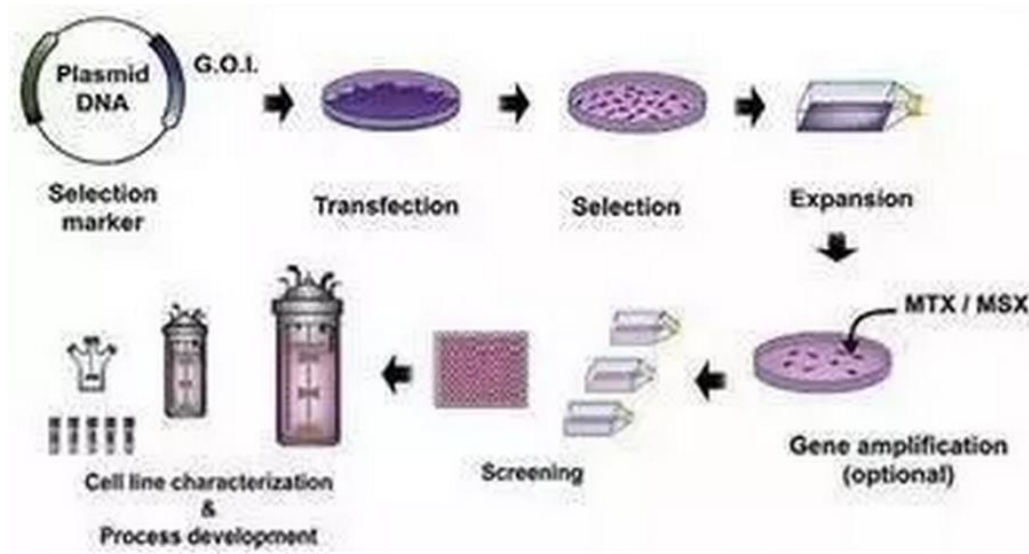


生产用细胞株构建的原理及方法

宿主细胞与重组蛋白生产



动物细胞是生产治疗性重组蛋白的强有力工具。为与小分子药物区别开来，治疗性蛋白、疫苗以及细胞治疗产品统称为生物制品。宿主细胞的选择和改造对于提高产品的产量和质量来说至关重要。因此必须对细胞进行筛选，选出具有高表达量和良好生长特性的细胞。在此我们主要讨论适用于大规模生产重组蛋白的细胞株的筛选。

工业上重组蛋白的制备主要有两种方式：瞬时转染和稳定转染。瞬时转染经常用于制备少量蛋白（多达克级）用于药物开发早期的蛋白活性或动物实验。瞬时转染并不产生克隆细胞株，它只是暂时将编码外源蛋白的质粒转导入已有的细胞株里面（比如 *HEK293* 或 *COS* 细胞）。随着细胞的分裂外源基因不断丢失，蛋白产量较低，一般在 $1-100\text{mg/L}$ 。近年来有报道称 *HEK293* 细胞中瞬时表达产量可达 1g/L 。

与瞬时转染不同，稳定细胞株是为工业化生产治疗性蛋白而构建的。稳定细胞株需要具备在不同的时间，不同的场地以及不同的批次间生产相同质量产品的能力。在选定生产用细胞株之后，需要建立主细胞库（*master cell bank*）。从主细胞库复苏后，扩增建立工作细胞库（*working cell bank*），工作细胞库用于生产。细胞库通常保存在液氮中，需要维持整个产品的生命周期。在构建生产用细胞株的过程中，宿主细胞和表达载体至关重要。

