

HEK293分批补料培养优化rAAV生产

Expi293细胞在转染后，通过分批补料保持活率，提高病毒滴度和病毒颗粒质量。

引言

重组腺相关病毒 (rAAV) 载体是基因治疗中基因传递平台的首选载体。rAAV能够在体内稳定和长期的进行基因表达，同时由rAAV具有最小的免疫原性且几乎没有毒性，使它成为基因治疗中的完美工具。各种血清型的可用性使rAAV适应不同的基因治疗方法，这反映在几种已批准的基于rAAV的药物和许多正在进行的临床试验中。

另一方面，目前的产量往往不能满足基因治疗应用的高剂量要求。典型的 III 期临床试验需要 10^{16} 至 10^{18} 个病毒基因组 (VG)，治疗剂量为每公斤体重 10^{12} 至 10^{14} VG，而目前的产量仅为 10^8 至 10^{11} VG/mL 左右。

有趣的是，大多数生产的重组衣壳是无目的基因组的，这对基因治疗并没有用，并且使下游纯化复杂化。这些因素是基于rAAV的疗法很容易花费数千至数百万美元用于一个疗程的部分原因。

在本案例研究中，描述了FUJIFILM Irvine Scientific开发用于HEK293细胞培养的新型补料培养基的方法，以提供有用的见解，从而了解通过提高病毒滴度和优化病毒包装来提高rAAV生产所使用的方法和参数分析。

材料与方

在本案例研究中，我们旨在开发用于HEK293细胞培养的补料培养基，以通过提高病毒滴度和优化病毒包装来提高rAAV的产量。为此，我们将Expi293细胞 (Thermo Fisher Scientific) 驯化于BalanCD HEK293培养基 (FUJIFILM Irvine Scientific) 中，通过几代传代培养以确保生长稳定。我们从第3-25代中挑选细胞，并在转染前24小时以 10^6 cells/mL 接种。

根据行业标准，使用AAV2三质粒 (GOI、RC 和辅助质粒) 和聚乙烯亚胺 (Polyplus PEIpro) 转染细胞。在转染后24小时，使用12% v/v的培养物给细胞补料对照或13种不同的原型补料 (A - M) 中的一种。转染后72小时收获细胞。

在转染前和收获时监测细胞指标 (图1)。数据显示，在这一系列组合中应用补料不会对细胞产生负面影响，并且所有细胞指标，包括活细胞密度(VCD)、活率和细胞直径都与“无补料”对照相当。



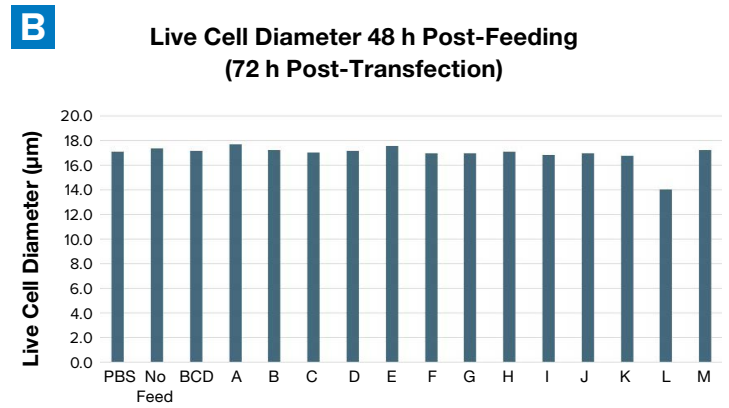
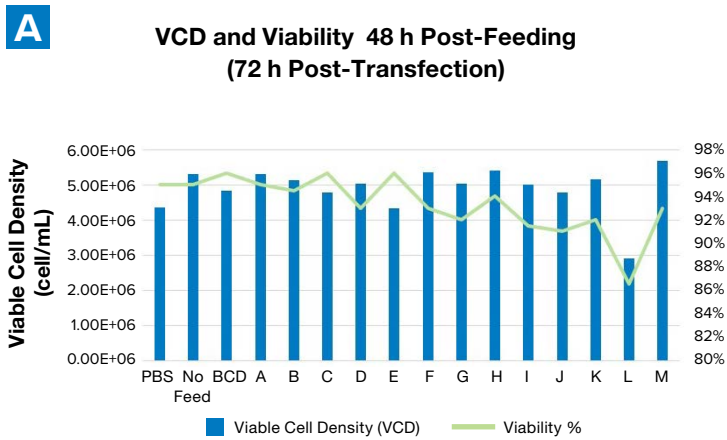


