

杂交瘤无血清培养基
技术白皮书 (2017年版)
2017年2月26日



1. 细胞数量：平均密度可达 $2-2.5 \times 10^6$ /mL
2. 驯化适应:无需梯度驯化,部分细胞系可直接培养
3. IgG抗体表达量高达520mg/ L
4. 全自动无人灌装线生产，无菌率100%。
5. 内毒素低于0.25EU/mL
6. 化学成分明确，所以批间差极小，批次性能稳定。
7. 没有血清及血清替代物添加，产品更安全。
8. 静态及摇瓶培养均可,适用性更强
9. 经过了极端使用条件测试，更适合工业化使用。



一个拥有10年历史的品牌，
一个单品销售额6000余万，占据全国90%市场份额的公司，
一个靠创新取胜市场的公司。

用户的使用便利，就是我们的前进方向！

目 录

1. 细胞驯化适应说明.....	3
2. 细胞接种密度实验数据(含极限接种密度).....	4
3. 细胞静态培养生长曲线及抗体表达对比数据.....	5-6
4. 细胞动态培养生长曲线对比数据.....	7
5. 提高抗体表达的新方法对比数据(培养袋法).....	8-9
6. 细胞培养中容易出现的问题及解决方法.....	10
7. 产品质量保障.....	11-12



一、杂交瘤无血清细胞培养基驯化适应说明

杂交瘤细胞未驯化直接培养

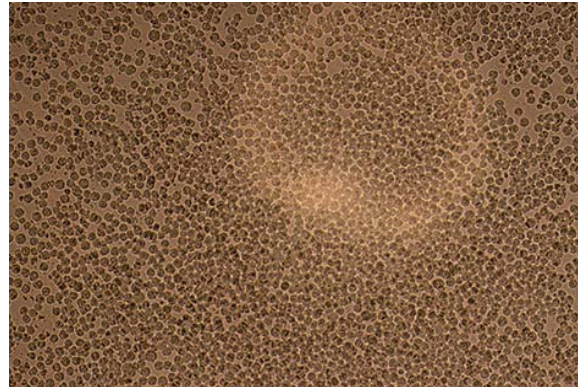
方法说明：杂交瘤细胞未经过细胞驯化适应,直接从含血清培养基中转入无血清培养基进行传代培养

细胞株A



细胞形态较差,无法完全适应
导致细胞生长缓慢,甚至衰退

细胞株B



细胞形态良好,可直接适应
细胞生长迅速

结果提示：由于杂交瘤细胞系的差别,导致有些细胞系不经驯化,不能完全适应无血清培养基.对于此类细胞需进行驯化培养,而能直接适应的细胞系可不进行细胞驯化.

杂交瘤细胞驯化后再培养

方法说明：

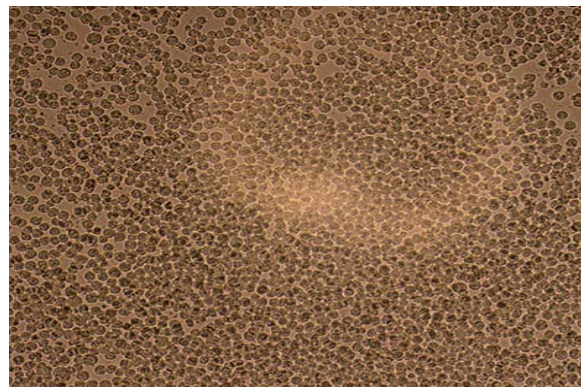
- 1、初次用无血清培养基培养,需在无血清培养基基础上添加5%血清。
- 2、杂交瘤细胞在含5%的无血清培养基中接种密度调整 $1-2 \times 10^5$ cells/mL。
- 3、当细胞密度达到 1×10^6 cells/mL以上时,直接更换无血清培养基半量补液,继续培养。
- 4、当细胞密度再次达到 1×10^6 cells/mL以上时,重复第3步,细胞即完全适应无血清培养。

