

# 新品發佈！ HyClone Peak Expression 培養基， 幫助AAV生產效率更上一層樓

隨著基因治療在生物製藥領域的熱度日益升高，重組腺相關病毒載體 (rAAV，例如 rAAV5) 作為基因治療遞送系統已經過廣泛評估。在本文中，Cytiva將展示新品HyClone Peak Expression 細胞培養基的配製方法以及如何在實際應用中提升 rAAV 產量。Cytiva 在 Xcellerex XDR-10 和 XDR-200 生物反應器中採用 HyClone Peak Expression 培養基對該製程的可放大性進行了研究，並與搖瓶培養製程的性能進行比較。結果顯示，HyClone Peak Expression 培養基可以提高 HEK293.2 sus 細胞的生長、存活率和 rAAV 產量。

HyClone Peak Expression 培養基是一款專為培養 HEK293 細胞生產 rAAV 所設計的產品。

該培養基具有以下特徵：

- 無動物源性成分 (ADCF)
- 無血清，無水解物
- 含穩定型穀氨醯胺及泊洛沙姆188
- 支援高密度細胞生長
- 提升轉染效率和病毒包裝能力

## 配製步驟：

1. 室溫條件下 (20°C-25°C) 在潔淨容器中加入終體積90%的細胞培養級純水 (例如配製1 L 的 Peak Expression 液體培養基，在容器中先加入900 mL 純化水)，並開始攪拌。
2. 沿漩渦中心緩慢加入25.17 g/L Peak Expression 乾粉培養基，以避免結團。攪拌20分鐘直至所有乾粉溶解。
3. 緩慢加入2.5 g/L 碳酸氫鈉。攪拌10分鐘直至所有乾粉溶解。
4. 註：此步驟後溶液呈淡黃色，無顆粒。在調節 pH 之前，溶液可能呈輕微渾濁。
5. 用5 N NaOH 或 HCl 逐滴加入，調節 pH 至7.0-7.4。
6. 加入細胞培養級純水，定容至終體積。
7. 測定最終 pH 和滲透壓：pH 須在7.0-7.4之間，滲透壓須在300至340 mOsm/Kg 之間。
8. 使用0.2  $\mu\text{m}$  濾器進行除菌過濾。
9. 2 °C-8 °C 避光保存。

**案例分享：使用 HyClone Peak Expression 培養基提升 rAAV5 的表達以及製程放大**



## 實驗方案

### • 細胞株馴化

使用 HyClone Peak Expression 培養基通過對 HEK 293.2 sus 細胞 (ATCC) 進行直接馴化。種子細胞培養從原培養基中直接接種至 HyClone Peak Expression，接種密度為  $5.0 \times 10^5$  cell/mL。每 3 至 4 天再進行繼代，連續培養 12 代以上，直至細胞的群體倍增時間 (PDT) 達到 24 到 30 小時之間，並且細胞存活率高於 90%。

### • 搖瓶培養

將 HEK293.2 sus 細胞接種於裝有 30 到 50 mL HyClone Peak Expression 培養基的 125 mL 搖瓶中，接種密度為  $0.4 \times 10^6$  cell/mL。在振盪培養箱中以 140 rpm、37 °C 和 5 % CO<sub>2</sub> 的條件進行培養。當細胞計數和存活率下降到一定程度時終止培養。細胞培養按三次重複進行。

### • 病毒增殖和滴度測定

通過三質粒轉染系統對細胞進行轉染。該系統由一個遞送腺病毒基因的 pHelper 質粒、一個 Rep/Cap (複製和衣殼蛋白) 質粒和另一個在末端反向重複序列 (ITR) 之間包含有目標基因 (GOI，在本研究中是指綠色螢光蛋白 [GFP]) 的質粒組成，這三個質粒對於將目標基因包裝到 AAV 衣殼中必不可少。

helper: Rep/Cap: GOI 質粒的比例為 2.0:1.5:1.0。在密度為  $2 \times 10^6$  cell/mL 的培養物中，以 2:1 (PEI 比 DNA) 的比例使用線性化聚乙炔亞胺 (PEI, Polysciences Inc.) 誘導轉染。收穫時間 (TOH) 為轉染後第 4 天，通過微滴式數位 PCR (ddPCR) 檢測綠色螢光蛋白 (GFP) 轉基因盒，從而確定病毒滴度。

