



Animal Cell Culture Engineering

动物细胞培养工程

张元兴 易小萍 张立 孙祥明 编著



化学工业出版社
生物·医药出版分社

0431.01(12) 目次页在封面

华东理工大学研究生教学用书立项资助

Animal Cell Culture Engineering

动物细胞培养工程

张元兴 易小萍 张立 孙祥明 编著



化学工业出版社
生物·医药出版分社

·北京·

图书在版编目(CIP)数据

动物细胞培养工程/张元兴等编著. —北京: 化学工业出版社, 2006. 12
ISBN 978-7-5025-9413-8

I. 动… II. 张… III. 动物-细胞培养-技术
IV. Q954.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 150924 号

责任编辑: 郎红旗 孟 嘉

文字编辑: 朱 恺

责任校对: 顾淑云

装帧设计: 胡燕玮

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市前程装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 16½ 字数 410 千字 2007 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: [http:// www.cip.com.cn](http://www.cip.com.cn)

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 39.00 元

版权所有 违者必究

前 言

最近几年来，哺乳动物细胞生产的单克隆抗体以前所未有的速度获准临床应用，极大地推动着生物制药产业的发展，也促进了动物细胞培养技术的进步。基于动物细胞培养的生物制药已经成为许多国家新药开发的优先发展方向之一。我国自“七五”起的20年来，在此领域投入了大量人力和物力，在细胞培养反应器、微载体、培养过程及工艺和无血清培养技术等方面的研发取得了长足进步。相应地，我国细胞培养的生物制药产业也得到了迅速发展，出现了具有一定规模的生物制药公司，专门从事细胞培养产品的开发。相信在不远的将来，动物细胞培养的产品必将成为我国的生物制药产业发展的重要推动力。

相对于产业的蓬勃发展，滞后的是动物细胞培养工程的理论升华和人才培养。动物细胞培养工程的基础来自于传统的微生物发酵工程，然而动物细胞的生物学特性使得细胞培养过程远比传统发酵复杂得多，涉及的科学和技术问题也尤其特殊性，这对研发人才提出了更高的要求。当前，动物细胞培养领域的人才培养已经成为产业发展的重要瓶颈。

20世纪80年代中期起，华东理工大学便开始动物细胞培养方面的研究和教学，是我国最早从事大规模动物细胞培养的单位之一。本书正是作者对过去20多年来的科研和教学实践的总结，并揉入了国际上在这个领域的最新技术和动态。期盼它的问世能对该领域的人才培养和细胞培养过程的开发有所贡献。

全书基本覆盖了细胞培养领域的各个方面，围绕细胞培养过程的五大关键技术——生物反应器、载体、培养基、培养工艺和过程优化而展开。大量的实例直接来自于科研实践，写作中注重内容的实用性，同时不乏过程的理论分析，以满足不同层次的需求。本书可以作为相关专业的研究生教学用书或本科生的课外知识拓展读物，也适合从事动物细胞培养的科研和工程技术人员阅读。

编写本书，耗时三载余。尽管力求严谨，疏漏恐在所难免。欢迎专家与读者批评指正。

作者

于生物反应器工程国家重点实验室

2006年12月

目 录

| | | | |
|-----------------------|----|------------------|----|
| 第一章 动物细胞培养的历史和发展 | 1 | 一、水 | 35 |
| 第一节 动物细胞培养的发展历史 | 1 | 二、低分子量营养物质 | 35 |
| 第二节 通过动物细胞培养得到的产品 | 2 | 三、非营养性物质 | 38 |
| 一、近年来美国食品和药品管理局 (FDA) | | 第三节 血清 | 39 |
| 批准的产品 | 3 | 一、蛋白质 | 40 |
| 二、近来报道的工艺 | 6 | 二、多肽 | 40 |
| 三、悬浮细胞培养过程 | 7 | 三、激素 | 40 |
| 四、贴壁细胞培养过程 | 8 | 四、代谢物和营养物 | 40 |
| 五、悬浮和贴壁细胞培养过程的共同 | | 五、无机物 | 40 |
| 问题 | 9 | 六、抑制剂 | 40 |
| 第三节 哺乳动物细胞表达系统 | 9 | 第四节 无血清和无蛋白培养基 | 41 |
| 参考文献 | 11 | 一、无血清培养基 | 41 |
| 第二章 动物细胞生长的生物学 | 15 | 二、无血清培养基的常用添加成分 | 41 |
| 第一节 细胞分类和细胞系 | 16 | 三、无蛋白培养基 | 45 |
| 一、细胞的贴壁依赖性 | 16 | 四、利用无血清无蛋白培养基培养 | |
| 二、细胞培养物 | 17 | 动物细胞的方法和工艺 | 45 |
| 三、常用细胞系 | 18 | 第五节 工业规模细胞培养的培养基 | 46 |
| 第二节 细胞的生长和死亡 | 20 | 一、低血清培养基和无血清培养基 | 46 |
| 一、细胞的生长和死亡 | 20 | 二、对贴壁依赖性细胞系悬浮培养 | |
| 二、细胞周期调控 | 21 | 的培养基设计 | 48 |
| 第三节 哺乳动物外源蛋白质表达宿 | | 三、适合于高密度培养的低成本 | |
| 主细胞改造 | 25 | 培养基设计 | 48 |
| 一、实现无血清、无蛋白培养 | 26 | 参考文献 | 49 |
| 二、改变细胞的能量代谢途径 | 26 | 第四章 细胞培养的基本方法 | 52 |
| 三、改进细胞贴壁性 | 27 | 第一节 动物细胞培养的基本条件和 | |
| 四、增强抗细胞凋亡活性 | 28 | 常规操作 | 52 |
| 五、控制细胞增殖速率 | 28 | 一、细胞培养基本条件 | 52 |
| 六、改善重组蛋白质糖基化 | 28 | 二、细胞的消化 | 55 |
| 参考文献 | 29 | 三、细胞计数 | 55 |
| 第三章 培养基和添加剂 | 31 | 四、动物细胞冷冻保存 | 56 |
| 第一节 培养基的物理性质 | 34 | 五、细胞培养的污染和控制 | 58 |
| 一、pH | 34 | 第二节 动物细胞培养工艺 | 62 |
| 二、缓冲 | 34 | 一、贴壁培养 | 63 |
| 三、渗透压 | 34 | 二、悬浮培养 | 70 |
| 四、温度 | 34 | 三、固定化培养 | 71 |
| 五、黏度 | 34 | 参考文献 | 71 |
| 六、表面张力和泡沫 | 34 | 第五章 细胞培养生物反应器 | 73 |
| 第二节 细胞培养基的基本组成 | 35 | 第一节 搅拌式生物反应器 | 74 |

