

# 使用 SciVario® 双联生物反应器控制系统在悬浮细胞培养中生产腺相关病毒

Jorge L. Escobar Ivirico and Ma Sha

Eppendorf, Inc., Enfield, CT, USA

Contact: [bioprocess-experts@eppendorf.com](mailto:bioprocess-experts@eppendorf.com)

## 摘要

疫苗是抵抗病原体和控制全球性疫情的重要工具。使用哺乳动物细胞培养生产各种类型的病毒疫苗的情况已相当普遍,例如减毒活疫苗、病原体灭活疫苗和亚单位疫苗。然而,它们通常依赖于贴壁细胞培养。为了提高生产能力、增加产量,最重要的是便于扩大生产,在悬浮细胞培养平台上生产疫苗更为可取。悬浮生物反应器已广泛用于抗体生产,可加快多功能疫苗平台的开发过程。mRNA 疫苗、腺病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体疫苗等新技术在控制最近的新冠疫情方面都发挥了关键作用。细胞培养产生的 AAV 载体已成为疫苗生产和基因治疗中最有效的基因和蛋白质递送工具之一。

在本应用指南中,我们阐释了基于悬浮细胞培养的高效、可扩展的 AAV 生产平台的可行性。我们使用优化的悬浮培养的 HEK293 细胞系(Expi293F)作为宿主,结合无辅助 AAV 系统,从而去除野生型腺病毒的污染。为了实现高产量的 AAV 衣壳生产,我们在由 SciVario 双联生物反应器控制系统控制的 BioBLU 1c 一次性生物反应器中进行了细胞转染。我们对代谢物、细胞密度和细胞活力进行了监测和分析,达到了约  $10^{12}$  个衣壳 /mL 的稳健 AAV 滴度,符合疫苗行业的典型产量 [1]。

## 您是否希望了解更多生物工艺信息?

我们的“季度生物工艺大事件”新闻邮件让您能及时了解与您的细胞培养生物过程工作流程相关的教育材料、活动和产品新闻。



您可以方便地随时取消订阅此新闻邮件。

[立即订阅](#)



## 前言

疫苗是用于对抗病毒病原体和传染病最有效的工具之一，每年可挽救全球数百万人的生命。市场上的疫苗类型多种多样，依据每个人的健康状况和既往病史，适用的疫苗也不尽相同 [2]。每种类型的疫苗的研发，都是专为训练免疫系统在未来抵抗某些传染源。

灭活疫苗是最常用的疫苗类型之一，其成分为经灭活的特定病原体。灭活疫苗不像真正的感染，通常无法像其他类型的疫苗那样能提供强大的免疫力，因而人们可能需要多次注射加强针才能保持对病毒和细菌的免疫力。灭活疫苗包括甲型肝炎疫苗、流感疫苗和脊髓灰质炎疫苗等。

减毒活疫苗使用致病性减弱的致病生物体来触发类似自然感染引起的免疫反应，因此免疫反应通常较为强烈。减毒活疫苗包括水痘疫苗、黄热病疫苗、轮状病毒疫苗或天花疫苗等 [3]。亚单位疫苗只使用病原体的特定部分，而不是整个病毒或细菌。它们会针对细菌抗原产生非常强的免疫反应 [4]。通常这种疫苗副作用较少。新冠疫苗、乙型肝炎疫苗、脑膜炎球菌疫苗或百日咳疫苗（百日咳疫苗是白喉、破伤风和百日咳 (DTaP) 联合疫苗中的一部分）通常都是亚单位疫苗。目前大多数新冠疫苗都是针对一种特定的抗原亚基，例如刺突蛋白，但是并非所有亚单位疫苗的设计初衷都是将蛋白质抗原直接引入体内。最近，已设计出 mRNA 疫苗等新型疫苗，这类疫苗将病原体亚基的遗传密码递送到患者细胞中，从而让这些细胞自己制造抗原 [5]，或者通过病毒载体递送亚基抗原（基于载体的疫苗）[6]。在这种情况下，抗原的遗传密码被插入到低风险病毒（载体）中，该病毒充当递送系统将密码引入细胞；指导细胞的机器对病毒进行复制，在不引起疾病的情况下产生抗原。慢病毒、腺病毒和 AAV 是使用最广泛的载体。腺病毒 [7] 和 AAV [8] 目前都已用于新冠疫苗生产。

