

连续灌流培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体

米力 李玲 冯强 余晓玲 陈志南*

(第四军医大学 国家 863 西安 细胞工程基地 西安 710032)

关键词 灌流培养, 杂交瘤细胞, 单克隆抗体, 高密度

中图分类号 Q953 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0360-05

自 20 世纪 70 年代以来,工程抗体在基础医学研究、临床诊断和治疗,以及免疫预防等领域中的广泛应用,大大促进了其产业化的进程。目前工业化生产单克隆抗体的主要方法是通过发酵罐、中空纤维和固定床等生物反应器培养系统,以微载体、微包裹法在体外大规模高密度培养杂交瘤细胞,再通过相关的纯化手段浓缩纯化制备抗体^[1,2]。就操作方式而言,一般采用两个基本策略:①大容量高密度的悬浮培养,最多采用的是搅拌式气升式生物反应器,通过微载体依托细胞相对固定化,降低了搅拌培养时对细胞的剪切力,提高细胞的密度和稳定性及生产率。在 1986 年以前,采用此种方式培养的杂交瘤细胞就有 100 多种。但分批式培养多需要较大的工作体积如 100L、500L、1000L-10000L。②另一种策略是用相对小的容积、高密度细胞培养系统,如中空纤维、固定床和微囊培养等。这些系统的相似之处是细胞密度高,可达 $5 \times 10^7 \sim 10^8$ cells/mL,这意味着单位体积内杂交瘤细胞的培养浓度已接近于小鼠腹水的细胞浓度^[3]。采取连续灌流培养细胞可处在一个较稳定的良好环境中,新鲜培养液不断灌注,同时回收产物,有害代谢废物积累较低,通常可持续培养数月。本文用 5L 固定床生物反应器在聚酯片载体上连续灌流培养杂交瘤细胞,其细胞密度和抗体产量均已达到中试水平,为单克隆抗体产业化提供了初级放大模式。

1 材料与方法

1.1 杂交瘤细胞系与种子细胞的制备

HAB18 杂交瘤细胞是用新鲜肝癌手术标本的细胞悬液免疫 BABL/c 小鼠,取其脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞融合制备获得。1987 年 8 月建株,至今一直稳定分泌抗人肝细胞癌的抗体^[4]。培养扩增用 100mL 玻璃培养瓶置于 37℃ 的 CO₂ 培养箱内进行,然后转入 850mL 罗氏瓶中进一步扩增。

1.2 培养基及其添加成分

杂交瘤细胞无血清培养基 CCM1 购自美国 Hyclone 公

司,其中总蛋白含量 2.1mg/L,葡萄糖 3151mg/L,谷氨酰胺 365mg/L,异亮氨酸 54.47 mg/L;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,新生牛血清浙江杭州四季青公司;苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和色氨酸均为 Gibco 公司产品,18Ω 无菌无热源超纯水用美国 Millipore 超纯水机制备;其它试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.3 生物反应器

5L CelliGen Plus 生物反应器(美国 NBS 公司),工作容积 3.5L 罐体中间填装 200g 的聚酯片载体(美国 NBS 公司),聚酯片载体是由 50% 聚酯纤维和 50% 聚丙烯制备的直径为 6mm 的小圆盘,比表面积为 120cm²/cm³。搅拌与通气在固定床的上方,在搅拌中产生负压,迫使培养基不断流经中间聚酯片载体,有利于营养物质和气体的传递。生物反应器填充载体,注入 0.01mol/L pH7.2 PBS,120℃ 高压消毒 80min,接种细胞前需将反应器中的 PBS 放出并加入新鲜培养基。

1.4 连续灌流培养

待种子细胞扩增培养到一定密度时接种到 5L CelliGen Plus 生物反应器中,接种细胞密度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ /mL,严格无菌操作以防污染。细胞在载体上生长,其培养条件为温度 37℃,pH 7.2,搅拌速度 60~80 r/min,溶氧 40%~50%,四气混合系统供气(氧气、空气、二氧化碳、氮气),以上设定参数由生物反应器自动化控制。当 pH 值低于 7.1,葡萄糖消耗量 $\geq 30\%$,开始灌流新鲜培养基,设定灌流速度与回收速度相等。

1.5 检测方法

1.5.1 细胞耗氧速率(OUR)的测定:利用溶氧电极法进行测定,在停气后记录其溶氧(DO)的变化曲线,直接计算曲线的直线部分斜率 k ,其绝对值 $-k$ 即为耗氧速率(OUR)。

