

表达抗-CD25 单克隆抗体的 GS-NS0 骨髓瘤细胞无血清培养及代谢特性

赵亮, 范里, 张旭, 谭文松

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要: 抗-CD25 单克隆抗体作为免疫抑制剂拥有广阔的市场前景和巨大的经济价值。本实验以表达抗-CD25 单克隆抗体的 GS-NS0 细胞为研究对象, 开发了支持其大规模培养和抗体表达的无血清低蛋白培养基, 批培养最大活细胞密度和最大抗体浓度分别达 3×10^6 cells/mL 和 300 mg/L 以上, 比商业无血清培养基(Excell 620 + 0.2% primatone)分别提高了 100%和 46%。通过批培养实验, 研究了细胞的生长、葡萄糖和氨基酸代谢、以及产物表达特点, 并揭示了批培养过程中初始葡萄糖浓度对 GS-NS0 细胞生长与代谢的影响规律。为优化 GS-NS0 细胞培养过程和抗 CD25 单抗成功迈向产业化提供了重要的科学依据。

关键词: GS-NS0 细胞, 无血清培养基, 抗 CD25 单克隆抗体, 代谢特性

Metabolic characteristics of GS-NS0 Myeloma cells producing anti-CD25 monoclonal antibody in serum-free culture

Liang Zhao, Li Fan, Xu Zhang, and Wensong Tan

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: As an immunodepressant, anti-CD25 monoclonal antibody has a huge market with wide prospect and economic value. We developed a low protein serum-free medium for large-scale GS-NS0 myeloma cell culture and anti-CD25 monoclonal antibody production. Further study focused on the characteristics of GS-NS0 cell growth, glucose and amino acid metabolism, and antibody production. In the serum-free medium, the maximal viable cell density and antibody concentration reached above 3×10^6 cells/mL and 300 mg/L in batch culture. Compared with the commercial serum-free medium (Excell 620 + 0.2% Primatone), the maximal viable cell density doubled and the maximal antibody concentration increased 46%. Results also showed the specific growth rate decreased when the glucose concentration was lower than 6 mmol/L. And the production of lactate increased when glucose concentration was excessively high (>30 mmol/L). These results were important to provide technique and theory basis for developing optimized GS-NS0 cell culture and anti-CD25 monoclonal antibody production processes.

Keywords: GS-NS0 cell, serum-free medium, anti-CD25 monoclonal antibody, metabolic characteristics

Anti-CD25(IL-2R α)单克隆抗体是 T 细胞活化的阻滞剂。1992 年法国医生 Hiesse 等在进行肾移植时

首次采用 Anti-CD25 嵌合型单克隆抗体(即 LO-TACT-1)作为免疫抑制剂取得了满意的治疗效

Received: March 12, 2009; **Accepted:** May 11, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20706016).

Corresponding author: Wensong Tan. Tel: +86-21-64250948; Fax: +86-21-64252250; E-mail: wstan@ecust.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 20706016)资助。

果^[1]。LO-Tact-1 嵌合型单克隆抗体可减少急性排斥反应的发生,特别是对肾移植术后急性排斥反应的治疗具有很好的疗效^[2,3]。目前,我国用于抗移植免疫排斥治疗的抗体药物主要靠进口,费用相当昂贵。临床试验证明 LO-Tact-1 在抗急性免疫排斥反应、2 年存活率等方面都优于现有产品,其有望成为国内第一个用于器官移植领域、具有独立知识产权的嵌合型单克隆抗体药物,具有十分广阔的市场前景和巨大的经济价值。

此外,随着治疗性单克隆抗体的种类和需求量的日趋增多,与具有诸多优势的理想宿主 GS-NS0 细胞及其单克隆抗体表达过程相关的问题倍受研究者关注。以往的研究通常集中于针对特定 NS0 细胞株的无血清培养研究^[4]、过程设计与控制^[5,6]以及细胞凋亡^[7,8]等方面,但由于不同细胞株之间存在的生长代谢和产物表达差异,以及现有商业无血清培养基配方保密、组分复杂、价格昂贵等因素,因此针对表达 Anti-CD25 单抗的 GS-NS0 细胞的无血清培养和生长代谢特性研究成为其成功迈向产业化过程的一项必不可少的基础工作。

为此,本研究以由上海新生源医药研究有限公司和法国 Technopharm 公司合作开发的表达 Anti-CD25 的嵌合型单克隆抗体(即 LO-TACT-1)的 GS-NS0 细胞为研究对象,首先开发了适合其悬浮培养和抗体生产的无血清低蛋白培养基。通过批培养实验考察 GS-NS0 细胞在无血清低蛋白培养基中的生长代谢特性,并了解葡萄糖等重要底物消耗和代谢副产物积累对细胞生长、代谢和产物合成的影响,为 GS-NS0 骨髓瘤细胞培养和抗 CD25 抗体的工业化生产过程优化和放大奠定基础。另一方面,本研究对 GS 系统动物细胞生长代谢所取得的认识,也将对其他动物细胞培养过程和抗体、重组蛋白药物等产品工业化生产提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