生产大量抗原必须考虑多种因素，包括正确选择培养基、培养条件、细胞平台和容器尺寸。使用贴壁细胞系或悬浮细胞系均

可完成疫苗生产，但无论使用哪种方式，都需要对上游和下游工艺进行特殊设计。此前，Eppendorf 已经发布了多个适用于疫苗应用的贴壁细胞培养应用，尤其是 Vero 细胞 [9-11]。然而，在培养贴壁细胞时需要大量人力，并且与悬浮培养相比，贴壁培养缺乏大规模生物反应器生产解决方案。此外，需要从其生长表面进行细胞分离，从而导致放大工艺更加复杂，同时意味着成本会更高。我们相信，为了满足对疫苗日益增长的需求，将贴壁细胞应用于悬浮细胞培养是一种合理的生产策略，可以大大简化上游工艺流程，并在降低成本的同时提高滴度产量。

尽管对于病毒载体和疫苗生产已经评估了许多哺乳动物细胞系 [12-16]，但在可满足这些需求的各细胞平台中，HEK293 细胞系是使用最广泛的平台之一。HEK293 细胞具有多种优点，包括维护程度低、增殖速度快以及可便捷地应用于瞬时表达和稳定表达。此外，它们易于转染，可产生大量重组蛋白和病毒颗粒。具体来说，已经在使用微载体的搅拌罐生物反应器系统中获得了高产量的腺病毒载体（约  $4 \times 10^{15}$  个病毒颗粒）[17,18]。然而，由 ThermoFisher 开发出的新型悬浮优化 HEK293 细胞系——Expi293F 细胞能够收获高细胞产量 [19]，同时可加快不同病毒载体的生产工艺。

AAV 是领先的基因递送平台，最近也成为疫苗行业的重要工具 [20-24]。AAV 颗粒包含约 4.7 kb 的单链 DNA 基因组，包装在由 60 种二十面体对称排列的蛋白质组成的无包膜衣壳中。已在人类中发现了 12 种 AAV 血清型，其中 AAV-2 是临床前研究和临床研究中使用的最广泛的载体 [25-27]。每种血清型都有独特的受体，其组织特异性由衣壳血清型决定。此外，因目前尚未发现野生型 AAV 会在体内引起疾病，故其安全性评级较高；因 AAV 在体内引起的反应非常温和，故其免疫原性较低；AAV 感染性广泛 (AAV 感染静止细胞和分裂细胞)。上述三点是 AAV 载体最重要的优势。

## AAV-2 衣壳生产工艺流程



图 1：典型的 AAV-2 载体(衣壳)生产工艺流程。

使用 BioRender.com 创建

在当前新冠疫情背景下,随着人类暴露于新致命病原体的风险增加,需要推动可扩展性更高的疫苗生产策略,以满足不断增长的全球需求。为此,我们使用 SciVario 双联生物反应器控制系统和 BioBLU 1c 一次性生物反应器,并运用 Expi293F 细胞在受控环境中通过 AAV-2 衣壳生产过程,在悬浮细胞培养平台上开发出了一个基于生物反应器的 AAV 生产应用实例。我们在运行过程中分析了细胞生长、活力和代谢活性(培养基中的葡萄糖、氨和乳酸水平)。我们还测定了上清液和细胞沉淀的可渗透细胞中的 AAV-2 衣壳滴度。

### 材料和方法

#### 悬浮细胞系

选择合适的细胞系平台是大规模生产 AAV 衣壳的关键因素之一。此外,HEK293 细胞系的另一个重要特征是它们通过整合位于 19 号染色体上的含有 E1A 和 E1B 基因的腺病毒 5 (Ad5)基因组片段进行转化 [28,29]。E1A 和 E1B 基因是 AAV 复制的必要辅助因子。

我们使用的是悬浮优化的 HEK293 细胞系 Expi293F™ (ThermoFisher Scientific, USA, A14528),这是因为我们之前已证明它是一种稳健的悬浮细胞系,能够在高密度培养中实现更高的单个细胞生产力 [19]。

### AAV 载体生产工艺流程

在生产 AAV-2 载体时,我们遵循生产高滴度 AAV 的典型策略,包括以下几个步骤:从质粒开发或选择、细胞扩增、质粒转染和病毒载体生产到分离和滴定(图 1)。

#### 质粒选择

我们使用的方法仅涉及两种质粒,即包含 AAV-2 的结构基因和包装基因(复制基因(rep)和衣壳基因(cap))的 rep/cap 质粒和辅助质粒(AAVpro® 包装质粒(AAV2),Takara,USA, 6234)。在这种情况下,辅助质粒包含腺病毒 E2A、E4 和 VA,它们是高效生产 AAV 所需的基因,而不是野生型腺病毒,这样可使系统更加安全方便。我们使用这两种质粒来生产没有目的基因的 AAV-2 空衣壳载体来确定可行性。

