



加速细胞系开发以实现商业化生产的指南

2021年7月15日 | Fern Slingsby, Katy McLaughlin

关键词或短语:

细胞系开发, 药物开发, 工艺开发, CHO细胞系, 生物制药, 蛋白质

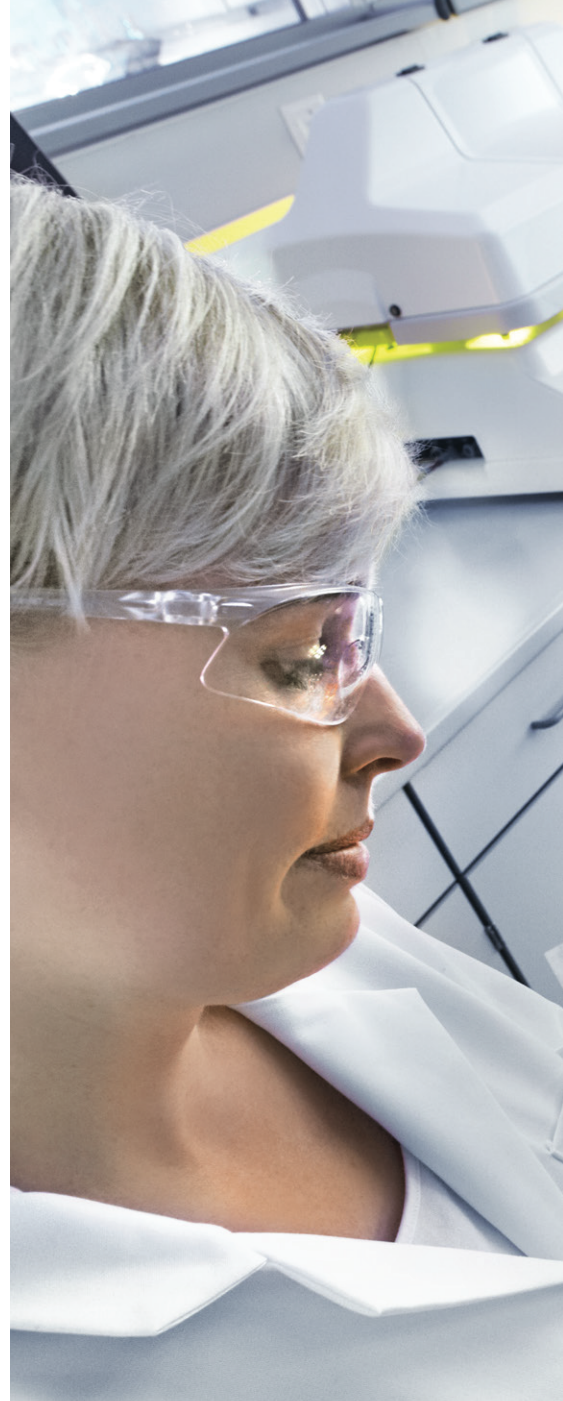
Simplifying Progress

SARTORIUS

细胞系开发： 可靠生产工艺的基础

生物技术药物产品或生物制剂正在迅速发展，也已成为医疗保健行业的一个重要分支。生物技术药物主要由治疗性重组蛋白组成，其治疗各种疾病，特别是癌症和炎症疾病方面取得了巨大的成功⁽¹⁾。然而，开发一种可靠的商业化生物技术药品生产工艺在设计思路和技术上都有很高的要求，而且项目期间失败的可能性很高。

生物技术药品生产利用活的宿主细胞作为生产中心。开发稳健、高产的细胞系是可靠生产工艺的基础。然而，细胞却引入了不确定性及一系列独特的技术挑战。尽早意识到高效工艺开发的可能障碍，对于做出明智的项目决策至关重要。在这里，我们先讨论与生物制剂生产中的细胞系开发相关的挑战，随后概述了可以帮助生物技术开发人员规避错误决策风险的解决方案。