| | | | |
|---|-----|-------------------------------|-----|
| 一、笼式通气搅拌生物反应器 | 74 | 第四节 流加培养 | 130 |
| 二、传递特性分析 | 75 | 一、流加培养基 | 130 |
| 三、双层笼式通气搅拌器生物 反应器 (CellCul-20) | 78 | 二、减少副产物的积累 | 131 |
| 四、离心式搅拌器细胞培养 反应器 (CellCul-50) | 79 | 三、流加培养过程的检测和控制 | 131 |
| 第二节 气升式细胞培养生物反应器 | 81 | 四、流加培养过程中的动力学 | 133 |
| 一、气升式生物反应器构型及原理 | 81 | 五、流加培养的举例 | 134 |
| 二、混合和传质 | 83 | 六、与其他操作模式的比较 | 141 |
| 三、气升式生物反应器的应用 | 84 | 第五节 细胞截留方式及装置 | 142 |
| 第三节 固定床和流化床生物反应器 | 87 | 一、微载体沉降系统 | 142 |
| 一、流化床生物反应器 | 87 | 二、倾斜式沉降系统 | 143 |
| 二、陶质矩形通道蜂窝状生物反应器 | 88 | 三、旋转过滤式细胞截留系统 | 144 |
| 三、固定床生物反应器 | 88 | 四、中空纤维细胞截留系统 | 146 |
| 第四节 膜式生物反应器 | 89 | 五、超声波细胞截留系统 | 147 |
| 一、中空纤维生物反应器及其原理 | 89 | 六、离心式细胞截留系统 | 148 |
| 二、中空纤维生物反应器的局限性 及其优缺点 | 90 | 参考文献 | 149 |
| 三、中空纤维生物反应器在动物 细胞及组织培养中的应用 | 91 | 第八章 细胞培养过程中的代谢和调控 | 153 |
| 第五节 生物反应器的检测与控制 | 92 | 第一节 糖代谢 | 153 |
| 参考文献 | 94 | 一、糖酵解 | 153 |
| 第六章 细胞的损伤和死亡 | 97 | 二、三羧酸循环 | 155 |
| 第一节 细胞的损伤和保护 | 97 | 三、磷酸戊糖途径 | 157 |
| 一、水力相关的细胞损伤 | 97 | 第二节 氨基酸代谢 | 158 |
| 二、气泡相关的细胞损伤 | 103 | 一、氨基酸的脱氨基作用 | 158 |
| 三、细胞的保护 | 107 | 二、 α -酮酸的代谢 | 159 |
| 第二节 细胞凋亡 | 109 | 三、谷氨酰胺的代谢 | 159 |
| 一、细胞坏死和细胞凋亡的特征 | 110 | 第三节 细胞培养中的代谢调控 | 160 |
| 二、细胞凋亡的检测方法 | 111 | 一、培养基的优化 | 160 |
| 三、动物细胞培养过程中的细胞坏死 和细胞凋亡 | 113 | 二、葡萄糖代谢和谷氨酰胺代谢 的相互影响 | 163 |
| 四、与细胞凋亡过程有关的基因 | 114 | 第四节 代谢副产物对细胞培养的影响 | 164 |
| 五、抑制细胞凋亡的策略 | 115 | 一、乳酸 | 165 |
| 参考文献 | 118 | 二、氨 | 173 |
| 第七章 细胞培养模式 | 120 | 三、丙氨酸 | 183 |
| 第一节 分批和换液培养 | 121 | 第五节 代谢工程 | 185 |
| 一、分批培养 | 121 | 一、哺乳动物细胞的糖基化加工 | 186 |
| 二、换液培养 | 122 | 二、昆虫细胞中 N 糖链加工的缺陷 | 187 |
| 第二节 连续培养 | 123 | 三、代谢工程改善昆虫细胞的糖基化 | 188 |
| 第三节 灌注培养 | 126 | 参考文献 | 191 |
| 一、灌注培养过程的特性 | 126 | 第九章 组织工程 | 193 |
| 二、灌注培养系统的控制策略 | 127 | 第一节 体外重建人体组织的培养 | 193 |
| 三、灌注培养的优点 | 129 | 一、种子细胞 | 194 |
| | | 二、细胞培养方式 | 194 |
| | | 三、细胞分化问题 | 197 |
| | | 四、细胞特性的检测 | 199 |
| | | 五、质量控制 | 199 |

| | | | |
|-------------------------|-----|---------------------------------|-----|
| 第二节 组织工程的研究进展 | 200 | 的影响 | 233 |
| 一、人工皮肤 | 200 | 三、代谢产物对蛋白质糖基化的影响 | 235 |
| 二、造血组织 | 200 | 四、添加寡糖前体对糖基化的影响 | 237 |
| 三、人工肝脏 | 200 | 五、丁酸钠浓度对 EPO 糖基化 | |
| 四、胰组织 | 201 | 的影响 | 238 |
| 五、软骨组织 | 202 | 参考文献 | 239 |
| 参考文献 | 203 | 第十一章 动物细胞培养的生产工艺管理 | 244 |
| 第十章 动物细胞培养中蛋白质生产 | | 第一节 细胞库 | 244 |
| 的调控及品质控制 | 205 | 第二节 GMP 规程 | 245 |
| 第一节 蛋白质生产调控的策略 | 205 | 一、动物细胞培养生产药物的 | |
| 一、外源添加物提高蛋白质 | | 生产特点 | 246 |
| 的生产能力 | 205 | 二、硬件设施 | 247 |
| 二、细胞培养环境对蛋白质 | | 第三节 生产过程的检验 | 249 |
| 生产的影响 | 224 | 一、细胞库检验 | 249 |
| 第二节 哺乳动物细胞生产的重组 | | 二、培养物和产物检测 | 249 |
| 糖蛋白的异质性 | 231 | 三、质量控制检验 | 250 |
| 一、蛋白质糖基化的生物学作用 | 231 | 参考文献 | 253 |
| 二、培养基成分对蛋白质糖基化 | | | |

第一章 动物细胞培养的历史和发展

动物细胞培养是指在体外培养动物细胞的技术，即在无菌条件下，从机体中取出组织或细胞，或利用已经建立的动物细胞系，模拟机体内的正常生理状态下生存的基本条件，让细胞在培养容器中生存、生长和繁殖的方法。

动物细胞体外培养简化了环境条件，排除了体内实验受到的各种复杂因素的影响，便于应用各种物理、化学和生物等外界因素探索和揭示细胞生命活动的基本规律；便于应用各种技术和方法研究和观察细胞结构与功能的变化；可以在长时间内研究和观察细胞遗传行为的变化；可以同时提供大量生物性质相同的细胞，特别是人的活细胞作为研究对象，不仅成本低，而且解决了不能用人做实验的问题。近年来，随着基因工程和细胞工程技术的不断发展，动物细胞已成为大规模生产一系列有商品价值的生物制品的重要宿主。杂交瘤技术的建立使人们能够通过细胞融合得到抗特定抗原的单克隆抗体。基因重组动物细胞能够表达原核生物和低等真核生物所不能正确表达的糖蛋白和复杂结构与修饰的多肽。在此基础上，动物细胞大规模培养技术得到了长足的发展。但是，由于人们对于动物细胞遗传、生理、代谢、分化等许多基本问题的认识还很肤浅，细胞培养技术还基本处于实验技术的阶段。

