

制备可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白的两种细胞培养工艺比较

黄世高, 尹玉婷, 熊春晖, 王彩虹, 吕建新, 高基民

温州医学院 浙江省模式生物技术与应用重点实验室, 浙江 温州 325035

黄世高, 尹玉婷, 熊春晖, 等. 制备可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白的两种细胞培养工艺比较. 生物工程学报, 2013, 29(1): 115-118.

Huang SG, Yin YT, Xiong CH, et al. Comparison of two types of cell cultures for preparation of sTNFR_{II}-gAD fusion protein. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 115-118.

摘 要: 利用 7.5 L 生物反应器篮式贴壁培养和全悬浮批次培养 CHO 工程细胞株表达可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部 (sTNFR_{II}-gAD) 融合蛋白, 比较这两种培养方法的产率, 以便优化高效表达 sTNFR_{II}-gAD 融合蛋白的制备工艺。篮式贴壁培养首先小规模培养 CHO 工程细胞株, 待细胞增殖到一定密度后以 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL 密度接种生物反应器贴壁培养 3 d, 调换成不含血清的 LK021 培养基继续培养 4 d。而全悬浮无血清批次培养则以 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL 密度的 CHO 工程细胞株接种于生物反应器, 连续培养 7 d。培养过程实时监测培养条件, 维持 pH 和 DO 的稳定。分别收集细胞上清, 离心去细胞后用 Pellicon 切相流超滤系统对蛋白进行浓缩, 并通过 DEAE 离子交换柱进行纯化。结果显示, 篮式贴壁培养和全悬浮批次培养均成功表达了 sTNFR_{II}-gAD 融合蛋白, 产量分别为 8.0 mg/L 和 7.5 mg/L、纯度分别为 95% 和 98%, 从而为 sTNFR_{II}-gAD 融合蛋白的中试工艺研究提供了一定的基础。

关键词: 可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白, 生物反应器, CHO 细胞, 真核表达

Comparison of two types of cell cultures for preparation of sTNFR_{II}-gAD fusion protein

Shigao Huang, Yuting Yin, Chunhui Xiong, Caihong Wang, Jianxin Lü, and Jimin Gao

Zhejiang Provincial Key Laboratory for Technology & Application of Model Organisms, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Abstract: In this study we used two types of cell cultures, i.e., anchorage-dependent basket and full suspension batch cultures of sTNFR_{II}-gAD-expressing CHO cells in the CelliGen 310 bioreactor (7.5 L) to compare their yields in order to optimize the culturing conditions for efficient expression of sTNFR_{II}-gAD fusion protein consisting of soluble tumor necrosis factor receptor II and globular domain of adiponectin. The anchorage-dependent basket culture was performed in

Received: October 25, 2012; **Accepted:** December 20, 2012

Supported by: National Major Specific Project for Innovation of New Pharmaceuticals (No. 2009ZX09103-649), Zhejiang Provincial Major Research Program (Nos. 2008C14082, 2010C13007), Research & Development Foundation of Ministry of Health (No. 201231029), Research & Development Foundation of Zhejiang Provincial Department of Education (No. Y201016518), Zhejiang Provincial Program for the Cultivation of High-level Innovative Health Talents, Zhejiang Province Postgraduate Innovative Scientific Research Project.

Corresponding author: Jianxin Lü. Tel: +86-577-86689805; E-mail: jxlu313@163.com

Jimin Gao. Tel: +86-577-86689746; Fax: +86-577-86689977; E-mail: jimingao@yahoo.com

国家新药创新重大专项 (No. 2009ZX09103-649), 浙江省重大科技专项 (Nos. 2008C14082, 2010C13007), 卫生部科研基金 (No. 201231029), 浙江省教育厅科学基金 (No. Y201016528), 浙江省卫生高层次创新人才培养工程, 浙江省研究生创新科研项目资助。

4 L 10% serum-containing medium with the final inoculating concentration of 3×10^5 to 4×10^5 cells/mL of sTNFRII-gAD-expressing CHO cells for 3 days, and then switched to 4 L serum-free LK021 medium to continue the culture for 4 days. The full suspension batch culture was carried out in the 4 L serum-free LK021 medium with the final inoculating concentration of 3×10^5 to 4×10^5 cells/mL of sTNFRII-gAD-expressing CHO cells for 7 days. The culturing conditions were monitored in real-time to maintain pH and dissolved oxygen stability through the whole process. The supernatants were collected by centrifuge, and the protein was concentrated through Pellicon flow ultrafiltration system and then purified by DEAE anion exchange. The results showed that the yields of sTNFRII-gAD fusion protein were 8.0 mg/L with 95% purity and 7.5 mg/L with 98% purity in the anchorage-dependent basket and the full suspension batch cultures, respectively. The study provided the framework for the pilot production of sTNFRII-gAD fusion protein.