细胞系开发工艺

开发一个强大、稳定的细胞系是生物工艺开发中的一个重要步骤，通过其可以生产出足够的产品用于测试、优化及商业规模的生产。在项目早期阶段采用的路径将决定项目未来的成败。下面列出了细胞系开发工作流程的概况。

1. 基因克隆与转染

首先，必须对所选哺乳动物宿主细胞系的细胞进行工程改造，以表达所需的蛋白质。那么必须合成含有治疗蛋白编码所需遗传物质的表达载体，并用于转染细胞。转染过程会产生一个混合的细胞群，然后对该细胞群进行筛选、汇集并分析。早期分析提供了解携带重组DNA细胞的一般特征及其产生预期生物制剂的能力的见解。

2. 克隆筛选及选择

接下来，必须分离出单细胞并对其进行扩增，用以生成克隆种群。随后进行筛选以确定最理想的克隆。高性能克隆必须是稳定的，且能够以高表达量生产所需的蛋白质。在进一步表征之前，还应验证细胞群的单克隆性。



3.细胞系特性分析

一旦完成了筛选和克隆选择,应对表现最好的克隆应进行扩增及充分的特性分析,以确保该细胞能够重现所需生物制剂的所有特征。应采用多重试验来评估产品的关键质量属性(CQA),如效价、结合力、物理化学和结构特性。此外,还应使用新一代测序方法(NGS)来检测转基因的插入位点,并进一步了解克隆的稳定性。

4.扩增与优化

不同规模的最佳生产参数可能需要进行几轮的优化才能获得。开发人员必须确认产品质量从试验规模到商业化规模保持不变。对各种培养基成分和工艺参数进行迭代测试可以确定更多的机会,以便在必要的生产规模下提高蛋白质生产效率和产量。

5.细胞库建立

最后,对细胞进行扩增,创建高密度的细胞库,用于生物技术药品的连续生产。建立、全面测试符合GMP认证的主细胞库(MCB)并进行表征分析,为创建工作细胞库(WCB)和开始生产做准备。

细胞系开发面临的关键挑战

在创建和优化稳健细胞系的过程中,可能会在不同的阶段出现不同问题。但是,在早期工艺开发阶段增强对未来的潜在挑战的认识有助于降低失败风险,减少重复工艺相关费用,并确保细胞系和生物疗法满足监管要求。

选择合适的细胞系

生物制剂通常是高度结构化的大分子。它们在细胞内的表达、加工、包装和运输机制都非常复杂。因此,生产一种可稳定合成产品并准确捕获其特征的细胞系是其临床功能所必需的,但在技术上却具有一定的挑战性。

决定使用哪种细胞系进行生物技术药物的生产至关重要,因为其性能决定了整个生产工艺的效率。功能不良的细胞系可能需要开发人员改变既定的方案,并会产生进行多轮优化的相关成本。

合适的细胞系将易于转染/转换,从而高效地生产所需的生物制剂。

所选细胞系必须具有创造产品所有生物学特征的性能,包括结构部分和翻译后修饰。其他要考虑的问题包括细胞系的稳定性、历史、生长特性和所需的培养条件。

中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系是生产重组蛋白最常见的选择,因为它们有良好的高效蛋白质生产记录,当然还包括其他因素 (2)。然而,包括人类细胞系在内的其他各种选择可能更适合于某些应用,例如,避免潜在的免疫原性非人性翻译后修饰 (3)。

克隆筛选

筛选细胞以识别并选择高性能克隆是一个复杂而艰巨的过程。克隆性能可能不可预测,因此筛选的克隆数越多,发现罕见、高产细胞系的可能性就越大。

有效的筛选策略可能需要进行几轮的优化,并可能导致工艺开发出现重大延迟。一旦确定了几个有效的克隆,应进行多次试验,以便全面了解每个克隆的特征,这样才能筛选出性能最佳的克隆。进行这些试验可能需要一系列专业知识,并且可能需要大量的人力和时间。