第一节 动物细胞培养的发展历史

虽然许多学者以前研究过动物细胞的体外行为，动物细胞首次应用于生产是在1949年，实验证明体外培养的灵长目动物神经和非神经（肾）组织的细胞能够感染和繁殖脊髓灰质炎病毒。

其实，在此之前动物细胞培养的探索已长达半个多世纪。最早的当数Arnold于1880年证明白细胞能在体外分裂，1885年德国人Roux用温生理盐水保持鸡胚细胞存活了数月。1897年Loeb证明从血液和结缔组织中分离的细胞在血清和血浆中可存活。1903年Jolly用盖片悬滴法培养蝾螈白细胞，细胞进行分裂并存活近一个月。

现代细胞培养应该说是从Harrison和Carrel两人开始的。Harrison于1907年在无菌条件下，采用悬滴法在淋巴液中培养蛙胚神经组织生存了数周，观察到神经细胞突起生长的过程，创立了在体外观察和研究活组织的方法。1913年，Carrel采用严格的无菌技术致使细胞长期培养，据报道最长达34年之久，其创造性的工作揭示离体的动物细胞在适当的培养条件下具有近于无限的生长和繁殖能力。1923年他又引入了一种Carrel培养瓶，可以方便地进行无菌传代培养，此瓶成为细胞培养瓶的鼻祖。

在细胞培养方面的又一明显进步是1916年Roux和Jones采用胰蛋白酶消化组织基质，形成游离的细胞，以后又用于贴壁依赖性细胞的传代培养。但该技术直到20世纪50年代才趋于成熟。

20世纪40年代，青霉素、链霉素等抗生素相继被发现并被引入细胞培养过程，有助于常规地保持培养基无菌和减少污染，使细胞培养成为一种广泛采用的实验室技术。

细胞培养技术的不断革新,得以建立了长期生存的细胞株和细胞系。1948年, Earle 分离出小鼠 L 成纤维细胞,从单细胞形成克隆,建立了 L 细胞系。1952年, Gey 从人的子宫癌建成一株称为 HeLa 细胞的连续细胞系。1961年, Hayflick 和 Moorhead^[1]分离出一株人成纤维细胞 (WI-38),并证明它在细胞培养中有一定寿命。1965年, Harris 和 Watkins 用病毒使人和小鼠细胞融合。1975年, Köhler 和 Milstein^[2]报道了第一株能分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞,使细胞工程进入了一个崭新的阶段。目前,全世界已建立的细胞系有数千种,包括正常细胞、转化细胞、肿瘤细胞和遗传缺陷型细胞,这些细胞来自于人、小鼠和其他哺乳动物,鱼等脊椎动物,蚊、蚕等昆虫,以及其他更低等动物的各种组织。

合成培养基的建立对细胞培养技术的迅速发展发挥了重要作用。1955年, Eagle 在研究不同细胞在培养中的营养要求的基础上,提出了第一个被广泛使用的合成培养基。1965年, Ham^[3]引入了第一个无血清培养基,支持了一些细胞的生长。1978年, Sato 用激素和生长因子的混合配方形成了开发无血清培养基的基础,形成了目前无血清培养基配方的基本格局。

自 1949 年脊髓灰质炎病毒在体外培养的细胞上增殖成功后,20 世纪 50 年代形成了利用猴子的肾或睾丸培养生产脊髓灰质炎疫苗的工艺。这个技术的建立为利用培养的鸡或灵长目动物胚胎细胞生产流行性腮腺炎 (1951)、麻疹 (1958)、腺病毒 (1958) 等的疫苗奠定了基础。进入 20 世纪 80 年代,随着基因工程技术的发展,利用培养的动物细胞生产的重组蛋白产生了重大的效益。1982 年,人胰岛素成为第一个获准作为治疗药物的重组蛋白。1987 年,用重组动物细胞生产的组织型纤溶酶原激活剂成为商品。后来,利用动物细胞表达的 HBsAg、EPO、第八因子、第九因子等一批新的重组蛋白药物进入市场。近年来,重组抗体的生产和应用得到迅速发展,一大批具有特殊疗效的抗体药物已经进入或即将进入市场。

第二节 通过动物细胞培养得到的产品

用动物细胞生产产品,是 20 世纪 80 年代以来生物技术工业中一个十分重要的组成部分,早期开发成功的一部分产品列于表 1-1^[4]。这些产品可以分为三类。①动物细胞可以自然合成或在外源基因指导下合成许多分泌产物,其中许多被鉴定为很有潜力的治疗药物。某些细胞合成的干扰素和酶,细胞工程方法建立的杂交瘤细胞合成的单克隆抗体(以下简称“单抗”),基因工程细胞株合成的 EPO、tPA 等就是典型的例子。②用动物细胞作为宿主,可以生产其他生物体,如病毒疫苗就是迄今生产规模最大的细胞培养产品。自 20 世纪 50 年代以来,一系列人用疫苗、兽用疫苗通过动物细胞生产出来并得到了许可。最初采用原代的猴肾细胞生产人用疫苗,后来改用人二倍体细胞 WI-38 作为主要的宿主细胞。20 世纪 80 年代,异倍体的 Vero 细胞被有限度地获准用于生产人的病毒疫苗。③有的细胞本身就是产品,

表 1-1 动物细胞培养生产的主要现代生物技术产品 (1995 年前)

| 糖蛋白 | 宿主细胞系 | 典型生产方法 | 世界销售量/亿美元 | | 代表性生产公司 |
|------|-------|------------|-----------|--------|-----------|
| | | | 1990 年 | 1995 年 | |
| EPO | CHO | 自动化滚瓶 | 2.9 | 10 | Amgen |
| 第八因子 | BHK21 | 500L 反应器 | 1.75 | 6 | Miles |
| tPA | CHO | 1000L 反应器 | 2.1 | 3 | Genentech |
| 单抗产品 | 杂交瘤 | 10000L 反应器 | 0.35 | 2 | Celltech |

用于皮肤或骨髓移植、基因治疗等，某些有用大分子可以从培养的细胞体中提取。培养的细胞还可用于抗癌药的筛选和毒性测定等。

生物技术产业过去 10 年取得了很大的进展，并且仍然在快速发展^[5]。专家预测，蛋白质治疗还只是进入市场的开始，未来 10~20 年，蛋白质、抗体和多肽将扑面而来^[6]。在蛋白质治疗的快速发展中，哺乳动物细胞培养生产的各种产品近年来大量上市，代表性的是治疗乳腺癌的单克隆抗体 HerceptinTM，治疗类风湿性关节炎的免疫球蛋白-肿瘤坏死因子受体融合蛋白 EnbrelTM，以及灭活甲肝疫苗 VaqtaTM。近年来，治疗用重组抗体生物制品的销售额呈急剧增长的趋势（图 1-1），成为重组动物细胞培养生产的主要产品。