图1. Expi293细胞以 10^6 cells/mL的密度接种在新鲜的BalanCD培养基中。

它们在24小时后使用PEIpro方法转染，该方法使用 $1.5 \mu\text{g DNA/mL}$ 和DNA:PEI 1:2。将培养物分成24孔板中的16个孔，并使用PBS、无补料或BalanCD HEK293 (BCD, FUJIFILM Irvine Scientific) 作为对照或13个原型补料 (A-M) 之一在转染后24小时以12% v/v补料。(A)记录收获时细胞VCD和活率以及(B)细胞直径，这表明在生产AAV2后的细胞培养期间，所有补料培养基都支持细胞健康生长。

表现最佳的培养基提高了AAV2滴度并提高了包装效率

VG滴度使用AAV实时PCR滴定试剂盒 (Takara Bio) 测量，衣壳滴度使用Progen AAV2滴定ELISA试剂盒测量 (图2)。数据显示，原型补料中的VG和衣壳滴度得到了不同程度的改善。补料J (4.72×10^9 VG/mL) 获得了最高的VG和衣壳滴度，与“无补料”对照相比，AAV2滴度提高了约10倍。补料I也有所改善包装效率，达到 7.53×10^{10} capsid/mL。

在不优化包装的情况下提高衣壳产量，只会产生空壳。至关重要的是，成功的补料将有助于改善病毒包装，或者换句话说，改善病毒基因组/衣壳 (VG/VP) 比率。图3说明了使用原型补料A-J通过测量VG/衣壳比率来确定包装效率。

在这种情况下，补料A的效果最好，达到32.77%的病毒包装效率，其次是补料B (28.9%) 和补料J (21.81%)。

根据最高到最低的VG滴度、病毒基因组/衣壳比率，对原型补料进行排序，确定了最佳补料。然后对原型补料从最低到最高进行排序 (图4)。从性能角度来看，很明显，补料J不仅将VG滴度提高了10倍，而且将衣壳产量提高了约6倍，病毒基因组/衣壳比率提高了1.67倍。虽然补料A提高了包装效率 (提高2.51倍)，但VG滴度仅提高1.55倍，且衣壳产量下降。

