

# 一次性生物反应器悬浮培养 HEK293 细胞生产 Ad-IFN $\gamma$ 的工艺

吴全德<sup>1</sup>, 黄文林<sup>1,2,3,4,5</sup>

- 1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101
- 2 中山大学附属肿瘤医院, 广东 广州 510010
- 3 广东省肿瘤靶向治疗新药研发企业重点实验室, 广东 广州 510663
- 4 广东省发展和改革委员会基因药物工程实验室, 广东 广州 510663
- 5 广州达博生物制品有限公司, 广东 广州 510663

吴全德, 黄文林. 一次性生物反应器悬浮培养 HEK293 细胞生产 Ad-IFN $\gamma$  的工艺. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1787-1791.  
Wu QD, Huang WL. Producing Ad-IFN gamma by suspension culture of HEK293 cells in a disposable bioreactor. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1787-1791.

**摘要:** 腺病毒载体是极具发展前景的基因治疗载体之一, 为获得一条新型腺病毒规模化生产工艺, 研究采用 5 L 振荡激流式一次性生物反应器悬浮培养 HEK293 细胞来生产重组腺病毒载体。细胞经种子链逐步扩增后, 接种至 AP10 生物反应器, 采用 CD293 无血清培养基流加培养悬浮 HEK293 细胞, 细胞密度达约  $2.0 \times 10^6$  个/mL 时, 以 30 MOI (Multiplicity of infection) 感染重组 Ad-IFN $\gamma$  (Recombinant adenovirus-interferon gamma), 48 h 后收获细胞, 3 次冻融裂解离心收获上清病毒粗产品。采用壳蛋白免疫法快速测定粗产品滴度。结果表明, 采用振荡激流式一次性生物反应器, 流加 HEK293 细胞悬浮培养 6 d, 密度可达  $2.0 \times 10^6$  个/mL, Ad-IFN $\gamma$  粗产量达  $1.49 \times 10^{13}$  IFU (Infectious unit), 单细胞包装量达 3 800 IFU/cell。采用阴离子交换层析法纯化重组腺病毒, 回收率 35.9%。建立了利用 5 L 激流式一次性生物反应器悬浮培养 HEK293 细胞生产重组腺病毒载体 Ad-IFN $\gamma$  的初步工艺。

**关键词:** 重组腺病毒, HEK293 细胞悬浮培养, 一次性生物反应器, 分离纯化, 阴离子交换层析

## Producing Ad-IFN gamma by suspension culture of HEK293 cells in a disposable bioreactor

Quande Wu<sup>1</sup>, and Wenlin Huang<sup>1,2,3,4,5</sup>

- 1 Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
- 2 Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510010, Guangdong, China
- 3 Guangdong Provincial Key Laboratory of Tumor-targeted Drug, Guangzhou 510663, Guangdong, China
- 4 Guangdong Provincial Development and Reform Commission Key Laboratory of Gene Medicine, Guangzhou 510663, Guangdong, China
- 5 Guangzhou Double Bioproducts Cooperation, Guangzhou 510663, Guangdong, China

**Abstract:** Adenovirus vectors are promising delivery systems for gene therapy. We established a new process for clinic trial of recombinant adenovirus vectors using a novel disposable bioreactor. The suspension HEK293 cells were inoculated into a 5 L

**Received:** February 27, 2014; **Accepted:** April 15, 2014

**Supported by:** Science and Technology Program of Guangdong Province (No. 2011A080502010), Major Drug Discovery of the 12<sup>th</sup> Five-year Program (No. 2012ZX09401015).

**Corresponding author:** Wenlin Huang. Tel/Fax: +86-20-87343146; E-mail: drhuangwenlin@163.com

广东省科技计划项目 (No. 2011A080502010), 十二五重大新药创制项目 (No. 2012ZX09401015) 资助。

网络出版时间: 2014-05-30

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140119.html>

disposable bioreactor with parameters control of pH, DO, agitation and temperature. After 6 days of a fed-batch culture, the final cell density reached  $2.0 \times 10^6$  cells/mL. The culture was infected with Ad-IFN $\gamma$  at an MOI of 30. The harvest was performed at approximately 48 h post-infection and crude viral lysate was obtained after 3 freeze/thaw cycles and centrifugation. The maximum titers of crude viral lysate was  $1.49 \times 10^{13}$  Infectious units (IFU) and the bulk product specific was 3 800 IFU/cell. Purified Ad-IFN $\gamma$  by anion-exchange chromatography and the final recovery of infectious unit reached 35.9%. The result demonstrates that an efficient and stable process of producing Ad-IFN $\gamma$  using a disposable fed-batch bioreactor is established.

