

使用 BalanCD HEK293 Perfusion A (91184)在悬浮 HEK293 细胞中进行腺相关病毒(AAV)的高细胞密度转染生产

试验方案

本文件描述了使用高细胞密度(2×10^7 cells/mL)在 BalanCD HEK293 Perfusion A 培养基中通过瞬时转染悬浮 HEK293 细胞培养进行腺相关病毒(AAV)生产的方案，适用于带有类灌注过程的微型生物反应器或使用 ATF 灌注系统的台式生物反应器。根据特定的 AAV 生产系统、不同的细胞系、转染试剂或外源基因，可能需要进一步优化。该方案可作为起点评估瞬时转染高细胞密度悬浮 HEK293 细胞 BalanCD HEK293 Perfusion A中的AAV 生产。

材料

- 悬浮 HEK293 细胞，例如Expi293F，用于生成海报“可放大的生物工艺策略：HEK293细胞培养中的病毒载体强化生产”中图 5 的 AAV2 生产数据。
- BalanCD HEK293 Perfusion A ((FUJIFILM Biosciences, 货号 91184)
- L-谷氨酰胺溶液，200mM ((FUJIFILM Biosciences, 货号 9317)
- PEIpro® 转染试剂 (PolyPlus, 货号 101000026)
- AAV 生产用质粒，例如 pRC2-mi342、pHelper 和 pZsGreen (Takara AAV 系统货号 6230 和6231)
- 125 mL 聚碳酸酯锥形瓶（带通气盖）（Corning, 货号 431143)
- Corning 50mL 微型生物反应器（货号：431720)
- BioBLU 3c 一次性生物反应器（Eppendorf, 货号 1386112000)
- XCell ATF2 细胞截留装置（Repligen)
- 消泡剂C乳液（Millipore Sigma, 货号 A8011-250mL)

重要注意事项

- 使用无菌技术处理以避免污染。
- 将培养基避光储存于2-8 °C。
- 如果培养基瓶中出现颗粒物、浑浊或污染的迹象，请勿使用。

方案

方案包括以下步骤：



注意：用于灌流细胞培养的BalanCD HEK293 Perfusion A应添加8mM的L-glutamine。

BalanCD HEK293 Perfusion A中的细胞培养适应

1. 在基准培养基中培养的悬浮HEK293细胞应在进入AAV生产之前，适应BalanCD HEK293 Perfusion A培养基，至少经过3次传代，并在补充8mM L-glutamine的BalanCD HEK293 Perfusion A中达到所需的倍增时间。
2. 使用基准培养基的标准方案进行细胞传代。初次传代至BalanCD HEK293 Perfusion A培养基时，不需要通过离心去除基准培养基，但如果有助于适应过程，可以采用此方法。
3. 一旦细胞完全适应于BalanCD HEK293 Perfusion A培养基，将细胞培养维持在125mL圆底摇瓶中，培养体积为25mL到30mL，接种细胞密度为 3×10^5 - 4×10^5 /mL，并在细胞指数生长阶段每3-4天进行传代，细胞密度不超过 6×10^6 /mL。

微型生物反应器或台式生物反应器中的细胞接种

· 在微型生物反应器中生产AAV：

1. 在细胞接种到微型生物反应器时，我们建议在基准条件下分别在基准培养基和BalanCD HEK293 Perfusion A培养基中进行AAV生产，采用批次(Batch)培养模式，例如在低细胞密度下进行转染，最优转染条件包括转染时的细胞密度、每 1×10^6 细胞的总质粒使用量、质粒之间的摩尔比、总质粒与转染试剂的比率、孵育时间和转染缓冲液的体积。
2. (可选：用于AAV生产的低密度悬浮HEK293细胞培养物的典型瞬时转染) 准备低细胞密度细胞培养物：将所需量的细胞培养物在指数生长阶段转移到微型生物反应器中，并添加预热的BalanCD HEK293 Perfusion A(添加8mM L-谷氨酰胺)，使最终活细胞密度约为 2×10^6 /mL，微型生物反应器中的细胞培养总量为4.5mL。
3. 准备高细胞密度细胞培养物：在指数增长阶段，将所需量的细胞培养物转移至离心管中，以400g离心5分钟。吸去培养基，并将细胞沉淀重悬于预热的BalanCD HEK293 Perfusion A培养基中(添加8mM L-谷氨酰胺)，使最终浓度达到约 2×10^7 /mL。采用标准细胞计数方法，将细胞悬液稀释 5-10 倍，以验证细胞计数结果。转移3.6mL的细胞重悬液到微型生物反应器中。建议进行两到三个细胞培

