: 从SF21中分离得到，最常用。抗机械剪切，无血清培养基的搅拌反应器中生长。

TN-5B1-4: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*。表达能力比Sf9高20多倍，能悬浮培养。

生产抗体、试剂盒，生物学研究

小结

动物细胞结构与功能：代谢场所，合成，修饰，分泌

动物细胞种类：原代与传代细胞，二倍体细胞，有限与连续细胞系

生产用细胞系：人源，哺乳动物源，昆虫细胞系

思考题

- (1) 离体动物细胞对葡萄糖和谷氨酰氨的代谢特征是什么？合成、修饰、分泌功能与制药有何关系？
- (2) 分析原代与传代细胞，有限与连续细胞系的异同点，举例说明制药方面的应用。
- (3) 最常用的两种药物生产哺乳动物源细胞系是什么，有什么特点？

第四章 动物细胞培养制药工艺

4.1 制药动物细胞

4.2 动物细胞的生产特征

4.3 动物细胞培养基制备

4.4 动物细胞培养技术

4.5 重组人红细胞生成素的生产工艺

4.2 动物细胞的生产特征

- ∩ 对培养条件要求严格
- ∩ 对培养基组成要求高
- ∩ 天然结构与活性的药物

1. 对培养条件要求严格

动物细胞对周围环境十分敏感

- 无细胞壁保护，细胞膜直接接触外界。
- 物理化学因素：渗透压、pH、离子浓度、剪切力等耐受力很弱，容易受伤害。
- 与细菌和植物细胞相比，动物细胞培养条件要求严格地多。

1、温度

哺乳动物细胞最佳培养温度为 37°C

鸡细胞为 $39^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ ；昆虫类细胞为 $25^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 。

耐受温度范围较窄， $35^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$

细胞受伤： $39^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 1小时，但能恢复。

受伤严重： $41^{\circ}\text{C} \sim 42^{\circ}\text{C}$ ，部分可恢复。

死亡： 43°C 以上。

2、氧气

动物细胞生长必须有氧气，缺氧时不能生存。

离体培养的气体：含有5% CO_2 和95% 空气，其中氧浓度为21%。

高氧环境： O_2 浓度60%以上，对细胞毒性较大，抑制生长和增殖，出现染色体异常等现象。

有时充以 N_2 气稀释 O_2 浓度。

3、pH值

低于6.8或超过7.6会对细胞产生严重影响甚至使细胞死亡。

机体细胞的pH范围为6~8，而且在血液和体液中，变化范围很小。

人体：血液pH比较恒定，7.36~7.44。

低于7.05发生酸中毒，高于7.45发生碱中毒

4、渗透压

正常血浆渗透压为280~310 mOsm/kg

高渗溶液: 高于310 mOsm/kg

低渗透压溶液: 低于280mOsm/kg。

动物细胞对渗透压有较强的耐受性

离体培养细胞的渗透压应控制为等渗透溶液。

增减NaCl的浓度调整渗透压, 每增加1mg/ml NaCl, 渗透压增加32 mOsm/kg。

2. 对培养基组成要求高

动物细胞对培养基的要求高

- 完全异养，容易利用、相对低分子量的营养物
- 12中必需氨基酸
- 8种以上维生素
- 多种无机盐和微量元素
- 多种附加成分：生长类、细胞因子和贴壁因子因子及激素、结合蛋白质
- 能源：单糖，葡萄糖，谷氨酰氨
- 氮源：氨基酸单体化合物

3. 天然结构与活性的药物

完善的翻译后蛋白质修饰功能

游离核糖体：合成细胞质基质内的蛋白质。

与膜结合的核糖体：合成分泌性和膜整合蛋白，多数为糖蛋白。

修饰：内质网加工，高尔基体加工、转运、分泌，糖链。糖基化、磷酸化、酰胺化等。

活性分子：装配折叠形成精确的三维结构。

4. 生产工艺特征

产品与天然的产物一致：适于临床使用

动物细胞生产：70%蛋白质药物。

培养工艺：难度大，产量低，成本高。

胞外分泌产物：分离纯化简单。

有潜在的血源性污染危险。

小结

- ∩ 培养条件要求
- ∩ 培养基组成要求
- ∩ 生产药物特征

思考题

- (1) 动物细胞制药培养条件有哪些要求，为什么？
- (2) 动物细胞培养可优先用于生产哪些药物？为什么？
- (3) 比较分析大肠杆菌、酵母、动物细胞系统制药的优缺点，如何选择应用？