克隆筛选也应在有代表性的条件下进行,以确保克隆后续也适用于受控的生物反应器环境。例如,摇瓶可以筛选出在溶解氧低或pH值控制差的条件下表现更好的克隆,而这些条件在生物反应器培养中不太可能存在。



早期表征分析和优化

完成克隆筛选和选择后,必须对所选克隆(或少数克隆)进行扩增及全面的表征分析。应采用正交法对生产的生物制剂进行综合分析,以证明其安全性和有效性。除了标准的安全性和功能性试验外,生物仿制药产品还必须接受进一步的测试,用以建立其与原研药的可比性,确认它们之间不存在任何临床意义上的差异。与之相关的问题是要确保维持生产工艺的一致性;细胞生长条件的任何波动都会显著影响产品的质量。

综合性表征分析需要使用不同的试验,每种试验都可提供药品特性和生物功能相关的不同信息。这些分析可能要使用多种仪器、平台及方法。此外,评估产品的特性和质量需要对来自不同技术的数据集进行分析和集成。这就需要具备跨越多个学科的大量专业知识,这对于小型生物技术公司来说可能是难以实现的。最后,重复采样也会产生错误、不一致以及污染细胞培养物和产品等风险

可扩展性

生物制剂生产过程中最重要的障碍之一是放大过程以进行商业化生产。使用可能不适合更大规模条件的模型进行决策可能会成为成功商业化道路上的障碍。

此外,放大通常需要将工艺转移到中试规模,并在每一步进行实质性优化,这会花费高昂成本,并可能会造成重大延迟。

开发思路

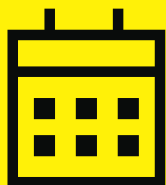
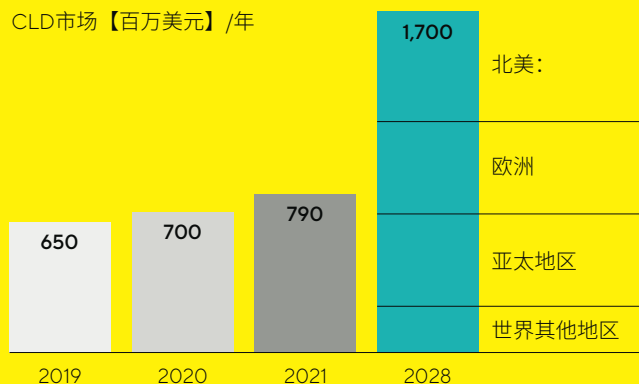
除了技术上的挑战,细胞系开发还表现出一些开发思路上的复杂性。在工艺开发的早期必须考虑的一个重要因素是开发者是否有能力建立和测试新的细胞系,如果有,他们将会采用什么技术平台。

开发者必须评估如果在内部完成,从开始到结束的整个工艺是否高效和经济;或者外包某些步骤可能会更提高生产力和成本效益。细胞系开发和维护需要符合GMP认证的设施以及具有必要技能的专业团队,从而可以根据要求管理和监管操作。

细胞系开发事实与数据

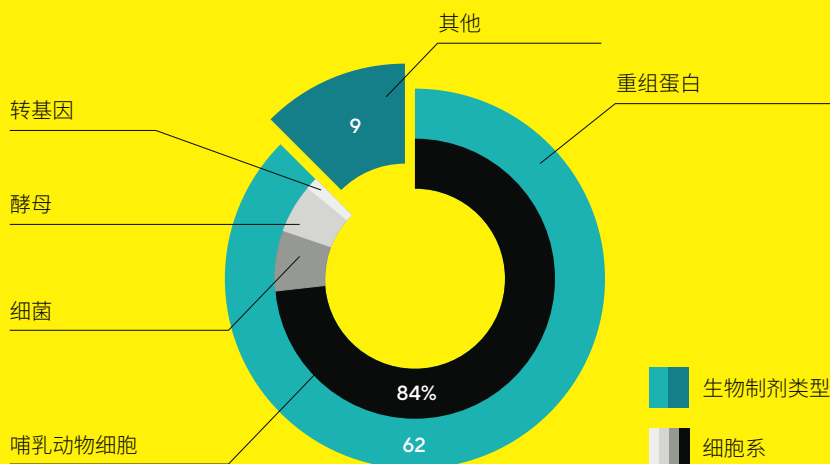
到**2028**年，全球细胞系开发服务市场的收入预计将达到**17亿美元**。

