

## 全人源抗 VEGF165 单克隆抗体培养工艺的研究

李昕然<sup>1</sup>, 刘睿<sup>2</sup>, 刘方堃<sup>2</sup>, 刘煜<sup>1\*</sup><sup>(1)</sup>中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 生命科学与技术学院, 南京 210009;<sup>(2)</sup>江苏先声药业有限公司, 南京 210042)

**摘要** 为研究一种表达全人源抗 VEGF165 单克隆抗体(HVAB)的重组 DG44 细胞的培养工艺。在摇瓶培养阶段, 利用常见的流加和分阶段温度控制培养的方法, 初步确定培养工艺。在生物反应器培养阶段, 研究了不同 pH 范围对 DG44 细胞生长和单克隆抗体表达的影响。结果表明, 通过补料可使 HVAB 表达量从 101 mg/L 提高到 654 mg/L; 通过在生长中期的适当降温, 使细胞终活性保持在 80% 以上; pH 控制范围 6.4~7.4 更适合 DG44 细胞的生长和 HVAB 表达。反应器中的抗体表达量为 526 mg/L, 与对照摇瓶相比降低了 11%, 为之后的中试研究奠定了工艺基础。

**关键词** DG44 细胞; 生物反应器; 全人源单克隆抗体; 悬浮培养; 工艺优化

**中图分类号** TQ460.6 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)06-0734-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150617

## Culture process for fully human anti-VEGF165 monoclonal antibody

LI Xinran<sup>1</sup>, LIU Rui<sup>2</sup>, LIU Fangkun<sup>2</sup>, LIU Yu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Sincere Pharmaceutical Group, Nanjing 210042, China

**Abstract** This study was focus on the optimizing cell culture process of recombinant DG44 cells which expressing novel fully human anti-VEGF165 monoclonal antibody(HVAB). Feed-batch culture and two-phase temperature control were studied for optimizing the HVAB productivity in shaken flasks. The influences of pH changes were determined to study the growth of DG44 cell and expression of HVAB in bioreactors. The HVAB productivity was rose from 101 mg/L to 654 mg/L after feed-batch culture in shaken flask, and cell viability maintained above 80% after reduce the temperature in middle growth phase. It is also suggested that pH range at 6.4-7.4 is beneficial to DG44 cells growth and HVAB expression. The productivity in bioreactor is 526 mg/L decreased 11% compare with in shaken flask, which laid an foundation for further pilot scale production.

**Key words** DG44 cells; bioreactor; fully human monoclonal antibody; suspension culture; process optimization

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA02A303) and China National Key High-Tech Innovation Project for R&D of Novel Drugs (No. 2013ZX09301303-004)

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能直接作用并促进血管内皮细胞的增殖, 增加血管新生<sup>[1]</sup>。肿瘤组织生长必须依靠新血管生成来维持足够的氧气和营养物质, 是针对 VEGF 临床应用的基础; VEGF 为肿瘤血管生成最有效的促进因子, 肿瘤组织中 VEGF 表达显著增

加, 而增加的 VEGF 又会促进肿瘤的生长和转移<sup>[2]</sup>。贝伐单抗(bevacizumab, 商品名: Avastin)是抗 VEGF 的人源化单克隆抗体, 能够结合多种 VEGF-A 亚型抑制 VEGF 作用, 使肿瘤细胞不能得到足够养分和氧气, 从而达到治疗的作用<sup>[3]</sup>。

目前, 哺乳动物细胞是表达单克隆抗体最主要

的宿主之一,但其在工业生产中仍存在成本高、产量低等缺点。动物细胞培养技术从培养条件的角度出发,改善细胞的生长、目的蛋白表达和修饰,最终达到提高表达量、产品合格稳定等目的。无血清细胞培养技术具有安全性好、过程便于监测、技术稳定可靠、工艺放大可操作等优点,为众多生物制药企业所青睐<sup>[4-6]</sup>。

细胞培养工艺放大是抗体规模化生产的关键技术,其目的是实现实验室规模与生产规模的对接。目前细胞系表达能力可超过每天每个细胞 20 pg;流加培养工艺中可达到每毫升  $2 \times 10^7$  个细胞密度,最高表达量约 10 g/L,培养体积最高可达 20 000 L。现今,细胞培养工艺研发的重点已从单纯提高表达量发展到产品质量及工艺放大过程的一致性等方面<sup>[7]</sup>。

