



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116917461 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 20

(21) 申请号 202380009311.1

(22) 申请日 2023.04.28

(66) 本国优先权数据

202210472347.0 2022.04.29 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/091697 2023.04.28

(71) 申请人 北京华龔生物科技有限公司

地址 100195 北京市海淀区杏石口路80号

益园文化创意产业基地B区B1-208

(72) 发明人 鄢晓君 刘伟 赵红莉 张元元

徐环叶 刘少丹

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11436

专利代理师 程淼 刘海

(51) Int.Cl.

C12N 5/07 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页 附图13页

(54) 发明名称

基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法

(57) 摘要

一种基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,具体涉及一种在三维多孔微载体上进行培养的细胞中实现基因载体,例如慢病毒质粒、腺病毒质粒、腺相关病毒(AAV)质粒,转染并生产病毒的方法。

1. 一种基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,包括以下步骤:
 - (1) 将细胞悬液与三维多孔微载体悬液相混合,并在生物反应器进行细胞培养;
 - (2) 用基因载体转染细胞,并培养实现细胞产毒;
 - (3) 收获病毒。
2. 根据权利要求1所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述三维多孔微载体由选自胶原、明胶、壳聚糖、透明质酸、和/或海藻酸钠的材料制成。
3. 根据权利要求1或2所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,进行细胞培养时,三维多孔微载体的浓度是0.5-12g/L,优选为1-10g/L,更优选为1-5g/L。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述生物反应器包括连续搅拌罐生物反应器、波浪式一次性反应器。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述生物反应器是连续搅拌罐生物反应器,步骤(1)进行细胞培养时采用间速培养和恒速培养的组合,间速培养时以较高速约30rpm至80rpm进行约5-10分钟;以较低速约1rpm至5rpm进行约25-35分钟;较高速搅拌和较低速搅拌交替进行;在约4-36小时以后改为恒速培养,以较高速约30rpm至80rpm进行约24-96小时或者更长的时间。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述生物反应器是连续搅拌罐生物反应器,步骤(2)转染后0-12小时采用恒速或间速培养,随后以较高速例如约30rpm至80rpm进行约12-240小时或者更长的时间。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述生物反应器是波浪式一次性反应器,步骤(1)进行细胞培养时采用间速培养和恒速培养的组合,间速培养时以较高速约7rpm至10rpm进行约5-10分钟;静止约25-35分钟;较高速搅拌和静止交替进行;在约4-36小时后改为恒速培养,以约7rpm至10rpm进行24-96小时或者更长的时间,倾斜角度约3°-10°。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述生物反应器是波浪式一次性反应器,步骤(2)转染培养时采用恒速培养,以约7rpm至10rpm进行约24-240小时或者更长的时间。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述细胞选自293T细胞。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,所述基因载体包括慢病毒质粒、腺相关病毒质粒、腺病毒质粒。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,其中,进行转染时的细胞培养条件包括:37℃,5%CO₂。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,还包括纯化病毒的步骤。
13. 三维多孔微载体用于病毒载体生产的用途。

基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法

[0001] 本申请要求于2022年04月29日提交的申请号为202210472347.0、发明名称为“基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法”的中国专利申请的优先权,在此通过引用将其全文并入本文。

技术领域

[0002] 本发明属于细胞基因治疗领域,涉及一种基于三维多孔微载体的病毒载体生产方法,具体涉及一种在三维多孔微载体上进行培养的细胞中实现基因载体,例如慢病毒质粒、腺病毒质粒、腺相关病毒(AAV)质粒,转染及病毒载体生产的方法。

背景技术

[0003] 近年来,基因治疗药物的病毒载体因其高转染效率和稳定的转基因表达而在体内和体外得到广泛应用。常用的病毒载体包括慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等。腺相关病毒、腺病毒等常用于体内直接表达,而慢病毒等常用于体外表达。基因治疗让我们能够治疗“无法治愈”的疾病,也为其他疾病带来新的治疗思路。目前基因治疗的主要应用场景是治疗罕见病,随着递送系统不断成熟,基因治疗一次给药即可实现彻底治愈的特性对病人吸引力越来越大,越来越多的在研发人员将应用场景从罕见病拓展到常见病。然而,作为一种“革命式”的新型疗法,基因治疗也面临诸多挑战。

[0004] 目前悬浮细胞培养常见于生产病毒载体,但悬浮细胞是由贴壁细胞“改造”而来的。由于改造的悬浮细胞不是在细胞本身的自然状态,行为方式不同,往往会比贴壁细胞提供更低的产量,因此在大规模生产方面存在许多挑战。要实现真正的工业化,还需要更可靠、可放大的解决方案。微载体结合大规模自动化生物反应器,为贴壁细胞的悬浮培养提供了可能性。

[0005] 微载体培养是目前公认最具发展前途的一种动物细胞大规模培养技术,其兼具悬浮培养和贴壁培养的优点,且容易放大。该技术已广泛用于培养各类型细胞,如293细胞、成肌细胞、Vero细胞、人二倍体细胞。目前市面常用微载体包括实心球结构和多孔微粒结构,例如,本发明专利中使用三维多孔可降解微载体。与实心球结构的微载体相比而言,通过与生物反应器相结合实现细胞悬浮培养,三维多孔可降解微载体比表面积更大,单位体积内细胞密度得到大幅度提高,同时可降解特性可实现细胞无损收获,收获效率更高。然而,在基因治疗领域病毒载体生产中,目前采用的依然是二维培养,或实心微载体培养,细胞附着在实心微载体表面上培养生长,而尚未有报道将三维多孔微载体应用于基因治疗领域病毒载体生产,三维多孔微载体培养细胞是否可用于基因载体如质粒的转染仍然是个未知数,普遍认为使用三维多孔微载体进行细胞培养以用于基因载体转染时,三维多孔结构将妨碍基因载体进入细胞,从而影响转染效率,无法实现经济上可行的规模化病毒生产。因此,亟需开发建立新的细胞培养方法以用于基因治疗领域病毒生产。

发明内容

[0006] 尽管本领域中普遍认为利用三维多孔微载体培养细胞不利于基因载体进行转染,无法实现经济上可行的规模化病毒生产,本发明人出乎意料地发现采用三维多孔微载体在动态培养条件下能够进行高效率的基因载体转染,其效果媲美甚至超越二维培养,进而实现经济上可行的规模化病毒生产。因此,本发明的目的是提供一种在三维多孔微载体进行培养的细胞中进行基因载体(以下以质粒为代表性基因载体)的转染方法。本发明的方法基于三维多孔微载体,与现有技术中报道的方法相比,本发明的方法具有大规模、可降解微载体以温和收获细胞实现逐级放大、三维仿生环境使转染后细胞存活时间长优点。

[0007] 在一方面,本发明提供了一种基于三维多孔微载体的质粒转染方法,包括以下步骤:

[0008] (1)将细胞悬液与三维多孔微载体悬液相混合,并在生物反应器进行细胞培养;

[0009] (2)用基因载体转染细胞,并培养实现细胞产毒;

[0010] (3)收获病毒。

[0011] 在一些实施方案中,所述三维多孔微载体选自由胶原、明胶(变性胶原)、壳聚糖、透明质酸、和/或海藻酸钠的材料制成。

[0012] 在一些实施方案中,进行细胞培养时,三维多孔微载体的浓度是0.5-12g/L,优选为1-10g/L,更优选为1-5g/L。

[0013] 在一些实施方案中,所述生物反应器包括连续搅拌罐生物反应器和波浪式一次性反应器

[0014] 在一些实施方案中,所述生物反应器是连续搅拌罐生物反应器,步骤(1)进行细胞培养时采用间速培养和恒速培养的组合,间速培养时以较高速约30rpm至80rpm进行约5-10分钟;以较低速约1rpm至5rpm进行约25-35分钟;较高速搅拌和较低速搅拌交替进行;在约4-36小时以后改为恒速培养,以较高速约30rpm至80rpm进行约24-96小时。

[0015] 在一些实施方案中,所述生物反应器是连续搅拌罐生物反应器,步骤(2)转染后0-12小时采用恒速或间速培养,随后以较高速例如约30rpm至80rpm进行约12-240小时或者更长的时间。

[0016] 在一些实施方案中,步骤(2)转染培养时采用恒速培养,以较高速例如约30rpm至80rpm进行约24-240小时或者更长的时间。

[0017] 在一些实施方案中,所述生物反应器是连续搅拌罐生物反应器,步骤(2)转染后0-12小时采用间速培养,随后以较高速例如约30rpm至80rpm进行约12-240小时或者更长的时间。

[0018] 在一些实施方案中,所述生物反应器是波浪式一次性反应器,步骤(1)进行细胞培养时采用间速培养和恒速培养的组合,间速培养时以较高速约7rpm至10rpm进行约5-10分钟;静止约25-35分钟;较高速搅拌和静止交替进行;在约4-36小时以后改为恒速培养,以约7rpm至10rpm进行约24-96小时或者更长的时间,倾斜角度约3°-10°。

[0019] 在一些实施方案中,所述生物反应器是波浪式一次性反应器,步骤(2)转染培养时采用恒速培养,以约7rpm至10rpm进行约24-240小时或者更长的时间。

[0020] 在一些实施方案中,转染后进行细胞培养的时间为约24小时至240小时。

[0021] 在一些实施方案中,所述细胞选自293T细胞。

- [0022] 在一些实施方案中,所述基因载体包括慢病毒质粒、腺相关病毒质粒、腺病毒质粒。
- [0023] 在一些实施方案中,转染后进行细胞培养的条件包括:37℃,5% CO₂。
- [0024] 在一些实施方案中,还包括纯化病毒的步骤。
- [0025] 在一方面,本发明提供了三维多孔微载体用于病毒载体生产的用途。

附图说明

- [0026] 图1显示了1g/L载体三维培养293T细胞增殖情况。
- [0027] 图2显示了3g/L载体三维培养293T细胞增殖情况。
- [0028] 图3显示了293T细胞使用三维多孔微载体进行连续传代扩增。
- [0029] 图4显示了293T细胞在WAVE式反应器上的增殖情况。
- [0030] 图5显示了不同三维多孔微载体浓度培养293T细胞的增殖情况。
- [0031] 图6显示了二维和三维培养细胞的慢病毒质粒转染荧光图。
- [0032] 图7显示了二维和三维培养细胞的慢病毒质粒转染效率检测结果。
- [0033] 图8显示了三维培养细胞生产慢病毒感染细胞荧光图。
- [0034] 图9显示了二维和三维培养细胞慢病毒感染荧光图。
- [0035] 图10显示了二维和三维培养细胞慢病毒原液滴度结果。
- [0036] 图11显示了三维多孔微载体与Cytodex微载体接种细胞后D1贴附活死染色图。
- [0037] 图12显示了三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒24小时转染效率比较。
- [0038] 图13显示了三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒24小时后细胞活死染色情况。
- [0039] 图14显示了三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒72小时荧光图。
- [0040] 图15显示了三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒72小时转染效率比较。
- [0041] 图16显示了三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒72小时后细胞活死染色情况。
- [0042] 图17显示了三维动态培养293T不同细胞密度慢病毒转染前活死染色情况。
- [0043] 图18显示了三维动态293T不同细胞密度慢病毒转染24小时转染情况。
- [0044] 图19显示了三维静态293T不同细胞密度慢病毒转染24小时转染情况。
- [0045] 图20显示了三维动态293T不同细胞密度慢病毒转染72小时转染效率荧光图。
- [0046] 图21显示了三维动态293T不同细胞密度慢病毒转染72小时转染效率比较情况。
- [0047] 图22显示了三维静态293T不同细胞密度慢病毒转染72小时转染效率荧光图。
- [0048] 图23显示了三维静态293T不同细胞密度慢病毒转染72小时转染效率比较情况。
- [0049] 图24显示了三维培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒前细胞活死染色情况。
- [0050] 图25显示了三维培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒72小时转染荧光图。
- [0051] 图26显示了三维培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒72小时转染效率比较情况。
- [0052] 图27显示了三维培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒原液滴度比较结果。
- [0053] 图28显示了二维和三维培养细胞腺相关病毒质粒转染荧光图。
- [0054] 图29显示了二维和三维培养细胞腺相关病毒质粒转染效率检测结果。

