

实验结果: (1) OLH 组能促进 $G^{67}C$ 孕酮的合成而且孕酮的生成量随着 OLH 量的增加而增加。(2) VLDL 组孕酮生成量较 OLH 组显著增高, 两者之间有显著性差异 ($p < 0.001$)。(3) 用 3 次实验结果合并计算 VLDL 组和 OLH 组的平均数相当于对照组平均数的百分数, 发现 VLDL 组明显高于 OLH 组。

实验结果说明 VLDL 是携带胆固醇的脂蛋白, 从而在 OLH 作用下, 使颗粒细胞合成孕酮的量增多。

参 考 文 献

[1] Krumins, S. A. et al., 1981, *Biochem.*

J., 196: 481-488.

[2] Schjeide, O. A., 1954, *J. Biol. chem.*, 211: 355-362.

[3] Hillyard, L. A. et al., 1972, *Biochem.*, 11: 511-518.

[4] Hammond, R. W. et al., 1980, *General and Comparative Endocrinology*, 41: 467-476.

[5] 蔡海江等., 1983, 南京医学院学报, 3: 42.

[6] Sgarlata, C. S. et al., 1984, *Endocrinology* 114: 2032-2037.

[7] Khan, I. et al., 1935, *Biol. Reprod.*, 32: 96-104.

实验技术

应用中空纤维生物反应系统中试 生产人体肝癌单克隆抗体

朱德厚 孙燮钧 李云宝 姚曾序 叶 锋* 周一变* 黄 皖*

(中国科学院上海细胞生物研究所)

近年来, 应用杂交瘤技术研制和生产各种有社会效益和经济效益的单克隆抗体(单抗)已有许多报道, 其中不少产品已作为检测试剂或药剂等出售^[1]。在细胞工程这个新兴领域中, 这方面工作的前景是不可限量的。单抗一定规模的生产, 首先决定于相应的杂交瘤细胞的大量繁殖, 而在后者不仅要满足其高密度生长所需的条件, 并且还必须在培养系统中具备能维持细胞长时间健康生存, 并持续分泌目标产物的微环境。为了适应大量细胞工程产品的发展需要, 新一代的高密度繁殖细胞的系统已陆续问世, 如中空纤维系统(Hollow Fiber System), 巨载体-生物反应罐(Macrocarrier + Bioreactor System)等。本文报道应用中空纤维系统 ACUSYST-JrTM 生产人体肝癌单抗的一些结果。

材 料 和 方 法

1. 细胞大量繁殖系统 采用美国 Endotronics 公司设计和生产的中空纤维生物反应系统 ACUSYST-JrTM 型, 适合中试生产工程细胞的分泌产物。在调试运转正常后, 将已通过培养瓶试验后所确定的各参数的设定点(set point)即参数数值范围, 包括温度、pH 值、溶氧量(DO)、葡萄糖和乳酸浓度, 以及每小时培养液和血清的输入量、产物收集量等依次输入微机系统, 在自动运转中起监控作用。

2. 杂交瘤株和细胞的大量繁殖条件 分泌人体肝癌单抗(IgG₁)的小鼠杂交瘤株 Hepama-1 是本所肝癌单抗研究组在 1985 年建立的, 其培养条件见谢弘

此项工作得到国家七五科技规划资金和中国科学院七五重大科技项目合同资金资助。

戴信兰、王亚先、刘敏英等同志参加技术工作。

* 工作单位: 中科院上海生物工程实验基地。

等的报道^[2]。经检查无支原体污染后,在中空纤维系统的生物反应罐(bioreactor)中一次接种 2×10^6 细胞,使逐渐附着并填充在中空纤维管壁外侧的海绵状的结构中生长、繁殖。大量繁殖细胞所用的基础培养液为DM-EM,每升培养液加谷氨酰胺0.3克,葡萄糖4.5克,NaHCO₃3克及青霉素、链霉素、卡那霉素各100单位/毫升。pH值为7.2—7.4。培养液中新牛血清含量,开始时为20%,在运转30天后降低到5%和2.5%。培养温度保持在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。循环管道中培养液的DO值范围为在80—200 mmHg,一般维持在120 mmHg左右。在该系统的组合循环管道(integration circuit)中,由培养液循环泵灌注培养液的速度为50 ml/小时;在扩增循环管道(expansion circuit)中,由收集循环泵收集含抗体的培养液,开始70天为连续收集,5 ml/小时;以后血清含量降低到5%和2%时改为批量收集,30 ml/6小时。这些都是在输入或改变信息后,由微机操作和控制。