稳定细胞株构建---高产细胞株的秘密

CHO 和骨髓瘤细胞是构建稳定细胞株最常用的两种宿主细胞。基本上用这两类细胞生产的治疗性蛋白都能分泌到细胞外，从而可以从细胞培养液中收获产

物。*CHO* 细胞属于成纤维细胞，是一种非分泌型细胞，它本身很少分泌内源蛋白。

科研人员在蛋白组学和转录组学水平上研究了 *B* 细胞变成浆细胞所发生的生理变化。细胞转变提高了能量代谢水平，改善了蛋白分泌和糖基化能力，同时增加了氧化还原水平用来应对活性氧的影响。*B* 细胞或浆细胞的基因组中只有一个功能性的免疫球蛋白基因。在 *B* 细胞成熟的过程中，二倍体细胞中其中一个等位基因发生失活。但是，仅仅是免疫球蛋白基因的一个拷贝足以使浆细胞成为一个高产的分泌细胞。因此，只需将目的基因的一个拷贝整合到杂交瘤细胞基因组适合的位置就可以使其成为分泌外源蛋白的强大细胞。与瘤细胞不同，*CHO* 必须经过改造后才能提升蛋白表达能力。除了蛋白表达能力之外，优秀的细胞株还应具备良好的生长和代谢特性。在过去的十多年里，大量转录组学和蛋白组学的研究致力于揭示高产细胞株的特性。人们逐渐意识到没有那一种主要的调控因素能使 *CHO* 或 *NSO* 来源的重组细胞变成高产细胞株。高产细胞株的形成涉及细胞内许多通路的改变，比如代谢、分泌、氧化还原平衡和生长/死亡调控；更可能的是大量基因表达水平的微小变化，而不是几个主要节点的大变化。

构建高产细胞株的基本步骤

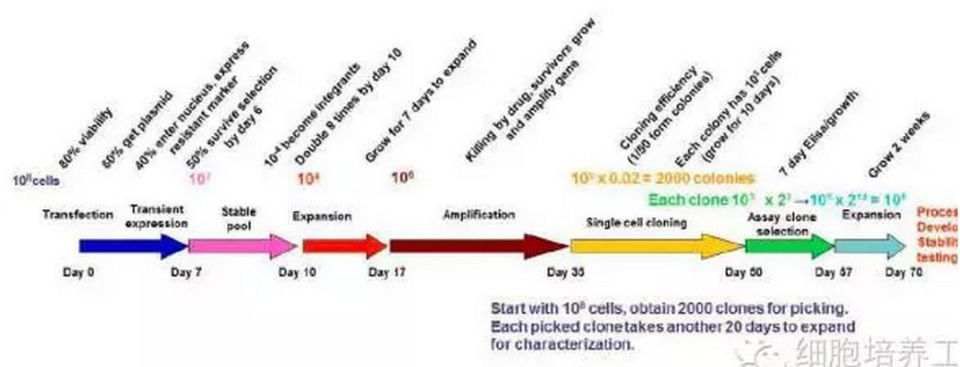


Fig. 5.8: A timeline for generating an industrial producing cell line.

转染-筛选-扩增-单克隆化-筛选-驯化

首先，通过质粒将目的蛋白的编码基因导入到细胞内。质粒上除了目的基因外还带有抗性基因，比如抗生素抗性基因。这样在转染后就可以利用选择压力富

集整合质粒的细胞。在哺乳动物细胞中质粒不能进行复制，未整合到基因组中的质粒随着细胞分裂逐渐丢失。在一段时间的选择压力后，所有存活下来的细胞基因组中都整合了外源质粒。

获得了一系列整合了外源基因的稳定细胞后，接下来就需要从中筛选出表达量最高的克隆。最常用的方法是检测 96 孔细胞培养板中蛋白的浓度；另外一个方法是让细胞在软琼脂上生长形成集落，然后利用原位免疫沉淀技术获得高产细胞。近年来，发展起来的高通量自动化筛选技术也被受关注。

为实现克隆的高表达，在有些情况下外源基因扩增，比如以 *CHO* 用作宿主细胞；有些情况则不需要，比如杂交瘤细胞。为了实现外源基因的扩增，将细胞在高浓度的扩增标记（比如 *dhfr*）抑制剂的压力下生长。细胞存活需要扩增标记。高浓度的抑制剂能够杀死除拥有多个扩增标记基因以外的绝大多数细胞。在标记基因扩增的过程中，与它相邻的基因也随之发生扩增。基因拷贝数的增加导致转录和翻译水平的提高。在这个过程中，某些高产细胞株重组 *IgG* 重链的转录水平成为细胞内最高。另一方面，过高的蛋白表达可能会超过细胞内蛋白折叠的限度，内质网中发生未折叠蛋白效应导致细胞凋亡。因此没有建立起与高表达相匹配的其它结构的细胞可能不能存活。