[0055] 图30显示了二维和三维培养细胞腺相关病毒滴度比较结果。

[0056] 图31显示了不同密度的三维多孔微载体三维动态培养293T细胞染色情况。

具体实施方式

[0057] 除非另有定义,本文使用的所有科学技术用语的含义与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。本发明所属领域技术人员将会理解,下文描述的方法和材料,仅是示例性的,而不应视为限定本发明的范围。

[0058] 本发明人出乎意料地发现采用三维多孔微载体在动态培养条件下能够进行高效率的病毒质粒转染,其效果媲美甚至超越二维培养,进而实现经济上可行的规模化病毒生产。

[0059] 能在本发明的基因载体例如质粒转染方法中应用的基因载体例如质粒没有特别限制,例如本领域技术人员熟知的基因载体例如质粒转染系统。当在本文中使用时,术语“基因载体”是指将所期望的靶向基因导入目标细胞的媒介,根据其来源分为质粒载体、噬菌体载体、病毒载体等。许多病毒的包被所需质粒是本领域中已知的,包括但不限于慢病毒质粒、腺病毒质粒、腺相关病毒质粒等。

[0060] 当在本文中使用时,术语“慢病毒质粒”是指含有主要来源于慢病毒的结构和功能遗传元件或其部分的基因载体。

[0061] 当在本文中使用时,术语“腺病毒质粒”是指含有主要来源于腺病毒的结构和功能遗传元件或其部分的基因载体。

[0062] 当在本文中使用时,术语“腺相关病毒质粒”是指含有主要来源于腺相关病毒的结构和功能遗传元件或其部分的基因载体。

[0063] 能在本发明的病毒载体生产方法中应用的细胞是能够被病毒载体转染,并能够提供基因载体本身缺失的完整复制和包装所需功能的细胞或细胞系。在一些实施方案中,能在本发明的病毒载体生产方法中应用的细胞是能够贴壁在三维多孔微载体上的细胞。在一些实施方案中,能在本发明的病毒载体生产方法中应用的细胞包括293细胞,例如293T、293FT、293MGH、293E等。在优选实施方案中,所述细胞是293T细胞。

[0064] 当在本文中使用时,术语“三维多孔微载体”是指用于细胞培养的三维多孔支撑结构,其具有约80 μm 至约500 μm 的粒径,并包括多个具有约10 μm 至约50 μm 的孔径的孔。在一些实施方案中,能在本发明中使用的三维多孔微载体优选具有约100 μm 至约400 μm 的粒径,更优选具有约200 μm 至约300 μm 的粒径。表述“包括具有约10 μm 至约50 μm 的孔径的孔”应当理解为并不排除在该孔径范围之外的孔。约10 μm 至约50 μm 的孔径代表了用于细胞培养的三维多孔微载体的优选孔径分布,更优选为具有约20 μm 至约50 μm 的孔径。三维多孔微载体所具有的一些孔可以在该孔径范围之外。孔可以具有相同或相似的尺寸。任选地,孔可以具有约10 μm 至约50 μm 的不同孔径,例如约20 μm 至约30 μm 的不同孔径。

[0065] 制成三维多孔微载体的材料包括但不限于胶原、明胶(变性胶原)、壳聚糖、透明质酸、和/或海藻酸钠。可用于本发明的三维多孔微载体可以是本领域中熟知的三维多孔微载体,包括可以商购获得的市售产品,例如,3D TableTrix[®]微载片(北京华龛生物科技有限公司)。

[0066] 在本发明中,首先分别制成细胞悬液和三维多孔微载体悬液。其中细胞悬液为二

维培养消化的游离细胞,重悬于培养基中,细胞密度为约 1×10^5 至约 1×10^7 细胞/ml。在一些实施方案中,所述细胞是293细胞,在优选实施方案中,所述细胞是293T细胞。在一些实施方案中,所述培养基是DMEM培养基,在优选实施方案中,所述培养基是含10%胎牛血清的DMEM培养基。在一些实施方案中,细胞密度为约 1×10^5 至约 1×10^7 细胞/ml范围内的任何数值,例如约 1×10^5 细胞/ml、约 1×10^6 细胞/ml或约 1×10^7 细胞/ml。三维多孔微载体悬液为三维多孔微载体浸泡于培养基中,载体密度为约1至约20g/L。在一些实施方案中,所述培养基是DMEM培养基,在优选实施方案中,所述培养基是含10%胎牛血清的DMEM培养基。在一些实施方案中,载体密度为约1至约20g/L范围内的任何数值,例如约1g/L、约3g/L、约5g/L、约10g/L、约15g/L或约20g/L。

[0067] 在一些实施方案中,细胞悬液和三维多孔微载体悬液以约 1.0×10^7 细胞/1g三维多孔微载体的比例至约 5.0×10^8 细胞/1g三维多孔微载体的比例相混合,优选为约 3.3×10^7 细胞/1g三维多孔微载体的比例至约 3.3×10^8 细胞/1g三维多孔微载体的比例相混合。在一些实施方案中,细胞悬液和三维多孔微载体悬液以约 1.25×10^8 细胞/1g三维多孔微载体的比例相混合。

[0068] 在本发明中,生物反应器的实例包括但不限于连续搅拌罐生物反应器、波浪式一次性反应器。在一些实施方案中,本发明采用的生物反应器是连续搅拌罐生物反应器。相应地,在本发明中,转染前和转染时的细胞培养包括动态培养和静态培养。在一些实施方案中,转染前和转染时的细胞培养是动态培养。

[0069] 在本发明中,细胞培养的培养基是本领域技术人员熟知的适用于所培养细胞的维持、培养和扩增的培养基。例如,当细胞是293T细胞时,合适的培养基包括但不限于DMEM培养基,例如DMEM+10%FBS。

[0070] 在本发明中,转染前细胞培养的培养程序根据所采用的反应器类型而不同。在采用连续搅拌罐生物反应器时,可以采用间速培养、恒速培养或者二者的组合。在一些实施方案中,间速培养包括以较高速例如约30rpm至80rpm进行约5-10分钟;以较低速例如约1rpm至5rpm进行约25-35分钟;较高速搅拌和较低速搅拌交替进行。在一些实施方案中,间速培养时,较高速转速为约30rpm至80rpm范围内的任意转速,例如约30rpm、40rpm、50rpm、60rpm、70rpm或80rpm,较高速持续时间为约5-10分钟范围内的任意时间,例如5、6、7、8、9或10分钟。在一些实施方案中,间速培养时,较低速转速为约1rpm至5rpm范围内的任意转速,例如约1rpm、2rpm、3rpm、4rpm或5rpm,较低速持续时间为约25-35分钟范围内的任意时间,例如约25分钟、30分钟或35分钟。在一些实施方案中,间速培养持续时间为约4-96小时内的任意时间或者更长的时间,例如4小时、8小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时。

[0071] 在一些实施方案中,恒速培养包括以较高速例如约30rpm至80rpm进行约24-96小时内的任意时间或者更长的时间。在一些实施方案中,恒速培养时,较高速转速为约30rpm至80rpm范围内的任意转速,例如约30rpm、40rpm、50rpm、60rpm、70rpm或80rpm,较高速持续时间为约24-96小时范围内的任意时间或者更长的时间,例如24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时。

[0072] 在一些实施方案中采用间速培养和恒速培养的组合,两种培养方式的顺序没有特别限制,例如先进行间速培养再进行恒速培养。

[0073] 在优选实施方案中,首先进行约4-36小时,例如18-30小时,例如24小时的间速培养;然后进行约24-96小时内的任意时间或者更长的时间的恒速培养。在优选实施方案中,采用间速培养和恒速培养的组合,其中间速培养时,以较高速例如约30rpm至80rpm进行约5-10分钟;以较低速例如约1rpm至5rpm进行约25-35分钟;交替进行持续约4-36小时,例如18-30小时,例如24小时后改为恒速培养,以较高速例如约30rpm至80rpm进行约24-96小时内的任意时间或者更长的时间,例如24小时、48小时、72小时或96小时。

[0074] 在采用波浪式一次性反应器时,可以采用间速培养、恒速培养或者二者的组合。在一些实施方案中,间速培养包括以约7rpm至10rpm进行约5-10分钟;静止约25-35分钟;搅拌和静止交替进行;倾斜角度约 3° - 10° 。在一些实施方案中,间速培养时,转速为约7rpm至10rpm范围内的任意转速,例如约7rpm、8rpm、9rpm或10rpm;持续时间为约5-10分钟范围内的任意时间,例如5、6、7、8、9或10分钟。在一些实施方案中,间速培养时,静止时间为约约25-35分钟范围内的任意时间,例如约25分钟、30分钟或35分钟。在一些实施方案中,间速培养持续时间为约4-96小时内的任意时间或者更长的时间,例如4小时、8小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时。在一些实施方案中,倾斜角度为约 3° - 10° 范围内的任意角度,例如 3° 、 4° 、 5° 、 6° 、 7° 、 8° 、 9° 或 10° 。

[0075] 在一些实施方案中,恒速培养包括以约7rpm至10rpm的转速进行约24-96小时内的任意时间或者更长的时间,倾斜角度约 3° - 10° 。在一些实施方案中,转速为约7rpm至10rpm范围内的任意转速,例如约7rpm、8rpm、9rpm或10rpm;持续时间为约24-96小时范围内的任意时间或者更长的时间,例如24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时。在一些实施方案中,倾斜角度为约 3° - 10° 范围内的任意角度,例如 3° 、 4° 、 5° 、 6° 、 7° 、 8° 、 9° 或 10° 。

[0076] 在一些实施方案中采用间速培养和恒速培养的组合,两种培养方式的顺序没有特别限制,例如先进行间速培养再进行恒速培养。

[0077] 在优选实施方案中,首先进行约4-36小时,例如18-30小时,例如24小时的间速培养;然后进行约24-96小时内的任意时间或者更长的时间的恒速培养。在优选实施方案中,采用间速培养和恒速培养的组合,其中间速培养时,以约7rpm至10rpm进行约5-10分钟;静止约25-35分钟;搅拌和静止交替进行持续约4-36小时,例如18-30小时,例如24小时后改为恒速培养,以约7rpm至10rpm进行约24-96小时内的任意时间或者更长的时间,例如24小时、48小时、72小时或96小时,倾斜角度约 3° - 10° 。

[0078] 在进行细胞培养时,可以包括一级或多级扩增,每一级扩增可以在相同体积的培养罐中进行,或者在不同体积的培养罐中进行,优选为逐级转罐放大进行培养。在一些实施方案中,进行2级放大扩增培养,或者进行3级放大扩增培养,或者进行更多级放大扩增培养。在一些实施方案中,本发明的细胞培养可以在数十毫升至数百毫升的体积规模下进行。在一些实施方案中,本发明的细胞培养可以在数升至数百升乃至数千升的体积规模下进行。在一些实施方案中,本发明的细胞培养可以在约125ml至1000L的体积规模下进行。在一些优选实施方案中,本发明的细胞培养可以在约125ml至1000ml范围内的任意体积规模下进行。在一些优选实施方案中,本发明的细胞培养可以在约1L至100L范围内的任意体积规模下进行。在一些优选实施方案中,本发明的细胞培养可以在约100L至1000L范围内的任意体积规模下进行。在一些优选实施方案中,本发明的细胞培养可以在约1000L以上的任意体

积规模下进行。

[0079] 在本发明中,进行转染时的培养基是本领域技术人员熟知的适用于所培养细胞的维持、培养和扩增的培养基。例如,当细胞是293T细胞时,合适的培养基包括但不限于DMEM培养基,例如DMEM+10%FBS。