本研究旨在从多角度对一种表达全人源抗 VEGF 单克隆抗体(HVAB)<sup>[8]</sup>的 DG44 细胞进行培养条件的优化,在摇瓶阶段确定工艺,并在 3L 生物反应器中进行了放大研究,为中试规模制备 HVAB 奠定了工艺基础。

## 1 材料

### 1.1 试剂和细胞

CDM4 CHO、Cell Boost 5(美国 Hyclone 公司);谷氨酰胺(美国 Gibco 公司);锥虫蓝、Pluronic F-68、NaHCO<sub>3</sub>(美国 Sigma 公司)。其余试剂均为市售分析纯。

CHO DG44 细胞株由无锡奥巨生物科技有限公司构建,本实验室保存。

### 1.2 仪器

全自动细胞计数仪(Count Star);生化分析仪(美国 Nova Biomedical 公司);冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);高效液相色谱仪 1200(安捷伦科技上海有限公司);3L 生物反应器(荷兰 Applikon 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞传代培养

取 DG44 细胞,按每毫升  $5 \times 10^5$  个接种于含 4 mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L MTX 的 CDM4 培养基中,将 125 mL 摇瓶置于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,100 r/min 的摇床中悬浮培养,2~3 d 传代 1 次,培养

体积为 30 mL<sup>[6]</sup>。

### 2.2 补料浓度对细胞生长的影响

将培养至对数生长期的 DG44 细胞按每毫升  $5 \times 10^5$  个分别接种于 5 个含 4 mmol/L 谷氨酰胺的 CDM4 培养基中,初始培养体积为 30 mL,从第 3 天开始补 Cell Boost 5,浓度分别为初始体积的 1%~5%。培养条件为 37 ℃,5% CO<sub>2</sub>,100 r/min。

### 2.3 温度对细胞生长的影响

将培养至对数生长期的 DG44 细胞按每毫升  $5 \times 10^5$  个接种于含 4 mmol/L 谷氨酰胺的 CDM4 培养基中,初始培养体积为 30 mL,从第 3 天开始补 Cell Boost 5,浓度为初始体积的 4%。培养条件为初始温度 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、100 r/min。分别于第 4 天、第 6 天、第 8 天将温度降至 30 和 33.5 ℃。

### 2.4 pH 对细胞生长的影响

将培养至对数生长期的 DG44 细胞按每毫升  $5 \times 10^5$  个分别接种于 2 个含 4 mmol/L 谷氨酰胺的 CDM4 培养基中,初始培养体积为 200 mL,从第 3 天开始补 Cell Boost 5,浓度为初始体积的 4%。培养条件为 37 ℃到第 6 天降至 33.5 ℃,5% CO<sub>2</sub>,搅拌速度为 200 r/min,40% 溶氧。pH 范围分别为 6.8~7.4、6.4~7.4。

### 2.5 细胞计数与活性测定

取细胞培养液 50 μL,与 0.2% 锥虫蓝按 1:1 充分混合。取 20 μL 至全自动细胞计数仪中计数<sup>[8]</sup>。

### 2.6 葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、氨浓度的测定

取样后,放入生化分析仪自动检测葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、氨浓度的测定。

### 2.7 HVAB 表达检测

收获细胞培养液,进行 4 000 r/min 离心取上清液。培养上清液经 Protein-A 亲和色谱柱(Porosa/20)进行分析,用积分方法获取峰面积,通过与 IgG1 标准品进行峰面积比对,对样品的 HVAB 浓度进行定量,具体方法参见文献<sup>[9]</sup>。