实验所用细胞株为 GS-NS0 骨髓瘤细胞,分泌抗 CD25 嵌合型单克隆抗体 LO-Tact-1^[9],由上海新生源医药研究有限公司提供。

1.2 培养基

在 DMEM/F12(1:1)培养基的基础上,添加胰岛

素、转铁蛋白、胆固醇、碳酸氢钠、HEPES、Pluronic F68 等成分配制而成,化学成分明确,经 Millipore 公司 0.1 μm 微孔滤膜过滤除菌。所有培养基配制所用试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 细胞培养系统和培养方法

1.3.1 种子细胞培养

从细胞库中复苏 GS-NS0 种子细胞,以 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ cells/mL 活细胞密度接种于摇瓶中,置于 36.8°C、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,转速为 50 r/min,作为实验用的种子细胞。

1.3.2 摇瓶中的批培养

取对数生长期的 GS-NS0 细胞,经 1200 r/min 离心 5 min,弃去上清,用新鲜的批培养培养基悬浮细胞。以约 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL 的活细胞密度接种至摇瓶,培养体积为 60 mL,置于 36.8°C、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,转速为 50 r/min。培养过程中每隔约 12 h 取样,计数细胞,经 3000 r/min 离心 10 min 后取上清测量渗透压,并作生化分析。

1.3.3 反应器中的批培养

取对数生长期的 GS-NS0 细胞,经 1200 r/min 离心 5 min,弃去上清,用新鲜的批培养培养基悬浮细胞。以约 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL 的活细胞密度接种至反应器(2 L BIOSTAT B,德国 B.Braun 公司,在线监控软件 MFCS/win1.1),培养体积为 2 L。反应器操作条件: pH (7.0 \pm 0.1), DO 为 50% 空气饱和度,温度为 36.8°C,搅拌转速为 50 r/min。培养过程中每隔约 12 h 取样,计数细胞,经 3000 r/min 离心 10 min 后取上清测量渗透压,并作生化分析。

1.4 测定和分析方法

1.4.1 细胞计数

取样约 1.5 mL 置于 24 孔板内,吹打均匀后加入适量 0.4% 台盼蓝染色后,用血球计数板计数,每个样品计数 3 次,取平均值。

1.4.2 葡萄糖、乳酸和氨浓度测定

葡萄糖浓度采用 GOD-POD 葡萄糖试剂盒(上海生物制品研究所)测定。原理:葡萄糖经葡萄糖氧化酶氧化成葡萄糖酸,并产生过氧化氢,后者与苯酚及 4-氨基安替比林在过氧化物酶作用下产生红色化合物,该有色化合物在 505 nm 波长的吸光度与葡萄糖浓度成线性关系。操作按说明书进行。

乳酸浓度采用乳酸测定试剂盒(南京建成生物

工程研究所)测定。原理: 以 NAD^+ 为氢受体, LDH 催化乳酸脱氢产生丙酮酸, 使 NAD^+ 转化为 NADH , 与吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS)和氯化硝基四氮唑蓝(NBT)生成紫色呈色物, 在 530 nm 波长的吸光度与乳酸含量成线性关系。操作按使用说明书进行。

氨浓度采用改进的 Berthelot 尿素氮测定试剂盒(上海生物制品研究所)比色法测定, 不使用脲酶, 改用 5 mmol/L NH_4Cl 作为标准液。原理: 在碱性条件下, 氨经次氯酸氧化生成的氯胺与苯酚被硝基铁氰化钠催化生成蓝色的靛酚, 在 550 nm 波长的吸光度与氨含量成线性关系。操作按使用说明书进行。

1.4.3 氨基酸浓度测定

采用 Waters 公司提供的氨基酸测定试剂盒及 AccQ · Tag 方法, 反相高效液相色谱系统(1525 Binary HPLC pump, 717plus Autosampler, 2487 Dual λ absorbance detector, Nova-Pak C18 4 μm 3.9 mm \times 150 mm column, Waters)测定, 按使用说明书方法操作。

1.4.4 单抗浓度测定

采用 ELISA 酶联免疫吸附法测定^[10]。用包被液按滴度 1:200 稀释一抗鼠抗人 IgG1 重链单抗, 以 100 μL /孔加至 96 孔酶标板内, 37 $^\circ\text{C}$ 2 h 或 4 $^\circ\text{C}$ 过夜(16~18 h)。洗板 3 次, 用封闭液, 以 200 μL /孔加至板内, 37 $^\circ\text{C}$ 放置 2 h。将封闭好的酶标板洗板 3 次, 5 min/次。标准品和待检样品均以 100 μL /孔加至板内, 37 $^\circ\text{C}$ 放置 1 h。洗板 3 次, 5 min/次。用稀释液按滴度 1:500 稀释二抗 HRP-鼠抗人 Kappa 轻链, 以 100 μL /孔加至板内, 37 $^\circ\text{C}$ 1 h。洗板 10 次, 5 min/次。以 100 μL /孔加入底物 TMB 显色液, 室温显色 5 min, 以 50 μL /孔加入终止液终止反应。将酶标板放入酶标仪中, 选择 450 nm 为测定波长, 655 nm 为参比波长测定吸光度。所用单克隆抗体购自 Zymed 公司。