採用 100  $\mu$ L 的 10 $\times$  裂解緩衝液 (5 % Tween 20、10 mM 氯化鎂、200 mM Tris，pH 8.0) 和 20 U/mL Turbonuclease 酶在搖床中對大約 900  $\mu$ L 培養物進行處理 (37 °C，持續 4 小時)。將等分試樣以 15000  $\times$  g 離心 10 分鐘，並對粗裂解上清液進行 ddPCR 分析。

## • 生物反應器培養

以  $0.5 \times 10^6$  cell/mL 的密度將 HEK 293.2 sus 細胞接種於裝有 HyClone Peak Expression 培養基的一次性 Xcellerex XDR-10 L 細胞培養袋中，生物反應器的最終批體積為 9 L。使用表 1 中列出的培養參數，在 XDR-10 生物反應器中進行細胞培養。將細胞從搖瓶移到 WAVE 生物反應器 (Xuri 細胞擴增系統 W25) 中，再移到 XDR-200 生物反應器中，以此進行擴增。

Table 1. Bioreactor conditions for scale-up studies

Parameter	XDR-10 bioreactor run	XDR-200 bioreactor run
Culture medium	HyClone™ peak expression medium	HyClone™ peak expression medium
Working volume	9 L	180 L
Impeller speed	120 rpm (up-flow direction)	158 rpm (up-flow direction)
Temperature	37°C	37°C
pH set point	7.3 (controlled by CO <sub>2</sub> and base)	7.3 (controlled by CO <sub>2</sub> and base)
Dissolved oxygen (DO) set point	40% (controlled by oxygen enriched air)	40% (controlled by oxygen enriched air)
O <sub>2</sub> flow	Proportional integral derivative (PID) controlled	PID controlled
CO <sub>2</sub> flow	PID controlled	PID controlled

表 1. 製程放大研究的生物反應器條件

## 結果

### • 細胞株馴化

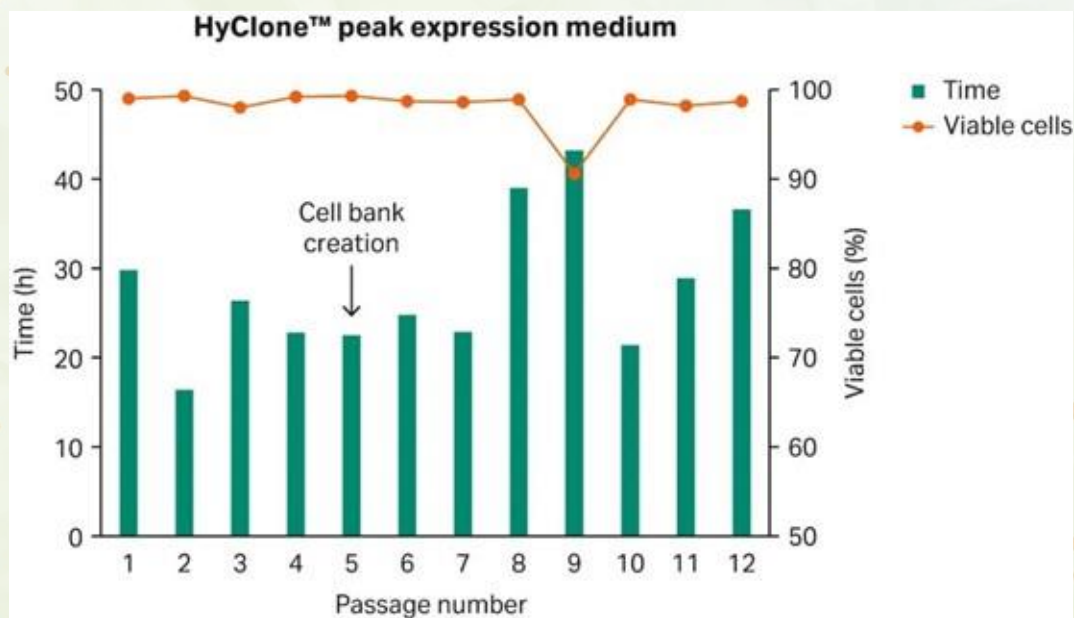


圖 1. 採用 HyClone Peak Expression 培養基直接對 HEK 293 細胞進行馴化。



在連續繼代過程中，我們在搖瓶中用 HyClone Peak Expression 培養基培養了不同代次的細胞，培養時間最長達 13 天 (圖 2)。對 VCD、細胞活力和 PDT 進行全程監測。我們可以從圖 2 中看出，細胞生長密度範圍在  $6.0$  至  $9.0 \times 10^6$  cell/mL 之間。