细胞株A



细胞形态良好,可逐渐适应
细胞生长快速

细胞株B

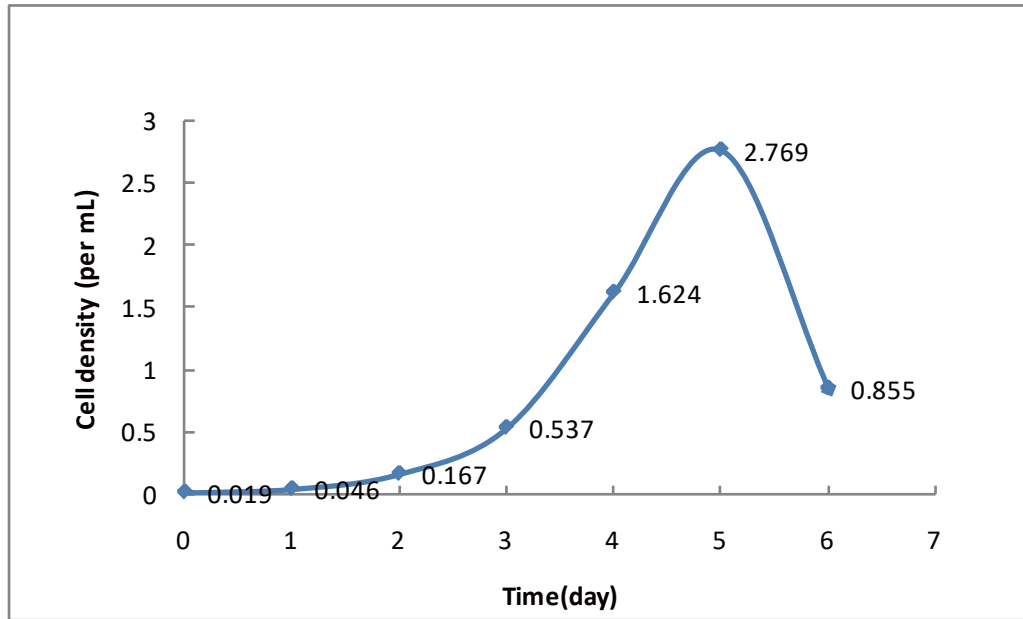


细胞形态良好,生长迅速
细胞密度较不驯化有所提升

结果提示：不经驯化,不能完全适应无血清培养基的杂交瘤细胞.经过驯化后可以达到应用要求。

二、杂交瘤细胞接种密度数据

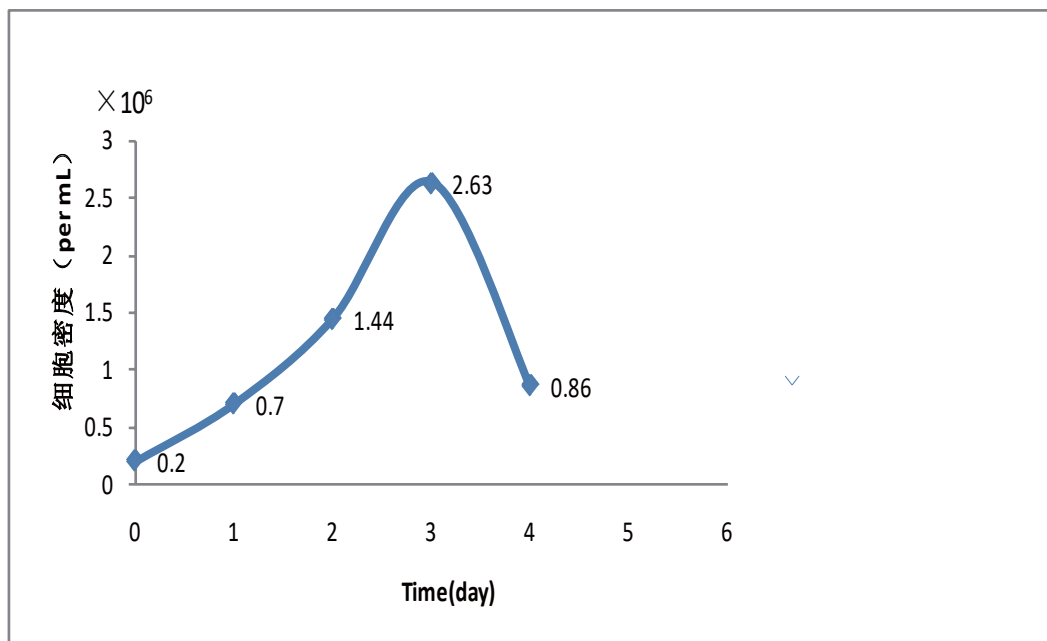
低密度接种: 接种密度 2×10^4 cells/mL



结果分析:

极限挑战接种密度低至 2×10^4 cells/mL,杂交瘤细胞仍可正常生长,但细胞峰值延长至第五天.

高密度接种: 接种密度 2×10^5 cells/mL



结果分析:

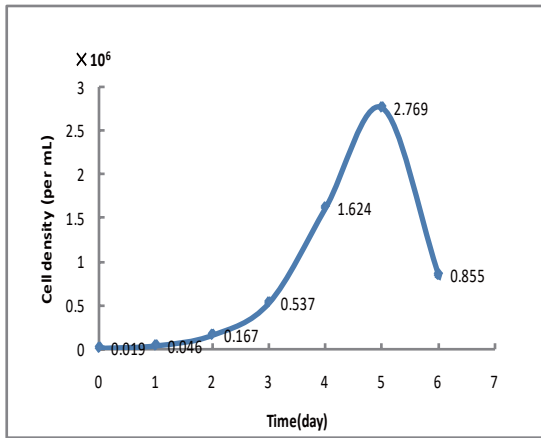
极限挑战接种密度低至 2×10^5 cells/mL,杂交瘤细胞正常生长,细胞峰值缩短至第三天.

综合分析:

考虑到适合工业生产需要,杂交瘤细胞接种最适合密度为 $1-2 \times 10^5$ cells/mL.可缩短生产周期,提高生产效率.

