

现代生物技术制药丛书

动物细胞与转基因动物制药

Animal Cell Engineering and Transgenic
Animal Pharmaceuticals

劳为德 主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

现代生物技术制药丛书

动物细胞与转基因动物制药

Animal Cell Engineering and Transgenic
Animal Pharmaceuticals

劳为德 主编

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞与转基因动物制药/劳为德主编. —北京:
化学工业出版社, 2003. 3
(现代生物技术制药丛书)
ISBN 7-5025-4103-9

I. 动… II. 劳… III. ①动物-细胞-生物制品:
药物-制造②基因转变-动物-生物制品: 药物-制造
IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 013389 号

现代生物技术制药丛书
动物细胞与转基因动物制药

Animal Cell Engineering and Transgenic Animal Pharmaceutics

劳为德 主编

责任编辑: 杨燕玲 叶 露

文字编辑: 刘志茹

责任校对: 李 林

封面设计: 潘 峰

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市管庄永胜印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 14¼ 字数 336 千字

2003 年 4 月第 1 版 2003 年 4 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4103-9/Q · 34

定 价: 38.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《现代生物技术制药丛书》编委会

编委会主任 甄永苏

编委会副主任 刘海林 肖梓仁 吴剑波 赵贵英

委 员 (以姓氏汉语拼音为序)

程克棣	中国医学科学院药物研究所	研究员
董德祥	中国医学科学院医学生物学研究所	研究员
劳为德	中国科学院遗传与发育生物学研究所	研究员
李 元	中国医学科学院医药生物技术研究所	研究员
刘海林	中国医药生物技术协会	副理事长兼秘书长 研究员
吴剑波	中国医学科学院医药生物技术研究所	研究员
吴朝晖	中国医药生物技术协会	副秘书长
肖梓仁	中国医药生物技术协会	副理事长 研究员
许实波	中山大学药学院	教授
叶和春	中国科学院植物研究所	研究员
赵贵英	中国医学科学院医药生物技术研究所	研究员
甄永苏	中国医学科学院医药生物技术研究所	研究员 中国工程院院士

本册主编与编写人员

主 编 劳为德

编写人员 (以姓氏汉语拼音为序)

贾 茜	华北制药集团新药研究开发有限责任公司	高级工程师
劳为德	中国遗传与发育生物学研究所	研究员
刘思国	中国遗传与发育生物学研究所	博士生
王 辉	华北制药集团新药研究开发有限责任公司	助理工程师
魏敬双	华北制药集团新药研究开发有限责任公司	高级工程师
郑 虹	华北制药集团新药研究开发有限责任公司	工程师

序

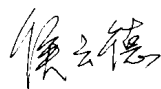
在人类基因组工程和生物信息学的推动下，生物技术创新日新月异，生物医药产业正在经历一个飞速发展的新阶段。生物技术将为人解决疾病防治、人口膨胀、食物短缺、能源匮乏、环境污染等一系列问题。发展生物技术产业是我国难得的机遇与挑战。生物技术产业在今后 20 年内，将与 30 年以前的计算机产业一样，对人类社会产生愈来愈大的影响。近几年来，科学家、金融家、企业家对生物医药产业的信心倍增，表现在用于生物医药产业发展的研究和发 展（R & D）费用每 5 年翻一番，是世界上用于 R & D 费用最多的产业。在开发生物医药的品种上也正在发生明显的转变，即从治疗一般疾病转向治疗疑难病症，从防治儿童和成人疾病转向防治老年病，从治疗疾病转向提高人的生活质 量，从生产药品转向生产功能性食品。

2002 年 5 月 1 日世界卫生组织发表的关于基因研究报告中指出，基因研究可以大幅度地提高发展中国家的医疗保健事业，振兴民族经济。我国在 2001 年已有 20 多种基因工程药物和疫苗被批准进行商业化生产，奠定了我国现代生物技术制药产业的基础。我国政府对发展生物技术极为重视：我国“十五”计划高技术产业化规划中“生物技术产业化工程”已列为十二项重点之一；在我国“十五”计划科技规划中“功能基因组和生物芯片”已列为十二个重点科技专项之一。