1.5.2 抗体检测方法:酶联免疫吸附试验 ELISA 夹心法,羊抗鼠 IgG 和酶标羊抗鼠 IgG 均购自 Sigma 公司。纯化单抗 IgG(HAB18 单抗)由本室自制,经中国生物制品检定所检定

其纯度大于 98%^[5]。每块板设严格的阴阳性对照,阳性对照用纯化小鼠 IgG_{HAB18} 单抗(做标准曲线,阴性对照为稀释样品用的稀释液,每个样品设 3 个复孔,待测孔 OD 值大于阴性对照孔两倍以上为阳性孔,根据同一条件下标准曲线的读数,计算待测培养上清中 HAB18 单抗的含量。

1.5.3 氨基酸分析检测方法:取原始培养液和不同时间点的杂交瘤细胞培养上清,在美国惠普 1100 高效液相色谱仪,用磷苯二甲酸(OPA)标前衍生生化外标定量测定法测定氨基酸含量。

1.5.4 葡萄糖检测方法:用葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定不同时间点的杂交瘤细胞培养上清中葡萄糖的含量。

1.5.5 细胞计数法:用台盼蓝染色法对杂交瘤细胞进行死活细胞计数。电镜观察细胞在巨载体上生长,按常规复染镜检。

2 结果

2.1 培养条件的选择

用方瓶培养杂交瘤细胞,在不同培养条件下测定细胞的生长速度与抗体分泌量。分别在含 5%、10%、15% 小牛血清的 1640 培养液和含 1% 小牛血清的无血清培养基 CCMI 及无血清培养基 CCMI 五种培养条件下培养,每天定时测细胞浓度和抗体分泌量。从图 1 可以看出在 5%、10%、15% 小牛血清的 1640 培养液中细胞生长速度快但死亡也快,含 1% 小牛血清的无血清培养基 CCMI 细胞生长速度较慢但存活时间较长,抗体分泌量也较高(图 2);无血清培养基 CCMI 细胞生长速度相比较慢,抗体分泌量较含 5%、10%、15% 血清 1640 培养条件下无明显减少(图 2)。

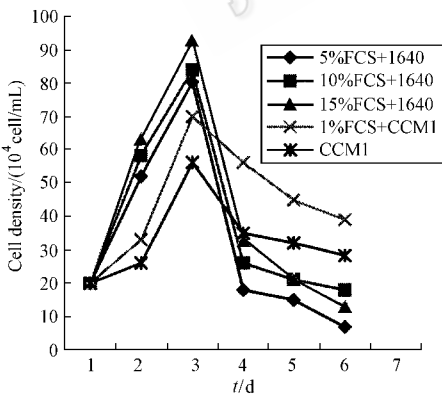


图 1 不同培养条件下细胞生长曲线

Fig.1 Cell growth curve in different culture media

2.2 连续灌流培养

2.2.1 细胞生长密度:我们选用含 1% 血清的无血清培养基 CCMI 作为基础培养液,收集的种子细胞接种到生物反应器,约 30min 后 90% 的细胞都进入固定床的载体中,在初始培养时要放慢搅拌速度 60r/min,控制温度、溶氧,使细胞适宜并贴附生长于载体中。从图 3 可以看出聚酯片载体提供细胞生长的足够的表面积和空间。扫描电镜观察细胞可在聚酯

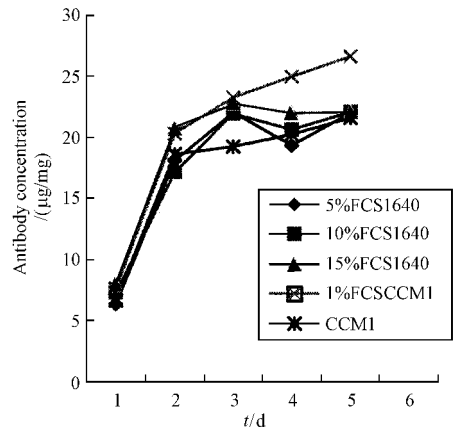


图 2 不同培养条件下抗体分泌量曲线

Fig.2 Antibody secret curve in different culture media

片载体内高密度生长(图 4)。经过 22d 的连续灌流培养,接种细胞密度为 2.5×10^5 cells/mL,最后总细胞密度为 8.79×10^8 cells/mL,其中 disk 中细胞总数为 2.6×10^{12} ,上清中游离的细胞总数为 4.77×10^{11} ,游离细胞的百分比为 15.5%。

