

用无血清培养基在填充床生物反应器生产 rHuEPO

邓继先 杨 琴 程 萱 李 琳 周 江

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 在填充床生物反应器用含 5% FBS 的 DMEM:F12 培养基培养重组人促红细胞生成素(rHuEPO)的细胞 C₂ 8~10d 后,使用自制的无血清生产培养基(SFM-p)生产 rHuEPO。SFM-p 培养基既能维持细胞生长,又能生产 EPO,也便于纯化分离 rHuEPO。使用填充床生物反应器培养细胞,能维持培养 20~25d, rHuEPO 表达水平达 12~28.4mg/L 之间,反应器的产率达到 71.0mg/L/d,比滚瓶的产率增加 12~14 倍。葡萄糖最高消耗量达到 21g/L/d,细胞培养密度最高达到 3.0×10^7 /ml 以上,每次可收无血清培养上清 80~87L。由于细胞被固定在聚酯片上,培养上清中脱落细胞很少。观察了反应器的乳酸和氨的含量,其结果表明乳酸和氨含量分别低于 3.5g/L 和 5mmol/L,不影响产物的表达。经过多批培养和生长 rHuEPO 的结果表明,自行配制的 SFM-p 培养基在该反应器能有效地维持细胞生长和生产 rHuEPO。

关键词 生物反应器, rHuEPO, 细胞培养, 无血清培养基

重组人促红细胞生成素(rHuEPO)在临床上治疗肾衰性贫血、接受化疗的癌症患者贫血和用于择期手术的自身输血血液储备都有显著效果^[1]。卢柏松等^[2]构建的 EPO 工程细胞株能生产具有天然人 EPO 特性的 rHuEPO,具有临床上的使用价值。为了达到一定的生产规模,有利于产物纯化,我们曾对其培养基进行了研究,获得的无血清培养基 SFM-p 适用于重组 CHO 细胞的生长和 rHuEPO 生产^[3]。使用无血清培养基利用滚瓶生产 rHuEPO^[4],该方法具有操作简便,不易造成批量污染等优点,也存在需要大面积的生产用温室、耗能、劳动量大、细胞密度不易提高、培养上清中产物浓度较低等不足之处。因此,用自制的 SFM-p 培养基,在填充床生物反应器中进行了连续高密度培养 C₂ 工程细胞并生产 rHuEPO 的研究。

1 材料和方法

1.1 细胞

生产 rHuEPO 的工程细胞为含有 HuEPO cDNA 序列和 dhfr 基因的 CHO 细胞系,由卢柏松等^[2]构建,命名为 C₂ 细胞。

1.2 培养基及其添加成分

培养 C₂ 细胞的完全培养基含 5% 胎牛血清(FBS)和 2.0×10^{-7} mol/L MTX 的

参加实验工作的还有卢建申、李玉玲同志。

本文于 1996 年 8 月 26 日收到。

DMEM:F12(1:1)培养基(GIBCO 及 BRL 公司产品)。FBS 为 GIBCO 公司生产的胎牛血清。其他试剂均为进口和国产分析纯产品。

1.3 仪器

细胞培养滚床系美国 Bellco 产品,滚瓶容积为 2L,生产面积 670cm^2 。填充床反应器为美国 NBS 公司产品,容积 5L,工作容积 3.5L,每次填装聚酯片 192~200g。聚酯片用无离子水浸洗 2~3 次后装填反应器内,反应器在 121°C 高压灭菌 80min。使用前,排空反应器内积水。

1.4 培养方法

细胞扩增使用 5%FBS 培养基在 75ml T 型细胞瓶(装注 10ml),于 37°C 无 CO_2 条件下培养,然后转入 850ml 大培养瓶内培养,进一步扩增则使用 Bellco 的滚瓶(2L),盛培养基 150ml,2~4d 细胞覆盖瓶内壁,可用于接种反应器。反应器的培养条件:pH 值控制 7.00~7.40 之间,搅拌速度为 150r/min,溶氧为 35~50% 空气饱和度。调节 pH 值的酸碱溶液分别为 0.5mol/L Hepes 溶液和 2%~7% 的 NaHCO_3 溶液。接种细胞后缓慢升温到设定温度,约要 1~2h。搅拌速度从 80r/min 升至 150r/min。