2002 年 4 月 18 日美国参议院一致通过一项决议，指定 4 月 21～28 日为“国家生物技术周”，以示国家对生物技术的重视。现代生物技术可提高健康保障水平，振兴医药工业，在农业上可提高产量，改进农产品的质量，并可保护环境。确定“国家生物技术周”的目的是要使美国人民了解生物技术对改善人的生活质量和环境质量是多么重要。

正值国际上生物制药蓬勃发展之时，化学工业出版社组织编写的《现代生物技术制药丛书》即将出版，这是我国生物技术界的一件大事。丛书从理论到实践全面系统地概括介绍了现代生物技术制药的最新进展。丛书包括《基因工程药物》、《抗体工程药物》、《动物细胞与转基因动物制药》、《植物细胞工程制药》、《酶工程制药》、《海洋生物制药》、《微生物制药》、《疫苗技术基础与应用》、《生物制药设备和分离纯化技术》以及《生物制药生产规范与质量控制》10 个分册。本丛书的作者均是国内一流的专家或院士，不仅具有很高的学术水平，而且也有丰富的实践经验。本丛书的宗旨是基础理论与实用技术相结合，并侧重于实用性，它不仅适合于生物制药相关领域的技术人员，也适用于大专院校相关专业的师生们。我坚信，本套丛书的出版必将对提高我国现代生物技术制药水平发挥积极作用，从而促进我国生物医药产业的发展。

中国工程院院士



2002 年 5 月于北京

前 言

150 多年来，人类疾病新疗法的开发是建立在有机化学和医学生理学知识综合基础上的。药物配方中的有机小分子有利于药剂分布，这一概念为医学提供了革命性的依据。这种简单的科学概念的应用促使临床实践发生了翻天覆地的变化，产生了现代的制药业。

20 世纪的后四分之一，分子生物学与生物技术对现代医学产生了深刻的影响。DNA 重组技术产生了以蛋白质为基础的新药物和新疗法；高通量组合化学的药物筛选方法与自动化设备加速了新药发现和开发进程；以前依靠在动物和整器官水平上检验合成有机分子来寻找新药的过程已经转变为针对重组蛋白和工程细胞系的高通量筛选；药物的生产从合成、天然物提取扩展到包括原核细胞、真核细胞、动物个体等各种表达系统的利用。

药伤补败，方药的概念在扩展。器官移植，以好换新——人与人之间器官的移植，只需看看免疫学的匹配，可从捐献者移植到接受者，不牵涉制药或更多的加工。这种替代疗法，已不是传统的药疗概念。现代医学之“药”，除了传统的狭义概念，已经拓展到细胞、组织或器官，连同它们的佐剂或配伍。而它们的制法和施用也因人而异，技术日渐趋新。

化学、生物化学、分子遗传学、分子发育生物学、分子病毒学和免疫学的新进展为有成效的新疗法开发的格局带来了深刻变化。建立在生物工程、基因疗法、移植疗法和人类疾病的分子生物学和发育生物学等学科进步的基础上的当代四种基本疗法（药物、基因、细胞、移植）的研究领域，存在巨大的新挑战和新机遇。每一途径均有可能通过最大限度地提高药物递送或导引的针对性，最大限度地减少传统药物治疗所固有的全身副作用，提高治疗效率。

以往为研究开发高疗效的药物花了很大努力。对疾病的药物疗法多为全身性给药，这往往会遭致全身的毒性，反过来使疗效受到限制。因此人们极希望能对具体部位有针对性地下药。用生物工程手段的疗法不仅可解决药物的正确递送，而且可向植入部位高度集中地进行局部递送。

对基因治疗的途径来说，以位点特异方式调节基因的表达，正如在发育期间所看到和在转基因动物中所确定的那样，开发出的基因递送载体可具有类似特异性和受控调节的性质。导引装置也可达到同样效果，有可能应用到心血管疾病和癌症治疗上。

