

使用 Sf9/BEV 系统开发 rAAV 病毒载体生产缩小模型

Simon Fradin¹ and Ulrike Becken^{2*}

¹Généthon, Evry, France; ²Eppendorf AG Bioprocess Center, Juelich, Germany

* 通讯作者: becken.u@eppendorf.com

摘要

单基因病是由基因突变导致的蛋白质功能缺失或丧失。基因治疗可将正常基因传递至受影响的细胞，补偿缺失或缺陷的相应功能基因，是一种极具前景的治疗方法。此疗法通常使用重组腺相关病毒 (rAAV) 等病毒载体插入基因。昆虫细胞系 Sf9 是病毒生产的合适宿主。Sf9 细胞培养于悬浮液中，

因此其工作体积比贴壁细胞培养更易适应工艺开发和生产过程中不断变化的需求。本研究中，Généthon® 的研究人员使用 Eppendorf DASbox® 迷你生物反应器系统开发了在 Sf9 细胞中生产 rAAV 病毒载体的缩小模型。使用小工作体积进行平行试验可省时且经济地评估工艺性能。

引言

单基因病基因治疗的开发和应用需要对大规模基因治疗载体生产工艺进行优化。重组腺相关病毒 (rAAV) 是极具前景的载体选择。该病毒具有诸多优势，如无致病性、DNA 与人类基因组的整合几乎无效、病毒颗粒稳定等。在大动物模型试验、临床试验和实际治疗中，均需要使用相当数量的病毒，这给治疗应用带来了困难。昆虫细胞系 Sf9 是 rAAV 生产的一种常用宿主。细胞转染采用杆状病毒表达载体 (BEV) 系统，使用产生功能性病毒颗粒所需的基因转染细胞。Sf9/BEV 系统在大规模病毒生产的一个主要优势是其或可用于悬浮培养 Sf9 细胞。悬浮培养可获得比贴壁细胞培养更高的细胞密度，系统本身具有的可扩展性也更易适应工艺开发和生产期间生产体积的调整。在工艺开发过程中，通常先采用较小的培养规模，后再扩大至较大的生产体积。缩小模型可在较小的培养体积中模拟生产工艺，用于工艺优化、故障排除和施行变更，具有很高的应用价值。

Généthon 是一个非营利性生物治疗研发组织，由法国抗肌病协会 (Association Française contre les Myopathies) 创建和资助，旨在为患者及其家属提供支持。组织的使命是针对罕见疾病设计基因治疗产品，确保产品的临床前和临床开发，并进行生产，为患者提供接受创新治疗的机会。Généthon 目前正在资助两个基因治疗项目，均已进入临床试验阶段，同时其还参与了多个处于临床前或研究阶段的项目。

本应用文献介绍了使用 Sf9/BEV 系统成功开发出 rAAV 生产缩小模型的内容。研究目的是在 Eppendorf DASbox 迷你生物反应器系统中重现 2 L 生物反应器所获得的生产性能。系统针对平行工艺开发进行优化，可通过共享设备同时运行、监测和控制多个试验。工艺工作体积最小可达 60 mL，有助于降低培养基和补充剂的成本。

材料和方法

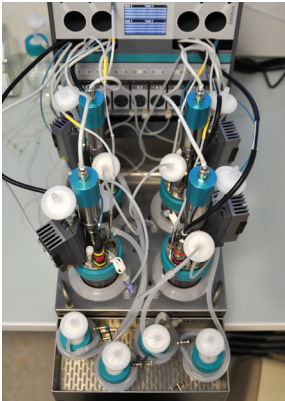


图 1: 在 Généthon 使用的 Eppendorf DASbox 迷你生物反应器系统。

表 1: 试验条件汇总。一台 DASbox 迷你生物反应器系统运行三次试验。在指定运行中比较几种搅拌速度。运行 1 分析了培养物的活细胞密度、细胞直径和细胞存活率, 运行 2 和 3 分析了每 mL 的病毒基因组滴度 (VG/mL) 和每个细胞的病毒基因组滴度 (VG/细胞)。

运行	生物反应器 1	生物反应器 2	生物反应器 3	生物反应器 4	分析
1	300 rpm	375 rpm	450 rpm	-	活细胞密度; 细胞直径; 存活率
2	300 rpm	300 rpm	400 rpm	400 rpm	VG/mL; VG/cell
3	300 rpm	400 rpm	-	-	VG/mL; VG/cell