CLD市场【百万美元】/年

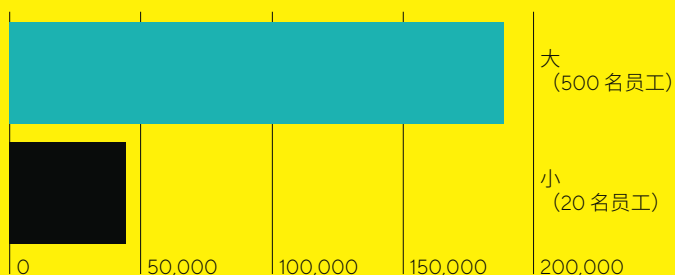


细胞系开发是一个**耗时**的过程——GMP级别细胞系的开发完成时间通常在**12-18个月**。

在过去**4**年中，**71**种新批准的生物技术药品活性成分中有**62**种是重组蛋白，其中**84%**来自**哺乳动物细胞**。



GMP认证的年度成本[\$]



对于小型生物技术公司 (<20名员工) 而言，GMP认证的费用**高昂**。FDA估计初始成本约为**26000美元**，此外每年需追加**46000美元**。

克服障碍

中小型生物技术公司可以探索各种解决方案，以降低在生物制剂开发中相关的风险。实际行动可能包括将项目的某些方面外包给具有必要专业技能的外部组织，以便快速满足开发人员的需求。其他解决方案可以在内部实施，其中包括在商业生物制剂生产中采用一些先进的技术和表征分析服务。

已建立的细胞系

使用已建立的表达平台可显著缩短项目时间，并降低一些与生物技术药品开发相关的不确定性。Cellca细胞系开发系统就是这样的平台，它是一个可扩展的多功能生物生产平台，拥有赛多利斯提供的完全限定的培养基系统。专门的细胞系降低了对新细胞系进行迭代优化的需求；它们旨在减少可变性，最大限度地提高产量和效率，并大大缩短开发时间。例如，开发人员可利用Cellca细胞系开发技术在短短14周内从DNA进展到研究细胞库，并有利于从小规模试验到大规模生产的直接放大。

此外，已建立的细胞系具有完整的历史和成功的项目记录，这会让开发人员对其细胞系开发项目充满信心。

用户可以获得 Cellca CLD 技术许可证，以在内部生产生物制剂。高效开发可靠的细胞系需要强大的基础设施和丰富的专业技能。然而，Cellca CLD 技术是一种“即插即用”的系统，其旨在简化细胞系开发，并在整个项目中提供全面支持。

已建立的载体

除了利用已建立的细胞系来简化下游工艺开发外，在内部开发细胞系时，还可以利用经过验证的表达载体。Cellca表达载体系统是一款灵活的工具，其经过精心设计，能够增强并稳定地表达插入的遗传物质，同时还能最大限度地减少对宿主细胞产生的任何副作用。

对细胞系开发服务的早期投资可消除反复试验的需要，从长远来看可能更经济。将部分或全部开发工艺外包给赛多利斯等外部公司，即可获得针对特定目的构建的细胞系。这些服务均由专业的科学家来运行，他们通常在处理很难表达的大型复杂分子表达平台方面具有非常丰富的经验。

外部细胞系开发

开发人员在开始细胞系开发之前，应该仔细考虑自己进行商业规模的 GMP 标准合规生产的能力。在某些情况下，将项目中最耗时或操作上最具挑战性的部分外包可能是最好的选择，这能让开发人员获得最新的技术和专业知识，而不会面临相关的开发思路和监管挑战。

