

不同通气搅拌条件下体外培养 CHO 细胞高表达西妥昔单抗的研究

翁志兵¹, 邵春花¹, 胡 辉^{*2}

(1. 上海中信国健药业股份有限公司,上海市,201203;2. 抗体药物国家工程研究中心,上海市 201203)

摘要:以稳定表达西妥昔单抗的 CHO 细胞为研究对象,采用无血清悬浮培养方式,建立 4 种不同的通气及搅拌方式,通过对细胞密度、细胞活率以及蛋白浓度进行跟踪检测,考察其对细胞生长和蛋白表达水平的影响。实验结果表明新型通气搅拌方式的细胞密度和蛋白表达量优于或相当于传统的微泡通气方式,同时还改善了细胞培养的微环境,且在清洗验证上具有很大优势,为大泡通气在动物细胞培养的应用方面奠定了一定的基础,也为优化中试规模制备西妥昔的 CHO 细胞培养工艺奠定了基础。

关键词:西妥昔单抗;CHO 细胞;细胞培养;大泡通气

中图分类号:Q 813.11 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2015)01—0074—05

Study on High Level Expression of Cetuximab in Vitro Culture by Different Ventilation and Stirring Conditions in CHO Cells

WENG Zhibing¹, SHAO Chunhua¹, HU Hui^{*2}

(1. Shanghai CP Guojian Pharmaceutical Co.ltd., Shanghai 201203, China; 2. National Engineering Research Center of Antibody Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: Four different Ventilation and stirring conditions were established ,Taking CHO cells expressed Cetuximab as research object and adopting the serum -free medium and suspension culture, the effect of different Ventilation conditions on cell density, cell viability and protein concentration were contrasted. The results show that compared with traditional Ventilation like micro bubble and no bubble, cell density and protein concentration of big bubble Ventilation was almost the same even better in some respects. The new aeration not only changed the microenvironment of the CHO cells, but also had a great advantage in the cleaning validation. This Study laid a foundation for the application of big bubble ventilation on Large-scale Mammalian Cell Culture, and also laid a foundation for the optimization of CHO culture technology in pilot scale.

Keywords: cetuximab, CHO cells, cell culture, big bubble ventilation

收稿日期: 2014-05-18

基金项目: 上海市科技人才计划项目(13XD1422100); 上海市科技支撑计划项目(12431901402)。

作者简介: 翁志兵(1980—), 男, 上海人, 工学硕士, 工程师, 主要从事动物细胞培养研究。E-mail: wengzhib@cpgj-pharm.com

* 通信作者: 胡 辉(1976—), 男, 上海人, 高级工程师, 主要从事抗体药物开发研究。E-mail: huhui@china-mab.com

动物细胞大规模培养是当前生产高附加值抗体类医药产品的基础。然而动物细胞培养时由于缺乏细胞壁的保护,自身非常脆弱,对剪切力极端敏感。除了搅拌外,通气带来的气泡在破裂的时候,也能产生很大的剪切力,可把细胞击伤甚至击碎,影响细胞密度和细胞存活率,乃至过早地触发细胞凋亡,从而影响目的蛋白的表达^[1-2]。但是动物细胞的生长需要氧气等外源气体来维持,细胞培养过程中的通气是不可避免的,因此通气方式的选择就显得非常重要。

常见的通气方式分为两种:一种为无泡通气,另外一种为有泡通气,有泡通气又包括微泡和大泡通气。其中无泡通气方式最有利于动物细胞的培养,但是有三大弊端,一是传质效率低,二是 CO₂ 难以逸出,三是难以清洗验证。而采用微泡方式,虽然氧气传质效率会有所提高,但在规模化之后,微泡的弊端也逐渐显现。每次使用后,需要拆卸清洗,微孔通气装置为金属烧结,很难清洁,使用时间过长后,还会产生锈斑,对 GMP 检查也不利^[3-6]。若能寻找出一个折中的方案,既能对细胞伤害最小,又能保证使用效率,将有效地提高生产力和产品的安全性。大泡通气主要用于微生物发酵,鲜见于哺乳动物细胞培养,借鉴了微生物发酵经验,大胆尝试大泡通气方式,采用六叶平桨和 60°平桨组合。大泡通气具有以下优势:1. 大泡通气设计简单,混合传质效果较好,而且易于工艺放大;2. 大泡通气的采用,还可以取代底部 CIP 喷淋球,可保持罐体密闭的情况下,直接进行 CIP,杜绝更换空气分布器的操作,降低生物污染的机会。目前国际上很多大公司在罐体设计时,已经开始采用大泡通气方式,而在国内尚无发现采用大泡通气方式的文献报道。大泡通气作为 CHO 细胞培养通气方式的一种,具有良好的发展前景^[7-11]。

