

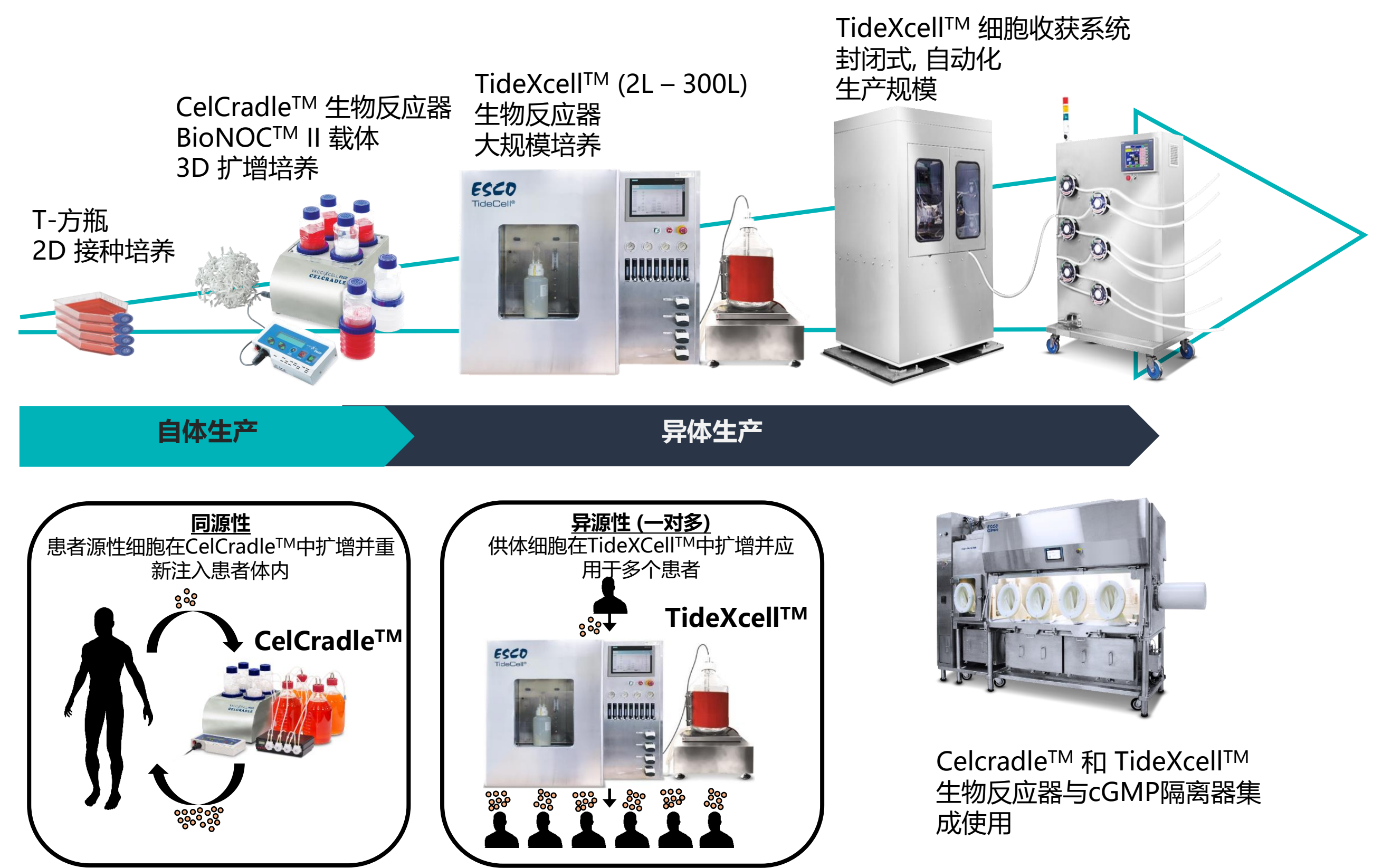
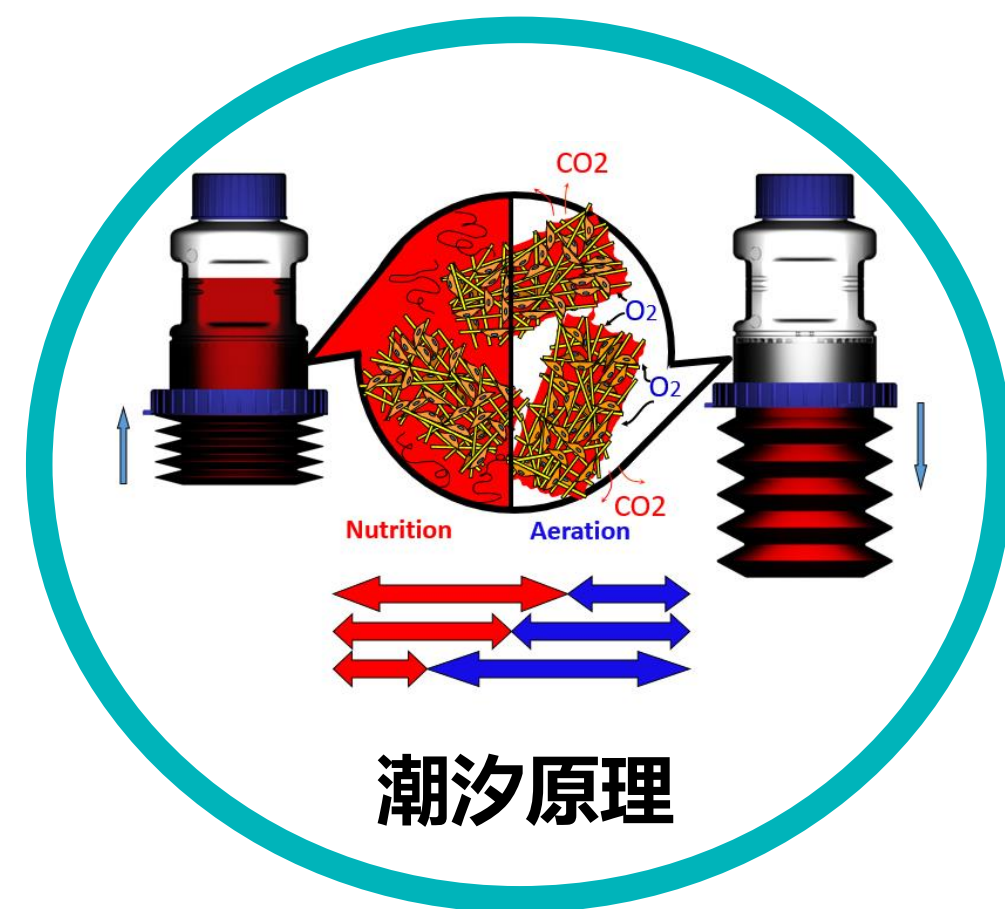
三维潮汐式生物反应器用于间充质干细胞 (MSCs) 的放大培养及工艺优化



