

王 杰,肖 政,范 里,等. 培养基组分及操作参数对抗体多聚体形成的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):29-32.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.009

培养基组分及操作参数对抗体多聚体形成的影响

王 杰¹,肖 政¹,范 里¹,邓献存²,刘旭平¹,谭文松¹

(1. 华东理工大学生物反应器国家重点实验室,上海 200237; 2. 浙江海正药业股份有限公司,浙江台州 318000)

摘要:近年来,国家食品药品监督管理局基于药物安全性的考虑对于治疗性蛋白的质量提出了更高的要求,而蛋白多聚体能引起人体免疫反应,被认为是关键质量属性(critical quality attributes,CQA)。采用培养基组分添加试验和操作参数控制试验的方法,系统研究了培养基中氧化还原物质和培养过程参数(温度和 pH 值)对抗体多聚体形成的影响。结果表明,半胱氨酸的添加能显著抑制多聚体的形成,培养基中半胱氨酸添加浓度增至 30 mmol/L,多聚体含量下降 40%。而铜离子的添加浓度从 500 $\mu\text{mol/L}$ 降至 0 $\mu\text{mol/L}$,多聚体含量则降低了 43%。培养温度从 35 $^{\circ}\text{C}$ 降低至 32 $^{\circ}\text{C}$,重链结合蛋白(BiP)和蛋白二硫键异构酶(PDI)的表达水平平均提高了 89%,细胞翻译后修饰能力显著加强,分泌至上清液中的抗体多聚体含量相应下降了 38%。研究结果明确了生产工艺和产品关键属性之间的关系,为后续设计优化以质量为先导的培养过程,生产质量可控、安全、有效抗体药物奠定了基础。

关键词:单克隆抗体;多聚体;氧化还原;操作参数;培养基组分

中图分类号:Q943.1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2015)02-0029-04

21 世纪以来,食品药品监督管理局对治疗性蛋白药物安全性和功效性要求不断提高,质量监测和控制成为动物细胞大规模培养过程中的研究热点,美国药物与食品监管局和欧洲药物局于 2004 年提出了在所有的药物开发生产中补充质量设计(quality by design,QbD)理念^[1]。

多聚体含量是蛋白药物关键质量属性(CQA)之一,越来越受到人们的关注。生产过程中形成的蛋白多聚体会影响最终产品安全性和功效性。Rosenberg 指出蛋白多聚体是免疫反应的强力诱导者,仅 10% 的多聚体含量就会引发人的免疫反应,甚至导致人的死亡,因此要严格控制生产过程中多聚体的形成^[2]。

蛋白多聚体是通过共价键(例如二硫键),或者非共价键(静电作用和疏水作用)的连接形成的^[3]。抗体二硫键连接

发生在内质网中,内质网的氧化还原电势将直接影响到抗体二硫键的连接。培养过程中的控制参数(pH 值和温度)已被广泛证明会影响细胞生理状态,影响抗体表达,折叠和翻译后修饰,Yoon 等报道,降低培养温度至 33.5 $^{\circ}\text{C}$,使 EPO 的比生成速率提高了 4 倍,使 EPO 的产量提高了 2.4 倍^[4]。Muthing 等报道 pH 值影响了杂交瘤细胞表达的单克隆抗体的半乳糖和唾液酸的含量^[5]。抗体分泌到胞外后已正确连接的二硫键又会被氧化还原物质还原和重构,形成蛋白多聚体^[6]。而为防止因活性氧(reactive oxygen species,ROS)引起的细胞凋亡,培养基中一般均会添加谷胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸等还原物质,这可能会加速蛋白多聚体的形成。基于 QbD 理念基础,亟须研究培养过程参数及培养基组成对蛋白多聚体形成的影响,深入理解多聚体和生产工艺之间的联系,建立多聚体与过程参数的关系,从而减少最终产品多聚体含量,保证实现质量设计。

我们采用培养基组分添加试验和操作参数控制试验的方法,系统研究了培养基中氧化还原物质和培养过程参数(温度和 pH 值)对抗体多聚体形成的影响。研究结果为后续在质量设计(QbD)指导下进行工艺开发提供了数据支持,为建立质量可控的培养工艺奠定了基础。

收稿日期:2014-11-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:21106045)。

作者简介:王 杰(1987—),女,河北保定人,硕士研究生,研究方向为动物细胞与组织工程。E-mail:ecust12wj@126.com。

通信作者:谭文松,教授,研究方向为动物细胞与组织工程。E-mail:wstan@ecust.edu.cn。

28(1/2):187-194.

