

高效筛选优质细胞系

加快重组蛋白和单克隆抗体生产细胞系的开发

内容

细胞系开发流程	2	应用：抗体和重组蛋白	
杂交瘤细胞筛选	4	单克隆抗体	8
细胞克隆筛选技术		G-蛋白偶联受体	10
方法学比较	5	其他蛋白质	11
快速、强大的克隆筛选方法	6	单克隆性	12
		细胞系开发解决方案	13

For more information, visit
moleculardevices.com

前言

在过去的十年里，采用哺乳动物细胞生产单克隆抗体和重组蛋白促进了生物治疗蛋白的繁荣。从1986年第一个重组蛋白药物获批到2011年，总共有96个重组蛋白药物获批上市^{1, 3}。全球市场从2014年到2019年的增长率预计为12.5%，到2019年预计达到39.6亿美元²。推动这一发展的关键因素包括：日益增长的单抗药物需求、新颖细胞系技术的出现以及疫苗产量的提升²。随着竞争加剧，对降低细胞系开发成本以及缩短上市时间的需求变得愈发紧迫。本文概述了细胞系开发的流程，并介绍了高通量筛选方法用于更快、更方便地开发高产细胞系。

细胞系开发流程

杂交瘤细胞、CHO细胞以及HEK 293细胞是常见的宿主细胞用于表达重组蛋白药物。开发稳定细胞系的第一步是向宿主细胞转入重组质粒。如果生产的是抗体，传统方法通过将骨髓瘤细胞和B细胞融合获得杂交瘤细胞。这些B细胞通常来自动物，比如小鼠。细胞转染或者细胞融合后，需要筛选大量细胞克隆以获得高表达的细胞(如CHO细胞)或抗原特异性的细胞(如杂交瘤细胞)。一旦确定候选细胞克隆，一系列功能分析将用于确定、验证和表征细胞株。最后，细胞克隆将逐级放大培养，并开展工艺优化。

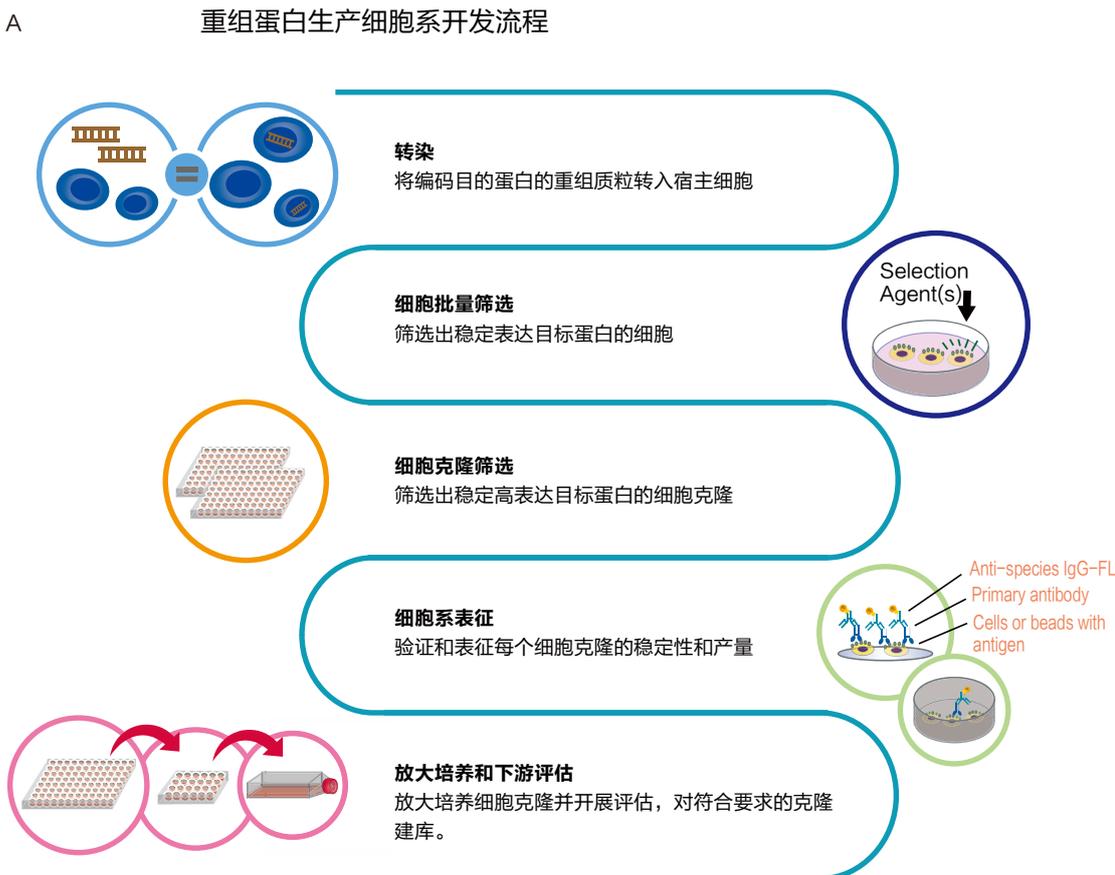
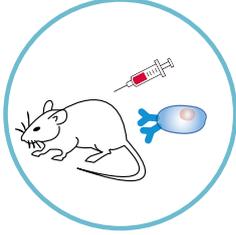


图1：重组蛋白生产细胞系(A)和杂交瘤细胞系(B)的开发流程。

- Lai T, Yang Y, Ng S. Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production. *Pharmaceuticals (Basel)*.2013; 6(5):579–603.
- Cell Line Development Market by Product (Equipment, Media, and Reagents), by Source, by Type, by Application (Bioproduction, Tissue Engineering & Regenerative Medicine, Toxicity Testing, Research, Drug Discovery) – Analysis & Global Forecast to 2019,” MarketsandMarkets Inc., Sept. 2014.
- Kim J, Kim Y, Lee G. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2012); 93:917–930.