Keywords: sTNFRII-gAD fusion protein, bioreactor, CHO cells, eukaryotic expression

生物反应器已广泛应用于表达大量重组蛋白,用于生产重组蛋白药物的表达系统通常选用哺乳动物中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞^[1-3]。但目前利用动物细胞表达系统获得蛋白比较困难,一方面动物细胞表达蛋白量比较低,另一方面国内大规模培养动物细胞技术及仪器设备尚未十分成熟。类风湿性关节炎已成为危害人类健康最常见、最难治的疾病之一^[4-5], sTNFRII 单体是 TNF α 的天然拮抗剂^[6], sTNFRII-Fc 融合蛋白拮抗 TNF α 的能力是相应 sTNFRII 单体的 50~1 000 倍^[7-8], sTNFRII-gAD 是借助脂联素^[9-11] 球部 (Globular domain of adiponectin, gAD) 可形成同源三聚体的特性^[12], 构建的一种可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部的融合蛋白,用于治疗与肿瘤坏死因子有关的类风湿性关节炎等多种疾病。

本研究主要利用已稳定转染质粒 pAAV2-opti-sTNFRII-gAD 并筛选出高表达量的 CHO/dhfr⁻ 细胞^[13], 在生物反应器中经过篮式贴壁培养和全悬浮培养表达融合蛋白, 并比较了两种工艺途径生产蛋白的产率, 探索细胞在生物反应器中生长的最佳培养方式, 进而优化一套高密度、高表达、高效率的融合蛋白中试工艺路径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、试剂及材料

表达重组人 sTNFRII-gAD 蛋白的 CHO 工程细胞株 D579-dhfr⁻ 由本实验室构建。DMEM 培养基, 胎牛血清购自 GIBCO 公司; 化学成分限定培养基 LK021 由北京五加和分子医学研究所提供; hTNFR-Fc 阳性对照品由复旦张江生物医药公司提

供; 100 kDa 超滤离心管购自 Sartorius 公司; 鼠抗人 TNFRII 单抗购自 Abcam 公司; 马抗小鼠 IgG/磷酸酶标记抗体购自中杉金桥公司; BCIP/NBT 购 Calbiochem 公司; 葡萄糖监测试剂盒购自南京建成生物研究所; 搅拌培养瓶购自 CHEMICAL GLASS 公司。

1.1.2 主要仪器

7.5 L Celligen310 生物反应器购自美国 NBS (New Brunswick Scientific) 公司; AKTA 纯化仪购自 GE 公司; Pellicon 切相流超滤系统 (包括夹具和膜包) 购自 Millipore 公司; 平板滤器 (直径 90 mm) 购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

采用 10 个 T75 培养瓶同时培养 CHO 细胞, 待细胞长满时消化细胞, 以细胞密度为 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL 接种于搅拌培养瓶, 搅拌转速设定为 80 r/min, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱搅拌培养。

1.2.2 生物反应器篮式贴壁培养细胞

将细胞密度为 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL 的活种子细胞接种到 7.5 L 生物反应器, 生物反应器圆盘填充床里填充 250 g Fibracel 载体, 用含 10% 血清培养基培养 3 d 后去除培养基, 改加不含血清的 LK021 培养基培养 4 d 后收获上清, 反应器操作条件: 篮式培养 pH (7.08 \pm 0.1), DO 为 60% 空气饱和度, 温度为 37 °C, 搅拌转速开始为 50 r/min, 培养到第 2 天就换为 70 r/min, 培养过程中每隔 12 h 取样, 测定葡萄糖和乳酸盐浓度。共收获 4 L 细胞培养上清, 用于蛋白的浓缩纯化。

1.2.3 生物反应器全悬浮批式培养细胞

取细胞密度为 $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ cells/mL 的活种子

细胞接种到 7.5 L 生物反应器进行全悬浮培养, 培养体积为 4.0 L。反应器操作条件: pH (7.08±0.1), DO 为 60% 空气饱和度, 温度为 37 °C。培养过程中每隔约 24 h 取样, 测定葡萄糖和乳酸盐浓度。连续培养 7 d, 期间以 RPC 软件进行数据采集, 实现计算机在线控制, 维持细胞培养条件的稳定。

