

## 杂交瘤细胞培养的优化

张元兴<sup>1</sup> 方宏勋<sup>2</sup> 容秉培<sup>2</sup>

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)<sup>1</sup>

(香港城市大学生物及化学系 香港九龙)<sup>2</sup>

**摘要** 根据杂交瘤细胞培养中单克隆抗体生产的动力学原理,采用灌注培养方式、添加醋酸钾和丰富营养物质培养的途径,对反应器放大培养过程进行了优化。每天灌注 1/2 反应器工作体积,与分批培养相比,细胞密度由  $4.5 \times 10^5/\text{ml}$  提高到  $11 \times 10^5/\text{ml}$ ,单抗浓度由 19mg/L 提高到 28mg/L;添加 1g/L 醋酸钾,细胞密度基本保持不变,但单抗浓度增加到 38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;用丰富营养物质培养后,细胞密度和单抗浓度分别进一步提高到  $42 \times 10^5/\text{ml}$  和 94mg/L。抗 B 型红细胞单抗的血凝滴度,由分批培养的 1:32,最终提高到 1:256。

**关键词** 杂交瘤,细胞培养,醋酸钾,灌注培养,优化

学科分类号 Q95331

随着杂交瘤细胞株不断建立和所生产的单克隆抗体的日益广泛应用,杂交瘤细胞的放大培养得到前所未有的重视。目前,杂交瘤细胞放大培养研究集中于细胞的高密度培养、细胞合成单抗的比生产速率提高、细胞无血清无蛋白培养以生产体内治疗用单抗以及高性能培养装置和过程的开发。

在杂交瘤细胞培养中,单克隆抗体是由那些具有抗体蛋白合成能力的杂交瘤细胞合成并分泌出来的。因此,活细胞密度、抗体比生产速率和细胞培养维持时间便成为提高产量的三个要素。本文在对其动力学分析基础上,利用醋酸钾提高单抗比生产速率,利用反应器灌注培养方式和添加营养物质提高细胞密度和维持时间,从而实现对杂交瘤细胞的优化培养。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 细胞系

Cp9B 杂交瘤细胞株是由 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞和用人 B 型血细胞免疫 Balb/c 小鼠的脾细胞融合所得。它分泌单克隆抗体 IgG<sub>3</sub>, 抗人 B 型血细胞的表面抗原。

#### 1.2 培养基

1.2.1 基础培养基采用 RPMI 1640,添加 10% 小牛血清和适量的葡萄糖和谷氨酰胺。

1.2.2 营养丰富培养基:在 RPMI 1640 基础上再添加 4 倍氨基酸和维生素,但羟脯氨酸只添加 2 倍,同时添加 2g/L 葡萄糖、0.004g/L  $\beta$ -巯基乙醇和 0.003g/L 乙醇胺。在生物反应器培养中,还添加 1g/L Pluronic F68 作为细胞培养保护剂。基础培养基和血清购

自 GIBCO,其他添加物质购自 SIGMA。

### 1.3 细胞培养

**1.3.1 静止分批培养:** 细胞在实验条件的培养基传代 2 次后,接种到 24 孔细胞培养板中,每孔接种 2ml(细胞密度为  $0.25 \times 10^5/\text{ml}$ )。每天取样 4 孔,计数活细胞,取其平均值。

**1.3.2 反应器分批培养:** 采用一台 2.5L CelliGen 反应器(New Brunswick Scientific),工作体积 2L。接种细胞  $0.5 \times 10^5/\text{ml}$ 。操作条件为 pH7.0,溶解氧 30% 空气饱和度,搅拌转速 40r/min。

**1.3.3 反应器灌注培养:** 反应器及培养条件与分批培养相同。灌注速率 1L/d,即 1/2 工作体积。连接 1 根 3 通玻璃管,制成流动沉降装置,用于细胞截留<sup>[1]</sup>。在蠕动泵驱动下,循环速率是排出速率的 2 倍。