B

杂交瘤细胞系开发流程

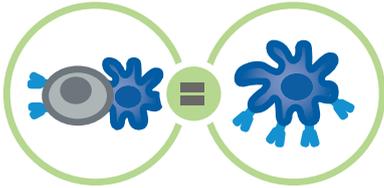
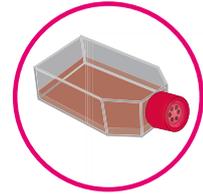


小鼠免疫&分离脾细胞

用特定抗原免疫小鼠，检测血液中的抗体，随后分离脾细胞用于制备杂交瘤细胞

准备骨髓瘤细胞

骨髓瘤细胞是永生化的细胞，与脾细胞融合后可以得到杂交瘤细胞。准备骨髓瘤细胞用于细胞融合。

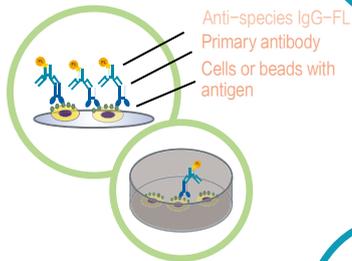
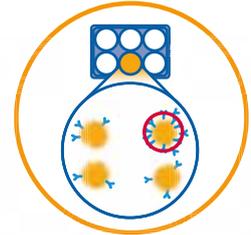


细胞融合

PEG处理使骨髓瘤细胞和脾细胞融合形成杂交瘤细胞。

克隆筛选和挑取

根据抗体特异性、抗体的类型以及产量等筛选和挑取候选细胞克隆。

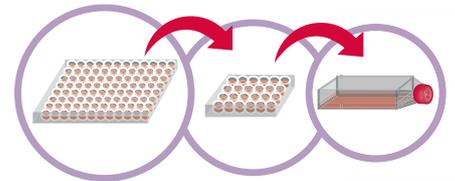


功能分析

对候选细胞克隆开展功能分析(如ELISA)，验证其特异性或产量等。

逐级放大培养

将目标细胞克隆主机放大培养，同时撤去筛选试剂。



放大培养

放大目标细胞克隆的培养规模(如生物反应器或大型摇瓶)。

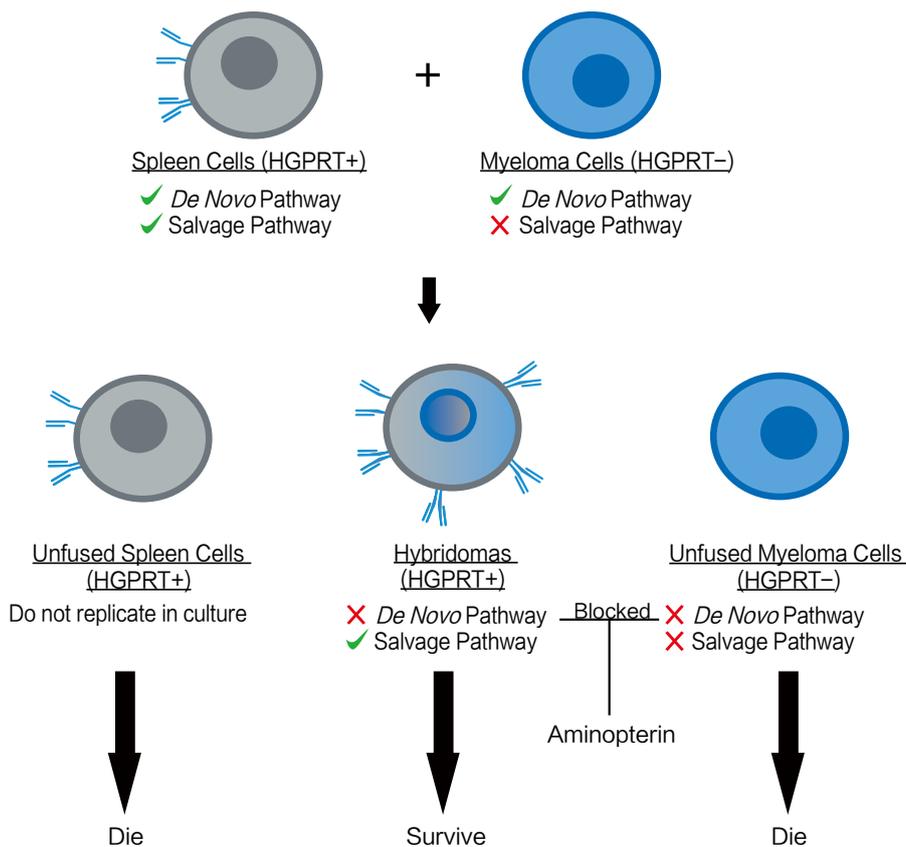


HAT法筛选杂交瘤细胞

杂交瘤细胞来自骨髓瘤细胞和脾细胞的体外融合用于生产抗体。将这两种细胞融合的原因是脾细胞不能增殖导致难以收集抗体，而骨髓瘤虽然能够增殖却不能分泌抗体。因此，融合获得的杂交瘤细胞兼具两者的特性，能够在体外增殖而持续分泌抗体。在细胞融合过程中，重要的一点是要将杂交瘤细胞从骨髓瘤细胞和脾细胞中筛选出来以提高抗体产量。

脾细胞不能在培养条件下增殖因此可以很容易地被筛选。骨髓瘤细胞则相对困难，一般利用含次黄嘌呤(hypoxanthine, H)、氨基蝶呤(aminopterin, A)和胸腺嘧啶核苷酸(thymidine, T)的培养基(即HAT培养基)筛选。其生物学机理为：哺乳动物细胞可以通过两条途径合

