

单克隆抗体的生产简介

获得稳定的杂交瘤细胞系后，即可根据需要大量生产单抗，以用于不同目的。

一、单抗的大规模制备

目前大量制备单抗的方法主要有两大系统，一是动物体内生产法，这是国内外实验室所广泛采用；另一是体外培养法。

1、动物体内生产单抗的方法

迄今为止，通常情况下均采用动物体内生产单抗的方法，鉴于绝大多数动物用杂交瘤均由 BALB/c 小鼠的骨髓瘤细胞与同品系的脾细胞融合而得，因此使用的动物当然首选 BALB/c 小鼠。本方法即将杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔内，在小鼠腹腔内生长杂交瘤，并产生腹水，因而可得到大量的腹水单抗且抗体浓度很高。可见该法操作简便、经济，不过，腹水中常混有小鼠的各种杂蛋白（包括 Ig），因此在很多情况下要提纯后才能使用，而且还有污染动物病毒的危险，故而最好用 SPF 级小鼠。

（1）材料：

- a. 成年 BALB/c 小鼠。
- b. 降植烷（Pristane）或液体石蜡。
- c. 处于对数生长期的杂交瘤细胞。

（2）方法：

- a. 腹腔接种降植烷或液体石蜡，每只小鼠 0.3-0.5ml。
- b. 7-10 天后腹腔接种用 PBS 或无血清培养基稀释的杂交瘤细胞，每只小鼠 $5 \times 10^5/0.2\text{ml}$ 。
- c. 间隔 5 天后，每天观察小鼠腹水产生情况，如腹部明显膨大，以手触摸时，皮肤有紧张感，即可用 16 号针头采集腹水，一般可连续采 2-3 次，通常每只小鼠可采 5-10ml 腹水；
- d. 将腹水离心（2000r/min 5 分钟），除去细胞成分和其他的沉淀物，收集上清，测定抗体效价，分装， -70°C 冻存备用，或冻干保存。

二、体外培养生产单抗的方法

总体上讲，杂交瘤细胞系并不是严格的贴壁依赖细胞（anchorage dependent cell, ADC），因此既可以进行单层细胞培养，又可以进行悬浮培养。杂交瘤细胞单层细胞培养法是各个实验室最常用的手段，即将杂交瘤细胞加入培养瓶中，以含 10-15% 小牛血清的培养基培养，细胞浓度以 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6/\text{ml}$ 为佳，然后收集培养上清，其中单抗含量约 10-50ug/ml。显然，这种方法制备的单抗量极为有限，无疑是不适用于单抗的大规模生产。要想在体外大量制备单抗，就必须进行杂

交瘤细胞的大量（高密度）培养。单位体积内细胞数量越多，细胞存活时间越长，单抗的浓度就越高，产量就越大。

目前在杂交瘤细胞的大量培养中，主要有两种类型的培养系统。其一是悬浮培养系统，采用转瓶或发酵罐式的生物反应器，其中包括使用微载体；其二是细胞固定化培养系统，包括中空纤维细胞培养系统和微囊化细胞培养系统。

1、悬浮培养法

目前小规模悬浮培养多采用转瓶培养，通过搅拌使细胞呈悬浮状态；而大规模悬浮培养多采用发酵式的生物反应器，美国、加拿大、法国和德国等几家公司生产这类反应器，其培养方式可分为纯批式、流加式、半连续式和连续式。

2、微载体培养法

微载体（Microcarrier）是以小的固体颗粒作为细胞生长的载体，在搅拌作用下微载体悬浮于培养液中，细胞则在固体颗粒表面生长成单层。可用作细胞大量培养的微载体主要以交联琼脂糖或葡聚糖、聚苯乙烯、玻璃等作为基质的产品，其中以 Cytodex I，Biosilon 和 Superbeads 为好。微载体培养的基本方法上与悬浮培养相同。近来的研究表明，该法是杂交瘤细胞大量培养的理想途径之一。

3、中空纤维细胞培养系统

该系统由中空纤维生物反应器、培养基容器、供氧器和蠕动泵等组成。用于细胞培养的中空纤维由乙酸纤维、聚氯乙烯-丙烯复合物、多聚碳酸硅等材料制成，外径一般为 100-500um，壁厚 25-75um，壁呈海绵状，上面有许多微孔。中空纤维的内腔表面是一层半透性的超滤膜，其孔径只允许营养物质和代谢废物出入，而对细胞和大分子物质（如单抗等）有滞留作用。目前使用的中空纤维生物反应器分为柱式、板框式和中心灌流式。尽管该培养系统在大规模生产单抗时成本较低，并可获得高产量高纯度的抗体，由于设备价格昂贵，限制了其使用范围。

4、微囊化细胞培养系统

该系统是先将杂交瘤细胞微囊化，然后将此具有半透膜的微囊置于培养液中进行悬浮培养，一定时间后，从培养液中分离出微囊，冲洗后打开囊膜，离心后即可获得高浓度的单抗。

总之，上述四种体外培养生产单抗的方法仍处在发展之中；随着研究的不断深入和技术的完善，它们将会在单抗生产的产业化进程中发挥越来越大的作用。

三、杂交瘤细胞的无血清培养

杂交瘤细胞的体外培养绝大多数应用 DMEM 或 RPMI-1640 为基础培养基，添加 10-20%胎牛或新生小牛血清。基础培养基主要提供各种氨基酸、维生素、葡萄糖、无机盐、各种合成核酸和脂质

的前体物质。而血清主要供给杂交瘤细胞等各种营养成分，血清中的激素可刺激细胞生长，其中的许多蛋白质能结合有毒性的离子和热源质而起解毒作用，同时这些蛋白质对激素、维生素和脂类有稳定和调节作用。但是，血清中含有上百种的蛋白质，这给单抗的纯化带来很大麻烦，而未纯化的含有异种蛋白的单抗用于动物治疗可诱发变态反应；加之，血清来源有限；每批血清之间质量差异较大，直接影响结果的稳定性，同时血清是杂交瘤细胞发生支原体污染的最主要来源之一，而且价格较贵，为了克服血清的这些缺点，采用无血清培养基培养杂交瘤细胞越来越受到广泛重视。

无血清培养的实质就是用各种不同的添加剂来代替血清，然后进行杂交瘤细胞的培养。目前已报道的各类无血清培养基有含有大豆类脂的、含有酪蛋白的、化学限定性的、无蛋白的、含有血清低分子量成分的血清培养基，其中一部分已有产品出售。综合这些无血清培养基，约有几十种不同的添加剂可用于无血清培养基，在其中至少必须添加胰岛素、转铁蛋白、乙醇胺和亚硒酸钠这四种成分，才能起到类似血清的作用，其他较重要的添加剂包括白蛋白、亚油酸和油酸、抗坏血酸以及锰等一些微量元素。

采用无血清培养基培养杂交瘤细胞制备单抗，有利于单抗的纯化，有助于大规模生产，可减少细胞污染的机会，且成本较低。但无血清培养细胞的生产率低、细胞密度小，影响了单抗的产量；同时无血清培养基还缺少血清中保护细胞免受环境中蛋白酶损伤的抑制因子等。尽管如此，无血清培养基终究会成为杂交瘤细胞培养的理想培养基。