细胞培养

Généthon 研究团队使用 Sf-900™ III SFM 培养基 (美国 Thermo Fisher Scientific® Inc.) 在 27 °C、50% 溶解氧的条件下培养了 Sf9 细胞。参比生产系统使用工作体积为 2 L 的玻璃生物反应器, 缩小规模试验使用工作体积为 250 mL 的 Eppendorf DASbox 迷你生物反应器系统 (德国 Eppendorf AG, 图 1)。两个系统均采用推进式搅拌桨。2 L 生产系统的搅拌速度为 180 rpm。缩小模型开发期间必须确保适当的培养物混合和氧传递。使用 3 个罐体对 300 rpm、375 rpm 和 450 rpm 三种搅拌速度同时进行了测试 (表 1)。

使用细胞活力分析仪 Vi-CELL® XR (美国 Beckman Coulter®, Inc.) 离线测定了细胞密度、细胞存活率和细胞直径。

病毒生产和产量定量

Généthon 的研究人员使用 Sf9 细胞作为宿主生产 8 型重组腺相关病毒 (rAAV8)。接种 72 小时后, 研究人员用两种不同的杆状病毒克隆共感染 Sf9 细胞, 其中一种病毒携带合成病毒衣壳的基因, 另一种携带目的基因。杆状病毒在其裂解周期内, 利用 Sf9 细胞机器进行复制, 感染培养物中的其它细胞, 生成 rAAV8 载体。感染 96 小时后收获培养物, 并使用清洁剂处理释放载体。研究团队通过使用实时定量 PCR 测量病毒 DNA 确定 rAAV8 载体的滴度。通过分析可以得出病毒基因组滴度 (VG), 即携带目的基因的病毒载体颗粒数。通过将病毒基因组滴度标准化为活细胞密度计算感染时的单位生产率 (VG/细胞)。

在平行工艺中比较了 300 rpm 和 400 rpm 两种搅拌培养条件下的产品产量。为检测结果的重现性, 每种搅拌速度各在生物反应器中进行了 3 次试验 (表 1)。

结果

本研究旨在将 rAAV 生产的工作体积从 2 L 缩小至 250 mL, 同时再现最初的生产性能。首先, Généthon 研究团队比较了未

受病毒感染的 Sf9 细胞在工作体积为 250 mL 的 DASbox 迷你生物反应器系统和 2 L 的玻璃罐体中的生长情况。

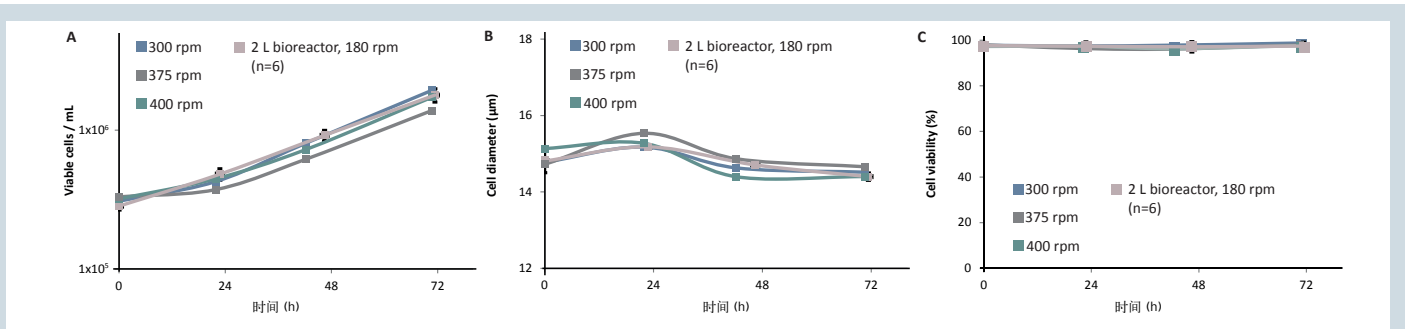


图 2: Sf9 细胞的生长性能。在 DASbox 迷你生物反应器系统和 2 L 生物反应器中培养了 Sf9 细胞。测试了几种搅拌速度。离线测定了活细胞密度 (A)、细胞直径 (B) 和细胞存活率 (C)。