作者考察不同通气方式对 CHO 细胞生长、蛋白表达水平等的影响,通过试验考察新型通气方式和传统通气方式,即大泡通气相对无泡、微泡通气是否具有优势,具有实际应用的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

高表达单克隆抗体(西妥昔)的 CHO 细胞株:作者所在公司提供。培养基:抗体药物国家工程研

究中心提供。

1.2 细胞培养方法

将细胞以 1×10^6 cells/mL 的初始细胞密度接种于 5 L 生物反应器中,培养初始体积为 3 L, pH 控制为 6.95,温度为 37 °C,溶氧控制为 40% 的饱和空气,转速为 120 r/min。每天取样计数,并将培养液于 10 000 r/min 离心 5 min,保存上清于 -20 °C 冰箱,用于理化参数分析。

1.3 分析方法

1.3.1 细胞计数 每天取样利用台盼蓝拒染法染色,使用 Countstar 自动细胞计数仪读取活细胞密度和细胞活率,每样计数 3 次,取平均值。

1.3.2 蛋白表达量检测 HPLC 法,色谱柱采用 AB 公司 POROS® A20 Columns, 2.1 mm×30 mm, 系统采用 Agilent1260 HPLC。流动相 A(50 mmol/L PB, 0.1 mol/L NaCl), 流动相 B(体积分数 0.1% HCl, 0.1 mol/L NaCl); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 280 nm; 进样温度(5±3) °C; 柱温(25±5) °C; 进样量 100 μL。

1.3.3 氧传递系数(KLa)的测定方法 KLa 的测定采用动态法结合图解法求值。

1.3.4 葡萄糖-乳酸测定方法 采用全自动德国 Labo 公司 TRACE 葡萄糖-乳酸分析仪检测乳酸和葡萄糖浓度,每一样品重复检测一次,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 不同通气方式对细胞密度和细胞活率的影响

对于 CHO 细胞培养来说,由于动物细胞无细胞壁,耐剪切力较差,采用不同的通气方式和搅拌方式会对混合传质造成较大的影响。作者采用 4 种通气方式,第一种为无泡通气,双层两叶 60°平桨;第二种为微泡通气,双层两叶 60°平桨;第三种为大泡通气,双层两叶 60°平桨;第四种为大泡通气,上层为两叶 60°平桨,下层为六叶平桨。作者通过同批次的种子液接种,其他条件温度、DO、补料等条件均保持一致,采用 4 种不同的通气方式来培养 CHO 细胞,观察不同通气条件对细胞生长和蛋白表达量的影响。从图 1 可以看出,采用无泡通气时活细胞密度最高,大泡通气次之,而大泡通气方式中,大泡方案 2 的活细胞密度最高,达到 13.2×10^6 cells/mL,尤其是在对数生长期间细胞生长繁殖迅速,应该是由于大泡通气的气液混合传质较好,有利于 CHO