1.5 EPO 含量测定

采用 EPO-ELISA 检测盒(Boehringer mannheim 公司产品),按检测盒的操作程序进行,以标准品绘制曲线,然后计算出样品含量。

1.6 EPO 体内活性测定

采用大鼠饥饿法^[5],使用 γ 计数器测定血液摄取 ^{59}Fe 量进行计算。

1.7 葡萄糖、乳酸和氨含量测定

使用血糖测定盒(北京百泰生物技术公司产品)测定样品中葡萄糖含量,测量范围为 0~50g/L。乳酸和氨浓度测定试剂购自德国 Centronic 公司,均采用半自动生化仪进行比色后计算。

2 结 果

2.1 生物反应器的细胞培养

根据填充床反应器的操作要求,以使用填装聚酯片容量计算,接种细胞密度为 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6/\text{ml}$,起始搅拌速度为 80r/min,30min 后,95% 的细胞贴附在聚酯片上,搅拌速度上升为 120r/min,1h 后上升为 150r/min。溶氧设定在 35%~55% 空气饱和度。pH 值开始设在 7.40 左右,在灌注培养时,pH 值设定在 7.00。本反应器不能取样观察细胞生长情况,只能通过 pH 值变化、葡萄糖消耗量来大致判断细胞密度。

反应器的灌注速度以葡萄糖耗量来决定,细胞生长培养基的葡萄糖浓度为 10g/L,灌注速度以维持反应器内糖浓度在 1~3.0g/L 范围为适宜^[6]。肖成祖等^[7]报道使用微载体方法培养 CHO 工程细胞的葡萄糖消耗率为 $6 \sim 7\text{g}/24\text{h}/10^7$ 细胞,由于此反应器不能直接计数,根据此反应器的葡萄糖消耗速率最高可达 $21\text{g}/\text{L}\cdot\text{d}$ (图 1),推算在填充床反应器的细胞密度可达到 $3.0 \times 10^7/\text{ml}$,与微载体培养方法的葡萄糖消耗量相比,前者约为后者 2 倍。灌注量应维持葡萄糖消耗量在一理想水平,我们的实验表明:葡萄糖消耗量、灌注体积的比值以 10:1.2~1.4 为宜,即 $10\text{g}/\text{L}\cdot\text{d}$ 葡萄糖耗量时,灌流体积为 1.2~1.4 个反

反应器培养体积,随着时间的延长,细胞密度增大,代谢产物也逐渐增多,如乳酸和氨的产量(见图2),这样就必须加大灌流速度减少代谢物的浓度。乳酸和氨的浓度过高对细胞的表达会产生影响。这样,在反应器运转期间,乳酸浓度控制在3.5g/L以下,氨浓度控制在5mmol/L以下,细胞表达水平未降低。

反应器的收集液中脱落细胞在整个运转过程中都较少。镜检收集液,几乎见不到脱落细胞,这点与文献报道一致^[8]。而滚瓶培养脱落细胞镜检计数大约在 $1\sim5\times10^5/\text{ml}$ 之间。

2.2 rHuEPO 的生产

rHuEPO 的表达水平与细胞密度成正比,随着细胞密度增大,表达水平不断提高(图3)。由于填充床反应器的通气条件和葡萄糖供应都比滚瓶优越,应该说更有利于 rHuEPO 的产生和糖基化。在培养8~10d后,更换无血清生产培养基 SFM-p,细胞密度还不断地上升,表达水平也不断地提高。灌注体积适当提高,更有利于产物的表达。在反应器的培养上清中,EPO 含量从换成 SFM-p 培养基的 $12\mu\text{g}/\text{ml}$,逐渐升高到 $28.4\mu\text{g}/\text{ml}$,反应器的产率体积则提高到 $71.0\text{mg}/\text{L}\cdot\text{d}$,比使用滚瓶生产的产率提高14倍左右(表1)。

