

# 用于高效高密度细胞库的 一次性含氟聚合物袋

## 简介

对快速开发疫苗和其他疗法及其扩展生产规模的需求从未像目前这么迫切。但是,传统分级渐进的基于细胞培养液扩增细胞的培养制程效率低下且存在风险。它们从相对少量的细胞开始,需要数周的培养处理和多次转换容器的步骤。培养液中的细胞通常储存在1至5毫升(mL)规格的小瓶中。细胞必须在冷链保存、解冻、扩增和加入生物反应器的整个制程中保持健康。

传统的培养液细胞储存使用可容纳12至18个小瓶的圆柱形细胞冻存容器。冻存盒中装满异丙醇以控制冷冻速度。在单个小瓶中冷冻细胞可以达到在长期冷冻后保持细胞活性的目的,但也有一些缺点。典型的细胞递增培养涉及一个由多个手动步骤组成的开放式系统,要将细胞从小瓶转移到依次增大的摇瓶,再到生物反应器(图1)。每次将细胞转移到更大的摇瓶中时,都有污染的风险。每个批次均需要新的种子培养基细胞,从而会带来不同批次之间细胞质量不一致的风险。

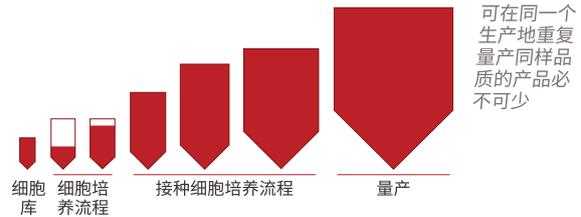
这种多步骤制程成本高昂且耗时,需要数周时间才能将细胞培养扩增到足够高的数量,达到可以转入生物反应器量产的水平。因此,需要一种更有效、更精简的生产程序,以加快细胞培养扩增制程并降低成本,同时保持高细胞质量。提高效率需要增加细胞培养物中的培养基体积和/或细胞密度,并减少制程步骤的数量。

对高密度细胞库的研究表明,将细胞培养的细胞密度从每毫升1,000万个细胞上至到每毫升1亿个细胞是可以实现的。<sup>1</sup>这种方法可减少递增容量细胞培养中的步骤数,从而将处理时间从数周缩短到数天。<sup>2</sup>高密度细胞库通过省去手动转移步骤,可将污染风险降至最低。高密度细胞库不是将冷冻细胞培养物储存在单个小瓶中,而是依赖于更大的容器。

## 上游制程强化的技术创新

传统:

一个2毫升玻璃小瓶,用于一个生物反应器



强化:

五个500毫升袋子,用于五个生物反应器

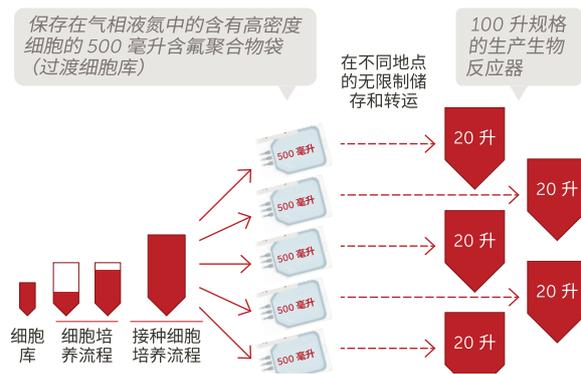


图1. 与传统的递增扩容培养制程相比,强化的制程方法可将处理时间缩短数周。

当用另一种储存方法替换细胞冻存盒时,必须在整个冷冻、储存、解冻和转移过程中对细胞进行保护。除了通过减少递增扩容培养步骤来节省时间外,所选方法还应满足以下要求:

- 将冷冻速度控制在每分钟递减1°C,保持到至少降至-40°C
- 可满足各种标准的可渗透和不渗透防冻剂要求
- 实现高细胞密度
- 可耐受冷冻至-150°C的长期冷冻储藏
- 达到等于或超过行业标准的解冻速度
- 在制程结束时实现至少90%的细胞存活率
- 可充分按比例扩增细胞以便对大型(20至100升)生物反应器提供有效的起始细胞密度
- 经济实惠且可复制生产