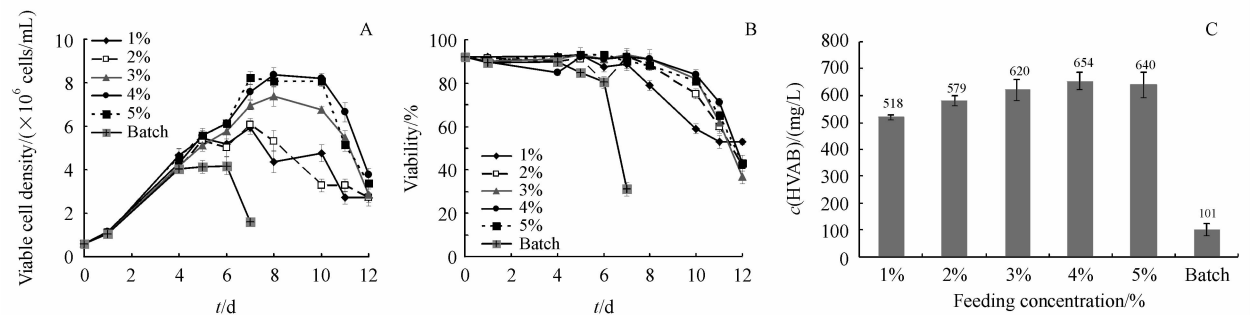
## 3 结果

### 3.1 补料浓度对细胞生长和 HVAB 的表达量影响

补料的加入无论是对细胞密度的积累、活性的保持以及最终 HVAB 的产量都有明显的促进作用,见图 1。补料浓度从 1%~4% 对细胞的生长及

产物的积累都有明显的促进作用,4%的补料浓度下最高达 654 mg/L,表明 1%~3%的补料浓度不能满足 DG44 细胞在持续生长阶段的营养需求。5%的补料浓度与4%相比,在第7天时5%的细胞明显积累得更快,更先进入平台期。然而到第11天其细胞密度及活性下降得更快。从抗体产量上

看,5%比4%的产量不升反降,说明更高的补料浓度不仅不能起到更多营养补充的作用,反而会对细胞的生长维持及表达有一定的抑制作用。通过比较发现,4%的补料浓度最适合本细胞株的生长和表达,最终通过补料,表达量从 101 mg/L 提高到了 654 mg/L( $P<0.05$ )。

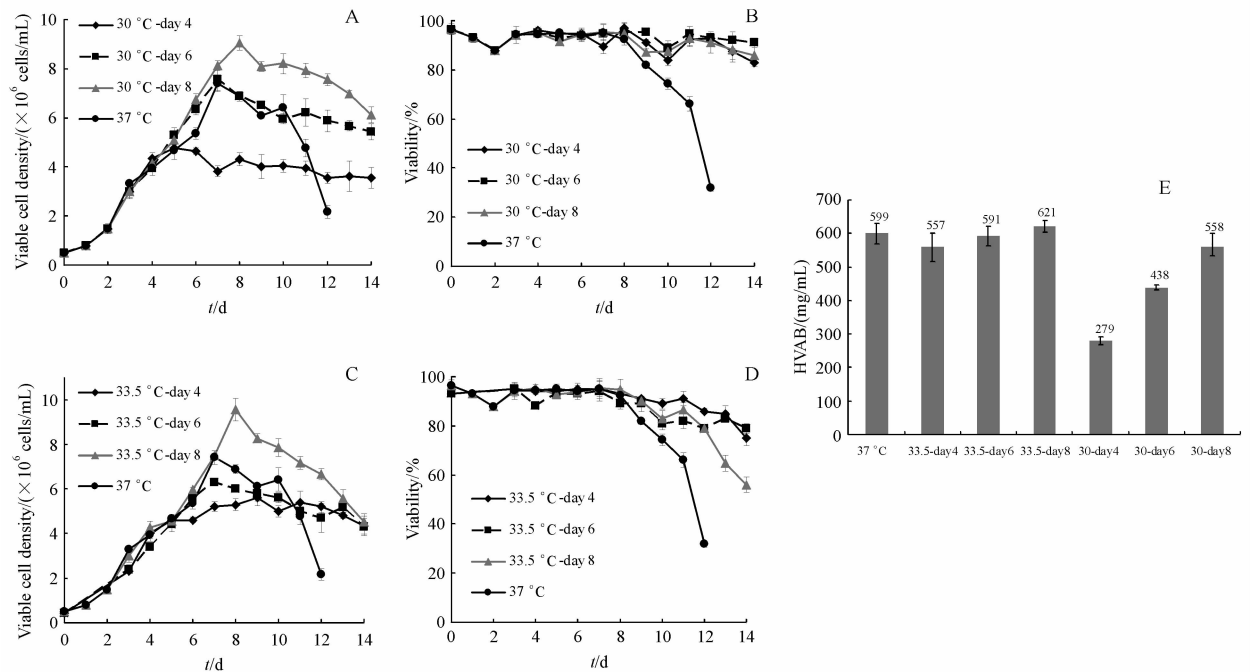


**Figure 1** Effect of various feeding concentration on the growth curves (A), viability curves (B) and target protein expression levels (C) of DG44 cells in fed-batch cultures ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