[0080] 在本发明中,进行转染时,病毒质粒和转染试剂的比例为约1:1.6-1:2.5,例如1:1.6、1:1.8、1:2.0、1:2.2或1:2.5。病毒质粒在培养液中的浓度比例控制为约0.5-5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,例如0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0081] 在本发明中,进行转染时的细胞培养程序根据所采用的反应器类型而不同。在采用连续搅拌罐生物反应器时,可以采用恒速培养。在一些实施方案中,恒速培养包括以较高速例如约30rpm至80rpm进行约24-240小时内的任意时间或者更长的时间。在一些实施方案中,恒速培养时,较高速转速为约30rpm至80rpm范围内的任意转速,例如约30rpm、40rpm、50rpm、60rpm、70rpm或80rpm;较高速持续时间为约24-240小时范围内的任意时间或者更长的时间,例如24小时、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时、168小时、192小时、216小时或240小时。在采用连续搅拌罐生物反应器时,可以采用间速培养和恒速培养的组合。在一些实施方案中,间速培养和恒速培养的组合包括首先进行约0-18小时范围内的任意时间或者更长的时间的间速培养;然后进行约12-240小时内的任意时间或者更长的时间的恒速培养。在一些实施方案中,首先间速培养时,以约30rpm至80rpm范围内的任意转速,例如约30rpm、40rpm、50rpm、60rpm、70rpm或80rpm进行约1-10分钟范围内的任意时间或者更长的时间,例如5-10分钟,例如3分钟、4分钟、5分钟、6分钟或7分钟;静止约10-150分钟范围内的任意时间或者更长的时间,例如30-120分钟,例如20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、90分钟或120分钟;搅拌和静止交替进行持续约0-18小时范围内的任意时间或者更长的时间,例如4-16小时,例如4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时或16小时,然后进行恒速培养,以约30rpm至80rpm进行约12-240小时内的任意时间或者更长的时间。在优选实施方案中,间速培养时,以40rpm的转速进行5分钟;静止60分钟,搅拌和静止交替进行。在一些实施方案中,恒速培养时,较高速转速为约30rpm至80rpm范围内的任意转速,例如约30rpm、40rpm、50rpm、60rpm、70rpm或80rpm;较高速持续时间为约12-240小时范围内的任意时间或者更长的时间,例如12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时、168小时、192小时、216小时或240小时。在优选实施方案中,恒速培养时,转速为40rpm。

[0082] 在采用波浪式一次性反应器时,可以采用恒速培养。在一些实施方案中,恒速培养包括以约7rpm至10rpm的转速进行约24-240小时内的任意时间或者更长的时间,倾斜角度约3°-10°。在一些实施方案中,恒速培养时,转速为约7rpm至10rpm范围内的任意转速,例如约7rpm、8rpm、9rpm或10rpm;持续时间为约24-240小时范围内的任意时间或者更长的时间,例如24小时、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时、168小时、192小时、216小时或240小时;倾斜角度为约3°-10°范围内的任意角度,例如3°、4°、5°、6°、7°、8°、9°或10°。

[0083] 在本发明中,进行转染时的细胞培养时间可以根据基因载体种类的不同而变化。在一些实施方案中,基因载体是慢病毒质粒,进行转染时的细胞培养时间为约24-72小时内的任意时间或者更长的时间,优选为约24-72小时内的任意时间,更优选为约60-72小时内的任意时间,最优选为约72小时。在一些实施方案中,基因载体是腺相关病毒质粒,进行转

染时的细胞培养时间为约24-96小时内的任意时间或者更长的时间,优选为约24-96小时内的任意时间,更优选为约84-96小时内的任意时间,最优选为约96小时。在一些实施方案中,基因载体是腺病毒质粒,进行转染时的细胞培养时间为约24-240小时内的任意时间或者更长的时间,优选为约24-240小时内的任意时间,更优选为约216-240小时内的任意时间,最优选为约240小时。

[0084] 实施例

[0085] 下面通过实施例,并结合附图,对本发明的技术方案作进一步详细的说明。给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。若未特别说明,以下实施例中使用的试剂均为本领域常规试剂,可商购获得或按照本领域常规方法配制而得,规格为实验室纯级即可;使用的实验方法和实验条件均为本领域常规的实验方法和实验条件,可参考相关实验手册、公开文献或厂商说明书。

[0086] 实施例中使用的部分设备和试剂如下:

[0087] 三维多孔微载体为北京华龛生物科技有限公司的3D TableTrix® 微载片(货号F02、W02和G02)。

[0088] Cytodex微载体为Cytiva公司产品-(货号17044802),为常规市售产品。

[0089] 3D FloTrix® microSPIN 6通道微型生物反应器为北京华龛生物科技有限公司研发设备。

[0090] 胰酶消化液为维森特的TRYPsin/EDTA-(货号325-043-EL)。

[0091] Lipo8000™转染试剂为碧云天公司产品-(货号:C0533-1.5ml),为常规市售产品。

[0092] PEI MW40000转染试剂为翌圣生物公司产品-(货号:40816ES03-1g),为常规市售产品。

[0093] Opti-MEM为Gibco公司产品-(货号:31985-070),为常规市售产品。

[0094] polybrene为碧云天公司产品-(货号:C0533-1.5ml),为常规市售产品。

[0095] 慢病毒滴度快速检测卡为博奥龙公司产品-(货号:BF06202-100),为常规市售产品。

[0096] 超滤管为美国密理博公司产品-(货号:UFC901096-1),为常规市售产品。

[0097] DMEM培养基是上海源培生物科技股份有限公司产品,主要成分为葡萄糖、维生素、无机盐等常规成分,为常规市售产品。

[0098] 血清为维森特生物科技有限公司胎牛血清,为常规市售产品。

[0099] 293T细胞为离体的人胚胎肾上皮细胞系衍生株,为本领域常见细胞。

[0100] 慢病毒质粒包括三质粒系统(质粒有pLV-CMV-mVenus-puro,pVSVG和p Δ 8.9)和四质粒系统(质粒有pCDH-CMV,pMDLg pRRE,pRSV-Rev和pMD2.G)。腺相关病毒质粒中包括的质粒为AAV helper,AAV-CMV,PHGTI-adenol(Δ F6)。上述质粒的序列结构对于本领域技术人员而言是熟知的,也可以是市售商购可以获得的。

[0101] 实施例1. 三维培养293T细胞方法的建立

[0102] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTrix® 微载片F02。

[0103] 1. 三维培养293T细胞增殖情况

[0104] 三维细胞培养:按照3D FloTrix® vivaSPIN 5L生物反应器的说明书进行设备调试

和灭菌处理。将提前制备的293T细胞悬液和三维多孔微载体悬液泵入反应器中,细胞密度为37.5万细胞/ml,三维多孔微载体密度为1g/L或3g/L,培养体系为2L。搅拌转速设置为间速培养:40rpm,5分钟;1rpm,30分钟;24小时后,改为恒速40rpm(转速的调整标准为载体搅拌起来为准)。

[0105] 2.293T细胞使用三维多孔微载体进行连续传代扩增

[0106] 在125ml培养瓶培养,37.5万细胞/ml,三维多孔微载体密度为3g/L,培养体系为30ml。搅拌转速设置为间速培养:40rpm,5分钟;1rpm,30分钟;24小时后,改为恒速40rpm。接种完成后,将125ml培养瓶从培养箱中取出,待微载体沉降后,弃除部分上清,加入一定量的3DFloTrix® Digest微载体裂解液,裂解液工作浓度为1mg/ml-2mg/ml,置于培养箱生物反应器中旋转孵育30-60分钟。肉眼观察微载体逐渐裂解,取样镜下观察,微载体基本裂解完全。加入终止液,继续消化细胞5-10分钟。再次取样镜下观察,细胞基本为单悬状态,终止反应。通过离心弃掉上清,使用PBS溶液清洗细胞1次,使用培养基重悬细胞,台盼蓝染色计数。按照细胞密度为37.5万细胞/ml,三维多孔微载体密度为3g/L,培养体系为30ml再次三维接种细胞,继续培养。

[0107] 3.WAVE式反应器培养293T细胞增殖情况

[0108] 将二维培养的293T细胞消化,显微镜下拍照,PBS清洗两遍,加入等量PBS和胰酶消化液消化1min,细胞脱落后加入10mL完全培养基终止反应。离心,采用完全培养基重悬细胞。将提前制备的293T细胞悬液和三维多孔微载体悬液泵入反应器中,细胞密度为52万细胞/ml,三维多孔微载体密度为6g/L。补充完全基至体积为1L。启动摇匀模式6°10rpm,取样计数、计算实际接种密度。将反应器调整为间速培养模式:6°10rpm 5min、0°0rpm 55min,24个循环;D1-D2 6°8rpm;D2-D7 6°6rpm 240min,6°10rpm 5min培养。每日取样计数、染色、测糖。根据糖份的变化进行自动换液,程序为:定时换液,D2-D3换液1L,D3-D4换液2L。每天取样计数、染色。

[0109] 4.结果

[0110] 4.1根据荧光染色图片判断:荧光染色结果显示,1g/L载体浓度组细胞较好贴附于微载体上生长且微载体上贴附细胞随培养天数增加逐渐增多(图1A),表明细胞扩增效果较好,增殖到第七天细胞密度达到最高530万/ml(图1B)。3g/L载体浓度组细胞较好贴附于微载体上生长且微载体上贴附细胞随培养天数增加逐渐增多(图2A),表明细胞扩增效果较好,增殖到第七天细胞密度达到最高753万/ml(图2B)。

[0111] 4.2 293T细胞使用三维多孔微载体进行连续传代扩增细胞计数结果判断:二维培养消化的种子细胞接种于三维培养,293T细胞培养6天,达到19.8倍的增殖,效果较佳(图3A)。三维培养完成后,裂解微载体,将消化收获的三维培养细胞再次培养6天最终细胞扩增达到10倍以上扩增(图3B),仍能达到有效扩增。

[0112] 4.3 293T细胞在WAVE式反应器培养,从细胞增殖结果来看,D5达到增殖最高倍数,为28.9倍,D6、D7细胞增殖有所下降(图4)。

[0113] 本实施例说明了利用三维多孔微载体能够将细胞培养扩增至10倍以上,因此可以应用于大规模病毒转染。

[0114] 实施例2.三维多孔微载体不同浓度培养293T细胞的增殖比较

[0115] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTrix® 微载片W02。

[0116] 1. 三维培养293T细胞

[0117] 三维培养293T细胞与实施例1中方式相同,提前准备三维多孔微载体悬液和细胞悬液。按照20万/ml的细胞密度,微载体密度分别为1g/L、3g/L、4.5g/L、5g/L、10g/L,加入125mL转瓶,补充培养基到终培养体积80mL。转瓶放入培养箱,设置间速接种程序:35rpm, 3min;1rpm,1h,程序循环6次,实现细胞在微载体贴附。

[0118] 接种后D1,取样、计数、染色,观察细胞贴附情况;转速调为恒速35rpm。接种后D2-D7,取样、计数,培养基上清测糖,若低于原始值1/2,进行换液。

[0119] 2. 结果

[0120] 2.1不同密度的三维多孔微载体三维动态培养293T细胞染色情况

[0121] 活死染色结果显示,随着接种天数的增加,两组载体密度细胞的贴附和增殖明显增高,同时死细胞数量也呈现逐渐增多的趋势(如图31所示)。

[0122] 2.2不同密度的三维多孔微载体三维动态培养293T细胞增殖情况

[0123] 293T细胞在用不同三维多孔微载体密度进行3D接种后D1细胞贴附率均可达到80%以上,五种细胞密度中3g/L贴附率达到最高,为100%;使用不同三维多孔微载体密度细胞增殖,随着培养天数增加,细胞密度均有明显提高(图5)。

[0124] 本实施例说明以不同三维多孔微载体密度进行三维动态培养293T细胞,从活死染色、细胞贴附及细胞增殖方面综合来看,3g/L的三维多孔微载体密度作为进行后续细胞3D培养的三维多孔微载体密度更为合适。

[0125] 实施例3. 三维培养293T细胞慢病毒质粒转染的建立及应用

[0126] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTriX®微载片G02。

[0127] 1. 二维和三维培养293T细胞

[0128] 1.1二维细胞培养:将293T细胞悬液,按照75万细胞/孔接种于无菌TC 6孔板中培养,补加含10%血清DMEM完全培养基至2mL,培养18-24小时后,细胞贴附融合度达到70%-80%,进行慢病毒转染操作。

[0129] 1.2三维细胞培养:静态培养,将一片20mg微载片放入非TC6孔板,提前制备的293T细胞悬液200 μ L滴加到微载体上,6孔板放入培养箱2小时后加入培养基8mL进行培养。动态培养,按照3DFloTriX®miniSPIN生物反应器和125mL培养瓶的说明书进行设备调试和灭菌处理。将提前制备的293T细胞悬液和三维多孔微载体悬液沿125mL培养瓶侧臂加样口加入到培养瓶中,细胞密度为37.5万细胞/mL,三维多孔微载体密度为3g/L,培养体系为30mL。将125mL培养瓶转移到生物反应器的瓶位中心,搅拌转速设置为间速培养:40rpm,5min;1rpm,30min;24小时后,改为恒速40rpm(转速的调整标准为载体搅拌起来为准),准备进行质粒转染。