第四章 动物细胞培养制药工艺

4.1 制药动物细胞

4.2 动物细胞的生产特征

4.3 动物细胞培养基制备

4.4 动物细胞培养技术

4.5 重组人红细胞生成素的生产工艺

4.3 动物细胞培养基制备

培养基组成成分

培养基种类

培养基质量控制

4.3.1 培养基组成的成分

糖类、必需氨基酸、维生素、无机盐类、生长类因子及激素、结合蛋白质、贴附与伸展因子及其它附加成分等。

1、糖类

- ❖ 糖类提供细胞生长的碳源和能源，分解后释放出能量ATP。不同细胞对葡萄糖利用相似，在无氧条件下还产生乳酸等有机酸。
- ❖ 不能利用：多糖、双糖、寡糖等聚合物。
- ❖ 利用：单糖单体化合物。
- ❖ 主要是葡萄糖

2、氨基酸

❖ 氮源作用

❖ 不能利用：多肽、蛋白质等高分子聚合物。

❖ 利用：氨基酸等单体化合物。

❖ 12种是必需氨基酸：Arg、Cys、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr、Val。

❖ 必须在培养基中添加，才能满足细胞的生长

❖ 谷氨酰胺：重要碳源和能源。

3、维生素

❖作用：一类微量的小分子有机生物活性物既不是细胞的物质基础，也不是能量物质，对代谢和生长起调节和控制作用。

❖水溶性维生素：B族维生素和维生素C

❖脂溶性维生素：维生素A、D、E、K四种。

4、无机盐类

- ❖作用：细胞代谢所需酶的辅基，调节酶活性，细胞构成成分；
- ❖参与生理电活动；
- ❖维持水平衡、保持渗透压和酸碱平衡。
- ❖胞外无机盐对维持正常生长环境很重要。

5、生长类因子与激素

- ❖作用：对细胞的生长有刺激作用
- ❖贴附因子：细胞的贴壁生长必需。
- ❖脂类化合物：必需的，类脂及其前体和血清常平行使用。
- ❖铁传递蛋白：离子载体。

4.3.2 动物细胞培养基的种类

天然培养基

合成培养基

无血清培养基

1.天然培养基

概念：直接取自于动物组织提取液或体液作为培养基

种类：血浆凝块、血清、淋巴液、胚胎浸出液。

特点：营养价值高，成分复杂，不稳定，来源受到限制，不宜大量生产使用。

应用：许多细胞系和原代及传代细胞培养。

2.合成培养基

概念：用化学成分明确的试剂配制的培养基。

组成：糖、氨基酸、无机盐、维生素及其他成分。

特点：组分稳定，容易配制。

缺点：不能直接使用；需要添加5%–20%血清，才能培养。

已有几十种合成培养基，大部分已商品化。

血清 (Serum) 成分与作用

- 含有基本的营养成分: 补充合成培养基成分的不足
- 脂肪酸和微量元素: 细胞生长所必需, 磷脂质、胆固醇、前列腺素E, 铜、锌、钴、钼、硒。
- 激素和生长因子: 细胞增殖、分化, 胰岛素、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、皮质醇、雌二醇。
- 贴附和伸展因子: 细胞贴壁所需, 纤维结合蛋白、软骨素、胶原等。
- 载体蛋白: 白蛋白、转铁蛋白, 金属、激素、维生素和脂类结合, 带入细胞

血清(Serum)成分与作用

- 蛋白酶抑制剂：降解细胞死亡释放的蛋白质；消除毒素和金属的毒性。
- 蛋白质：抗机械剪切，保护细胞免于损伤的作用
- 缓冲物质：K、Na、Cl、Fe、Ca、葡萄糖等，稳定pH和渗透压
- 来源：胎牛血清、新生牛或成牛血清、马血清、鸡血清、羊血清及人血清。
- 应用于许多细胞系和原代及传代细胞培养。