3.2 温度对细胞生长和 HVAB 的表达量影响

降温对维持细胞密度和保持细胞活性方面有明显作用,因此本研究将培养周期延长至 14 d,见图2。降温条件下,培养至第 14 天细胞活性均可保持在 80% 以上。但从表达量上来看,通过与 37 °C 恒温培养对照组进行比较,降温的效果不够理想,温度的降

低虽然保持了细胞的高密度和高活性,但也同时降低了细胞的代谢和表达,所以在表达量方面没有促进作用。在第6天降温至 30 °C,明显在保持密度的同时,降低了细胞的表达能力,最高仅为 559 mg/L。将温度降至 33.5 °C 的条件下,表达量基本保持不变 (591 mg/L),且能保持较高的细胞活性。



**Figure 2** Effect of various temperature on the growth curves (A,C), viability curves (B,D) and target protein expression levels (E) of DG44 cells in fed-batch cultures ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A and B Cell culture condition; Reduce the temperature to 30 °C in day 4, day 6, day 8; C and D Cell culture condition; Reduce the temperature to 33.5 °C in day 4, day 6, day 8

3.3 pH 对细胞生长和 HVAB 的表达量影响

两个反应器的细胞密度高于对照摇瓶,说明反应器条件下更易于细胞的积累(图 3)。pH 范围在 6.8~7.4 条件下,第 9 天,细胞密度和活性开始明显不断下降,说明将 pH 维持在 6.8 以上不宜于细胞密度和活性的维持。pH 在 6.4~7.4 范围,细胞生长情况良好,最高密度达每毫升  $8.66 \times 10^6$  个,细胞活性保持在 80% 以上。从表达量来看,反应器的表达量与其细胞密度的积累呈正相关,分别为 480 和 526 mg/L,低于对照摇瓶 591 mg/L。在工

艺放大研究过程中,培养体积的成倍增长使培养必须在生物反应器中进行。生物反应器与摇瓶的培养环境存在一定的差异,也更为复杂,从摇瓶到反应器的放大,最终的表达量往往存在一定的波动。从摇瓶表达量 591 mg/L 到反应器 526 mg/L,表达量降低了 11%,在 30% 的可接受范围内,符合工艺放大的规律。通过生长情况和表达量的比较,6.4~7.4 的 pH 范围更适合此细胞株的生长和表达,说明该细胞株更适合在偏酸的环境下生长和表达蛋白。

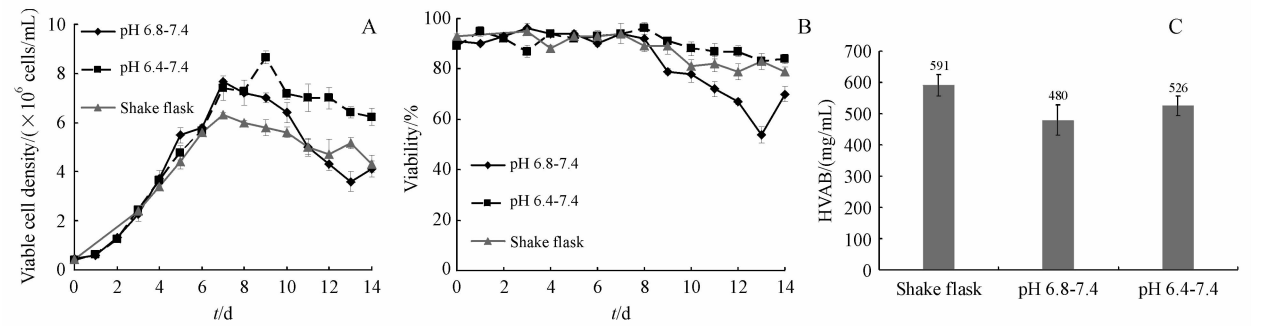


Figure 3 Effect of various pH on the growth curves (A), viability curves (B) and target protein expression levels (C) of DG44 cells in 3L bioreactor ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

在整个培养过程中,葡萄糖在 2~11 g/L 之间波动(图 4),处在一个合理的范围内。0~3 d,由于没有补料的原因,基础培养基中的葡萄糖被大量消耗。从第 3 天开始补料到第 8 天,葡萄糖的浓度逐渐升高,说明补料中葡萄糖的量大于细胞消耗的量。8~14 d 为细胞生长的中后期,此阶段为抗体积累的黄金时期,葡萄糖浓度再次减少说明此时细胞消耗大量的葡萄糖以满足表达的需要。整个培养过程中 pH 6.8~7.4 反应器消耗了更多的葡萄糖,