[0130] 2. 293T细胞慢病毒质粒转染

[0131] 2.1二维培养293T细胞慢病毒质粒转染方法

[0132] ①转染前,将二维培养293T细胞中的原培养基更换为新鲜完全培养基。

[0133] ②取无菌EP管,加入125 μ L无血清Opti-MEM培养基,8 μ g的慢病毒质粒

[0134] DNA(pLV-CMV-mVenus-puro:pVSVG:p Δ 8.9=4:3:2),再加入15 μ L的Lipo8000™

[0135] 转染试剂,轻轻吹打混匀。

[0136] ③将上述混合液按照比例,均匀的滴加至二维培养293T细胞的6孔板中,混匀,37

℃, 5% CO₂培养箱中培养。

[0137] ④转染后24小时、48小时、72小时、96小时在倒置荧光显微镜下观察各组细胞慢病毒质粒转染效果。同时消化细胞,采用流式法检测慢病毒转染效率。

[0138] 2.2三维多孔微载体培养293T细胞慢病毒质粒转染方法

[0139] ①转染前,将三维静态和动态培养293T细胞中的原培养基更换为新鲜完全培养基。

[0140] ②取无菌EP管,静态培养转染组加入500μL无血清Opti-MEM培养基,32μg的慢病毒质粒DNA,再加入16μl的Lipo8000™转染试剂,轻轻吹打混匀。动态培养转染组加入1875μL无血清Opti-MEM培养基,120μg的慢病毒质粒DNA,再加入60μl的Lipo8000™转染试剂,轻轻吹打混匀。

[0141] ③将上述混合液按照比例,病毒质粒在培养液中的浓度比例为4.0μg/ml,均匀的滴加至三维培养6孔板或125ml反应瓶中,混匀,将125ml培养瓶转移到生物反应器的瓶位中心,37℃, 5% CO₂培养箱中培养。

[0142] ④转染后24小时和48小时在倒置荧光显微镜下观察各组细胞慢病毒转染效果。同时取样,流式法检测慢病毒转染效率。具体操作如下:

[0143] 1)将125ml培养瓶置于取样台上,待微载体和培养基搅拌均匀后,使用电动移液管吸取1mL微载体和培养基的混合液(微载体悬液)于离心管中

[0144] (每次取3管作为平行数据)。

[0145] 2)离心1000-1500rpm,5分钟,弃除离心管中上清,每管加入微载体裂解液至1mL,混合均匀。

[0146] 3)将裂解液与微载体吹打混匀后放入37℃水浴锅或恒温箱孵育30分钟,每隔10分钟观察并吹打混匀。

[0147] 4)待微载体裂解完全,取部分细胞悬液进行流式检测慢病毒转染效率。

[0148] 3.293T细胞慢病毒滴度检测

[0149] 3.1慢病毒浓缩

[0150] 将二维培养和三维培养收获的慢病毒上清液进行浓缩。将二维和三维收获的病毒上清液取15ml,加入到Amicon Ultra-Plus 10K超离管中,低温5000rpm离心30分钟。收获浓缩上清液,分装于1.5ml EP管中,滴度鉴定后储存于-80℃冰箱中,备用。

[0151] 3.2慢病毒滴度检测

[0152] 每孔 1×10^4 个细胞的密度将293T细胞接种于96孔板,将上述病毒上清梯度稀释加入293T细胞培养液中,以8μg/ml的浓度加入聚凝胺(polybrene)。培养4天后,荧光显微镜下计算绿色荧光蛋白阳性细胞数,以下面公式计算病毒上清滴度。病毒滴度=绿色荧光蛋白阳性细胞数/加入病毒上清的体积。

[0153] 4.慢病毒感染能力检测

[0154] 将二维培养和三维培养收获的慢病毒浓缩液10μl与相应量polybrene加入到293T细胞中,培养4天后检测各组细胞转染效率。

[0155] 5.结果

[0156] 5.1慢病毒包装质粒转染效率检测

[0157] 二维和三维细胞转染后荧光观察培养24小时,48小时细胞转染效率,随着时间延

长,带绿色荧光蛋白的细胞数量逐渐增多(图6)。使用流式细胞仪检测细胞转染效率,二维和三维动态细胞转染效率均高于90%,二维转染效率93.95%,三维动态转染效率94.64%,两组之间无统计学差异。三维静态转染效率17.47%,明显低于三维动态转染效率(图7)。本部分实验证明,三维动态培养293T细胞在慢病毒生产过程中细胞产毒效率与二维培养293T细胞相同。

[0158] 5.2慢病毒感染能力检测

[0159] 采用梯度稀释的方法检测收获细胞培养上清液中病毒滴度,使用三维收获慢病毒上清液感染293T细胞,感染24小时、96小时后流式检测感染效率,慢病毒上清液在24小时和96小时细胞感染效率分别为1.92%和16.98%(图8)。该结果说明三维生产慢病毒可成功感染293T细胞。

[0160] 5.3慢病毒滴度检测

[0161] 采用梯度稀释的方法,通过细胞计数和流式检测感染效率计算滴度,从48小时感染效率来看,三维和二维之间没有明显差异(图9),通过滴度检测结果来看,二维原液滴度达到 $3.67\text{E}+07\text{TU/ml}$,三维原液滴度达到 $4\text{E}+07\text{TU/ml}$,两者没有明显差异(图10)。

[0162] 实施例4.293T细胞在三维多孔微载体与Cytodex微载体感染效率对比

[0163] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTrix®微载片G02。

[0164] 1.微载体培养293T细胞

[0165] 微载体培养293T细胞与实施例1中方式相同,提前准备载体,三维多孔微载体和Cytodex微载体各需90mg;接种125转瓶,293T细胞密度 100W/ml ,30ml体积,三维多孔微载体和Cytodex微载体浓度 3g/L ,0-24h间速培养:40rpm,5min;1rpm,30min;接种后D1取样计数,计算细胞贴附率,转速调为恒速40rpm继续培养。

[0166] 2.三维多孔微载体与Cytodex微载体培养293T细胞转染慢病毒

[0167] 贴附率达到75%左右,进行转染,转染前将原培养基更换为新鲜完全培养基。

[0168] 每组总质粒需 $40\mu\text{g}$,转染试剂 $60\mu\text{l}$,稀释液体积 1.5ml ,培养体积 30ml , $\text{LV}=\text{Aka}:\Delta 8.9:\text{Vsvg}=3:2:1$ 比例,每组按照质粒比例加入 1.5ml 无血清培养基中混匀,再加入 $60\mu\text{l}$ PEI,混匀,室温静置20min,将混合液均匀的滴加至微载体培养的293T细胞中, 37°C ,5% CO_2 培养箱中40rpm恒速培养。

[0169] 转染24小时、48小时,收获上清、更换等体积新鲜完全培养基,取样在倒置荧光显微镜下观察、同时消化细胞计数、进行活死细胞染色。

[0170] 转染72小时,取样观察、计数、PI死细胞染色,上清全部收获, $0.22\mu\text{m}$ 过滤、保存于 -80°C 冰箱;流式检测转染效率。

[0171] 3.结果

[0172] 3.1三维多孔微载体与Cytodex微载体接种后D1贴附率及活死染色结果

[0173] 接种后D1计数结果显示,三维多孔微载体裂解液处理后贴附率达到86%,Cytodex微载体贴附率可达70%(图11),且Cytodex微载体死细胞多于三维多孔微载体,接下来进行慢病毒转染。

[0174] 3.2三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒24小时后细胞增殖、转染情况及活死染色结果

[0175] 三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒24小时后,三维多孔微载体细胞增

殖1.3倍,Cytodex微载体细胞增殖0.22倍,出现大量细胞脱落情况;转染效率GFP表达三维多孔微载体明显高于Cytodex微载体,且Cytodex微载体死细胞多于三维多孔微载体(图12-图13)。

[0176] 3.3三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒72小时后细胞增殖、转染情况及活死染色结果

[0177] 三维多孔微载体与Cytodex微载体转染慢病毒72小时后,三维多孔微载体细胞增殖3.27倍,转染效率流式检测为82.96%,Cytodex微载体细胞增殖1.92倍,转染效率流式检测为43.67%;转染效率GFP表达三维多孔微载体明显高于Cytodex微载体,且Cytodex微载体死细胞多于三维多孔微载体(图14-图16)。本部分实验证明,3g/L三维多孔微载体与Cytodex微载体密度,293T 100万细胞/ml的细胞密度转染慢病毒,从转染效率及细胞增殖方面综合来看,三维多孔微载体表现更优。

[0178] 实施例5.293T不同细胞密度慢病毒转染效率的验证

[0179] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTrix® 微载片G02。

[0180] 1.三维培养293T细胞

[0181] 三维动态、静态培养293T细胞与实施例1中方式相同,分别以25、50、100、250万细胞/ml接种125转瓶中,三维多孔微载体3g/L,体系为30ml。D0间歇接种:40rpm,5min;1rpm,30min;12小时循环。

[0182] 2.三维多孔微载体三维动态、静态培养293T细胞转染慢病毒

[0183] 接种后D1转染,质粒比例Aka: Δ 8.9:Vsvg=3:2:1。

[0184] 三维动态转染质粒量和转染试剂量:组一:总质粒量25 μ g,转染试剂75 μ l;组二:总质粒量50 μ g,转染试剂150 μ l;组三:总质粒量100 μ g,转染试剂300 μ l;组四:总质粒量200 μ g;转染试剂600 μ l;三维动态四个组共需375 μ g质粒,转染试剂共需1125 μ l。

[0185] 三维静态转染质粒量和转染试剂量:组一:11.1 μ g;转染试剂33.3 μ l;组二:22.2 μ g,转染试剂66.6 μ l;组三:44.4 μ g,转染试剂133.2 μ l;组四:88.87 μ g,转染试剂266.6 μ l;三维静态四组共需167 μ g质粒,转染试剂501 μ l。质粒与转染试剂混匀后,静置20min,将混合液均匀的滴加至3D培养的293T细胞中,37℃,5%CO₂培养箱中40rpm恒速培养。静态培养的非TC六孔板直接置于37℃,5%CO₂培养箱中培养即可。

[0186] 转染24小时、48小时,收获上清、更换等体积新鲜完全培养基,取样在倒置荧光显微镜下观察、同时消化细胞计数、进行活死细胞染色。

[0187] 转染72小时,取样观察、计数、活死染液细胞染色,上清全部收获,0.22 μ m过滤、保存于-80℃冰箱;流式检测转染效率。

[0188] 3.结果

[0189] 3.1三维动态培养293T不同细胞密度慢病毒转染前贴附率及染色情况

[0190] 三维动态接种后,细胞贴附率达到70%左右即可进行慢病毒的转染,染色情况显示各组死细胞量没有明显差异(图17)。

[0191] 3.2三维静、动态293T不同细胞密度慢病毒转染24小时转染情况

[0192] 三维动态转染慢病毒24小时,随着接种细胞量的增加,转染效率没有明显的差异(图18);但三维静态转染慢病毒24小时,随着接种细胞量的增加,转染效率呈现逐渐增高的趋势(图19)。

[0193] 3.3三维静、动态293T不同细胞密度慢病毒转染72小时细胞增殖及转染情况

[0194] 三维动态转染慢病毒72小时,50万细胞/ml的细胞密度转染效率最高,达到57.09%,其次是100W/ml达到45.62%(图20-图21);25万细胞/ml的细胞密度细胞增殖倍数最高,达到4.21倍,其次是50W/ml,达到2.4倍;3D静态转染慢病毒72H,200万细胞/ml的细胞密度转染效率最高,达到49.25%,其次是100W/ml达到25.31%(图22-图23);50万细胞/ml的细胞密度细胞增殖倍数最高,达到7.18倍,其次是100W/ml达到6.78倍。本部分实验证明,293T不同细胞密度慢病毒转染,从细胞增殖和转染效率综合考虑,动态培养细胞转染效率明显高于静态培养细胞,且3D动态条件下50万细胞/ml的细胞密度转染效率最高;3D静态转染200万细胞/ml的细胞密度转染效率最高。

[0195] 实施例6. 三维培养293T不同转染方式验证

[0196] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTrix®微载体片G02。

[0197] 1. 三维培养293T细胞

[0198] 三维培养293T细胞与实施例1中方式相同。按照100万细胞/ml接种到125转瓶中,培养体积32ml,三维多孔微载体2g/L,D0间歇接种:40rpm,5min;0rpm,25min;12小时循环后调节为40rpm恒速培养。