血清(Serum)成分与作用

- 质量不稳定：个体差异大，批次间一致性差，
- 血源性污染：病毒、真菌、支原体污染的可能性
- 某些成分对细胞有毒性
- 分离纯化：增加难度
- 干扰某些生物测定
- 增加成本

2.合成培养

MEM: minimum essential medium, 12种aa、8种V

BME: basal medium Eagle's

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

GMEM: Glasgow's modified Eagle's medium

JMEM: Joklik's modified Eagle's medium

RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute

3.无血清培养基

概念：全部用已知成分组配、不加血清的合成培养基。

组成：合成培养基基础之上，添加激素与生长因子、结合蛋白、贴壁与伸展因子、低分子量营养因子。

特点：提高了培养的质量，避免血清带来的麻烦，产品纯化容易，组分稳定，大量配制。

3.无血清培养基种类

I类：无蛋白质成分，化学成分完全明确，只适用于一些特定细胞系。

II类：含有纯化蛋白和激素，应用广，二倍体，原代及确立细胞系，相对比较昂贵。

III类：非确定生物添加剂取代血清，化学成分不太明确。可以灭菌，价格低廉。

4.3.3 培养基质量的控制

培养用水质

缓冲液

生理盐水和平衡盐溶液

其他成分配制

1、培养用水质

必需使用纯净水配制培养基

水存放时间不宜超过2周

普通水必需除去各类元素有毒或有害物质及微生物和热源，达到纯净水标准。

2.缓冲液

弱酸与弱酸盐：碳酸氢钠/碳酸体系

弱碱与弱碱盐：磷酸二氢钠/磷酸氢二钠体系

有机缓冲液：MOPS、TES、HEPES、DIPSO

作用：pH恒定。

应用：缓冲剂配制，进一步配制其他溶液。

3.生理盐水和平衡盐溶液

生理盐水:

调节渗透压的盐溶液, 0.9% NaCl等渗能力

平衡盐溶液: balanced saline solution, BSS

生理盐水, 缓冲剂与指示剂、无机盐、葡萄糖

作用:

满足细胞对盐离子、碳营养的要求; pH和渗透压的环境要求; 直观观察pH。

3.生理盐水和平衡盐溶液

磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution,PBS):

KCl、 KH_2PO_4 、NaCl、 Na_2HPO_4 配制而成。

应用：培养物、器皿的洗涤液。

生理盐水和平衡盐溶液：

配制直接接触、长期培养的培养液。

4.氨基酸配制

用量：使用L型氨基酸，对于DL混合型氨基酸，使用量应该加倍。

单独配制谷氨酰胺：溶液中很不稳定。

100倍浓缩液， -20°C 保存

一般培养液中含量为 $1\sim 4\text{ mmol/L}$ 。

5. NaHCO_3 配制

配成3.7%、5.6%、7.4%三种浓度
过滤除菌或高压灭菌，4℃保存
使用前加入，调节培养基pH。

6、培养基灭菌

不含葡萄糖的溶液常规高压灭菌。

含葡萄糖时，采用过滤除菌；115℃，15min

血清使用：需要灭活，过滤灭菌，按一定比例加入。

4℃保存。出现沉淀、混浊时，要重新配制。

小结

培养基组成成分：碳氮源、维生素、生长因子及其他附加成分

培养基种类：天然、合成、无血清培养基

培养基质量控制：原料、水质、配制、灭菌

思考题

- (1) 动物细胞培养基组成成分及其作用是什么？与微生物培养基相比，有何特殊性？**
- (2) 生产用最适动物细胞培养基应该选择哪种？为什么？**
- (3) 如何控制动物细胞培养基的质量？**

第四章 动物细胞培养制药工艺

4.1 制药动物细胞

4.2 动物细胞的生产特征

4.3 动物细胞培养基制备

4.4 动物细胞培养技术

4.5 重组人红细胞生成素的生产工艺

4.4 动物细胞培养技术

- 动物细胞生长和基质依赖性
- 动物细胞培养基本过程
- 动物细胞大规模培养方法

4.4.1 细胞生长和基质依赖性

生长基质

接触抑制

贴壁依赖性细胞

非贴壁依赖性细胞

兼性贴壁细胞

1. 生长基质

概念: growth substratum

把改变生长表面特性, 促进细胞贴附的物质。

胞外基质成分:

多聚赖氨酸

胶原

2. 接触抑制

概念: **contact inhibition**

细胞在生长基质上分裂增殖，逐渐汇集成片，当每个细胞与其周围的细胞互相接触时，细胞就停止增殖。

特点: 保持充足的营养，细胞仍可存活一段时间，但细胞密度不再增加。

有: 大多数细胞

无: 少数悬浮培养细胞（癌细胞）

3. 贴壁依赖性细胞

概念: anchored-dependent cell

需要有适量带电荷的固体或半固体支持表面才能生长的细胞

大多数动物细胞都属于此类。

4. 非贴壁依赖性细胞

概念: anchored-independent cell

不依赖于固体支持物表面生长的细胞，可在培养液中悬浮生长，被称为悬浮细胞。

举例：血液、淋巴细胞、肿瘤细胞和某些转化细胞，Namalwa细胞。

5. 兼性贴壁依赖性细胞

概念：

对支持物的依赖性不严格，既可贴壁生长，也可悬浮生长。

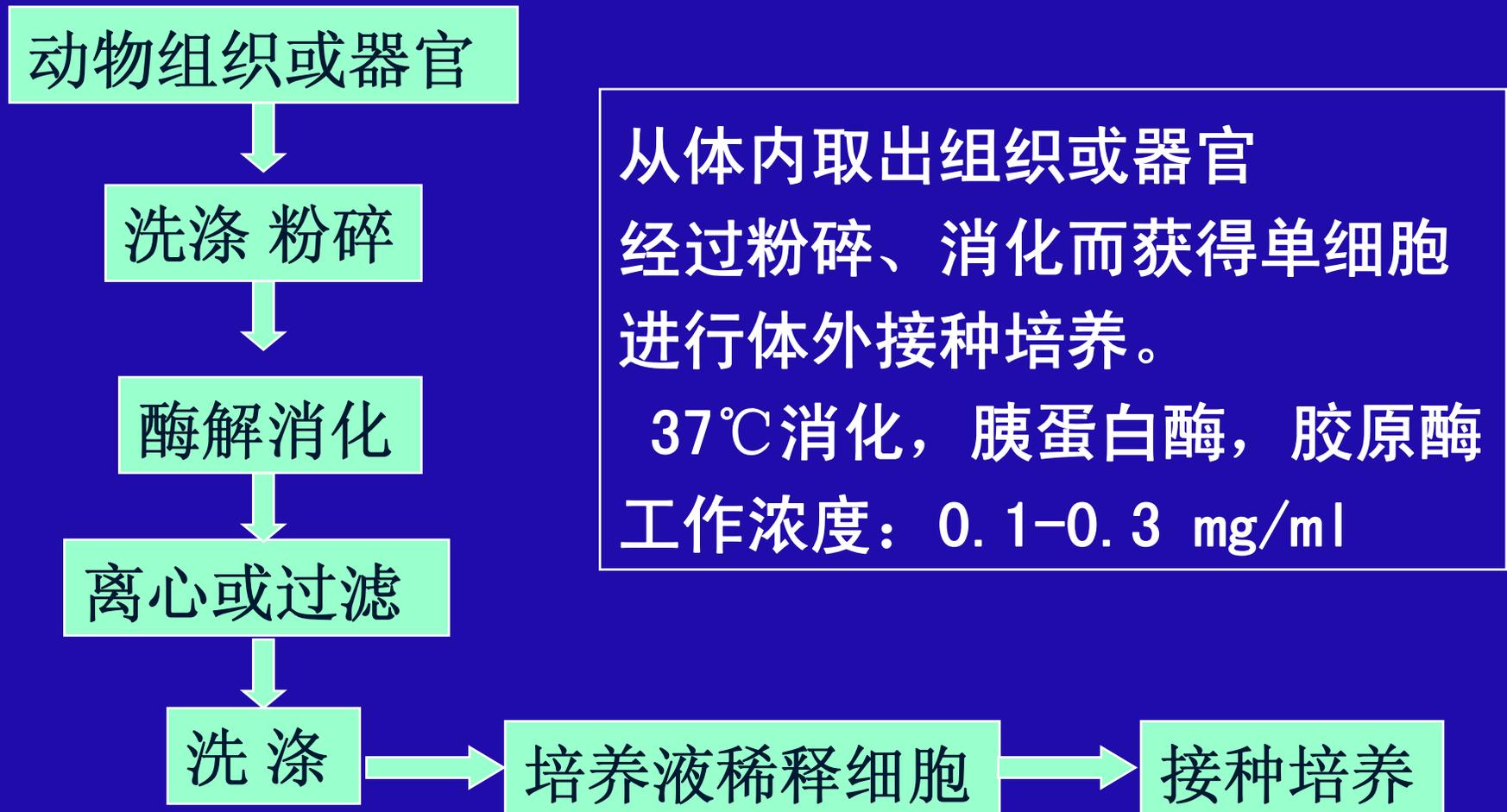
举例：CHO细胞、BHK细胞、L929细胞。

理想的药物生产细胞系

4.4.2 动物细胞培养基本过程

- 1、原代细胞分离与培养
- 2、传代细胞培养

1. 原代细胞培养—过程



2. 传代细胞培养—过程

概念：对长满表面的细胞进行消化分离，接种到新的培养基上，进行新一轮培养。

传代时期：刚刚全部汇合的细胞。

消化方法：过程与原代细胞相同。

传代的次数：不能无限次传代，保证特性

防止细胞系之间、非细胞生物的污染

要领：适宜的时期和方法，不要过度

4.4.3 动物细胞大规模培养方法

- 1、单层贴壁培养
- 2、悬浮培养
- 3、微载体培养
- 4、固定化培养

1. 单层贴壁培养——概念与过程

细胞贴附于一定的固体支持表面上，形成单层细胞的培养过程。

生长过程：

接种，细胞经过吸附、接触而贴附于基质表面；