2 结果与讨论

2.1 混合脂添加剂对 GS-NS0 细胞生长的影响

NS0 骨髓瘤细胞通常为胆固醇营养缺陷型^[11], 虽然已有报道一些非胆固醇缺陷型的亚株能成功生长于无胆固醇的培养基中^[11-13], 但一般用于 NS0 细胞培养的培养基中需要加入胆固醇。

因此, 包含胆固醇的混合脂类添加剂是 NS0 骨髓瘤细胞无血清培养基特有的重要无血清添加物。

经过反复试验、筛选与优化, 最终形成编号为 NS0-I3 的混合脂添加剂(由胆固醇、维生素 E 等配制而成)。图 1 为商业混合脂添加剂 CLC(Gibco)和 NS0-I3 对 GS-NS0 细胞生长的影响。

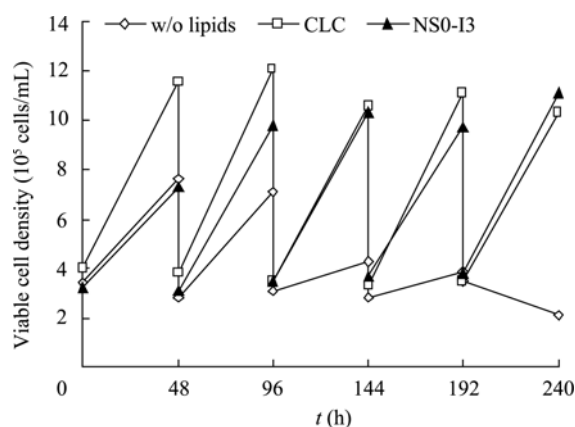


图 1 混合脂添加剂对 GS-NS0 细胞生长的影响
Fig. 1 Effect of complex lipids on GS-NS0 cell growth.

在不添加混合脂的培养中, 细胞生长受到严重影响, 比生长速率随着传代次数的增多逐渐下降, 直至最后变为负值。对比添加商业混合脂 CLC 和 NS0-I3 的培养过程, 细胞在添加 NS0-I3 的无血清培养基中第一代比生长速率略低, 经过一代适应后, 比生长速率基本达到添加商业混合脂 CLC 的无血清培养基水平, 约为 0.5 d⁻¹。

2.2 无血清低蛋白培养基开发

以 DMEM/F12 (1:1)为基础培养基, 添加血清替代物如胰岛素(Insulin)、转铁蛋白(Transferrin)、混合脂 NS0-I3 等组分, 形成了适合 GS-NS0 细胞悬浮培养和产物表达的无血清低蛋白培养基, 命名为 LP3.6。该培养基化学成分确定, 不含各类蛋白水解物, 仅含总量低于 10 mg/L 的胰岛素和转铁蛋白, 易于分离纯化。

图 2b 为在摇瓶中以 LP3.6 培养基培养 GS-NS0 的细胞形态, 由图可见, 细胞悬浮生长, 形态均一, 圆而通透, 轮廓清晰, 且不结团, 与商业无血清培养基(Excell 620 + 0.2% Primatone)中的细胞形态(图 2a)相近。LP3.6 无血清低蛋白培养基能较好地支持 GS-NS0 细胞生长与产物表达, 其在摇瓶中批培养的对数期平均比生长速率、最大活细胞密度和最大抗体浓度分别为 0.75 d⁻¹、3.47 \times 10⁶ cells/mL 和 307 mg/L, 较商业无血清培养基(Excell 620 + 0.2%

Primatone)分别提高了 114%、103%和 46%，培养周期缩短了 30%，过程效率大大提高(表 1)。

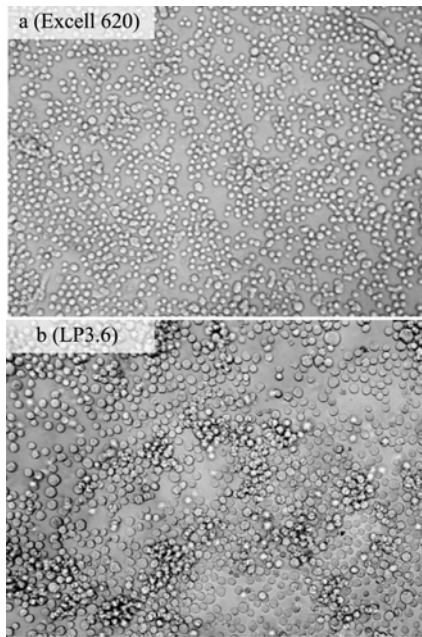


图 2 GS-NS0 细胞在 Excell 620 和 LP3.6 培养基中的形态
Fig. 2 Morphology of GS-NS0 cells cultivated in Excell 620 and LP3.6 (40 \times).