1.2.4 sTNFRII-gAD 蛋白的点杂交检测

取全悬浮批式培养的细胞上清, 12 000 r/min 离心 5 min, 点杂交检测上清中目的蛋白的浓度。

1.2.5 培养上清的浓缩及纯化

收集细胞培养上清, 离心取上清, 再经过 0.22 μm 滤膜过滤, 完成样品的初步纯化。纯化后的样品再经过 Pellicon 切向流超滤系统浓缩。两种工艺浓缩后的蛋白经阴离子交换柱纯化, 比较产率。

2 结果

2.1 点杂交检测生物反应器中 sTNFRII-gAD 融合蛋白的持续表达

从第 2 天到结束前 1 天, 每天取 5 μL 细胞上清做点杂交, 标准品用 100 μg/mL TNFR-Fc 作对照。结果发现颜色逐天加深, 表明 CHO 细胞在反应器内持续表达 (图 1)。

2.2 制备融合蛋白 sTNFRII-gAD-工艺流程

工艺流程见图 2。

2.3 两种工艺流程生产蛋白情况比较

篮式贴壁培养用 4 L 的 LK021 培养基生产蛋白 32 mg, 纯度为 95%, 而全悬浮批式培养则用同样培养基生产蛋白 30 mg, 纯度为 98%, 悬浮批式培

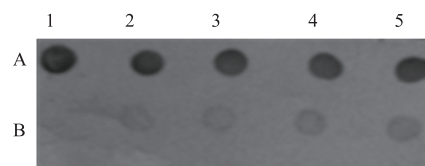


图 1 蛋白点杂交分析验证融合蛋白的持续表达

Fig. 1 Continuous expression of sTNFRII-gAD fusion protein analyzed by protein dot blotting with monoclonal antibody against TNFRII. (A) Lanes 1 to 5: positive controls at 5 μL of 100 mg/L TNFR-Fc. (B) Lanes 1 to 5: detection of sTNFRII-gAD fusion protein in the supernatants of CHO cells after the culture of 24 h, 48 h, 96 h, 144 h and 192 h.

养获得的 sTNFRII-gAD 蛋白产量和篮式培养相差不多, 但蛋白纯度是篮式培养的 1.03 倍 (表 1)。

3 讨论

动物细胞培养开始于 20 世纪初。1962 年, 其规模开始扩大, 利用动物细胞培养生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单抗等, 已成为医药生物高技术产业的重要部分^[14]。

目前利用生物反应器进行大规模细胞培养并表达目的蛋白具有许多优点: 无菌操作, 维持温度和 pH、DO 值稳定, 监测控制自动化, 因此非常适合基因工程细胞的高密度、高表达培养。但不同细胞的培养方式和表达条件不完全相同, 需要注意摸索最佳培养条件^[15]。我们构建的 sTNFR-gAD 融合蛋白表达于上清中, 因此需要从上清中提取和纯化目的蛋白。为了提高蛋白产量并利于下游纯化的方便, 在生物反应器培养条件下比较了两种细胞培养方式生产的蛋白产率 (表 1)。悬浮培养工艺由于培养过

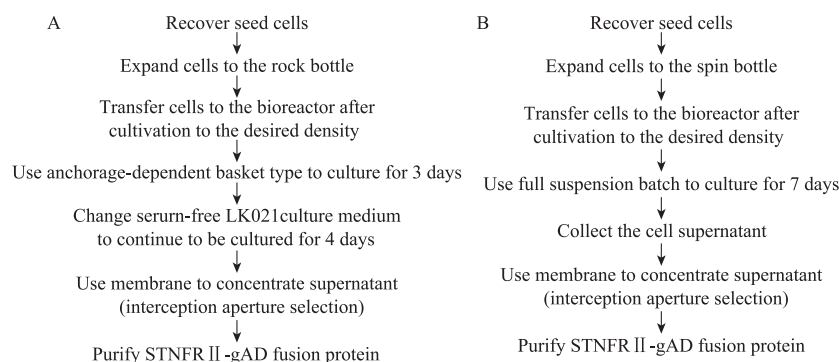


图 2 制备融合蛋白 sTNFRII-gAD-工艺流程图

Fig. 2 Schematic diagrams of anchorage-dependent basket (A) and full suspension batch (B) cultures for preparation of sTNFRII-gAD fusion protein.

