

刘金涛, 范里, 邓献存, 等. 基于产品质量分析的中国仓鼠卵巢细胞流加培养工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 47–50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.015

基于产品质量分析的中国仓鼠卵巢细胞流加培养工艺的优化

刘金涛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:在前期建立的流加培养工艺的基础上, 考察培养过程中的 pH 值对流加培养过程的影响, 明确了过程控制参数 pH 值与产品关键质量属性(critical quality attributes, CQAs)间的联系, 建立了产物质量属性和过程操作属性间的关系, 并确认 pH 值为抗体融合蛋白生产工艺中的关键控制参数。结果表明, 流加培养过程随着培养 pH 值的提高, 抗体融合蛋白的生物学活性呈一定程度的下降趋势, 但唾液酸含量却呈明显的上升趋势; 此外, 在 pH 值 6.9 和 pH 值 7.0 的条件下培养过程中的最大细胞密度、活力、蛋白表达量均优于其他条件, 确定 6.95 ± 0.05 为过程的控制 pH 值。将此培养工艺放到大 200 L 中试生产规模, 结果与 2 L 反应器的结果基本一致。

关键词:CHO 细胞; pH 值; 抗体融合蛋白; 流加培养; 产品质量

中图分类号: Q813.1⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0047-03

抗体药物由于具有靶点明确、临床疗效显著、副作用少等优点已成为当今生物医药产业发展的主流, 其中动物细胞大规模培养技术是生产抗体药物最主要的技术手段。“质量可控, 安全有效”是药品研发过程中应首要遵循的原则, 美国 FDA 在 21 世纪现行优良生产规范(current good manufacturing practices, cGMPs)中提出的一个关键要素就是质量源于设计(quality by design, QbD)^[1]。因此在工艺开发中始终贯彻 QbD 原理, 设计不同的参数控制范围来设计产品的质量, 使得产品质量始终处于可控状态, 对加快药品开发有着十分重要的意义^[2]。

前期我们关于培养温度对细胞生长和产物表达影响及机制进行了深入的研究和探讨^[3-4], 而培养过程中的另一关键控制参数——pH 值对细胞生长和表达有着重要作用^[5]。一方面由于 pH 值在摇瓶、孔板等小规模培养高通量系统中难以进行有效的检测和控制, 导致在放大到反应器规模时则会出现产品质量不可控制的状态; 另一方面细胞在培养过程中乳酸等代谢副产物的大量生成导致培养体系中的 pH 值发生较大变化, 须要通过补酸或补碱的方式维持 pH 值的稳定。因此在反应器中系统研究 pH 值对于细胞生理状态特别是产物质量的影响是保证生产过程中产品质量可控的一项必不可少的工作。

本研究以表达抗体的融合蛋白的重组中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞为研究对象, 以抗体融合蛋白关键质量参数为主要评价标准, 同时结合细胞生长、代谢和

产物表达情况, 在 2 L 生物反应器中对流加培养过程中的操作参数 pH 值进行了详细的考察, 通过综合分析确定最适 pH 值, 并成功地将该工艺稳定地放大到中试生产规模。

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养基

试验细胞株为表达抗体融合蛋白的重组 CHO 细胞。基础培养基为商业 Excell 302 培养基(SAFC), 流加培养基为笔者实验室自主开发^[6]。培养基经 0.22 μm 微孔滤膜(millipore)过滤除菌, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。培养基配制所用试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 细胞培养

从细胞库中复苏重组 CHO 细胞, 以 $(2 \sim 3) \times 10^5$ 个/mL 活细胞密度接种于摇瓶中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养, 转速为 120 r/min, 作为试验用的种子细胞。取对数生长长期的 CHO 细胞, 以约 1.0×10^6 个/mL 的活细胞密度接种至反应器中, 培养体积为 1.5 L。培养过程中每 24 h 取样, 计数。培养液经 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于试验结束后营养物、代谢副产物、抗体融合蛋白的检测。培养过程均使用 Sartorius 公司生产的 2 L BIostat A-plus 细胞反应器。培养时反应器操作条件: 溶解氧为 50%, 温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌转速为 150 r/min, pH 值分别控制在 6.8、6.9、7.0、7.2 条件下(无控制作用区设为 ± 0.02)。pH 值的控制采用深层通入 CO_2 或者补入 1 mol/L NaOH 溶液的方式。流加策略采用葡萄糖控制模型^[6]。