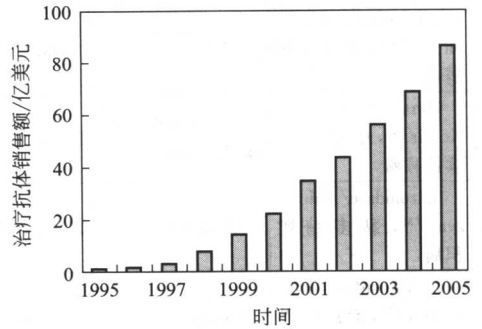


图 1-1 世界单克隆抗体销售增长趋势

在美国，1996~2004 年哺乳动物细胞培养生产的 37 个治疗和诊断产品成功上市，细胞培养技术随之发展，在产业水平上进行开发、放大和后续处理。在 20 世纪 80 年代，人们关注各种反应器的开发用于细胞培养。哺乳动物细胞培养的主要困难在于氧的供应、废产物的积累、精确的过程控制、细胞的剪切敏感性及培养贴壁细胞系的问题^[7]。最后，大规模细胞培养的反应器技术归结于采用标准的搅拌罐反应器，并且随着细胞适用于悬浮培养，剪切敏感性和氧的供应问题也基本解决。接下来的问题是提高产量的同时控制产品质量、放大时的二氧化碳控制，以及通过原材料和生产控制减小外来污染风险。但是，对于少量和专门的应用，反应器仍然百花齐放，从滚瓶到多层板和中空纤维，用于病毒疫苗、基因治疗和诊断产品的生产。转基因动植物也是很活跃的研究领域，可以在极大量生产（如年产 100kg 单克隆抗体）中发挥作用，但是规程方面还有问题要解决，利用转基因生物作为生产载体的产品还没有获得批准。

一、近年来美国食品和药品管理局（FDA）批准的产品^[5]

从 1996 年以来，FDA 批准生物技术产品中，大约有 2/3 是通过哺乳动物细胞系统生产的。根据技术特征，把它们分成治疗用重组蛋白、疫苗、组织培养产品和诊断产品。表 1-2 列出了每个产品的数据，包括生产细胞系、反应器型式和生产模式、生产培养基的类型。在细胞系的选择上，主要是三个细胞系，即中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 和 NS0。这三个细胞系用于生产了 21 个批准产品中的 11 个产品，几乎所有治疗用重组蛋白。

表 1-2 哺乳动物细胞培养系统生产的生物制品清单 1996~2004

| 生物制品名称 | 生产商 | 批准日期 | 产物类型 | 细胞系 | 生产方法 | 培养基 |
|--|--------------|--------------|-------------------------|---------|-------|--------|
| 重组治疗 | | | | | | |
| Natalizumab/Tysabri TM , 治疗多发性硬化症 | Biogen-Idec | 2004. 11. 23 | 人源化抗体 IgG _{4c} | 小鼠骨髓瘤细胞 | 未注明 | |
| Follitropin alfa/Gonal-F TM , 治疗不孕症 | Serono S. A. | 2004. 3. 25 | 重组糖蛋白, α -促滤泡素 | CHO | 反应器培养 | 未注明 |
| Bevacizumab/Avastin TM , 转移性结肠癌或直肠癌 | Genentech | 2004. 2. 26 | 人源化抗 EGF 受体抗体 | CHO | 未注明 | 含有庆大霉素 |

续表

| 生物制品名称 | 生产商 | 批准日期 | 产物类型 | 细胞系 | 生产方法 | 培养基 |
|--|--|--------------|--------------------------------------|---------|--------------|----------------------------------|
| Cetuximab/Erbitux™, 治疗结肠癌 | Imclone | 2004. 2. 12 | 嵌合抗 EGF 受体抗体 IgG _{1k} | 小鼠骨髓瘤细胞 | 未注明 | |
| Efalizumab/Raptiva™, 慢性中重度银屑病 | Xoma/Genentech | 2003. 10. 27 | 人源化抗 CD11a 抗体 | CHO | 未注明 | 含有庆大霉素 |
| Omalizumab/Xolair™, 中重度持续性哮喘 | Genentech/Tanox/Novartis | 2003. 6. 20 | 人源化抗 IgE 抗体 | CHO | 悬浮培养 | 含有庆大霉素 |
| Laronidase/Aldurazyme™, 黏多糖贮积病 | Genzyme | 2003. 4. 30 | 黏多糖- α -L-艾杜糖醛酸水解酶 | CHO | 未注明 | 未注明 |
| β -Algasidase/Fabrazyme™, 治疗弥漫性体血管角质瘤 | Genzyme | 2003. 4. 23 | β -半乳糖苷酶 | CHO | 反应器工作体积 340L | 未注明 |
| Alefacept/Amevive™ 中重度银屑病 | Biogen/Idec | 2003. 1. 30 | 融合蛋白 | CHO | 未注明 | 无血清 |
| Urokinase/Abbokinase™ 肺栓塞 | Abbott | 2002. 10. 10 | 重组蛋白, 尿激酶 | 新生儿肾细胞 | 未注明 | 未注明 |
| Ibritumomab tiuxetan/Zevalin™ B 细胞 non-Hodgkin's 淋巴瘤 | IDEC | 2002. 2. 19 | 单抗 | 鼠源, 杂交瘤 | 未注明 | 未注明 |
| Interferon β -1a/Rebif™, 治疗多发性硬化病 | Serono S. A. /Pfizer | 2002. 3. 7 | 重组蛋白, β 干扰素 1a | CHO | 未注明 | 未注明 |
| Darbepoetin alfa/Aranesp™, 治疗肾性贫血 | Amgen | 2001. 9. 17 | 重组糖蛋白, EPO 突变体 | CHO | 悬浮培养转瓶培养 | 未注明 |
| Alemtuzumab/CamPATH™, 治疗 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 | Ilex Oncology/Millennium Pharmaceuticals/Berlex Laboratories | 2001. 5. 7 | 人源化抗 CD52 抗体 | CHO | 悬浮培养 | 含有新霉素 |
| Tenecteplase/TNKase™ 减少由急性心肌梗死引起的死亡率 | Genentech | 2000. 6. 2 | 重组糖蛋白 | CHO | 未注明 | 含有庆大霉素 (65mg · L ⁻¹) |
| 重组抗血友病因子/ReFacto™ 控制 hemorrhagic episodes | Genetics Institute | 2000. 3. 6 | 重组糖蛋白 | CHO | 连续灌注 | 无血清, 含有人血清白蛋白和重组胰岛素 |
| 淋巴细胞干扰素 α -n1/Wellferon™, 治疗慢性丙型肝炎 | Wellcome Foundation Limited, Wellcome Research Laboratories | 1999. 3. 25 | 内生性糖蛋白 | 人成淋巴细胞系 | 未注明 | 未注明 |
| 重组凝血因子 VIIa/NovoSeven™ 治疗 A 或 B 型血友病人的出血 | Novo Nordisk A/S | 1999. 3. 25 | 重组糖蛋白 | BHK | 未注明 | 含有小牛血清 |
| Etanercept/Enbrel™ 治疗风湿性关节炎 | Immunex | 1998. 11. 2. | IgG ₁ 与 TNF 受体的融合体 | CHO | 搅拌罐反应器, 悬浮 | 未注明 |
| Trastuzumab/Herceptin™ 治疗转移性乳腺癌 | Genentech | 1998. 9. 25 | 单抗, 人源化 IgG _{1k} , 含小鼠 CDRs | CHO | 搅拌罐反应器, 悬浮 | 无血清, 含有庆大霉素 |