由含氟聚合物制成的一次性 2D 储存袋组件提供的解决方案可同时增加细胞培养量和每毫升的细胞密度,同时保持细胞活力。本白皮书阐述了这些袋子在冷冻、储存和解冻步骤中的性能表现,以及为什么它们在各种上游细胞库应用中是小瓶容器的有效替代品。

## 反思细胞冷冻策略

冷冻和解冻对所有细胞来说都有压力,但通过使用最佳行业操作方法,可以优化细胞活力。冷冻速度是决定解冻后细胞生理机能和存活率的关键变量。重要的是在初始冷冻制程中将冷冻速度控制在每分钟接近  $-1^{\circ}\text{C}$ ,直至至少降到  $-40^{\circ}\text{C}$ 。<sup>3</sup> 如果冷冻速度太慢,细胞周围过度生成冰晶会导致机械应力,细胞形态就会受到负面影响。冷却速度过快会导致细胞内形成冰晶。当进一步冷却以进行培养液玻璃化和长期低温储存时,温度下降的速度并不重要。

传统的细胞冻存盒通过隔热小瓶来被动地控制细胞的冷冻速度。用异丙醇 (IPA) 或其他醇基溶剂注入冻存盒,只需将冻存盒放入固定温度的冷冻柜中,即可使小瓶内的细胞以可接受的速度冷却。

一次性储存袋是冷冻培养细胞的另一种方法。尽管许多此类袋子已经上市数十年,但将它们用于细胞库应用已被证明颇具挑战性。冷冻速度是取得成功的关键,但往往没有得到很好的控制。在整个制程中保持袋子的完整性至关重要,一些商用袋子出现问题,导致微生物污染。并非所有产品均与许多应用所需的超低储存温度相容。袋子和管子材料的选择在确定上游生物工艺的适用性方面起着非常重要的作用。

Entegris 一直在与 CPE Lyon 和 IUT Lyon 的大学实验室合作,评估一次性含氟聚合物袋组件用于高密度细胞库应用的可行性。这些袋子由可在极低温度下保持柔韧性的单层含氟聚合物制成,通常可在低至  $-196^{\circ}\text{C}$  的温度下进行测试。<sup>4</sup> 这些袋子有多种大小规格可供选择,可以容纳比包含 18 个小瓶的细胞冻存盒的体积更高的细胞溶液。

实验将 50 毫升和 500 毫升袋子与传统细胞冻存盒的性能进行了对比。将袋组件插入金属低温壳中,既可以保护袋组件,又可以确保与金属的最大接触面积,以保证袋中物的持续均匀冷却。按照使用细胞冻存盒时的标准做法,低温壳可以在冷冻柜中从实验室环境室温空冷至  $-40^{\circ}\text{C}$  以下。

然而,对于相对较小的袋子,当直接放在冷冻柜架上时,低温壳往往会过快地冷却培养细胞液。为了解这一问题,可以将低温壳封装在一个隔热的低温箱中,该低温箱具有与细胞冻存盒相似的热传导功能。低温箱(图 2)内衬有聚乙烯 (PE) 泡沫,而不是注入异丙醇 (IPA)。