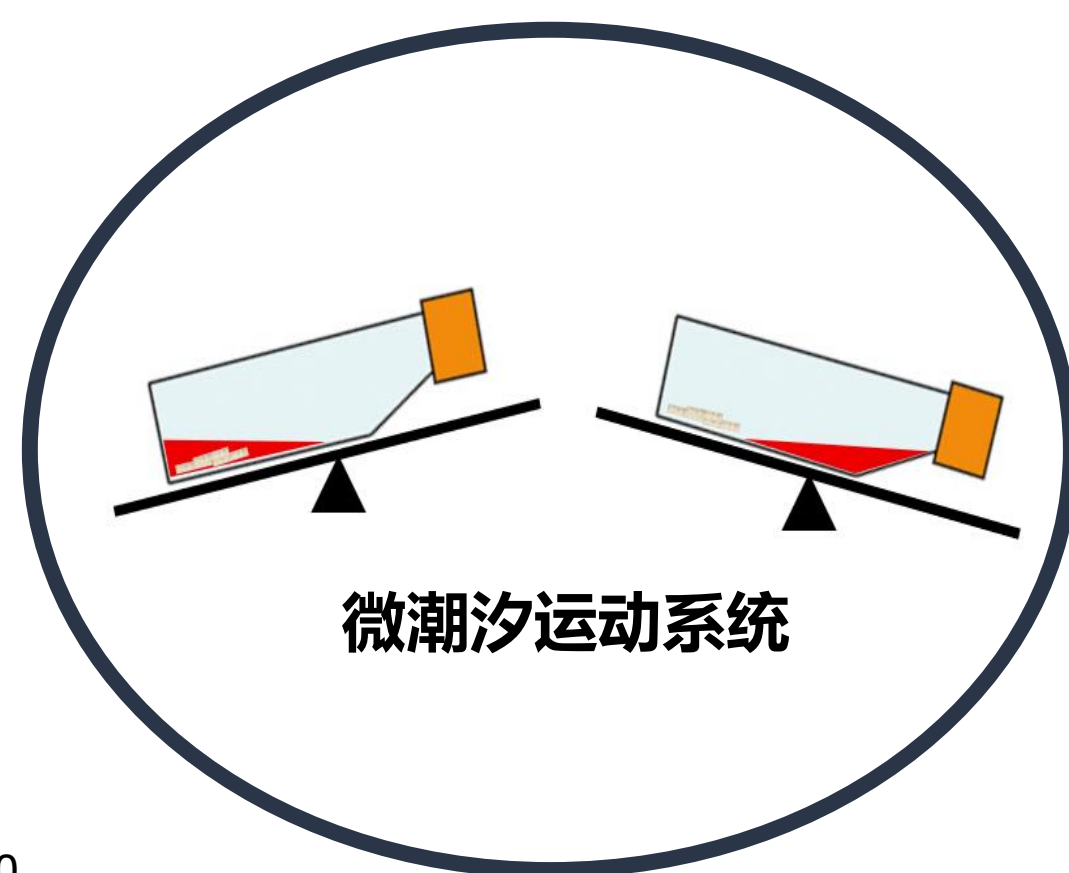