三、杂交瘤静态培养生长曲线及抗体表达对比数据

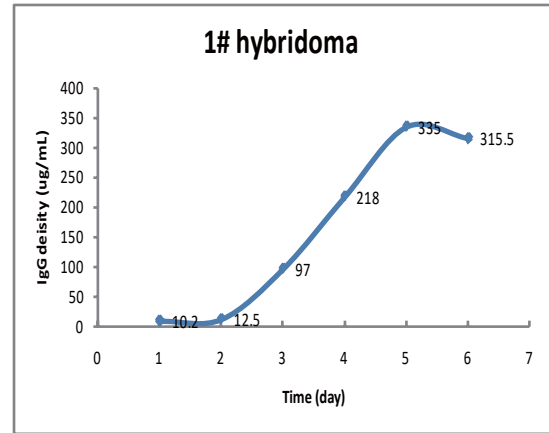
1号细胞株生长曲线数据



培养条件:

T25培养瓶,5mL培养液, 接种密度 1.9×10^4 /mL
连续7天不换液培养。

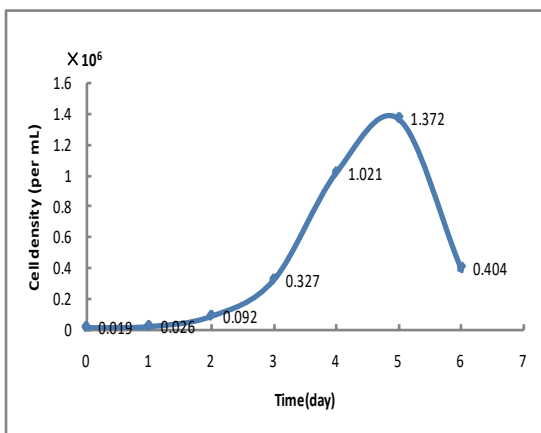
1号细胞株抗体表达数据



检测条件:

小鼠IgG elisa检测, 抗体表达峰值335ug/mL。

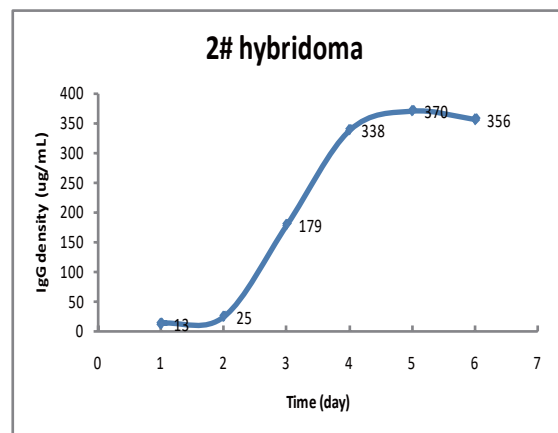
2号细胞株生长曲线数据



培养条件:

T25培养瓶,5mL培养液, 接种密度 1.9×10^4 /mL
连续7天不换液培养。

2号细胞株抗体表达数据

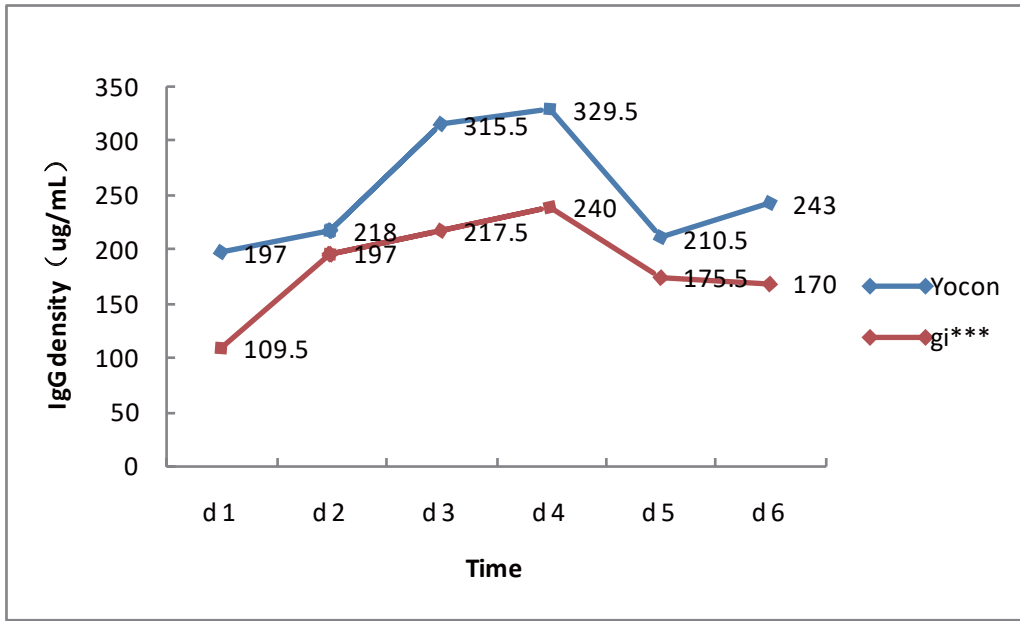


检测条件:

小鼠IgG elisa检测, 抗体表达峰值370ug/mL。

三、杂交瘤静态培养抗体表达对比数据

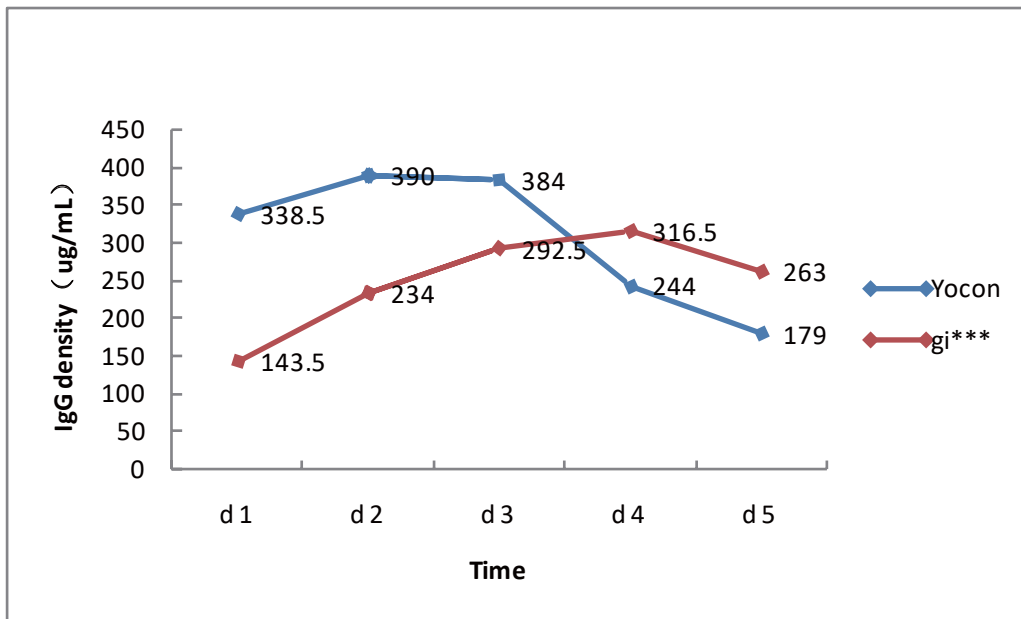
1号细胞株与GI***抗体表达数据



结果说明：

1号细胞株 小鼠IgG表达量第四天达到峰值，yocon抗体表达量为329.5ug/mL，远高于gi***的240ug/mL。

2号细胞株与GI***抗体表达数据

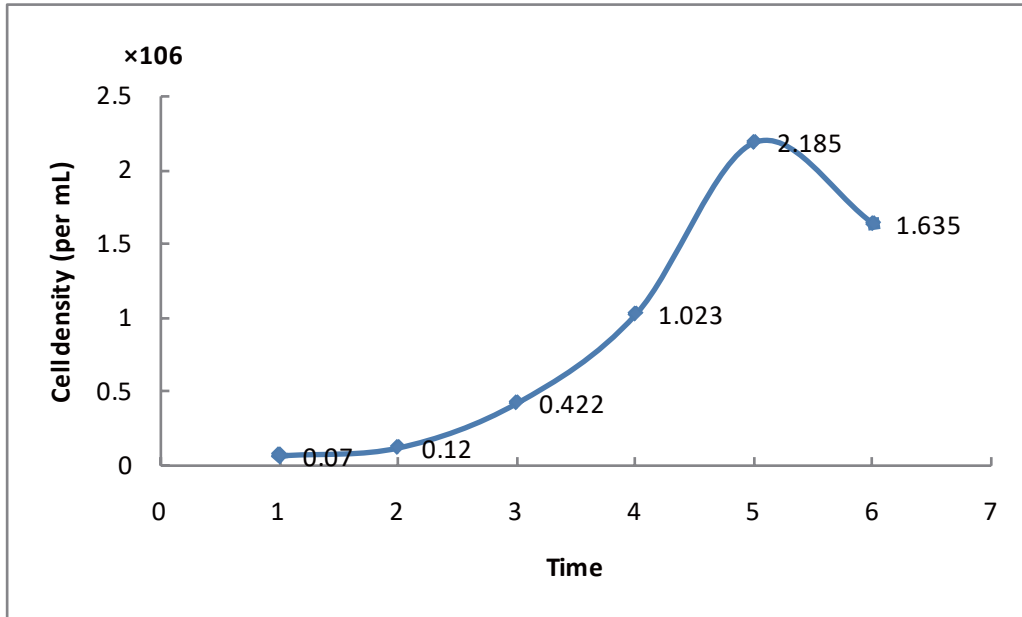


结果说明：

2号细胞株 小鼠IgG表达量第3天达到峰值，yocon抗体表达量为384ug/mL，远高于gi***的316.5ug/mL。