续表

| 生物制品名称 | 生产商 | 批准日期 | 产物类型 | 细胞系 | 生产方法 | 培养基 |
|--|-------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|---|
| Infliximab/Remicade™ 治疗 Crohn's 疾病 | Centocor | 1998. 8. 24 | 单抗, 小鼠/人嵌合 IgG _{1κ} | 小鼠骨髓瘤细胞系, 重组 (培养基组分选择的 NS0 细胞) | 搅拌罐反应器, 悬浮, 灌注培养 (旋转过滤) | 无血清, 含有蛋白水解物, 牛转铁蛋白, 胰岛素, 血清白蛋白, 和 Excyte |
| Palivizumab/Synagis™ 呼吸合胞病毒的预防 | MedImmune | 1998. 6. 19 | 单抗 | NS0, 重组 | 搅拌罐反应器, 悬浮, 流加分批 | 无血清 |
| Basiliximab/Simulect™ 急性器官排斥的预防 | Novartis Pharmaceuticals | 1998. 5. 12 | 单抗, 小鼠/人嵌合 IgG _{1κ} | 小鼠骨髓瘤细胞系, 重组 | 搅拌罐反应器, 悬浮, 灌注培养 | 无血清 |
| Daclizumab/Zenapax™ 急性器官排斥的预防 | Hoffman-LaRoche | 1997. 12. 10 | 单抗, 小鼠/人嵌合 IgG ₁ | SP2/0 | 未注明 | 未注明 |
| Rituximab/Rituxan™ 治疗 B 细胞非 Hodgkin 淋巴瘤 | IDEC Pharmaceutical/Genentech | 1997. 11. 26 | 单抗, 小鼠/人嵌合 IgG _{1κ} | CHO | 搅拌罐反应器, 悬浮 | 含有庆大霉素 |
| 重组凝血因子 IX/Benefix™ 控制 B 型血友病人 hemorrhagic episodes | Genetics Institute | 1997. 2. 11 | 重组糖蛋白 | CHO | 搅拌罐反应器, 悬浮, 换液 | 无血清, 含有重组胰岛素 |
| 干扰素 β-1a/Avonex™ 治疗多硬化症 | Biogen | 1996. 5. 17 | 重组糖蛋白 | CHO | 搅拌罐生物反应器, 悬浮 | 未注明 |
| 疫苗 | | | | | | |
| 轮状病毒疫苗, 活的, 口服, 四价/RotaShield™ 轮状病毒免疫 | Wyeth Laboratories | 1998. 8. 31 | 活病毒疫苗 | FRhL-2 | 未注明 | 含胎牛血清培养基, 含有硫酸新霉素和两性霉素 B |
| 狂犬病疫苗/RabAvert™ 狂犬病免疫 | Chiron Behring | 1997. 10. 20 | 疫苗 | 未注明 | 未注明 | 未注明 |
| 灭活甲型肝炎疫苗/VAQTA™ 甲型肝炎 | Merck & Co | 1996. 3. 29 | 灭活疫苗 | 人二倍体成纤维细胞 MRC-5 | 贴壁, 连续流加培养 | 有血清 |
| 组织培养产品 | | | | | | |
| 自体培养的软骨细胞/Cartilcel SM Service™ 软骨缺陷的修复 | Genzyme Tissue Repair | 1997. 8. 22 | 自体细胞 | 软骨细胞 | 组织培养瓶 | 有血清 |
| 诊断产品 | | | | | | |
| α-Thyrotropin/Thyrogen™, 血清甲状腺球蛋白测试 | Genzyme | 1998. 11. 30 | 重组蛋白 | CHO | 未注明 | 未注明 |
| I 型和 II 型人 T-lymphotropic 病毒/Abbott HTLV-I / HTLV-II EIA™ 用于酶法免疫测定 | Abbott Laboratories | 1997. 8. 15 | 单抗 | 慢性感染的人 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞 | 未注明 | 未注明 |
| Capromab pendetide/ProstaScint™ 肿瘤造影剂 | Cytogen | 1996. 10. 28 | 单抗, 小鼠 IgG _{1κ} | 小鼠杂交瘤细胞系 | 中空纤维 | 无血清, 含有牛血清白蛋白和转铁蛋白 |
| Nofetumomab/Verluma™ 肿瘤造影剂 | Dr Karl Thomae | 1996. 8. 20 | 单抗, 小鼠 IgG _{2b} Fab 片断 | 哺乳动物细胞 | 未注明 | 无血清 |

续表

| 生物制品名称 | 生产商 | 批准日期 | 产物类型 | 细胞系 | 生产方法 | 培养基 |
|---|--------------|-------------|---------------------------------|----------|------|-------------|
| Imciromab pentetate/Myoscint™ 心脏造影剂 | Centocor | 1996. 7. 3 | 单抗, 小鼠 IgG _{2k} FAb 片断 | 小鼠杂交瘤细胞系 | 未注明 | 有血清, 含有庆大霉素 |
| Technetium-99 acritumomab/CEA-Scan™ 转移性直肠癌肿瘤造影剂 | Immunomedics | 1996. 6. 28 | 单抗 | 小鼠杂交瘤细胞系 | 未注明 | 未注明 |

注: 资料来源: <http://www.fda.gov>. BHK, 幼仓鼠肾; CDR, 补体决定区; FAb, 抗原结合区; FRhL-2, 恒河猴胚胎二倍体细胞系; TNF, 肿瘤坏死因子。

重组治疗用产品, 主要是重组蛋白或抗体, 需要的量比较大, 因此成为大规模蛋白质生产的代表。在这些产品生产中, 至少 70% 的产品使用了搅拌罐反应器, 至少 50% 使用了无血清培养基。生产疫苗和组织替代产品的细胞系多种多样, 需要专门的反应器和培养基。另外, 诊断产品以单抗为主, 但是所需的量很小。生产公司采用专门的细胞系和反应器系统。