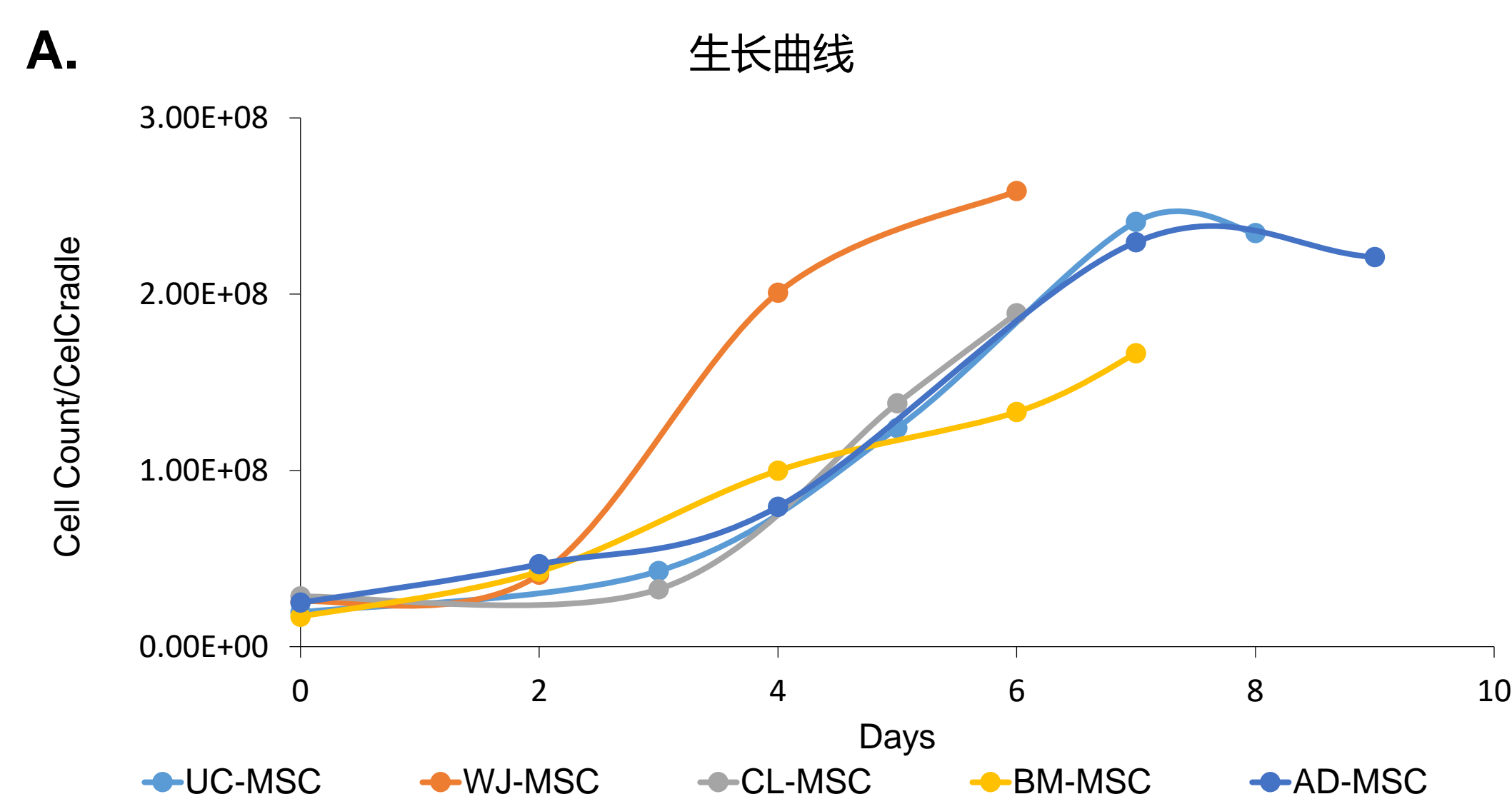
前言