[28] Meng X, Cai S. Association between glutenin alleles and Lanzhou alkaline stretched noodle quality of northwest China spring wheats. II. Relationship with the variations at the Glu-1 loci [J]. Cereal Research Communications, 2008, 36 (1): 107-115.

[29] 马冬云,朱云集,郭天财,等. 河南省 21 个小麦品种(系)高分子量麦谷蛋白亚基的电泳分析[J]. 华北农学报,2002,17(3): 29-32.

[30] 郑 威. 长江流域小麦地方品种农艺品质性状的遗传多样性 [D]. 武汉:华中农业大学,2013.

[31] 李学军,王 辉,于新智,等. 陕西关中不同时期小麦品种高分

子量麦谷蛋白亚基变异分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(4):41-44.

[32] 李 博,张荣琦,王亚娟,等. 黄淮麦区部分小麦地方品种高分子量麦谷蛋白亚基组成分析[J]. 麦类作物学报,2007,27(3): 483-487.

[33] 刘香利,郭蔼光,赵惠贤. 陕西省部分小麦栽培品种高分子量麦谷蛋白亚基组成及其与品质关系[J]. 分子植物育种,2007,5(6):827-832.

[34] Dong Z, Yang Y, Li Y, et al. Haplotype variation of Glu-D1 locus and the origin of Glu-D1d allele conferring superior end-use qualities in common wheat[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74859.

1 材料与方法

1.1 细胞株与培养基

试验所用细胞株为表达单克隆抗体 - A (Mab - A) 的 CHO 细胞。

基础培养基和流加培养基均由华东理工大学生物反应器国家重点实验室自主研发,其中流加培养基由多种氨基酸、维生素以及葡萄糖组成。

1.2 培养基组分添加试验

培养基组分添加试验分为 2 组:还原组分添加试验和氧化组分添加试验。还原组分添加试验中,选取了 5 个常用还原剂谷胱甘肽 (GSH)、二巯基苏糖醇 (DDT)、β - 巯基乙醇 (β - mercaptoethanol)、维生素 C 以及半胱氨酸 (cysteine),具体添加浓度见表 1,其中试验组 6 为未添加上述还原剂的阴性对照。试验组 1 ~ 5 设定的添加浓度均为基础培养基添加浓度的 3 ~ 10 倍。氧化组分添加试验选取了 CuSO₄ 和胱氨酸这 2 种氧化剂 (表 1)。添加 Cu²⁺ 试验中添加了不同浓度的铜离子,未添加铜离子作为阴性对照组。添加胱氨酸试验中的对照未添加胱氨酸。

表 1 还原组分和氧化组分的添加浓度

编号	还原组分	浓度	编号	氧化组分	浓度
1	谷胱甘肽	150 μmol/L	1	硫酸铜	0 μmol/L
		300 μmol/L			25 μmol/L
2	β - 巯基乙醇	4 mg/L			50 μmol/L
		12 mg/L			100 μmol/L
3	二巯基苏糖醇	500 μmol/L			500 μmol/L
		1 mmol/L	2	胱氨酸	27 mmol/L
4	维生素 C	0.1 mmol/L	3	对照	
		0.4 mmol/L			
5	半胱氨酸	30 mmol/L			
6	对照				

培养基组分添加试验采用流加培养方式考察上述培养基添加组分对最终产品多聚体含量的影响。流加培养的具体操作方式如下:将细胞以 1 × 10⁶ 个/mL 的密度接种于 500 mL (Corning, USA) 摇瓶内,工作体积为 150 mL,置于偏转半径为 20 mm 的摇床上培养,转速设置为 110 r/min,培养箱条件设置为 7% 的 CO₂ 浓度和 37 °C 的温度。每天脉冲 2% (体积分数) 的流加培养基以补充因细胞生长及产物合成所损耗的营养物。