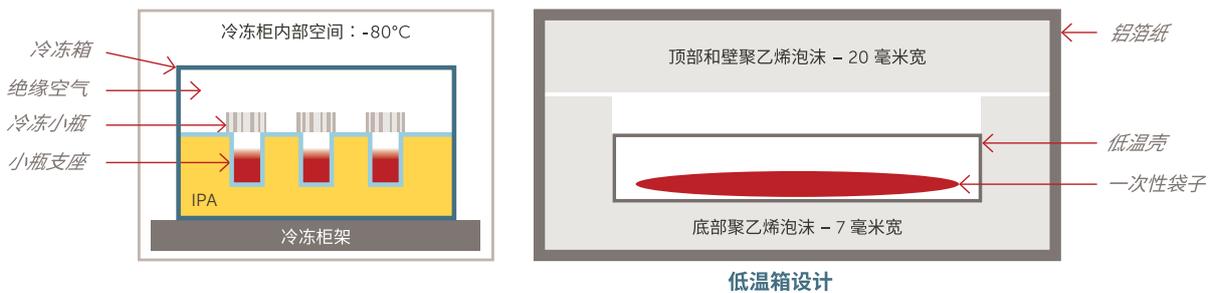


图 2. 用于冷冻 50 毫升袋的低温箱/低温壳组合。

测试表明,在 50 毫升袋中冷冻细胞时需要低温箱。使用低温箱时,冷冻速度保持在可接受的范围内,与采用小瓶实现的冷冻速度相似(图 3)。如数据所示,注入量会影响冷却速度。体积在 15 至 35 毫升之间可达到最佳效果。

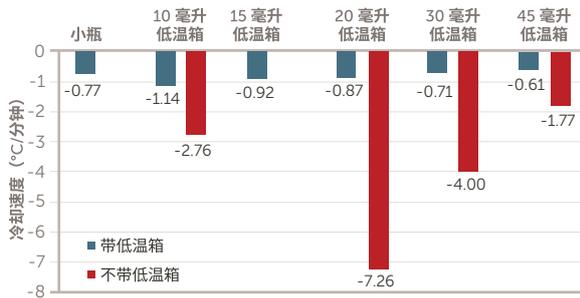


图 3. 带低温箱和不带低温箱的小瓶和 50 毫升袋中细胞的冷冻速度对比。袋子中的冷冻速度会因注入量不同而异。

当移至 500 毫升袋时,袋中的一小部分内装物与低温壳的金属表面接触,从而降低了冷冻速度。通过将低温壳直接放置在冷冻柜架上,而不使用低温箱,可以达到接近最佳的冷冻速度。较大袋子内不同位置的冷却曲线确实不同,通过在多个位置放置热电偶进行测试可以证明这一点。但是,放置在冷冻柜不同位置的不同细胞冻存盒之间的冷却曲线也会有所不同。与较小的袋子一样,500 毫升袋的冷却曲线取决于注入量。

一次性袋子的最佳操作方式是注入到袋子容量的 50% 到 70% 之间。这样做可以避免发生与过度注入相关的问题,例如增加泄漏或破裂的风险,但不能满足冷冻细胞的冷却速度严格要求。细胞库应用的最佳注入率要低得多,必须根据细胞系的敏感性、防冻剂成分和细胞密度来确定。在选择最佳袋子规格时,一定要考虑选择的注入量。虽然注入至 70% 的容量对于确保袋子的完整性来说是合适的,但在每分钟  $-1^{\circ}\text{C}$  或接近  $-1^{\circ}\text{C}$  的温度下可能太高,无法实现细胞的均匀冷冻。

对于最长达一年的短期冷冻,注入培养细胞液的含氟聚合物袋可以保存在设定为  $-80^{\circ}\text{C}$  的冷冻柜中。长期储存需要较低的温度,该低温可以通过将低温壳悬挂在液氮罐的气相中来实现。 $-150^{\circ}\text{C}$  的气相温度低于  $-120^{\circ}\text{C}$  的典型细胞培养液的玻璃化温度,有利于实现硬冻结。