### 1.4 分析方法

**1.4.1 单抗滴度:** 用血凝法测定<sup>[1]</sup>。

**1.4.2 单抗浓度:** 样品稀释一定倍数后,用鼠 IgG ELISA 试剂盒(Boehringer Mannheim)测定。

**1.4.3 葡萄糖和乳酸测定:** 分别用对应的试剂盒(Boehringer Mannheim)和紫外分光光度法测定。氨用 Fawatt 和 Scott 法<sup>[2]</sup>测定。

**1.4.4 细胞密度测定:** 用血球计数板计数。

## 2 结 果

首先,在静止分批培养中研究了不同浓度的醋酸钾对 Cp9B 细胞生长和单抗生产的作用。丰富培养基中添加 2g/L 葡萄糖和 2mmol/L 谷氨酰胺。实验结果表明,醋酸钾对细胞生长有抑制作用,在高浓度(2g/L)下抑制作用明显(图 1)。单克隆抗体的生产在低

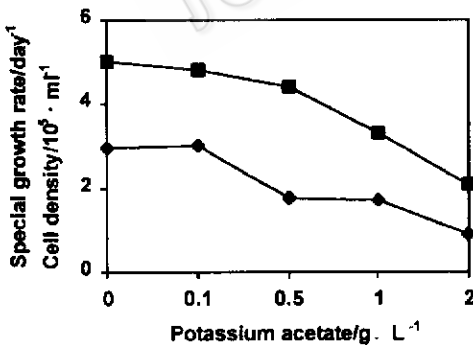


图 1 醋酸钾对分批培养 Cp9B 杂交瘤细胞最大比生长速率和细胞密度的影响

Fig. 1 Effects of potassium acetate on the maximal special growth rates (◆) and cell densities (■) in batch culture of Cp9B hybridoma cells

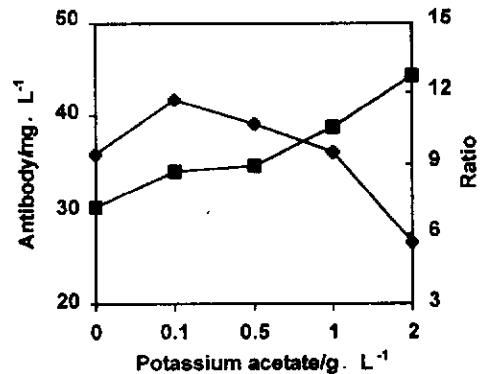


图 2 醋酸钾对单抗浓度和单抗浓度与细胞密度比的影响

Fig. 2 Effects of different potassium acetate concentrations on antibody concentration (◆) and the ratio of the antibody concentration to cell density (■) in batch culture of Cp9B hybridoma cells

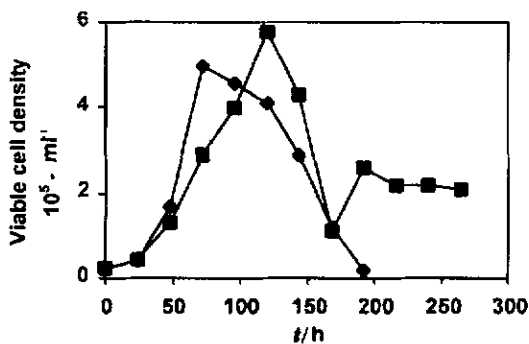


图3 不同培养基对杂交瘤细胞生长的影响

Fig.3 Hybridoma cell growth during static batch culture in RPMI 1640 (◆) and nutrient fortified (■) media

变化,而由于单抗比生产速率的提高,单抗浓度逐渐增加到平均 38mg/L。醋酸钾对葡萄糖消耗和乳酸、氨的生产的影响都比较小,葡萄糖的残余浓度平均增加 10%<sup>[1]</sup>。

在营养丰富的静止分批培养中,细胞密度并没有比在常规培养基中有大幅度提高,但培养周期却明显的延长(图3)。在生物反应器中,用同样培养基分批培养,细胞密度达到  $16 \times 10^5$ /ml,约为静止培养时的 3 倍,培养后期细胞活性有提高,单抗滴度由 1:64 提高到 1:128。

连续灌注培养中,醋酸钾浓度为 1g/L。先在通常的培养基(添加 2g/L 葡萄糖和 2mmol/L 谷氨酰胺)中灌注培养至稳定,再将灌注培养基切换为丰富培养基,培养至稳定状态。在两个不同培养条件的稳定态,细胞密度、单抗浓度、单抗滴度、残余葡萄糖浓度、生产的乳酸和氨浓度示于表 1。