[0199] 2. 三维多孔微载体不同转染转速培养293T细胞转染慢病毒

[0200] 125转瓶培养24小时后,将细胞和微载体平分到3D FloTrix®microSPIN 6通道微型生物反应器中,每组体系为8ml。转染前更换新鲜完全培养基(含5%FBS的高糖DMEM),每组总质粒需10μg,转染试剂30μl,稀释液体积0.5ml,培养体积8ml,质粒比例=pCDH-CMV:pMDLg pRRE:pRSV-Rev:pMD2.G=3:2:2:3,每组按照质粒比例加入0.5ml无血清培养基中混匀,再加入30μl PEI,混匀,室温静置20min,将混合液均匀的滴加至微载体培养的293T细胞中,37℃,5%CO₂培养箱中培养,四组培养条件分别为40rpm恒速、间歇40rpm,5min;0rpm,30min、间歇40rpm,5min;0rpm,60min和间歇40rpm,5min;0rpm,120min。

[0201] 转染12小时后换液(含5%FBS的高糖DMEM)并将所有组别调为40rpm恒速培养,48小时收获上清、更换等体积新鲜完全培养基,取样在倒置荧光显微镜下观察、同时消化细胞计数、进行活死细胞染色。

[0202] 转染72小时,取样观察、计数、PI死细胞染色,上清全部收获,0.22μm过滤、保存于-80℃冰箱;GFP荧光检测转染效率。

[0203] 3. 结果

[0204] 3.1三维多孔微载体培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒前细胞贴附情况

[0205] 3D FloTrix®microSPIN 6通道微型生物反应器三维多孔微载体动态接种后,细胞贴附率达到70%左右即可进行慢病毒的转染,染色情况显示细胞在微载体上分布较匀(图24)。

[0206] 3.2三维多孔微载体培养293T细胞不同转染转速72小时转染效率及转染荧光结果

[0207] 3D FloTrix®microSPIN 6通道微型生物反应器三维多孔微载体动态转染慢病毒72小时,通过荧光观察,间速转染整体比恒速转染荧光较强(图25)。

[0208] 3.3三维多孔微载体培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒原液滴度比较

[0209] 3D FloTrix®microSPIN 6通道微型生物反应器三维多孔微载体动态转染慢病毒收获48小时和72小时上清后混匀,1500rpm离心5min去除细胞碎片,使用慢病毒滴度快速检测

试剂卡检测滴度,40rpm恒速、间歇40rpm,5min;0rpm,30min、间歇40rpm,5min;0rpm,60min和间歇40rpm,5min;0rpm,120min原液滴度分别达到 1.25×10^6 TU/ml、 1.25×10^6 TU/ml、 6.25×10^6 TU/ml和 6.25×10^6 TU/ml (图26)。本部分实验证明,三维多孔微载体3D FloTrix® microSPIN 6通道微型生物反应器培养293T细胞不同转染转速转染慢病毒,综合考虑,间歇40rpm,5min;0rpm,60min较适合作为慢病毒转染的转速条件。

[0210] 实施例7. 三维培养293T细胞腺相关病毒质粒转染方法的建立及应用

[0211] 本实施例中使用的三维多孔微载体是3D TableTrix® 微载片W02。

[0212] 1. 二维和三维培养293T细胞

[0213] 二维与三维培养293T细胞与实施例1中方式相同

[0214] 2. 293T细胞腺相关病毒转染

[0215] 2.1 二维培养293T细胞腺相关病毒质粒转染方法

[0216] ①转染前,将二维培养293T细胞中的原培养基更换为新鲜完全培养基。

[0217] ②取无菌EP管,加入125 μ L无血清Opti-MEM培养基,8 μ g的腺相关病毒质粒DNA (AAV helper: AAV-CMV: PHGTI-adenol (Δ F6) = 7:7:20),再加入15 μ L的Lipo8000™转染试剂,轻轻吹打混匀。

[0218] ③将上述混合液按照比例,均匀的滴加至二维培养293T细胞的6孔板中,混匀,37℃,5% CO₂培养箱中培养。

[0219] ④转染后24小时、48小时在倒置荧光显微镜下观察各组细胞腺相关病毒质粒转染效果。同时消化细胞,采用流式法检测腺相关病毒质粒转染效率。

[0220] 2.2 三维多孔微载体培养293T细胞腺相关病毒质粒转染方法

[0221] ①转染前,将三维动态培养293T细胞中的原培养基更换为新鲜完全培养基。

[0222] ②取无菌EP管,加入125 μ L无血清Opti-MEM培养基,120 μ g的腺相关病毒质粒DNA (AAV helper: AAV-CMV: PHGTI-adenol (Δ F6) = 7:7:20),再加入60 μ L的Lipo8000™转染试剂,轻轻吹打混匀。

[0223] ③将上述混合液按照比例,均匀的滴加至三维培养125ml反应瓶中,混匀,将125ml培养瓶转移到生物反应器的瓶位中心,37℃,5% CO₂培养箱中培养。

[0224] ④转染后24小时、48小时、72小时、96小时在倒置荧光显微镜下观察各组细胞腺相关病毒质粒转染效果。同时与实施例2中方式相同进行取样,流式细胞仪检测腺相关病毒质粒转染效率。

[0225] 3. 结果

[0226] 腺相关病毒包装质粒转染效率检测

[0227] 二维和三维动态细胞转染后荧光观察培养24小时、48小时、72小时和96小时细胞转染效率,随着时间延长,带绿色荧光蛋白的细胞数量逐渐增多(图27)。使用流式细胞仪检测细胞转染效率,二维和三维动态细胞转染效率分别为60.27%和58.75%,两组之间无统计学差异(图28)。通过纯化病毒后进行滴度检测,二维原液滴度达到 8.09×10^8 VG/ml,三维原液滴度达到 1.01×10^9 VG/ml (图29),两者滴度之间没有显著差异。本部分实验证明,三维动态培养293T细胞在腺相关病毒生产过程中细胞产毒效率与二维培养293T细胞相当。

[0228] 本发明的实施方案并不限于上述实施例所述,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,本领域普通技术人员可以在形式和细节上对本发明做出各种改变和改进,而这些均

