

壳聚糖和 pH 对 CHO 细胞收获液澄清效率的影响

翁源灿, 杨彬*, 程习文, 鄢成伟, 孙文正

(广东东阳光药业有限公司, 广东 东莞 523867)

摘要: 作者研究了壳聚糖和 pH 对中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 培养液料液澄清过程的影响。初步探索了在 CHO 细胞收获液 (pH 7.0) 中添加 0~0.10 g/dL 壳聚糖对 0.22 μm 膜过滤通量的影响。结果显示, 添加 0.06 g/dL 壳聚糖时膜过滤通量最大, 达到 8 266.22 L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$)。探索了 pH 值 (5.0~7.0) 对收获液澄清效率的影响, 研究发现, 不添加壳聚糖的情况下降低培养液 pH 值对膜过滤通量没有十分显著的提高。为更多地去去除宿主细胞蛋白 (Host Cell Protein, HCP) 和残留 DNA, 作者研究了 pH 值与壳聚糖对膜过滤通量及残留杂质的交互影响。结果表明, pH 为 5.0 壳聚糖质量浓度为 0.06 g/dL 时滤出液中残留 DNA 几乎完全去除, HCP 含量降低 50% 以上, 而抗体的回收率不受影响。

关键词: 壳聚糖; pH; CHO; 絮凝; 料液澄清

中图分类号: TS 202.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)03-0322-05

Effect of Chitosan and pH on Clarification Process Efficiency of Harvested CHO Cell Culture Fluid

WENG Yuancan, YANG Bin*, CHENG Xiwen, YAN Chengwei, SUN Wenzheng

(Sunshine Lake Pharma Co., Ltd, guangdong dongguan 523867, China)

Abstract: Chitosan is a natural, non-toxic and biodegradable flocculant. This study focused on determining and optimizing the clarification process efficiency in the presence of various concentrations (0~0.10 g/dL) of chitosan at different pH 5.0~7.0 for the harvested Chinese hamster ovary (CHO) cell culture fluid (HCCF) (pH 7.0). Following HCCF was treated with 0.06 g/dL chitosan, the filtration flux was achieved up to 8 266.22 L/($\text{m}^2 \cdot \text{h}$) using 0.22 μm filter. In addition, the result showed that similar filtration flux for HCCF at different pH without chitosan addition whereas increasing filtration flux was achieved when HCCF pre-treated with chitosan at decreasing pH. To further improve this clarification process, the combined effect of various concentrations of chitosan at different pH on the filtration flux and the removal of process impurities including host cell proteins (HCP) and residual DNA in HCCF was evaluated. The result of a full factorial experiment including two factors and three levels (chitosan at 0.02, 0.04, 0.06% and pH at 5, 6, 7) showed that 90% antibody product yield with nearly complete removal of residual DNA and 50%

收稿日期: 2015-03-18

基金项目: 广东省引进创新科研团队计划项目 (201101Y0104990178)。

* 通信作者: 杨彬 (1981—), 男, 湖北鄂州人, 理学硕士, 主要从事生物制药方面的研究。E-mail: yangbin@hecpharm.com

引用本文: 翁源灿, 杨彬, 程习文, 等. 壳聚糖和 pH 对 CHO 细胞收获液澄清效率的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(03): 322-326.

more reduction of HCP were obtained when HCCF pre-treated with the optimal 0.06 g/dL chitosan at pH 5.0.

Keywords: chitosan, pH, CHO, flocculation, centrifugal filtration

中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是外源真核基因的最佳表达系统之一,也是生物制药中最常用的哺乳动物细胞^[1-3],外源蛋白质容易在 CHO 细胞中合成并分泌到培养基中^[4]。在发酵法生产中,发酵液中存在大量细胞、细胞代谢物、剩余培养基以及表达产物组分以外的其他复杂组分。所以在提取精制之前必须进行预处理和过滤以除去这些干扰物质^[5-6]。目前比较常用的预处理方法是离心过滤,然而发酵液中有大量的细胞碎片,HCP、DNA 密度与水相近,离心并不能去除,所以需要往发酵液中加入絮凝剂^[7],通过吸附架桥作用将小颗粒群或已经凝结的小絮团结合成大絮团,增加颗粒密实度,以利于离心去除,从而改善发酵液过滤性能^[8]。