养重复实验，以便正确评估培养基的性能。在转移到每个微型生物反应器之前，确保多次轻柔吸移，以达到细胞均匀重悬。

4. 在微型生物反应器中准备好细胞培养物后，将微型生物反应器转移到设置为37°C、300rpm、25mm振幅和5% CO₂的培养箱中。这些细胞培养物应在培养箱中至少培养 1 小时，以适应培养环境，然后再进行转染。

· 在桌面生物反应器中生产AAV：

1. （可选）在细胞接种到微型生物反应器时，我们建议在基准条件下分别在基准培养基和BalanCD HEK293 Perfusion A 培养基中进行AAV生产，采用批次(Batch)培养模式，例如在低细胞密度下进行转染，最优转染条件包括转染时的细胞密度、每1×10⁶ 细胞的总质粒使用量、质粒之间的摩尔比、总质粒与转染试剂的比率、孵育时间和转染缓冲液的体积。
2. 准备低细胞密度细胞培养物：将处于指数生长期的所需量细胞培养物接种到含有所需培养基（添加8mM L-谷氨酰胺）的生物反应器中，接种前需进行24小时无菌保存，最终细胞密度约为3×10⁵ – 5×10⁵/mL。为确保转染后生物反应器内细胞培养体积达到最佳状态，请考虑到生物反应器中需要添加相当于培养体积10%的转染复合物。以分批培养模式控制生物反应器，直至细胞密度达到2×10⁶ – 3×10⁶/mL，以便进行转染。此过程可能需要2-3天，具体时间取决于细胞系在培养基中的倍增时间。
3. 准备高细胞密度的细胞培养物：将处于指数生长期的所需量细胞培养物接种到含有所需培养基（添加8mM L-谷氨酰胺）的生物反应器中，接种前需确保生物反应器已成功进行无菌保存，最终细胞密度至少为5×10⁵/mL。如果转染浓度约为2×10⁷/mL，请考虑到生物反应器中需要添加相当于培养体积40%的转染复合物，以获得转染后生物反应器内最佳的细胞培养体积。（如果添加40%培养体积后的总体积超过生物反应器的最大培养体积，则可能需要在转染前进行细胞放流。）以分批培养模式控制生物反应器，直至细胞密度达到约3×10⁶-5×10⁶/mL。我们建议此时开始灌注培养，细胞灌注速率约为25 pl/cell/day。如果观察到泡沫积聚，可根据需要使用浓度为0.25%的消泡剂。

转染

· 微型生物反应器中AAV生产：

1. 转染低密度细胞培养物：根据标准基准转染条件或表1中建议的转染条件，使用以下公式准备转染复合物：

$$\begin{aligned} & \text{Total plasmid usage } (\mu\text{g}) \\ &= \frac{\text{VCD at the time of transfection } \left(\frac{\text{cells}}{\text{mL}}\right) \times \text{cell culture volume to be transfected}(\text{mL}) \times 0.75}{1 \times 10^6} \end{aligned}$$

$$PEIpro (\mu L) = 2 \times total \text{ plasmid usage } (\mu g)$$

$$\begin{aligned} & \text{Medium (with L - glutamine) volume for either plasmids or PEIpro solution (mL)} \\ &= \frac{10\% \times \text{cell culture volume to be transfected (mL)}}{2} \end{aligned}$$

计算示例见表2。

2. 转染高密度细胞培养物：根据表1准备转染复合物，使用以下公式：

$$\begin{aligned} & \text{Total plasmid usage } (\mu g) \\ &= \frac{VCD \text{ at the time of transfection } (\frac{cells}{mL}) \times \text{cell culture volume to be transfected (mL)} \times 0.4}{1 \times 10^6} \end{aligned}$$

$$PEIpro (\mu L) = 2 \times total \text{ plasmid usage } (\mu g)$$

$$\begin{aligned} & \text{Medium (with L - glutamine) volume for either plasmids or PEIpro solution (mL)} \\ &= \frac{40\% \times \text{cell culture volume to be transfected (mL)}}{2} \end{aligned}$$