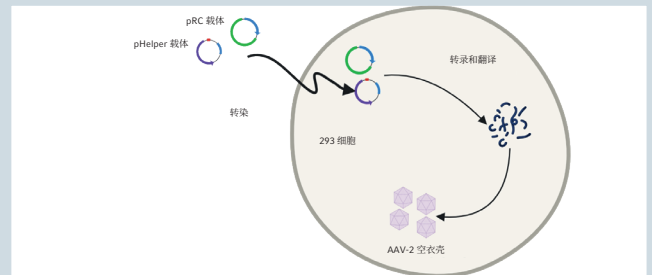


图 2：使用 AAV 无辅助系统在没有目的基因的细胞内形成 AAV-2 空衣壳。

使用 BioRender.com 创建

### 质粒转染和病毒载体生产

细胞一旦发生扩增并达到选定的转染细胞密度,我们就制备 DNA 复合物(带有固定比例的选定质粒)并将其添加到系统中。我们使用的转染试剂是 FectoVIR®-AAV (PolyPlus+ transfection, France, 101000044)。FectoVIR-AAV 是一种基于化学和无动物源性成分的新型转染试剂,旨在解决当前 AAV-2 病毒载体产量和工业可扩展性方面的限制。

### AAV-2 分离、纯化和衣壳滴度

有别于其他 AAV 血清型, AAV-2 衣壳在细胞内的保留程度很高,因此就需要一种方法将其分离。我们使用 AAVpro 纯化试剂盒 (Takara, USA, 6232) 获得 AAV-2 衣壳。

我们使用酶联免疫吸附试验 (AAV-2 Xpress ELISA, Progen, USA, PRAAV2XP) 对来自上清液和细胞沉淀的 AAV-2 衣壳滴度进行定量测定。

### 在生物反应器中生产 AAV-2 衣壳接种物制备

我们在摇床中开始细胞的扩增过程,如图 3 所示。我们在 New Brunswick S41i CO<sub>2</sub> 恒温摇床 (Eppendorf, Germany) 中培养细胞(培养条件: 温度 37 °C, CO<sub>2</sub> 浓度 8 %, 搅拌速度 125 rpm), 在第三次传代中获得了超过  $900 \times 10^6$  个细胞。在扩增过程中,我们保持接种密度、摇瓶装填比例和其他参数不变。最后,我们在每个接种瓶中 200 mL Expi293F 表达培养基中制备了含有  $400 \times 10^6$  个细胞的接种物。

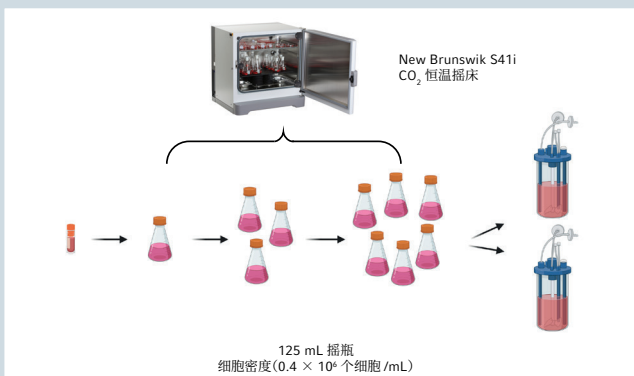


图 3: 从摇床到生物反应器的 AAV 悬浮培养放大工艺流程

使用 BioRender.com 创建

### SciVario 双联生物反应器控制:

我们使用 SciVario 双联生物反应器控制系统和配备单个斜叶搅拌桨的 BioBLU 1c 一次性生物反应器进行两次分批培养。每个生物反应器装置配备三个用于 pH(端口 1)和 DO(端口 2)电极的通用端口连接器、一个结合了电加热水和冷的温度控制块、搅拌控制和一个气体模块,该气体模块包括 1 个具有 1:12,000 超高调节比的热式质量流量控制器 (TMFC) 和 4 个用于 4 种气体自动混合的电磁阀(参见图 4)。

### 电极校准

在制备 BioBLUs 1c 一次性生物反应器之前,我们将填充了凝剂的 ISM pH 电极连接到 SciVario 双联生物反应器控制系统,软件会自动检测到它们。我们根据操作手册进行校准,分别使用 pH 7 和 pH 4 的缓冲溶液作为“零”和“斜率”。然后,我们断开 pH 电极连接,在可高压灭菌的袋中对其进行灭菌。