1.3 分析方法

细胞密度和活力采用 Bio-Rad TC20™ 自动计数仪, 葡萄糖、乳酸、氨的检测采用 NOVA Bioprofile 400; 产物浓度的检测采用 Protein A-HPLC (Applied Biosystems) 的方法, 方法参照文献[7]。上清收获后采用 rProtein A 亲和层析柱(GE Healthcare)纯化并收集抗体。唾液酸含量根据《中华人民共

收稿日期: 2014-12-21

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21106045)。

作者简介: 刘金涛(1987—), 男, 山东临沂人, 博士研究生, 主要从事动物细胞大规模培养研究。E-mail: jltiu0416@gmail.com。

通信作者: 谭文松, 教授, 博士生导师, 主要从事动物细胞大规模培养研究。E-mail: wstan@ecust.edu.cn。

和国药典》(2010 年版 3 部)中唾液酸检测方法测定。生物学活性的测定方法同文献[8]。多聚体的检测采用凝胶排阻色谱(SEC)的方法,色谱柱为 TSK-Gel G3000 SWXL (4.6 mm×30 cm,Tosoh Bioscience),方法参见文献[9]。

2 结果与分析

2.1 pH 值对于细胞生长和代谢的影响

2.1.1 pH 值对细胞生长的影响 通过在不同 pH 值培养条件(6.8、6.9、7.0、7.2)下的对比试验可知,在 pH 值 6.8 条件下,CHO 细胞直接进入指数生长期,快速生长达到最高细胞密度 8.6×10^6 个/mL,随后活细胞密度显著降低(图 1)。pH 值 6.9 和 pH 值 7.0 的条件下,细胞生长情况与 pH 值 6.8 条件下类似,但最高活细胞密度达到 1.01×10^7 个/mL,并且至培养结束时细胞仍维持较高的活力(大于 90%)。而在 pH 值 7.2 的条件下最高活细胞密度仅为 5.8×10^6 个/mL,随后活细胞密度和细胞活力快速下降,培养仅维持 9 d,培养结束时细胞活力仅为 45.7%。

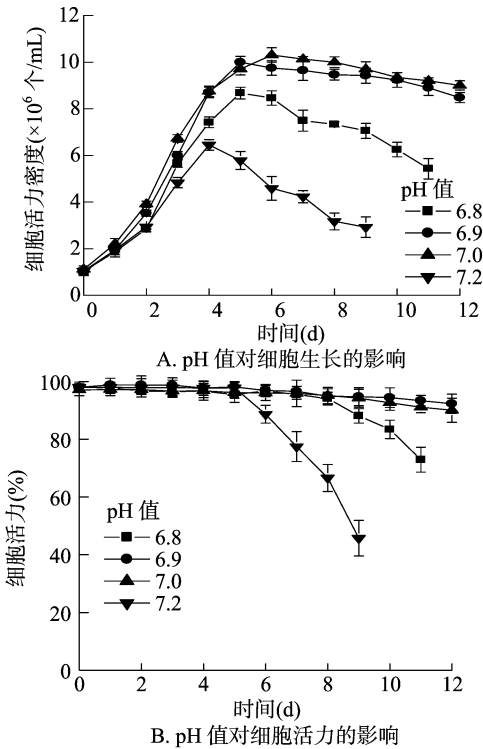


图1 pH 值对细胞生长和细胞活力的影响

2.1.2 pH 值对主要营养物表达的影响 葡萄糖是细胞生长代谢所需的重要碳源和能源物质,为了维持培养基中的葡萄糖浓度,防止葡萄糖耗竭所引起的细胞代谢的变化^[10],流加策略采用葡萄糖控制模型。由表 1 可知,在细胞生长阶段(0~5 d)各培养过程的葡萄糖比消耗速率无明显差异。而产物表达阶段(6~12 d),pH 值控制在 7.2 的培养过程葡萄糖的比消耗速率依然维持在一个较高的水平,为 $1.8 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells} \cdot \text{d})$,是其他培养过程的 3.3~3.8 倍。