向体内递送或导引有生物学功能细胞的生物学途径与传统的药物递送或导引有异曲同工之处。目前的器官移植是生物学途径与药理学途径的结合。组织、器官的复杂性，及以功能正常的组织、器官替代患病组织的需要，促使了以细胞、组织和器官为基础的特异形态疗法的出现。该技术的优点将充分体现在减免免疫抑制剂的使用而可维持移植体存活；而未来在器官来源及免疫抑制上的改善，成功率将会提高。未来更令人神往的是利用重编程的细胞再生同基因的组织或器官。

以细胞为基础的制药和疗法的研究和开发方兴未艾，未来的前景难于预料。细胞制药（cell pharmaceutical）与制药细胞（pharmaceutical cell）的研究引发出了以蛋白质为基础和以细胞为基础（包括组织和器官）的新的医疗手段和保健产品。前者已经被生物制药或制药业用于大规模培养来生产细胞来源的蛋白质产品，而转基因动物制药是此途径的引申和扩

展——本书的上、下两篇即分别侧重这两方面的内容。

本着反映现代制药业新领域的现状和发展趋势，本书内容尽可能涵盖近 1~2 年的最新成果。但因编写时间仓促，未免有疏漏和不当之处，欢迎指正。

希望本书能对生物制药相关领域的技术人员和大专院校药学和生物专业的师生有所裨益。

劳为德

2002 年 11 月 26 日

内 容 提 要

《现代生物技术制药丛书》是化学工业出版社重点策划、隆重推出的一套精品图书。该套书由我国著名生物技术专家甄永苏院士担任编委会主任，相关专业的专家共同撰写。

《动物细胞与转基因动物制药》分为两篇。上篇为动物细胞制药，阐述了传统细胞培养制药的历史沿革、基本原理、动物细胞生物反应器技术、动物细胞制药工艺和质量控制，并对动物细胞制药的前景进行了展望。下篇为转基因动物制药，将重点放在转基因动物技术上，阐述了转基因动物生物反应器、哺乳动物胚胎中遗传信息的导入、乳蛋白基因的表达调控及其相关组织特异性表达因子、乳腺特异的转基因表达、用于乳腺生物反应器表达的基因选择、应用体细胞克隆的方法生产转基因动物。

本书可供从事动物细胞制药和转基因动物制药的研发、生产、管理人员，及有关专业的大专院校师生阅读和参考。

目 录

上篇 动物细胞制药

(贾 茜 魏敬双 王 辉 郑 虹)

第 1 章 动物细胞制药历史沿革	1
参考文献	5
第 2 章 动物细胞制药的基本原理	6
2.1 细胞培养的生物学	6
2.1.1 起源和特性	6
2.1.2 分化	7
2.2 材料的选择	7
2.2.1 细胞类型	7
2.2.2 组织来源	8
2.2.3 传代培养	8
2.2.4 培养基	9
2.2.5 气相	10
2.2.6 培养系统	10
2.3 培养过程	11
2.3.1 基质	11
2.3.2 培养基	12
2.3.3 细胞培养	13
参考文献	15
第 3 章 用于制药的动物细胞	17
3.1 用于蛋白药物生产的细胞系	17
3.2 细胞的衰老和凋亡	19
3.2.1 细胞凋亡的引发途径	19
3.2.2 细胞凋亡的诱因	20
3.2.3 细胞凋亡的预防	21
3.2.4 培养物中衰老、凋亡和坏死细胞的检测	22
3.2.5 细胞培养物中凋亡组分的测定	24
3.3 无血清培养基	24
3.3.1 概述	24
3.3.2 血清和其他成分不确定的组织提取物在细胞培养系统中的作用	24
3.3.3 反应曲线	25
3.3.4 抗菌素、酚红、Hepes 和光的作用	27