计算示例见表2。

3. 根据所需的转染复合溶液体积，将所需量的每种质粒转移到合适的容器中。
4. 将所需量的含L-谷氨酰胺的质粒培养基转移到装有所有质粒的容器中。用移液器或涡旋振荡器充分混匀溶液。
5. 将所需量的含L-谷氨酰胺的PEIpro培养基转移到另一个容器中。将所需量的PEIpro转移到该容器中。用移液器或涡旋振荡器充分混匀溶液。
6. 将含有PEIpro的培养基转移到装有培养基和质粒的容器中。用移液器轻轻吹吸4-5次。
7. 将第6步得到的转染复合溶液在室温下孵育，孵育时间见表1。
8. 将步骤7中的转染复合物溶液转移到微型生物反应器中。
9. 将微型生物反应器放回培养箱。

· 台式生物反应器中AAV生产：

1. 转染低密度细胞培养物：根据标准基准转染条件或表1中建议的转染条件，使用以下公式准备转染复合物：

Total plasmid usage (μg)

$$= \frac{VCD \text{ at the time of transfection } \left(\frac{\text{cells}}{\text{mL}}\right) \times \text{cell culture volume to be transfected}(\text{mL}) \times 0.75}{1 \times 10^6}$$

$$PEIpro (\mu\text{L}) = 2 \times \text{total plasmid usage } (\mu\text{g})$$

$$\begin{aligned} & \text{Medium (with L-glutamine) volume for either plasmids or PEIpro solution (mL)} \\ &= \frac{10\% \times \text{cell culture volume to be transfected}(\text{mL})}{2} \end{aligned}$$

计算的示例可以在表3中找到。

2. 转染高密度细胞培养物：根据表1准备转染复合物，使用以下公式：

Total plasmid usage (μg)

$$= \frac{VCD \text{ at the time of transfection } \left(\frac{\text{cells}}{\text{mL}}\right) \times \text{cell culture volume to be transfected}(\text{mL}) \times 0.4}{1 \times 10^6}$$

$$PEIpro (\mu\text{L}) = 2 \times \text{total plasmid usage } (\mu\text{g})$$

$$\begin{aligned} & \text{Medium (with L-glutamine) volume for either plasmids or PEIpro solution (mL)} \\ &= \frac{40\% \times \text{cell culture volume to be transfected}(\text{mL})}{2} \end{aligned}$$

计算的示例可以在表3中找到。

3. 根据所需的转染复合溶液体积，将所需量的每种质粒转移到合适的容器中。
4. 将所需量的含L-谷氨酰胺的质粒培养基转移到装有所有质粒的容器中。用移液器或涡旋振荡器充分混匀溶液。
5. 将所需量的含L-谷氨酰胺的PEIpro培养基转移到另一个容器中。将所需量的PEIpro转移到该容器中。用移液器或涡旋振荡器充分混匀溶液。
6. 将含有PEIpro的培养基转移到含有培养基和质粒的容器中。用移液器轻轻吹吸4-5次
7. 将第6步得到的转染复合溶液在室温下孵育，孵育时间见表1。
8. 暂停出料泵、进料泵以及 ATF 装置的隔膜泵。夹紧连接生物反应器和 ATF 顶部的管路（Repligen Xcell ATF2 系统中的 A2B2 管路）。
9. 将第7步中的转染复合物溶液转移到生物反应器中。

10. 在转染后约4小时，开启出料泵和进料泵，以及ATF设备的隔膜泵。移除连接生物反应器和ATF顶部的管道上的夹子。

表1. 使用PEIpro的建议转染条件

转染缓冲液/培养基		基准转染缓冲液或BalanCD HEK293 Perfusion A
转染条件	低细胞密度 ($2 \times 10^6 - 3 \times 10^6/\text{mL}$)	(0.75 μg 的总质粒 : 1.5 μL 的PEIpro)/ 1×10^6 细胞转染复合物在培养基中的总体积: 培养体积的10% 转染复合物孵育时间: 15分钟
	高细胞密度 ($\sim 2 \times 10^7/\text{mL}$)	(0.4 μg 总质粒 : 0.8 μL 的PEIpro)/ 1×10^6 细胞 转染复合物在培养基中的总体积: 培养体积的40% 转染复合物孵育时间: 10-13分钟
取样时间	在低细胞密度下转染的培养物	转染后48-72小时
	在高细胞密度下转染的培养物	转染后每天直到滤膜堵塞或活率<70%