然而，生物技术公司将需要仔细设计他们的平台，以便后期在设施之间的顺利转移。

外包的细胞系开发越来越受欢迎(4)，而且开发人员现在在选择最符合其需求的服务时具有相当多的选择。合适的服务合作伙伴会在交付成功的蛋白质生产细胞系方面有成功的记录，并能提供细胞系生成方面的重要专业知识。

赛多利斯的Cellca细胞系开发平台提供从初始克隆筛选到研究细胞库的诸多服务，这意味着您无需投资设施、试剂和工时，即可确保在您的生产过程的最佳条件下对最佳细胞系进行筛选和扩增。这些全面的解决方案便于您简化细胞系开发工艺并缩短上市时间。

细胞系表征分析包

应在整个药物开发过程中持续对细胞系进行性表征分析，以确保满足生物安全法规，并确保产品的性能符合预期。为了避免设备安装费用及需要精通多种技术的技能，许多生物技术公司经常雇用外部服务提供商进行所有必要的分析，以确保其细胞库满足监管要求并可以放行。



赛多利斯提供预先确定的细胞系表征分析包，旨在根据ICH监管指南对您的细胞系进行全面的分析。即用型表征分析包涵盖一系列试验，并且可以定制，用于满足任何项目需求。

-

高通量 | 自动化技术

如果经济上可行，可以使用最新的分析平台和生物工艺技术来支持大型筛选项目。

用于细胞系开发和扩增的高通量自动化解决方案，如Ambr®多联生物反应器，可节省大量工时、优化时间以及资源(5)。此类系统在生理学相关条件下有助于在开发过程的早期使用可扩展平台进行筛选，结合工艺开发和设计质量(QbD)原则，缩短时间并降低后期风险。

Ambr®15可在一次运行中为多达48种培养物提供平行可重复的条件，此外，用户还可使用集成式分析仪无缝跟踪并记录培养物，以便高效优化。自动化平台还能增强生产工艺的可放大性；不同规模之间的条件保持一致，这让您在放大到商业生产阶段时的策略做出明智的预测(6)。

整合平台可减少安装和掌握多种技术的要求。一套集成式技术可以无缝配合，为项目从开始到结束的全过程提供支持。集成分析(如自动细胞和代谢物分析)和数据分析(如DoE的Umetrics®套件和多变量数据分析(MVDA)数据分析软件)可为处理和分析提供进一步的控制，使用户能够在用户友好的界面中获得丰富的高质量数据。这些功能使您能够更好地理解工艺，并指导您做出明智的决策。

传统的分析方法(如ELISA)在评估产品效价时很有用，但对于每个克隆的关键生产力属性，其能给出的信息有限。

如iQue®先进流式细胞计数平台这样的先进技术，可同时快速评估效价、生产力和细胞活力，以便提供更深入的见解，便于生产克隆的排序和选择(7)。当考虑所有这些特性时，克隆排名可能会发生显著的变化(8)。

虽然表达水平分析(如效价筛选)在细胞系开发的早期进行，但由于缺乏可用于快速筛选的合适的高通量分析技术，其他CQA(如聚糖表征)通常仅在开发过程的后期进行评估。

使用先进的无标签检测系统会加速全面的分子分析。例如，Octet平台使用生物膜层干涉技术(BLI)可作为定量或动力学分析的一种手段，检测分子的实时结合。实时测量粗提细胞培养上清液中的蛋白质效价和糖基化的能力可提高克隆筛选成功率，并能简化工作流程。

最终，集成的自动化技术能简化并加速细胞系开发中的工艺优化，减少生产工艺中的可变性。

稳健的细胞系开发需要明智的决策

生物技术药品开发的挑战意味着项目往往伴随着重大的风险。潜在的障碍包括生物制剂的复杂性带来的技术挑战和物料要求带来的供应链仓储问题。

开发人员希望建立稳健可靠的管线，以在保持低成本的同时缩短上市时间。但是，预计的时间和费用往往是理想化。为了加快工艺优化，他们需要快速获得高质量的数据，以便做出明智的决策。