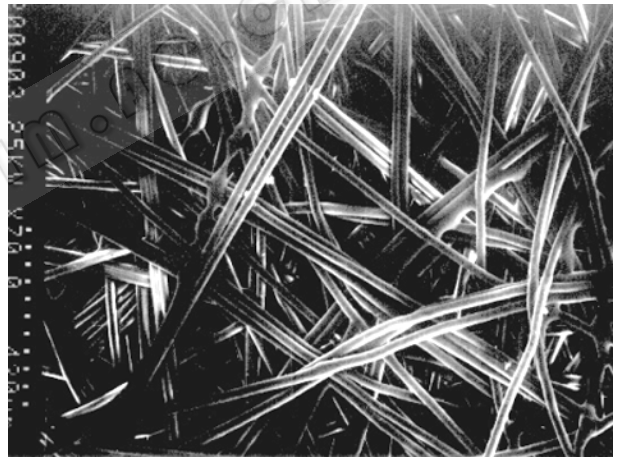


图 3 未生长细胞的聚酯片载体结构(×200)

Fig.3 Structure of Fibra-Cel carriers undetached cells(×200)

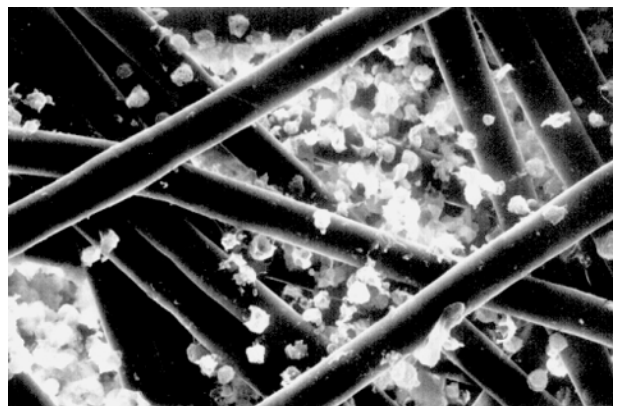


图 4 杂交瘤细胞贴附生长在聚酯片载体上(×300)

Fig.4 Hybridoma cells grow on the Fibra-Cel carriers(×300)

2.2.2 灌流速率:图 5 显示前三天上清中游离细胞的活性率为 100%,葡萄糖消耗量增加,第三天葡萄糖的消耗量已

大于 30% ,由于乳酸的积累 pH 开始下降 ,上清中游离细胞的活性下降 ,此时应考虑开始灌流。杂交瘤细胞需要最小培养密度 ,特别是在低血清或无血清培养条件下。种子细胞接种后需生长到一定的密度再开始灌流 ,初始灌流速度稀释率为每天 0.5 个灌体积 ,随着葡萄糖消耗量的增加灌流体积相应增加(0.5 ~ 2V/d) ,以满足细胞生长的需要 ,总灌流量 108L。但是 ,到培养后期单凭增加稀释率已不能改善长期培养中细胞的生长与活力 ,细胞活性下降 ,葡萄糖消耗量减少 (图 5)。

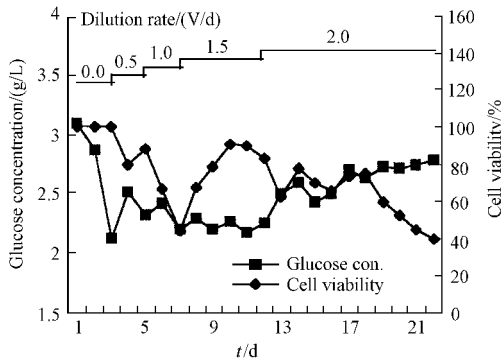


图 5 连续灌流培养中葡萄糖浓度与细胞活性
Fig.5 Glucose concentration and cell viability in continuous perfusion culture

2.2.3 氧气摄入率 空气是细胞赖以生存的必要条件之一 ,在短时期的缺氧环境中细胞可通过糖酵解途径继续生存 ,此时葡萄糖的消耗和乳酸量明显增加。从图6可以看出当溶