### BioBLU 1c 一次性生物反应器制备和工艺参数

我们为每台 BioBLU 1c 配备了 pH 电极(之前已灭菌,详见上文)。我们在生物安全柜内的无菌条件下将 pH 电极插入 PG 13.5 端口。此外,我们还将以下设备连接到磁头板: 极谱式 DO 电极 (Mettler Toledo®)、排气冷凝器、取样汲取管、连接到气体喷射口的 4 种气体混合管线以及连接到加液口 (一个用于接种 / 添加培养基, 一个用于添加碱, 还有一个用于添加 0.1% 的消泡剂 (Pluronic®-F68 表面活性剂, Life Technologies®, USA)) 的硅管延长件。然后,我们将 BioBLU 1c 生物反应器放置在各自的温度模块中,使系统保持恒温。



图 4: 使用 SciVario 双联生物反应器控制系统和 BioBLU 1c 一次性生物反应器在分批培养中生产 AAV-2 衣壳。

最后,我们将 800 mL Expi293F™ 表达培养基添加到每个生物反应器中,然后按照表 1 中列出的参数和设定点调节至少 24 小时。

| 参数     | 设定点                                                                                                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 起始体积   | 800 mL                                                                                                                                              |
| 终末体积   | 1 L                                                                                                                                                 |
| 初始搅拌速率 | 155 rpm (0.4 尖端速度)                                                                                                                                  |
| 温度     | 37 °C                                                                                                                                               |
| 接种密度   | 0.4 x 10 <sup>6</sup> 个细胞 /mL                                                                                                                       |
| 细胞培养基  | Expi293™ 表达培养基                                                                                                                                      |
| DO 设定点 | 40% (P=0.1; I=0.001)                                                                                                                                |
| pH 设定点 | 7.0 (死区 = 0.2), CO <sub>2</sub> (酸) 级联 0.45 M 碳酸氢钠 (碱) 级联                                                                                           |
| 析气范围   | 将控制器输出为 30 % 时的 O <sub>2</sub> % 设置为 21 %, 将控制器输出为 100 % 时的 O <sub>2</sub> % 设置为 100%。将控制器输出为 0 % 时的流量设置为 0.04 SLPH, 将控制器输出为 100 % 时的流量设置为 30 SLPH。 |

### DO 级联控制

我们建立了以下 DO 级联: “将控制器输出为 30 % 时的 O<sub>2</sub> % 设置为 21 %, 将控制器输出为 100 % 时的 O<sub>2</sub> % 设置为 100%。将控制器输出为 0 % 时的流量设置为 0.04 SLPH, 将控制器输出为 100 % 时的流量设置为 30 SLPH。”

### 在 BioBLU 1c 一次性生物反应器中进行 Expi293F™ 细胞培养

我们在 BioBLU 1c 一次性生物反应器中以约 0.4 x 10<sup>6</sup> 个细胞 /mL 的细胞密度和 95 % 以上的细胞活力接种了 200 mL 上述接种物(参见“接种物制备”部分)。我们将温度设置为 37 °C, 将溶解氧(DO)控制在 40%, 同时根据需要使用 Pluronic-F68 表面活性剂。我们采用凝胶填充的 pH 电极将细胞培养运行中的 pH 控制在 7.0(死区 = 0.1), 使用 CO<sub>2</sub>(酸)和 0.45 M 碳酸氢钠(碱)的级联。我们每天从生物反应器中取样, 离线测量 pH、细胞活力和细胞密度以及各种代谢物的浓度。

### 在 BioBLU 1c 一次性生物反应器上转染 Expi293F 细胞的程序

在对生物反应器接种三天后, 我们达到了约 3 x 10<sup>6</sup> 个细胞 /mL 的转染细胞密度。然后, 将摩尔比为 2:1 的两种质粒 (1752 µg pRC + 1245 µg pHelper) 用 50 mL Expi293F 表达培养基稀释(总培养体积的 5%)。接下来, 我们短暂地将 FectoVIR 进行涡旋并一次性将 3 mL 溶液加入质粒 / 培养基溶液中, 之后再次涡旋并在室温下将混合溶液培养 30 分钟。最后, 我们将转染混合物添加到生物反应器中的细胞上。