壳聚糖作为一种天然的阳离子吸附剂,本身无毒、无味,不会造成二次污染,是絮凝和回收蛋白质的理想絮凝剂^[9]。脱乙酰基时间越长,壳聚糖脱乙酰度越高,相对分子质量越低。一般而言,壳聚糖相对分子质量越大,黏度也越大,絮凝效率也越高^[8]。目前关于哺乳动物细胞发酵液通过添加絮凝剂进行料液澄清的研究比较少,生产用途的更少^[10]。作者以壳聚糖为絮凝剂,调节发酵液 pH 值,研究其对絮凝发酵液的影响,寻找一种高效的料液澄清的方法来简化下游处理步骤,以提高效率,降低成本。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

表达单抗的 CHO 细胞培养收获液:活细胞密度 $1.90 \times 10^7/\text{mL}$,细胞活力 90%左右,作者所在实验室培养;脱乙酰度 ≥ 90.0 的壳聚糖溶液:浙江金壳药业;AR 级盐酸:成都科龙化工;WZT-2000 型光电浊度计:上海劲佳仪器;L720R-3 型高速冷冻离心机:湘离心机;0.22 μm 孔径针头滤器:Millipore;色谱柱:applied biosystems;CHO 细胞宿主蛋白抗原标准品、抗 CHO 细胞宿主蛋白一抗、山羊抗 CHO 宿主蛋白 HRP 酶标二抗:CYGNUS TECHNOLOGIES;微量核酸提取试剂盒:天根。

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖单因素试验 将细胞收获液分别添加不同质量浓度壳聚糖,控制相同 pH,130 r/min 搅拌 30 min,4 000 g 离心 20 min、0.22 μm 孔径膜过滤、Protein A 处理。

1.2.2 pH 值单因素试验 将细胞收获液调节不同 pH 值,130 r/min 搅拌 30 min,4 000 g 离心 20 min、0.22 μm 孔径膜过滤、Protein A 处理。

1.2.3 pH (5.0、6.0、7.0) 与壳聚糖质量浓度(0.02、0.04、0.06 g/dL) 两因素三水平全因子试验 130 r/min 搅拌 30 min,4 000 g 离心 20 min、0.22 μm 孔径膜过滤、Protein A 处理。

1.2.4 分析方法 发酵液浊度的测定:WZT-2000 型光电浊度计检测;抗体浓度的测定:HPLC 法检测;HCP 的测定:ELISA 法检测;残留 DNA 的测定:实时荧光定量 PCR 法检测。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖单因素实验结果

壳聚糖单因素实验结果见图 1。在收获液 pH 7.0,壳聚糖终质量浓度 0~0.1 g/dL 范围内,收获液经离心后的浊度与壳聚糖质量浓度明显呈反比,最高降低 60%。离心后的收获液用 0.22 μm 孔径滤器过滤,通量显著提高,质量浓度为 0.06 g/dL 时通量最高,达 $497.81 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$,说明壳聚糖添加量的提高可以使收获液中更多的微粒被聚集为大颗粒,离心效果更明显。而当质量浓度为 0.1 g/dL 时,收获液粘度增大,过滤通量反而下降,抗体回收率无明显影响,均在 90%左右。

2.2 pH 值单因素实验结果

pH 单因素实验结果见图 2。pH 值在 5.0~7.0 间变化,对离心后收获液浊度及过滤通量影响不明显,其中在 pH 5.0 的浊度稍微降低,过滤通量提高了,抗体回收率无明显差异,说明单纯的改变 pH 值对收获液的澄清效率并不起明显的作用。

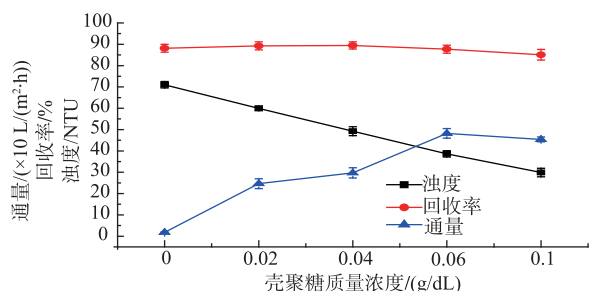


图 1 壳聚糖质量浓度影响效果实验

Fig. 1 Effect of chitosan concentration experiment

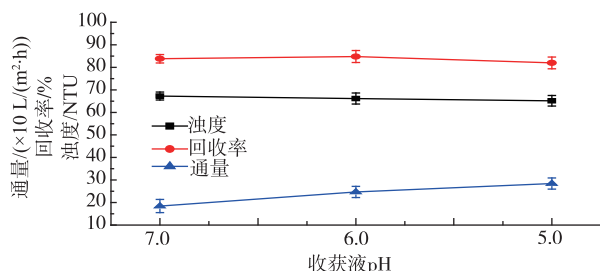
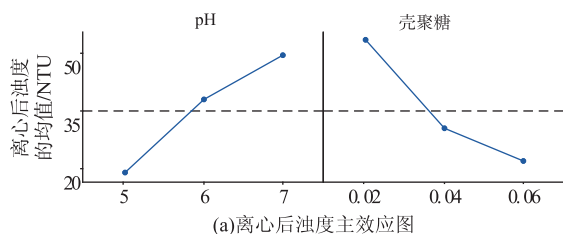