基因扩增后的细胞既含有多个拷贝的外源基因，能高水平的表达目的基因和抗性基因，还具备了强大的蛋白分泌能力。除此之外，高产细胞株还应具备高密度培养和能维持较长平台期的能力。

基因扩增后的细胞可以视为一个细胞“*Pool*”，其中含有众多不同遗传背景

的细胞，或是基因插入位点的不同，或是扩增程度的不同等等。因此基因扩增后下一步是细胞的单克隆化。单克隆化是利用流式细胞仪或有限稀释法或其他自动化方式(0.2 个细胞/孔)将细胞接种到多孔板中。可以认为从某一特定孔里长出的细胞都是由早期的一个细胞分裂而来，他们在遗传上是同源的。

单克隆化后需要对获得的细胞株进行初步的评价。主要包括生长特性，产品质量的评价。有些情况下需要将细胞驯化到更接近生产模式的条件下，进行培养。

单克隆化细胞株构建过程中的关键环节。通常不管是否进行基因扩增都应进行细胞的单克隆化。尽管用于构建细胞株的宿主细胞都是非整倍体，倾向于进行基因组重排和表观遗传学的改变；但是单克隆化获得的细胞在同源性上远高于细胞“*Pool*”。从单个细胞开始到生产环节结束，细胞大概需要进行 60 次分裂；

如果算上整个产品的市场寿命，细胞至少需要 80 次分裂。通过单克隆化可以防止最初细胞“*Pool*”里发生突变或产量低细胞成为优势群体，逐渐取代高产细胞，导致细胞不稳定。

转染方法

•

通常使用的转染方法主要有 DNA-磷酸钙共沉淀法，电击法，脂质体法。

质粒 DNA 的基本元件

外源基因是以质粒 DNA 的形式进入动物细胞的，同时质粒 DNA 上带有提高外源基因转录和翻译水平的元件。尽管病毒来源的载体和细菌来源的载体都被用来将外源基因导入动物细胞，但是工业上在构建细胞株的过程中极少用到病毒来源的载体。

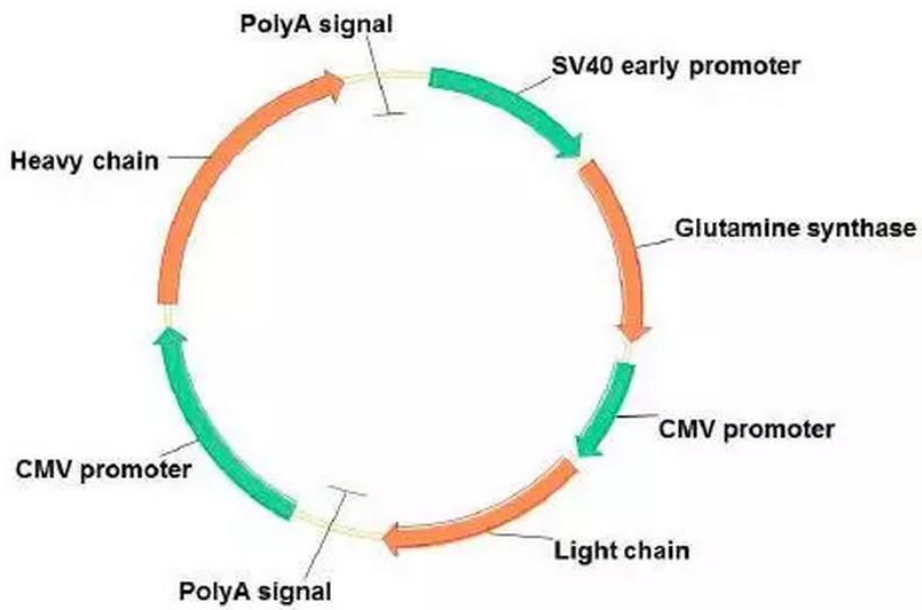
目的基因可以由组成型，诱导型或条件型启动子进行启动转录。在细胞分化和发育的研究中经常用到条件型启动子，它可以由某些特定因素引发，导致蛋白表达，影响细胞的分化。但是在重组蛋白的生产中，绝大多数表达载体使用强组成型的启动子。通常病毒来源的启动子，如 SV40 晚期启动子和 CMV 启动子，应用最为广泛。近年来，CHO 来源的 EF-1 和 GAPDH 的启动子也被应用到蛋白生产中。