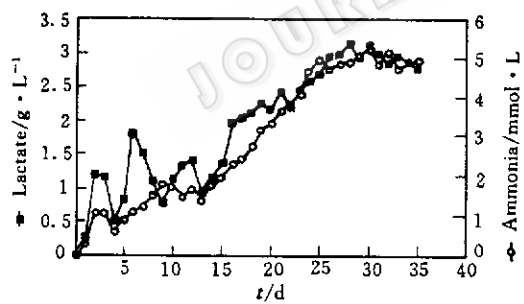


图2 C₂细胞在填充床反应器培养过程中乳酸和氨的产量
Fig.2 Productivity of lactate and ammonia of C₂ cells in packed bed bioreactor

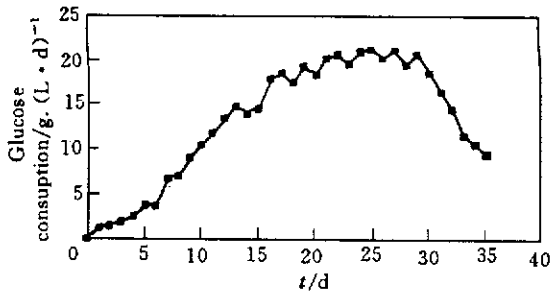


图1 在填充床反应器培养 C₂ 细胞时葡萄糖消耗情况
Fig.1 Glucose consumption rate of C₂ cells in packed bed bioreactor

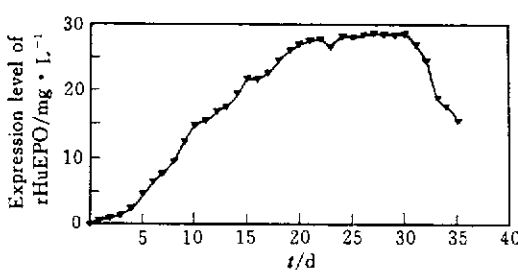


图3 在反应器里的 C₂ 细胞表达 rHuEPO 的水平
Fig.3 rHuEPO expression level of C₂ cells in packed bed bioreactor

表1 填充床反应器和滚瓶生产 rHuEPO 的比较

Table 1 Comparison of rHuEPO production between packed bed bioreactor and roller bottles

	Expression level of culture supperent/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Highest productivity / $\text{mg}(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$	Media change / $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$
Roller bottle	5.1	5.1	— — —
Bioreactor	28.4	71.0	2.5

在确定填充床反应器的培养方法之后,进行了连续生产。每批次收集无血清培养基上清均在 80L 以上(表 2)。使用 ELISA 和大鼠饥饿法分别测定产物的体外含量和体内生物活性的结果表明,具有良好活性。

表 2 使用填充床反应器生产 rHuEPO 的情况
Table 2 Results of rHuEPO produced with packed bed bioreactor

Culture batch	5% FBS medium			FBS-free medium		Expression level	
	Inoculation cells $\times 10^9$	Used volume /L	Culture time/d	Used volume /L	Culture time/d	$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	$\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$
1	2.1	15	8	80	19	14.7	2430
2	1.8	15	8	85	23	15.1	2520
3	2.0	15	7	87	25	14.2	2368

