

表达 NDK105 蛋白 rCHO 细胞在批次培养与浓缩物流加培养中的生长与代谢特性

王美玲, 任东升*, 段鑫, 张艳

西藏诺迪康药业股份有限公司, 成都 610003

摘要: 人程序性死亡受体抗体在抗肿瘤, 抗感染, 抗自身免疫性疾病等方面有广阔的市场前景。本实验以表达 PD-1 抗体的 rCHO 细胞为研究对象, 考察了在培养过程中浓缩物流加培养对 rCHO 细胞生长、葡萄糖消耗, 以及副产物乳酸、氨生成的影响。结果表明: 浓缩物流加培养过程中, 活细胞密度达到 3.1×10^6 Cells/mL, 较批次培养提高 1.6 倍, 细胞培养时间延长; 而乳酸生成大幅减少, NDK105 产量增加。本研究所采用的研究方法和控制策略为优化 CHO 细胞培养过程和 NDK105 成功产业化奠定了基础。

关键词: CHO 细胞; NDK105 蛋白; 乳酸

中图分类号: R392

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.024

Growth and Metabolism of NDK105 Producing rCHO Cells in Batch and Concentrate Fed-Batch Culture

WANG Mei-ling, REN Dong-sheng*, DUAN Xin, ZHANG Yan

Tibet Rhiola Pharmaceutical Holding Co, Chengdu 610003, China

Abstract: NDK105 is antibody of programmed death 1 receptor that has great potential in anti-tumor, anti-infection and autoimmune disease. We studied the effects of concentrate fed-batch culturing on rCHO growth, glucose consumption, as well as lactate and ammonia production. It is found that the maximum viable cell density in concentrate fed-batch culture reaches 3.1×10^6 Cells/mL, which is 1.6-fold in batch culture. At the same time, the culture time of rCHO were extended, and also, compared with the batch process, the newly developed concentrate fed-batch process reduced lactate production and improved NDK105 production. This concentrate fed-batch process would therefore facilitate the productions of therapeutic antibody by rCHO cells.

Key words: CHO cells; NDK105; lactate

哺乳动物细胞培养技术开始于本世纪初, 发展至今已成为生物、医学研究和应用中广泛采用的技术方法。与微生物表达系统相比, 动物细胞表达系统的最大优势在于其分泌的复杂

结构大分子物质具备良好的生物学活性, 并具有完整的翻译后修饰结构, 从而保证了其在人体内不发生免疫排斥。因此利用哺乳动物细胞生产抗体类药物得到越来越广泛的应用。中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO cell) 是生产重组蛋白药物中使用得最广泛的哺乳动物细胞系之一, 目前约有 70% 的重组蛋白药物由 CHO 细胞产生^[1],

因此成为生产抗体类药物的首选宿主细胞。

PD-1 (programmed death 1) 程序性死亡受体 1, 是一种重要的免疫抑制分子^[2]。NDK105 是利用受体免疫球蛋白融合技术, 将受体的细胞外区与人免疫球蛋白的 Fc 段基因融合得到的重组蛋白。NDK105 能特异性的与体内 PD-1 结合, 激活体内免疫系统, 这类药物在抗肿瘤, 抗感染, 抗自身免疫性疾病及器官移植存活等方面具有明显的疗效。

目前“抗体类药物”的生产工艺就要是浓缩物流加 (Fed-Batch) 培养, 与传统的批培养工艺相比, 流加培养工艺是营养补充式培养, 操作相对简便宜, 可重复性强^[3]。提高流加培养工艺中产物产率的一个重要途径就是解决培养基低效利用和有毒代谢物累积的问题^[4,5]。本研究在观察表达 NDK105 的 CHO 工程细胞代谢的基础上, 比较了批培养工艺

和浓缩物流加培养工艺对细胞生长和重组蛋白表达的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞株和培养基

本实验所用的细胞为 rCHO 细胞,分泌人 PD-1 受体抗体融合蛋白,由西藏诺迪康药物股份有限公司构建。

无血清培养基 Opti-BM 由西藏诺迪康药物股份有限公司自行研制开发,其基础培养基为 DMEM/F12 商业培养基 (Hyclone 公司)。流加培养基为葡萄糖,氨基酸,磷酸根,等营养成分浓缩液,化学成分明确(见表 1)。上述培养基均经过 Millipore 公司 0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌。