因此可以说, 目前应用哺乳动物细胞培养大规模生产的工业过程是以搅拌罐反应器中的悬浮培养为公共平台的。采用相同的细胞系 (小鼠骨髓瘤细胞或 CHO), 就能够使用共同的平台系统。在这些过程中, 还有的共同特征是趋向于使用无血清培养基, 以及更加精确的流加或灌注技术。

重组抗体在中国有巨大的市场和利益空间。近年来, 重组抗体的研发受到了国内科技界和企业界的广泛重视。一批抗体药物已经完成临床前研究, 有的进入临床研究阶段 (表 1-3)。这些抗体药物研发以与国外合作或者跟踪国外研究为主, 绝大多数注册为二类新药。

表 1-3 国内申请进入临床研究的单克隆抗体药物

| 药品名称 | 申请类型 | 注册分类 | 申请日期 | 开发商 |
|--------------------------------------|------|------|--------------|------------------|
| 重组 CD3 人源化单克隆抗体注射液 | 新药 | 一类 | 2006. 3. 21 | 上海张江生物技术有限公司 |
| 重组抗 EGFR 人鼠嵌合单克隆抗体注射液 | 新药 | 二类 | 2006. 1. 16 | 上海张江生物技术有限公司 |
| 注射用重组抗 CD52 人鼠嵌合单克隆抗体 | 新药 | 二类 | 2005. 11. 14 | 上海张江生物技术有限公司 |
| 重组抗 CD52 人源化单克隆抗体注射液 | 新药 | 二类 | 2005. 6. 7 | 上海张江生物技术有限公司 |
| 重组抗 CD25 人源化单克隆抗体注射液 | 新药 | 二类 | 2005. 4. 20 | 上海国健生物技术研究院 |
| 重组人 CD22 单克隆抗体注射液 | 新药 | 二类 | 2005. 4. 6 | 深圳龙瑞药业有限公司 |
| 注射用重组抗 CD11a 人源化单克隆抗体 | 新药 | 二类 | 2005. 3. 18 | 上海国健生物技术研究院 |
| 碘 ^[131] 肿瘤细胞核人鼠嵌合单克隆抗体注射液 | 新药 | | 2004. 9. 24 | 上海美恩生物技术有限公司 |
| 注射用重组抗 HER2 人源化单克隆抗体 | 新药 | 二类 | 2004. 4. 5 | 上海中信国健药业有限公司 |
| 重组人-鼠嵌合抗 CD20 单克隆抗体注射液 | 新药 | 二类 | 2003. 11. 25 | 上海中信国健药业有限公司 |
| 重组人源化单克隆抗体 h-R3 | 新药 | | 2001. 8. 30 | 百泰生物药业有限公司 |
| 抗人白细胞介素-8 单克隆抗体乳膏 | 新药 | | 2001. 3. 1 | 东莞宏远逸士生物技术药业有限公司 |

二、近来报道的工艺

最近批准的生物制品代表早期临床研究中建立的生产工艺被认可。这些技术可能并不代表细胞培养技术的新趋势, 工业生产中遇到很多大规模生产上的障碍。例如, 贴壁细胞系的放大常遇到困难, 因此很多产品利用悬浮细胞系生产, 包括悬浮适应的 CHO 或小鼠骨髓瘤。通过合理设计和控制反应器以及向培养基中添加剪切保护剂 (如 Pluronic F68), 大大减小了搅拌和通气造成的剪切损伤。采用更加精确的流加策略和连续除去废产物的灌注系

统, 或者使用谷氨酰胺合成酶表达系统, 废产物的积累也得到了控制。过程控制系统有的借用微生物发酵控制系统的, 有的为细胞培养反应器重新开发。

最近的文献仍然关注这些问题, 以期找到更好的解决办法。目前, 随着动物细胞生产的重组蛋白的需求量急剧增加, 生物反应器的规模已经放大到 10m^3 以上, 相应的生物反应器放大设计和操作成为了新的挑战。这其中的主要技术关键涉及剪切敏感性、均一性、氧需求和传递、二氧化碳释放、pH 控制及渗透压等问题^[8]。在灌注和流加培养中, 10^7 个/ml 以上的高细胞密度已经屡见不鲜, 导致高的氧需求, 氧的传递成为制约因素。解决的策略是通入纯氧或者富氧空气, 并且采用烧结板气体分布器减小气泡以提高传递系数。虽然现在认为流体剪切对细胞的损伤并不像以前想象的那么严重, 特别是使用 Pluronic F68 可以减轻气泡对细胞的损伤, 但是仍然出于这些方面的考虑, 不主张增加通气量。可是, 小通气量不足以排走二氧化碳, 溶解二氧化碳浓度的上升也会损伤细胞, 并使 pH 下降。如果加碱, 渗透压又会增高。实验室研究证明, 比目前普遍使用的更强的搅拌强度仍然是可以接受的, 更加关注的是气体流速和泡沫问题。生物反应器中的均一程度随着规模放大而变差, 特别是在流加反应器中。

三、悬浮细胞培养过程

近年来, 许多细胞可以适应悬浮培养, 使用大分子添加剂减小剪切损伤, 使悬浮培养得到广泛应用^[9]。由于均相系统的放大技术成熟和过程控制容易, 悬浮培养成为细胞的大规模培养的首选方案。Moran 等^[10]和 Schenerman 等^[11]发现, 悬浮培养的规模从 3L 放大到 10000L, 过程性能和产品质量都没有明显差别。研究发现某些细胞培养条件会影响产品质量。Andersen 等^[12]发现组织型纤溶酶原激活剂 (tPA) 的糖基化对应于 CHO 细胞的生长速率, 与细胞的状态有关。Wu 等发现培养 CHO 细胞生产 EPO 过程中, 氨对 EPO 分子的糖基化程度有明显影响^[13]。

Schenerman 等^[11]描述了在搅拌罐反应器中利用 NS0 细胞生产人源化单抗 (Syn-agisTM)。他们发现, 细胞培养的收获时机影响抗体的产物性质, 但是规模增大、细胞代数的增加和葡萄糖条件都不影响产物质量。细胞在无血清下流加培养, 培养规模从 20L 放大了 10000L。虽然操作细节没有阐述, Schenerman 等描述的生物过程认证方法很有价值, 除了控制要求指标外测定了 3 个关键参数, 并且用生化方法和功能比较的方法评价这些参数的作用。Moran 等^[10]提出了另一个生物过程认证的方法。他们在搅拌罐中悬浮培养 NS0 细胞生产单抗 (IgG1), 无血清流加培养在 3~8000L 的规模上保持了过程和产物性质的不变。他们提出了 5 个关键参数, 测定了 32 种可能的参数组合中的 16 种。上述两种方法说明, 科学的认证程序与精确的分析方法相结合, 能够对生产过程和产品质量有深入的了解。