表2. 使用PEIpro的微型生物反应器转染条件示例

培养条件		37°C, 5% CO ₂ , 80% 相对湿度, 300rpm, 振幅为25mm
转染缓冲液/培养基		基准转染缓冲液或BalanCD HEK293 Perfusion A
转染条件	低细胞密度 例如: 4.5mL细胞培养液, 细胞密度 $2 \times 10^6/\text{mL}$	6.75 μg 的总质粒加入225 μL 培养基中 13.5 μL PEIpro加入225 μL 培养基中 转染复合物孵育时间: 15min 如果质粒原液浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 则总转染复合物溶液为470 μL
	高细胞密度 例如: 3.6mL细胞培养液, 细胞密度 $1 \times 10^7/\text{mL}$	28.8 μg 的总质粒加入720 μL 培养基中 57.6 μL PEIpro加入720 μL 培养基中 转染复合物孵育时间: 10-13min 如果质粒原液浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 则总转染复合物溶液为1526 μL

表3. 使用PEIpro的台式生物反应器转染条件示例

培养条件		37°C, 40% DO, 5% CO ₂ , 无pH控制*
转染缓冲液/培养基		基准转染缓冲液或BalanCD HEK293 Perfusion A
转染条件	低细胞密度 例如: 1.5L细胞培养液, 细胞密度 2×10^6 /mL	2.25mg的总质粒加入75mL培养基中 74.5mL的PEIpro加入75mL培养基中 转染复合体孵育时间: 15分钟
	高细胞密度, 例如: 1.3L细胞培养液, 细胞密度 2×10^7 /mL	10.4mg的总质粒加入260mL培养基中 20.8mL的PEIpro加入260mL培养基中 转染复合体孵育时间: 10-13分钟

*: 我们建议不使用pH控制或在狭窄死区(例如 ± 0.1)内进行pH控制, 因为添加碱会阻止细胞消耗乳酸, 并触发乳酸的积累和更多的碱添加, 导致渗透压显著升高以及细胞凋亡。如果使用pH控制, 我们建议设置一个宽的pH死区在6.7到7.4之间, 以避免触发碱的添加。

转染后的细胞培养和取样

在微型生物反应器中生产AAV:

- 对于低密度转染细胞培养, 细胞在生产阶段以批次方式培养, 转染后不进行任何培养基更换。转染后约24小时取样是可选的。可以在转染后约48小时和72小时收集细胞培养样本以进行细胞计数、代谢物分析和AAV滴度测定。
- 对于高密度转染细胞培养, 转染后应每天更换新培养基。我们建议在更换培养基之前, 取少量细胞培养样本, 例如50 μ L, 稀释5-10倍进行细胞计数。在进行细胞计数后, 将微型生物反应器以400 $\times$ g离心5分钟。小心地将上清液转移到另一个离心管中, 并将细胞沉淀重悬于5mL预热的添加了8mM L-glutamine的BalanCD HE K293 Perfusion A中。如果已知所测血清型可在上清液中分泌, 收集的培养基上清可以用于代谢物分析或AAV滴度测定。也可以收集少量细胞培养样本(100-200 μ L)以供后续AAV滴度测定。通过每天更换培养基可以维持培养到细胞活率低于70%。可以在初次评估期间获得AAV生产动力学和生产阶段细胞生长情况, 以确定最佳AAV生产持续时间。

• 在台式生物反应器中生产AAV:

1. 对于批次生物反应器中培养的低细胞密度转染细胞，转染后约 72 小时内可以每天进行细胞计数、收集培养基上清和细胞培养样本，以便进行细胞生长、代谢物和AAV滴度测定。
2. 对于在灌流生物反应器中培养的高细胞密度转染细胞，转染后约96小时内可以每天进行细胞计数、收集培养基上清和细胞培养样本，以便进行细胞生长、代谢物和AAV滴度测定。从渗透液中收集样本以评估AAV颗粒能否通过细胞截留膜是可选的。请注意，为确保在特定细胞计数设备的动态范围内进行准确的细胞计数，应稀释细胞培养样本，并调整细胞裂解方案，以确保高密度细胞样本的细胞裂解充分。灌流细胞培养可持续进行，直至滤膜堵塞或细胞活率低于70%。可以在初次评估期间获得AAV生产动力学和生产阶段的细胞生长，以确定最佳AAV生产持续时间。

技术支持

联系我们

如需更多信息或协助，请联系客户服务：

- 邮箱：biopharma@fujifilm.com
- 电话：021-50106000转生命科学部