1.3 操作参数控制试验

操作参数控制试验主要考察培养温度和 pH 值对最终产品多聚体含量的影响,分为温度控制试验和 pH 值控制试验 2 部分内容。温度控制试验选取 32.0、33.5、35 °C 3 个水平,每个水平做 4 个平行,33.5 °C 为对照组;pH 值控制试验选取 6.8、7.0、7.2 等 3 个水平,每个水平做 3 个平行,pH 值 7.0 为对照组。操作参数控制试验均在 2 L 生物反应器上进行,采用的培养模式为流加培养,具体操作如下:接种细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL,工作体积为 2 L,搅拌转速设置为 80 r/min,溶氧为 40%,pH 值采用补加 CO₂ 或 NaOH 控制,温度和 pH 值参数设置如上所述。

1.4 分析方法

1.4.1 多聚体含量检测 凝胶排阻色谱 (SEC) 是检测单克隆抗体中多聚体含量的通用方法,本方法使用的高效液相系统为 Waters 2487 HPLC System (1525 Binary HPLC Pump;717 plus Autosampler;2487 UV Detector, Waters),采用的色谱柱是孔径为 4 μm 的 TSK - Gel G3000 SWXL (4.6 mm × 30 cm, Tosoh Bioscience, Montgomery, PA) 色谱柱。流动相为 20 mmol/L 磷酸二氢钠、0.2 mol/L 氯化钠缓冲溶液。进样量为 20 μl,检测波长为 280 nm,以 0.5 mL/min 的流速等度洗脱 30 min。

1.4.2 BiP mRNA 和 PDI mRNA 相对含量检测 BiP 和蛋白二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 是抗体蛋白翻译后修饰过程中 2 个重要的分子伴侣蛋白,直接参与蛋白二硫键的形成。BiP mRNA 和 PDI mRNA 含量能间接反映内质网中二硫键加工能力。BiP mRNA 和 PDI mRNA 含量通过荧光定量 PCR 测定,以 β - actin 为内参基因,BiP mRNA 和 PDI mRNA 的相对含量由公式 (1) 计算得到:

$$X = X_i / X_{std} \times 100\% . \tag{1}$$

式中: X 为 BiP mRNA 或 PDI mRNA 相对含量, X_i 为 BiP mRNA 或 PDI mRNA 的含量, X_{std} 为 β - actin mRNA 的含量。

2 结果与分析

2.1 培养基组分对多聚体形成的影响

2.1.1 还原组分对多聚体形成的影响 还原组分添加试验的检测结果见表 2。半胱氨酸是对多聚体形成影响极显著 (P < 0.000 1)。培养基中添加了 30 mmol/L 的半胱氨酸后,抗体多聚体相对百分含量下降至 62%,比对照组下降了近 40%。半胱氨酸是氨基酸中唯一一个带有游离巯基的氨基酸,该游离巯基被认为可以参与蛋白中二硫键的交换和还原。Banks 等用半胱氨酸对半胱氨酸化水平有差异的抗体进行孵育,发现半胱氨酸不仅能够去除抗体的半胱氨酸化,而且能够减少抗体中多聚体含量,提高抗体稳定性^[7]。抗体分子处于铰链区二硫键溶剂暴露性最差,一方面易相互交换形成多聚体,另一方面也容易受游离巯基的攻击而发生解离。因此,半胱氨酸的加入可能攻击了抗体铰链区的二硫键的连接,加速了这部分二硫键的还原,促使多聚体转变为单体,从而显著减少了多聚体含量。谷胱甘肽、二巯基苏糖醇、β - 巯基乙醇、维生素 C 在试验组考察的范围内对多聚体的形成与对照差异不显著。