应用营养补加以增加细胞密度或者提高比生产速率, 从而增加体积产率, 仍然是关注的焦点^[14]。在搅拌罐反应器中最简单的悬浮培养越来越少了, 因为营养补加能够减少废物积累和营养波动, 达到更高的细胞密度和产率。现在的悬浮培养大致有三类: 换液分批培养、流加培养和灌注培养。有时过程开发受到时间限制, 换液分批培养成为大量生产的最有效方法^[15,16]。

Cacciuttolo 等^[15]通过更换和优化培养基, 除去毒性副产物, 特别是氨, 使细胞密度增加到 5×10^6 个/ml 以上, 培养周期达到 6 天。这个过程从 500ml 放大到 20L, 再到 200L 搅拌罐反应器。除了溶解氧的控制以外, 所有参数很容易从 3L 放大到 200L。他们认为, 在 200L 规模, 非理想混合造成氧限制, 减少了细胞生长, 增加了乳酸生产。解决的办法是把

溶解氧浓度从 20% (空气饱和度) 提高到 50%。

缩短过程开发周期的另一种方法是开发细胞培养的技术平台, 用来生产许多种重组蛋白或者单抗。Sauer 等^[17]开发了搅拌罐反应器的无血清流加培养方法, 能普遍用于 Sp2/0 和 NS0 细胞系培养生产人的或人源化的 IgG 抗体。过程在 3L 规模进行优化, 直接放大到 15L 和 750L 规模, 细胞密度、单抗比生产速率和产物质量都不变。同一个流加培养过程用于 7 个 Sp2/0 细胞系和一个 NS0 细胞系, 说明选择一个平台系统能够大大减少过程开发时间。Sauer 等也认为, 同样的过程可以用于其他细胞系的培养, 形成普适的流加培养过程, 但是他们只是把 SP2/0 细胞系的工艺用到了一个 NS0 细胞系。另一个例子是在搅拌罐反应器中用无血清流加培养工艺培养了 CHO/人源化单抗系统和 293/腺病毒绿色荧光蛋白系统^[18,19]。

对于蛋白质生产, 灌注悬浮培养是最常用的方式。设计搅拌罐灌注系统时, 细胞的截留有许多方式: 离心^[20]、内部或外部旋转过滤器^[21~23]、中空纤维组件等^[24,25]。Iding 等^[23]利用 CHO/凝血酶原系统在 200L 规模详细分析了灌注和培养条件对内部旋转过滤器性能的影响。中空纤维生物反应器也用作灌注系统, 但是其生产能力要小得多^[26~28]。Yang 等^[24]把流加培养的控制流加的概念引入到灌注培养中, 形成控制流加的灌注系统, 并用于无血清培养 Sp2/0-Ag14 细胞生产 hLL2 (人源化的 B 细胞专一性 IgG2a)。开始是用滚瓶培养的, 后来适应到搅拌罐悬浮培养。他们考察了 3L 规模的分批、流加和灌注培养, 用外部中空纤维组件进行了 20L 规模的灌注培养, 获得了最高的细胞密度 (1.3×10^7 个/ml) 和最高的单抗浓度 (150U/L)。在灌注培养上增加了葡萄糖的控制流加, 使细胞密度和单抗浓度分别提高到 1.8×10^7 个/ml 和 275U/L。Yang 等^[24]认为两种作用一起显著增加了控制流加灌注培养的单抗日产量: 葡萄糖的流加增加了细胞密度, 减小了产物稀释。他们也注意到, 滚瓶培养和最终优化的控制流加灌注培养在产物的糖基化上有差别。

四、贴壁细胞培养过程

贴壁细胞培养的工业放大会遇到特殊问题。由于贴壁细胞系有表面贴附要求, 为了增加细胞密度, 就要增加反应器的比表面积。培养贴壁细胞的传统方法是滚瓶培养^[29,30], 多层板系统 (如 Costar cellcubes 和 Nunc cell factories)^[31] 和搅拌罐中的微载体系统^[32~35]。现在, 滚瓶培养和多层板系统只限于使用在特殊的场合, 如 EPO 生产、基因治疗和疫苗生产。Unger 等^[30]模拟了滚瓶反应器中的流动和流体混合, 并在实验装置中用颗粒成像流速仪证实了理论结果。增加了垂直摆动, 改善了滚瓶系统中混合的速率和整体性。这个例子说明, 即使很完善的反应器系统, 利用工程原理进行设计改进, 仍有潜力可挖。用于贴壁细胞培养的非传统生物反应器还有鼓泡塔反应器, 组合有径向流固定床的膜透析反应器和灌注填充床反应器^[36~39]。

培养贴壁细胞的最主要的生物反应器是在搅拌罐中的微载体悬浮培养系统。微载体搅拌罐反应器的规模已达 10000L, 过程优化容易, 流加设计有弹性。由于技术原理相似, 工业上更容易建立平台技术。开发悬浮和贴壁培养的流加工艺时, 原理和方法是一致的, 目标是减少废物积累和营养变异, 建立高密度的细胞培养。

目前, 贴壁培养工艺的主要研究热点是带微载体颗粒的灌注培养。Kong 等^[32]在 3L 和 15L 的搅拌罐反应器中进行微载体灌注培养, 用 CHO 细胞生产单细胞克隆抑制因子。反应器中安装了内部旋转过滤器, 截留细胞/微载体, 运行了 2 个月。这个过程的重要特征是能够直接接种进行微载体培养, 无需细胞消化。主要参数都容易地从 3L 放大到 15L 规模, 但

是需要重新优化微载体浓度以增加表面积和在高微载体浓度下改进叶轮设计。

微载体之间细胞不经消化的直接转移已有报道^[33,34]。Zhang 等^[34]在 3L 搅拌罐反应器中安装内部旋转过滤器，灌注培养 CHO 细胞生产重组人丝钙素 (stanniocalcin, hSTC)。同时，在 60L 规模用 Sf9 细胞生产 hSTC。两种工艺生产的产物量接近，但是 CHO 细胞生产的 hSTC 的糖基化结构与 Sf9 细胞生产的不一样。这种糖基化结构上的差别表明，如果糖基化结构很重要，必须要采用哺乳动物细胞。

五、悬浮和贴壁细胞培养过程的共同问题

在中试规模转移到生产规模时，常常提出氧限制的问题，在这方面的改进工作没有间断过。细胞培养的另一个控制指标是溶解二氧化碳的测定和控制问题，这在小通气量下成功供氧时特别突出。迄今为止，溶解二氧化碳仍然以离线分析更可靠。Pattison 等^[40]报道了一种在线二氧化碳分析仪 (YSI 8500)，用于微生物和哺乳动物细胞培养。他们发现，在 30~2000L 搅拌罐反应器的微载体悬浮培养中，为避免过量通气造成损伤，采用了纯氧微通气，结果二氧化碳的积累成为问题。为了控制溶解二氧化碳在一定水平，在在线分析溶解二氧化碳下通入氮气。