表 1 Excell620 和 LP3.6 培养基中细胞生长和产物表达
Table 1 Cell growth and antibody production in Excell 620 and LP3.6 media

	Excell 620	LP3.6
$X_{v \max}$ (10^6 cells/mL)	1.62	3.47
μ (1/d)	0.37	0.75
Duration (h)	168	117
IVC (10^9 cells \cdot d/L)	8.17	9.98
Max antibody concentration. (mg/L)	210	307

IVC was calculated until the viability decreased to approximately 50%.

2.3 GS-NS0 细胞的生长、代谢及抗体表达

2.3.1 细胞生长

图 3 所示为 GS-NS0 细胞在 2 L 生物反应器中的批培养细胞生长曲线。以 0.51×10^6 cells/mL 的活细胞密度接种至新鲜的 LP3.6 无血清培养基, 细胞活性为 91.7%, 基本未观察到延迟期, 细胞直接进入对数生长期。当培养至 91 h 时活细胞密度达到最大, 为 3.68×10^6 cells/mL, 此时的总细胞密度为 3.89×10^6 cells/mL。随后细胞进入衰亡期, 活细胞密度迅速下降。细胞在对数生长期的最大比生长速率为 0.85 d^{-1} , 平均比生长速率为 0.73 d^{-1} 。由图可见在活细胞密度达到最大值之前, 培养过程中的细胞活

性持续上升; 而当细胞进入衰亡期后, 细胞的活性则迅速下降。

2.3.2 葡萄糖代谢

在批培养的对数生长期内(15~58 h), 培养环境中的葡萄糖浓度变化较大, 如图 4 所示。细胞的葡萄糖比消耗速率和乳酸比生成速率也迅速下降。此阶段乳酸平均产率 $Y_{\text{Lac}/\text{Gluc}}$ 约为 $1.23 \text{ mmol}/\text{mmol}$ 。在此阶段细胞对葡萄糖的主要代谢去向分布基本保持不变, 理论上约有 60% 的葡萄糖经过糖酵解途径生成丙酮酸后, 在乳酸脱氢酶的作用下生成了代谢副产物乳酸。

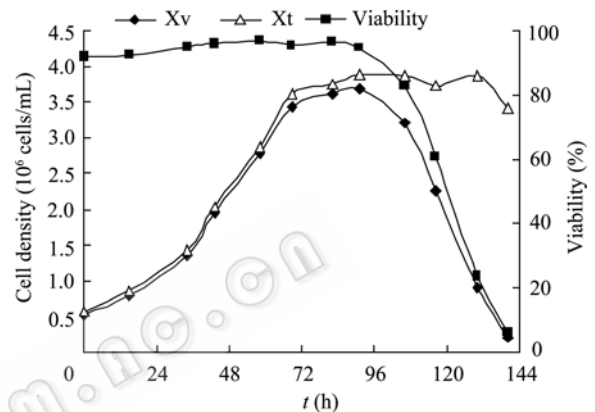


图 3 GS-NS0 细胞批培养的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of GS-NS0 cells in batch culture.

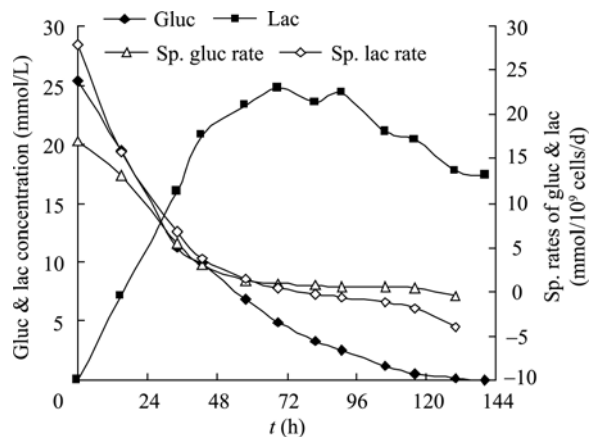


图 4 GS-NS0 细胞批培养中的葡萄糖与乳酸代谢

Fig. 4 Metabolism of glucose and lactate in batch culture of GS-NS0 cells.

对数生长期后期, 即培养至 69 h 后, 细胞的生长受到了影响, 比生长速率迅速下降。此时培养环境中的葡萄糖已消耗至 $5 \text{ mmol}/\text{L}$ 以下, 乳酸已不再生成, 开始消耗, 且消耗速率略有增大。此现象表明, 用于细胞生长的重要碳源和能源物质葡萄糖已供不