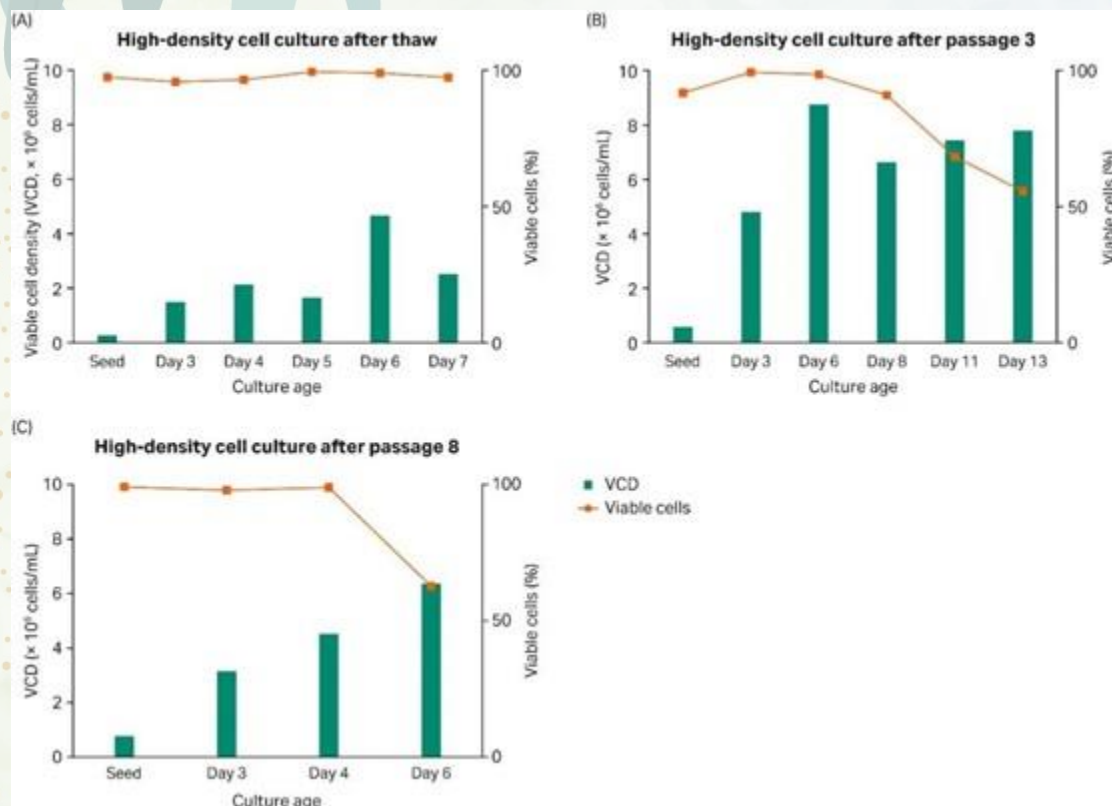


圖 2. 搖瓶規模中的復甦後 (A)，第 3 代 (B) 和第 8 代細胞 (C) 培養。

## 轉染條件

採用三重質粒轉染法對已馴化的 HEK293.2 懸浮細胞進行暫態轉染。在該過程中，線性化聚乙炔亞胺 (PEI) 與 DNA 形成複合物，然後被導入到宿主細胞中。使用綠色螢光蛋白 (rAAV5-GFP) 對搖瓶中的 HEK293.2.sus 細胞進行轉染，質粒的使用量為每  $2 \times 10^6$  個細胞對應  $2 \mu\text{g}$  DNA。

為研究該培養基對 PEI-DNA 複合物穩定性的影響，測試了轉染複合物在 HyClone Peak Expression 培養基中的佔比 (占 rAAV 生產總體積的 5% 或 10%) (圖 3)。每種條件按三次重複在搖瓶中進行實驗。結果顯示佔比為 10% 時，一致性較好，因此在使用 HyClone Peak Expression 培養基的 rAAV 生產實驗中，推薦使用該體積。