3.3.5 组分纯度·····	28
3.3.6 脂肪酸·····	28
参考文献·····	29
第4章 大规模培养——动物细胞生物反应器技术 ·····	30
4.1 导论·····	30
4.1.1 悬浮培养·····	30
4.1.2 贴壁培养·····	31
4.1.3 贴壁和悬浮细胞培养的普遍问题·····	31
4.1.4 工业化细胞培养的发展趋势·····	32
4.2 常规方法与培养参数·····	32
4.2.1 细胞数的测定·····	32
4.2.2 设备与试剂·····	33
4.2.3 实际工作中应考虑的因素·····	34
4.2.4 培养基与营养成分·····	34
4.2.5 pH·····	35
4.2.6 氧气·····	36
4.2.7 培养类型·····	38
4.2.8 限制放大的因素·····	39
4.3 单层培养·····	39
4.3.1 概述·····	39
4.3.2 细胞贴壁·····	40
4.3.3 放大·····	41
4.4 悬浮培养·····	47
4.4.1 悬浮培养的驯化·····	48
4.4.2 静态悬浮培养·····	48
4.4.3 小规模悬浮培养·····	49
4.4.4 放大因素·····	49
4.4.5 搅拌反应器·····	51
4.4.6 连续流培养·····	51
4.4.7 气升式反应器·····	52
4.5 固定化培养·····	53
4.5.1 禁锢培养方法·····	53
4.5.2 截留培养·····	54
4.5.3 多孔载体·····	55
参考文献·····	56
第5章 动物细胞制药工艺 ·····	58
5.1 对厂房的要求·····	58
5.1.1 厂址选择·····	58
5.1.2 对厂房的要求·····	58
5.1.3 空气洁净技术·····	60

5.2 种子细胞的保存、复苏和鉴定	61
5.2.1 细胞的冻存	61
5.2.2 细胞系的鉴定	64
5.3 产物的分离纯化	69
5.3.1 蛋白纯化的放大	69
5.3.2 细胞及细胞碎片的去除	70
5.3.3 核酸的去除	73
5.3.4 浓缩和初步纯化	73
5.3.5 柱层析	76
5.3.6 蛋白质纯化系统的放大	83
5.3.7 蛋白质的稳定性	84
5.4 制剂分装	87
5.4.1 终产物的稳定性	87
5.4.2 冻干	88
5.4.3 贴标签和终产品的包装	89
5.5 保存和运输	89
参考文献	90
第6章 动物细胞制药质量控制	91
6.1 蛋白质的定性检测	91
6.1.1 免疫印迹实验	91
6.1.2 分子质量的测定	92
6.1.3 蛋白质结构测定	93
6.2 蛋白质的定量检测	95
6.2.1 免疫学测定	96
6.2.2 生物学活性测定（功能分析）	96
6.2.3 蛋白的浓度测定	97
6.3 蛋白质纯度分析	98
6.3.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳	98
6.3.2 高压液相分析	100
6.3.3 蛋白质中糖含量的分析	100
6.3.4 残余宿主细胞蛋白及 DNA 含量分析	101
6.3.5 牛血清蛋白残留量检测	101
6.3.6 亲和层析脱落配基的检测	101
6.4 对蛋白质药物制剂的质量控制	102
参考文献	103
第7章 动物细胞制药未来发展	104
7.1 对宿主细胞的改造	104
7.2 动物细胞大规模培养方式的选择	105
7.3 对发酵过程的控制	105
7.4 化学限定培养基的开发	105

7.5 产品的质量和安全性	106
7.5.1 对原材料的控制	106
7.5.2 外源因子的清除	106
7.5.3 规章、准则和药品生产质量管理规范	107
7.6 展望	107
参考文献	107

下篇 转基因动物制药

(刘思国 劳为德)