3. 细胞生长状况的监测 根据中空纤维生物反应系统中的pH指示电极和DO指示电极,在微机监控板上所显示的数值,以及从生物反应罐循环管道中吸取培养液所检测的葡萄糖和乳酸含量等4个参数的动态,监测细胞生长状况。后两种成分检测方法参照Sigma技术报告No.826-UV和No.170-UV。

4. 抗体效价的检测和定量

(1) 用免疫荧光间接法(IF)测定每次收集样品的抗体效价。靶细胞为人肝癌细胞QGY-7703(江苏启东肝癌防治研究所赠予),对照细胞为人鼻咽癌上皮细胞CNE,第一抗体为待检测的收集液样品,第二抗体为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗鼠IgG抗血清。抗血清经过纯化后,用透析法标记FITC,并经sephadex-G-25过滤和DEAE纤维素柱层析,取F/P比值为1—2的部分作染色用。待检样品经倍比稀释,染色后在透射荧光显微镜(日本Olympus)下观察,以靶细胞膜荧光强度“+”(弱荧光反应)为终点。每次检测均有阴性对照及阳性对照,后者除呈强阳性反应外,效价也应与原测效价相符,这样可使每次检测样品的效价具有可比性。

(2) 用ELISA双抗体夹心法测定收集液中抗体的含量。检测过程基本参照Walters的报告^[3],但包被抗体和辣根过氧化物酶抗体均为纯化后的羊抗小鼠IgG,反应底物为四甲基联苯胺(上海医科大学生化教研组)。用DG-1型酶联反应检测仪(南京华东电子管厂)读取光密度(OD₄₅₀)。在同一反应板作小鼠IgG浓

度的标准曲线,再从标准曲线上查得与检测样品OD值相对应的抗体浓度。

结果和讨论

1. 一些设置点的确定

在使用中空纤维生物反应系统大量繁殖细胞,生产目标产物之前,先应以常规静止瓶培养方法了解相应细胞株的生长和代谢特点,包括与细胞生长有关的培养液pH值、葡萄糖摄取量、乳酸产量、血清供应与产物浓度的关系等。经过按时取样分析,确定在ACUSYST-Jr™系统中与细胞生长和产物分泌量有关的较适当的参数。

图1、2是静止瓶培养分泌抗人肝癌单克隆抗体杂交瘤Hepama-1细胞的两组实验结果。从图1可见,细胞生长相(growth phase)和产物相的最适pH值是有差异的。前者宜选择细胞生长曲线斜率最大的相应pH值7.35—7.4,而后者宜选择细胞生长曲线斜率最小的相应pH值7.25—7.2。在图2细胞生长曲线上,与细胞密度峰值相应的葡萄糖浓度为100 mg/dl,乳酸浓度为200 mg/dl。将这两个相关参数输入微机系统,作为监测细胞代谢状态的设置点较为适宜。