### 细胞活力和代谢活性

我们每天从 BioBLU 1c 一次性生物反应器采集样本, 测定细胞活力、细胞密度和代谢物(葡萄糖、氨(NH<sub>3</sub>)和乳酸)的浓度, 测定方式为将 5 mL 无菌注射器连接到鲁尔锁样品端口。我们采集了 5 mL 体积的死样本, 然后丢弃; 在改用新的 5 mL 无菌注射器后, 我们又采集了 3 mL 作为活样本进行分析。我们取 1 mL 样本使用 Cedex® Bio Analyzer(Roche, USA)测量代谢物水平, 取 1 mL 样本使用 Vi-Cell® XR 细胞活力分析计数仪(Beckman Coulter®, USA)测量细胞活力和细胞密度, 取 1 mL 样本使用 Orion Star™ A211 pH 计(ThermoFisher Scientist, USA)对 pH 进行离线查看。

### AAV-2 衣壳分离

转染后 72 小时, 我们使用带有线组的 labtainer 袋 (ThermoFisher Scientific, USA, SH30658.11) 采集了 60 mL Expi293F 细胞和培养基。我们以 300 x g (5430R 台式离心机, Eppendorf) 将细胞离心 5 分钟, 然后分离细胞沉淀和上清液。我们使用 AAVpro Maxi 纯化试剂盒, 按照制造商的方案说明对细胞沉淀或上清液中的 AAV-2 衣壳进行分离和纯化。

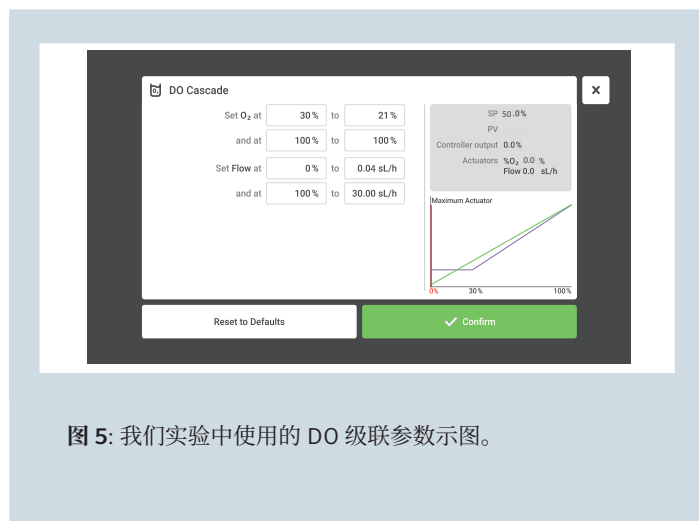


图 5: 我们实验中使用的 DO 级联参数示意图。

## AAV-2 衣壳滴定

病毒颗粒分离后, 我们通过 AAV-2 Xpress ELISA 试剂盒对细胞沉淀和上清液中衣壳的总量进行了定量。使用该试剂盒进行免疫滴定快速、灵敏且重现性良好, 适用于滴定组装和完整的 AAV-2 空衣壳。然后, 我们根据制造商的方案说明完成了含量测定。

## 结果和讨论

### 在生物反应器中生产 AAV-2 衣壳

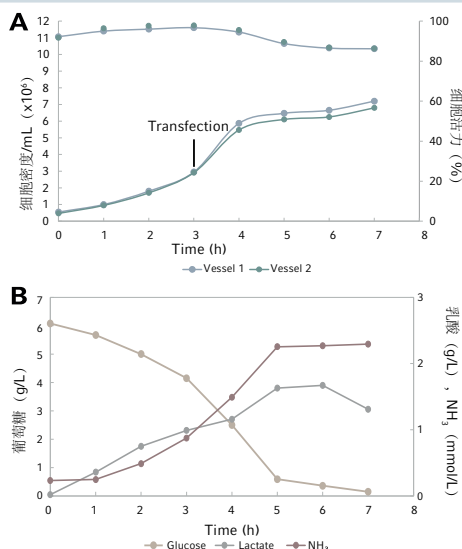
本应用的目的是证明基于生物反应器的悬浮细胞培养方法用于基于 AAV 载体的疫苗生产的可行性。我们之前已证明了 Expi293F 细胞可在没有 AAV 的生物反应器的悬浮培养中稳健生长 [23]。我们以 2:1 的 pCR:pHelper 质粒比和 1:1 的 FectoVIR: 总 DNA 比建立了质粒转染方案。我们使用之前提到的转染条件在 1 L 生物反应器中进行了瞬时转染, 然后继续在生物反应器中进行细胞培养, 培养时长共 7 天。