2.1.2 氧化组分对多聚体形成的影响 铜离子不仅是具有强氧化性的化学物,而且会影响线粒体、内质网等重要细胞器的生理功能。铜离子添加浓度对多聚体含量的影响见图 1。铜离子添加浓度与多聚体含量呈正相关。对照组多聚体的含量为 9%,添加 25 μmol/L 铜离子后,多聚体含量达到 10.8%,比对照增加了 20%,添加 500 μmol/L 铜离子后,多聚体含量最高,达 15.8%,比对照增加了 76%。Chaderjian 等发现培养基中加入 Cu²⁺ 离子后,CHO 细胞表达的 IgG1 的 Fab 片段上的自由巯基含量显著减少,说明铜离子在胞内介导了内质网内蛋白质的合成过程^[8]。Cromwell 等认为金属离子会造成蛋白表面局部变性,改变蛋白表面物化特性,增加蛋白聚合的概率^[9]。我们推测铜离子一方面影响了内质网内的氧化还原电势,另一方面引起了培养上清中抗体表面的变性,使某

表 2 还原组分添加试验

编号	添加组分	浓度	多聚体相对百分含量 (%)
1	谷胱甘肽	150 μmol/L	105 ± 3.43
		300 μmol/L	106 ± 1.89
2	β-巯基乙醇	4 mg/L	97 ± 2.32
		12 mg/L	98 ± 1.65
3	二巯基异糖醇	500 μmol/L	103 ± 2.45
		1 mmol/L	97 ± 2.12
4	维生素 C	0.1 mmol/L	97 ± 2.64
		0.4 mmol/L	98 ± 1.17
5	半胱氨酸	30 mmol/L	62 ± 1.23 ***
6	对照	~	100 ± 3.54

注:计算公式为 $C = C_i / C_{con} \times 100\%$, 式中: C_i 表示条件 i 下的多聚体百分含量, C_{con} 表示对照组的多聚体百分含量, C 代表条件 i 下多聚体的相对百分含量。以上所有数值格式均为“平均值 ± 标准偏差”($n=3$)。*** 表示 $P<0.0001$ 。

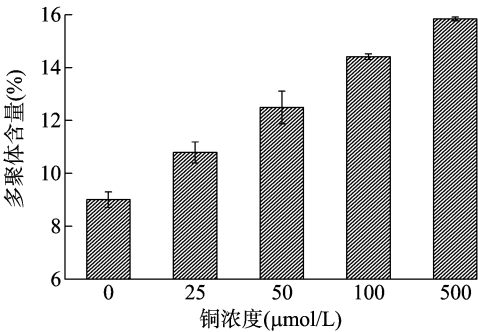


图1 添加不同浓度铜离子对 Mab-A 多聚体含量的影响

些二硫键溶剂暴露性增大,增加了分子间二硫键错配交联的几率,从而导致了二硫键的形成。

在基础培养基中加入胱氨酸后,产物中多聚体的相对百分含量见表 3,添加 27 mmol/L 胱氨酸使多聚体相对百分含量达到 103%,比对照仅增加了 3%,与对照处于同一水平。表明,胱氨酸的加入对多聚体的形成并没产生影响。

表 3 胱氨酸添加实验

添加组分	浓度	多聚体相对百分含量 (%)
半胱氨酸	27 mmol/L	103 ± 1.47
对照		100 ± 3.54

注:计算公式为 $C = C_i / C_{con} \times 100\%$, 式中: C_i 表示条件 i 下的多聚体百分含量, C_{con} 表示对照组的多聚体百分含量, C 代表条件 i 下多聚体的相对百分含量。

2.2 培养过程参数对多聚体形成的影响

2.2.1 温度对多聚体形成的影响 温度是影响细胞代谢和表达的重要参数, Schatz 等将 CHO 细胞培养温度降低至 28 ℃,最终抗体的产量提高了 38 倍^[10]。Trummer 等将培养温度降低至 30 ℃时,CHO 细胞表达的 EPO 的唾液酸含量降低了 40%^[11]。温度被认为是培养过程中最重要的关键操作参数之一。培养温度的降低能显著降低抗体多聚体的含量(图 2)。培养温度从 35 ℃降低至 32 ℃时,蛋白多聚体含量