表 1 流加培养基组成及添加物浓度

Table 1 Supplementations made to the feed solution used in feed medium

组分 Composition n	含量 Concentration (mg/L)	组分 Composition	含量 Concentration (mg/L)
Arg	332.8	Phe	198.9
Cys	218.5	Pro	261.3
Glu	1846.6	Ser	262.5
Gln	1023.05	Thr	177
Gly	187.5	Trp	153.2
His	176.5	Tyr	372.5
Ile	239.3	Val	267.5
Leu	211.8	Na ₂ HPO ₄	2232.2
Lys	311.2	Glucose	36000
Met	128.3		

1.2 细胞培养

复苏 rCHO 种子细胞,以 $2 \sim 3 \times 10^5$ cells/mL 活细胞密度接种于摇瓶,置于在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,当细胞生长至对数生长期时离心,弃去上清液,并用新鲜培养基重悬浮细胞,接入工作体积为 2 L 的生物反应器 (Biorea 2000, 上海伯瑞)。反应器操作条件为:pH = 7.10,溶氧 50% 空气饱和度,温度 37 $^{\circ}\text{C}$,搅拌转速 50 rpm。

批次培养起始培养基葡萄糖浓度为 21 mmol/L,流加培养的起始培养基葡萄糖浓度为 13 mmol/L。在细胞密度达 1.0×10^6 cells/mL 时到每隔 12 h 取样,进行细胞计数并作生化分析。

1.3 细胞计数和细胞活力分析

用血球计数板计数细胞,用台盼蓝拒染法分析细胞活力。

1.4 培养液生化指标测定

采用葡萄糖测试盒(南京建成生物工程研究所)测定培养液中葡萄糖含量。培养液中的氨浓度采用 Berthlet 比色法氨试剂盒(上海生物制品所)测定,乳酸浓度采用乳酸脱氢酶法测定(南京建成生物工程研究所),氨基酸采用反相高效液相色谱系统 ACCQ-TAG 柱前衍生方法测定。假设培养细胞的比代谢率保持恒定,每次培养终止时的葡萄糖的比消耗率、氨和乳酸的比生成率按公式 $q = dY/(dt \cdot X)$ 计算,Y 代表代谢物,t 代表培养时间,X 代表细胞密度。TNFR-Fc 浓度采用高效亲和色谱检测。

2 结果与amp;讨论

2.1 细胞生长与amp;产物表达

在生物反应器中的批次培养的 rCHO 细胞的生长曲线及产物合成曲线(图 1)可以看出,以 3×10^5 cells/mL 的活细胞密度接种 12 h 后,细胞直接进入对数生长期,培养至第 4 d,活细胞密度达到最大值 (1.9×10^5 cells/mL) 随后细胞进入衰老和凋亡期,活细胞密度随着培养时间的延长逐渐降低。从 NDK15 产物的累积曲线上可以看出,随着培养时间的延长,NDK15 的产量不断增加,培养至第 8 d,NDK15 蛋白的浓度达到 61.3 mg/L。这说明 rCHO 细胞表达的 NDK15 的产量与细胞的生长不相关,rCHO 细胞的生长速度下降并不影响 NDK15 产物的生成,因此,提高单位体积活细胞的密度和延长培养时间可以增加最终 NDK15 的产量。

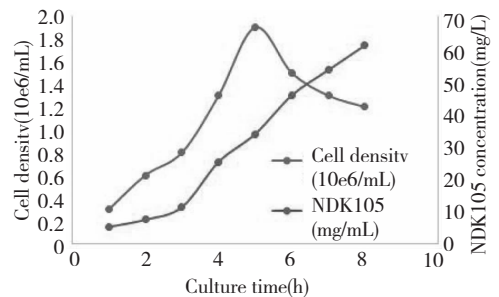


图 1 细胞批培养的生长与 NDK105 蛋白表达曲线

Fig. 1 Cell growth and NDK105 production curves in batch culturing

2.2 葡萄糖与丙酮酸和乳酸代谢

葡萄糖是细胞生长代谢的主要能源和碳源物

质。图 2 比较了批次培养工艺和浓缩物流加工艺在培养过程中葡萄糖浓度对细胞丙酮酸和乳酸代谢的影响。批次式培养起始培养基葡萄糖浓度 21 mmol/L,流加培养的起始培养基浓度为 13 mmol/L。当细胞密度达到 1.0×10^6 cells/mL 时开始流加。流加培养基中葡萄糖浓度 20 mmol/L。由图 2A 可以看出批次培养中葡萄糖的消耗比较快,在培养 84 h 后降至 0.5 mmol/L 以下,与批次培养相比较,在浓缩物流加培养过程中,葡萄糖可在 120 h 后才降至 0.5 mmol/L 以下。这说明浓缩物流加培养能够防止葡萄糖在培养过程中被过早的耗竭,从而消除营