成核苷酸：生物合成途径(de novo pathway)和补救途径(salvage pathway)。正常条件下，哺乳动物细胞会采用生物合成途径完成DNA复制。当生物合成途径被抑制时，在提供次黄嘌呤(H)和胸腺嘧啶核苷酸(T)的条件下，细胞会利用补救途径完成DNA复制。HAT筛选的关键在于选用HGPRT缺陷的骨髓瘤细胞，而HGPRT是补救途径所必须的一个酶。在生物合成途径被氨基蝶呤(A)抑制的情况下，骨髓瘤细胞因HGPRT缺陷而不能增殖。杂交瘤细胞从脾细胞获得正常功能的HGPRT酶而能继续增殖。筛选结束后不需要再添加氨基蝶呤(A)。撤去氨基蝶呤的筛选压力后，杂交瘤细胞尚未完全恢复，还需要补救途径以完成复制，因此培养基中需要添加次黄嘌呤(H)和胸腺嘧啶核苷酸(T)。当杂交瘤细胞完全恢复后，HT也可以撤去。



相关资源

- [Poster: High-throughput hybridoma cloning and screening for antibody discovery](#)

克隆筛选技术

转染或融合后得到的细胞群体内存在高度异质性。因此筛选大量克隆以获得高表达细胞系是必需的一步操作。下表比较了常见的几种筛选技术。

筛选技术	描述	优势	劣势
有限稀释法	细胞逐级稀释后按每孔小于1个细胞的密度接种至孔板。在如此低的密度下，推定克隆来自单个细胞。	<ul style="list-style-type: none"> • 低成本； • 操作相对简单； • 方法成熟； 	<ul style="list-style-type: none"> • 耗时、通量低、劳动强度大； • 需要借助其他方法，如显微镜，验证单细胞来源； • 需要多轮筛选以获得高表达细胞；
流式细胞分析仪 (FACS)	仪器逐个分析细胞的荧光特征，随后利用电压将细胞引入特定收集管。	<ul style="list-style-type: none"> • 高通量，更短时间内找到候选细胞； • 可以分析细胞的多个特征； • 可以实现单个细胞或一群细胞的分选； 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要额外的分析以鉴定高表达细胞； • 单细胞分离和流体剪切力影响细胞活性； • 分选依据细胞膜表面的蛋白质，而不是真实分泌的蛋白质； <ul style="list-style-type: none"> • 很多蛋白质无法被该方法检测； • 这种间接检测方法 with 蛋白质表达水平的相关性较差；
ClonePix 2系统	利用自动化挑选系统从细胞群体中筛选出高价值的细胞克隆。	<ul style="list-style-type: none"> • 通量高，仅少量人工操作就可以完成数千个克隆的筛选； • 可以依据用户定义参数筛选克隆(如克隆形态、尺寸、间距以及荧光强度)； • 利用荧光检测试剂实现高表达克隆的原位检测； • 无菌环境下挑取克隆； • 方法成熟； • 在半固体培养基中筛选分泌蛋白的克隆； 	<ul style="list-style-type: none"> • 通量不及FACS高，但是可以检测一段时间内的蛋白质表达水平，因此相关性更好。

快速、强大的克隆筛选系统

有限稀释法因为低效率而被研究人员逐渐摒弃。自动化可以提高效率、通量，从而缩减细胞系开发时间。ClonePix 2系统是一个不错的选择，它能自动筛选大量的细胞克隆。哺乳动物细胞在半固体培养基(如CloneMedia)中形成分离的细胞克隆。ClonePix 2系统逐个挑取克隆从而在一步操作内实现高概率的单克隆性。此外，荧光检测试剂(如CloneDetect)可以直接添加到半固体培养基中从而原位检测

分泌蛋白的含量或抗原特异性。ClonePix 2系统利用白光成像检测克隆形态和尺寸(反映单克隆性和生长速率)，再利用多通道荧光成像原位定量检测分泌蛋白、细胞膜蛋白，或者抗原的特异性。仪器配套的软件可以根据用户定义参数(如荧光强度)对克隆进行排序，从而筛选出高表达的细胞克隆。随后仪器可以准确挑取排名靠前的细胞克隆，从而避免有限稀释法带来的误差。

Select and pick with more accuracy and confidence

铺细胞到半固体培养基

根据系统的分析才排列，用户筛选克隆

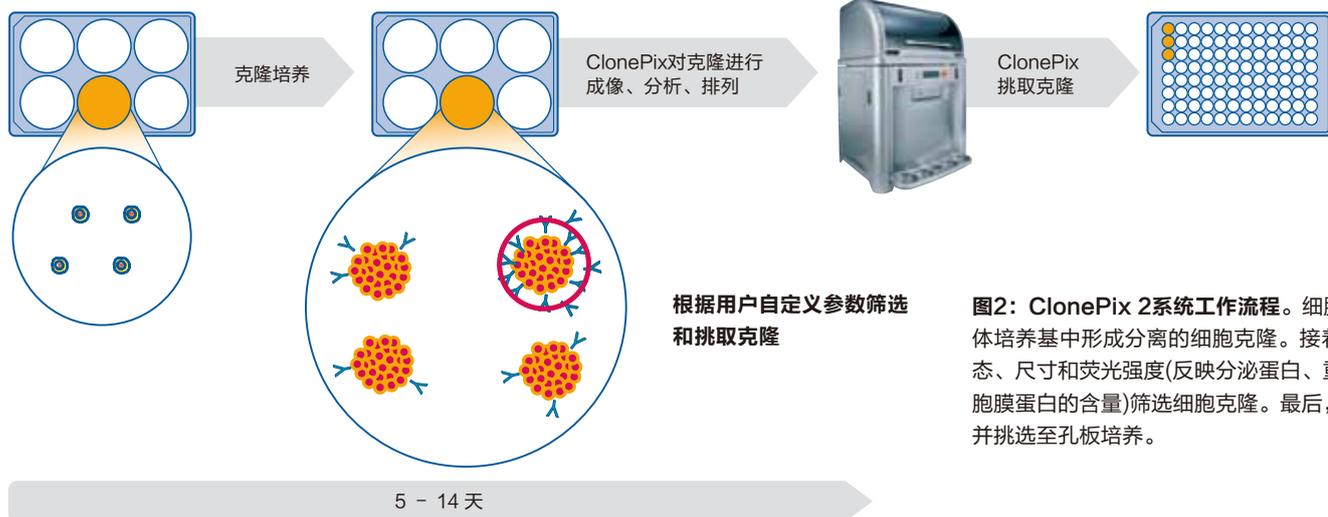
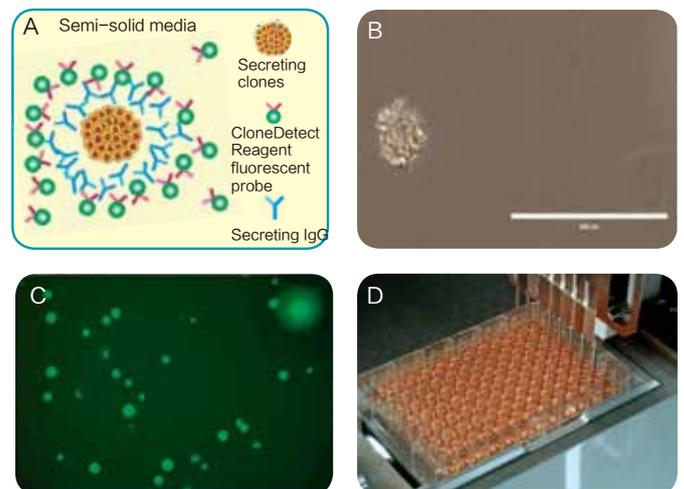