应求, 需通过消耗乳酸生成丙酮酸来补充葡萄糖供给的不足。

2.3.3 谷氨酸、谷氨酰胺及其他氨基酸代谢

对于 GS 系统的细胞而言, 培养环境中的谷氨酸是细胞重要的氮源物质和能源物质。谷氨酸一方面可在谷氨酰胺合成酶作用下合成细胞生长和产物合成所必需的谷氨酰胺; 另一方面, 经谷氨酸脱氢酶催化脱氢生成 α -酮戊二酸和氨, 或者和丙氨酸(或草酰乙酸)在转氨酶催化作用下生成 α -酮戊二酸和丙酮酸(或天冬氨酸)等非必需氨基酸, 生成的 α -酮戊二酸进入三羧酸循环。实验表明在 GS-NS0 细胞的培养基中加入谷氨酰胺, 有利于细胞生长与产物合成。因此, 在培养基中加入了适量的谷氨酰胺。图 5 为培养过程中谷氨酸、谷氨酰胺和其代谢副产物氨、丙氨酸的浓度变化。由图可以看出, 谷氨酸和谷氨酰胺浓度在培养过程中不断降低, 副产物氨的浓度虽然缓慢增加, 但在整个过程中氨浓度的变化并不显著, 培养结束时氨的最大浓度也不到 2 mmol/L。随着培养过程的进行, 当谷氨酰胺消耗到一定程度时, 参与细胞合成和抗体生成的谷氨酰胺可能一部分需要由谷氨酸合成, 同时会消耗一部分氨。过程中丙氨酸持续累积生成, 对数生长期结束时浓度为 1.90 mmol/L, 为初始的 1.5 倍, 终浓度达到了 3 mmol/L 以上。

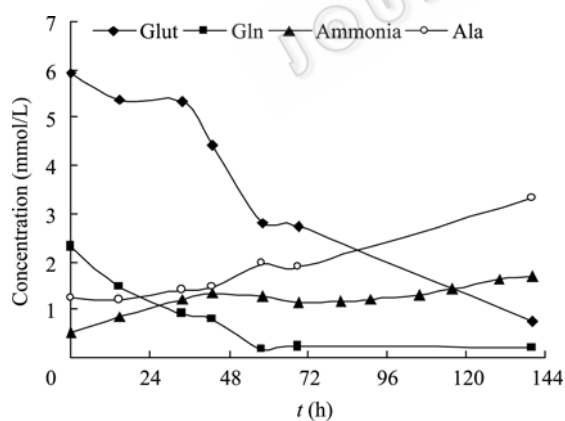


图 5 批培养过程中谷氨酸、谷氨酰胺、氨和丙氨酸的浓度变化

Fig. 5 Concentrations of glutamate, glutamine, ammonia, and alanine in batch culture.

在批培养的对数生长期谷氨酸的平均比消耗速率为 $0.91 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$, 谷氨酰胺的平均比消耗速率为 $0.58 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$ 。细胞在对数生长期结

束后, 谷氨酰胺已消耗至较低的浓度, 谷氨酰胺的比消耗速率也大幅下降, 此时由于细胞整体代谢活性的降低, 谷氨酸的比消耗速率也略有下降。

在参与 GS-NS0 细胞生长、代谢的氮源底物中, 除了谷氨酸和谷氨酰胺以外, 还包括必需氨基酸, 如酪氨酸(Tyr)、胱氨酸(Cys)、组氨酸(His)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、色氨酸(Trp)、缬氨酸(Val)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile), 以及可自主合成的非必需氨基酸, 如丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)。图 6 为批培养过程中其他氨基酸的浓度变化, 在批培养对数生长期结束时, 并没有出现氨基酸耗尽的现象, 在整个培养过程中大部分氨基酸的浓度在对数生长期期间迅速下降, 对数生长期后直至培养结束这一阶段浓度变化缓慢或维持不变, 而脯氨酸有所生成。

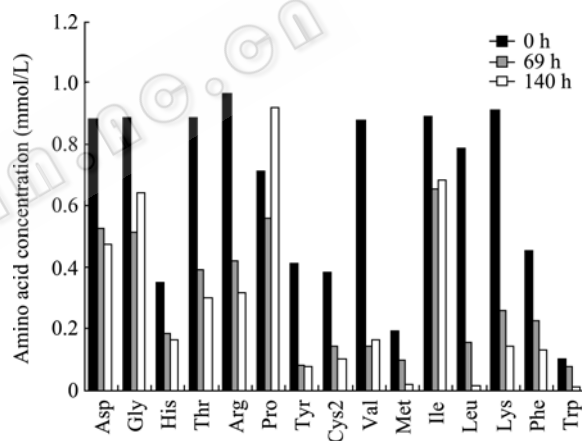


图 6 批培养过程中的其他氨基酸浓度变化

Fig. 6 Concentrations of amino acids in batch culture.