为了提高转录水平，除了使用强的启动子外，还可以在目的基因中插入内含子。通常可以看到在目的蛋白的基因中含有至少一个内含子。此外，密码子优化可以提高基因的翻译水平。表达载体除了包含启动子、增强子和目的基因外，还需要有筛选标记基因，甚至，扩增标记基因。

尽管转染后有大量的质粒进入细胞，但是只有极少数能够进入细胞核，进一步整合到基因组中。细胞中只有整合的质粒才能复制，未整合的质粒逐渐被降级或丢失。转染后至少有一个筛选标记基因（抗性基因）整合到基因组并成功表达的细胞在抗性的压力下才能存活。

筛选标记可以分为显性的和隐形的。隐形筛选标记是细胞内固有的基因，缺失时影响细胞生长（如 DHFR）。通过引入外源补偿基因可以克服这类缺陷。

比如，CHO DG44 细胞是 DHFR 基因双敲除的细胞株，需要在培养基中添加 HT 才能正常生长。通过转染使其获得功能性的 DHFR 基因，就能使它在不含 HT 的培养基中也能生长。相反，显性筛选标记（一般为抗生素）对细胞具有杀伤作用。通过向细胞中引入抗性基因可以赋予细胞对抗显性筛选标记的能力。每一个抗性基因编码一种酶，可以破坏显性筛选标记的化学结构。下表（table2）中显示的是常用的显性筛选标记和抗性基因等信息。



A vector with GS selection system

Fig. 5.6: A vector with GS selectable marker.

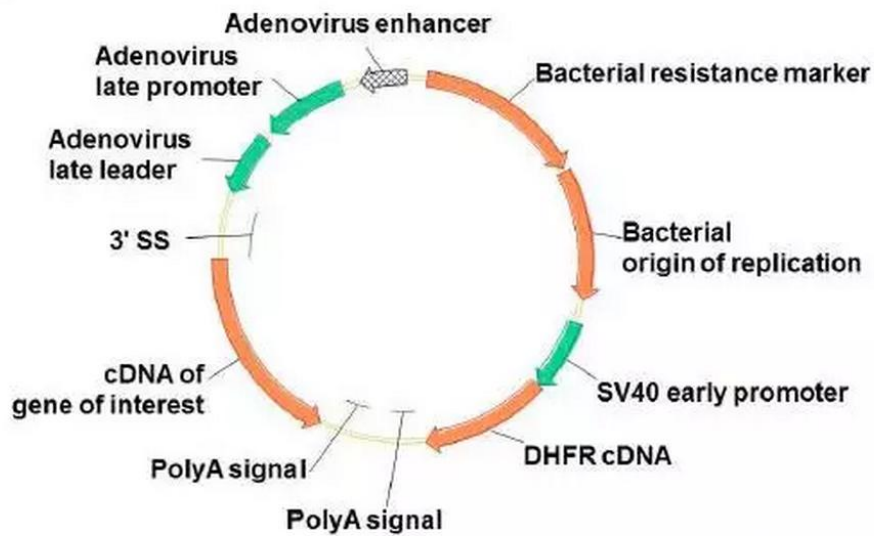


Fig. 5.4: A vector for DHFR based amplification of transgene.