进行生长、分裂繁殖，很快进入对数期。

数天就长满整个表面，形成致密单层细胞。

1. 单层贴壁培养——特点

优点：

容易更换培养液，灌注培养时，能达到高细胞密度；有利于产物的分泌表达，可改变培养液与细胞的比例。

缺点：

操作较繁杂，检测受到限制，培养条件难以均一，传质和传氧差，放大培养是瓶颈。

2. 悬浮培养

细胞在反应器内游离悬浮在培养液中生长的培养过程

优点：操作简单，培养条件相对均一，传质和传氧较好，容易放大培养。

缺点：细胞体积小，密度低，培养病毒易失去标记而降低免疫能力。

适用范围：悬浮细胞，兼性贴壁细胞，杂交瘤

借鉴微生物发酵理论和经验，发挥动物细胞的特性

3. 微载体培养

概念：细胞贴附于微载体上伸展和增殖，再悬浮于培养液中的培养过程。

优点：细胞生长的环境均一，培养基利用率高，重复性好，减少了劳动强度，容易放大。

兼具贴壁和悬浮培养的双重优点

微载体，多孔微载体

应用：工业化生产干扰素、疫苗和尿激酶原。

4. 固定化培养

❖ **概念：**用物理、化学方法将细胞固定在载体介质上，然后进行悬浮培养。

❖ **应用：**贴壁依赖性和非贴壁依赖性细胞。

❖ **优点：**细胞密度高、抗剪切力和污染，生产首选

❖ **方法**

共价交联：双功能试剂处理，细胞之间交联。

吸附：物理吸附使细胞贴附在固体载体表面。

包埋：细胞包埋在载体内部。

微囊法：亲水半透膜把细胞包埋在微囊内。

小结

细胞生长的基质依赖性：生长基质，细胞类型

细胞培养基本过程：消化，传代

细胞大规模培养方法：单层贴壁，悬浮，微囊化，固定化

思考题

- (1) 基质依赖性与非依赖性细胞系对培养条件的要求有什么不同？如何满足？
- (2) 动物细胞培养的基本过程是什么，各步的目的是什么？
- (3) 细胞大规模培养有几种方法，有何特点，如何选择应用？