被认为落入了本发明的保护范围。

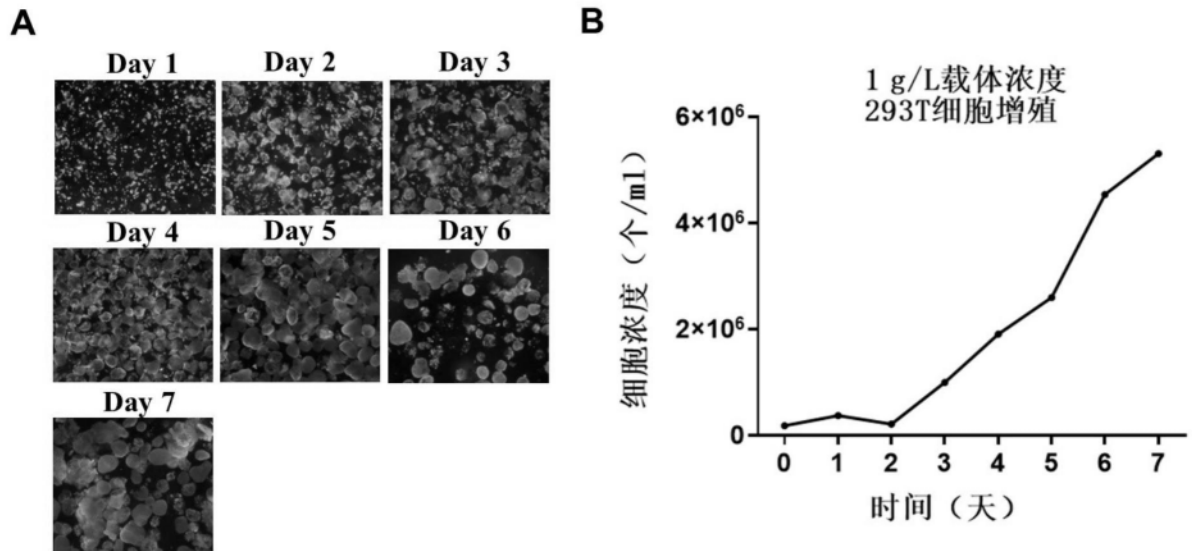


图1

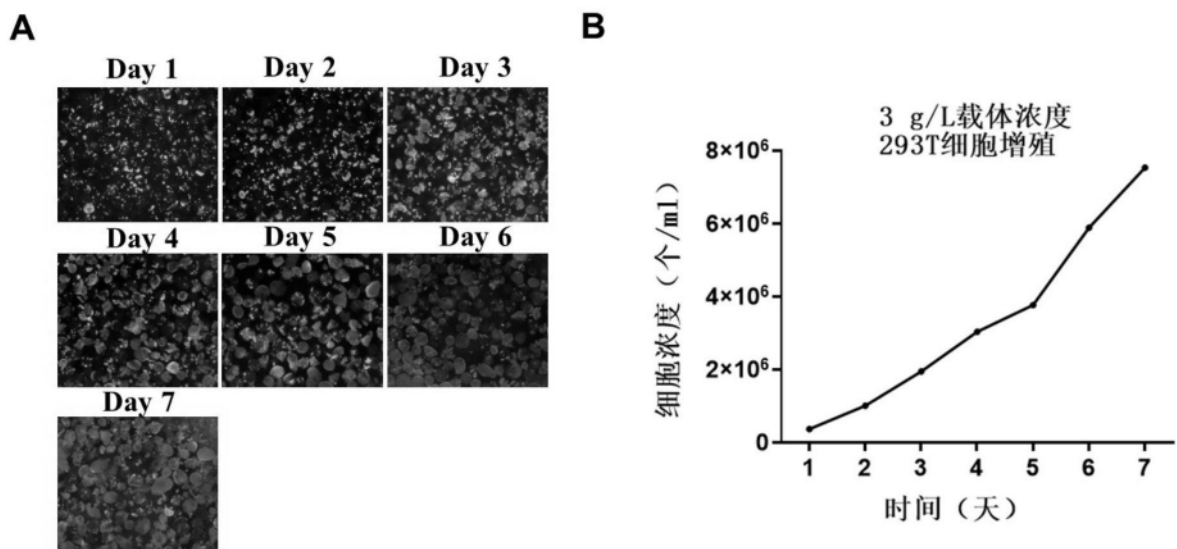


图2

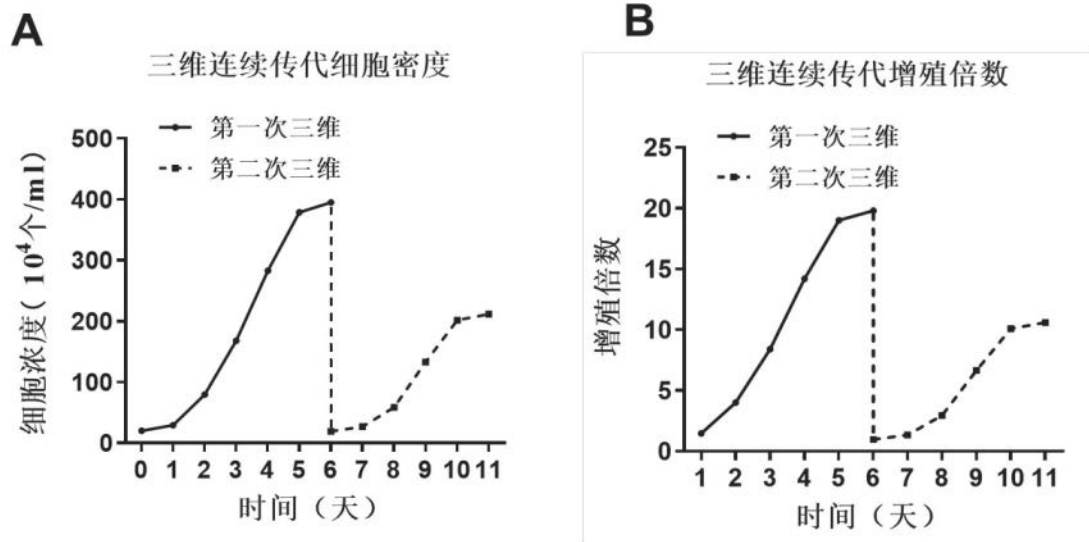


图3

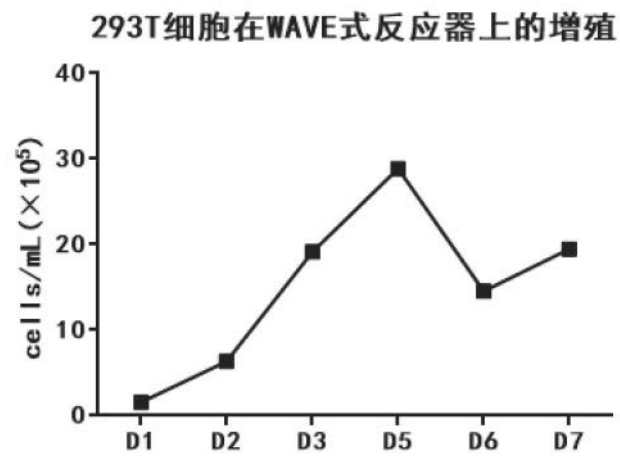


图4

三维多孔微载体不同载体密度培养293细胞增殖情况

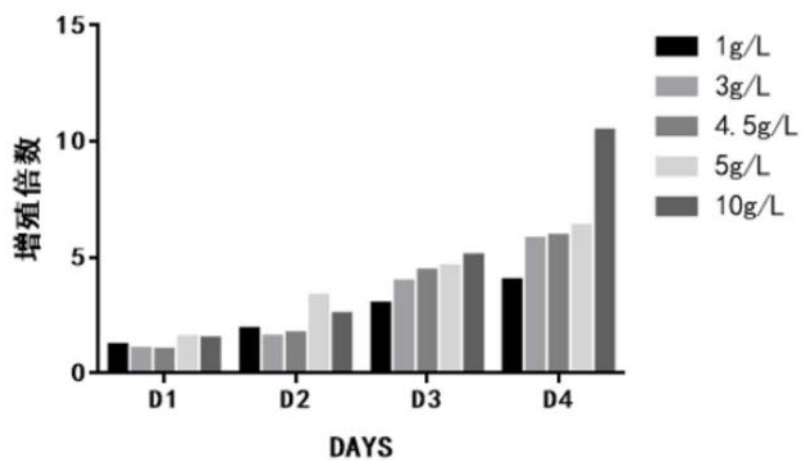


图5

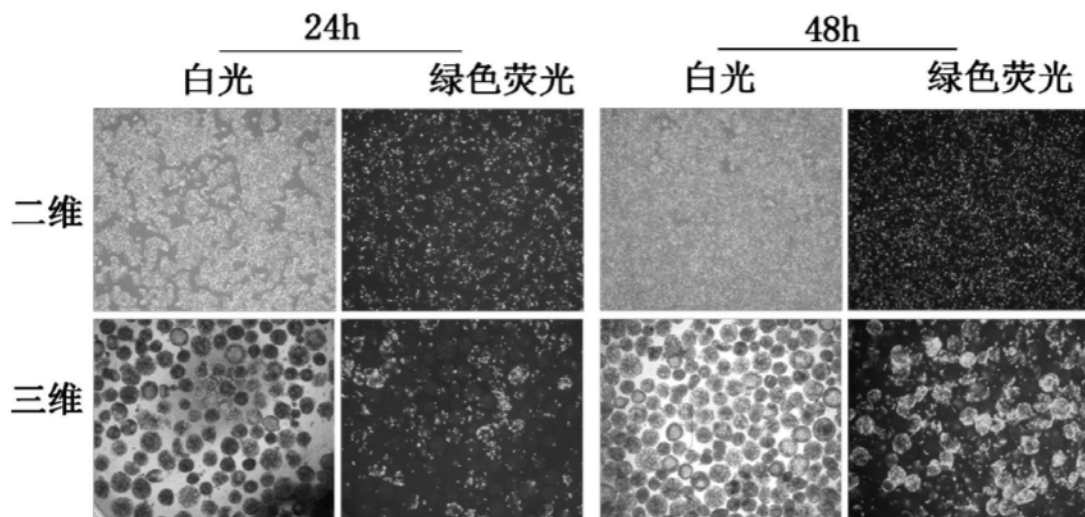


图6

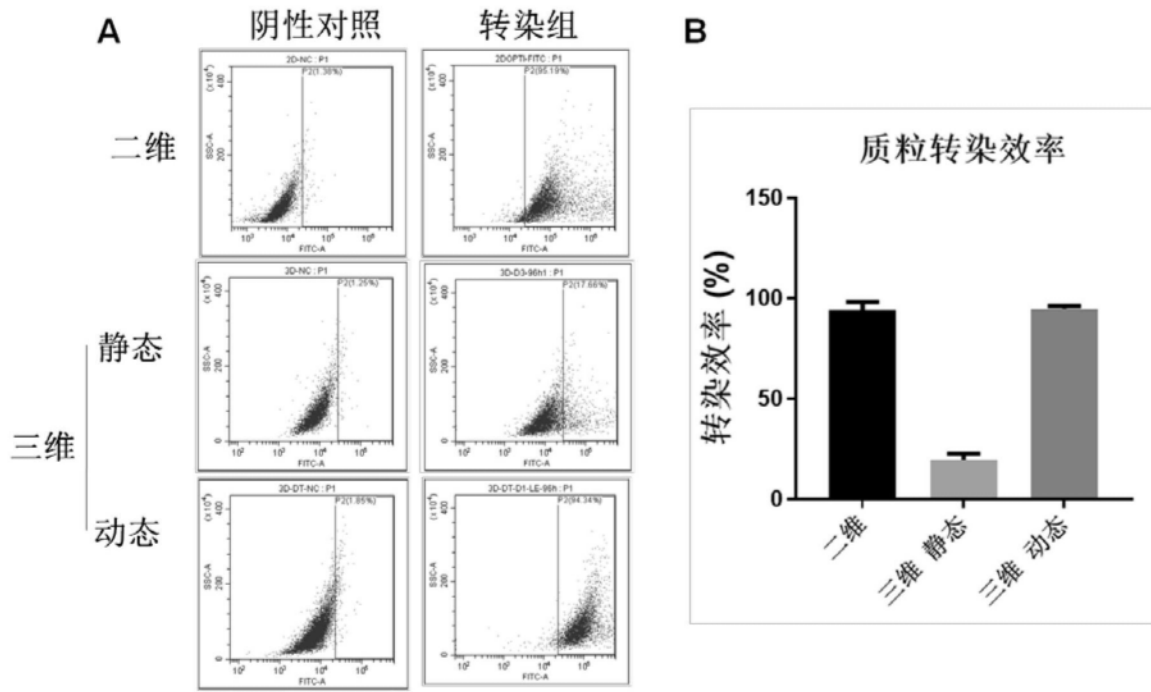


图7

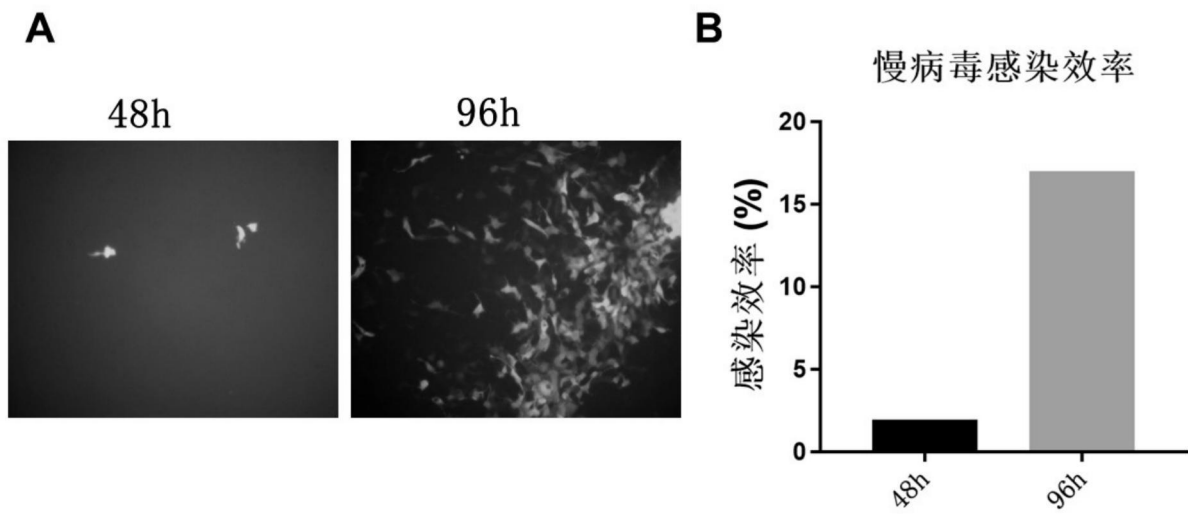


图8

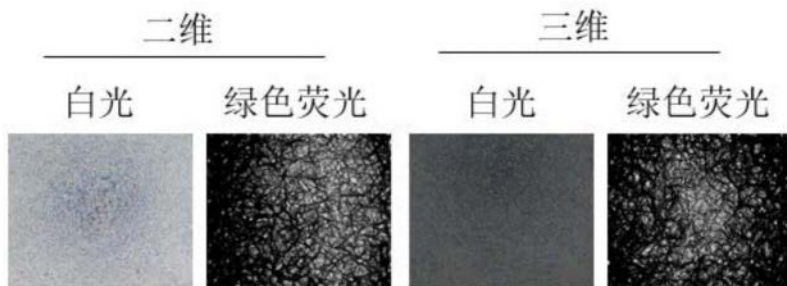


图9

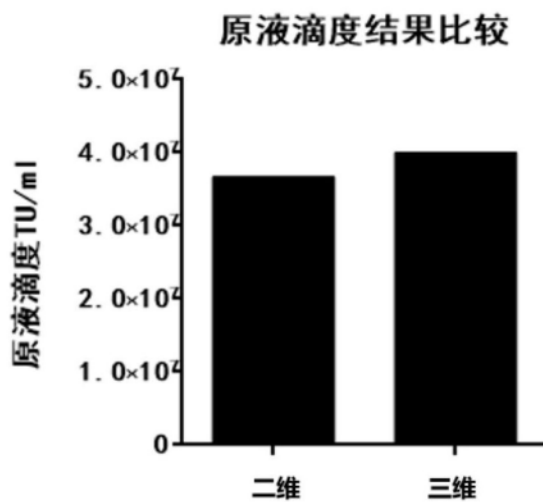


图10

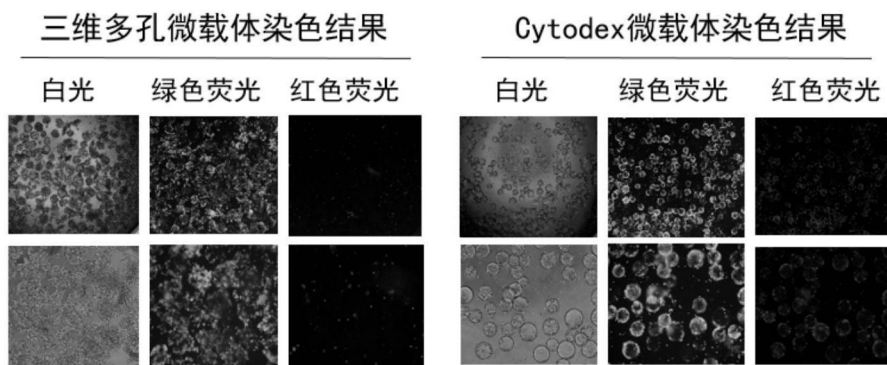


图11

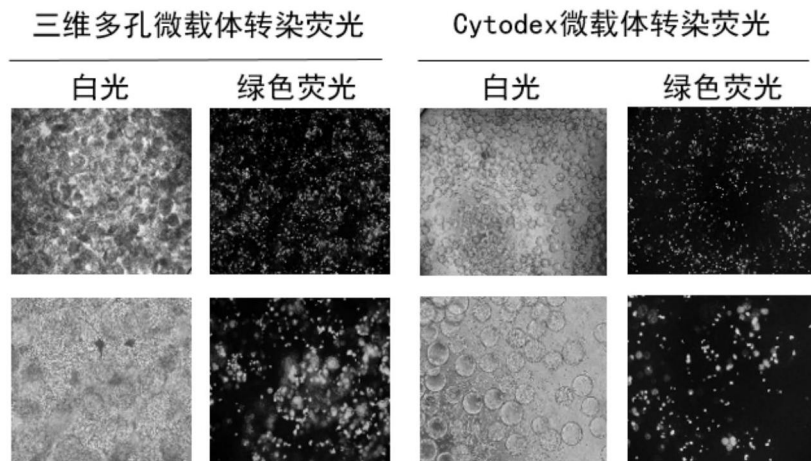


图12

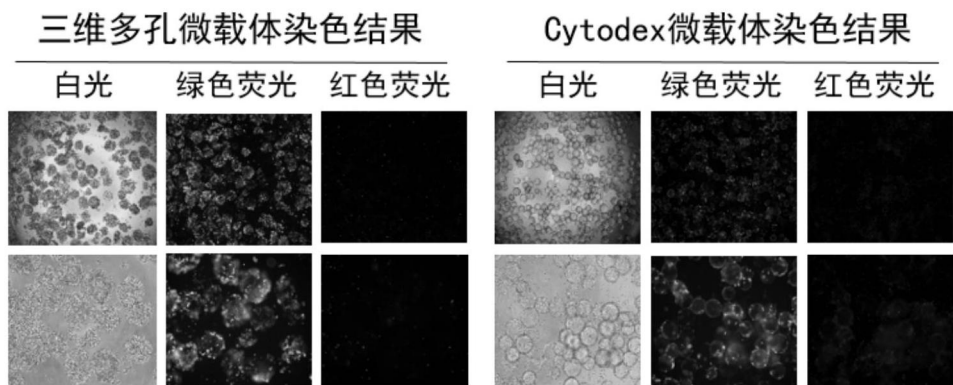


图13

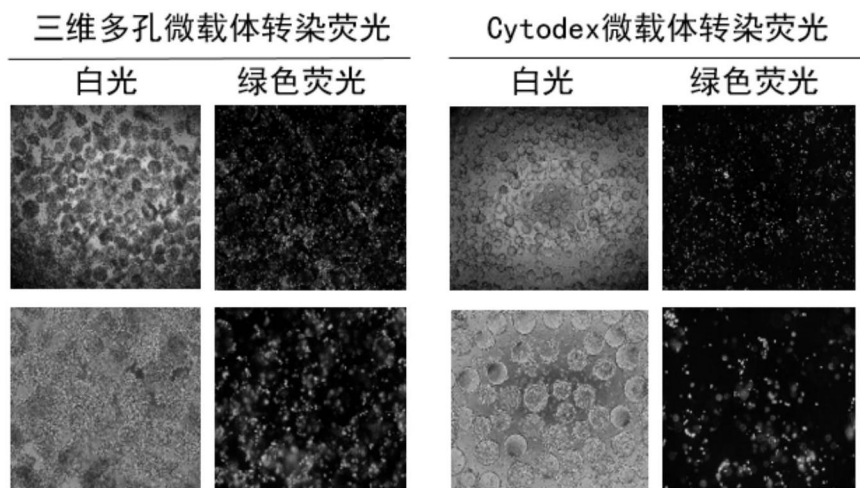


图14

三维多孔微载体与Cytodex载体转染慢病毒后
72H转染效率比较

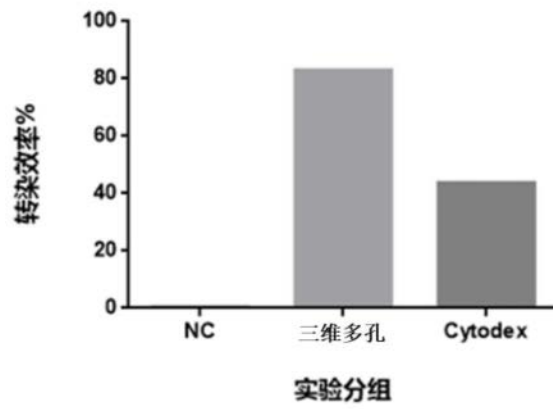


图15

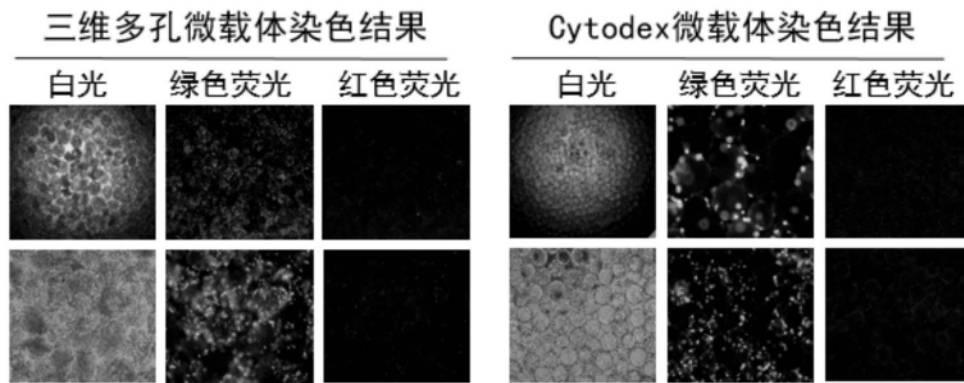


图16

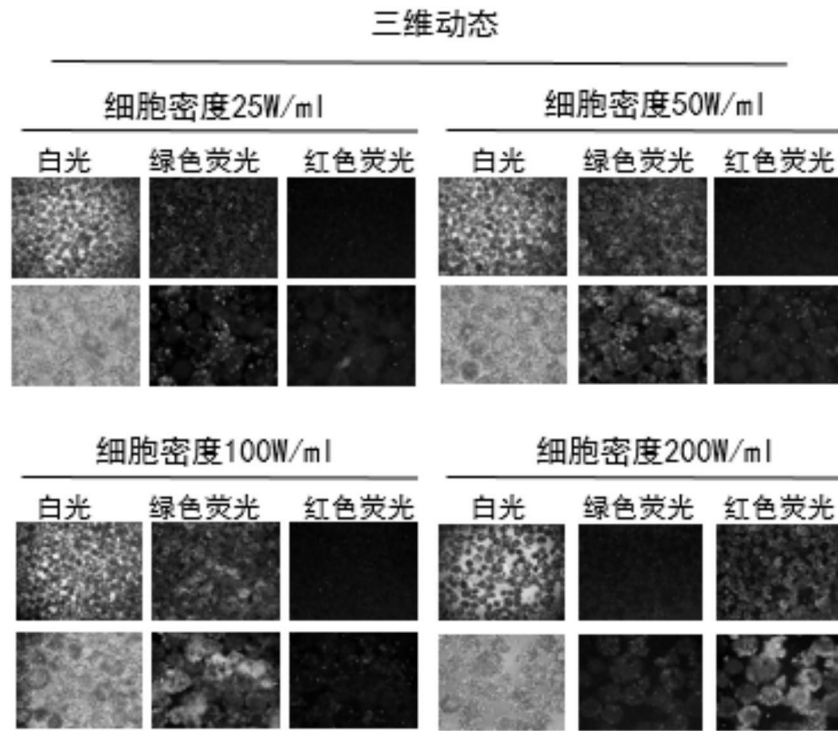


图17

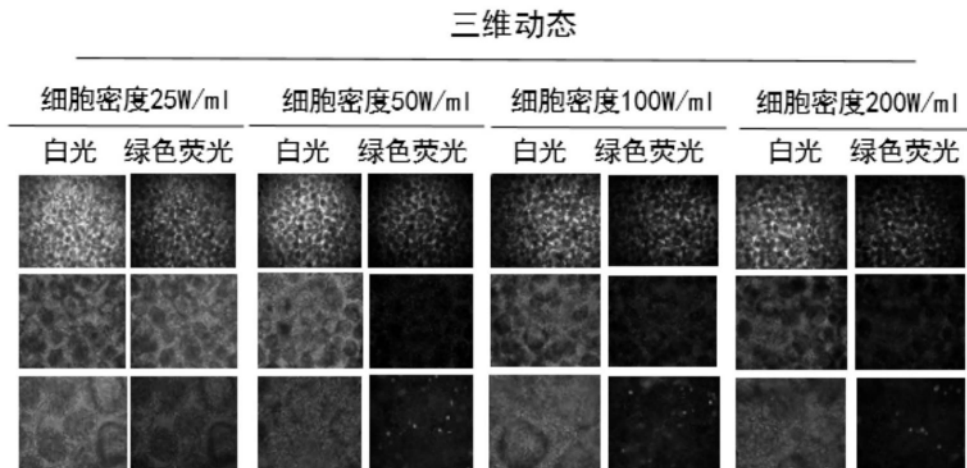


图18

三维静态

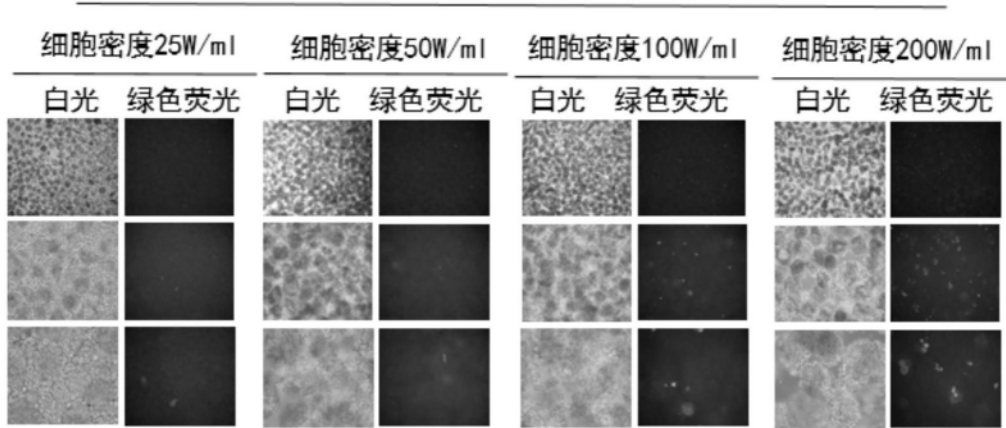


图19

三维动态转染72H荧光

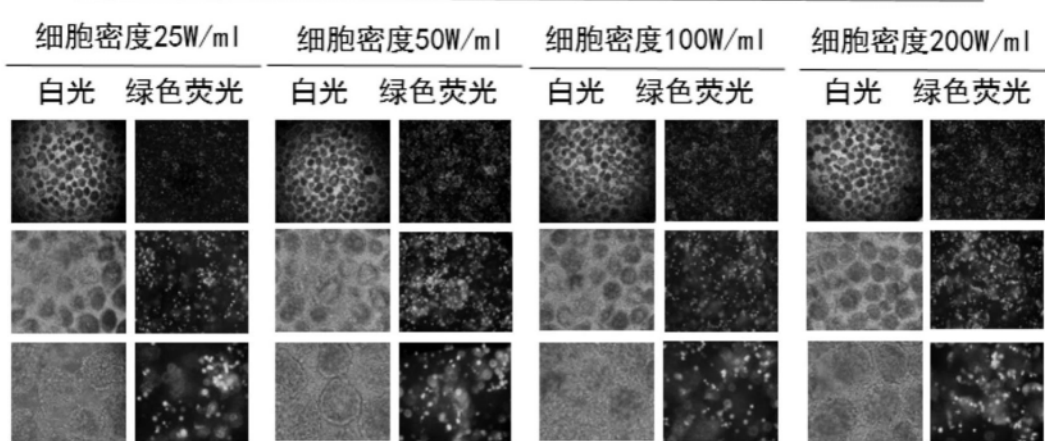


图20

三维动态293T不同细胞密度慢病毒转染72H转染效率比较

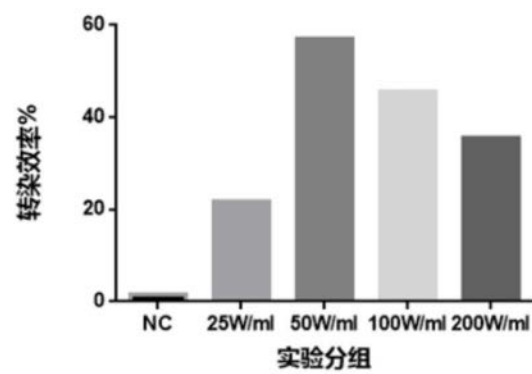


图21

三维静态转染72H荧光

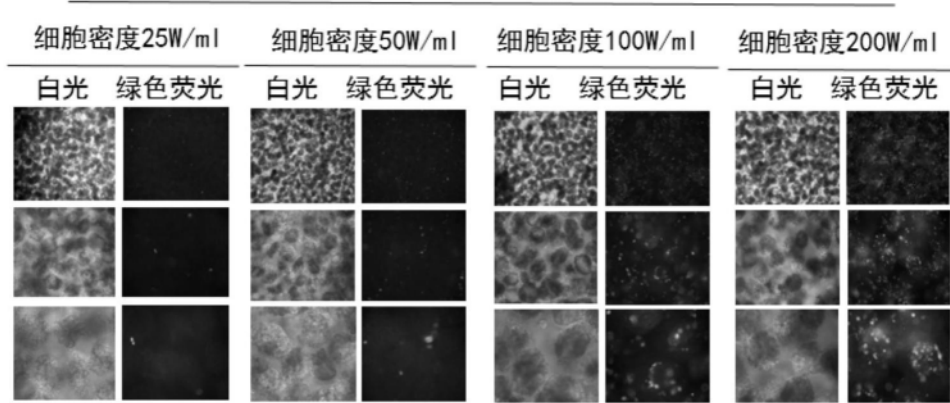


图22

三维静态GT2-293T不同细胞密度慢病毒转染72H转染效率比较

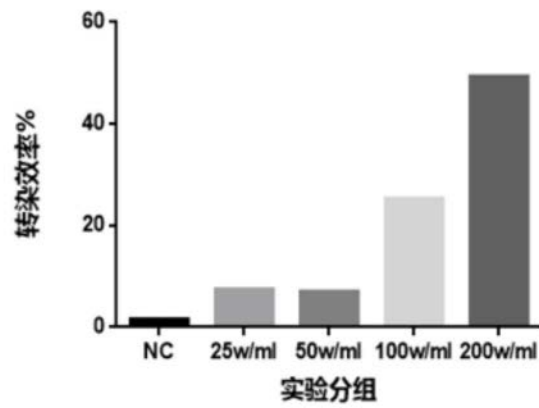