表 1 篮式贴壁培养与全悬浮批式培养的比较

Table 1 Comparison between anchorage-dependent basket and full suspension batch cultures for preparation of sTNFRII-gAD fusion protein

	Anchorage-dependent basket type	Full suspension batch
Culture time (d)	7.0	7.0
Collecting the supernatant (L)	4.0	4.0
Protein concentration (mg/L)	8.0	7.5
Final yield (mg)	32.0	30.0
Protein purity (%)	95.0	98.0

程中不用含血清的培养基过渡, 所以收集上清中血清含量少, 纯化时较易纯化, 得到的蛋白纯度较高。而且培养过程中不用更换培养基, 经济方便。

本研究利用生物反应器培养含 sTNFRII-gAD 的 CHO 工程细胞株表达目的蛋白的工艺在国内外未见报道。其原因是因为转染质粒 pAAV2-opti-sTNFRII-gAD 的 CHO/dhfr⁻工程细胞株是本实验室保存, 并已申请专利^[16], 该专利是利用了脂联素球部自动形成三聚体的特性与 sTNFRII 融合基因的策略来获得 sTNFRII-gAD 重组蛋白, 此双功能蛋白拮抗 TNF α 的活性比二聚体化 sTNFRII-Fc 更高, 但尚未进入市场。所以此工艺还处于初步探索设计阶段。篮式贴壁培养工艺, 开始因接种细胞数量较少, 以 30 r/min 的低速搅拌有利于细胞均匀分布在罐体内并有效地吸附在填充床的 Fibracel 载体上, 4~6 h 后细胞完全贴壁, 此时提高搅拌速度为 70 r/min, 细胞密度增多后换 LK021 培养基继续培养 3 d。全悬浮批式培养则采用逐渐提高搅拌速度, 这样循序渐进, 可以使细胞周围微环境中代谢物和营养物质在短时间内达到平衡。两种培养工艺下该工程细胞株较理想的培养条件为恒定温度 37 °C、pH 7.08, pH 值在线控制靠 CO₂ 和碳酸氢钠的浓度比来维持稳定。

任何动物细胞表达的生物制品, 都要经历从获得生产用的工程细胞株系到建立和完善生产工艺的过程。本实验的有些部分如细胞在生物反应器中的扩大培养, 细胞培养操作模式, 如何加强蛋白三聚体的稳定性等, 还需要更加细致深入的研究, 总之建立一套成熟的 sTNFRII-gAD 融合蛋白制备工

艺流程尤为重要。

REFERENCES

- [1] Butler M. Animal Cell Cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(3): 283–291.
- [2] Rosser MP, Xia W, Hartsell S, et al. Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Prot Expr Purif*, 2005, 40(2): 237–243.
- [3] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Revs Genet*, 2003, 4(5): 346–358.
- [4] Landry Y, Gies JP. Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008, 22(1): 1–18.
- [5] Toussiot E, Wendling D. The use of TNF- α blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert Opin Pharmacother*, 2007, 8(13): 2089–2107.
- [6] Fernandez-Botran R. Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9(3): 497–514.
- [7] Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*, 1993, 151: 1548–1561.
- [8] Edwards CK 3rd, Martin SW, Seely J, et al. Design of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEG sTNF-RI) for chronic inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(10): 1315–1336.
- [9] Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A, Widomska S. Adiponectin and its role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2008, 8(1): 7–46.
- [10] Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord*, 2008, 6(2): 87–102.
- [11] Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*, 2004, 10: 524–529.
- [12] Shapiro L, Scherer PE. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*, 1998, 8(6): 335–338.
- [13] Lu Y, Liu D, Zhang XR, et al. Rapid expression and preparation of the recombinant fusion protein sTNFRII-gAD by adenovirus vector system. *Chin J Biotech*, 2011, 27(8): 1239–1246 (in Chinese).
陆月, 刘丹, 张孝任, 等. 腺病毒载体介导的重组蛋白 sTNFRII-gAD 快速表达和制备. *生物工程学报*, 2011, 27(8): 1239–1246.
- [14] Lin FY, Chen ZL, Liu H, et al. Problems and solutions of large-scale mammalian cell culture. *Biotechnol Inform*, 1999, 1: 32–35 (in Chinese).
林福玉, 陈昭烈, 刘红, 等. 大规模动物细胞培养的问题及对策. *生物技术通报*, 1999, 1: 32–35.
- [15] Fan L, Zhao L, Sun YT, et al. Development of a fed-batch process for TNFR-Fc producing GS-CHO cells. *Chin J Biotech*, 2010, 26(2): 216–222 (in Chinese).
范里, 赵亮, 孙亚婷, 等. 表达 TNFR-Fc 融合蛋白的 GS-CHO 细胞动态流加培养过程的设计. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 216–222.
- [16] Gao JM. sTNFRII-gAD fusion protein: China patent, ZL200510100468.9. 2007-04-11.
高基民. 可溶性肿瘤坏死因子受体 II-“脂联素”球部融合蛋白: 中国专利, ZL200510100468.9. 2007-04-11.

(本文责编 郝丽芳)