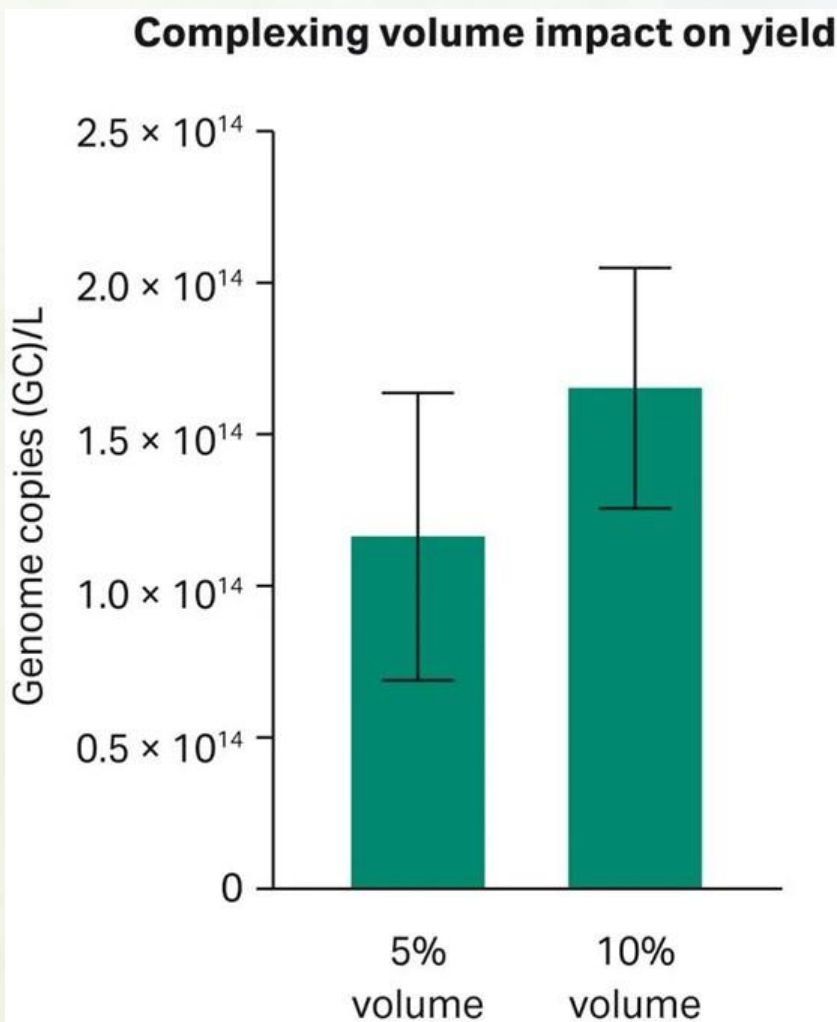


圖 3. 使用 HyClone Peak Expression 培養基比較不同體積 PEI 和 DNA 複合物 (5% 和 10%) 在搖瓶中的轉染收率差異。基因組拷貝數 = GC。



• rAAV產率提升

Cytiva評估了 rAAV5 在兩種不同培養基 (HyClone Peak Expression 培養基和原培養基) 中的產率。滴度測定結果以 GC/L (基因組拷貝數/升) 為單位，對四次重複實驗進行比較。

我們發現與原培養基相比，使用 HyClone Peak Expression 培養基時的滴度 (GC/L) 增長至 4 倍 ( $p < 0.05$ )，如圖 4 所示。使用原培養基時的收獲率 (GC/細胞) 為  $2.6 \times 10^4$  GC/細胞，而在使用 HyClone Peak Expression 培養基的樣品中，我們觀察到收獲率為  $6.8 \times 10^4$  GC/細胞，相當於增長至兩倍多，未顯示相關資料。