搅拌速度为 300 rpm、375 rpm 和 450 rpm 时，在 2 L 玻璃罐体和 DASbox 系统罐体中 Sf9 细胞的生长性能结果相当。接种 72 小时后，所有测试的试验条件下活细胞密度均从 3×10^5 个细胞 /mL 增加至约 1.5×10^6 个细胞 /mL (图 2A)。平均细胞直径取决于细胞周期时相，并与杆状病毒感染相关。在 Sf9/BEV 系统中定期测定了细胞直径，未感染细胞的平均细胞

直径约为 15 μm (图 2B)。细胞存活率接近 100% (图 2C)。然后，研究团队监测了病毒生产性能，对使用 DASbox 系统(搅拌速度为 300 rpm 和 400 rpm) 和 2 L 玻璃罐体的培养工艺进行了比较。所有试验条件下病毒基因组滴度和单位生产率都相当。三次试验运行的结果均具有高度的重现性(图 3)。

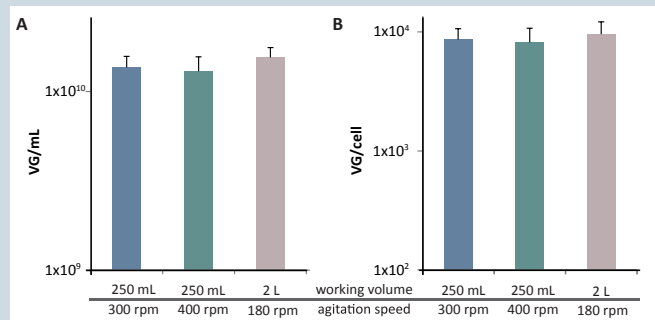


图 3: 病毒生产性能。分别在 DASbox 迷你生物反应器系统和 2 L 生物反应器中采用 Sf9/BEV 表达系统生产 rAAV, 前者采用 300 rpm 和 400 rpm 两种搅拌速度, 后者搅拌速度为 180 rpm。在 DASbox 系统中进行了三次重复试验, 2 L 生物反应器进行了两次重复试验。平均值和标准偏差如图所示。测定了每 mL 的病毒基因组滴度 (VG/mL) (A) 和单位生产率 (VG/细胞) (B)。

结论

结果表明，使用 Sf9/BEV 系统成功缩小了 rAAV 的生产规模。工作体积为 250 mL 的 Eppendorf DASbox 迷你生物反应器系统再现了 2 L 玻璃罐体中的细胞生长和生产性能。本研究例证了 Eppendorf DASbox 迷你生物反应器系统在工艺缩小中的价值。缩小模型开发过程中必须进行多次试验测试多种试验条件，并保证工艺性能的重现性。使用平行生物反应器系统可节省时间、最大程度确保试验运行间的可比性。Généthon 的研

究人员通过使用 DASbox 缩短了开发时间线。他们指出：“考虑到 rAAV 的生产动力学特点，生物学时间是不可能缩短的。但使用 2 L 玻璃生物反应器需要两周才能完成的生产，DASbox 系统运行相同数量的生物反应器在一周内即可完成，缩短了开发时间线。”使用 DASbox 系统可促进小规模生物反应器研究的开展，这也有助于降低成本。

订购信息

产品描述	订购编号
DASbox® 迷你生物反应器系统 , 用于细胞培养, 最大通气流量 5 sL/h	
4 罐体系统	76DX04CC
8 罐体系统	76DX08CC
16 罐体系统	76DX16CC
24 罐体系统	76DX24CC
DASware® control , 包括电脑、操作系统和授权	
适用于 4 罐体 DASbox® 系统	76DXCS4
适用于 8 罐体 DASbox® 系统	76DXCS8
适用于 16 罐体 DASbox® 系统	76DXCS16
适用于 24 罐体 DASbox® 系统	76DXCS24
DASware® control 专业版 , 包括电脑、操作系统软件和授权	
适用于 4 罐体 DASbox® 系统	76DXCSP4
适用于 8 罐体 DASbox® 系统	76DXCSP8
适用于 16 罐体 DASbox® 系统	76DXCSP16
适用于 24 罐体 DASbox® 系统	76DXCSP24