2. 抗体分泌动态及与其他参数的关系

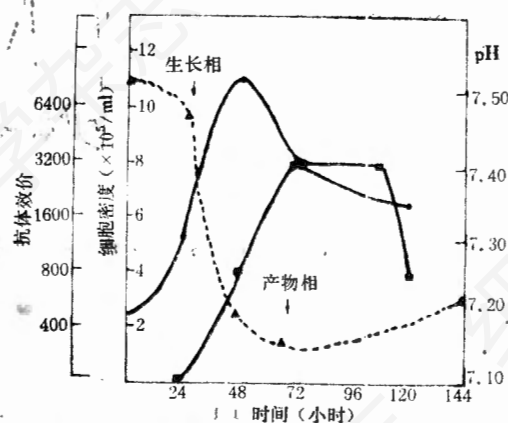


图1 细胞密度、pH与抗体效价的关系曲线

●—●—细胞密度
—▲—pH
—■—效价

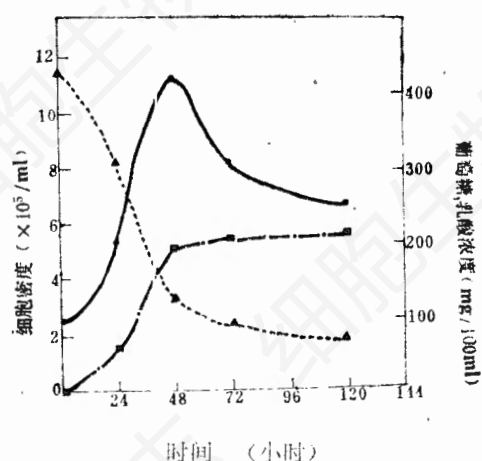


图2 Hepama-1 细胞的代谢曲线

●—●—细胞密度
 ▲—▲—葡萄糖浓度
 ■—■—乳酸浓度

图3显示,在接种 Hepama-1 细胞后, ACUSYST-Jr™ 运转 60 天时间内,分泌抗体效价与葡萄糖摄取量、乳酸产量和 DO 的动态关系。从产物曲线可以看出,运转 10 天后抗体效价就达到很高水平(1:51200)。从图3曲线所示的一般趋势看,在培养液中乳酸产量上升时葡萄糖摄取量也相应上升,而 DO 值则呈下降趋势。这些现象是符合细胞增殖过程中代谢变化的情况的。

在连续运转 120 天过程中,从第 30 天时起血清供应量开始逐渐降低,最后 10 天为 2.5%。血清含量在 10%—20% 时,抗体效价基本维持在 1:51200 水平,再进一步降低到 5% 以下,则抗体效价下降到 1:25600—1:12800 水平(图

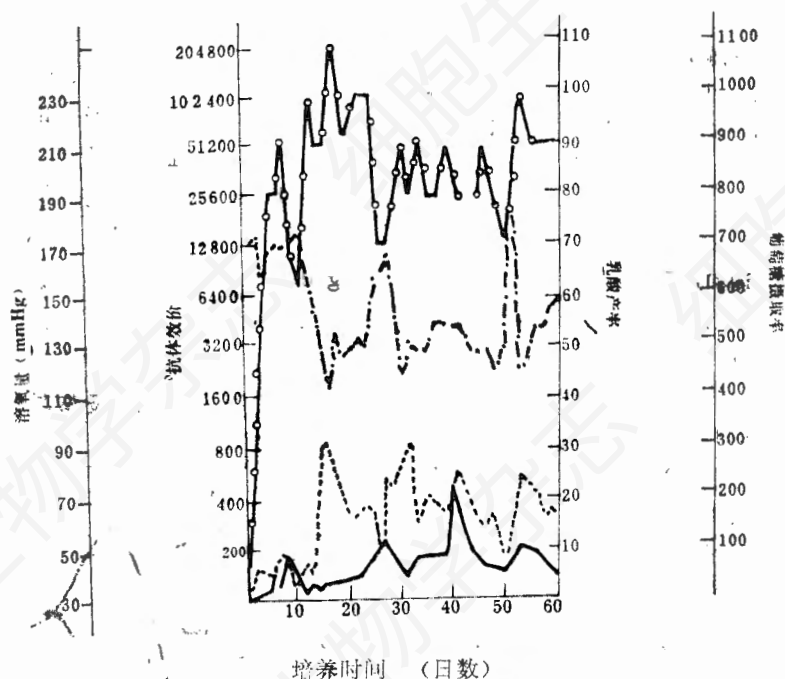


图3 中空纤维系统 60 天运转过程中溶氧、葡萄糖摄取率、乳酸产率和产物的动态曲线

○—○—抗体效价
 ●—●—溶氧量
 ———葡萄糖摄取量
乳酸产量

4)。这一结果显示 Hepama-1 细胞分泌抗体量与培养中血清浓度的依赖关系,但也不能排除由于培养时间延长,细胞衰老所产生的影响,尚待进一步研究。

ACUSYST-Jr™ 运转 120 天连续收集含抗体培养液共 15 升;用 ELISA 方法定量检测,不同批量的收集液中抗体含量在 1.6 mg/ml—3.8 mg/ml 范围,总收获量在 20 克以上,平均月