表 1 比较添加 1g/L 醋酸钾的常用培养基和营养丰富培养基在反应器中灌注培养 Cp98 杂交瘤细胞的结果

Table 1 A comparison of culture results between with RPMI 1640 and nutrient fortified media during perfusion culture of Cp9B hybridoma cells in bioreactor. 1g/L potassium acetate was supplemented in both media

| Medium             | Viable cell density/<br>$10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ | Antibody<br>concentration/<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | Antibody<br>titer | Remainder<br>glucose concen-<br>tration/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | Lactate<br>accumu-<br>lation/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | Ammonia<br>accumu-<br>lation/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|--------------------|---|---|-------------------|---|--|---|
| RPMI 1640          | 11  | 38  | 1:64              | 1.8   | 1.4  | 1.9   |
| Nutrient fortified | 42  | 94  | 1:256             | 0.1   | 3.1  | 4.0   |

### 3 讨 论

杂交瘤细胞培养生产单抗的过程,不考虑单抗在培养过程中的变性和降解,可以建立

醋酸钾浓度下基本不受影响,在高醋酸钾浓度下抗体浓度下降。培养中最大单克隆抗体浓度与最大细胞密度比值却呈现随醋酸钾浓度增加而增加的趋势(图2)。培养结束时残余葡萄糖浓度都在 1g/L 以上,生成的乳酸约在 2g/L。但在高醋酸钾浓度下(2g/L),葡萄糖的消耗受到明显抑制,产生的乳酸量在 0.5-1g/L 间。

在连续灌注培养中,培养基添加 2g/L 葡萄糖和 2mmol/L 谷氨酰胺。实验结果表明,虽然细胞密度有一定的波动,但不添加醋酸钾,细胞密度平均为  $11 \times 10^5$ /ml,单抗浓度平均为 28mg/L。然后,添加醋酸钾至 1g/L,细胞密度没有发生显著变化,

如下数学模型:

$$\frac{dc}{dt} = \mu_p N_v$$

积分后,

$$\Delta c = \int_0^T \mu_p N_v dt$$

其中  $c$  为单抗浓度(mg/L),  $\mu_p$  为单抗比生产速率(mg/cell/h),  $N_v$  为活细胞密度(s/ml),  $T$  为培养时间(h)。

在确定的培养条件下,  $\mu_p$  随时间的变化较小, 为简化起见, 取其平均值  $\mu_{pm}$ , 故有:

$$\Delta c = \mu_{pm} \int_0^T N_v dt$$

其实,  $\int_0^T N_v dt$  就是细胞分批培养中活细胞密度曲线与时间坐标轴之间的面积。在决定单抗生成浓度的 3 个因素 ( $T, \mu_{pm}, N_v$ ) 中,  $T$  和  $N_v$  有着较大的联系。在分批培养中, 提高  $N_v$  的条件常也可增加  $T$ , 在连续培养中, 增加  $T$  意味着提高停留时间, 这将带来生产能力的减小, 更严重地则会引起细胞活性下降, 不利于生产过程。杂交瘤细胞的放大培养优化更多地着眼于  $N_v$  和  $\mu_{pm}$ 。

$\mu_{pm}$  是一个重要的动力学参数, 因细胞株而异, 受培养条件、细胞生理状态等多方面因素影响。根据它与细胞生长速率的关系, 将单抗生产分为生长耦联型<sup>[3]</sup>, 负生长耦联型<sup>[4,5]</sup>和非生长耦联型<sup>[6]</sup>, 其中尤以负生长耦联型的报道为多。所依据的理论基础为杂交瘤细胞在生长周期中, 在  $G_1$  期合成单抗最快, 这已被细胞同步化研究的结果所证实<sup>[7]</sup>。据此, 若使细胞生长变缓慢, 则处于  $G_1$  期的细胞的比例将增加, 从而可提高单抗合成速率。