养物限制对细胞生长带来的不利影响。观察批次培养和浓缩物流加培养对丙酮酸代谢的影响我们发现与葡萄糖消耗快相对应的,培养上清中丙酮酸的量也在不断的累积增加。而当葡萄糖耗竭后,丙酮酸开始降低,这说明丙酮酸重新被细胞利用供细胞维持所需。通过葡萄糖消耗与丙酮酸生成的关系我们可以看出葡萄糖是细胞培养过程是重要的碳源和能源物质,当葡萄糖和丙酮酸在培养基内都富裕时,细胞优先利用葡萄糖,在浓缩物流加培养中,当环境中葡萄糖的浓度维持在相对富裕的水平时,无需额外添加丙酮酸。

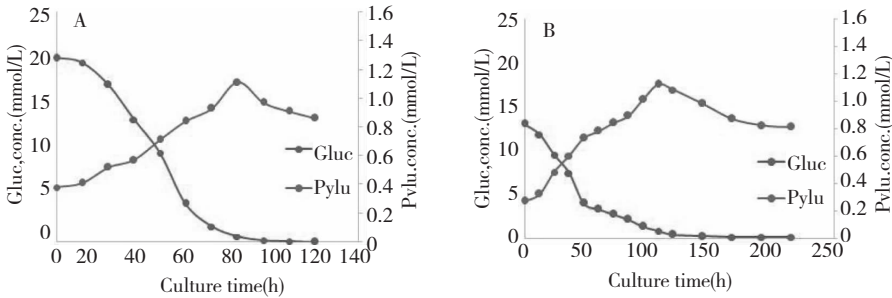


图 2 rCHO 细胞批次培养和浓缩物流加培养中葡萄糖和丙酮酸的代谢。A 批次培养, B 浓缩物流加培养

Fig. 2 Metabolism of glucose and pyruvate in batch and concentrate fed-batch culture of rCHO cells. A, batch culture. B, concentrate fed-batch culture

2.3 葡萄糖和乳酸代谢

细胞摄入葡萄糖后,经糖酵解转化为丙酮酸,之后或直接转化为代谢副产物乳酸,或进一步经由三羧酸循环完全氧化生成二氧化碳和水。由批次培养图 3A 中可以看出,快速消耗葡萄糖并大量产生乳酸是体外培养细胞的一个特点,培养至 120 h,乳酸累积量达到 32.8 mmol/L。而当培养过程中葡萄糖

以浓缩物流加的方式供给时(图 3B),虽然乳酸也是持续生成,但其累积浓度有明显降低,同样培养至 216 h,乳酸的累积量为 14.1 mmol/L。这说明培养过程中通过浓缩物流加葡萄糖而不是一次性加入葡萄糖能够促使细胞提高葡萄糖的利用率,减少代谢副产物乳酸的生成。

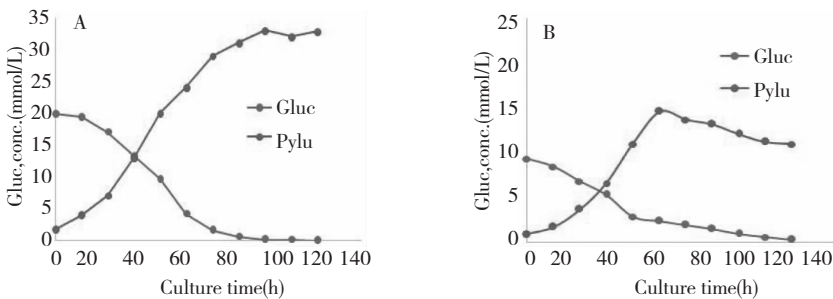


图 3 批培养(A)及浓缩物流加培养(B)培养过程中葡萄糖和乳酸浓度

Fig. 3 Concentration of glucose and lactate in batch culture (A) and concentrate fed-batch culture (B)

图 4 为浓缩物流加培养中葡萄糖比消耗速率 q_{Gluc} 和乳酸比生成速率 q_{Lac} 与葡萄糖浓度的关系。随着葡萄糖浓度的降低, q_{Gluc} 和 q_{Lac} 均呈下

降趋势,表明在浓缩物培养过程中当葡萄糖浓度发生限制时,会显著降低进入糖酵解的葡萄糖比例,从而减少其代谢副产物乳酸的生成和积累。

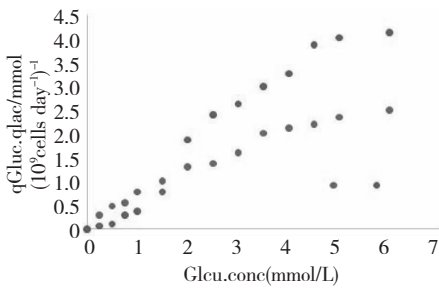


图4 浓缩物流加培养中葡萄糖比消耗速率 q_{Gluc} 和乳酸比生成速率 q_{Lac} 与葡萄糖浓度的关系

Fig. 4 Effects of glucose concentrations on the specific rates of glucose consumption and lactate production in concentrate fed-batch culture