第8章 概论	109
8.1 生物制药公司面临的生产问题	109
8.1.1 生物医药开发的增长	109
8.1.2 企业供应的制约因素	109
8.2 转基因动物在生物工程制药中的地位	110
8.3 转基因的最新成果	111
8.4 当前的技术挑战	111
8.4.1 启动区	112
8.4.2 提高转基因的表达	112
8.4.3 位置无关性	112
8.4.4 新的长构件载体	113
8.4.5 胚胎干细胞	113
8.4.6 生产效率的优化	113
8.4.7 细胞核移植	114
8.5 结语	115
第9章 产生重组蛋白质的不同动物系统	116
9.1 从超级小鼠向转基因大家畜的延伸——动物生产性状的改良	116
9.2 产生重组蛋白质的不同动物系统	117
9.2.1 血液	117
9.2.2 尿液	118
9.2.3 精液	118
9.2.4 蛋清	118
9.2.5 蚕茧	118
9.2.6 乳汁	118
9.3 在转基因家畜的血液中表达重组蛋白	119
9.4 在转基因家畜乳腺中生产人体蛋白质	120
第10章 哺乳动物胚胎中遗传信息的导入	125
10.1 生产用动物的选择	125
10.2 转基因的方法	126
10.3 当前应用的技术——直接向哺乳动物胚胎细胞核内微注射 DNA	127
10.3.1 供体动物的超排	128

10.3.2	卵的收集	129
10.3.3	DNA 的微注射	129
10.3.4	存活胚胎的转移	130
10.3.5	转基因的整合	130
10.3.6	转基因的表达	132
第 11 章	乳蛋白基因的表达调控	133
11.1	酪蛋白基因的表达调控	133
11.1.1	核因子	134
11.1.2	测定 β -酪蛋白基因 mRNA 3'-UTR 序列结合蛋白	137
11.1.3	3'-UTR 涉及了 β -酪蛋白基因的组织特异性表达的决定	137
11.2	乳清蛋白—— β -乳球蛋白和乳清酸蛋白基因的调控	138
11.2.1	β -乳球蛋白的基因表达调控	139
11.2.2	乳清酸蛋白基因的调控	140
第 12 章	乳腺特异的转基因表达	145
12.1	酪蛋白基础上的转基因乳腺特异表达	145
12.1.1	牛的完整酪蛋白基因在转基因小鼠中的表达	146
12.1.2	牛的 $\alpha s1$ 和 κ 酪蛋白基因在转基因小鼠中的表达分析	147
12.1.3	酪蛋白基因簇的结构	148
12.1.4	在转基因小鼠中重建牛的 $\alpha s1$ - β 酪蛋白区域	149
12.1.5	小结	150
12.2	BLG 基础上的转基因表达	150
12.3	基于 WAP 的转基因乳腺表达	152
12.4	总结	154
第 13 章	乳腺生物反应器中基因的选择	155
第 14 章	几种动物的转基因制作过程	159
14.1	转基因兔的产生	159
14.1.1	用于微注射的 DNA 溶液的准备	159
14.1.2	YAC DNA 微注射	159
14.1.3	供体兔的准备和胚胎的收集	159
14.1.4	兔卵的微注射	160
14.1.5	注射后兔胚胎的移植及后代的产生	160
14.1.6	产生转基因兔的效率	161
14.1.7	转基因品系的建立及标记转基因的应用	162
14.2	猪的转基因	163
14.2.1	转基因猪作为个体制药系统的可行性	163
14.2.2	转基因猪的生产	164
14.3	转基因奶牛	165
14.3.1	牛受精卵的来源	165
14.3.2	原核注射	165
14.3.3	胚胎的培养	165

14.3.4	胚胎的性别鉴定和转基因检测	165
14.3.5	胚胎移植和羊水分析	166
第 15 章	体细胞克隆方法生产转基因动物	168
15.1	通过核移植产生胚胎	168
15.2	遗传物质的导入 (胚胎重建)	169
15.2.1	重构胚胎的激活	169
15.2.2	重构胚胎的培养	169
15.2.3	重构胚的细胞周期同步	170
15.2.4	供体细胞	170
15.2.5	通过培养细胞生产转基因绵羊的过程	170
15.3	影响细胞核移植效率的因子	172
15.4	体细胞中的基因打靶	172
15.5	畜类细胞的基因打靶	173
15.6	基因打靶在大动物上的可能应用	173
第 16 章	转基因乳腺生物反应器的未来	175
16.1	增多分子来源	175
16.1.1	基因组序列	175
16.1.2	基因表达的控制	176
16.2	体细胞修饰	177
16.3	提高转基因效率	178
16.3.1	获得适用的胚胎	178
16.3.2	胚胎中导入外源 DNA 构件	179
16.3.3	构件在基因组中的稳定整合	180
16.3.4	处理后胚胎的转移和移植	180
16.3.5	外源基因在转基因动物中的正确表达	181
16.4	总结	181
	参考文献	181
附录一	动物细胞制药常用设备及耗材供应商名录	188
附录二	转基因技术大事记	201
	中文索引	203
	英文索引	207