**Keywords:** adenovirus vectors, suspension culture of HEK293 cell, disposable bioreactor, purification, anion-exchange chromatography

腺病毒载体是极具发展潜力的基因治疗载体之一<sup>[1]</sup>,在全球已报道 1 970 例基因治疗临床试验中占 23.5%<sup>[2]</sup>。探索规模化、高效和可重复的符合 GMP 标准的重组腺病毒生产工艺,是临床试验和商业生产的迫切需求<sup>[3-5]</sup>。HEK293 是最常用的腺病毒包装细胞系,传统采用微载体、纸片载体、固定床等预装载体于生物反应器内贴壁培养<sup>[3,6-7]</sup>,缺点是不易放大。悬浮驯化培养操作简便,易于放大,使用无血清 CD (Chemical define) 级培养基,避免动物来源成分所产生的潜在风险,利于下游纯化工作的开展<sup>[8]</sup>。近年,一次性生物反应器 (Single use bioreactor) 或称抛弃型生物反应器 (Disposable bioreactor) 逐渐应用于生物制药<sup>[9-12]</sup>。一次性生物反应器易操作,交叉污染风险低,并经过 FDA 认证,能有效缩短生产周期及降低生产成本等优点而广受欢迎<sup>[9]</sup>。

研究采用悬浮 HEK293 作为包装细胞,在 5 L 振荡激流式一次性生物反应器中培养生产 Ad-IFN $\gamma$ ,并采用 Q sepharose XL 阴离子交换层析进行分离纯化,初步建立了基于振荡激流式一次性生物反应器的重组腺病毒生产工艺。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 细胞和病毒

悬浮 HEK293 细胞由中山大学附属肿瘤医院实验研究部惠赠。Ad-IFN $\gamma$  由广州达博生物馈赠,按常规方法进行扩增保存。

### 1.2 培养基

CD 293 干粉购自 Gibco 公司,细胞级纯水由纯水仪 (Millipore, GER) 制备;添加 4 mmol/L 谷氨酰胺 (Sigma, USA),调节 pH 7.0,经 0.22  $\mu$ m

过滤除菌。

### 1.3 细胞种子扩增

悬浮 293 细胞从液氮中取出快速复苏,37  $^{\circ}$ C,置于摇床培养,120 r/min。经传代逐步放大培养后,接种至 5 L 振荡激流式一次性生物反应器 (AmProtein current bioreactor 10, APCB10),由杭州安普生物提供。

### 1.4 一次性生物反应器培养

反应器配套细胞培养袋、呼吸袋、取样器均购自杭州安普生物。以密度  $3 \times 10^5$ – $6 \times 10^5$  个/mL 接种,温度 37  $^{\circ}$ C,通 CO $_2$  及 0.5 mmol/L NaOH 调节 pH 7.0–7.2,通过自动控制系统通入混合 O $_2$ /N $_2$ /空气控制 DO 40%–50%,起始转速 55 r/min,随培养体积扩大提高至 65 r/min。

每 24 h 取样,计算细胞密度及存活率,测定葡萄糖和乳酸浓度。细胞密度大于  $1 \times 10^6$  个/mL 开始流加培养,流加率 0.6–1 (前 24 h 培养体积的 0.6–1 倍)。经 4–6 d,细胞密度达到  $2 \times 10^6$  个/mL,按 30 MOI 感染 Ad-IFN $\gamma$ ,48 h 后收获感染细胞。加入 3 倍体积细胞裂解液 [Tris 50 mmol/L, MgCl $_2$  2 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, pH 8.0] 重悬冻融裂解,离心得上清粗产品经纯化并于 –80  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.5 阴离子交换层析纯化

采用 50 mLQ XL (GE healthcare, USA) 阴离子交换层析柱纯化病毒。病毒粗产品经核酸酶 (Merck, GER) 处理 1 h,经 0.45  $\mu$ m 过滤澄清后上样,450 mmol/L NaCl 洗脱收获病毒。

### 1.6 检测方法

#### 1.6.1 细胞计数及活力检测

采用血球计数板点样计算细胞密度,台盼蓝

拒染法计算细胞活率,计数3次取平均值。

### 1.6.2 乳酸浓度及葡萄糖浓度测定

乳酸测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;葡萄糖测定试剂盒购自上海荣盛生物药业公司;按说明书进行测定。