2.4 氮代谢

氨是动物细胞培养过程中两个最主要的有毒副产物。我们的研究发现批次培养和浓缩物流加培养产生的氨最大分别为 3.5 vs 4.1 mmol/L, 两者的差别并不明显(图5)。多数文献报道的动物细胞如(CHO 细胞、杂交瘤细胞等)能够承受的氨浓度范围一般在 5 ~ 10 mmol/L 及以上^[6]。所以本实验的氨积累浓度在 3 ~ 4 mmol/L 之间, 尚不构成对细胞生

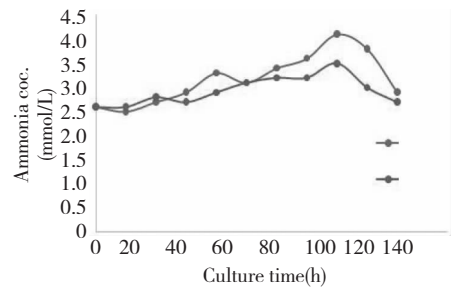


图5 批次培养和浓缩物流加培养中氨的生成

Fig. 5 Ammonia production in batch culture and concentrate fed-batch culture

长和产物表达的抑制。

2.5 细胞密度、活率和 NDK105 产量

与批次培养相比, 浓缩物流加培养可将 rCHO 细胞的最大培养密度从 1.9×10^6 cells/mL, 提高到 3.2×10^6 cells/mL(图6A), 细胞的活力均可保持在 80% 左右(图6B), 由于浓缩物流加培养提高了 rCHO 细胞的对营养物质的利用率, 同时细胞密度的增加也提高了单位体积 NDK105 的产率, 与批次培养相比, 最终使 NDK105 的产量提高了 2.8 倍(图6C)。

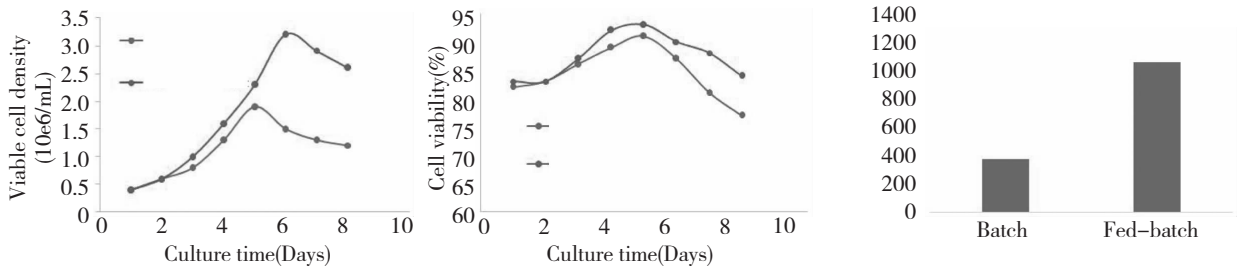


图6 批次培养和浓缩物流加培养中细胞的密度(A), 活力(B)和 NDK105 的产量(C)

Fig. 6 Cell density (A), viability (B) and NDK105 production (C) in batch and concentrate fed-batch culture

3 结论

在 rCHO 细胞的培养过程中, 营养物限制和代谢副产物的积累是一对主要矛盾, 也是限制细胞生长和产率的关键因素, 采用较低的初始葡萄糖浓度和浓缩物流加可将培养过程中的葡萄糖浓度控制在较低的范围, 可减少副产物乳酸的生成, 显著提高葡萄糖的能量代谢利用率。在浓缩物流加培养过程中, 最终产量的提高是由于流加过程提高了活细胞的密度, 并相应的延长了生产周期, 但如果能在培养过程中将许多其它的参数如温度、溶氧、pH、渗透压, 还有其它一些刺激因子的添加等进行优化, 可望

进一步提高最终抗体的产率。

参考文献

- Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem Eng Prog*, 2007, 103(7): 40-47
- Sui X, Ma J, Han W, et al. The anticancer immune response of anti-PD-1/PD-L1 and the genetic determinants of response to anti-PD-1/PD-L1 antibodies in cancer patients. *Oncotarget*, 2015, 23: 19393-19404.
- Bibila TA, Robinson DK. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. *Biotechnol Prog*, 1995, 11: 1-13.

(下转第 105 页)