在早期阶段利用有限的可用信息做出工艺决策是很困难的。然而，从长远看来，稳健的设计、以及时间和资本投资可以最大限度提高效率。有效的风险管理战略包括早期的工艺和产品特性分析、运用外部专业知识、及利用专门构建的技术和服务。

在生物治疗药物项目开发之初及时采用自动化和高通量平台，就能以可追溯的方式简化优化策略。这可以通过促进多个参数的平行评估，并使得从研究规模到商业规模生产的条件保持一致，显著提高细胞系开发效率。



作者简介



Fern Slingsby

博士，产品专家-Ambr®，赛多利斯

Fern Slingsby自2018年以来一直为赛多利斯效力。她拥有伦敦大学玛丽皇后学院分子生物学学士学位，并在爱丁堡大学医学研究委员会(英国)获得博士学位。

Fern在重组蛋白生产和上游工艺开发方面拥有超过18年的经验。在加入赛多利斯之前，她曾担任了六年的项目负责人和项目经理，负责从临床前到临床I期、II期和III期的生物技术药品cGMP生产。

在赛多利斯任职期间，Fern将高通量技术整合到细胞系和工艺开发中，用以支持客户，其主要致力于赛多利斯的Ambr®技术和集成式平台。



Katy McLaughlin

博士，科技文稿撰写人，赛多利斯

Katy是赛多利斯营销传播团队的一员，她帮助撰写从发表文章到网络内容在内的各种书面文章。

在2021年加入赛多利斯之前，Katy在爱丁堡大学学习并获得了博士学位，随后被聘为博士后研究员。在此期间，她开展过遗传学和细胞生物学方面的研究，并开始从事写作项目，最终成为了各个生物技术公司和机构的自由撰稿人。

参考文献

1. Johnson, D. E. (2018). Biotherapeutics: Challenges and opportunities for predictive toxicology of monoclonal antibodies. In *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3685. <https://doi.org/10.3390/ijms19113685>
2. Zhu, J. (2012). Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1158–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
3. Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. In *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
4. Moleirinho, M. G., Silva, R. J. S., Alves, P. M., Carrondo, M. J. T., & Peixoto, C. (2020). Current challenges in biotherapeutic particles manufacturing. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(5), 451–465. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1693541>
5. Rameez, S., Mostafa, S. S., Miller, C., & Shukla, A. A. (2014). High-throughput miniaturized bioreactors for cell culture process development: Reproducibility, scalability, and control. *Biotechnology Progress*, 30(3), 718–727. <https://doi.org/10.1002/btpr.1874>
6. Hsu, W. T., Aulakh, R. P. S., Traul, D. L., & Yuk, I. H. (2012). Advanced microscale bioreactor system: A representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology*, 64(6), 667–678. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9446-1>
7. Sartorius (2018) Analytical Power Tools Open Upstream Bioprocessing Bottlenecks. [Whitepaper] <https://www.sartorius.com/en/pr/mab/analytical-power-tools-open-upstream-bioprocessing-bottlenecks>
8. ForteBio. (2019). Cell Line Development: Accelerating Antibody Discovery By Monitoring Titer And Glycosylation With The Octet Platform [Whitepaper]

销售与服务 联系方式

更多联系信息，请访问
www.sartorius.com.cn

赛多利斯泰帝（上海）贸易有限公司

E-mail: info.cn@sartorius.com

热线电话：400 920 9889 | 800 820 9889

上海

地址：上海市浦东新区盛荣路388弄

百佳通产业园3号楼7-11层

邮编：200120

电话：+86.21.60666100

北京

地址：北京市顺义区空港工业区B区裕安路33号

邮编：101300

电话：+86.10.80426516

传真：+86.10.80426580

广州

地址：广州市越秀区水荫路117号1105单元

邮编：510075

电话：+86.20.37618687 | +86.20.37618651

传真：+86.20.37619051