细胞的生长,同时由于剪切力相对较大,对 CHO 细胞具有一定的损伤,会影响活细胞密度和细胞存活率,因此活细胞密度会低于无泡通气。

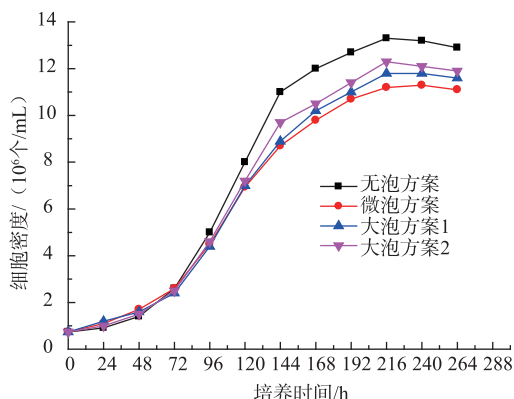


图 1 不同通气方式对活细胞密度的影响

Fig. 1 Effect of different ventilation conditions on the cell density of CHO

根据图 2 可以看出,无泡通气的细胞活率最高,大泡方案 2 的细胞活率次之,微泡通气时的细胞活率最低,但是并无较大差异。剪切力较大造造成细胞死亡、非致命的生理反应、抗体糖基化水平低等影响,大泡通气、微泡通气的细胞活率较低应该由于通气时的气泡破裂带来的剪切力对细胞造成了损伤。研究结果表明气液交界面气泡破裂是造成细胞损伤的剪切力的主要来源,而与大气泡相比,小气泡对细胞造成的损伤更大^[12],因此微泡通气的细胞活率最低,但整体看来 4 种通气方式的细胞活率并无较大的差异,都维持在 94% 以上。

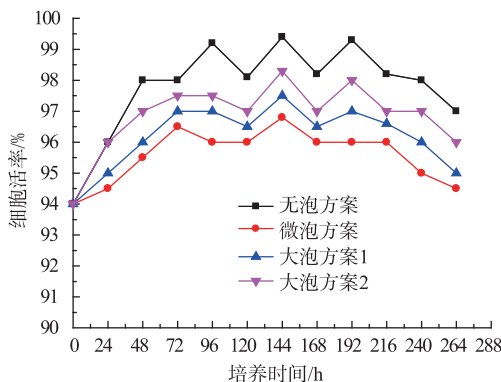


图 2 不同通气方式下细胞活率的曲线图

Fig. 2 Effect of different ventilation conditions on the cell viability of CHO

2.2 不同通气方式对 pH 的影响

根据图 3 可以看出,前期由于控制 pH, pH 基本都维持在 6.95, 中后期 pH 不断上升, 4 种通气方式

的最终 pH 相差并不大, 其中大泡方案 2 的 pH 最高, 无泡的 pH 最低, 大泡的 pH 相对较高的原因可能是采用大泡方案 2 通气方式时, 混合传质较好, 较多的通气量使溶解在培养液中的 CO₂ 随着气泡排出, 这对于 CHO 细胞的生长是有利的, 高浓度的 CO₂ 分压会影响 CHO 细胞的生长、代谢和产物的糖基化作用。无泡通气时的模式使溶解在培养液中的 CO₂ 不易排出, 这会降低培养液 pH, 另外乳酸浓度变化也会对 pH 造成不小的影响, 乳酸浓度偏高也会造成 pH 相对较低。

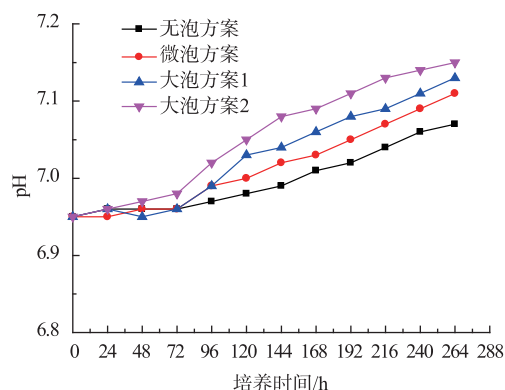


图 3 不同通气方式下对 pH 的影响

Fig. 3 Effect of different ventilation conditions on the pH

2.3 不同通气方式对乳酸的影响

根据图 4 可以看出,大泡通气时乳酸的浓度呈现先上升后降低的趋势,而采用无泡、微泡通气时,乳酸浓度呈现逐步上升的趋势。乳酸是细胞培养的主要副产物,乳酸主要是由于葡萄糖经糖酵解途径不完全氧化形成的,也可以由其他糖类及其谷氨酰胺产生。乳酸浓度较高时会降低培养液的 pH、增大渗透压,这会抑制细胞的生长,也不利于蛋白的表达。