上篇 动物细胞制药

第 1 章 动物细胞制药历史沿革

提到动物细胞制药，必须从动物细胞体外培养（animal cell culture *in vitro*）讲起。

从 20 世纪 50 年代开始，动物细胞体外培养技术进入了迅猛发展的时期。这里只简单介绍一下堪称动物细胞体外培养历史上里程碑的事件^[1]。

1907 年，Harrison 创立了体外组织培养（tissue culture）技术。

1951 年，Earle 等开发了能促进动物细胞体外培养的人工合成培养基（synthetic medium）。

1957 年，Graff 用灌注技术（perfusion technology）创造了悬浮细胞培养（suspension culture）史上绝无仅有的细胞密度高达 $(1\sim2)\times 10^{10}/\text{L}$ 的记录，标志着现代灌注概念的诞生。

1962 年，Capstick 成功地大规模悬浮培养小鼠肾细胞，标志着动物细胞大规模培养技术的起步。

1967 年，Van Wezel 以 DEAE Sephadex A50 为载体培养动物细胞获得成功^[2]。

1975 年，Sato 等在培养基中用激素代替血清使垂体细胞株 GH3 在无血清介质中生长获得成功，预示着无血清培养（culture in serum-free medium）技术的诱人前景。

1975 年，Kohler 和 Milstein 成功地融合了小鼠 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞而产生能分泌预定单克隆抗体的杂交瘤细胞（hybridoma cell）^[3]。

1986 年，Demo Biotech 公司首次用微囊化（microencapsulation）技术大规模培养杂交瘤细胞（hybridoma cell）生产单克隆抗体获得成功。

1989 年，Konstantinovti 首次提出大规模细胞培养过程中生理状态控制，更新了细胞培养工艺中优化控制的理论。

动物细胞体外培养的问题解决后，为了实现动物细胞制药的工业规模的生产，要解决的问题首先是动物细胞的大规模培养，这方面的技术似乎最近才发展起来，但是人^[4]和仓鼠细胞^[5,6]早在 30 多年前就已在 1 000L 的细胞罐中培养成功。起初只有为数很少的几家研究机构由于特殊的需要才去进行这么大规模的工作。这些特殊需要一是要生产商业规模的兽用口蹄疫（FMD）病毒疫苗，二是要生产大量的人干扰素（IFN）用于临床评价。而在其他方面，大规模细胞培养一般被认为是一种难度很大、很难控制而且很不经济的生产方法，另外，其表达产物往往最终在安全性方面达不到临床使用的要求。

在 20 世纪 50 年代和 60 年代，随着磁力搅拌驱动的“搅拌瓶”（spinner）培养方式的出现，有关安全性的问题引起了人们的注意。研究表明，适应悬浮培养（suspension culture）方式而且可以不受明显限制地再传代的细胞都已经发生了“转化”，其特性与直接来源于人或动物组织的细胞以及二倍体成纤维细胞很不相同。大多数转化细胞来源于肿瘤，至少某些染色体异常，为非整倍体，当注射入新生或免疫抑制动物时，可引起肿瘤形成。由于当时人

们对转化状态的机制所知甚少，所以对于用这种细胞生产蛋白质药物很少有人赞同，人们担心产品会受到细胞来源的病毒或致癌因子的污染，从而对使用者构成潜在的威胁。

现在，由于动物细胞培养（animal cell culture）在规模和可靠性方面都不断发展，而且从中得到的蛋白质也被证明是安全有效的，因此人们对动物细胞培养的态度已经发生了改变。如今许多国家都制定了从动物细胞培养生产药品的法规条例，一些用这种方式生产的药品已经被批准使用。实际上，对于一些人用和兽用的重要蛋白质药物，尤其是那些相对较大、较复杂或糖基化（glycosylated）的蛋白质来说，动物细胞培养是首选的生产方式。本章将简单介绍一些重要历史事件的发展过程，着重介绍口蹄疫病毒疫苗和干扰素的生产。