表 2 为批培养过程中氨基酸在对数生长期的平均比消耗速率。可以看出, 在这些氨基酸中除谷氨酸和谷氨酰胺外, 苏氨酸、精氨酸、缬氨酸、亮氨酸和赖氨酸的比消耗速率较大, 平均比消耗速率均大于 $0.15 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$, 在后续过程优化中应适量添加。另外, 丙氨酸的比生成速率较大, 为 $0.23 \text{ mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$ 。

2.3.4 抗体生成

在批培养过程中抗体浓度随批培养的进行不断增加, 特别是在 69 h 后, 即对数生长期结束后, 细胞开始维持直至进入衰亡期, 抗体浓度仍在持续增加, 至批培养结束时抗体浓度达到 301 mg/L。以抗

体累积生成量为纵坐标, 活细胞对时间的积分值 IVC 为横坐标作图(图 7), 进行线性拟合, 发现具有良好的线性($R^2 = 0.9826$), 斜率即为抗体的比生成速率, 约为 $24.4 \text{ mg}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$ 。说明此 GS-NS0 细胞表达抗 CD25 嵌合型单克隆抗体与细胞生长是不相关的, 细胞在此批培养期间具有恒定的抗体比生成速率。在抗体比生成速率不变的前提下, 抗体的最终浓度与活细胞对时间的积分值(IVC)成正比, 即过程优化中提高活细胞密度和延长培养时间均会对最终的抗体浓度起到积极的作用。

表 2 批培养过程中氨基酸的比消耗速率

Table 2 Specific rates of amino acids in batch culture

Amino acids	Sp. rate	Amino acids	Sp. rate
Asp	0.131	Arg	0.189
Glut	0.913	Ala	-0.225
Gly	0.142	Pro	0.084
Gln	0.575	Tyr	0.088
Met	0.059	Lys	0.207
Ile	0.051	Phe	0.072
Lue	0.167	Trp	0.022
His	0.053	Cys2	0.100
Thr	0.193	Val	0.188

Unit: $\text{mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$.

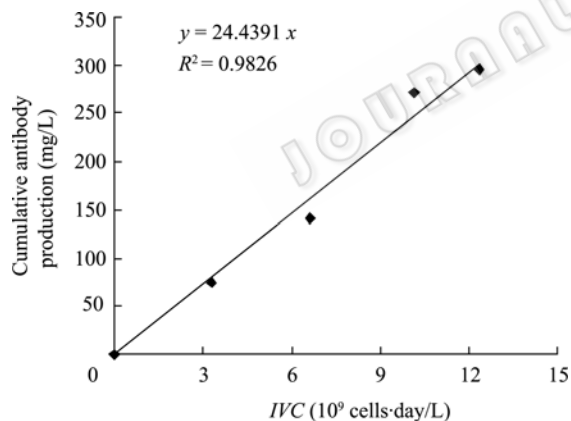


图 7 批培养过程中的抗体累积生成量与 IVC 的关系
Fig. 7 Relationship of cumulative antibody production and IVC in batch culture.

2.3.5 批培养过程中初始葡萄糖浓度对 GS-NS0 细胞生长与代谢的影响

在 2 L 反应器中进行了不同初始葡萄糖浓度的批培养实验, 通过考察葡萄糖浓度对细胞生长和代谢的影响, 以期对 GS-NS0 细胞的生长代谢特性有更进一步的认识。初始葡萄糖浓度分别为 15 mmol/L

(Batch-1)、 24 mmol/L (Batch-2)和 66 mmol/L (Batch-3), 培养基中氨基酸均较为充足, 三批批培养结束时氨基酸均未构成限制。由于三批批培养葡萄糖和氨基酸浓度差别较大, 为了排除渗透压对细胞生长和代谢的影响, 配制时在保持培养基中钠钾比的同时适当调整 NaCl 和 KCl 的含量, 使三批批培养的培养基具有相同渗透压。

各批批培养中细胞的生长、代谢和产物表达的特征参数如表 3 所列。在 Batch-1 中, 对数生长期内葡萄糖已耗尽, 因此对细胞生长构成了严重限制, 活细胞密度只有 $1.72 \times 10^6 \text{ cells/mL}$; 在 Batch-2 中, 对数生长期中后期葡萄糖浓度已消耗至较低的水平, 对细胞生长造成一定影响; 而在 Batch-3 中, 葡萄糖浓度始终较高, 未对细胞生长产生限制作用, 活细胞密度达到 $4.26 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 。在各批培养过程中, 由于其他氨基酸均未构成限制, 因此较高的葡萄糖初始浓度能够支持生长的活细胞密度也最高。

表 3 各批批培养的细胞生长、代谢和产物表达

Table 3 Growth, metabolism, and antibody production of GS-NS0 cells in batches

	Batch-1	Batch-2	Batch-3
X_{vmax} (10^6 cells/mL)	1.72	3.68	4.26
μ (1/d)	0.66	0.73	0.81
IVC ($10^9 \text{ cells}\cdot\text{d/L}$)	3.80	11.28	9.00
Max antibody conc. (mg/L)	102.5	301.1	253.9
q_{Gluc} ($\text{mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$)	7.63	7.18	5.47
q_{Lac} ($\text{mmol}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$)	11.13	9.32	14.42
$Y_{\text{Lac/Gluc}}$ (mmol/mmol)	1.46	1.30	2.83
q_{Antibody} ($\text{mg}/(10^9 \text{ cells}\cdot\text{d})$)	24.1	24.4	24.1