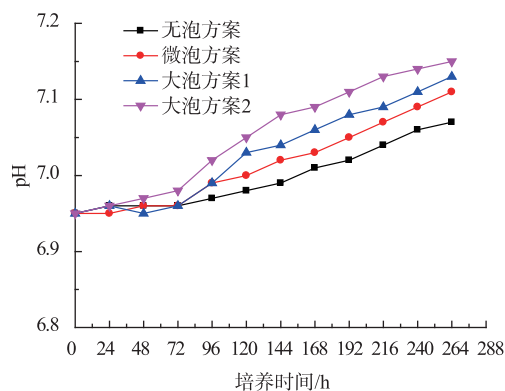


图 4 不同通气方式下乳酸 pH 值的曲线图

Fig. 4 Effect of different ventilation conditions on the lactate concentration

2.4 不同通气方式对 KLa 的影响

根据图 6 可以看出,不同通气方式下反应器的 KLa 各不相同,微泡的 KLa 是最高,大泡方案 2 的 KLa 次之,无泡通气的 KLa 最低。微泡通气效率高, KLa 高,但相对于大泡而言对细胞的损伤较大,因此细胞密度和细胞活率均略低于大泡通气。而大泡通气 2 的 KLa 仅低于微泡通气, 供氧能力也满足要求,通气量相对较多,混合传质较好,利于培养液气液相之间的气体交换,从而有利于培养液中 CO_2 的逸出^[13],对于 CHO 细胞的培养起到了促进作用,但由于气泡破裂对 CHO 细胞的损伤,也对细胞活率造成一定的影响。

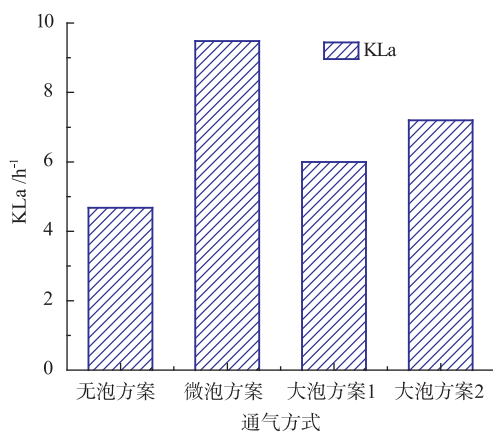


图 5 不同通气方式下的氧传递系数 KLa

Fig. 5 KLa of different ventilation conditions

2.5 不同通气方式对蛋白表达量的影响

根据图 6 可以看出,4 种通气方式中采用无泡通气时蛋白表达量是最高的,大泡方案 2 的蛋白表达量次之,但是大泡方案 2 的蛋白表达量与无泡通气的蛋白表达量相比并没有较明显的差异。120 h 期间无泡通气时的蛋白表达量明显高于其他通气方式,而后期无泡通气和 大泡方案 2 的蛋白表达量差异很小,这应该是由于前期细胞对 O_2 需求较小,大泡、微泡通气对细胞具有一定的损伤,无泡通气更具有优势,而中后期由于细胞对 O_2 需求较大,大

泡方案 2 能满足细胞对 O_2 的需求,而且混合传质较好,并改善了细胞培养的微环境,因此目的蛋白表达量得到了一定的提高。大泡方案 2 的活细胞密度较高,在生长期大幅度提高细胞密度和细胞活率,有利于后期目的蛋白的表达,提高目的蛋白的表达量^[14]。

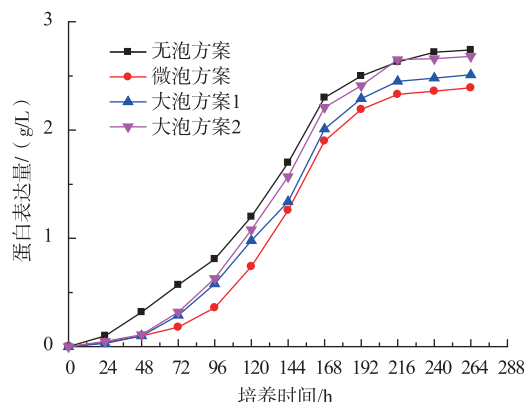


图 6 不同通气方式对蛋白表达量的影响

Fig. 6 Effect of different ventilation conditions on the protein concentration

3 结 语

在 5 L 反应器中,综合比较了不同通气方式对 CHO 细胞生长和蛋白表达水平的影响。结果发现,无泡通气系统各方面的条件最佳,大泡通气效果略次于无泡通气。通过使用 60°平桨和六叶平桨组合,可大幅度降低耗氧量,大幅度增加传质效率,消除大泡通气的最大瓶颈。另外,根据大泡通气的特点,罐的规模越大,搅拌转速越高,高径比越大,气体在液体中的滞留时间越长,越是能体现出大泡通气的优势。作者由于实验条件的限制,并未找到最优的桨叶,临时采用剪刀力相对较大的六叶平桨,因此转速设置较小,若能采用其他更好的桨型,并添加适当浓度的剪切保护剂降低剪切力对细胞的损伤,可进一步增大转速,进一步提高混合传质效率,更有利于大泡通气的实现。