（1）用 BHK21 细胞生产口蹄疫病毒疫苗 口蹄疫（FMD）在世界的很多国家都有发生，危害牛、绵羊、山羊和猪，如果不加控制会产生严重的经济后果。1947 年，Frenkel^[7]发现，在合适的培养基中，FMD 病毒可以在新鲜牛舌上皮的组织碎片中生长。现在，这种培养基已用于工业规模的培养罐中，仍在进行着疫苗用病毒的生产。不过，这一系统具有所有初级组织培养系统（primary tissue culture systems）的弱点，不能满足世界范围对疫苗的要求。

1962 年，在 Pirbright 英国政府动物病毒研究所（AVRI）工作的 Mowat 和 Chapman 在贴壁细胞系 BHK 21 中将 FMD 病毒培养成功^[8]。后来 AVRI 的 Capstick 及同事将 BHK 细胞进行了悬浮培养（suspension culture）驯化（adaptation），并且使之在这种状态下进行 FMD 病毒复制^[9,10]。经过 AVRI 的科学家们进一步的研究以及后来与 Wellcome FMD 实验室的合作，搞清了适合细胞生长和病毒繁殖的环境条件，并且知道了如何将这一工艺放大到工业应用的规模。这些研究比较了动物细胞培养（animal cell culture）和微生物培养系统的异同，许多由实验室系统发展而来的工业化工艺都已证明在大规模动物细胞培养方面具有通用性。

AVRI 的实验工作最初是从 200ml 和 800ml 的玻璃容器开始，很快就放大了 30L 和 100L 不锈钢罐的规模。一种基于 Eagle's 配方的价格低廉的培养基，补充 5% 成牛血清和蛋白胨后，被用于大罐细胞培养，细胞长势良好。实验工作证实，BHK21 细胞的连续生长和 FMD 病毒的持续生产都可以实现，在同一个罐内可以在很长的时间里进行连续批式培养，而不会出现微生物污染的问题。

在上述系统中生产的 FMD 病毒是灭活疫苗的来源，这种疫苗具有很强的效力，能够保护接种动物免受攻击病毒的感染。前文曾指出，起初人们担心这种来源的疫苗可能具有致癌性。BHK 细胞含有 C 型病毒颗粒，在连续悬浮培养（suspension culture）传代过程中变成非整倍体，并且在其起源物种——仓鼠身上具有越来越高的潜在致癌可能。但是，因为是兽用产品，人们可以直接在动物身上进行安全试验，于是，高浓度的细胞和含有核酸的细胞抽提物被注射到各种动物体内，并观察 2~3 年的时间。所有这些研究都确证肿瘤只在仓鼠这一种动物发生，而且只有在注射完整细胞时才会发生。疫苗生产工艺确保在制造过程中所有细胞都被破坏或除去。

从 1967 年起，在中试规模发展起来的这项技术被设计并应用于工业规模 FMD 病毒疫苗的生产，生产厂商是 Wellcome（现为 Cooper 动物保健）集团，生产厂分布于欧洲、非洲和南美洲的 8 个国家。这些厂家现在使用 5 000L 的细胞罐生产当地特定血清型的 FMD 病毒。到 1976 年，这些工厂每年生产多于 1 百万升的疫苗，到 1983 年，规模就达到了大约 2 百万升，相当于 3.50×10^8 支单价疫苗。Wellcome 还用同样的技术用 BHK21 细胞制造兽用