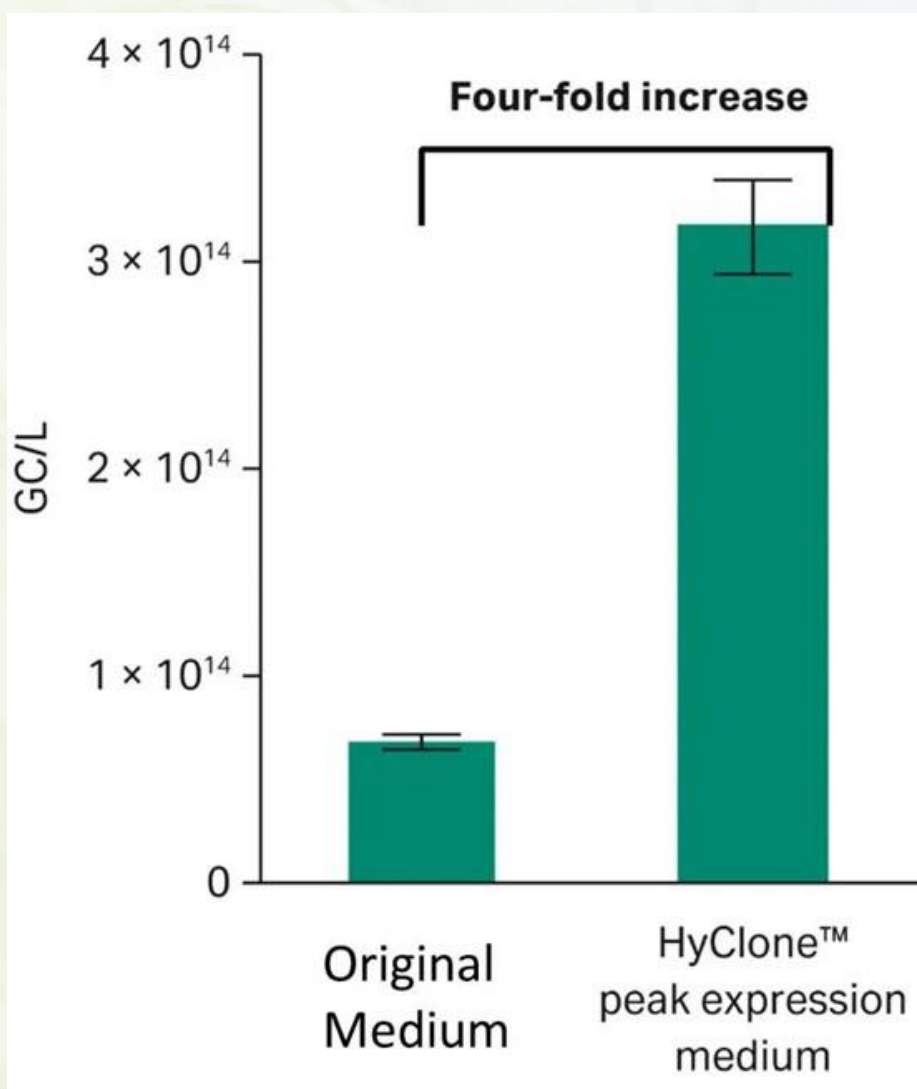


圖 4. 比較 rAAV5-GFP 生產過程中使用 HyClone Peak Expression 培養基和原培養基所獲得的基因組拷貝收率 ( $n = 4, p < 0.01$ )。採用 Student-t 檢驗進行統計學評估。

• 在生物反應器中放大 rAAV5 生產

最後，Cytiva將 rAAV5-GFP 的生產進行了放大，由搖瓶培養改為用 10 L 規格的 Xcellerex XDR-10 生物反應器培養，然後用 200 L 規格的 XDR-200 生物反應器進一步放大培養 (圖 5)。結果顯示，雖然相較與搖瓶培養的產率稍有下降，但總體來說該製程可在 10 L 至 200 L 生物反應器之間進行放大。GFP 的百分比峰值出現在轉染後第 48 小時 (未顯示相關資料)。