相应产生了更多的乳酸。pH 以第 3 天为分界点,其中一个反应器降至 6.8 以下,另一个保持在 6.8。乳酸的积累也产生了相应的差异。这说明 DG44 细胞在 pH 6.8 及以上的环境下会持续产生乳酸,而 pH 6.8 以下则不会。在 pH 6.8~7.4 培养条件下,乳酸积累的量在 0~2.5 g/L 之间符合工业在生产的控制范围(0~4.5 g/L)。氨浓度在 0~10 mmol/L 范围内符合的标准,不会对细胞产生太大的负面影响。

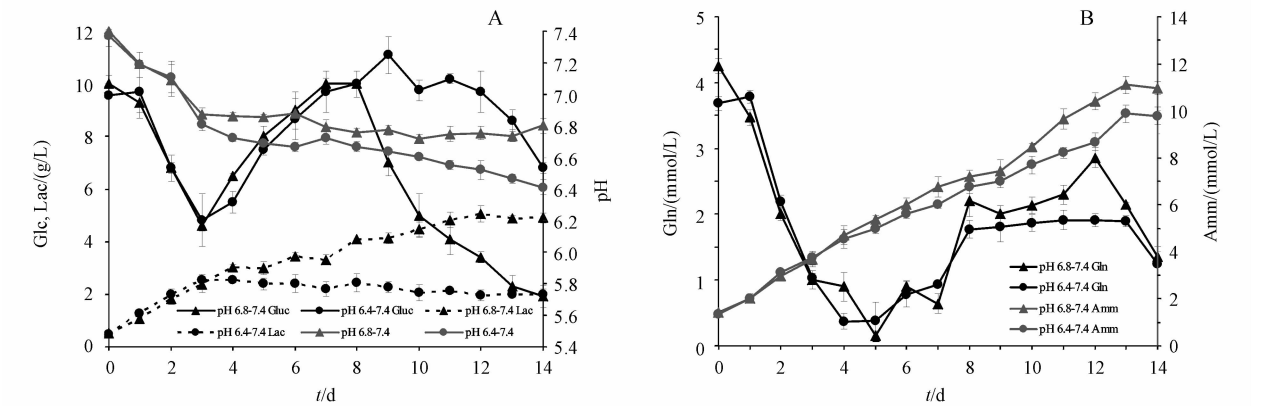


Figure 4 Effect of various pH on the nutrients, metabolite of medium in 3L bioreactor ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
A: Glucose (Glc), lactate (Lac) and pH at various pH for culture in 3 L bioreactor; B: Glutamine (Gln) and ammonia (Amm) at various pH for culture in 3 L bioreactor

## 4 讨论

培养基不仅影响细胞生长和产物合成,同时影响着成本的投入以及性价比,因此培养基是整个发酵过程中最昂贵的一项投入<sup>[10]</sup>。国外有文献报道,通过补料的方式可以给细胞提供保护,最终提高细胞密度及蛋白表达量<sup>[11]</sup>。本研究中,本课题组首先进行了每日补料浓度实验。结果表明,4%补料浓度条件下,细胞密度和表达量最高,分别为每毫升 $8.37 \times 10^6$ 个细胞和654 mg/L。过高的补料浓度不利于细胞的生长和表达,这可能由于高营养浓度提高了细胞培养环境的渗透压所致。

文献报道,细胞在36.5~38.5℃时生长活跃,降温会降低细胞的增殖速率<sup>[12]</sup>。通过培养中后期适当的降温可以延长培养时间,提高蛋白产量。之前研究发现,非降温条件下第8天的细胞密度达到最大值。因此选第4、6、8天作为降温点,同时选取30和33.5℃作为降温温度。结果表明,降温对细胞的增殖及凋亡速率均能起到抑制作用,在生长后期能维持较高的细胞密度,从而提高整体细胞密度。但在本研究中,降温虽然提高了DG44的整体细胞密度,同时也减少了单个细胞的表达,最终并没有通过提高整体细胞密度的途径提高抗体的表达量,与Zeng<sup>[13]</sup>的研究结果相符。近年来,动物细胞大规模培养技术开始广泛应用于生物医药的研发和生产过程中。其中以生物反应器技术为核心的动物细胞大规模培养平台,成为生物医药产业高速发展的有力推动工具<sup>[14]</sup>。pH是细胞在生物反应器中生长和表达的关键化学参数。有研究表明,DG44细胞对pH的变化非常敏感,pH偏低或偏高都会对细胞产生较大的影响<sup>[15]</sup>。由此看来,pH控制在一个合理的范围内显得尤为重要。从本研究的结果来看,pH 6.4~7.4的范围明显要更适于DG44细胞的生长和表达。通过检测代谢产物,当pH在6.8以上时细胞会不断的产生乳酸。乳酸的积累对细胞的生长和表达有较大的副作用,这可能是造成pH 6.8~7.4条件下抗体表达量较低的原因。通过检测葡萄糖、谷氨酰胺和氨的浓度变化,其浓度均在合理范围内,不会对细胞的生长造成限制。通过与对照摇瓶比较,生物反应器中细胞生长更好达每毫升 $8.66 \times 10^6$ 个细胞,而表达量却降低了65 mg/L。这可能是由于反应器中培养环境更