乳酸和氨是细胞代谢的 2 个主要副产物,在培养基中的大量累积会严重影响细胞的生长和产物的表达^[11-12]。与其他培养过程中出现乳酸代谢转变现象不同,pH 值为 7.2 的培养过程乳酸仍一直处于生成状态,培养结束时培养基中的乳

表 1 流加培养过程中主要营养物及代谢副产物比消耗(生成)速率

pH 值	比消耗速率[mmol/(10 ⁹ cells·d)]					
	葡萄糖		乳酸		氨	
	0~5 d	6~12 d	0~5 d	6~12 d	0~5 d	6~12 d
6.8	-2.40	-0.54	1.75	-0.43	0.44	0.27
6.9	-2.25	-0.50	2.05	-0.24	0.42	0.12
7.0	-2.35	-0.47	1.98	-0.08	0.49	0.05
7.2	-2.31	-1.80	2.61	0.82	0.45	0.054

注:负值代表消费。

酸浓度达到了 44.8 mmol/L,是其他过程的 1.48~3.33 倍(图 2-A)。培养过程中乳酸的大量累积可能是导致 pH 值为 7.2 时培养过程活细胞密度和细胞活力快速下降的主要原因。与乳酸代谢相似,氨代谢也在培养至 4 d 出现了显著的区别(图 2-B)。氨在 pH 值为 6.9~7.2 的培养过程进行到 4 d 后累积速率显著降低,以 pH 值为 7.0 的培养过程为例,氨比生成速率从 0.49 降低至 0.05(表 1),而 pH 值为 6.8 的培养过程氨依然大量累积,培养结束时氨浓度达到 17.7 mmol/L。

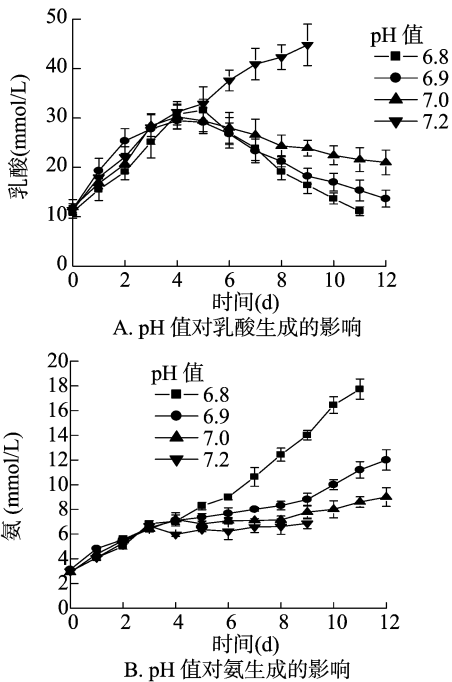


图2 pH 值对培养过程中乳酸和氨生成的影响

2.2 pH 值对抗体融合蛋白表达以及产品质量的影响

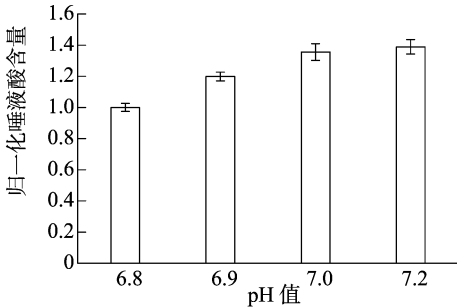
2.2.1 pH 值对抗体融合蛋白表达的影响 由表 2 可知,在 pH 值 7.2 条件下,由于细胞生长和维持不利,抗体融合蛋白的最高浓度仅为 0.32 g/L,仅是 pH 值在 7.0 培养过程的 24%。对比不同条件下抗体融合蛋白的比生成速率,pH 值 7.2 条件下抗体融合蛋白比生成速率与 pH 值 7.0 培养过程相比分别下降了 63.1%、20.7%。

