

## 前言

病毒载体如腺相关病毒(AAV)、慢病毒(LV)和逆转录病毒(RV)是基因治疗应用中最常用的载体。目前的病毒载体生产方法产量低,可扩展性有限。生产病毒载体的方法具有经验依赖性,而且这些过程通常没有很好的特征。这些方法转化为商业化的基因治疗时成本很高。

Esco Aster开发了TideMotion®生物反应器,用于贴壁细胞扩大培养。Esco Aster还建立了一个强大的、可扩展的平台,可以灵活地生产任何病毒载体。为了说明这一点,我们在这张海报中展示了TideMotion®平台上第三代慢病毒生产的上游部分。

Esco Aster通过TideMotion®平台为病毒载体生产提供上下游配套服务。

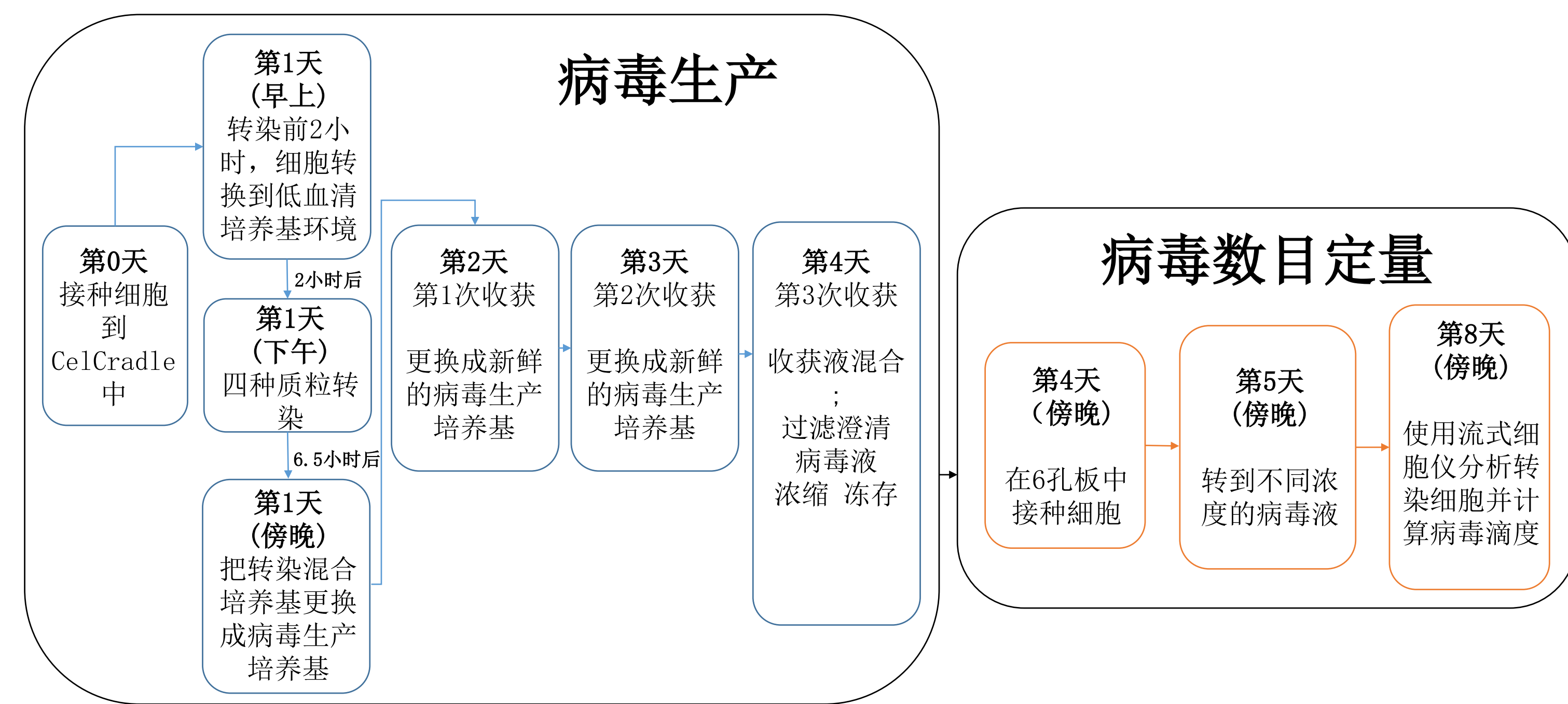
## 在病毒生产过程中使用贴附型反应器所面临的挑战

<b>挑战1</b> 质粒转染效率低	<b>挑战3</b> 从二维生产方式转变成大规模反应器生产不容易 (也适用于搅拌型反应器的悬浮细胞培养)	<b>挑战4</b> 病毒无法从巨型/微型载体上的裂解细胞直接进行有效的收获
<b>挑战2</b> 病毒滴度低		