我们以约  $0.4 \times 10^6$  个细胞/mL 的细胞密度对用于生产 AAV-2 衣壳的两个罐体进行了接种, 然后在第 3 天各以约  $3 \times 10^6$  个细胞/mL 的细胞密度进行转染。

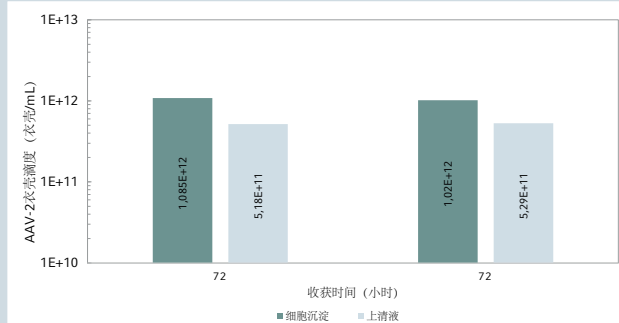
我们观察到, 在培养的第 1 天和第 4 天之间两个生物反应器中的细胞生长迅速加快, 活细胞密度达到  $7 \times 10^6$  个细胞/mL 的峰值(参见图 6A)。我们想指出的是, 与未进行转染的生物反应器工艺相比, 两种罐体中的生物工艺在转染后的细胞生长较低(数据未显示, 活细胞密度的峰值约为  $13 \times 10^6$  个细胞/mL)。此外, 我们测定了葡萄糖的消耗量和乳酸与  $\text{NH}_3$  的生成量, 同时在整个运行过程中使乳酸和  $\text{NH}_3$  的浓度分别保持在 2g/L 和 2.3 mmol/L 以下(见图 6B)。

如前所述, 我们在转染后 72 小时收获了 60 mL 细胞和培养基, 同时通过 ELISA 测定了细胞团和上清液中的 AAV-2 衣壳滴度。

我们观察到, 与来自两种罐体的 AAV-2 生产工艺中的细胞团相比, 来自上清液的 AAV-2 衣壳滴度较低(参见图 7)。我们从两个生物反应器中获得的 AAV 滴度非常相似, 这证明使用精密控制的生物反应器生产 AAV 具有良好的重现性。



**图 6:** BioBLU 1c 一次性生物反应器中的 Expi293F 生长曲线。A: 从接种(第 0 天)到转染(第 3 天)和收获(第 6 天), 两种不同容器的 Expi293F 细胞密度和活力。B: 来自容器 #1 的细胞培养物的代谢曲线。



**图 7:** 从两种罐体的转染细胞的细胞团和细胞培养上清液中获得的 AAV-2 衣壳滴度。

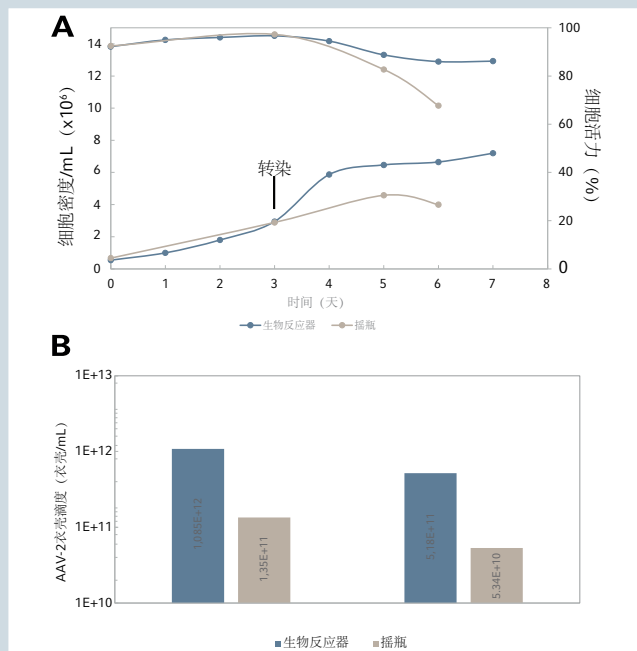
## 摇瓶和生物反应器生产 AAV-2 衣壳的比较

我们成功实现了对 Expi293F 细胞的转染,同时在摇瓶和精密控制的生物反应器中定量了 AAV 衣壳生产滴度。如图 8A 所示,与转染后的摇瓶工艺相比,生物反应器工艺可获得更高的细胞密度和活力。此外,我们还发现,与摇瓶中观察到的细胞密度和活力降低相比,生物反应器中的细胞在第 5 天后保持了较高的细胞密度。