### 1.6.3 病毒感染滴度测定

采用壳蛋白免疫法进行感染滴度测定<sup>[13]</sup>。抗壳蛋白抗体、共轭辣根过氧化物酶二抗均由中山大学附属肿瘤医院实验研究部馈赠。

### 1.6.4 纯化病毒产品的纯度检测

产品纯度采用紫外吸收法测  $A_{260}/A_{280}$  比值。

## 2 结果

### 2.1 悬浮 HEK293 细胞种子扩增

细胞复苏体积 15 mL, 摇床转速 120 r/min。

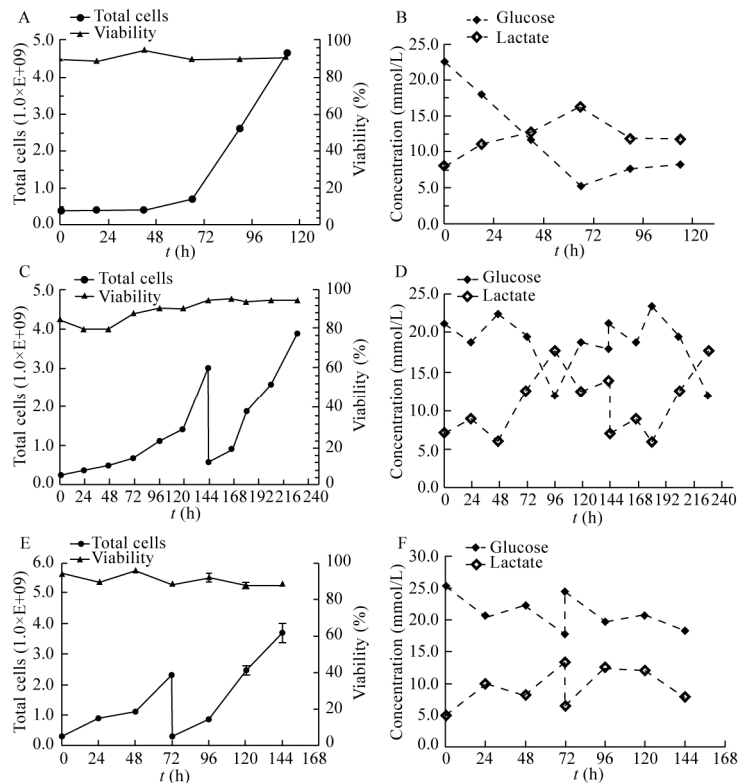


图1 反应器中细胞生长及葡萄糖、乳酸浓度曲线

Fig. 1 Cell growth curve and concentration curve of glucose and lactate of the bioreactor. (A) Cell growth and viability curve of the first trial of inoculating with  $5.0 \times 10^5$  cells/mL. (B) Concentration control of glucose and lactate during the first trial. (C) Cell growth and viability curve of the second trial of inoculating with  $3.0 \times 10^5$  cells/mL. (D) Concentration control of glucose and lactate during the second trial. (E) Cell growth and viability curve of the third trial of inoculating with  $6.5 \times 10^5$  cells/mL. (F) Concentration control of glucose and lactate during the third trial. The black arrows in (C) (E) show that portions of cell culture were inoculated into other bioreactors (data not show) and then the rest were re-inoculated into APCB10.

细胞密度达到  $1 \times 10^6 - 1.5 \times 10^6$  个/mL, 开始传代, 传代密度控制在  $5 \times 10^5 - 7 \times 10^5$  个/mL, 保证了细胞稳定性及倍增时间。建立了一条细胞种子扩增链, 见表1。

表1 摇床培养种子扩增链

Table 1 Seed train process using shaking culture

Culture vessel	Seeded vessels	Total volume (mL)	Day of culture
Vial-T75	1	15	3
T75-T175	1	50	3
T175-T175	2	100	1
T175-T175	4	200	1
T175-T175	8	400	1

### 2.2 5 L 一次性生物反应器悬浮培养 293 细胞

分别以  $5.0 \times 10^5$ 、 $3.0 \times 10^5$ 、 $6.5 \times 10^5$  个/mL 接种

至反应器, 每 24 h 取样, 绘制生长曲线, 如图 1A、

1C、1E。箭头处表示排出部分细胞作其他研究(结果未显示),留部分细胞重新接种。前48 h 细胞生长缓慢,此后进入快速生长期。密度达  $1 \times 10^6$  个/mL (约48–72 h),流加培养,流加率为0.6–1/d,倍增时间约24 h。同时,图1C、1E表明,重新接种细胞直接进入快速生长期。监测葡萄糖和乳酸浓度,见图1B、1D、1F,发现能量充足,乳酸低于20 mmol/L,反映细胞营养供给和代谢抑制因子均在可控水平<sup>[3]</sup>。细胞密度最终达到  $2 \times 10^6$  个/mL 时,加入 Ad-IFN $\gamma$  感染,48 hpi 收获感染细胞。