未来的细胞治疗需要大量的间充质干细胞(MSCs)，每个剂量从1000万到2亿多个细胞不等。当需要超过5000万个细胞的大剂量使用时，传统的平板培养MSCs是不切实际的。而利用生物反应器并结合线性放大、过程控制和自动化，是解决这一需求的主要方法。然而许多生物反应器在MSC培养方面都面临技术难题，比如如何控制培养基充分混合的同时将剪切力最小化，以及如何从具有高产量和高活性的片状载体中分离得到细胞等诸多难点。

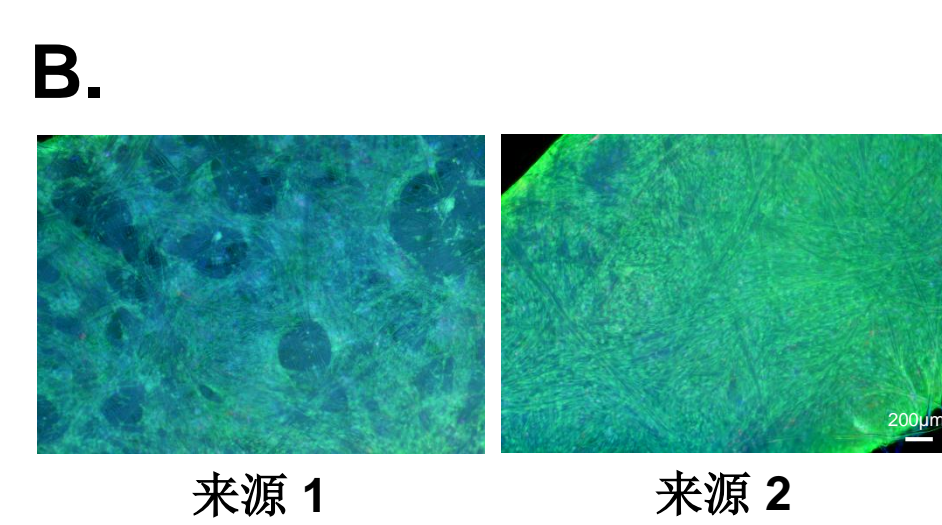
潮汐式生物反应器，利用3D片状载体 (BioNOC™ II) 建立了一个强大的、可扩展的平台，以满足未来临床治疗的需求。在整个培养期间，监测细胞培养条件，并测量生物过程参数，如葡萄糖消耗量和pH值，以确保适当的放大。同时研究优化干细胞培养系统所需的细胞接种密度、培养基培养条件和改进的生物工艺参数等关键问题。总的来说，Esco将提供过程优化与质量控制以及放大生产过程中的相关标准，以便协助用户将学术或工业研发转化为面向未来临床试验和商业化的实体销售。