图23

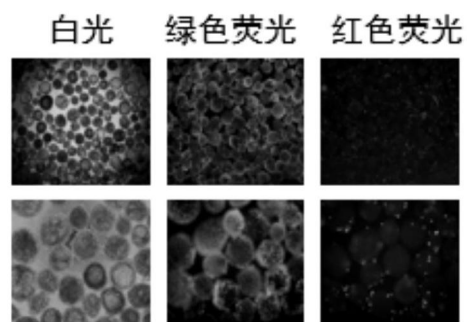


图24

三维转染72H荧光

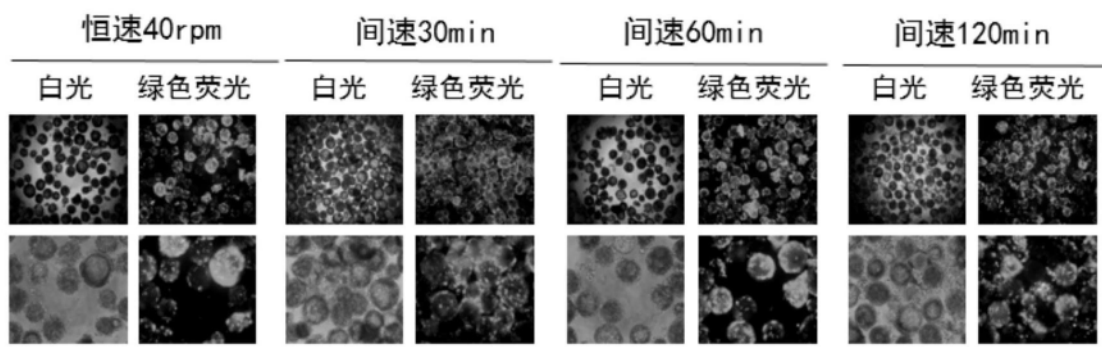


图25

不同转染转速转染72小时后转染效率比较

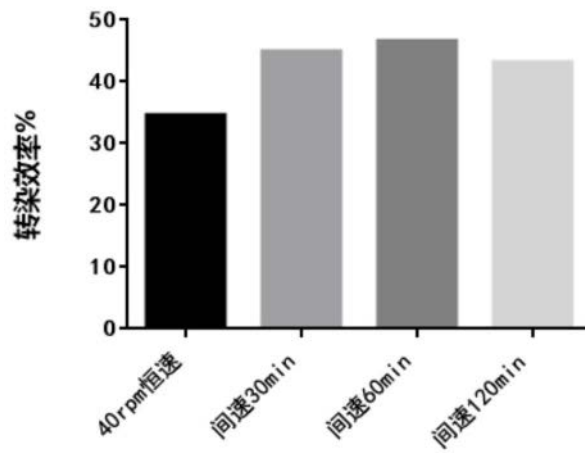


图26

不同转染转速转染慢病毒原液滴度比较

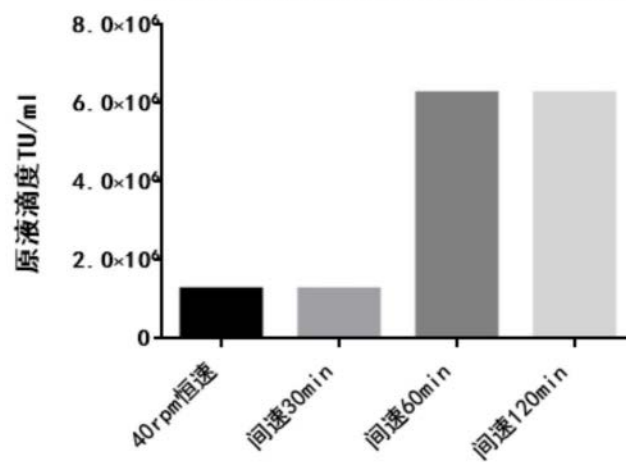


图27

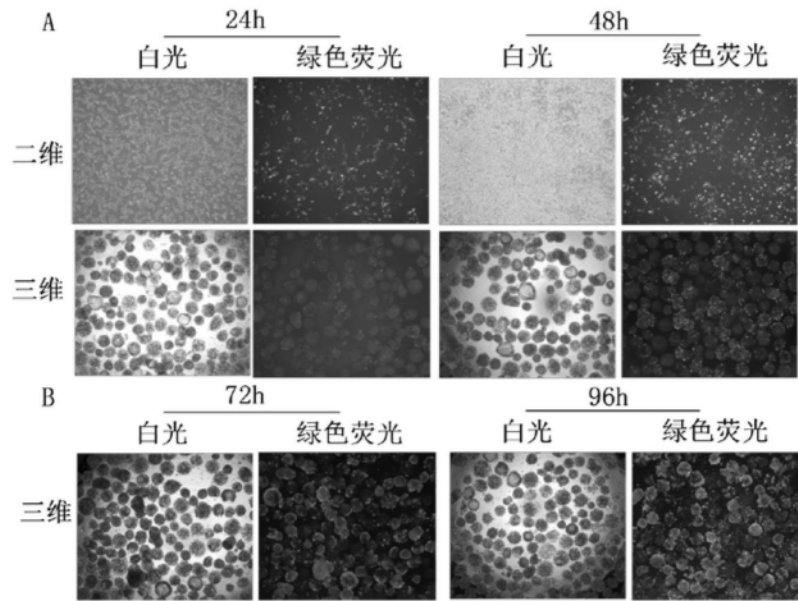


图28

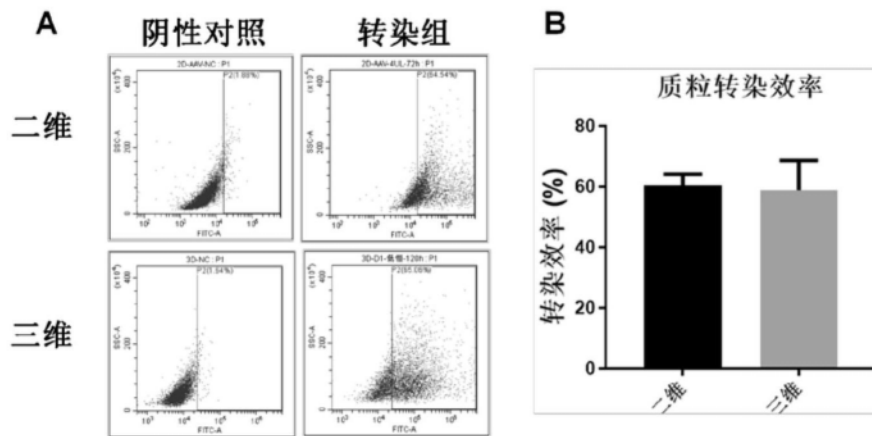


图29

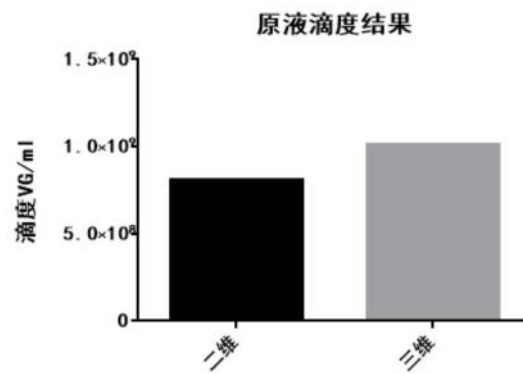


图30

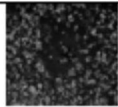
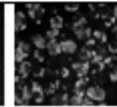
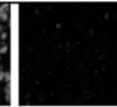
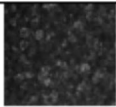
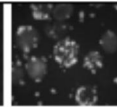
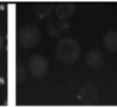
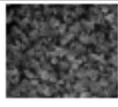
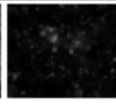
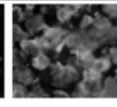
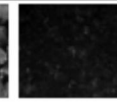
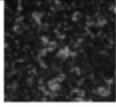
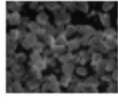
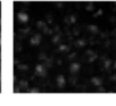
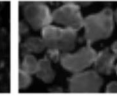
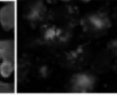
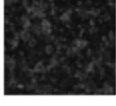
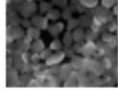
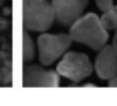
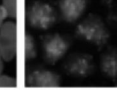
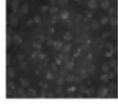
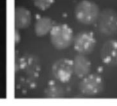