在大规模工业生产中，细胞培养的污染是一个严重的问题。有的污染是规程上关注的病毒或感染性蛋白质（朊病毒），它们很可能来自培养基中的动物成分^[9,41]。有的污染由不完善的加工条件造成，需要在大规模培养中添加抗生素，表 1-2 中工业生产中使用的抗生素的产品数就说明了这一点。

生产规程上对于使用无血清和无蛋白培养基的要求，使过程设计发生重大变化，特别是贴壁细胞培养。几乎所有上面谈到的悬浮细胞培养都使用了无血清培养基，许多是无蛋白培养基，但是贴壁细胞培养就不是这样。因此，工业上，为了采用无血清或无蛋白培养技术，更可行的办法是把已有的细胞系适应到悬浮培养，而不是把贴壁细胞适应到无血清培养。其他污染源通过在培养基中添加抗生素来控制，正在进行的用机器人自动操纵搅拌罐反应器的研究也很有前途。Lutkemeyer 等^[42]用机器人操作 20L 和 100L 规模反应器，进行无菌取样，并把样品送到分析仪器中。

对于特殊场合，要求有灵活性、一次性和具有外加过程控制，可以采用一次性培养系统。Wave 生物反应器 (Wave Biotech/Panacea Solutions, Inc, Bedminster, NJ) 汲取了常用于培养基无菌储存的无菌袋的优点，适用于贴壁和悬浮细胞系的生长^[43,44]。这个反应器已用于各种细胞/蛋白质系统、NS0/单抗、293/腺病毒和 CHO/重组蛋白。

尽管动物细胞培养技术还处于成长阶段，但是近年来哺乳动物细胞生产重组蛋白的生产水平有了很大提高，已经达到了每升克级的水平，20 年来提高了 100 倍。英国 Lonza Biologics 公司在 10L 生物反应器中悬浮培养 CHO 细胞生产重组人单抗，达到了 4.7g/L 的高水平^[45]。

第三节 哺乳动物细胞表达系统

近年来，生物技术产业迅速发展。出于不同目的，在不同系统中表达各种重组蛋白充满挑战。在用于筛选时，所需蛋白质的种类很多，每种蛋白质的需要量不多。在用于治疗时，也许需要成吨的产量规模。大多数治疗蛋白质是由哺乳动物细胞培养系统 (CHO 细胞更常用) 或大肠杆菌生产的^[5,46]。

过去 10 来年中, 哺乳动物细胞表达系统高水平表达重组蛋白的技术不断完善, 取得很大的进展。CHO 和 NS0 小鼠骨髓瘤细胞表达系统现已成为主要的哺乳动物表达系统。载体结构的改进、选择性标记的设计, 以及基因定向和高通量筛选策略的进展, 建立了高产细胞系 [生产抗体的细胞系达 20~60pg/(个·天)], 减少了细胞系开发的周期。近来, 应用传统的基于病毒启动子的表达载体的表达技术还在发展, 如双顺反子表达策略, 采用了内核糖体插入点 (internal ribosome entry site, IRES) 序列或选择性剪接的技术。这些策略把目的基因的表达和选择性标记联系起来。另外, 以前曾经开发能表达反向激活因子或者在表达结构中包括正向活化单元的宿主细胞系, 研究表明在不久的将来可能在增加启动子活性方面取得进展。

为了表达重组蛋白药物, 也为了定向代谢工程的研究, 开发和评价了许多新的启动子系统。例如, 四环素和链霉素基因调控系统在 CHO 和其他哺乳动物细胞的调控表达中非常有用^[47]。这些系统将可用于多元控制和本身会抑制细胞生长或产生细胞毒性的产物表达。

在表达筛选用的多种蛋白质时, 可以使用 α 病毒系统^[48]。瞬时表达系统也能在短时内生产相当量的蛋白质 (10~20mg/L), 这种情况下不用分离稳定的转化子, 可以迅速得到蛋白质表达, 但不能长期使用^[49]。这些系统提供了丰富的工具, 使各种基因的操作更加有效。

近年来的一个最重要的进展, 就是使用基因工程的方法, 按要求改变哺乳动物宿主细胞的某种特性, 使之更加适合用于重组蛋白的表达。糖基化的控制就是一个例子。多年研究已经阐明细胞培养条件、宿主细胞选择和目的蛋白特性是怎样影响糖基化途径中的各个反应, 从而产生了不同体内半衰期或生物活性的分子的^[50~52]。过表达某种糖基转移酶能专一地改变重组蛋白的寡糖结构, 提高多糖质量。提高天然结构的均一性或者引入宿主细胞不具有的糖基赋予多糖新的性质和功能, 都很重要。例如, 在 CHO 细胞中过表达半乳糖转移酶和唾液酸转移酶, 在表达的治疗用重组蛋白中对应地增加了半乳糖和唾液酸的含量^[53]。在 CHO 细胞中, *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶 (*N*-acetylglucosaminyltransferase III) 的过表达增加了产物抗体的分叉 *N*-乙酰葡萄糖胺的量^[54,55]。唾液酸也被以 α -2,6-连接的方式引入到 CHO 和 BHK 细胞合成的糖蛋白中, 而这些细胞缺乏对应的唾液酸转移酶^[52,56]。

遗传操作的另一个热点是改善中心碳代谢的效率, 减少乳酸积累。在 BHK 细胞中过表达丙酮酸羧化酶, 减少了乳酸积累, 提高了细胞对于葡萄糖的产率, 但是在 CHO 细胞中的情况还不清楚^[57]。在杂交瘤细胞培养中, 部分破坏编码乳酸脱氢酶 (LDH-A) 基因, 减少了乳酸, 改善了细胞培养^[58]。

代谢控制的一个重要目标是控制细胞生长和减少程控细胞死亡。重组蛋白的生产是与细胞的生长状态有关的。在不同的系统里, 有生长耦联型的, 也有负生长耦联型的。利用这种现象, 把产物基因和诱导细胞周期阻断在 G1/S 期之间的调节蛋白 (譬如 p27) 一起诱导表达, 生长阻断造成比生产能力提高 15 倍^[59,60]。以温度变化及表达肿瘤抑制剂 (interferon regulatory factor 1, IRF-1) 来控制细胞增殖, 都会增加产量^[61,62]。可是在这两种情况下, 温度和 IRF-1 也许会对转录和 (或) 翻译发生直接作用。无论细胞生产能力的提高能否补偿生长抑制, 体积生产率确实有了提高。虽然它们的潜在价值很鼓舞人, 但是还存在一些问题, 如启动子缺乏通用性, 细胞系间有差异, 生长控制的方法未解决^[63,64]。

同样, 证明细胞程控死亡的化学抑制剂能够提高培养的活性, 也为细胞死亡途径的基因工程奠定了基础。在几个不同哺乳动物细胞系统中, 过表达 Bcl-2 和 Bcl_xL 都抑制了细胞的程控死亡^[65]。过表达 Bcl-2 的 CHO 细胞, 用正丁酸钠处理, 抗体的体积产量增加^[66]。