3 讨 论

具有体内生物活性的 EPO 需要高度糖基化,糖链成分占 EPO 总分子的 40% 左右^[9], EPO 的生产需要工程细胞处于代谢活跃的阶段,提供适宜的生长条件 and 环境才能使 EPO 的糖基化达到完善。在选择培养基和添加辅助成分时,应充分地考虑到这一特点。在培养方式上,我们选择填充床生物反应器。细胞贴附在圆形聚酯片上生长,培养基循环,其培养环境与搅拌式反应器相比要温和得多,类似于滚瓶,而细胞需要的营养成分、溶氧和 pH 值都要比滚瓶更适宜于细胞的生长和代谢。这避免了滚瓶生产需要大温室、劳动量大、细胞密度不易提高、单位培养基产量较低等缺点,其产物具有同样的体内外生物活性,还具有能提高培养上清中目的蛋白浓度、减少培养上清脱落细胞的特点。

使用填充床反应器生产 rHuEPO,具有滚瓶特点不可比拟的特点,特别有利于产物纯化分离^[10]。在填充反应器上使用自制无血清生产培养基 SFM-p,一般可维持生产 20~25d,收集培养上清 80 至 87L,表达水平明显提高,使培养上清中 EPO 含量由滚瓶 5.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 提高到 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上,这一生产工艺的确定,降低了生产成本,提高了产率,为 rHuEPO 的制品生产提供了优质材料。

参 考 文 献

- [1] Grimm A M, Flaharty K K, Hopkins L E. *Clinical Pharmacy*, 1993, 8(11): 807~810.
- [2] 卢柏松、徐秀英、陈琳等. *生物工程学报*, 1996, 12(3): 249~254.
- [3] 邓继先、杨琴、程萱等. *军事医学科学院院刊*, 1997, 21(4): 285.
- [4] Tsao E I, Bohn M A, Omstead D R. *Annals New York Academy of Sciences*, 1989, 408: 127~133.
- [5] Fried L F, Plzak *et al.* *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957, 94: 237~241.
- [6] Xiao C, Huang Z, Liu F *et al.* *Chinese Medical Sciences Journal*, 1994, 9(2): 71~74.
- [7] Xiao C, Huang Z, Zhang Z *et al.* *Chinese Medical Sciences Journal*, 1994, 9(1): 203~208.
- [8] Wang G, Zhang W, Jacklin C *et al.* *Cytotechnology*, 1992, 9: 41~49.
- [9] Yoshiyuki E, Hiroshi N, Yoshihiko W *et al.* *Journal of Biochemistry*, 1992, 112: 700~711.
- [10] 李琳、邓继先、卢建申等. *军事医学科学院院刊*, 1997, 21(4): 43~49.

Production of rHuEPO with a Serum-free Medium in Packed Bed Bioreactor

Deng Jixian Yang Qin Cheng Xun Li Lin Zhou Jiang

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071*)

Abstract Recombinant CHO(C₂) cells producing human erythropoietin (rHuEPO) were cultured with 5% FBS DMEM:F12 medium for 8~10 days in packed bed bioreactor, then rHuEPO was produced with self-made serum-free medium (SFM-p). SFM-p medium can support the growth of C₂ cells and the production of rHuEPO. Moreover, rHuEPO was easily separated from the culture supernatant. Cell culture in the packed bed basket system using SFM-p was maintained in a stable condition for 20~25 days. The expression level of rHuEPO was 12~28.4mg/L. The bioreactor productivity was 71.0mg/L·d and increased 12~14-fold over that of the roller bottle. Glucose consumption rate was 21g/L·d. At the end of 30 days of continuous perfusion culture, a final cell density of over 3.0×10^7 /ml of culture volume was achieved. Since the cells were entrapped in the polyester disks, the culture supernatant contained a few of detachment cells. Variations in lactate and ammonia production between the reactor and roller bottle were observed, which results showed that lactate and ammonia production of bioreactor were 3.5g/L and 5mmol/L respectively, and didn't affect the expression of interest protein. This experiment demonstrates that SFM-p is suitable to the growth and rHuEPO production of recombinant C₂ in the packed bed bioreactor.

Key words rHuEPO, serum-free medium, cell culture, bioreactor