图 2 pH 值影响效果实验

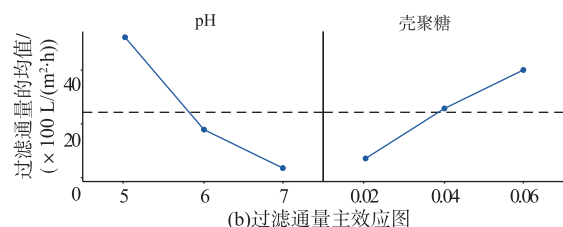
Fig. 2 Effect of pH experiment

2.3 pH 与壳聚糖全因子试验结果

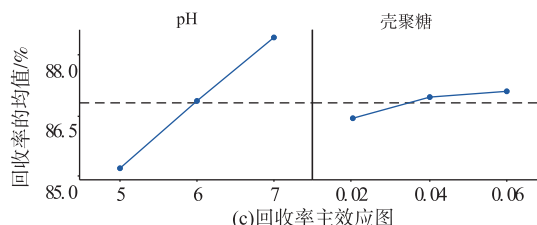
pH (5.0、6.0、7.0) 与壳聚糖质量浓度 (0.02、0.04、0.06 g/dL) 全因子试验结果用 Minitab 统计软件分析,结果见图 3。主效应图 3(a),收获液离心后浊度随着 pH 降低和壳聚糖质量浓度的增加均有降低的趋势,图 3(b)中 0.22 μ m 孔径膜过滤通量随着 pH 降低和壳聚糖质量浓度的增加亦有显著的提高,图 3(c)中显示 pH 的降低会降低膜过滤后产品收率,而不同壳聚糖质量浓度对抗体收率没有明显的影响,图 3(d)中 pH 的降低和壳聚糖质量浓度的增加明显降低收获液中 HCP 的质量浓度,图 3(e)中降低 pH 的收获液,其残留 DNA 质量浓度更高,而随着壳聚糖质量浓度的增加,DNA 质量浓度明显降低。