在各批培养过程中虽然葡萄糖浓度相差较大, 但对数生长期内细胞的平均比生长速率基本相同。图 8 为各批培养实验中葡萄糖浓度对 GS-NS0 细胞比生长速率的影响。由图可以看出, 当葡萄糖浓度大于 6 mmol/L 时, GS-NS0 细胞在对数生长期的比生长速率基本保持稳定, 约为 $0.66 \sim 0.81 \text{ d}^{-1}$ 。而当其浓度低于 6 mmol/L 时, 细胞的比生长速率明显下降。

在批培养过程中葡萄糖浓度持续变化, 细胞代谢也不断调整, 尽管三批批培养对数生长期的葡萄糖浓度有显著差异, 但葡萄糖比消耗速率相近(图 9),

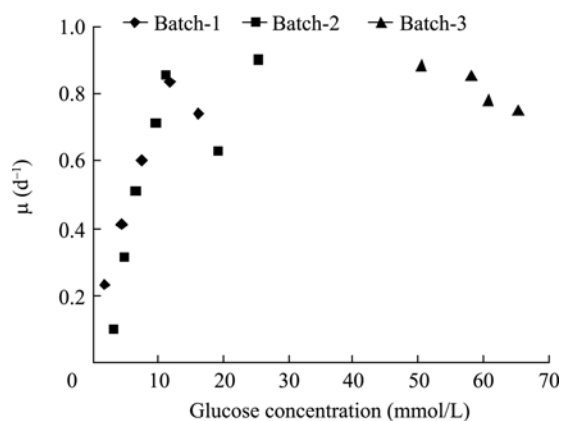


图 8 葡萄糖浓度对 GS-NS0 细胞比生长速率的影响
Fig. 8 Effect of glucose concentration on specific growth rate of GS-NS0 cells.

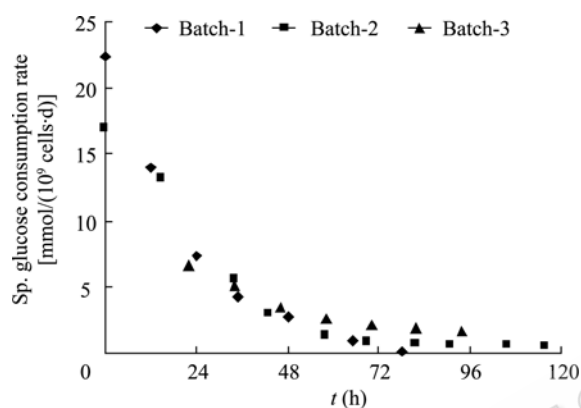


图 9 葡萄糖浓度对葡萄糖比消耗速率的影响
Fig. 9 Effect of glucose concentration on specific glucose consumption rate.

对数生长期的葡萄糖平均比消耗速率为 5.47~7.63 mmol/(10⁹cells·d), 说明葡萄糖浓度对 GS-NS0 细胞葡萄糖比消耗速率的影响不显著。

另外, 在葡萄糖初始浓度最高的批培养 (Batch-3) 实验中, 对数生长期乳酸的平均比生成速率最大, 为 14.42 mmol/(10⁹cells·d)。Batch-1 和 Batch-2 实验中葡萄糖浓度低于 24 mmol/L, 在此范围内乳酸产率相近, 为 1.30~1.46 mmol/mmol 之间; 而 Batch-3 中葡萄糖浓度最高, 始终大于 30 mmol/L, 乳酸产率大于 2, 约为 Batch-1 和 Batch-2 的 2 倍, 说明除大量的葡萄糖进行不完全氧化转化为乳酸外, 由其他氨基酸生成的中间代谢物丙酮酸未进行完全氧化, 一部分从生成乳酸途径溢出。Batch-3 对数生长期结束时乳酸已积累至 47.7 mmol/L, 过多的乳酸积累及其带来的培养环境恶化可能是导致细胞迅速进入衰亡期的原因。因此虽然其他氨基酸并未构成

限制, 葡萄糖也有充分富余, 但 Batch-3 的最大活细胞密度并未比 Batch-2 中显著提高, 甚至其单位体积活细胞对时间的积分 IVC 值还低于 Batch-2。

在各批培养实验中, 抗体的比生成速率接近, 约为 24 mg/(10⁹cells·d), 培养上清中的抗体浓度与 IVC 值成正比, 因此批培养中 IVC 值最高的 Batch-2 实验, 最大抗体浓度也最高, 为 301 mg/L, 葡萄糖浓度对抗体比生成速率没有影响。

3 结论

GS-NS0 细胞无血清培养需添加富含胆固醇的混合脂, 在此基础上形成的低蛋白无血清培养基 LP3.6, 化学成分确定, 不含蛋白水解物, 蛋白总含量不超过 10 mg/L, 能较好地支持 GS-NS0 的生长与抗体表达。