各组织来源MSCs的生长情况

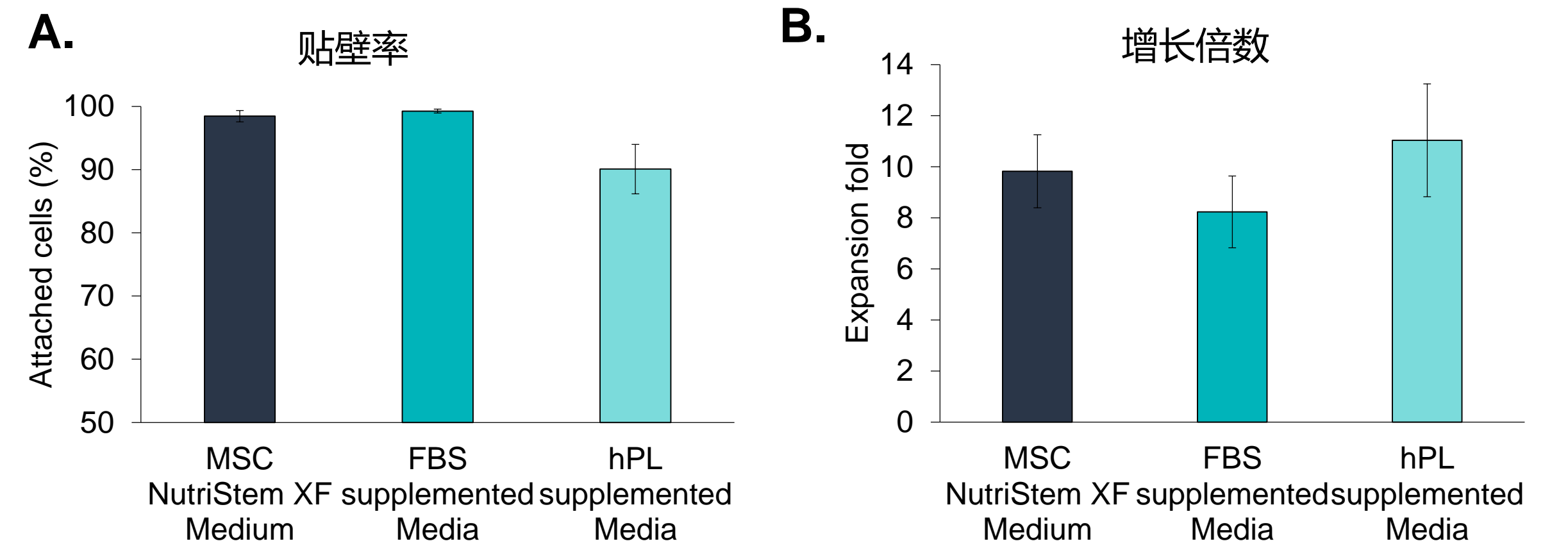


细胞组织来源	细胞接种浓度	细胞收获浓度	增长倍数	培养时间 (天)
UC-MSC	1.96E+07	2.41E+08	12.33	7
WJ-MSC	2.55E+07	2.59E+08	10.14	6
CL-MSC	2.85E+07	1.89E+08	6.64	6
BM-MSC	1.70E+07	1.66E+08	9.79	7
AD-MSC	2.50E+07	2.30E+08	9.15	9

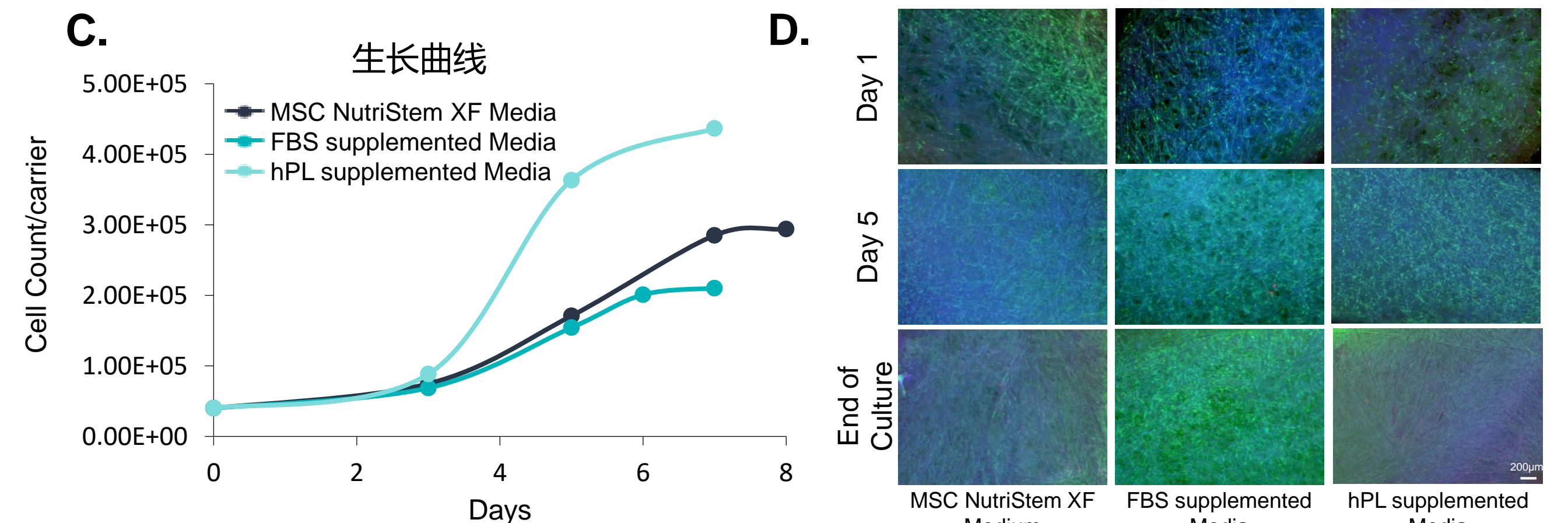


(A)用潮汐式生物反应器系统成功扩增了不同组织来源的MSCs。MSCs的常见组织来源，如脐带间充质干细胞 (UC-MSC)、沃顿胶间充质干细胞 (WJ-MSC)、骨髓间充质干细胞 (BM-MSC) 和脂肪间充质干细胞 (AD-MSC)，在培养后7天内普遍可扩增10倍。上表列出了使用商业细胞来源进行优化的不同组织来源MSCs的接种密度。(B) 将同类型 (相同组织来源) 但细胞来源不同的MSCs，从低播种密度进行扩增能力测试。结果显示，来源2的BM-MSCs与来源1的BM-MSCs生长情况存在明显差异，因此在进行线性放大扩增之前，需要对每个来源MSCs进行播种密度、培养基变化规律等参数进行优化。