四、杂交瘤细胞动态培养生长曲线对比数据

1号细胞株生长曲线数据



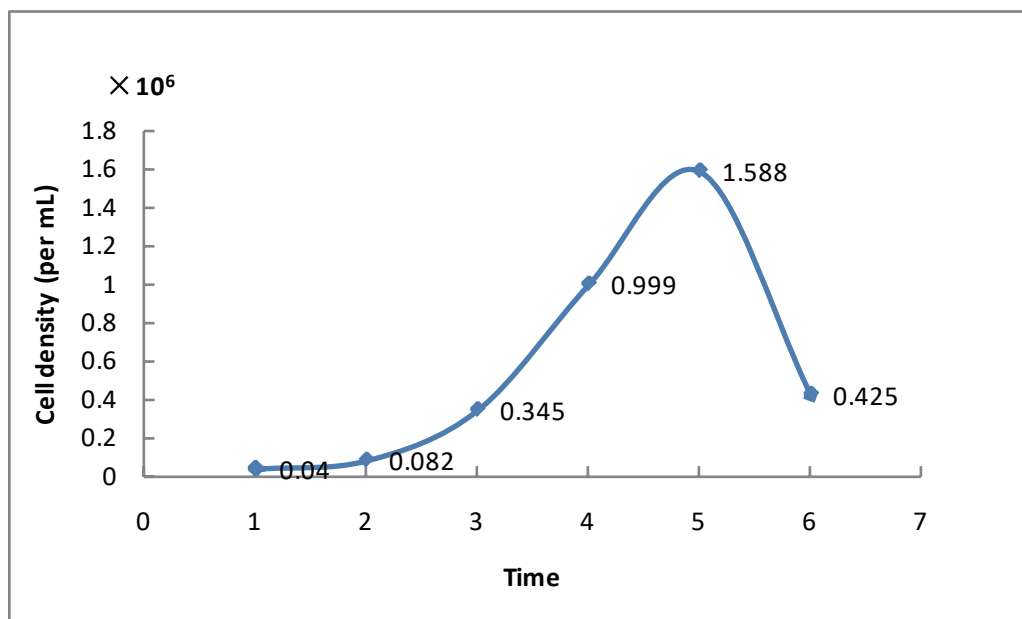
培养条件:125mL摇瓶

培养基:30mL

转速:90rpm/min

接种密度: 2×10^4 cells/mL

2号细胞株生长曲线数据



培养条件:125mL摇瓶

培养基:30mL

转速:90rpm/min

接种密度: 2×10^4 cells/mL

结果分析:

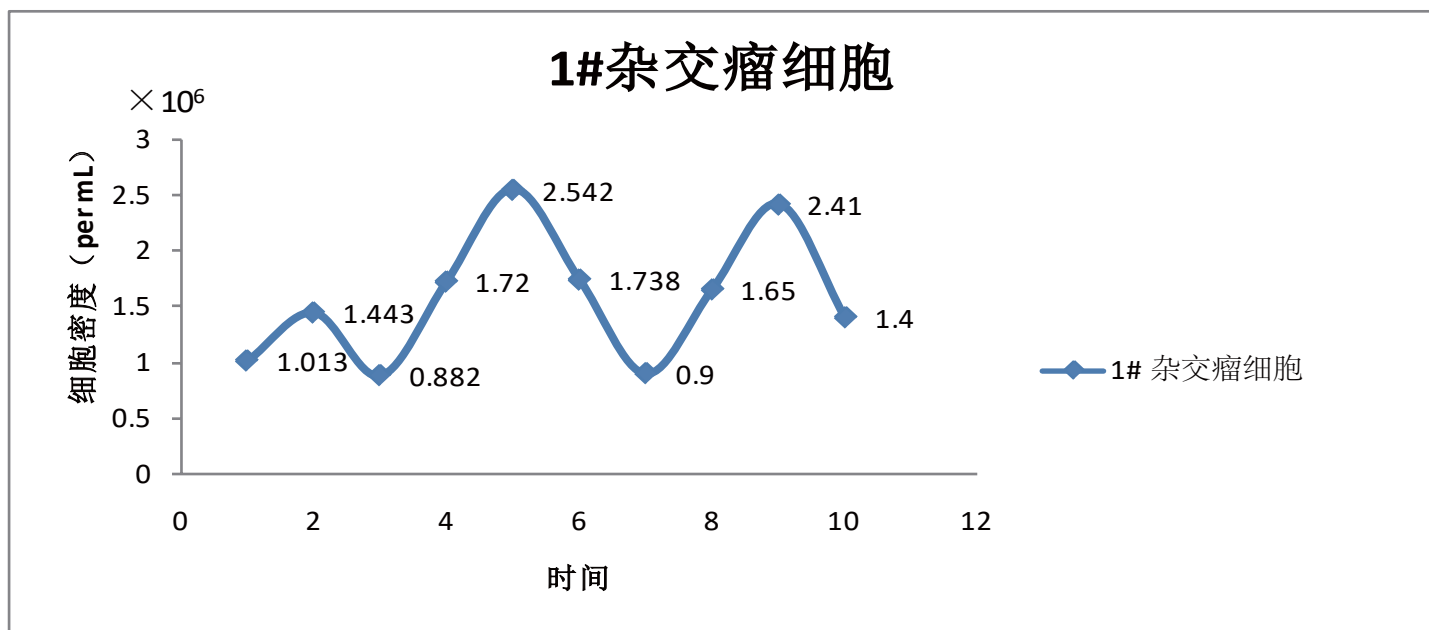
所测两株细胞均可进行摇瓶培养,本试验仅进行生长验证,未进行工艺优化。工艺优化后会得到更理想的结果。