## 细胞、培养基和材料

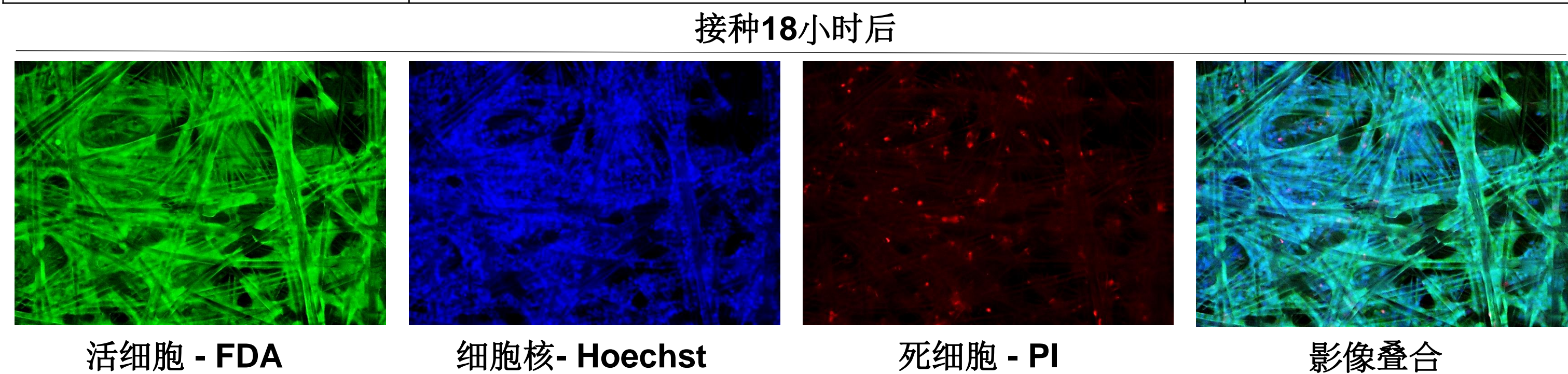
硬件设备	CelCradle™ 反应器
细胞株	贴附型HEK-293T 细胞(ATCC: CRL-3216)
病毒载体选择	第三代慢病毒
包装质粒 (从AddGene获得)	pCMV-VSV-g
	pMDL-pRRE
	pRSV-Rev
表达质粒	
生长培养基	标准 HEK293T生长培养基
转染试剂	PEI 'MAX'