参考文献:

- [1] 生中华. 生物反应器与相关生物工程探讨[J]. 黑龙江科技信息, 2013(12):12-12.
SHENG Zhonghua. Investigate of biotechnology and biological engineering related to biotechnology[J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2013(12):12-12. (in Chinese)
- [2] 魏明旺, 张淑香. 动物细胞大规模培养的主流技术[J]. 生物产业技术, 2009, 4(7):85-89.
WEI Mingwang, ZHANG Shuxiang. The mainstream technology of large-scale culture of animal cells, 2009, 4 (7):85-89. (in Chinese)

Chinese)

- [3] 刘伯宁. 治疗性单抗与抗体产业关键技术[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(5): 132-138.
LIU Boning. The latest development of large scale cell culture technology for commercial antibody manufacture [J]. **China Biotechnol**, 2013, 33(7): 103-111. (in Chinese)
- [4] Awasthi K K, Awasthi A, Kumar N, et al. Silver nanoparticle induced cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage in CHO cells[J]. **Journal of Nanoparticle Research**, 2013, 15(9): 1-12.
- [5] 许婧, 欧阳嘉, 何冰芳. 组成型纤维素酶高产菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4).
XU Jing, OUYANG Jia, HE Bingfang. Screening of an Efficient Constitutive Producing Strain and Fermentation Optimization for Cellulase Production[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(4). (in Chinese)
- [6] Senger R S, Karim M N. Effect of Shear Stress on Intrinsic CHO Culture State and Glycosylation of Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Protein[J]. **Biotechnology Progress**, 2003, 19(4): 1199-1209.
- [8] Nienow A W. Reactor engineering in large scale animal cell culture[J]. **Cytotechnology**, 2006, 50(1-3): 9-33.
- [9] Takuma S, Hirashima C, Piret J M. Dependence on glucose limitation of the pCO₂ influences on CHO cell growth, metabolism and IgG production[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2007, 97(6): 1479-1488.
- [10] Li F, Hashimura Y, Pendleton R, et al. A Systematic Approach for Scale-Down Model Development and Characterization of Commercial Cell Culture Processes[J]. **Biotechnology Progress**, 2006, 22(3): 696-703.
- [11] Huang Y M, Hu W W, Rustandi E, et al. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment[J]. **Biotechnology Progress**, 2010, 26(5): 1400-1410.
- [12] Nienow A W. Reactor engineering in large scale animal cell culture[J]. **Cytotechnology**, 2006, 50(1-3): 9-33.
- [13] Zhang X, Stettler M, De Sanctis D, et al. Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale[M]//Disposable bioreactors. Springer Berlin Heidelberg, 2010: 33-53.
- [14] Paul Smelko J, Rae Wiltberger K, Francis Hickman E, et al. Performance of high intensity fed-batch mammalian cell cultures in disposable bioreactor systems[J]. **Biotechnology Progress**, 2011, 27(5): 1358-1364.

科技信息

美国环境工作小组(EWG)公布 12 种“最脏”食品添加剂

据美国食品安全新闻网消息,美国环境工作小组(EWG)发布了食品添加剂“黑名单”列表,公布了 12 种食品“最脏”食品添加剂。

这 12 种脏食品添加剂包括:硝酸盐和亚硝酸盐、溴酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基苯(BHT)、没食子酸丙酯、可可碱、特殊香味物质、人工色素、双乙酰、磷酸盐、铝添加剂。

目前美国市面上有超过一万种食品添加剂,部分添加剂有致癌风险。美国环境工作小组建议民众尽量避免以上 12 种最脏添加剂。

[信息来源]食品伙伴网. 美国环境工作小组(EWG)公布 12 种“最脏”食品添加剂 [EB/OL]. (2014-11-14). <http://news.foodmate.net/2014/11/283674.html>.