从 $(6.8 \pm 0.38)\%$ 减少至 $(4.2 \pm 0.67)\%$,降低了 38%。这与 Rodriguez 等在研究温度对 β -IFN 蛋白分泌影响的结论^[12] 一致。Wyeth 也阐述了降温操作对降低抗体蛋白多聚体含量的重要性^[13]。但 Gomez 却发现 33 ℃比 37 ℃下抗体的多聚体含量增加 4 倍到 12 倍之多^[14],这可能与不同细胞蛋白合成能力和蛋白翻译后修饰能力的平衡有关。

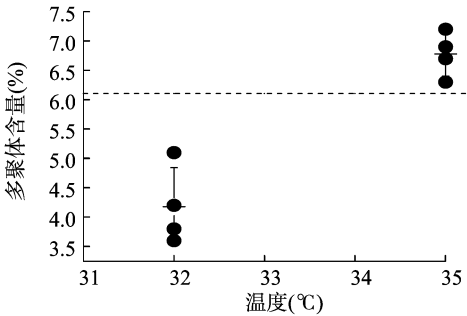


图2 不同温度条件下 Mab-A 中多聚体含量比较

我们从蛋白合成能力和蛋白翻译后修饰能力 2 个角度深入探讨降温操作对多聚体含量的影响。抗体比生成速率直接反映了细胞蛋白合成的能力。将每天的抗体产量对 IVCC 作图,斜率即为抗体比生成速率。不同温度条件下 Mab-A 的比生成速率见图 3,35 ℃条件下抗体的比生成速率为 $(12.58 \pm 0.15) \times 10^{-9} \text{ g}/(\text{cell} \cdot \text{day})$,32 ℃条件下的比生成速率提高到 $(20.83 \pm 0.34) \times 10^{-9} \text{ g}/(\text{cell} \cdot \text{d})$,比 35 ℃增加了 0.66 倍,可见降温操作能有效提高细胞蛋白合成能力。我们采用荧光定量 PCR 的方法检测了直接参与二硫键连接的 2 个重要蛋白 BiP 和 PDI 的转录水平(图 4),这 2 个蛋白转录水平的高低反映了蛋白翻译后修饰能力的强弱。低温培养能显著提高 BiP 和 PDI 的表达水平。与 35 ℃相比,CHO 细胞在 32 ℃条件下培养时 BiP 和 PDI 的表达水平均提高了 89%。Kou 等在研究培养温度对 TNFR-Fc 产物比生成速率的影响机制时发现,降低温度后,虽然两者的 mRNA 表达水平一致,但 30 ℃时内质网内分子伴侣 PDI 和 Bip 的表达量却是 37 ℃下的 1.8 倍,蛋白翻译后修饰能力提高了 2 倍^[15]。我们推测温度的降低虽然同时提高蛋白合成能力和蛋白翻译后修饰能力,但蛋白翻译后修饰能力的提高高于蛋白合成能力的提高程度,最终获得的抗体蛋白多聚体含量显著降低。

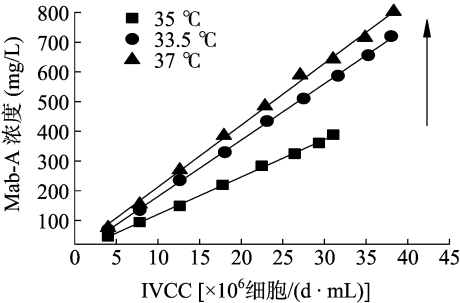


图3 不同温度下 Mab-A 的比生成速率

2.2.2 pH 值对多聚体形成的影响 从图 5 可以看出,pH 值 6.8 时蛋白多聚体含量为 5.1%~7.2%,平均含量为 $(6.4 \pm 1.14)\%$,pH 值 7.2 时蛋白多聚体含量为 4.2%~6.7%,平均含量为 $(5.7 \pm 1.34)\%$,而中间条件的 pH 值 7.0,多聚体含