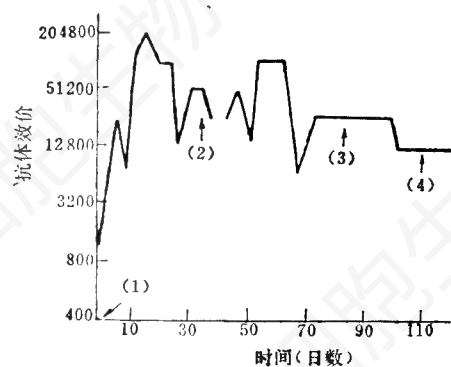


图 4 在中空纤维系统中 Hepama-1 杂交瘤细胞分泌抗体的动态

- (1) 接种细胞数
 2×10^5 细胞, DMEM + 20% 小牛血清
 (2) 5 ml/hr, 10% 小牛血清
 (3) 30 ml/hr, 5% 小牛血清
 (4) 30 ml/hr, 2.5% 小牛血清

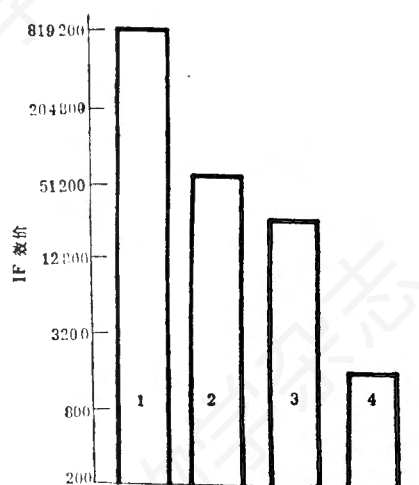


图 5 中空纤维收获液与小鼠腹水及静止瓶培养液中抗体效价的比较

1. 小鼠腹水
 2. 中空纤维 20% 小牛血清
 3. 中空纤维, 10% 小牛血清
 4. 静止瓶, 20% 小牛血清

产量约 5 克。这些数值均达到用 ACUSYST-JrTM 生产 IgG 的较高产量水平。

3. 中空纤维系统收获液与小鼠腹水中生产抗体的比较

利用小鼠腹水生产高浓度的单抗已经是一项成熟的方法, 一般每只小鼠腹水中抗体浓度在 10 mg/ml 左右^[4]。我们随机取接种 Hepama-1 小鼠腹水 1 份, 与中空纤维系统中中和静止培养液中抗体的效价作比较, 腹水抗体效价大于中空纤维系统培养液所含抗体 16 倍, 而后者又高于静止瓶培养液中抗体 16 倍(图 5)。

这一结果也反映, 在实验研究需用少量单抗的情况下, 制备腹水仍是一种经济有效的途径; 但用于实验治疗或诊断, 需要量较大时, 就难以满足要求, 另外经济效益也差。例如 Hopkinson 的报告^[5]中曾有过比较, 以中空纤维系统 Vitafiber Type II (Amicon) 生产单抗, 每 400 ml 超滤培养液中单抗含量可达 2.5 克, 纯度 90%, 而 200 只小鼠平均 800 ml 腹水中只生产 50% 纯度的 4 克单抗。本文应用 ACUSYST-JrTM 生产人体肝癌单抗也接近 Hopkinson 报告的水平。如果再考虑到生产腹水所需一定数量近交系小鼠的繁育, 以及纯化腹水所含抗体过程中会有相当量的损失, 这就更显示大量生产单抗时应用中空纤维系统等类似设备的优越条件了。

摘 要

本文应用中空纤维培养系统, 培养分泌人体肝癌单抗的 Hepama-1 小鼠杂交瘤株, 连续生产 120 天, 单抗的总产量为 20 克左右。

参 考 文 献

- [1] Birth, J. R., et al 1985 in "LARGE-SCALE MAMMALIAN CELL CULTURE" J. Feder and W. R. Tolbert (eds.) Academic PRESS, Inc. pp. 1-6.
- [2] 谢 弘等, 1985, 实验生物学报, 18: 263.
- [3] Wolters, G. et al., 1976 J. Clin. Path., 29: 873.
- [4] Reuveny, R., et al. 1986, J. Immunol. Methods., 86: 61.
- [5] Hopkinson, J. 1985 Biotechnology., 3: 225.