2.2.2 pH 值对抗体融合蛋白唾液酸含量的影响 唾液酸广泛存在于糖蛋白 N-糖链或 O-糖链的末端,研究表明,蛋白类药物中唾液酸含量对于药物在体内的半衰期有着重要的影响^[13]。因此抗体融合蛋白的唾液酸化程度是衡量药用蛋白质量的一个重要指标。在不同 pH 值培养条件下抗体融合蛋

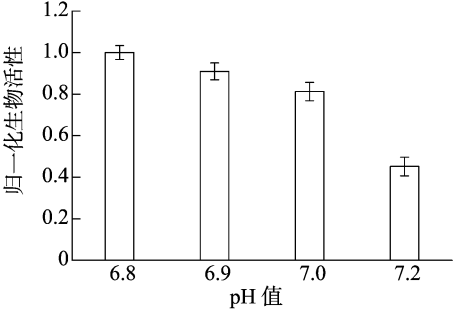
表 2 pH 值对抗体融合蛋白生成的影响

pH 值	表达量 (g/L)	蛋白比生成速率 [pg(cell · d)]
6.8	0.90	17.8
6.9	1.28	17.2
7.0	1.35	17.9
7.2	0.32	14.2

白的唾液酸含量见图 3 - A,可见随着培养 pH 值的降低抗体融合蛋白的唾液酸含量呈明显下降趋势,在 pH 值 6.8 条件下的唾液酸含量仅为 pH 值 7.0 条件下的 73.5%。研究结果表明,降低培养过程中的 pH 值能够显著抑制抗体融合蛋白的唾液酸修饰。Gawlitsek 等在研究氨对 TNFR - Fc 影响时发现,提高培养基中氨的浓度(15 mmol/L)能显著降低蛋白的唾液酸含量^[14]。研究还表明,降低培养 pH 值能使氨的比生成速率显著提高,这可能是在 pH 值 6.8 条件下唾液酸含量下降的主要原因。



A. pH 值对抗体融合蛋白唾液酸含量的影响



B. pH 值对抗体融合蛋白生物学活性的影响

图3 pH 值对抗体融合蛋白唾液酸含量和生物学活性的影响

抗体融合蛋白的生物学活性是评价产品生物学性质的一个重要指标。随着培养过程中 pH 值的提高,抗体融合蛋白的生物学活性呈明显下降趋势。在 pH 值 7.2 的条件下,抗体融合蛋白的生物学活性仅为 pH 值 7.0 条件下的 45.1% (图 3 - B)。可能是由于培养 pH 值改变引起了胞内 pH 值的改变,影响了抗体融合蛋白的加工和修饰过程中酶活性的变化,从而影响了蛋白的翻译后修饰。

2.2.3 pH 值对抗体融合蛋白多聚体含量的影响 重组蛋白的聚合是影响重组蛋白质量、安全的主要因素之一,不仅影响其生物学功能,而且有可能在体内引起免疫反应^[15]。不同 pH 值条件下培养液中抗体融合蛋白单体和多聚体的含量见表 3。结果表明,pH 值为 6.9 的培养过程抗体融合蛋白多聚体含量最低,仅为 5.87%,升高或降低 pH 值水平多聚体含量略有增加。考虑到多聚体的含量仍处于较高水平,可以进一步优化培养工艺或者通过下游纯化的方法来进一步降低多聚

表 3 不同 pH 值条件下抗体融合蛋白多聚体含量

pH 值	融合蛋白(%)	
	多聚体	单体
6.8	7.51	92.49
6.9	5.87	94.13
7.0	6.59	93.41
7.2	7.89	92.11