为复杂造成的,如搅拌桨会对细胞造成剪切力。其次,深层通气产生的气泡在培养基表层破裂时,同样会对细胞造成不利的影响,而这些现象不会出现在摇瓶培养中。综上所述,在工艺放大过程中,一定范围内表达量的流失为正常现象。本研究的损失率(11%)在现阶段来看属可接受范围。

本实验在摇瓶阶段分别研究了补料浓度和温度对DG44细胞株的生长情况和表达量的影响,初步确定摇瓶工艺,并进行了3L反应器的工艺放大研究,表达量符合工艺放大规律,证明该细胞株在放大培养中稳定,为之后的中试研究奠定了工艺基础。

## 参考文献

- [1] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2009,**29**(6):789-791.
- [2] Chen G, Li J, Cui WY, et al. Construction of eukaryotic expression vector for mouse-human chimeric antibody against vascular endothelial growth factor in CHO DG44 cells[J]. *Chin J Biotechnology*(中国生物制品学杂志),2014,**27**(11):1394-1399.
- [3] Dai F, Shu L, Bian Y, et al. Safety of bevacizumab in treating metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of all randomized clinical trials[J]. *Clin Drug Investig*,2013,**33**(11):779-788.
- [4] Wang XN, Wang LH, Gao P. The advantages, characteristics and experimental study for animal cells in serum-free culture medium[J]. *Asia-Pacific Tradit Med*,2009,**5**(2):21-23.
- [5] Xu J, Wang D, Liu Y, et al. Serum-free medium optimization based on trial design and support vector regression[J]. *Biomed Res Int*,2014,2014:269305. doi:10.1155/2014/269305.
- [6] Wang D. The effect of silkworm 30kc6 gene for CHO cell expressing VEGF mAb(家蚕30kc6基因对CHO细胞表达VEGF单克隆抗体影响的研究)[D]. Nanjing: China Pharmaceutical University,2014.
- [7] Guo JY. Development and optimization of the serum-free medium for CHO DG44 stable cell line(CHO DG44稳定细胞株无血清培养基的研发与优化)[D]. Xiamen: Xiamen University,2014.
- [8] Liu Y, Yun J, Chen Q, et al. Isolation and characterization of human anti-VEGF165 monoclonal antibody with anti-tumor efficacy from transgenic mice expressing human immunoglobulin loci[J]. *Cancer Lett*,2009,**273**(1):28-34.
- [9] Yang JD, Lu C, 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]. *Biotechnol Bioeng*,2007,**98**(1):141-154.
- [10] Duan XJ, Ren T, Luo HY, et al. Review of animal cell medium for antibody drug production[J]. *Chin Med Biotechnol*,2014,**9**(1):

53 – 57.

- [11] Arden N, Betenbaugh MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(4): 174 – 180.
- [12] Meuwly F, Weber U, Ziegler T, *et al.* Conversion of a CHO cell culture process from perfusion to fed-batch technology without altering product quality [J]. *J Biotechnol*, 2006, **123**(1): 106 – 116.
- [13] Zeng AP. Quantitative assessment of cell density effect on the metabolism and antibody production rate of hybridoma cells at high cell density [J]. *Biotechnol*, 1996, **45**: 243 – 251.
- [14] Mei JG, Zhuang JQ, Wang JL, *et al.* Advance of large-scale animal cell culture technology [J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2012, **32**(7): 127 – 132.
- [15] Duan XJ. Problems and solutions of bioreactor scale-up for antibody production [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2013, **8**(6): 466 – 469.