AAV2 Capsid and Viral Genome (VG) Titer per mL

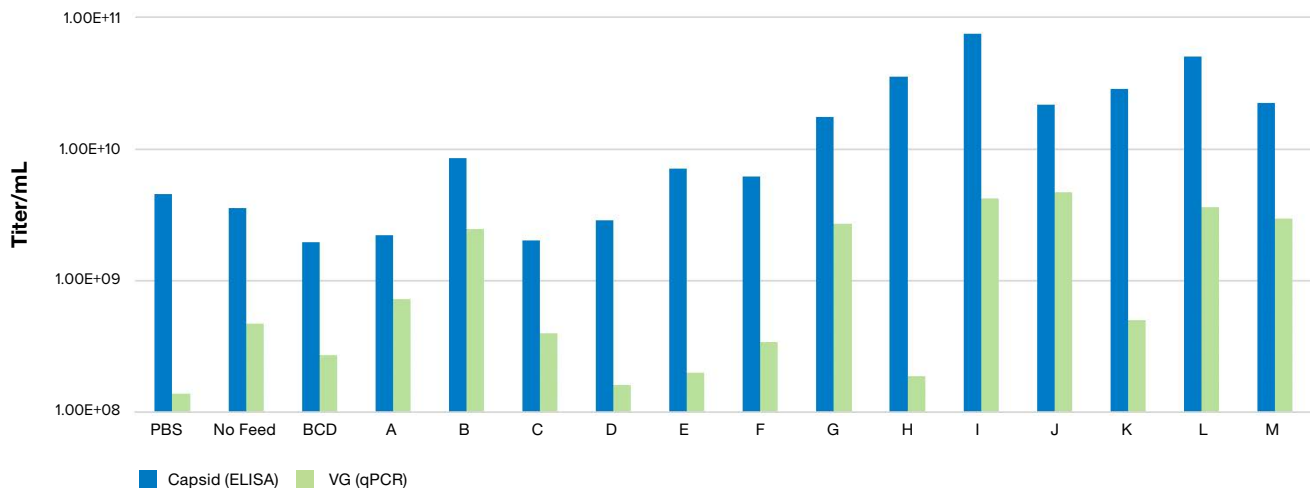


图2. 使用三循环冻融法提取细胞产物。在qPCR之前，根据Takara Bio AAV实时PCR试剂盒说明，通过离心澄清提取物并用DNase和裂解缓冲液处理。绿色条表示每毫升培养物中的VG滴度，而蓝色条表示通过Progen AAV2滴定ELISA试剂盒测量的每毫升衣壳滴度。补料J表现最佳，并与“无补料”对照相比，提高了AAV2滴度约10倍。

VG/Capsid Ratio

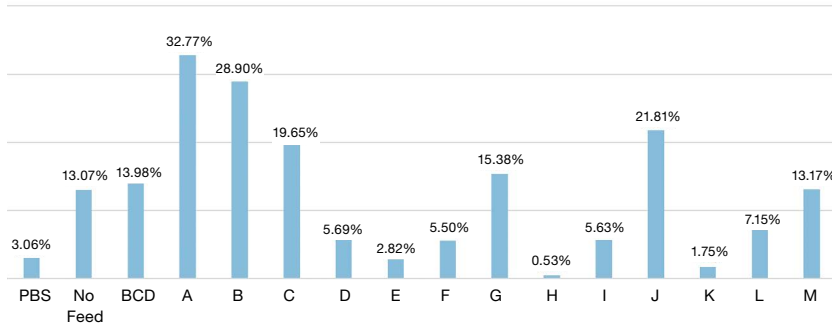


图3. 病毒基因组/衣壳比率，是病毒包装效率的指标。补料A的包装效率约为33%，其次是补料B（约29%）和补料J（约22%）。

Selection of the Top-Performing Media Prototypes

Rank			
Feed Type	Titer	VG/capsid	Total
J	1	3	4
B	6	2	8
A	7	1	8
G	5	5	10
M	4	7	11
L	3	9	12
I	2	11	13
C	10	4	14
No Feed	9	8	17
BCD	12	6	18
K	8	15	23
F	11	12	23
D	16	10	26
E	13	14	27
PBS	16	13	29
H	14	16	30

X Times Improvement of Each Prototype Over No Feed Control			
Feed Type	VG	Capsid	Vg/capsid
A	1.55	0.62	2.51
B	5.29	2.39	2.21
J	10.05	6.02	1.67

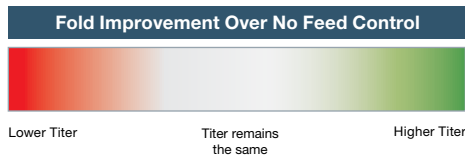


图4. 根据VG滴度和病毒基因组/衣壳比率，确定了表现最佳的培养基。Feed J将AAV产量提高了大约10倍，同时优化了病毒包装(1.67X)。与其他原型培养基相比，Feed A实现了最有效的包装。

优化最佳候选补料以提高液体形式的稳定性

VG滴度优化的验证在30 mL培养瓶中完成（图5）。与“无补料”对照相比，补料J的AAV2滴度增加了大约10倍。

尽管在VG滴度和衣壳生产方面取得了可喜的结果，但不幸的是，补料J在粉末水化后4-5周有沉淀的趋势。为了调查此问题的根本原因，我们使用HPLC分析了沉淀物并确定了颗粒中存在的化合物。约73%的化合物1沉淀，而其他组分如2、3和4可忽略不计（<0.1%，图6）。在培养基优化实验中滴定和分析化合物1。该实验表明，从补料J中去除化合物1不会损害细胞生长（数据未显示）并提高VG滴度（图7）。

AAV2 (VG) Titer Measured by qPCR (Takara)