MSCs在不同培养基中的扩增情况



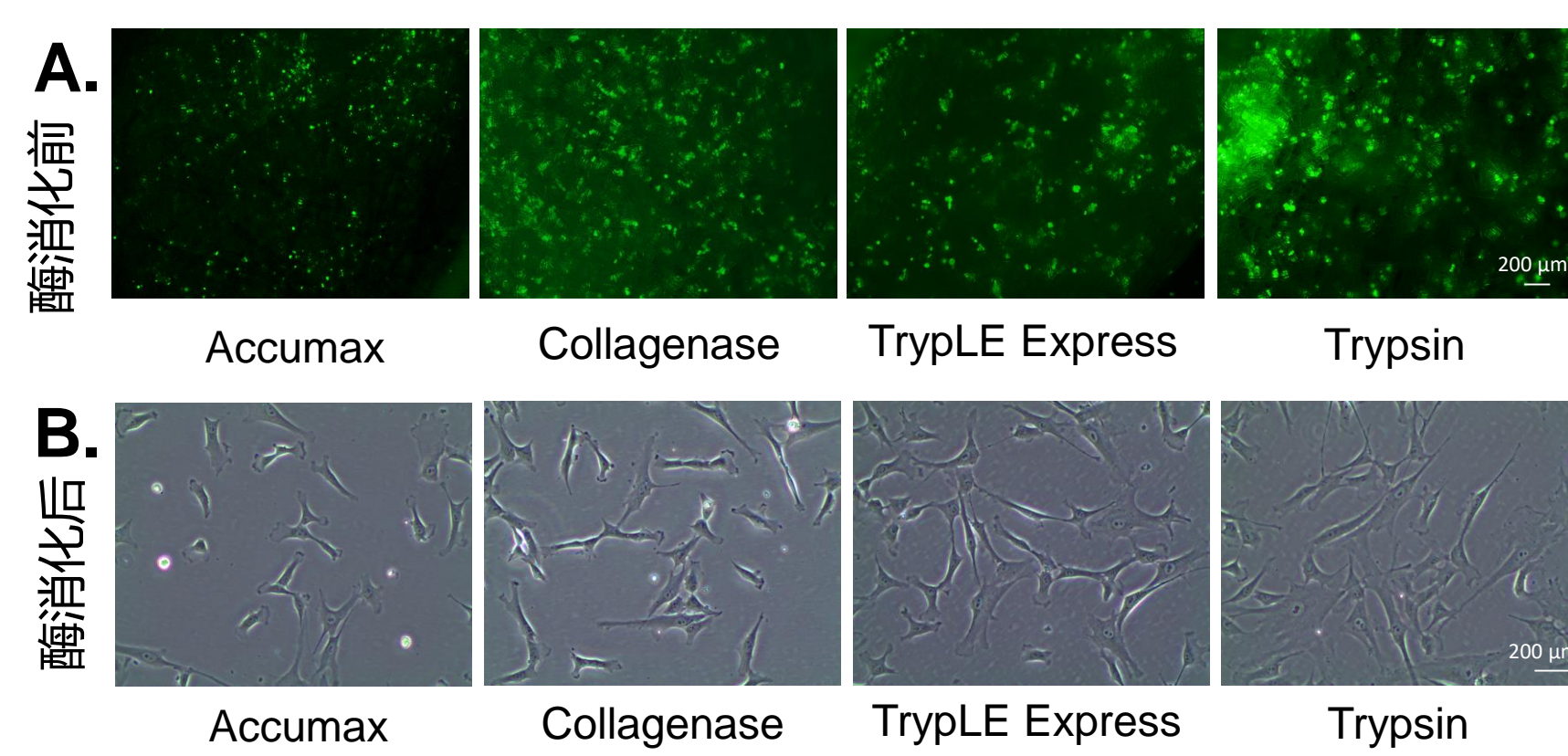
(A) 将UC-MSCs接种于含血清代替物 (hPL) 的培养基中，观察到其对载体的贴壁效率较低。(B) 尽管观察到的附着效率较低，但使用血清代替物补充培养基，使不同组织来源MSCs的细胞扩增倍数增大。



(C) 在将UC-MSCs接种到BioNOC™ II载体之前，对不同培养基类型培养的细胞进行2次以上传代，以监测其增殖速率。(D) 荧光图像显示细胞在培养期间在载体上的扩增情况，结果显示含胎牛血清 (FBS) 培养基的细胞生长较好，含血清代替物 (hPL) 的次之。综合考量，使用含血清代替物培养基是更优的选择。绿色: 荧光素二乙酸钠 (活细胞细胞质)，蓝色: Hoechst 33342 (细胞核)，红色: 碘化丙钠 (死细胞)