五、杂交瘤细胞培养袋法 数据对比

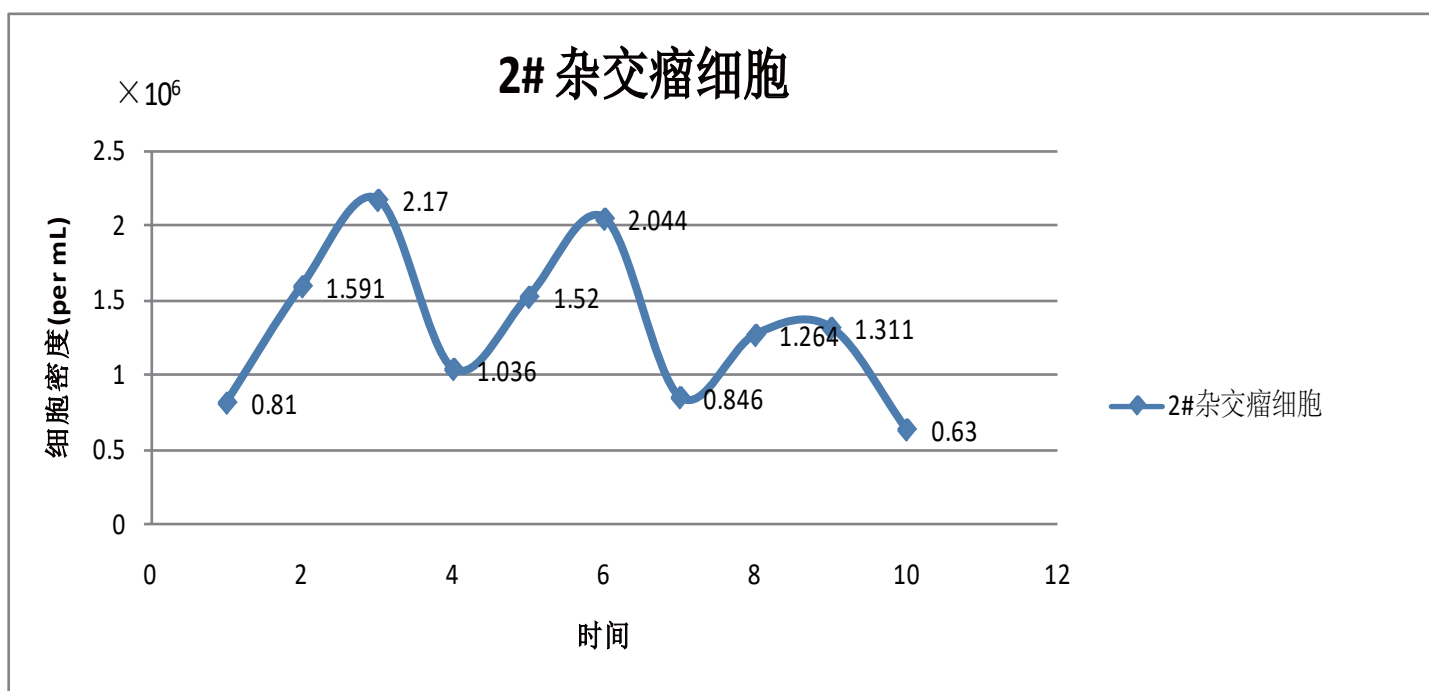
方法说明:

采用连续补液培养,体积扩大到100mL,开始入袋,接种密度 2×10^5 cells/mL。培养两天后补液200mL.第6天补液直至第10天。

1#杂交瘤细胞生长曲线(培养袋法)



2#杂交瘤细胞生长曲线(培养袋法)