我们对比了使用摇瓶和生物反应器生产的 AAV-2 衣壳(图 8B),发现使用精密控制的生物反应器系统进行生产所获得的衣壳滴度要高得多。

## 结论

本研究着重说明的是,基于悬浮培养的疫苗生产平台是一种更简易的贴壁培养替代方法。使用悬浮培养获得的 AAV-2 颗粒产量高,同时在培养过程中使用了在 CHO 细胞抗体生产领域技术成熟的标准搅拌罐悬浮生物反应器工艺。悬浮法可实现更加直截了当地扩大到类似于成熟 CHO 培养工艺的大型生物反应器 [26],具有非常可取的简易性。同时,与基于贴壁培养的方法相比,悬浮法可以使用的生产系统类型也更加多样化。我们在摇瓶阶段使用培养箱摇床开始悬浮培养工艺,然后使用 SciVario 双联生物反应器控制系统和 BioBLU 1c 一次性生物反应器进行生物反应器悬浮培养。SciVario 双联的设置高效而简易,与摇瓶中的细胞转染相比,可实现对细胞培养环境的精准控制,来自细胞团的 AAV-2 衣壳滴度可达到约  $10^{12}$  个衣壳 / mL,而在相同摇瓶转染条件下只能获得约  $10^{11}$  个衣壳 / mL。此外,从两种分批培养工艺中获得的数据证明,使用 SciVario 双联作为控制器时,这些实验可获得良好的可重现性。我们相信,Expi293F 细胞系与来自 Eppendorf 先进的悬浮培养生物反应器和控制器,如 SciVario 双联 [30]、BioFlo 320 [31] 和 BioFlo 720 [29],可为开发基于悬浮液的疫苗平台以及用于基因治疗研发的病毒载体生产提供理想的解决方案。



**图 8:** 摇瓶和生物反应器(容器 1)之间 HEK293 细胞生长曲线和 AAV-2 衣壳滴度的比较。A: Expi293F 细胞密度和活力。B: 来自培养上清液和细胞团的 AAV-2 衣壳滴度。

## Literature

- [1] <https://cellculturedish.com/questions/two-questions-what-do-you-consider-typical-titer-for-aav-production-and-what-can-you-do-to-increase-it/>
- [2] Gebre MS, Brito LA, et al. Novel approaches for vaccine development. *Cell*. 2021; 184:1589-1603.
- [3] Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*. 2021; 21:83-100.
- [4] Lal H, et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372:2087-2096.
- [5] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018; 17:261-279.
- [6] Sasso E, Morena A, Zambrano N et al. New viral vectors for infectious diseases and cancer. *Seminars in Immunology*. 2020; 50:101430.
- [7] Mendonça SA, Lorincz R, Boucher P et al. Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *npj Vaccines*. 2021; 6:97.
- [8] Zabaleta N, Dai W, Bhatt U, et al. An AAV-based, room-temperature-stable, single-dose COVID-19 vaccine provides durable immunogenicity and protection in non-human primates. *Cell Host & Microbe*. 2021; 29:1437-1453.
- [9] Sha M. Vero Cell-based Vaccine Production: Cell lines, Media and Bioreactor Options. *Application Note*. 2021; App-23.
- [10] Xiaofeng (Kevin) Han, Sha M. Vero High-Density Vero Cell Perfusion Culture in BioBLU® 5p Single-Use Vessels. *Application Note*. 2017; App-359.
- [11] Xiaofeng (Kevin) Han, Sha M. Easy Perfusion for Anchorage-dependent Cell Culture using an Eppendorf Vessel equipped with Microcarrier Spin Filter. *Application Note*. 2020; App-414.
- [12] Rimmelzwaan GF, Baars M, Claas ECJ, Osterhaus ADME. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *Journal of Virological Methods*. 1998; 74:57-66.
- [13] Voeten JTM, Brands R, Palache AM, et al. Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine*. 1999; 17:1942-1950.
- [14] Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine*. 2001; 19:2716-2721.
- [15] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*. 1998; 16:960-968.
- [16] Youil R, Su Q, Toner TJ, et al. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines. *Journal of Virological Methods*. 2004; 120:23-31.
- [17] Vemula SV, Mittal SK. Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010; 10:1469-1487.
- [18] Fuenmayor Garcés J, Gutiérrez Granados S, Gòdia Casablanco F, Cervera Gracia L. Cell line and plasmid influence on the efficiency of HEK293 cells transient transfection for the production of VLP-based vaccines. *New Biotechnology*. 2016; 33:S32-S33.
- [19] Escobar Ivirico JL, Sha M. HEK293 Suspension Cell Culture using Eppendorf BioFlo 320 with BioBLU 3c Single-Use Vessels. *Application Note*. 2021; App-447.
- [20] Fakhiri J, Landegger LD, Grimm D. Breaking the sound barrier: Towards next-generation AAV vectors for gene therapy of hearing disorders. *Hearing Research*. 2020; 15:10809.
- [21] Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Molecular Therapy*. 2021; 29:464-488.
- [22] Xin KQ, Urabe M, Yang J, et al. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* 2001; 12:1047-1061.
- [23] Du L, He Y, Wang Y, et al. Recombinant adeno-associated virus expressing the receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein elicits neutralizing antibodies: implication for developing SARS vaccines. *Virology*. 2006; 353:6-16.
- [24] LeWitt P, Rezai AR, Leehey MA, et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*. 2011; 10:309-319.
- [25] Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2020; 21:255-272.
- [26] Kuzmin DA, Shutova MV, Johnston NR, et al. The clinical landscape for AAV gene therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021; 20:173-174.