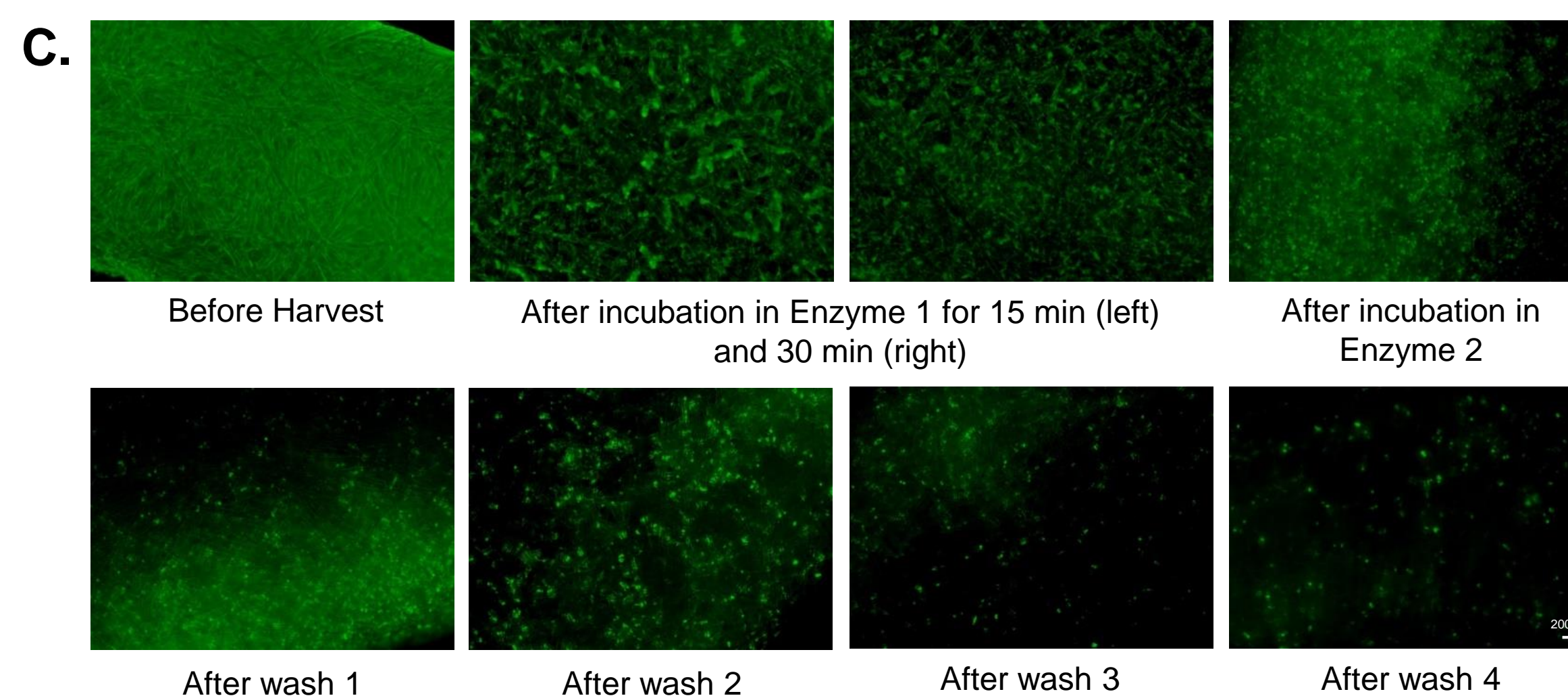
细胞收集工艺优化

不同种类的酶消化

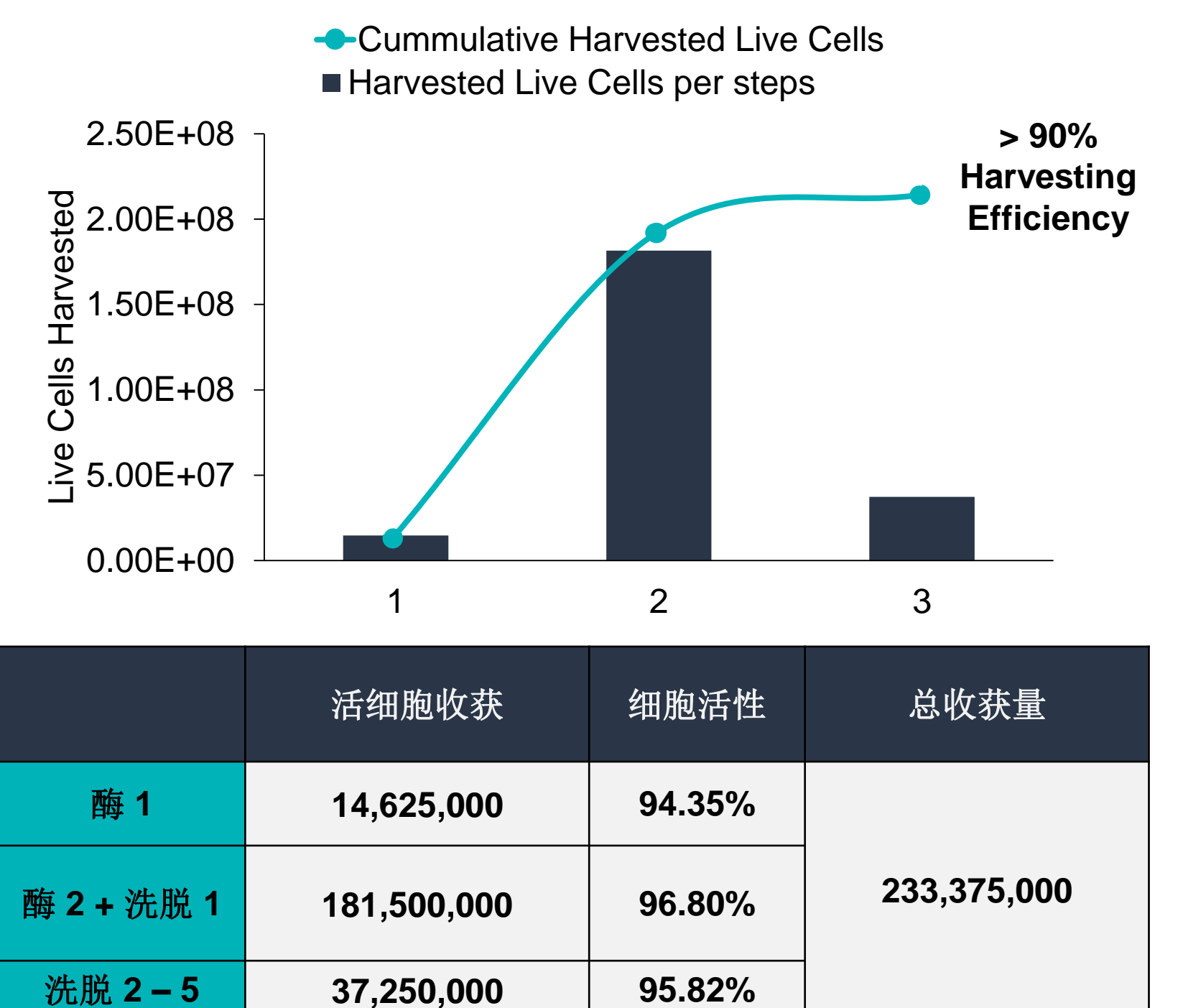


	Accumax	Collagenase	TryPLE Express	Trypsin
得率 (%)	87	68.3	78.3	56.3
细胞活性 (%)	95.6	73.2	95.8	88.9

CelCradle™ 高效收获细胞



(C) 通过优化参数，开发了一种从BioNOC™ II载体高效收获UC-MSCs的方法。在整个实验过程中，使用荧光素二乙酸钠 (FDA) 对BioNOC™ II载体上的活细胞进行染色。



质量控制

类别	性能参数	方法	参考值
数量	细胞计数	自动细胞计数器	取决于每小瓶的剂量 (范围从1000万到10亿)
活性	细胞活性	自动细胞计数器	>90%
特性	染色体核型	细胞遗传学研究	正常核型
特性	细胞形态	显微镜观察	成纤维细胞的纺锤体形状
特性	分化特性	分化试验 (如成脂肪细胞、成软骨细胞、成骨细胞)	阳性
特性	免疫表型检测	通过FACS检测免疫表型	≥ 95% CD105, CD73, CD90 ≤ 2% CD34, 45, HLA DR, CD11b, CD19
安全性	无菌试验 <USP71>	自动微生物检测系统	阴性
安全性	支原体检测 <USP63>	PCR	阴性