图2: ClonePix 2系统工作流程。细胞接种至半固体培养基中形成分离的细胞克隆。接着依据克隆形态、尺寸和荧光强度(反映分泌蛋白、重组蛋白或细胞膜蛋白的含量)筛选细胞克隆。最后，对克隆排序并挑选至孔板培养。

图3: ClonePix 2技术的原理。(A)检测细胞克隆分泌抗体的示意图。(B)白光成像检测细胞克隆。(C)荧光成像检测抗体。(D)ClonePix 2系统自动挑取克隆并转移至终板。



ClonePix vs. limiting dilution

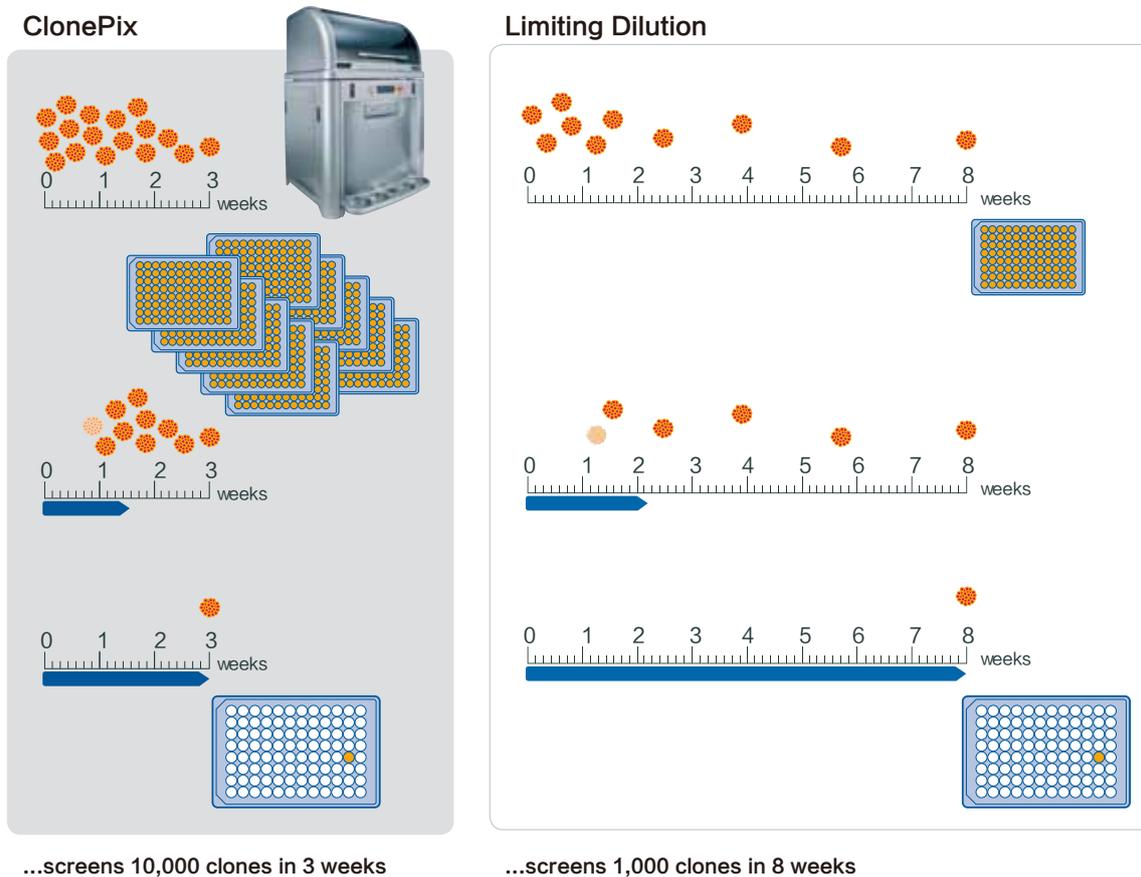


图4：相比传统的有限稀释法，ClonePix系统能够显著缩短细胞克隆的筛选时间。有限稀释法逐级稀释细胞浓度，最后按每孔小于一个细胞的密度接种至孔板中培养，这种方法往往需要耗时数月才能完成目标数量的克隆的筛选(如8周筛选约1000个克隆)。ClonePix系统可以显著缩短筛选时间(如3周筛选约10000个克隆)。