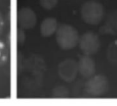
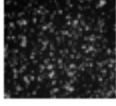
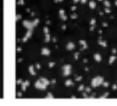
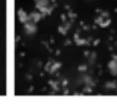
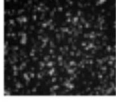
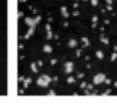
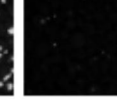
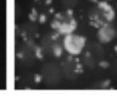
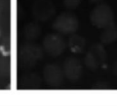
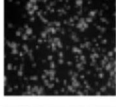
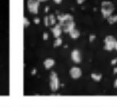
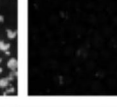
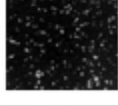
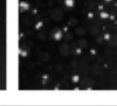
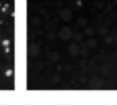
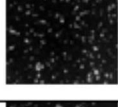
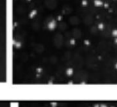
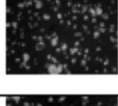
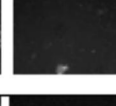
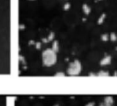
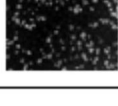
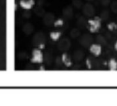
实验条件 [↗]	1g/L [↗]				3g/L [↗]			
接种后 D1 [↗]								
接种后 D2 [↗]								
接种后 D3 [↗]								
接种后 D4 [↗]								
实验条件 [↗]	4.5g/L [↗]				5g/L [↗]			
接种后 D1 [↗]								
接种后 D2 [↗]								
接种后 D3 [↗]								
接种后 D4 [↗]								
实验条件 [↗]	10g/L [↗]				[↗]			
接种后 D1 [↗]					[↗]			
接种后 D2 [↗]					[↗]			
接种后 D3 [↗]					[↗]			
接种后 D4 [↗]					[↗]			

图31