液中溶氧浓度一定时(40% ~ 50%) ,细胞的摄氧率(OUR)与细胞培养时间及产物形成有直接关系。

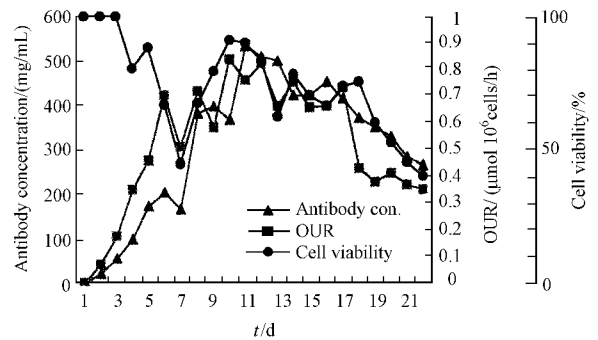


图 6 连续培训中氧气摄入率与细胞活性、抗体浓度的关系
Fig.6 Relationship between the oxygen uptake rate and cell viability , antibody concentration in continuous perfusion culture

2.2.4 抗体产量 在细胞培养中 ,我们用 HPLC 磷苯二甲醛外标定量测定法监测培养过程中氨基酸的变化 ,图 7 显示随着细胞培养时间的延长多数氨基酸被逐渐消耗 ,其中异亮氨酸(ILE)、亮氨酸(LEU)、苯丙氨酸(PHE)、半胱氨酸(CYS)消耗趋势较为显著 ,八种必需氨基酸苏氨酸(THR)、缬氨酸(VAL)、蛋氨酸(MET)、亮氨酸(LEU)、异亮氨酸(ILE)、苯丙氨酸(PHE)、赖氨酸(LYS)和色氨酸(TRY)都呈现明显的消耗趋势。但有些非必需氨基酸可由其它氨基酸分解代谢后合成 ,在培养过程中总量不但减少反而增加。如丙氨酸 ,谷氨酸经谷丙转氨酶的作用转换成丙氨酸 ,半胱氨酸经脱硫化氢酶的作用转换成丙氨酸。

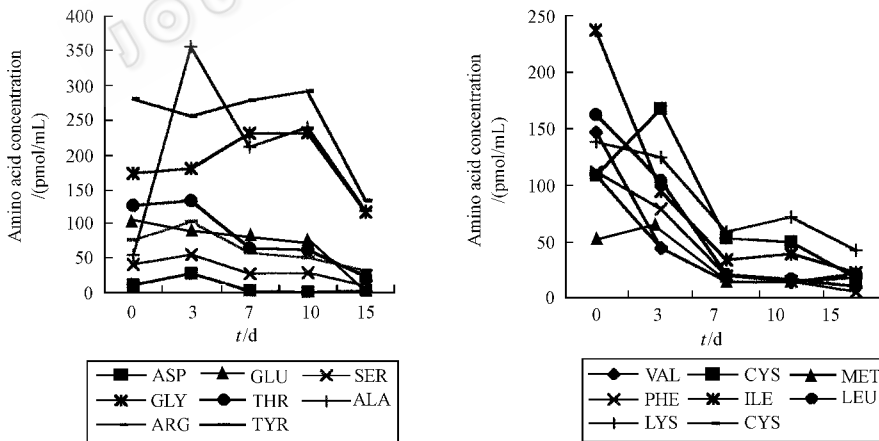


图 7 用磷苯二甲醛(OPA)标前衍生生化外标定量测定氨基酸含量
Fig.7 Determine amino acids concentration by OPA derivative

我们用酶联免疫吸附试验 ELISA 夹心法 ,经过严格的质量标准曲线 ,定量测定培养上清中的抗体含量。氨基酸分析结果显示(图 7)随着培养时间的延长某些氨基酸等营养物质的耗竭可能限制了细胞密度和产量的提高。图 8 可以看出在第 7 天开始添加相应的氨基酸 ,第 8 天细胞活性明显的改善 ,抗体产量从 165mg/L 增加至 379mg/L 提高了 2.3 倍 ,此时降低了血清浓度(0.5%) ,第 10 天抗体产量和细胞密度都

已达到较好的水平 ,又增加了相应氨基酸的浓度 ,使抗体产量又增加了 1.45 倍 ,抗体产量从 365mg/L 增加到 532mg/L ,第 11 天降低血清浓度抗体产量并未受到影响。

要实现动物细胞的高密度长期培养 ,首先要掌握细胞代谢规律、生长速率和产物合成的关系 ,在分泌型动物细胞的大规模培养中监测分泌产物提高产品产量是寻求最佳工艺的关键。通过氨基酸代谢的分析 ,在连续灌流培养过程中有