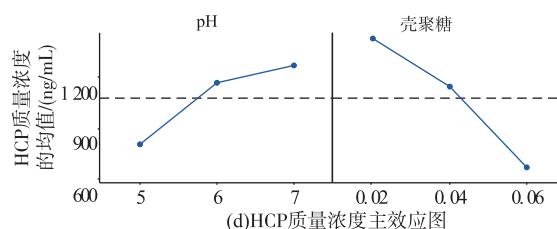
(a)离心后浊度主效应图



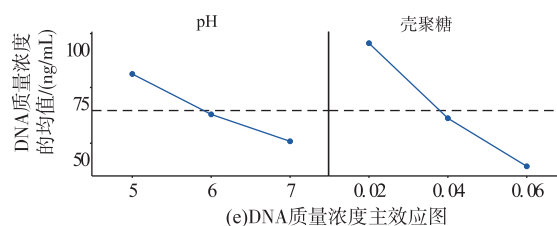
(b)过滤通量主效应图



(c)回收率主效应图



(d)HCP质量浓度主效应图

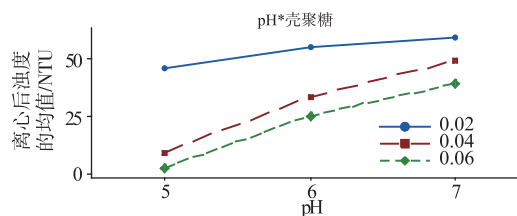


(e)DNA质量浓度主效应图

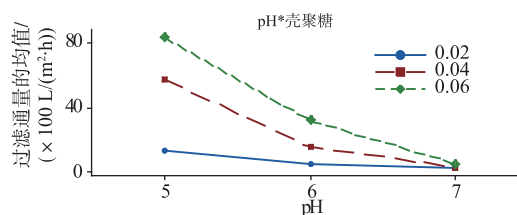
图 3 主效应图

Fig. 3 Main effect diagram

在交互作用图 4(a)中,当 pH 为 5.0、壳聚糖质量浓度为 0.06 g/dL 时,收获液离心后浊度最低;图 4(b)中,当 pH 为 5.0、壳聚糖质量浓度为 0.06 g/dL 时,0.22 μ m 孔径膜过滤通量最高;图 4(c)中可以看出,在壳聚糖质量浓度为 0.02 g/dL 和 0.04 g/dL 时,随着 pH 降低,产品回收率有下降的趋势;图 4(d)显示,壳聚糖质量浓度为 0.06 g/dL 时,收获液 HCP 质量浓度降低更明显,当 pH 降低到 5.0 时,HCP 质量浓度更低,在图 4(e)中,当 pH 降低时,收获液残留 DNA 质量浓度更高,而随着壳聚糖质量浓度的增加,DNA 质量浓度逐渐降低。



(a)离心后浊度交互作用图



(b)过滤通量交互作用图

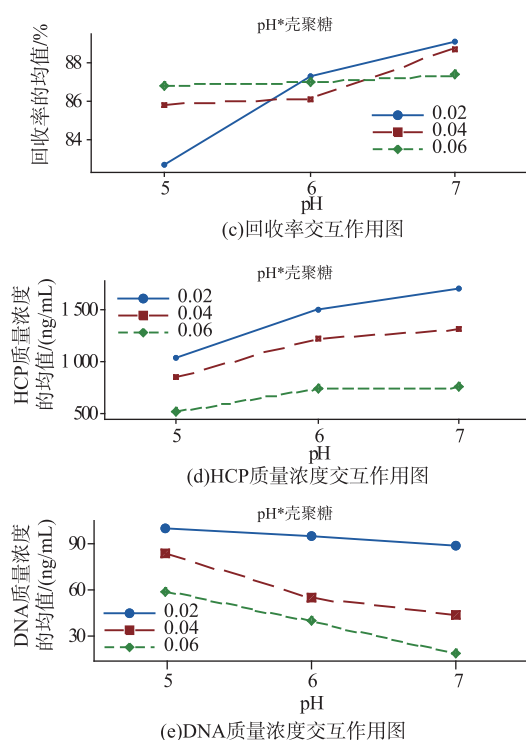


图 4 交互作用图

Fig. 4 Interaction diagram

试验结果表明,在不同的 pH 条件下,壳聚糖对收获液澄清效率有着相同的趋势;在不同壳聚糖质量浓度下,pH 对收获液澄清效率也有着相同的趋势。在交互作用图中可以看出,不同条件组合的产生影响的趋势明显不同,说明在收获液澄清方面,pH 与壳聚糖之间有互相促进作用。当 pH 降低时,壳聚糖被质子化,絮凝性能提高,更多的聚集了 HCP,但同时低 pH 条件下,细胞死亡率更高,释放出更多的 DNA,导致收获液中残留 DNA 质量浓度相对较高。

3 结语

壳聚糖具有良好的生物相容性和可降解性,其结构与细菌细胞壁上的肽聚糖类似,可被体内的溶菌酶及水解酶等降解成葡萄糖胺或壳寡糖^[12],对核酸、蛋白质等物质都有吸附能力,其带正电^[13],是一种很好的天然吸附剂。参照张明政^[12]研究的方法,模拟 CHO 收获液收获时的 pH 值,初步摸索壳聚糖质量浓度和 pH 值对收获液澄清效率的单一影响,发现单独改变壳聚糖质量浓度或 pH 值,其效果并非最优。组合后发现,不同组合之间效果差异明显,也优于单因素效果,综合分析后确定该细胞收获液的最佳絮凝条件:pH 5.0、壳聚糖质量浓度 0.06 g/dL。浊度可降低 70 NTU 以上,膜过滤通量显著提高,抗体回收率无明显影响,HCP 质量浓度降低一倍,DNA 几乎完全去除,结果趋势与文献提到的基本吻合。

通过壳聚糖对 CHO 细胞发酵液的絮凝处理,可以去除大量有色物质,添加壳聚糖后搅拌过程中,发酵液逐渐产生乳白色絮状物,离心后澄清液比对照颜色更浅,随着壳聚糖质量浓度的增加,颜色差异更明显。然而当壳聚糖质量浓度达到发酵液的 0.1 g/dL 时,其粘度增大,过滤性能并非最优。pH 较低时,收获液中 HCP 容易沉淀析出,易于分离。DNA 在正常 pH 条件下带较强的负电荷,实验结果表明,pH 与壳聚糖能对收获液澄清效率产生交互影响,在稀酸溶液中壳聚糖因质子化而带更多的正电荷,从而提高絮凝性能^[15],因此澄清效果更好。壳聚糖具有抗菌性能^[16]、生物粘附性^[17]等,其抗菌性可能对该发酵液防止微生物污染有一定的作用。生物粘附性可能会增加药物在体内的滞留时间,从而提高药物的利用效率^[14]。