相关资源：

- **Publication:** Rapid automated selection of mammalian cell line secreting high level of humanized monoclonal antibody using ClonePix FL system and the correlation between exterior median intensity and antibody productivity
- **Poster:** Rapid screening and selection of stable high producing clones
- **Brochure:** ClonePix 2
- **Poster:** Integration of automated colony picking into fast track cell line development process

单克隆抗体

单克隆抗体药物受到持续的关注。在2008年到2013年期间，单抗克隆药物的销售额增加了90%，从约390亿美元增长至750亿美元，而其他重组蛋白药物仅增长了约26%⁴。在杂交瘤细胞开发过程中的一个主要瓶颈在于从大量的异质性细胞中筛选出高产的候选细胞。利用自动化技

术可以克服这一挑战，如ClonePix系统可以原位检测分泌的抗体。

以下是一个筛选分泌特异性抗双链DNA(dsDNA)病毒抗体的细胞系的实例。

目标

筛选分泌特异性抗dsDNA病毒抗体的细胞系。

背景

亲本细胞系采用有限稀释法制备。抗体的历史产量低于3mg/L，且纯化后的抗体质量差异较大，制备过程中存在不同程度的聚合物。

方法

放大培养亲本杂交瘤细胞后用ClonePix系统分析并挑取目标克隆。从源板中一共挑选出480个克隆，随后用CloneSelect Imager™观察5天以确定细胞生长，挑出排名前146个细胞克隆开展抗原特异性分析。

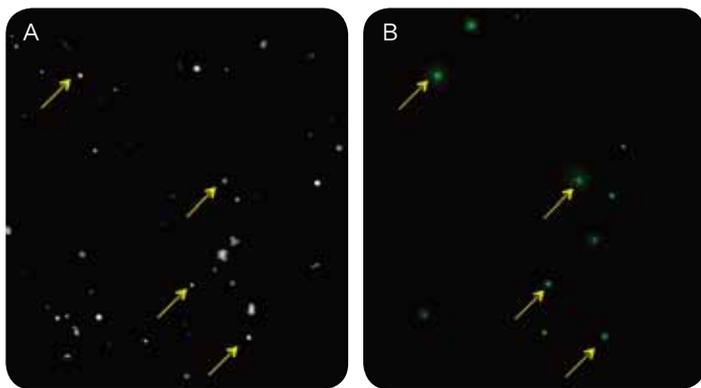


图5：检测亲本杂交瘤细胞IgG的分泌水平，结果显示只有少量细胞(约7%)分泌dsDNA病毒特异性的抗体。杂交瘤细胞铺于CloneMedia半固体培养基。荧光检测试剂CloneDetect(绿色)可原位检测分泌的IgG。(A)ClonePix系统白光成像(150 ms)检测细胞克隆。(B)荧光成像(500 ms)定量检测细胞克隆分泌的抗体。FITC信号强度的变异性表明杂交瘤细胞的不稳定性和非单克隆性。

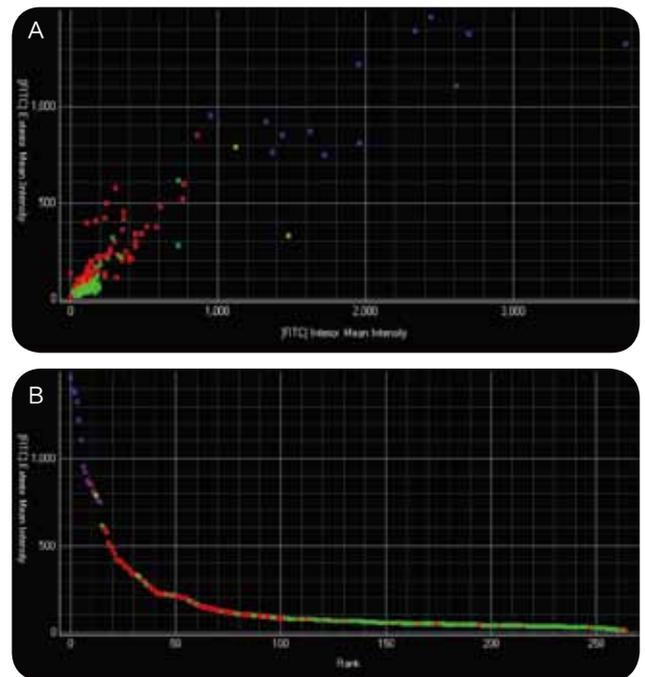


图6：利用ClonePix软件分析挑取高活性、高表达的细胞克隆。(A)散点图显示Exterior Mean Intensity和Interior Mean Intensity线性相关，表明抗体分泌正常。抗体产量低源于细胞群体内的异质性，仅有少量细胞分泌抗体而大部分细胞不分泌抗体。(B)排序图显示被挑取的细胞克隆(紫色)。

4. Ecker D, Jones S, Levine H. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*. (2015)7:1, 9-14.

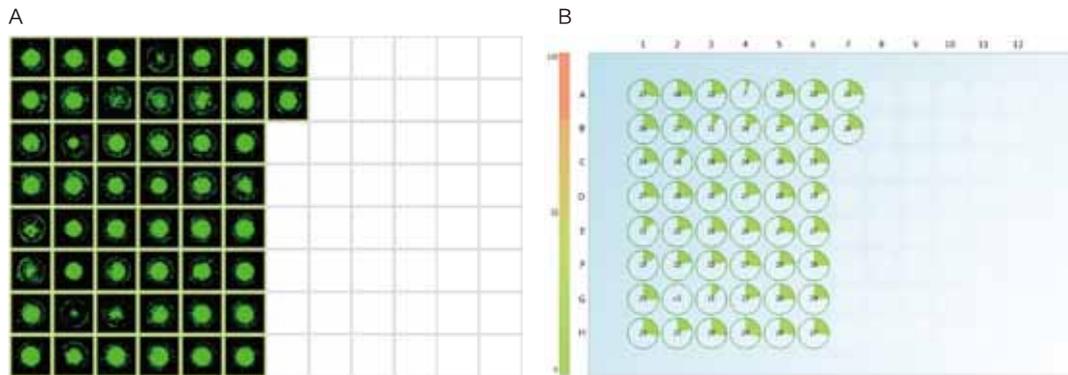


图7: Cloneselect Imager软件分析确定生长状况良好的克隆。ClonePix系统筛选克隆并挑取至96孔板培养, 随后用Cloneselect Imager观察7天以分析细胞生长状况。(A)Cloneselect Imager软件分析选定克隆的图像, 细胞生长区域显示为绿色。(B)饼图显示第7天时的细胞汇合度。