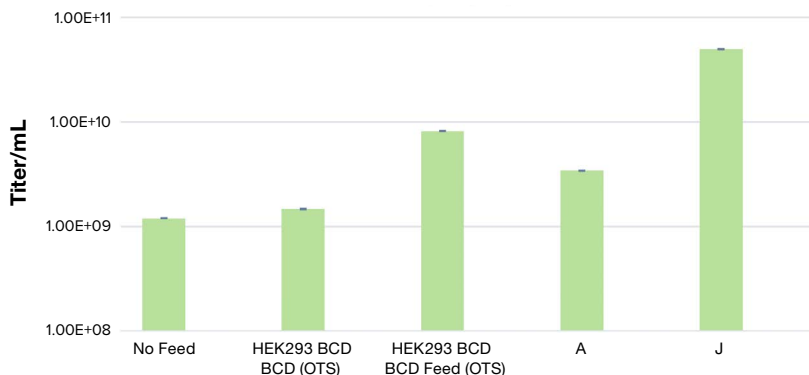


图5. 在30 mL培养瓶中进行验证实验；与“无补料”对照相比，使用补料J后AAV2 (VG)滴度提高了约10倍。

Component	% in the Pellet Compared to the Fresh Media
Component 1	73.46
Component 2	0.03
Component 3	0.03
Component 4	0.02

图6. HPLC分析显示，水化后4-5周的大部分沉淀物由一种成分(73.46%)组成。

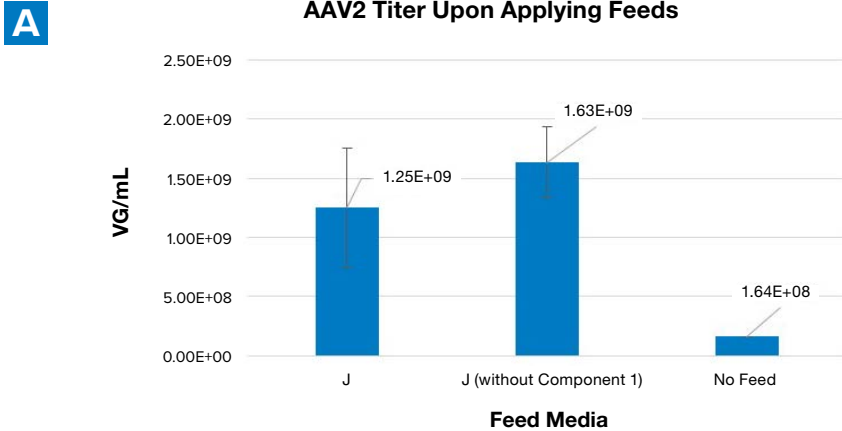
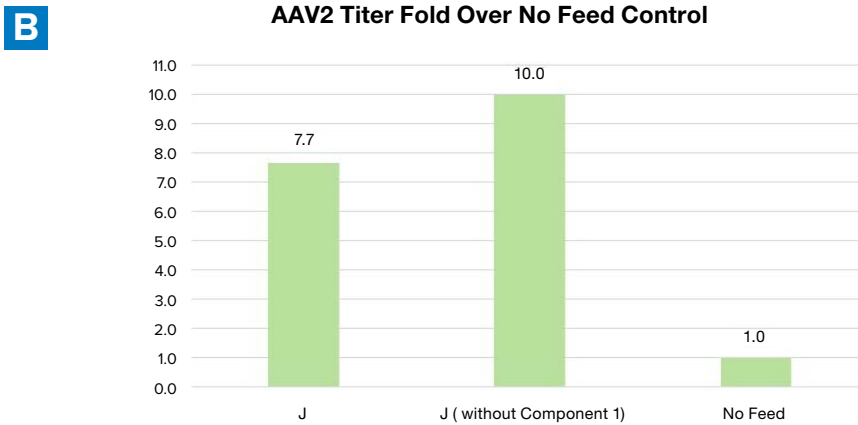


图7. 从补料 J 配方中去掉组分1会增加AAV2滴度。实验在30 mL培养瓶中进行。



总结与展望

FUJIFILM Irvine Scientific开发了一种补料培养基，可以将AAV2病毒基因组滴度提高约10倍，并将包装效率提高1.67倍，且不会影响细胞生长和健康。通过稳定性研究和配方优化，开发了液体形式的稳定补料。

我们的R&D实验室正在用培养瓶对其他AAV血清型（如AAV5和AAV9）进行测试，并在10 L生物反应器中进行试验。

FUJIFILM
Value from Innovation

FUJIFILM Irvine Scientific, its logo, and BalanCD are registered trademarks of FUJIFILM Irvine Scientific, Inc. in various jurisdictions. All other trademarks are the property of their respective owners.

 IrvineScientific

www.irvinesci.com