参考文献:

- [1] HU Xianwen, CHEN Huipeng, ZHANG Shuyong. Overview of global biopharmaceutical industry[J]. **Chin Med Biotechnol**, April, 2009, 4(2): 85-89. (in Chinese)
- [2] LIM Y, WONG N S C, LEE Y Y, et al. Engineering mammalian cells in bioprocessing-current achievements and future perspectives[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2010, 55(4): 175-189.
- [3] CHU L, ROBINSON D K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture[J]. **Curr Opin Biotechnol**, 2001, 12: 180-187.
- [4] LI Shichong, HUANG Peitang, CHEN Zhaolie. New technique of expression in Chinese hamster ovary cells[J]. **Letters in Biotechnology**, 2009, 20(3): 422-425. (in Chinese)
- [5] BELFORT G, DAVIS R H, ZYDNEY A L. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow

- microfiltration[J]. **Journal of Membrane Science**, 1994, 96(1-2): 1-58.
- [6] NOBBLE R D, STERN S A. Membrane Separation Technology: Principles and Applications [M]. Amsterdam: Elsevier Science, 1995: 353-413.
- [7] JABER J, MOYA W, HAMZIK J, et al. Stimulusresponsive polymers for the purification of biomolecules[P]. US Patent: 2011/0313066 A1, 2011-12-22.
- [8] SHI Yajing, ZHAO Yongqiang, WANG Cong, et al. Research of flocculant and its application in pretreatment of pharmaceutical ferment liquid[J]. **Pharmaceutical Engineering Design**, 2009, 20(10): 1. (in Chinese)
- [9] LIU Bingtao, ZHANG Yan, WANG Hairong. On the flocculation and recovery of protein water with chitosan[J]. **Journal of North China Institute of Water Conservancy and Hydroelectric Power**, 2005, 26(4): 69-71. (in Chinese)
- [10] HUA Rongrong, ZHOU Gongming, CAO Dawei. Research advances in flocculation properties of Chitosan [J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2008, 27(3): 335-339. (in Chinese)
- [11] GOTTSCHALK U. Process Scale Purification of Antibodies[M]. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, 2009: 23.
- [12] 程沁园. 壳聚糖止血活性及其生物安全性评价研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [13] AKEPRATHUMCHAI S, HAN B, WICKRAMASINGHE S R, et al. Murine leukemia virus clearance by flocculation and microfiltration[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2004, 88(7): 880-889.
- [14] ZHANG Mingzheng, LIU Bo, LIN Naiquan, et al. Factors affecting flocculation of fermentation broth of *Bacillus thuringiensis* by chitosan[J]. **Chinese Journal of Biological Control**, 2009, 25(2): 133-137. (in Chinese)
- [15] DONG Rui, ZHOU Jian, DONG Maomao, et al. Research progress and prospect of chitosan flocculating microalgae[J]. **Environmental Science & Technology**, 2014(1): 88-93. (in Chinese)
- [16] ZHENG Lianying, ZHU Jiangfeng, SUN Kunshan. Antimicrobial activity of chitosan[J]. **Materials Science and Engineering**, 2000, 18(2): 22-24. (in Chinese)
- [17] JIN Meixia, HU Qiaohong. The properties of chitosan and its application in bioadhesive drug delivery system[J]. **Central South Pharmacy**, 2008, 6(3): 324-327. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称(中文): 中国化学会第四届卟啉与酞菁学术研讨会

所属学科: 无机化学, 有机化学, 分析化学, 病毒与免疫学

开始日期: 2017-07-06

结束日期: 2017-07-09

所在城市: 山东省 青岛市

具体地点: 青岛

主办单位: 中国化学会应用化学学科委员会, 国家自然科学基金委员会

协办单位: 北京科技大学/功能分子与晶态材料科学与应用北京市重点实验室

承办单位: 中国石油大学(华东), 中国化学会卟啉与酞菁专业委员会

议题: 卟啉、酞菁和相关的大环类分子材料的最新研究进展和新的动向

全文截稿日期: 2017-06-06

联系人: 陈艳丽

联系电话: 18561961603

传真: 0532-86981526

E-MAIL: ncpp4th@126.com

通讯地址: 山东省青岛市黄岛区长江西路 66 号

会议网站: <http://www.chemsoc.org.cn/news/?hid=1840>