结果

最终获得两株亚细胞克隆, 抗体产物与抗原的结合力良好, 且产量较亲本克隆有极大提升(17–25 mg/L vs. ~1 mg/L)。整个杂交瘤细胞筛选的耗时缩短了50%以上。

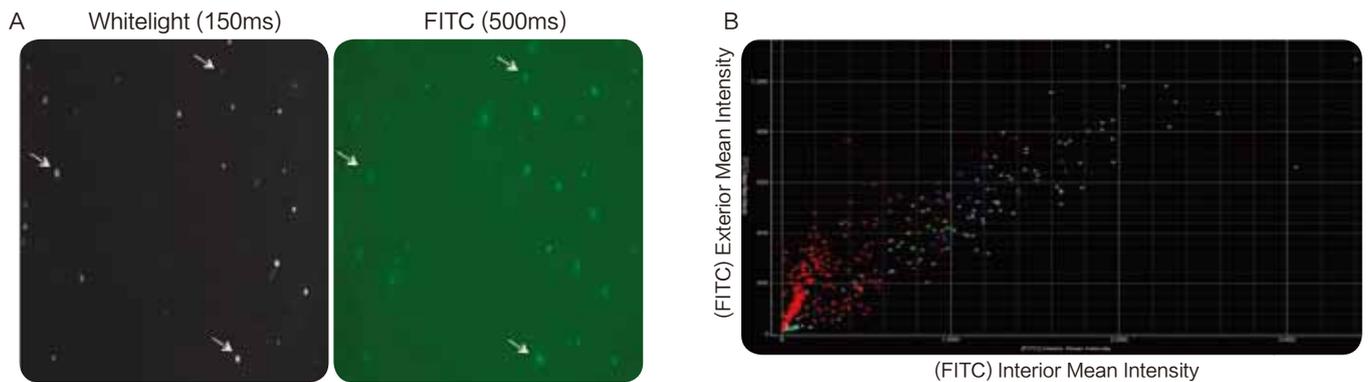


图8: Cloneselect系统对杂交瘤细胞亚克隆, 结果显示抗体分泌较一致且产量更高。图为其中一株亚克隆的结果。(A)亚克隆后FITC阳性克隆占比较亲本克隆(图5)显著提升。图为采用100 U/mL的CloneDetect试剂测定第7天时的抗体分泌量。(B)散点图显示Exterior Mean Intensity和Interior Mean Intensity之间线性相关, 更多克隆出现在上象限表明更多的FITC阳性克隆。

相关资源

- **Application Note:** Enhanced development of virus-specific hybridomas using ClonePix and Cloneselect Imager Technologies
- **Webinar:** Improved hybridoma discovery for immunodiagnostics using ClonePix and Cloneselect Imager technologies
- **Poster:** Rapid selective in situ screening of hybridomas in semi-solid medium

G-蛋白偶联受体

G-蛋白偶联受体(GPCR)是药物发现中常见的靶标。哺乳动物细胞内源表达水平较低，每个细胞一般不超过3000个拷贝。这个表达水平虽然足够维持适当的受体功能，但是对GPCR药物发现提出了挑战。大部分筛选方法需要在细胞膜上有更高的GPCR表达水平。在一些简单的细胞里构建表达体系的尝试遇到了不少的困难，或来自蛋白质折叠(大肠杆菌)，或来自低表达(酵母)，或是不正确的翻译后修

饰(杆状病毒)。因此需要GPCR高表达的哺乳动物细胞用于药物发现。

ClonePix系统可以帮助从大量异质性的转染细胞中分离出稀有的高表达细胞。利用白光成像和荧光成像，ClonePix系统可以定量检测内源性的和细胞表面的GPCR。

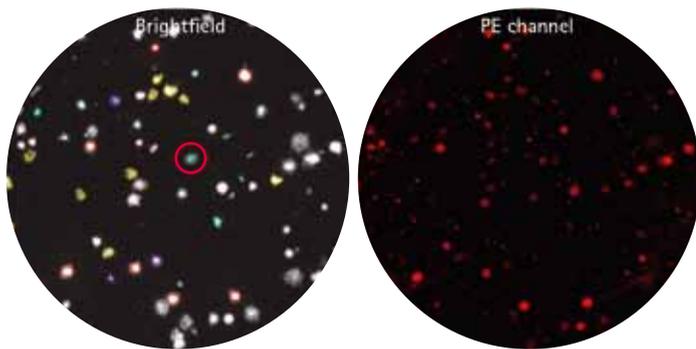


图9: ClonePix系统检测CHO-M1细胞。用表达G protein-coupled muscarinic 1 cholinergic receptor(GPCR-M1)的CHO-M1细胞系阐述ClonePix系统检测膜表面蛋白的可行性。用偶联藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)的抗M1抗体检测细胞克隆，ClonePix系统依据荧光强度筛选并挑取目标克隆。细胞克隆呈现出不同的荧光强度，表明ClonePix系统能够区分不同水平的GPCR-M1蛋白。

相关资源

- **Application Note:** Rapid selection and development of GPCR expressing mammalian cell lines using novel ClonePix technology
- **Webinar:** Identification and selection of GPCR cell lines with ClonePix 2
- **Poster:** Rapid selection and development of GPCR expressing mammalian cell lines using novel ClonePix technology