## 防冻剂相容性

需要防冻剂来消除培养细胞液中的冰晶形成,从而提高冷冻期间的细胞存活率。必须根据细胞类型和所需的细胞密度来选择理想的化学试剂和浓度。

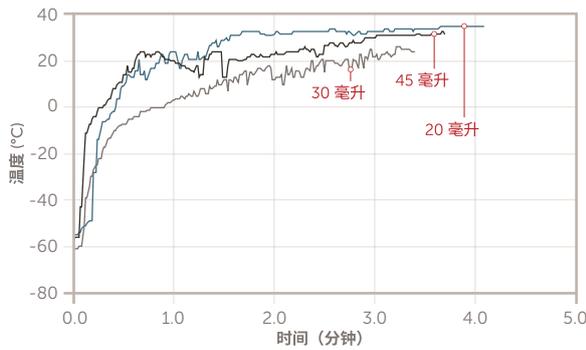
防冻剂可以是渗透性的(即反应物可渗透细胞膜),也可以是非渗透性的。二甲基亚砜(DMSO)等渗透性试剂比非渗透性试剂更有效,但如果防冻剂浓度过高,则在室温下对细胞有毒。在解冻后将细胞引入到生物反应器之前,通常包括一个洗涤步骤,以降低防冻剂浓度。使用非渗透性试剂时不需要洗涤,因为这些糖或淀粉是无毒的,但这种防冻剂可能不能充分保护细胞免受冷冻损伤。

我们评估了含二甲基亚砜商用防冻剂与不含二甲基亚砜商用防冻剂与含氟聚合物存储袋的兼容性。结果表明,此类袋子与这两种类型的防冻剂均相容,从而使实验室能够灵活选择最适合其细胞的防冻剂化学品和浓度。根据解冻后细胞群体倍增率定义的细胞活性测量表明,无论有无清洗步骤,在袋中冷冻均等于或优于小瓶中冷冻。

在冷冻前增加初始细胞密度有两个好处。首先,对于给定的袋子规格和注入水平,会有更多的细胞可用。其次,如果二甲基亚砜的量保持不变,则二甲基亚砜的有效浓度会降低。这意味着应该可以在解冻后省去防冻剂清洗步骤,同时保持足够高的细胞活性。在将细胞培养基从 500 毫升规格的袋子直接转移到大型生物反应器时,防冻剂会进一步稀释并消除潜在的毒性。活性数据表明,稀释有助于确保细胞免受防冻剂相关损伤。省去清洗步骤可进一步简化制程并降低污染风险,从而节省时间和费用。

## 快速解冻

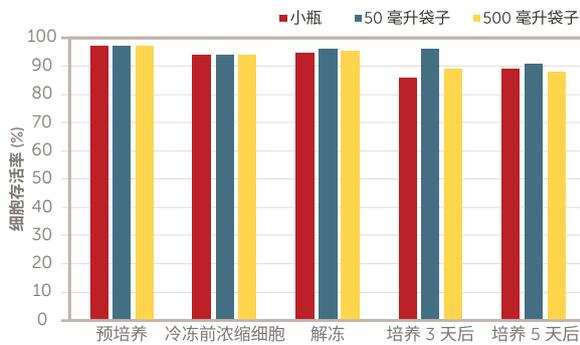
解冻步骤也必须正确完成,以确保细胞活性。在解冻过程中,最好尽快将冷冻培养基升至环境温度,以尽量减少对细胞的损害。在设定为 37°C 的水浴器中培养要比其他方法(例如在空气中或冰箱中解冻)快得多。因此,这是最常见的方法。含氟聚合物一次性袋子适用于水浴器解冻。在水浴器中手动搅动可进一步提高解冻速度,对袋子特别有效。50 毫升的袋子可在不到两分钟的时间内从 -60°C 解冻(图 4),这比在小瓶中要快得多。



袋子在不同体积的 37°C 水浴器中解冻过程中的温度记录。将袋子从低温箱和低温壳中取出,然后浸入水浴器中并手动搅动,直到冰完全消失。

图 4. 50 毫升袋子的解冻数据。

解冻后的细胞生长测量表明,袋装冷冻细胞的存活率高于小瓶装冷冻细胞的存活率(图 5)。在袋子中冷冻可提高冷冻过程中培养细胞液的同质性,并有利于加快解冻,这两点均有利于细胞存活。



实验步骤中的细胞活性。从生物反应器(预培养)中收集细胞,浓缩并重新稀释为悬浮培养细胞液,然后分配到小瓶(在 Mr.Frosty 中)、50 毫升袋子(在低温箱中)和 500 毫升袋子(仅在低温壳中)中。摇瓶培养细胞培养液中细胞的活性测量