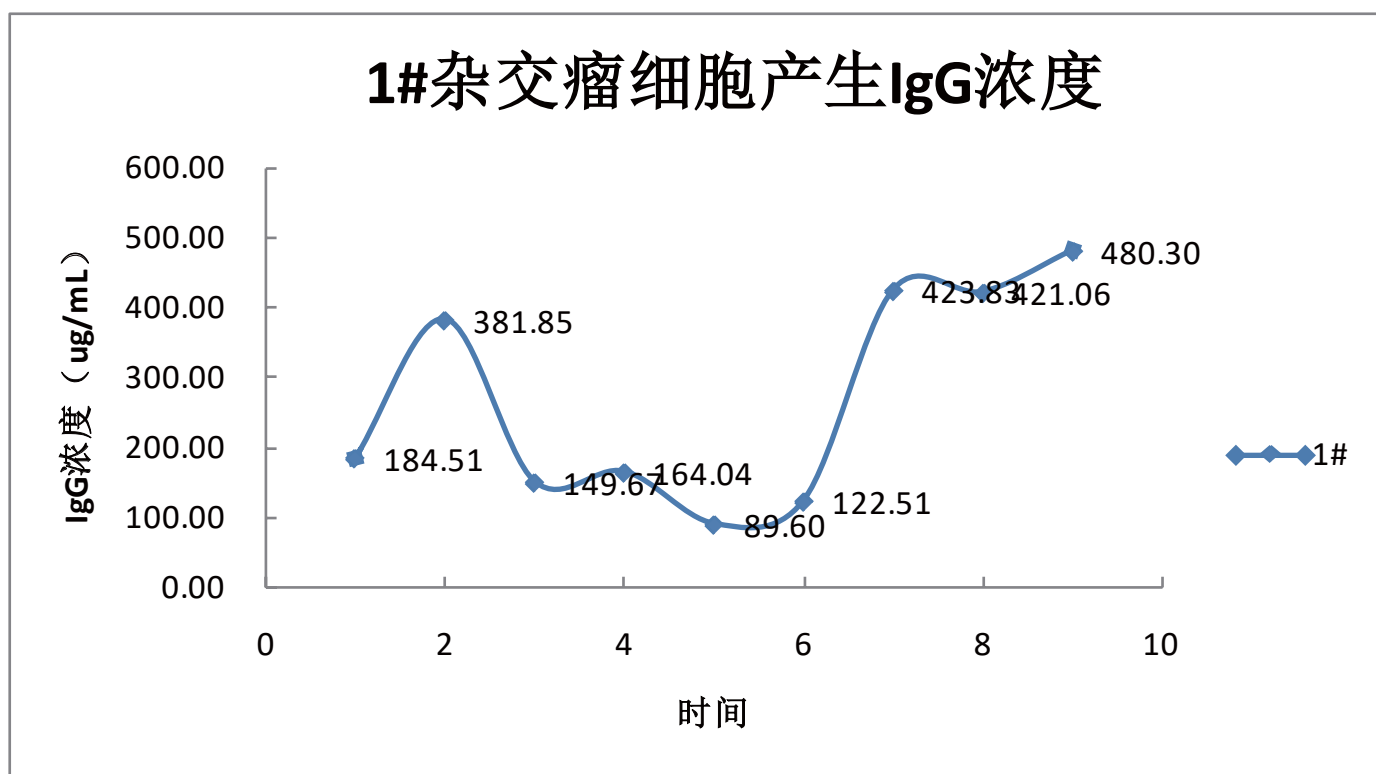


方法说明:

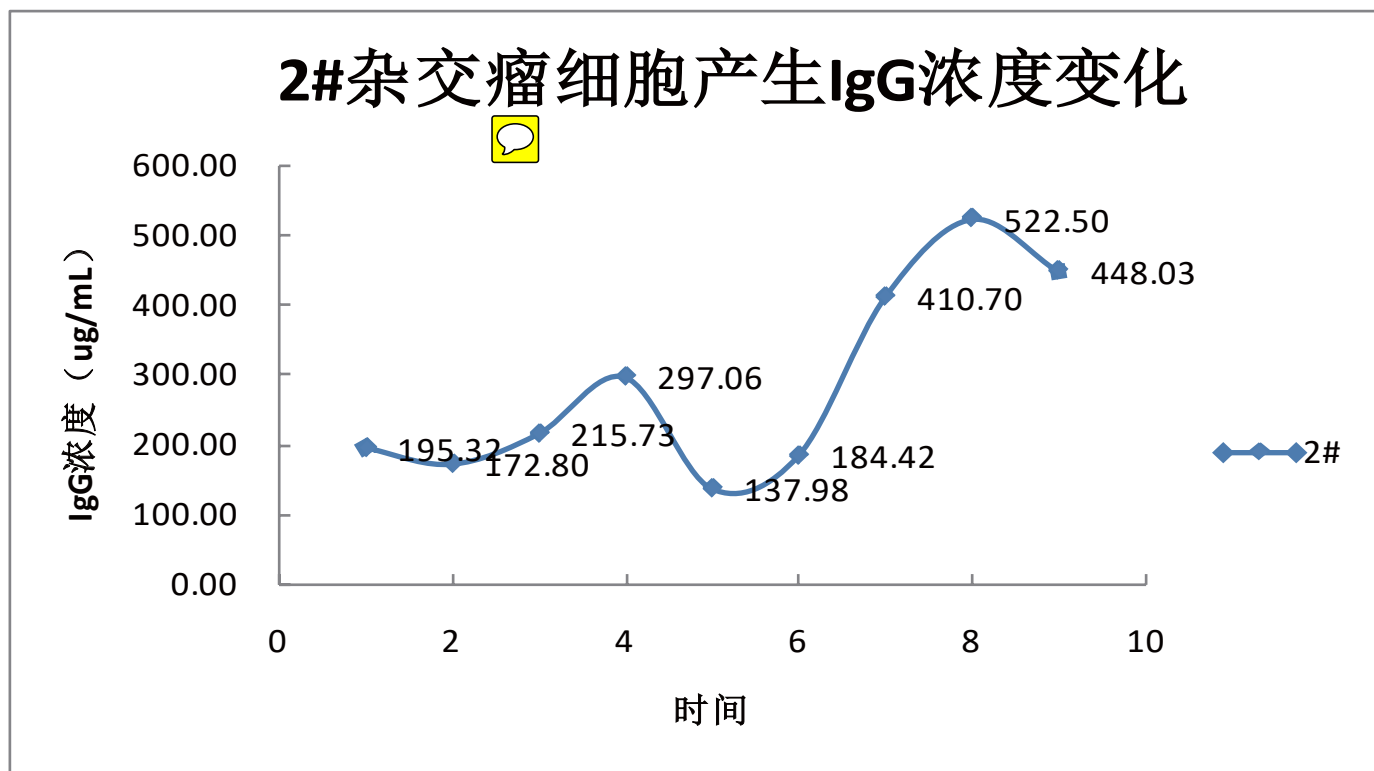
采用连续补液培养,体积扩大到100mL,开始入袋,接种密度 2×10^5 cells/mL。培养三天后补液200mL。第6天补液300mL,直至第10天。