第四章 动物细胞培养制药工艺

4.1 制药动物细胞

4.2 动物细胞的生产特征

4.3 动物细胞培养基制备

4.4 动物细胞培养技术

4.5 重组人红细胞生成素的生产工艺

4.5 重组人红细胞生成素生产工艺

4.5.1 概述

4.5.2 细胞培养工艺

4.5.3 分离纯化工艺

4.5.1 概述

- 天然红细胞生成素的发现与种类
- 理化性质
- 重组人红细胞生成素及其临床应用
- 重组人红细胞生成素表达研究

1、天然红细胞生成

1890: 现象, 低氧压下红细胞增多

1948: Bonsdorff和Jalavisto, 提出红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)。

形式: hEPO- α 及 hEPO- β , 二者氨基酸组成及顺序相同, 166aa, 活性类似。

糖基化及其含量不同: EPO- α 含有较多的N-乙酰葡萄糖胺, 总含糖量比EPO- β 高。

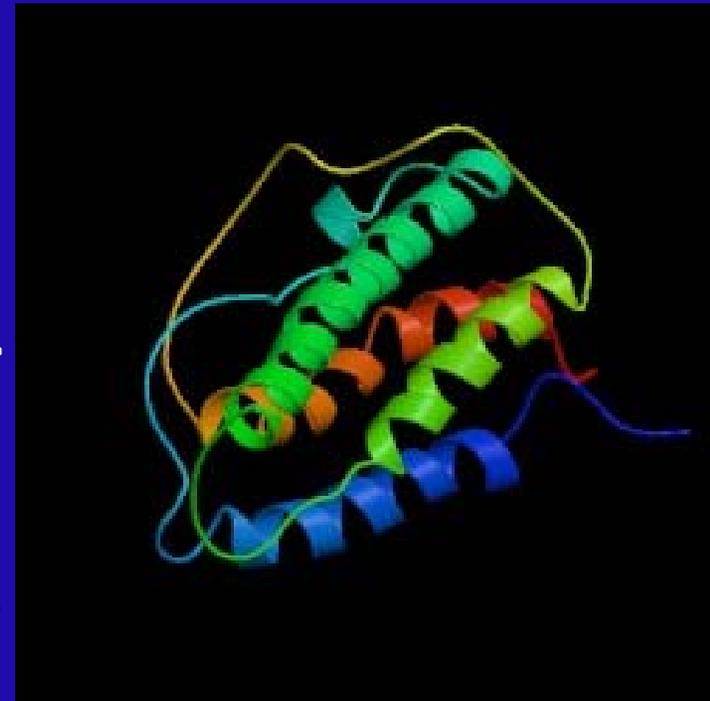
2、EPO的理化性质

大小：166aa

糖链占分子量的39%。

糖基化程度与准确性对活性影响很大。

pI 4.2~4.6，对热和pH变化相对稳定。



3、重组人红细胞生成素

第一代：两种，rhEPO- α 和 rhEPO- β 。

1989: Amgen, Epogen ; 1990, Ortho Biotech, Procrit

CHO、BHK细胞系生产

第二代：EPO突变体，2001, Amgen, Arasnep长效。

二联体或三联体EPO：高活性，长效（3—5倍）

适应症：肾性贫血、艾滋病患者贫血、癌症相关贫血等。隔日注射一次，长效EPO：每周一次。

4、rhEPO的表达研究

- (1) 由再生障碍性贫血患者的尿液中纯化而得，人源的红细胞生成素。产量极其有限。
- (2) SV40病毒启动子驱动表达载体，在COS-1中瞬时表达红细胞生成素
- (3) 昆虫SF9细胞中杆状病毒系统表达rhEPO。产率有所改善，但糖基化程度较小
- (4) 干扰素- α 基因启动子的rhEPO表达载体，BALL-1细胞，产生较高量的rhEPO。