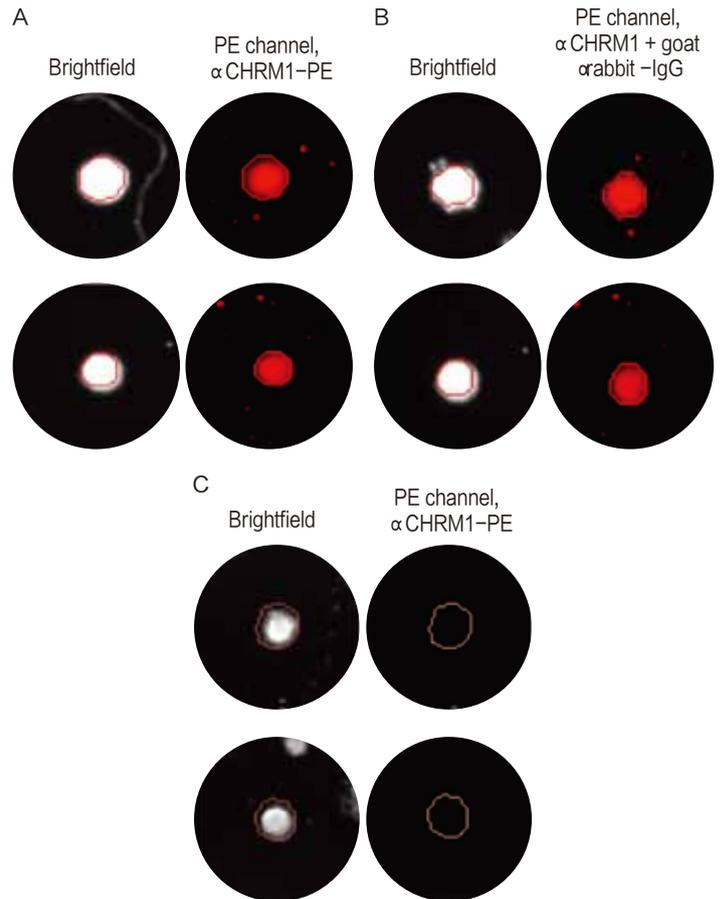


图10: 用直接标记的抗体(A)和间接标记的抗体(B)筛选表达GPCR-M1蛋白的细胞克隆。荧光强度和阳性克隆的M1表达水平成正比。(C)阴性对照，CHO-K1细胞在PE通道下没有荧光信号。

其他蛋白质

除了抗体、GPCR外，ClonePix系统还可以用于筛选表达其他蛋白质的高价值细胞，如重组蛋白质(带标签或不带标签)和细胞膜蛋白。利用荧光标记的目的蛋白特异性抗体，结合成像分析和自动化挑取，ClonePix系统能够显著提高表达细胞系的筛选效率。以下是一些实例。

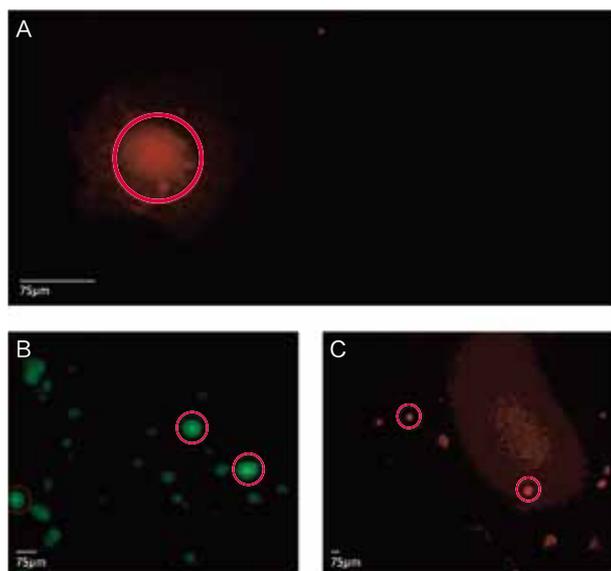


图11：筛选转染表达细胞膜蛋白的细胞。(A)Jurkat细胞生长于半固体培养基，第12天加入Red-Phycoerythrin(RPE)标记的抗T细胞受体CD3的抗体，第14天成像并挑取细胞克隆。(B)HEK293细胞生长于半固体培养基，第12天加入FITC标记的抗ICAM-1的抗体，第14天成像并挑取细胞克隆。(C)CGR8小鼠培养干细胞生长于半固体培养基，第9天加入RPE标记的抗SSEA-1的抗体，第10天成像并挑取细胞克隆。



图13：检测和挑取带标签的非抗体类蛋白质。可以利用荧光偶联的抗标签抗体检测重组蛋白。用anti-His和anti-FLAG的抗体混合物检测表达His6-和FLAG-标签的重组蛋白的CHO细胞。(A)贴壁CHO细胞克隆的白光成像结果。(B)细胞克隆的荧光成像结果。CHO细胞在半固体培养基中形成悬浮克隆，随后用抗标签的抗体检测。Anti-His6的抗体偶联FITC，从而实现分泌蛋白的荧光检测。

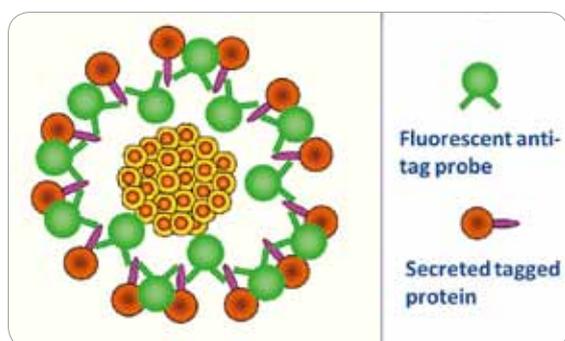


图12：检测带标签重组蛋白的原理。荧光偶联的抗标签抗体与蛋白质结合在克隆周边并原位显色。

相关资源

- Application Note: Rapid automated selection of mammalian cell colonies by cell surface protein expression
- Application Note: Rapid and efficient selection of high producing mammalian cells secreting non-mAb proteins