安全性	内毒素检测 <USP85>	鲎试剂法	<0.25 EU/kg
安全性	无人源特定病毒 (HIV, HBV, HCV, HPV)	病毒蛋白抗原检测 (ELISA)	阴性
安全性	致癌性	端粒酶活性	RTA < 1.2
有效性	细胞因子蛋白表达试验	例如 IL-6 蛋白分泌 (ELISA)	
有效性	细胞因子基因表达试验	例如 TNF-α 基因表达 (q-PCR)	
有效性	MSC迁移/粘附	划痕试验或迁移试验	
有效性	免疫调节试验	IDO 表达和活性试验	

结论

- 潮汐式生物反应器是由无菌一次性CelCradle™细胞培养瓶和波纹管压缩平台组成，可线性放大，且在培养过程中支持取样监测。
- 小规模系统支持MSCs早期研发阶段，可以低成本高效率进行参数优化。
- 为大批量生产MSCs提供一个很好的平台。

研究项目	MSCs性能
细胞类型	适合各种组织来源的MSCs (UC, WJ, BM and AD)*
细胞附着	高播种率 > 90% 用于无血清培养基的纤连蛋白包被 (适用于cGMP生产)
细胞生长和监控	通过细胞基质染色观察细胞 培养6-8天约~10倍扩增量
细胞收获和载体收集	选择合适的酶，细胞收获率 > 90% 所收集的培养基可以用于外泌体下游工艺
细胞质量	收获得到正常细胞，细胞活性 > 90% 保持MSCs细胞分化等干细胞特性

*其他组织来源MSCs的生长参数待补充