目的地添加相应氨基酸,并降低血清的浓度,使抗体产量和培养时间比较未添加之前都有了明显的提高(图9),优化了培养工艺。

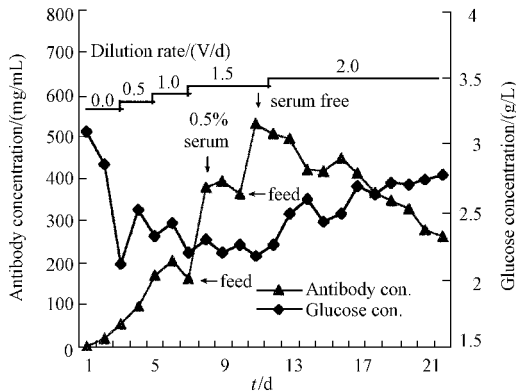


图8 连续灌流培养中抗体浓度与葡萄糖浓度

Fig.8 Antibody concentration and glucose concentration in continuous perfusion culture

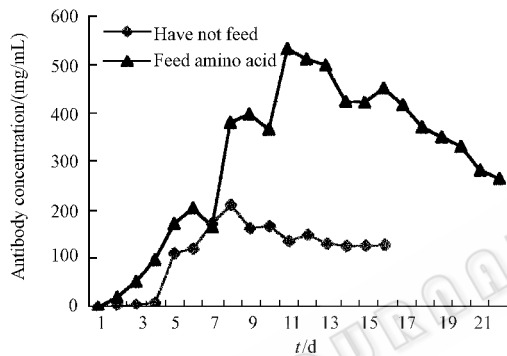


图9 在添加相应的氨基酸后抗体产量的比较

Fig.9 Comparison of antibody amount of production in fed amino acids

3 讨论

连续灌流培养法是近年来用于哺乳动物细胞培养生产分泌型重组治疗性药物如单克隆抗体、嵌合抗体以及人源化抗体等较为推崇的一种操作方式^[2,11]。它最大的优点是:①在细胞增长和产物形成的过程中,不断地将部分条件培养基取出,同时又连续不断地灌注新的培养基,因此细胞可处在营养的培养环境中,有害代谢废物浓度较低^[6];②细胞密度较高,一般可达 $10^7 \sim 10^8$ cells/mL,从而较大地提高了产品的产量^[7];③产品在罐内停留时间短,可及时回收到低温下保存,有利于保持产品的活性^[8]。但在实际操作中由于哺乳动物细胞体外培养的复杂性,常会出现细胞维持时间短、密度及抗体产率低等问题,限制了细胞产品产量、质量的提高和生产成本的降低。

目前世界众多的研究领域将研究热点集中于动物细胞代谢调控和控制策略上,以实现细胞培养时间延长、细胞密度提高和细胞比生产率的提高^[10,12]。在以往研究中采用提高营养物质浓度、优化培养基组成及进行灌流、补加培养等控制策略和培养模式,但高葡萄糖浓度常造成乳酸的快速积

累,增加谷氨酰胺浓度会增加其消耗速率,最终导致产生大量的氨和乳酸^[9]。我们在初次的培养过程中对回收培养液中的氨基酸进行分析,注重有目的地添加相应的氨基酸,并减少血清的浓度,使抗体产量有了明显的提高。但第十一天后抗体产量和细胞活性维持时间均短,可能是氨基酸浓度的增大导致产生大量的代谢产物,影响了细胞培养环境。我们的研究结果提示(1)在杂交瘤细胞大规模培养中,葡萄糖处于较低水平时,氨基酸成为限制细胞密度提高的重要因素,氨基酸等营养物质的耗竭亦是引起凋亡的主要原因。但不同的目标产品对培养条件的要求不尽相同,必须对其生长代谢规律进行分析,进行有目的地添加相应的氨基酸或有关营养物质,方能起到有效的作用。(2)在培养初期和对数生长期要注重培养条件对细胞的生长刺激作用,维持细胞高密度增长提高产率,进入一定的稳定期后要维持细胞生长及增加产物的合成,添加合适的氨基酸等营养物质,抑制细胞凋亡,延长培养时期,增加抗体的产率。(3)灌流式生物反应器的操纵策略上,大量补充新鲜培养基未必能刺激细胞增殖提高细胞的生产力。在细胞进入一定的稳态后,要逐渐降低血清、葡萄糖、谷氨酰胺的浓度,使细胞生长停滞或缓慢,大部分细胞由增殖转为生产蛋白,因而提高抗体产量。