### 2.3 粗产品感染滴度测定

通过快速测定病毒感染滴度,见表2。结果表明,采用APCB10一次性生物反应器悬浮培养,得到了稳定的Ad-IFN $\gamma$ 产量。

### 2.4 阴离子交换层析

采用Q XL阴离子交换层析法,低盐上样,450 mmol/L NaCl洗脱得到目的峰见图2。经检测病毒滴度回收率35.9%,比活性4%, $A_{260}/A_{280}=1.27$ 。

表2 病毒感染滴度测定结果

Table 2 The production of infective units

	Titer (IFU/mL)	Total titer (IFU)	Capacity (IFU/cell)
1	5.84E+10	6.38E+12	2 200
2	6.41E+10	3.20E+12	1 700
3	2.12E+11	1.49E+13	3 800

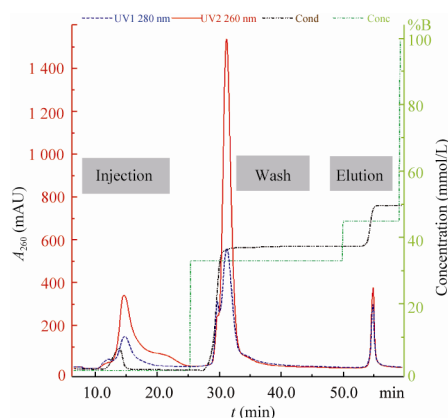


图2 Q XL阴离子交换层析纯化Ad-IFN $\gamma$

Fig. 2 Anion-exchange chromatography of Ad-IFN $\gamma$  lysate.

## 3 讨论

流加培养通过添加新鲜培养基,补充营养,稀释代谢副产物,维持细胞生长。流加培养无需截留器,硬件要求低,操作简便,在哺乳动物细胞大规模培养,特别是在一次性生物反应器中更常见<sup>[14]</sup>。但易受副产物累积制约,影响细胞状态。因此优化培养条件,控制流加时间及流加率极为重要。试验发现,细胞密度在  $1 \times 10^6$ – $1.5 \times 10^6$  个/mL 时,细胞状态良好,流加率为0.6–1/d,能保证细胞快速生长,缩短培养周期。密度增加至一定程度 ( $>1 \times 10^6$  个/mL),会出现“细胞密度效应 (Cell density effect)”<sup>[3,8,15]</sup>。普遍认为与营养耗竭或副产物积累有关,但机制未明。补充营养或者更新培养基效果有限,并导致成本提高<sup>[5,8,16]</sup>。因此,综合考虑成本及可操作性等因素,我们认为在密度  $2 \times 10^6$  个/mL 感染合适。报道指出,腺病毒颗粒单位 (Adenovirus particle unit) 单细胞包装量在  $10^4$ – $10^5$  VP/mL 之间,而其中具有感染能力单位 (Infectious units) 不足十分之一甚至更低<sup>[3]</sup>。我们获得单细胞病毒产量分别是2 200 IFU/cell、1 700 IFU/cell 和 3 800 IFU/cell,与其他工艺相比,具有一定的竞争力。

氯化铯密度梯度离心是经典的腺病毒纯化方法,但不适于规模化生产。人们开发各种高通量纯化工艺,如离子交换、凝胶过滤、扩张床、膜过滤等,以取代氯化铯密度梯度离心<sup>[17–19]</sup>。研究采用Q XL阴离子交换层析,获得了35.9%的整体回收率。腺病毒的纯化因工艺选择有所不同,如Peixoto等采用扩张床层析,获得了32%回收率<sup>[19]</sup>,Eglon等采用阴离子交换+凝胶过滤层析,获得36%回收率<sup>[18]</sup>,Riske等采用膜吸附+凝胶过滤+阴离子交换层析,获得(33±3)%回收率<sup>[20]</sup>,Liang等采用阳离子交换、亲和层析、凝胶过滤层析分别获得了39%、29%和24%回收率<sup>[21]</sup>。腺病毒的纯化受缓冲液选择、澄清方法等因素影响。选择合适的缓冲液能够保证核酸酶活性,降解宿主DNA,降低样品粘度,便于澄清处理,去除细胞杂质及病毒凝集,减少位阻效应,能有效提高病毒回收率<sup>[18]</sup>。因此,筛选缓冲液配方,改进澄清