GS-NS0 细胞的培养过程与传统的杂交瘤细胞和 CHO 细胞明显不同, 特别是代谢副产物氨的积累显著减少, 这一特点决定了在 GS-NS0 细胞培养过程中副产物氨的积累将不再是导致培养结束的主要抑制因素。因此, 在过程控制中不必对谷氨酸、谷氨酰胺等氨的主要来源物质进行严格的限制。由于当葡萄糖浓度低于 6 mmol/L 时, 细胞生长会受到影响, 为了获得较高的活细胞密度, 葡萄糖浓度应控制在 6 mmol/L 以上。在对数生长期, 初始葡萄糖浓度对细胞的葡萄糖比消耗速率影响不显著, 而且在葡萄糖浓度低于 24 mmol/L 的范围内, 乳酸产率基本恒定。然而, 过高的葡萄糖浓度 (>30 mmol/L) 会导致更多的葡萄糖进行不完全氧化转化为代谢副产物乳酸, 加速培养环境的恶化。

在批培养过程中抗 CD25 抗体的比生成速率基本恒定, 不受葡萄糖浓度的影响, 约为 24 mg/(10⁹cells·d), 培养过程的 IVC 值成为决定最终抗体浓度的关键因素, 因此提高培养过程的活细胞密度并维持更长的培养时间, 可望进一步提高抗体产物的浓度。

REFERENCES

- [1] Hiesse C, Lantz O, Kriaa F, *et al.* Treatment with Lo-Tact-1, a monoclonal antibody to the interleukin-2 receptor, in kidney transplantation. *Presse Med*, 1991, 20(40): 2036-2038.

- [2] Hiesse C, Kriaa F, Alard P, *et al.* Prophylactic use of the IL-2 receptor specific monoclonal antibody LO-Tact-1 with cyclosporin A and steroids in renal transplantation. *Transpl Int*, 1992, **1**: 444-447.
- [3] Reding R, Feyaerts A, Vraux H, *et al.* Prophylactic immunosuppression with anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody LO-Tact-1 versus OKT3 in liver allografting. A two-year follow-up study. *Transplantation*, 1996, **61**(9): 1406-1409.
- [4] Spens E, Haggstrom L. Defined protein-free NS0 myeloma cell cultures: Stimulation of proliferation by conditioned medium factors. *Biotechnol Prog*, 2005, **21**: 87-95.
- [5] Zhou WC, Chen CC, Buckland B, *et al.* Fed-batch culture of recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **55**: 783-792.
- [6] Burky JE, Wesson MC, Young A, *et al.* Protein-free fed-batch culture of non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **96**(2): 281-293.
- [7] Lengwehasatit I, Dickson AJ. Analysis of the role of GADD153 in the control of apoptosis in NS0 myeloma cells. *Biotechnol Bioeng*, 2002, **80**(7): 719-730.
- [8] O'Connor KC, Muhitch JW, Lacks DJ, *et al.* Modeling suppression of cell death by Bcl-2 over-expression in myeloma NS0 6A1 cells. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**(23): 1919-1924.
- [9] Huang YB, Zhang Y, Sun JR, *et al.* An immunosuppressant: Anti-CD25 chimeric monoclonal antibody: CN101210049. 2008-07-02.
黄阳滨, 张翊, 孙九如, 等. 一种免疫抑制剂-抗 CD25 嵌合单克隆抗体: CN101210049. 2008-07-02.
- [10] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of The People's Republic of China. 2005 Ed., Volume III. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: Appendix 47-48.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 年版三部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 47-48.
- [11] Keen MJ, Steward TW. Adaptation of cholesterol-requiring NS0 mouse myeloma cells to high density growth in a fully defined protein-free and cholesterol-free culture medium. *Cytotechnology*, 1995, **17**: 203-211.
- [12] Birch JR, Boraston RC, Metcalfe H, *et al.* Selecting and designing cell lines for improved physiological characteristics. *Cytotechnology*, 1994, **15**: 11-16.
- [13] Hartman TE, Sar N, Genereux K, *et al.* Derivation and characterization of cholesterol-independent non-GS NS0 cell lines for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **96**(2): 294-306.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

动物遗传育种与克隆的分子生物学基础研究

李宁 朱作言等 著

978-7-0-023246-5 ¥86.00 2009年6月 出版

内容简介

本书介绍了“973”计划项目“农业动物遗传育种与克隆的分子生物学基础研究”的研究成果,内容包括:肉、奶产量及其品质性状主基因的分离、克隆、测序、定位分析和性状基因的表达调控,农业动物杂种优势的分子机理和分子遗传标记辅助选择改良机理的研究进展,以及体细胞克隆胚核质互作中细胞核活动规律、农业动物克隆繁殖的分子生物学机理的研究成果。这些重大科学问题的阐明,将为我国在21世纪的动物农业提供高产、优质、高效发展的遗传理论基础和高新技术。

本书可作为农业院校动物遗传育种专业和综合性大学动物科学相关专业研究生的参考用书,也可供以动物为研究对象的科研院所的研究人员参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文字 联系电话:010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目