4、rhEPO的表达研究

(5) 大肠杆菌中表达，仅具有体外抗原结合活性。

(6) 家蚕体内的表达系统，糖基化简单，药物在体内稳定性较低、活性较差等问题。

(7) 在CHO、BHK细胞系统中稳定表达，获得的重组红细胞生成素与天然红细胞生成素相似。

现在工业生产中多采用动物细胞培养表达红细胞生成素进行大规模生产。

4.5.2 CHO培养工艺

- 工程CHO细胞系建立
- 种子细胞制备
- 反应器培养工艺
- 培养过程控制

1、工程CHO细胞系

CHO dhfr⁻ 细胞

载体: prEC, pDHFR

共转染, 筛选稳定表达的细胞系

稳定转染的筛选培养

胰蛋白酶消化，1: 5稀释，在含有1 nM MTX培养基上培养，3—4d更换培养基，培养10~14天，至抗性克隆出现。

胰酶消化，1: 5稀释，按1 nM→5 nM→25 nM→100 nM→200 nM→1000 nM使MTX浓度逐次升高，筛选抗性克隆。

抗性克隆培养于100 mm培养皿中，按1: 500稀释，继续培养3~5天，集落2-4 mm。

酶联免疫分析：确认表达人红细胞生成素。

2. 种子细胞制备

- (1) 冻存的细胞株37℃水浴，无菌离心。
- (2) 加适量DMEM培养基（10%小牛血清）。
- (3) 37℃、CO₂培养箱培养，连续传三代。
- (4) 细胞消化后接种，制成接种细胞浓度。

3. 灌流培养

- (1) 反应器灭菌：加纤维素载体片及pH7.0的PBS缓冲液，高压灭菌1.5h。
- (2) 接种：排出PBS缓冲液，加DMEM培养基，接种。
- (3) 贴壁培养：pH7， $<50\text{r}/\text{min}$ ， 37°C ， $\text{D}050\text{--}80\%$ 。
- (4) 扩增培养： $80\text{--}100\text{r}/\text{min}$ 。
- (5) 灌流培养：控制温度、 $\text{D}0$ 、pH值等培养条件，进行无血清培养基连续培养。
- (6) 收获培养物， $4^{\circ}\text{C}\text{--}8^{\circ}\text{C}$ 保存。

4、培养工艺过程控制

(1) 搅拌控制：接种后, 搅拌速度缓慢, 使细胞贴附于载体上, 随着细胞数量的增加逐渐提高搅拌速度。

(2) 温度控制：较为严格, 恒定 37°C

(3) pH值控制：7.2-7.4, 输入 CO_2 和碳酸氢盐溶液维持其恒定。

(4) 溶解氧控制：在50%-80%的范围内, 通入氧气、空气或氮气的比例混合气体。

(5) 葡萄糖控制：流加补料

(6) 代谢废物控制：监测氨、乳酸盐类等, 维持较低浓度, 减少对细胞损害。

4.5.3 rhEPO的分离纯化工艺

- 初级分离
- 精制纯化
- 产品质量控制

1. 初级分离

收获培养液：离心

过滤：滤膜

亲和色谱：NaCl—Tris平衡，梯度洗脱，
收集活性洗脱峰

透析：0.1mM Tris，过夜，换液4次。

过滤：0.22 μ m滤膜。

2. 纯化精制

DEAE离子交换：NaCl- Tris梯度洗脱，收集活性峰。

RP-HPLC：乙腈梯度洗脱，收集活性洗脱峰。

凝胶过滤：柠檬酸盐缓冲液洗脱，收集活性峰
过滤：0.22 μm 滤膜。

rhEPO产品：蛋白含量为1.2 mg/ml，其比活可为 2×10^5 IU/mg。

4、EPO的质控与活性检测

纯度，蛋白质含量，分子量等

体外活性：ELISA测定（原理免疫沉淀），单位unit（IU）

体内活性：网织红细胞计数法，注射BALB/c小鼠，眼眶取血，染色，涂片计数网织红细胞数。

比活性(specific activity, U/mg)：单位重量蛋白质(mg)中所含的活性

小结

- EPO概述：发现，种类，表达研究
- 培养工艺：工程菌建立，种子制备，灌流培养与控制
- 分离纯化工艺：初级分离，纯化精制

思考题

- (1) 分析比较各种表达系统生产rhEPO的优缺点。
- (2) CHO培养生产rhEPO的基本工艺过程及其构建控制点是什么，为什么？
- (3) rhEPO分离纯化工艺中使用了哪些操作单元，为什么？