细胞培养工艺

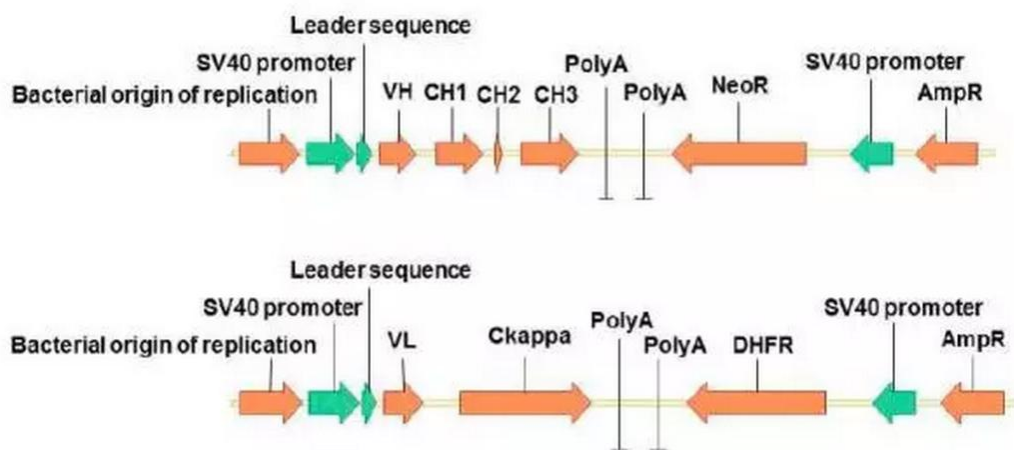


Fig. 5.5: A gene construct for introducing heavy chain and light chain molecules of immunoglobulin gene. 细胞培养工艺

参与使抗生素失活的酶（由抗性基因表达）只有在细胞内才有活性，失活过程中的磷酸化和乙酰化反应需要 *ATP* 和乙酰基团等底物，因此抗生素的失活必须在细胞内部才能进行。另一方面，蛋白酶即使在细胞死后释放到培养基中仍有活性。因此，在细胞株筛选过程中，筛选试剂（如抗生素）的浓度随时间逐渐降低，降低的速率取决于转染后细胞的密度。所以，最优的筛选试剂浓度不止取决于细胞系，也取决于细胞的密度。单克隆筛选和细胞群体“Pool”筛选在抗性浓度的使用上可能大不相同。

扩增

哺乳动物细胞中最常用的两种基因扩增系统是：二氢叶酸还原酶（*DHFR*）和谷氨酰胺合成酶（*GS*）系统。*DHFR* 是催化二氢叶酸还原成四氢叶酸的酶，四氢叶酸是甘氨酸、胸苷一磷酸和嘌呤生物合成所必需的。氨甲喋呤（*MTX*）是叶酸的类似物，可以与 *DHFR* 结合并抑制其活性。从而使细胞在缺乏胸苷和嘌呤的培养基中死亡。

当细胞在 *MTX* 的压力下生长时，只有 *DHFR* 基因扩增并高效表达的群体才能存活下来。*DHFR* 基因扩增可以带动插入位点附近 10-10,000kb 的 DNA 序列一起扩增。因此与 *DHFR* 邻近的外源基因也随之扩增。

扩增可以使一步完成也可以是分几步完成。随着 *MTX* 浓度的升高，存活下来的细胞 *DHFR* 扩增程度越高。能耐受高浓度 *MTX* 压力的细胞，可能含有几千个拷贝的 *DHFR* 基因。

GS 筛选系统基于细胞中的谷氨酰胺合成酶可以利用谷氨酸和氨合成谷氨酰胺。绝大多数哺乳动物细胞内源的谷氨酰胺合成酶活性很低，需要在培养基中额外添加谷氨酰胺细胞才能生长。*GS* 筛选系统的载体含有谷氨酰胺合成酶和外源基因，因此可以在不含谷氨酰胺的培养基中进行筛选。通常用比较弱的启动子，如 *SV40* 启动子来启动 *GS* 基因。在高浓度的谷氨酰胺合成酶抑制剂（*MSX*）的作用下，可以筛选得到基因高度扩增的细胞。

为实现外源基因的高效表达，基于上述筛选系统人们开发出了更为复杂有效的筛选途径。比如把 *DHFR* 与 *G418* 抗性基因相连，转染后加 *G418* 压力，这时只有质粒载体整合到转录活跃区的细胞才能表达足够高的潮霉素抗性，抵抗 *G418* 的压力从而存活下来。这时筛选出的克隆只含有外源基因的少数几个拷贝。接着通过 *MTX* 的扩增作用，使整合基因在细胞基因组中进一步扩增，从而实现外源基因的高表达。