体的含量。

2.3 流加培养工艺的优化及放大

通过研究,明确了过程控制参数 pH 值与产品关键质量控制参数唾液酸、多聚体含量、产物生物学活性间的联系,建立了产物质量属性和过程操作属性间的关系,确认 pH 值为抗体融合蛋白生产工艺中的关键控制参数。研究结果表明,随着培养 pH 值的提高,抗体融合蛋白的生物学活性呈一定程度的下降趋势,但是抗体融合蛋白的唾液酸含量却呈明显的上升趋势。在 pH 值 6.9 和 pH 值 7.0 的条件下,培养过程中的最大细胞密度、活力以及蛋白表达量均优于其他条件。综合考虑抗体融合蛋白的各个质量指标、细胞的生长和表达情况以及反应器控制时 pH 值的波动问题,在培养过程中 pH 值应该控制在 6.95 ± 0.05 。超过此范围特别是 pH 值水平偏高达 7.2 时,细胞生长受到抑制且维持不利,乳酸大量生成,关键质量控制参数唾液酸和产物活性均有不同程度的降低。

通过培养 pH 值的优化,并将流加培养工艺放大到 30 L 和 200 L 规模的反应器,表现结果与 2 L 反应器下的结果基本一致。

3 结论

在前期流加培养工作的基础上,通过考察流加培养过程中培养 pH 值对细胞生长、代谢与产物合成以及产物各质量参数的影响,结果表明:(1) 在 pH 值 6.9 和 pH 值 7.0 的条件下,最大细胞密度和细胞活力以及抗体融合蛋白的表达量均高于其他培养条件;(2) 培养过程中的 pH 值对细胞的乳酸或氨代谢有较显著的影响;(3) 提高培养过程中的 pH 值,抗体融合蛋白的生物学活性呈显著下降趋势,而抗体融合蛋白的唾液酸含量却呈上升趋势。

将细胞生长、代谢、表达以及抗体融合蛋白的各质量参数综合比对分析,确定 6.95 ± 0.05 为过程的控制 pH 值,并成功放大到 30 L 和 200 L 反应器规模。试验还发现抗体融合蛋白的多聚体含量仍处于较高的水平,可以进一步通过优化培养基、改变培养参数或者下游分离纯化等方法降低抗体融合蛋白的多聚体含量。

参考文献:

[1] Yu L X. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control [J]. Pharmaceutical Research,2008,25(4) :781 - 791.

[2] Rathore A S, Winkle H. Quality by design for biopharmaceuticals [J]. Nature Biotechnology,2009,27(1) :26 - 34.

[3] 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.

邓培渊,郭红玲,袁伟,等.不同沉淀方法对外源表达凝乳酶活性的影响[J].江苏农业科学,2015,43(4):50-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.016

不同沉淀方法对外源表达凝乳酶活性的影响

邓培渊¹,郭红玲²,袁伟²,李玉华¹

(1. 郑州师范学院/郑州市生物物种资源研究重点实验室,河南郑州 450044; 2. 华北水利水电大学环境与市政工程学院,河南郑州 450045)

摘要:从粗提重组凝乳酶的得率、保存活性 2 个方面比较了乙醇沉淀法和硫酸铵沉淀法的差别。结果表明,相对于硫酸铵沉淀法,乙醇沉淀法获得蛋白的量相差不是很大,但是乙醇沉淀法所获得蛋白的单位效价是硫酸铵沉淀法的 1.27 倍,且乙醇沉淀法所得产物的比活性提高了 16.78%。综合考虑重组凝乳酶的得率与活性,用乙醇沉淀的效果较好。