- [27] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. J. gen. Virol. 1977; 36:59–7.
- [28] Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and Sequencing of the Cellular– Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line. Virology. 1997; 233:423–429.
- [29] Suttle A, Longworth J, Sha M. From Shaker to Pilot/Production Bioreactor: How Scale Up Assist Using the BioFlo® 720 Bioreactor Control System Can Help Your Antibody Production Workflow. Application Note. 2021; App-436.
- [30] Suttle A, Sha M. Parallel Fed-batch CHO Culture on SciVario® twin, the Flexible Controller for All Your Bioprocess Needs. Application Note. 2020; App-432.
- [31] Suttle A, Sha M. CHO Cell Culture in Eppendorf BioBLU® 10c Single-Use Vessels. Application Note. 2018; App-361.

#### Ordering information

| Description                                                                                                                                                                          | Order no.  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>BioBLU® 1c Single-Use Bioreactor</b> , cell culture, open pipe, 2 pitched-blade impellers, optical pH, sterile, 4 pieces                                                          | 1386110500 |
| <b>SciVario® twin Fermenter/Bioreactor Control System</b> , base unit, 100 – 240 V/50/60 Hz, for 2 vessels                                                                           | 7600100001 |
| <b>New Brunswick S41i</b> , 170 L, CO2 incubator shaker with inner shelf and touch screen control, stackable up to 2-fold, 1 (2. optional) shelves, 120 V/60 Hz, orbit 2.5 cm (1 in) | S41I120010 |
| <b>Centrifuge MiniSpin® plus</b> , non-refrigerated, with Rotor F-45-12-11, 120 V/50 – 60 Hz (US)                                                                                    | 022620207  |
| <b>Centrifuge 5430 R</b> , keypad, refrigerated, with Rotor FA-45-30-11 incl. rotor lid, 120 V/50 – 60 Hz (US)                                                                       | 022620601  |
| <b>Eppendorf Conical Tubes</b> , sterile, pyrogen-, DNase-, RNase-, human and bacterial DNA-free, colorless, 50 mL                                                                   | 0030122178 |
| <b>Eppendorf Conical Tubes</b> , sterile, pyrogen-, DNase-, RNase-, human and bacterial DNA-free, colorless, 15 mL                                                                   | 0030122151 |

**Your local distributor:** [www.eppendorf.com/contact](http://www.eppendorf.com/contact)  
Eppendorf SE · Barkhausenweg 1 · 22339 · Hamburg · Germany  
[eppendorf@eppendorf.com](mailto:eppendorf@eppendorf.com) · [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

[www.eppendorf.com/bioprocess](http://www.eppendorf.com/bioprocess)

AAVpro® is a registered trademark of Takara Bio Inc., Japan. FectoVIR® is a registered trademark of POLYPLUS TRANSFECTION Société Anonyme, France. ISM® and Mettler Toledo® are registered trademarks of Mettler-Toledo AG, Switzerland. Pluronic® and Life Technologies® are registered trademarks of Life Technologies Corp. USA. Cedex® is a registered trademark of Roche Diagnostics GmbH, Germany. BioBLU®, SciVario®, Eppendorf®, MiniSpin®, and the Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf SE, Germany. Expi293F™, Orion Star™, and Thermo Scientific™ are trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc., USA. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2022 by Eppendorf SE.