## 生产慢病毒的总体生产线



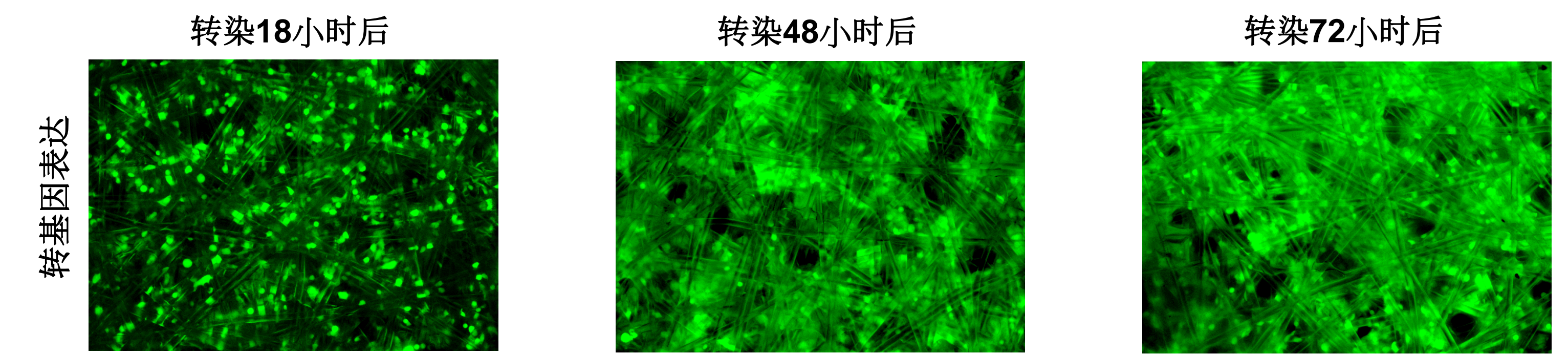
## 病毒生产第0天：细胞接种

每瓶CelCradle™ 接种细胞数目	条件: 机密	关键性: 非常重要
接种方式	直立	非常重要
接种体积	~150 毫升	无
接种时间	~3-5 小时	无
接种方法	每30分钟温和均匀摇晃一次	无
接种效率	> 85 %	无
培养体积	生长培养基补到500毫升	无
潮汐运动参数 (细胞生长)	上升速度: 1 毫米/秒; 上停滞时间: 1 分钟; 下降速度: 1 毫米/秒; 下停滞时间: 1 分钟	无



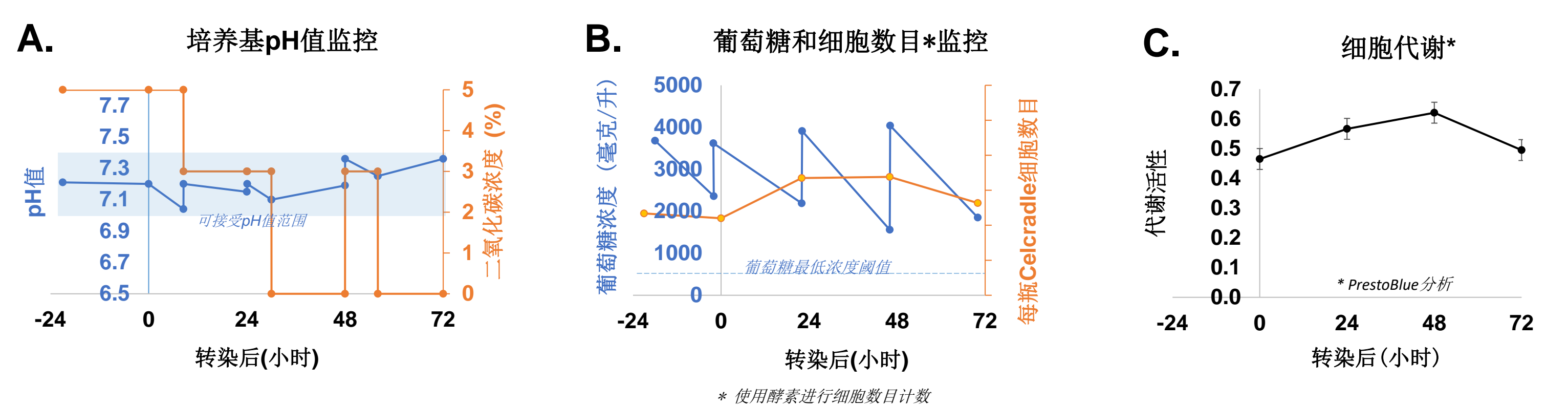
## 病毒生产第1天：四种质粒转染

	条件	关键性
生长培养基	标准HEK293T培养基	无
转染培养基	含低血清标准HEK293T培养基	无
病毒生产培养基	Transfection media with <b>additive(s)</b>	非常重要
转染前准备	Exchange cells into 450 ml of transfection media	非常重要
转染病毒的时机和细胞数目	机密	非常重要
质粒比例	机密	非常重要
PEI 'MAX' : DNA 比例	机密	非常重要
每个细胞转染的DNA量	机密	非常重要
潮汐运动参数 (转染6.5小时)	上升速度: 0.25 毫米/秒; 上停滞时间: 30 分钟; 下降速度: 0.25毫米/秒; 下停滞时间: 1分钟	非常重要
转染时间	6.5 小时	无
转染后的处理	更换成新鲜的病毒生产培养基	选择性