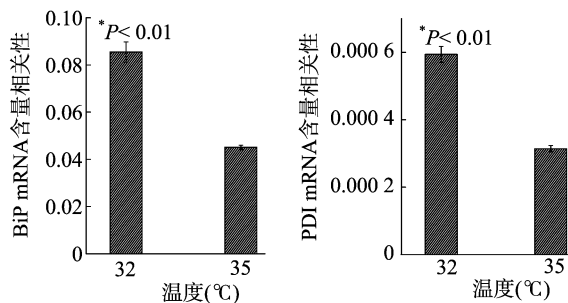
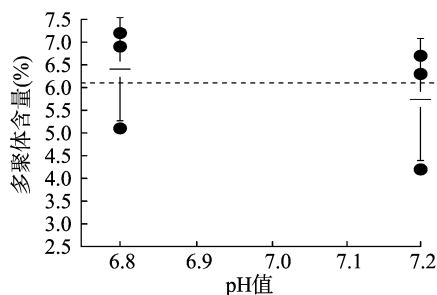


图4 温度对CHO细胞胞内BiP(左)和PDI(右)mRNA含量的影响



黑色横线代表同一温度下 3 个平行试验的平均值, 误差线代表标准方差值, 水平虚线代表 pH 值为 7 条件下的多聚体水平

图5 不同 pH 值条件下 Mab-A 中多聚体含量

量 6%, 并不具有统计学意义上的差别, Rodriguez 等也发现 pH 值的控制并不是多聚体形成的主要过程参数^[6,12]。

3 结论

多聚体的形成是蛋白药物生产过程中常见的现象, 存在可能引起抗体免疫原性和药代动力学方面的问题, 虽然下游纯化过程能够去除一部分多聚体, 但是在上游工艺中防止多聚体的形成能够减轻下游过程的负担, 并能提高过程的产量, 因此亟须建立减少多聚体的培养策略。本试验在质量设计 (QbD) 指导下, 系统研究了培养基中氧化还原组分和培养过程中的操作参数 (温度和 pH 值) 对多聚体的影响, 发现提高半胱氨酸浓度、降低铜离子浓度以及降低培养温度能有效抑制多聚体的形成。本试验结果初步建立了生产工艺与关键质量属性多聚体含量间的关系, 有助于后续工艺的优化设计, 保证最终产品质量, 可有效实现质量设计。

参考文献:

- [1] Rouiller Y, Solacroup T, Deparis V, et al. Application of quality by design to the characterization of the cell culture process of an Fc-Fusion protein[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, 81(2): 426-437.
- [2] Rosenberg A S. Effects of protein aggregates; an immunologic per-

- spective[J]. *The AAPS Journal*, 2006, 8(3): 501-507.
- [3] Philo J S, Arakawa T. Mechanisms of protein aggregation [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, 10(4): 348-351.
- [4] Yoon S K, Song J Y, Lee G M. Effect of low culture temperature on specific productivity, transcription level, and heterogeneity of erythropoietin in Chinese Hamster Ovary cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(3): 289-298.
- [5] Muthing J, Kemminer S E, Conradt H S, et al. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24 [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 83(3): 321-334.
- [6] Jing Y, Borys M, Nayak S, et al. Identification of cell culture conditions to control protein aggregation of IgG fusion proteins expressed in Chinese hamster ovary cells[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(1): 69-75.
- [7] Banks D D, Gadgil H S, Pipes G D, et al. Removal of cysteinylolation from an unpaired sulfhydryl in the variable region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody improves homogeneity, stability, and biological activity[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97(2): 775-790.
- [8] Chaderjian W B, Chin E T, Harris R J, et al. Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed[J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(2): 550-553.
- [9] Cromwell M E M, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing[J]. *The AAPS Journal*, 2006, 8(3): 572-579.
- [10] Schatz S M, Kerschbaumer R J, Gerstenbauer G, et al. Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 84(4): 433-438.
- [11] Trummer E, Fauland K, Seidinger S, et al. Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation - A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(6): 1045-1052.
- [12] Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, et al. Enhanced production of monomeric Interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions[J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(1): 22-30.
- [13] Gomes J M, Hiller G W. Use of low temperature and/or low pH in cell culture; US, 0269132A1 [P]. 2008
- [14] Gomez N, Subramanian J, Quyang J, et al. Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in CHO cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(1): 125-136.
- [15] Kou T C, Fan L, Zhou Y, et al. Detailed understanding of enhanced specific productivity in Chinese hamster ovary cells at low culture temperature[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111(3): 365-369.