关键词:重组凝乳酶;活性;乙醇沉淀法;硫酸铵;盐析

中图分类号: Q814.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0050-03

凝乳酶原一般存在于反刍动物的第 4 胃中,在酸性条件下经自我剪切形成有活性的凝乳酶。凝乳酶属于酸性蛋白酶,主要功能是水解 *K*-酪蛋白的 Phe 105-Met 106 键,在室温以上并有 Ca^{2+} 存在时,可使蛋白质凝聚成乳块,因而在奶酪生产和改良中有重要的应用价值^[1]。目前,凝乳酶的替代品主要来源于动物凝乳酶、植物凝乳酶、微生物凝乳酶以及重组凝乳酶。常见的动物胃蛋白酶主要存在于幼猪^[2]、小鸡、金枪鱼以及鲨鱼中^[3-5],但是这些动物的胃蛋白酶与小牛凝乳酶仍有所不同。在多种植物的不同部位中可以分离到使乳凝固的蛋白酶,即植物凝乳酶^[6]。在合欢树、无花果、新鲜木瓜中提取出的蛋白酶以及姜汁、柠檬汁等植物非蛋白酶均有

较好的凝乳作用,因此具有广阔的商业价值^[7-10]。

微生物凝乳酶主要来源于细菌、放线菌和真菌,由于微生物凝乳酶具有耐热性强、不易失活的特点,在实际生产中需要进一步调整工艺促使凝乳酶失活。研究发现,基因工程凝乳酶同天然凝乳酶的性质基本相同,利用基因工程生产的凝乳酶不仅纯度高、产出的奶酪品质好,而且易于工业化生产,因此重组凝乳酶具有重要的实际应用价值^[11]。

要对外源表达的凝乳酶进行分离纯化,获取有活性的目的产物,纯化的第 1 步就是对发酵液进行浓缩,在去除杂质的同时,可以获取高活性的凝乳酶。目前粗提外源表达凝乳酶常用硫酸铵沉淀法或乙醇沉淀法,不同的粗提方法直接影响凝乳酶的活性和纯化效果。本研究对外源表达重组凝乳酶的初步浓缩方法进行比较分析,以期工业化生产提供一定的理论基础。

收稿日期:2014-05-08

基金项目:河南省基础与前沿技术研究计划(编号:102300410146)。

作者简介:邓培渊(1981—),男,河南登封人,博士,讲师,主要从事动物分子生物学研究。E-mail:zhzd201@hotmail.com。

[4] Kou T C, Fan L, Zhou Y, et al. Increasing the productivity of TNFR-Fc in GS-CHO cells at reduced culture temperatures[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(1):136-143.

[5] Gawlitsek M, Estacio M, Furch T, et al. Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103(6):1164-1175.

[6] 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[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(2):216-222.

[7] Yang J D, Lu C H, Stasny B, et al. Fed-batch bioreactor process scale-up from 3 L to 2 500 L scale for monoclonal antibody production from cell culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(1):141-154.

[8] Tan Q Q, Guo Q C, Fang C, et al. Characterization and comparison of commercially available TNF receptor 2-Fc fusion protein products[J]. *mAbs*, 2013, 4(6):761-774.

[9] Gomez N, Subramanian J, Ouyang J, et al. Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in cho cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(1):125-136.

[10] 刘国庆,陈飞,赵亮,等.表达单克隆抗体的 CHO 细胞无蛋白培养基的优化[J]. *高校化学工程学报*, 2013, 27(1):96-101.

[11] Newland M, Kamal M N, Greenfield P F, et al. Ammonia inhibition hybridomas propagated in batch, fed-batch, and continuous-culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43(5):434-438.

[12] Li J C, Wong C L, Vijayasankaran N A, et al. Feeding lactate for CHO cell culture processes: Impact on culture metabolism and performance[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(5):1173-1186.

[13] Weiss P, Ashwell G. The asialoglycoprotein receptor: properties and modulation by ligand[J]. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1989, 300:169-184.

[14] Gawlitsek M, Ryll T, Lofgren J, et al. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: Degradative versus biosynthetic mechanisms[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(6):637-646.

[15] Rosenberg S A. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective[J]. *AAPS Journal*, 2006, 8(3):501-507.