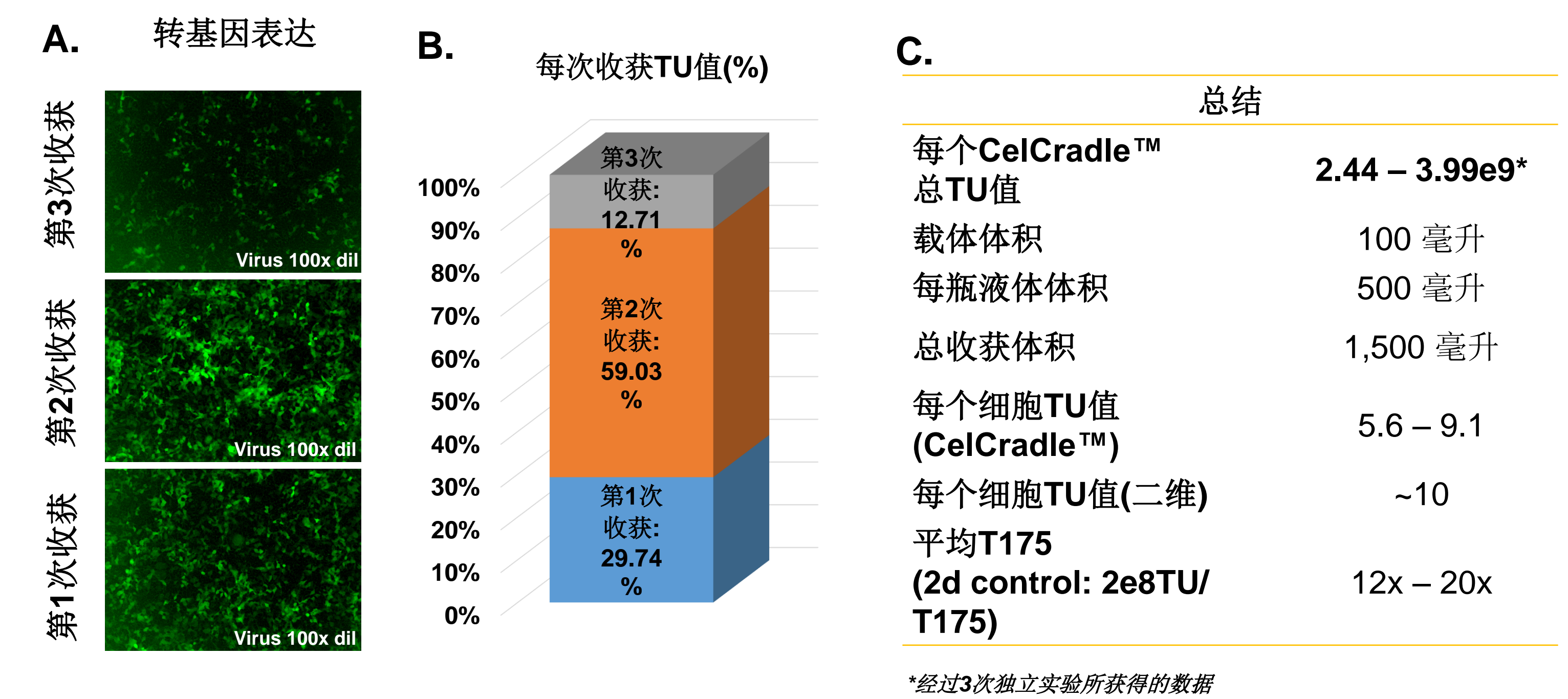


## 病毒生产第2-4天：培养监控/病毒收获

	条件	关键性
pH值	维持酸碱值 > 7.0	无
葡萄糖	> 0.5 克/升	无
收获时间点	24小时, 48小时, 72小时	非常重要



## 病毒滴度定量第4-7天：通过流式细胞仪测定病毒滴度



## 生产线灵活性

病毒种类的应用	第一期：接种	第二期：病毒生产/收获				
慢病毒 (分泌型病毒)	接种	转染四种质粒	第1次收获 (上清液)	第2次收获 (上清液)	第3次收获 (上清液)	无
反转录型病毒 (分泌型病毒)	接种	转染三种质粒	第1次收获 (上清液)	第2次收获 (上清液)	第3次收获 (上清液)	无
腺病毒 (非分泌型病毒)	接种	转染三种质粒	第1次收获 (上清液)	第2次收获 (上清液)	第3次收获 (上清液)	细胞收获

## 结论

使用潮汐运动技术来建立生产病毒的生产线:

- 灵活应用在不同病毒上
- 产量高且可线性放大
- 能够实现高病毒滴度的反应器: 每个 CelCradle™ 产出 4e9 TU