通过为期一到两周的基因扩增过程，筛选试剂浓度相应降低。在较低的筛选压力下，外源基因的拷贝数可能减少，导致转录水平和蛋白产量的下降。拷贝数的丢失与外源基因整合到染色体上的位置有关，位于染色体两臂末端的基因更倾向于丢失。通常在降低筛选压力后，细胞株先是经历一个外源基因拷贝数和表达量迅速下降的过程，随后便趋向于稳定。所以，通常需要维持一个合适的选择压力来防止细胞不利突变的发生，影响拷贝数或引起细胞生长速率的变化。

细胞驯化

确定生产用细胞株后，需要尽快使其适用生产规模下的培养条件。

细胞株稳定性研究

- 从细胞复苏（ 2×10^8 个细胞）到生产（ $20m^3$ ）细胞至少需要分裂 16 次；

- 稳定性试验至少测试细胞分裂 40 次；

- 用于疫苗生产用的正常的二倍体细胞通常在一定的分裂次数内保持稳定

- 连续培养的细胞系的核型不断变化。

- 体外培养的细胞发生基因突变和表观遗传学改变的几率很高。这有可能是受培养条件的影响。比如，一些类型的干细胞在细胞密度、氧气浓度和生长因子浓度等条件发生改变时会发生分化。用于疫苗生产的细胞多数是二倍体，在既定的培养条件下相对稳定。在生产上能接受的倍增次数范围内，这类细胞不会出现可见的表型或染色体上的变化，因此生物生产工艺上对这类细胞的稳定性关注较少。

- 细胞株稳定性涉及：

- 生产能力随时间下降；

- 产品质量随时间变化；

- 核型随时间改变；

- 染色体畸形；

- 后面两项对蛋白类生物制品可能影响不大，但是细胞治疗中需要考虑的。

- 相反，通过转染、扩增、筛选获得的生产重组蛋白的高产细胞株可能更不稳定。首先用于高产细胞株构建的非整倍体宿主细胞本身的稳定性就低于二倍体细

胞。非整倍体宿主细胞除了染色体数目异常外，还存在染色体结构畸形。这就导致了即使同一宿主细胞来源的不同细胞株具有不同的核型。核型差异和染色体畸形是高产细胞株的遗传特性。即使生产用细胞株在稳定性上可能不及二倍体细胞，但是他们必须具备在一定的倍增次数内保持其生产特性、生长状况、蛋白质质量的相对稳定。

假设进行 10,000 批 10,000L 规模，最终细胞密度为 $10E10$ cells/L 的生产，选定的细胞株需要进行接近 80 次的倍增。次数远远超过从一个受精卵发育成一只仓鼠、老鼠甚至是成人所需要的倍增次数。在如此长的周期内，某些细胞内基因突变、表观遗传学改变或者染色体重排不可避免，而这是目前无法解决的。

为测试细胞的稳定性，需要对细胞 40-60 次倍增范围内进行生产能力以及基因拷贝数的检测。从液氮罐中 $10e10$ 个细胞复苏到生产规模反应器生产，细胞需要进行 15 次倍增，所以 40 次倍增稳定测试就足以提供充分的数据。（如果起始细胞为 $10e7$ 开始复苏，到 10,000L 反应器需要多少次倍增呢？）

产品质量稳定性更难评估，基因突变，比如糖基转移酶突变，可能会影响产品质量。一个或多个拷贝中碱基突变会影响到蛋白氨基酸序列。由于基因组中外源基因不同拷贝的转录和翻译效率不同，不同的突变引起的对产品质量的影响不尽相同。通过高通量基因测序技术，可以检查出细胞群体中甚至很小水平的突变。

结语

在合适培养条件下，工业上 CHO 或杂交瘤来源的高产细胞株特异性细胞产量可达到 $50-100$ pg/cell-day，相当于体内专职分泌细胞的水平。如此优秀的细胞株通常是通过优化基因结构、筛选和扩增等方法获得的。