方法,是腺病毒纯化的关键之一。

一次性(抛弃型)生物反应器是生物制药产业的新热点。反应器配套耗材由经过 FDA 认证的特殊材质制成,安全性高。采用  $\gamma$  射线辐照无菌预处理,摒弃了传统生物反应器繁冗耗能的灭菌程序,保证不同批次生产的物理隔绝。因此,采用一次性生物反应器,能降低生产成本,降低能耗,缩短生产周期,减少交叉污染风险<sup>[9]</sup>。研究选用非搅拌振荡激流式一次性生物反应器生产重组腺病毒,取得了良好效果。

悬浮 HEK293 细胞经种子链扩增以及一次性生物反应器流加培养,温度控制 37 °C, pH 7.1–7.2, DO 40%–50%, 转速 55–65 r/min, 细胞密度提高至  $2 \times 10^6$  个/mL, 病毒粗产率达到 3 800 IFU/cell, 采用阴离子交换层析纯化腺病毒产品,得到 35.9% 的回收率,初步建立了利用 5 L 振荡激流式一次性激流式生物反应器悬浮培养 HEK293 细胞生产 Ad-IFN $\gamma$  的生产工艺,同时为扩大生产规模奠定基础,对其他类型的重组腺病毒产品生产也具有参考意义。

## REFERENCES

- [1] Connelly S. Adenoviral Vectors, in Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2001: 87–107.
- [2] Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trial. [2014–02–2]. <http://www.wiley.com/legacy/wileyc hi/ genmed/clinical/>.
- [3] Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv*, 2003, 20(7/8): 475–489.
- [4] Liu H, Liu XM, Li SC, et al. A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(5): 524–529.
- [5] Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. *J Gene Med*, 2004, 6 Suppl 1: S184–S192.
- [6] Morishita N, Katsuda T, Kubo S, et al. Immobilization of 293 cells using porous support particles for adenovirus vector production. *Cytotechnology*, 2010, 62(4): 293–300.
- [7] Wu S, Huang GY, Liu J. Production of retrovirus and adenovirus vectors for gene therapy: a comparative study using microcarrier and stationary cell culture. *Biotechnol Progr*, 2002, 18(3): 617–622.
- [8] Ferreira TB, Ferreira AL, Carrondo MJ, et al. Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(22): 1809–1813.
- [9] Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, et al. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(1): 41–49.
- [10] Kwon J, Yang Y, Cheon S, et al. Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(9): 2412–2424.
- [11] Sun B, Yu X, Kong W, et al. Production of influenza H1N1 vaccine from MDCK cells using a novel disposable packed-bed bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(3): 1063–1070.
- [12] Thomassen YE, van der Welle JE, van Eikenhorst G, et al. Transfer of an adherent Vero cell culture method between two different rocking motion type bioreactors with respect to cell growth and metabolic rates. *Process Biochem*, 2012, 47(2): 288–296.
- [13] Zhang YL, Liu RY, Ke ML, et al. A hexon immunoassay for titrating recombinant adenovirus. *Chin J Pathophysiol*, 2005, 21(4): 830–832 (in Chinese).  
张艳玲, 刘然义, 柯妙拉, 等. 壳蛋白免疫法测定重组腺病毒滴度的方法学评价. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(4): 830–832.
- [14] Krahe M. Biochemical Engineering, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. CH: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003, 5: 549–617.
- [15] Ferreira TB, Ferreira AL, Carrondo MJ, et al. Effect of re-feed strategies and non-ammoniogenic medium on adenovirus production at high cell densities. *J Biotechnol*, 2005, 119(3): 272–280.
- [16] Henry O, Dormond E, Perrier M, et al. Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86(7): 765–774.
- [17] Lee D, Kim B, Seol D. Improved purification of recombinant adenoviral vector by metal affinity membrane chromatography. *Biochem Bioph Res Co*, 2009, 378(3): 640–644.
- [18] Eglon MN, Duffy AM, O'Brien T, et al. Purification of adenoviral vectors by combined anion exchange and gel filtration chromatography. *J Gene Med*, 2009, 11(11): 978–989.
- [19] Peixoto C, Ferreira TB, Carrondo MJ, et al. Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *J Virol Methods*, 2006, 132(1/2): 121–126.
- [20] Riske F, Berard N, Albee K, et al. Development of a platform process for adenovirus purification that removes human set and nucleolin and provides high purity vector for gene delivery. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 11(3): 848–856.
- [21] Liang Z, Wu J, Huang J, et al. Bioactivity and stability analysis of endostatin purified from fermentation supernatant of 293 cells transfected with Ad/rhEndo. *Protein Express Purif*, 2007, 56(2): 205–211.

(本文责编 陈宏宇)