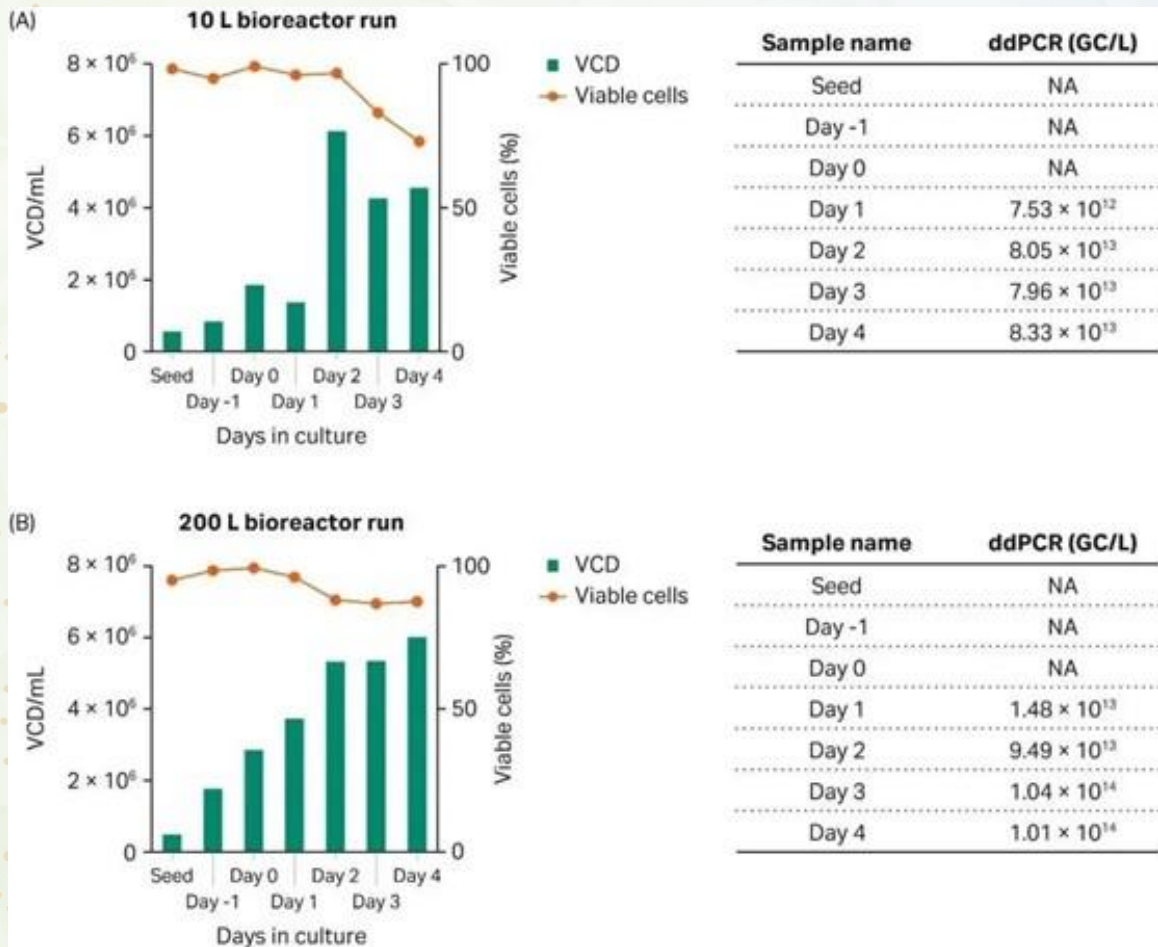


圖 5. 使用 (A) XDR-10 生物反應器在 10 L 培養規格中生產 rAAV5-GFP 生產以及使用 (B) XDR-200 生物反應器在 200 L 培養規格中生產 rAAV5-GFP。



• 培養基中的泊洛沙姆對rAAV產率的影響

為避免聚集，對抗剪切力損傷，並促進懸浮培養的細胞生長，通常在生長培養基中使用泊洛沙姆。儘管收率沒有顯著的統計學差異，我們仍然發現，在 PEI 和 DNA 複合物中未添加 Pluronic F-68 的情況下，rAAV 產率低於  $1.8 \times 10^{14}$  GC/L，反之，rAAV 產率高於  $1.8 \times 10^{14}$  GC/L。(圖 6)。