为了降低细胞生长速率, 通常采用的方法包括提高培养基渗透压<sup>[8]</sup>, 添加 DNA 合成抑制剂<sup>[5]</sup>和添加非抗体蛋白合成抑制剂。醋酸钾通过抑制除抗体外其他蛋白的合成而阻碍了细胞的正常生长<sup>[9]</sup>。正如图 2 所示, 在 0.1g/L 醋酸钾以上, 随着醋酸钾浓度的提高, 尽管细胞生产的最大单抗浓度不断降低, 但单抗比生产速率即  $\mu_{pm}$  却得到了提高。由于对生长的抑制和对单抗合成的促进这两者的相互抵销作用, 使用醋酸钾的优点在分批培养中不能得到体现。在连续灌注培养中, 由于活细胞被截留在反应器中, 营养物又在不断补充, 较为缓慢的细胞生长速率已不是重要的因素, 因而在添加 1g/L 醋酸钾后, 细胞密度基本保持不变, 而单抗浓度却从 28mg/L 提高到 38mg/L, 由此所计算的  $\mu_{pm}$  则从  $5.3 \times 10^{-10}$  mg/cell·h 提高到  $7.2 \times 10^{-10}$  mg/cell·h。

提高活细胞密度  $N_v$ , 总是优化培养所追求的一个目标, 尽管单抗产量并不与细胞密度的提高成比例。但是, 细胞密度的提高常受到营养物缺乏和有害副产物的积累所限制。常常显示不足的营养物包括氧、葡萄糖、氨基酸和维生素。证明对细胞有毒害作用或不良影响的有乳酸、氨<sup>[10]</sup>和死亡及自溶的细胞等。满足氧的供应是生物反应器研究的一个重要任务, 这里不作讨论。连续灌注培养已被证明是一种有效措施<sup>[11]</sup>, 能够不断将死细胞和碎片排出, 而将活细胞保留在反应器内, 节省了增殖这部分细胞所需的营养。这种培养模式还可以降低反应器中营养物的存在浓度, 从而降低了有害副产物的形成, 使这些营养

物的利用效率得到了提高<sup>[12]</sup>。Cp9B 细胞在反应器分批培养中最大细胞密度达到  $4.5 \times 10^5/\text{ml}$ ，而在连续灌注培养中达到  $11 \times 10^5/\text{ml}$ ，乳酸和氨的浓度则从分批培养的  $2.0\text{g/L}$  和  $2.2\text{mmol/L}$  降低到  $1.5\text{g/L}$  和  $1.9\text{mmol/L}$ 。提高细胞密度的另一有效措施是使用营养丰富的培养基，包括非化学限定营养物<sup>[13]</sup>和化学限定营养物<sup>[14~17]</sup>的添加。尽管这会显著地提高乳酸和氨的生成，但 Jo 等人<sup>[15]</sup>认为营养物对细胞生长的促进是起决定作用的。本研究中提出的新配方，就是选择性地提高了 RPMI 1640 培养基中的氨基酸和维生素浓度，从而大幅度地提高了细胞密度、单抗浓度和滴度。在其他相同的培养条件下，采用添加营养物的措施，细胞密度提高到 3.8 倍，单抗浓度提高到 2.4 倍，单抗滴度提高了 2 个稀释度。对培养上清的分析发现，尽管乳酸、氨和丙氨酸都达到了相当高的积累浓度，但都未抵销营养物对细胞生长的刺激作用，而谷氨酰胺、天门冬酰胺、葡萄糖等的大量消耗甚至接近耗尽的程度倒是可能造成限制细胞密度进一步提高的因素。

## 4 结 论

杂交瘤细胞 Cp9B 在生物反应器中培养，采用灌注培养方式、添加醋酸钾和进行营养富集培养，都是提高培养上清中单克隆抗体浓度的有效措施。采用灌注培养将活细胞截留在反应器内而培养基进行连续更换，有利于反应器中活细胞密度的提高。由于反应器中维持较低的营养物存在浓度，使有害副产物的积累有所降低。添加  $1\text{g/L}$  醋酸钾，虽然会对细胞生长有所抑制，但提高了细胞的单抗比生产速率。在灌注培养中添加醋酸钾可以保持细胞密度不变，提高上清中单抗浓度。氨基酸等营养物质的缺乏是限制细胞密度进一步提高的重要因素。采用添加营养物的培养基，细胞密度和单抗浓度都得到显著提高。这些优化放大的结果汇总于图 4。