因此动物细胞大规模培养工艺的研究,其根本在于优化细胞培养条件,尽可能地消除和减轻细胞环境压力对细胞的影响,提供适宜足够的营养保证,使细胞在维持活力与有效合成产物的状态中寻求平衡,力求达到多个稳态,实现高密度、高产量的长期培养。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kundu P K, Prasad N, Datta D. Monoclonal antibody: High density culture of hybridoma cell and downstream processing for IgG recovery. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1998, **36**(2): 125 ~ 135
- [2] Seifert D B, Phillips J A. The production of monoclonal antibody on growth-arrested hybridoma cultivated in suspension and immobilized modes. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(4): 655 ~ 666
- [3] Jackson L R, Trudel L J, Fox J G *et al.* Evaluation of hollow fiber bioreactors as an alternative to murine ascites production for small scale monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods*, 1996, **189**(2): 217 ~ 231
- [4] The Fourth Military Medical University(第四军医大学). Injection of Iodine¹³¹ Labeled Hepatoma Fragment Mab. (碘¹³¹I肝癌片段抗体注射液), Clinic trial No.98XL-57, 1999XL0140
- [5] The Fourth Military Medical University(第四军医大学). HAb18 monoclonal antibody IgG(单克隆抗体 IgG), National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, P. R. China. No. SJEX94371
- [6] Mercille S, Johnson M, Lanthier S *et al.* Understanding factors that limit the productivity of suspension-based perfusion cultures operated at high medium renewal rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, **67**(4): 435 ~ 449
- [7] Duk Jae Oh, Sang Kyo Choi, Ho Nam Chang. High-density continuous culture of hybridoma cells in a stirred-tank filter-perfusion system. *Biotechnol*

- nology and Bioengineering* ,1994 **44**(8) 895 ~ 901
- [8] Prior C P , Doyle K R , Duffy S A *et al.* The recovery of highly purified biopharmaceuticals from perfusion cell culture bioreactors. *J Parent Sci Tech* , 1989 **43** :15 ~ 23
- [9] Hiller G W , Asschlimann A D , Clark D S *et al.* A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. *Biotechnology and Bioengineering* , 1991 , **38** : 733 ~ 741
- [10] GAO H L (高红亮) , CONG W (丛威) , OUYANG F (欧阳藩) . Metabolic flux analysis of hybridoma cells. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2000 , **16** (6) :740 ~ 746
- [11] Chaubard J F , Asselot L , Benoist S *et al.* Vector production for human gene therapy. *Genetic Engineering News* , 2000 , **20**(18) : 48
- [12] Sharfstein S I , Tucker S N , Mancusn F *et al.* Quantitative *in vivo* nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* , 1994 **43**(6) :1059 ~ 1074

Continuous Perfusion Culture Hybridoma Cells for Production of Monoclonal Antibody

MI Li LI Ling FENG Qiang YU Xiao-Ling CHEN Zhi-Nan*

(*The Fourth Military Medical University , National Cell Engineering Reserch Center , Xi 'an 710032 , China*)

Abstract Hybridoma cells were cultured by continuous perfusion in Fibra-Cel of 5L packed-bed bioreactor for 22 days in low serum or serum-free media. The corresponded amino acids were fed and serum concentration was decreased by analyzing glucose concentration , oxygen uptake rate , secretary antibody amount and amino acids concentration in culture supernatant. Comparing with continuous perfusion culture that amino acids were not fed , antibody amunt of production was increased about 2 ~ 3 times . The inoculated cell density was 2.5×10^5 cells/mL , while the final cell density was 8.79×10^8 cells/mL. Antibody production was reached 295mg/L/d at average level , and the highest level was reached 532mg/L/d. These results provided a primary mode of en-large culture for monoclonal antibody industrilization.

Key words perfusion culture , hybridoma , monoclonal antibody , high density

Received : 10-17-2001

This work was supported by Grant from the Ninth Five-year National Science and Technology Keystone Program(No. 96-901-01-08).

* Corresponding author. Tel 86-29-3373667 ; Fax 86-29-3226349 ; E-mail : chcercl @ fmmu . edu . cn