单克隆性

当开发细胞系用于生物制药时，不管是从质量角度还是从符合监管要求的角度，保证细胞系来源于单个祖细胞都是非常关键的，即要求细胞系的单克隆性。传统的克隆方法(如有限稀释法和FACS)利用统计分析确定单克隆性的置信区间。但是，监管文件要求更加有效的技术和方法确定单克隆性。越来越多的研究人员采用成像系统，如CloneSelect Imager，验证单克隆性并检测细胞的生长过程。

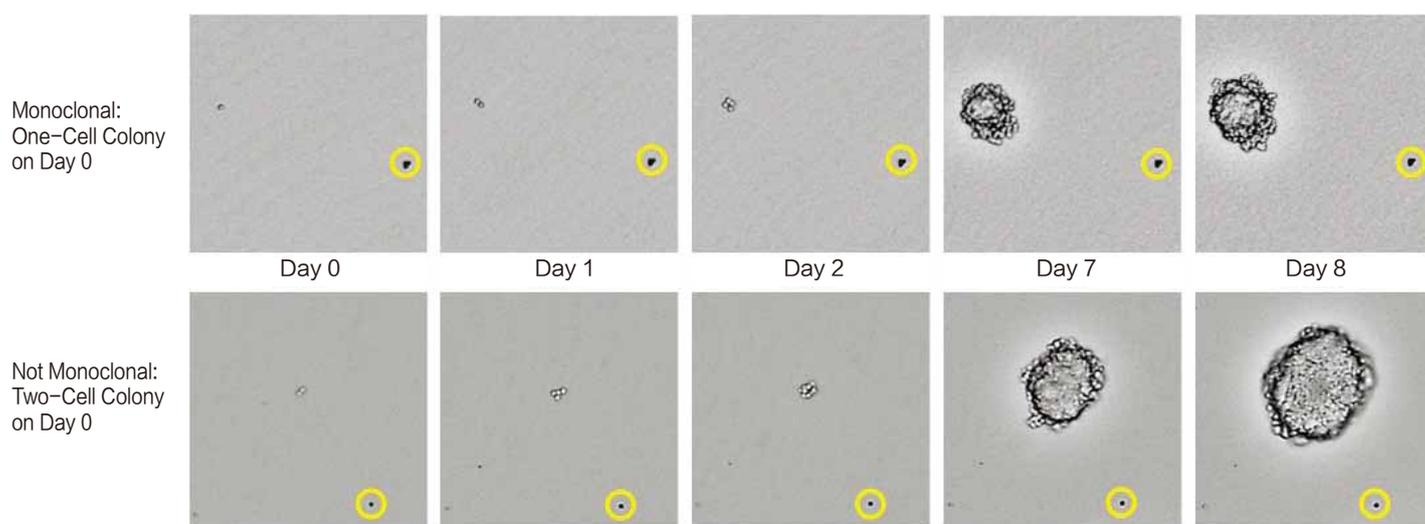


图14: CHO-S细胞在CloneMedia CHO Growth A半固体培养基中的生长。利用CloneSelect Imager采集不同时间点细胞生长的图片。在第0天，上排观察到一个细胞而在下排观察到两个细胞。黄圈用于指示克隆所在的位置方便追溯克隆的生长过程。

One cell on Day 0 – monoclonal

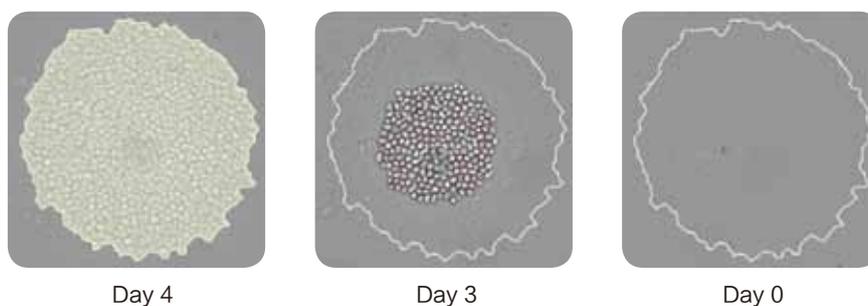


图15: 通过观察克隆的来源验证单克隆性。追溯每个孔的生长过程至起点(第0天)，从而提供单克隆性的证据。

相关资源

- **Poster:** Rapid Monoclonality Verification Methods to Boost Cell Line Development
- **Brochure:** CloneSelect Imager
- **Application Note:** Confident identification of monoclonal CHO-S cells grown in semi-solid media using the CloneSelect Imager

细胞系开发解决方案

For detailed information, select the images or text.



ClonePix 2 System



CloneSelect Imager



XP Media and CloneMedia Complete Kit for Mouse Hybridoma Generation



CloneMatrix reagents and CloneMedia reagents



CloneDetect Reagent

moleculardevices.com

13



扫一扫关注我们
的官方微信

Molecular Devices 大中华区 Email: info.china@moldev.com
上海 电话: 86-21-3372 1088 传真: 86-21-3372 1066
北京 电话: 86-10-6410 8669 传真: 86-10-6410 8601
成都 电话: 86-28-6558 8820 传真: 86-28-6558 8831
台北 电话: 886-2-2656 7585 传真: 886-2-2894 8267
香港 电话: 852-2248-6000 传真: 852-3010 2828

www.MolecularDevices.com www.MolecularDevices.cn
地址: 上海市长宁区福泉北路518号1座501室 200335
地址: 北京市朝阳区广渠东路3号中水电国际大厦612&613室 100124
地址: 成都市锦江区东御街18号百扬大厦2208室 610016
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段89号3楼
地址: 香港皇后大道东1号太古广场三座4楼406-9