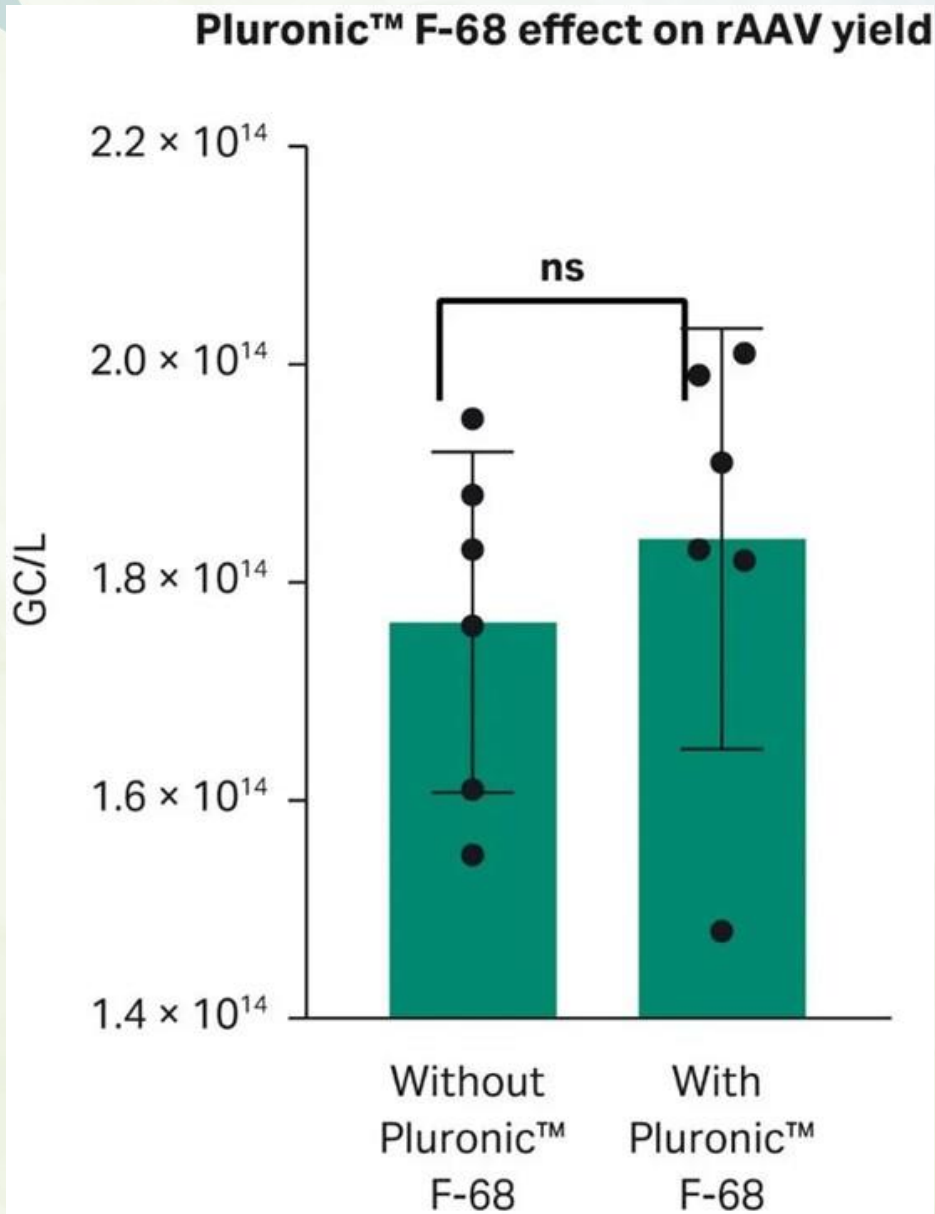


圖6. Pluronic F-68 對 rAAV 病毒滴度的影響。

## 結論

Cytiva對於 HyClone Peak Expression 培養基的觀察結果如下：

- HyClone Peak Expression 培養基具有完整的補料成分，無需額外添加其他培養物料，因而其上游製程簡單而穩健，可重現性更好。
- 細胞經過冷凍保存後復甦良好，培養條件穩定。
- 在搖瓶中的高密度培養可達到  $9.0 \times 10^6$  個細胞，可進行 rAAV 批量生產。
- 採用 HyClone Peak Expression 培養基可以將製程規模從搖瓶放大至 200 L。
- 與原培養基相比，rAAV 收率增長至 4 倍。
- 當占生產體積 10% 時 DNA-PEI 複合物一致性較好。
- 泊洛沙姆對 DNA-PEI 複合物的形成及後續轉染沒有影響。

## 產品規格及貨號：

HyClone peak expression powder medium	5L HDPE bottle	SH31192.01
	10L HDPE bottle	SH31192.02
	50L HDPE bottle	SH31192.03
HyClone peak expression liquid medium	1L bottle	SH31193.01

文章來源：[新品發佈 | HyClone Peak Expression 培養基，助力 AAV 生產效率更上一層樓](#)