五、杂交瘤细胞培养袋法 抗体表达数据对比

1#杂交瘤细胞抗体表达(培养袋法)



2#杂交瘤细胞抗体表达(培养袋法)



六、杂交瘤细胞培养过程中遇到的问题、产生的原因及解决办法

1、杂交瘤细胞初次培养及复苏效果不佳，如何解决此问题？

杂交瘤细胞系种类繁多，并不是所有的细胞系都能直接适应无血清培养基，如无法适应请先按照本公司驯化适应程序进行细胞驯化，驯化后的细胞即可完全适应本公司的无血清培养基。

复苏问题：如冻存的杂交瘤细胞活率较低，复苏时可加5%胎牛血清于无血清培养基中，可修复受损细胞的状态，细胞复苏时接种密度要求大于 1×10^5 cells/mL，可保证更好的复苏率。

2、杂交瘤细胞传代最低接种密度是多少？最佳的接种密度是多少？

经过我们反复测试，最低接种密度极限值 1×10^4 cells/mL，此密度仍可正常培养杂交瘤细胞，但细胞生长周期较长，6-7天达到峰值。

最佳接种密度为 $1-2 \times 10^5$ cells/mL，3-4天可达到峰值，细胞生长周期短，适合工业客户。

3、无血清培养杂交瘤细胞最大生长支持密度多少？怎么我养的几种杂交瘤细胞差距很大？

由于杂交瘤细胞系种类繁多，不同的细胞系最大生长密度也不一致，目前我们测试的细胞株最高的密度可到 3×10^6 cells/mL，最低的密度在 1.6×10^6 cells/mL。这取决于所培养的细胞株本身的特性。

4、贵公司无血清培养杂交瘤细胞抗体表达一般在什么水平？

目前我公司测试的两株细胞系，IgG抗体最高表达量在480-520mg/L，国外培养基IgG抗体最高表达水平在400-500mg/L，我公司的产品在抗体表达量上有明显的优势。

5、我培养的杂交瘤细胞抗体表达量总是很低，有办法进一步提高抗体表达量吗？

我公司在杂交瘤细胞培养方面，引入了全新的培养袋法，IgG表达量可从300-400mg/L提高到480-520mg/L，我们可提供相关技术支持。

七、产品质量保障2-1

我们认为，质量对产品选择有一票否决权。

细胞培养基的质量，最核心的有 2 点：

1、无菌。

污染的培养基，不仅会带来样本的损失、因子的损失、人工成本的损失等直接损失。还会带来诸多间接损失。

解读：

凡是不能将产品污染概率降低到 0‰的生产工艺，为有缺陷的生产工艺。避免不了产品污染。

我们

- 1、全国首条液体培养基全自动无菌机器人灌装线于 2015 年 6 月底投入使用，批次产能 1000L。配液、灌装均为设备在百级层流空间自动完成。
- 2、遍布生产线灌装区的 20 多个尘埃粒子计数器，实时记录打印灌装区内的尘埃粒子情况；
遍布 CIP 系统的上百个温度压力监测仪，精准指示工艺管线灭菌效果；
直连除菌系统的在线测试仪，实时监测大口径滤器完整性；
三套监测系统结合使用，做到了仅凭过程监测数据就可知产品是否无菌。



1000L配液罐与250L配液罐
适应不同生产批次需要



在线清洗与在线灭菌系统（CIP+SIP）



全自动无菌灌装系统，
小时产能500瓶，完全不需人工干预。



遍布生产线的控制与监测系统，
实现了过程控制而不是结果控制。

七、产品质量保障2-2

2、内毒素

培养液的内毒素过高，会带来其中的细胞的内毒素过高，内毒素负载过高的细胞进入动物体内，必然引起发烧等症状。

解读：

凡是组合降低内毒素的设备，产品内毒素要低于 0.25EU/mL，没有任何实现的可能性。

我们提供用户的杂交瘤细胞无血清培养基，内毒素低于0.25EU/mL。与国外最著名品牌指标完全一致。



应用了注射针剂专用蒸馏水系统，没有采用成本更低的超纯水系统内毒素更低。



专门的内毒素去除组合工艺进一步降低内毒素。

10 年的经历，给了我们保障质量的软件条件；国外先进制药装备企业开拓中国市场的努力，给了我们保障质量的硬件条件。我们现在液体细胞培养基产品方面的质量水准已经达到与国外产品完全一致的水准。



ISO9001



ISO13485



体外诊断试剂注册证书（15个）

2016 年，全国已有超过 50 多家著名的临床与工业的用户参观了我们的生产线。我们也期待更多的用户能够实地感受下我们的质量保障与质量水准。