狂犬疫苗。

(2) Rosewell Park Memorial 研究所进行的类淋巴母细胞 (lymphoblastoid cell) 培养当 FMD 病毒疫苗在英国进行开发时, 在上纽约州的 Rosewell Park Memorial 研究所进行着另一项先驱性的研究, George Moore 和他的同事创建了一座工厂, 在 1 000L 培养罐中进行人的类淋巴母细胞的悬浮培养 (suspension culture)^[4], 这在当时是动物细胞培养 (animal cell culture) 的最大规模。他们的研究表明这一规模的工作是可行的, 并开发了多种培养基, 尤其是 RPMI1640, 这种培养基至今仍在用于类淋巴母细胞的培养。然而, 由于当时不知道这样大量生产出来的细胞有什么用处, 失去了经济支持的工厂最终被关闭了。

这一工作超越了它当时所处的时代, 事后来, 这些类淋巴母细胞培养物中很可能含有各种淋巴因子, 如果当时能够意识到, 这些因子的量可能足够进行下一步的分离纯化。

(3) Wellcome 对类淋巴母细胞干扰素的开发 干扰素 (IFN) 于 1957 年被发现, 此后, 由于来源短缺, 其临床评价受到很大阻碍, 推迟了二十多年。白细胞干扰素是从交换输血的人白细胞制备得到的, 由于这种干扰素的出现, 在 20 世纪 70 年代早期对干扰素的临床研究得以开始, 但是用这种方式只能生产少量的干扰素。

在贝肯汉姆的 Wellcome 实验室, 对干扰素的研究开始于 1959 年。1974 年, Finter 及其同事决定开发人血细胞以外的其他替代物作为 IFN 的来源, 以从中制备大量的可用于临床试验的样品。当时, Wellcome 的成员已经在 BHK 细胞的大规模培养方面积累了很多经验, 因此很自然地首先想到 IFN 能否在同样的系统中生产。在筛选了多种人的细胞系 (cell line) 以后^[11,12], 他们选择了类淋巴母细胞 (lymphoblastoid cell) Namalwa 细胞系进行更深入的研究, 选择这种细胞的原因是因为这种细胞生长情况很好, 而且能产生大量的干扰素。这一项目的结果是生产出了大量的高度提纯的人淋巴细胞干扰素, 现在商品名为 Wellferon。在经过 50L 罐的初步放大后, 1978 年早期放大到了 100L 的中试规模, 然后 1980 年规模达到了 200L, 从 1983 年起规模更是扩大到了 800L 和 1 000L。

虽然生产 FMD 疫苗和 IFN 所需要的设备和技术基本相同, 但后者在工艺上的要求更加严格。

Namalwa 细胞生长相对较慢, 倍增时间约 35h, 因此使用连续培养系统 (continuous solera system) 进行细胞的培养。所使用的培养基是 RPMI1640, 补充蛋白胨和 3.5% 成牛血清。在大规模工厂中, 一系列体积依次增加的培养罐培养出生产 IFN 所需的细胞, 如果不管出于何种原因, 其中一个系列的细胞损失了, 可以很快从其他小一级的罐重新接种。IFN 的生产采用批式工艺, 细胞被接入生产罐中, 加入丁酸盐, 然后加入仙台病毒诱导^[13]。生产罐在每批细胞中间都要消毒, 但小体积的种子罐则尽量维持连续培养。通过设计和操作上的谨慎处理, 种子罐培养的平均维持时间逐渐延长, 从中试规模的几周到现在工厂中 10 个月或更长时间, 这样大大提高了生产效率和经济效益。

在抗生素或合成药物的制造过程中, 对终产品的质量和组成的重视远远超过中间工艺过程。相反, 在生产减毒病毒疫苗的过程中, 控制起始原料以及中间过程的质量是很关键的, 因为对终产品组成只能进行有限的几项检测。为保证大规模培养过程中培养基成分的一致性, 一次配制大量的培养基浓缩液, 配制好后将其储存起来, 必要时冻存于 -20℃。各种培养基浓缩液按需要的数量混合制备成一批完全培养基, 这样在相当长一段时间内都可以使用组成成分一致的培养基, 即使每天用量达 800L 以上时也如此。

(4) 由动物细胞培养制备的临床用产品的可接受性 由于前面已经讨论过的原因, 有一