图 5. 冷冻在小瓶、50 毫升袋子和 500 毫升袋子中的细胞在冷冻前后的细胞活性。

## 按比扩展为到更高的容量

含氟聚合物一次性袋子进行储存的高密度细胞库易于按比扩展。使用分批饲料扩增制程,每毫升细胞密度为 2,000 万或 3,000 万个细胞的 500 毫升袋子可以直接接种 20 升生物反应器,其细胞活性高于使用小瓶和摇瓶的传统方法所达到的细胞活性。通过将多个 500 毫升袋子转移到生物反应器中,进一步增加细胞密度,并将每个袋子注入到有利于实现理想细胞冷冻速度的最大水平,可以实现大型生产生物反应器的进一步扩展。

实验证明,一次性含氟聚合物袋是一种有效的冷冻方法,非常适合短期或长期储存重组蛋白和单克隆抗体(mAb)等经典生物制剂。该制程可成功扩增细胞,节省时间和费用,同时降低传统细胞递增培养中固有的污染风险。这种方法的未来扩展应用包括细胞和基因疗法应用。

## 关于 ENTEGRIS

Entegris 是为微电子行业和其他高科技行业提供特殊化学品和先进材料解决方案的领导企业。Entegris 通过了 ISO 9001 认证,在美国、中国、法国、德国、以色列、日本、马来西亚、新加坡、韩国和中国台湾都设有制造、客户服务和/或研究机构。更多信息可访问 [www.entegris.com](http://www.entegris.com)

## 参考文献

- <sup>1</sup> Wright, Benjamin, et al., *A Novel Seed-Train Process: Using High-Density Cell Banking, a Disposable Bioreactor, and Perfusion Technologies*, Bioprocessing International (2015).
- <sup>2</sup> Sargent, Brandy, *Direct Inoculum of Bioreactors with CHO Cells from Frozen Seed Bags to Eliminate Continual Seed Trains and Improve Facility Utilization*, Cell Culture Dish (2017). <https://cellculturedish.com/direct-inoculum-of-bioreactors-with-cho-cells-from-frozen-seed-bags-to-eliminate-continual-seed-trains-and-improve-facility-utilization/>.
- <sup>3</sup> Yokoyama, W.M., M.L.Thompson, and R.O.Ehrhardt, *Cryopreservation and thawing of cells*, Curr.Protoc.Immunol.99, A3.G (2012).DOI: 10.1002/0471142735.ima03gs99.
- <sup>4</sup> *Cold-Chain Bioprocessing Readiness: Mitigating Risk and Protecting Pharmaceutical Products*, Entegris white paper, August 2019.

### 更多相关信息

请立即致电区域客户服务中心, 了解 Entegris 可为您提供哪些帮助。  
请访问 [entegris.com](http://entegris.com), 然后选择[联系我们](#)链接, 查找离您最近的客户服务中心。

### 内容及免责声明

截至发布之日, Entegris 确认本文档中的信息是准确的。任何规格和设计如有更改, 恕不另行通知。对于本文档中的错误或遗漏, Entegris 不承担任何责任。Entegris 不承担更新本文档中提供的信息的义务。您不得使用或促成使用本文档针对本文中描述的 Entegris 产品实施任何侵权行为或其他法律分析。您同意向 Entegris 授予非专有的、免版税的许可, 用于此后起草的任何专利要求, 其中包括本文中披露的事项。本文档未以禁止反言的方式或其他方式明示或暗示授予任何知识产权的许可。



应特格 (上海) 微电子贸易有限公司

上海市科苑路 88 号德国中心 2 号楼 5 楼 201203  
电话: +86 21-80236500 | 传真: +86 21-50805598

Entegris®, Entegris Rings Design® 以及其他产品名称均是在 [entegris.com/trademarks](http://entegris.com/trademarks) 上列出的 Entegris, Inc. 商标。所有第三方产品名称、徽标和公司名称均是其各自所有者的商标或注册商标。使用这些第三方信息并不意味着与其所有者有任何形式的附属关系, 或得到其所有者的任何赞助或认可。

©2020 Entegris, Inc. | 保留所有权利。| 9000-11051ENT-0520