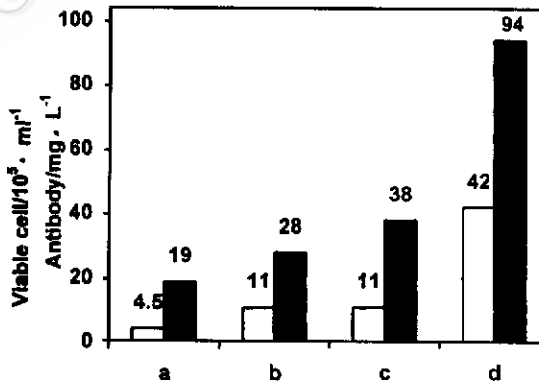


图 4 杂交瘤细胞在反应器中优化放大培养的结果

Fig. 4 The optimization result of cell densities (□) and antibody concentrations (■) in the hybridoma cells culture in bioreactor

a. Batch culture, b. Perfusion culture, c. Perfusion culture supplemented with  $1\text{g/L}$  potassium acetate, d. Perfusion culture supplemented with  $1\text{g/L}$  potassium acetate and fortified nutrients

## 参 考 文 献

- 1 Fong W, Zhang Y, Yung P. *Cytotechnology*, 1997, **24**:47~54
- 2 Fawcett J, Scott J. *J Clin Path*, 1960, **13**:156~159
- 3 Gaertner J G, Dhurjati P. *Biotechnol Prog*, 1993, **9**:298~308
- 4 Miller W M, Blanch H W, Wilke C R. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **32**:947~965
- 5 Suzuki E, Ollis D F. *Biotechnol Prog*, 1990, **6**:231~236
- 6 Glacken M W, Adema E, Sinskey A J. *Biotechnol Bioeng*, 1988, **32**:491~506
- 7 Al-Rubeai M, Emery A N. *J Biotechnol*, 1990, **16**:67~86
- 8 Ozturk S S, Palsson B O. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37**:989~993
- 9 Somenshein G E, Brawerman G. *Biochemistry*, 1976, **15**:5501~5506
- 10 Ozturk S S, Palsson B O. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**:418~431
- 11 Al-Rubeai M, Emery A N, Chalder S *et al.* *Cytotechnology*, 1992, **9**:85~97
- 12 Kurokawa H, Park Y S, Iijima S *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**:95~103
- 13 Zhang Y, Zhou Y, Yu J. *Cytotechnology*, 1994, **16**:147~150
- 14 Duval D, Demangel C, Munier-Jolain K *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1991, **38**:561~570
- 15 Jo E C, Park H J, Park J M *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1990, **36**:717~722
- 16 Bibila T A, Ranucci C S, Glazomitsky K *et al.* *Biotechnol Prog*, 1994, **10**:87~96
- 17 Xie L, Wang D I C. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**:175~1189

## Optimization in Hybridoma Cell Culture

Zhang Yuanxing<sup>1</sup> Fang Hongxun<sup>2</sup> Rong Binpei<sup>2</sup>

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,  
East China University of Science and Biotechnology, Shanghai 200237)<sup>1</sup>

(Department of Biology and Chemistry,  
City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong)<sup>2</sup>

**Abstract** Based on the formation kinetics of monoclonal antibody, the hybridoma cell culture in bioreactor was optimized by the application of perfusion culture mode, the supplementation of potassium acetate, and the fortification of nutrients. When the bioreactor was operated with the daily perfusion of medium of 1/2 work volume, viable cell density in bioreactor was , in comparison with batch culture, increased from  $4.5 \times 10^5$  cells/ml to  $11 \times 10^5$  cells/ml and antibody concentration in supernatant from 19mg/L to 28mg/L. After supplemented with 1g/L potassium acetate, the cell density kept constant and antibody production was improved to 38mg/L. The fortification of nutrients such as amino acids and vitamins raised the cell density to  $42 \times 10^5$  cells/ml and , responsively, antibody concentration to 94mg/L.

**Key words** Cell culture, hybridoma, perfusion culture, potassium acetate, optimization