GMP级无血清悬浮细胞大规模生产慢病毒的方法

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地涉及GMP级无血清悬浮细胞大规模生产慢病毒的方法。

背景技术

基因治疗(gene therapy)是指将外源治疗性基因导入靶细胞，以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病，或通过外源基因表达的产物作用于疾病靶点，以达到治疗目的。

一类常用的重组慢病载体是以HIV-1(人类免疫缺陷I型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体。与一般的逆转录病毒载体不同，重组慢病载体对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。重组慢病载体因其体内外生物滴度高和免疫原性低等优势，成为CART细胞和基因治疗的首选转基因载体。

成熟的HIV-1病毒直径100～120nm、呈20面体对称结构、球形，电镜下可见一致密圆锥状核心，内有病毒RNA分子和酶，后者包括逆转录酶、整合酶(integrase)和蛋白酶(protease)。HIV-1的最外层为脂蛋白包膜，膜上有表面蛋白(gp120)和相嵌蛋白(gp41)两种糖蛋白，gp120为刺突，gp41为跨膜蛋白。包膜内面为 P17 构成的基质蛋白(matrix)，包膜内为衣壳蛋白(P24)包裹的RNA。

目前的重组慢病毒载体是通过基因改造的方法，使慢病毒基因组中只留下包装信号和目的基因转录元件，而将逆转录酶、包膜蛋白VSVG、gag/pol、rev、tat 等结构或调节基因分散在不同的载体上，同时删除致病基因，从而保证重组慢病毒载体的安全性。

HEK293T是一株来源于人胚胎肾上皮的细胞株，由HEK 293细胞系通过腺病毒E1A基因的转染而获得，能表达SV40的大T抗原、含有SV40复制起始点与启动子区。含有SV40病毒的复制起始位点的真核表达载体可以在HEK 293T细胞中实现高效的复制和转录，从而提高外源基因的表达水平。因此HEK293T细胞广泛应用于慢病毒包装，能获得较高滴度的慢病毒料液。

然而，HEK293T细胞作为慢病毒生产细胞株仍然存在以下缺陷：1)大T抗原存在潜在的致癌风险，下游工艺如果不能很好的对其去除，用于临床治疗存

在一定风险，且大 T 抗原存在一定的免疫原性，会增加临床治疗的难度；2) HEK 293T 是一株贴壁细胞，用细胞工厂或者转瓶生产较难真正实现工业化；3) 贴壁能力较弱，使用微载体技术细胞容易脱落，产毒效能明显降低。

此外，虽然开发了一些基于悬浮细胞来生成慢病毒的技术，但是现有的生产方法仍存在一些不足，例如，不适合大规模生产，难以满足 GMP 生产的严格要求，生产出的病毒效价较低等。

因此，本领域迫切需要开发能够在无血清和悬浮培养培养下，通过包装细胞大规模高效生产慢病毒的方法。

发明内容

本发明的目的就是提供一种在无血清和悬浮培养培养下，通过包装细胞大规模高效生产慢病毒的方法。

在本发明的第一方面，提供了一种无血清悬浮细胞生产慢病毒的方法，包括步骤：

(a) 提供一种用于生产慢病毒的包装细胞的种子液，所述的包装细胞是悬浮生长的包装细胞；

(b) 将所述种子液接种于置于培养容器中的第一培养液中，获得第一培养物，其中，所述的第一培养液是无血清的细胞培养液，并且接种密度为 1×10^6-5×10^6 细胞/ml，并且第一培养液的体积为 3-100 升(较佳地 5-50 升)；

(c) 对所述第一培养物进行包装细胞的传代培养，其中，传代培养的条件设定为在温度为 30~38° C，溶氧为 35~55%，CO_2 浓度为 2~10%和 pH 6.9-7.4 下进行；

(d) 当满足换液触发条件时，启动换液操作，

其中，所述的换液触发条件包括：

(s1) 实时 pH≤6.9，较佳地≤7.0，较佳地≤7.05；

(s2) 通过调控氧气、空气、氮气和/或 CO_2 浓度，实时 pH 值仍呈现下降趋势；和

(s3) 传代培养时间≥72 小时；

其中，所述换液操作包括：将位于所述培养物的无细胞清液从所述培养容器中排出，其中排出清液前所述培养物的体积为 Vq1，而排出清液后所述培养

物的体积为 Vh1，则 Vq1/Vh1 之比为 3-15(较佳地 4-7，更佳地 5-6)；然后，向所述培养容器中补加培养液，形成包装细胞培养物；

(e) 重复步骤(c)和(d) n 次，n 为 1、2、或 3 次；

(f) 当满足转染触发条件时，启动转染操作，

其中，所述的转染触发条件包括：

(t1) 细胞总量为 0.05~2×10^{11}个细胞；

(t2) 细胞密度为 0.5~5×10^{6}个细胞/ml；

(t3) 细胞活率≥90%；和

(t4) 总的培养时间≥72 小时；

其中，所述的转染操作包括：将用于生产所述慢病毒的生产质粒与转染试剂混合后，加入所述培养容器，从而导入所述的包装细胞，形成经转染的包装细胞；

(g) 任选地进行转染后换液；

(h) 对经转染的包装细胞进行培养，其中，培养的条件设定为在温度为 30~37° C，溶氧为 35~55%，CO_2浓度为 2~10%和 pH 6.9-7.4 下进行；

(i) 当满足换液触发条件时，启动收获与换液操作，

其中，所述的换液触发条件包括：

(s1) 实时 pH≤6.9，较佳地≤7.0，较佳地≤7.05；

(s2) 通过调控氧气、空气、氮气和/或 CO_2浓度，实时 pH 值仍下降；和

(s3) 传代培养时间≥72 小时；

其中，所述换液操作包括：将位于所述培养物的无细胞的含病毒的料液进行回收，其中回收料液前所述培养物的体积为 Vq2，而回收清液后所述培养物的体积为 Vh2，则 Vq2/Vh2 之比为 3-15(较佳地 4-7，更佳地 5-6)；

(j) 重复步骤(h)和(i) m 次，m 为 1、2、或 3 次，其中在重复之前，向所述培养容器中补加培养液，形成转染细胞培养物；

(k) 将各次回收的回收液进行合并，获得经合并的含病毒的清液；和

(l) 对所述的经合并的含病毒的清液进行纯化处理，从而得到经纯化的慢病毒载体；

其中，在上述所有步骤中采用的培养液均为无血清的细胞培养液。

在另一优选例中，在步骤(d)中，所述包装细胞培养物的体积 Vb1，且 Vb1:Vq1 之比为（0.8-1.2）：1。

在另一优选例中，在步骤(j)中，所述转染细胞培养物的体积 Vb2，且 Vb2:Vq2 之比为（0.8-1.2）：1。

在另一优选例中，所述的步骤(c)和/或(h)中，在摇动条件下进行培养。

在另一优选例中，所述的摇动条件是摇动速度为 10~30 次来回摆动 (rocks)/min。

在另一优选例中，所述的每次摆动的幅度为 1-20cm，较佳地 5-10cm。

在另一优选例中，在不同步骤中添加的培养液是相同的或不同的培养液。

在另一优选例中，在步骤(c)和/或(h)中，将 pH 维持在 7.0-7.35 之间。

在另一优选例中，在步骤(c)和/或(h)中，将溶氧维持在 30%－50%之间。

在另一优选例中，在步骤(c)和/或(h)中，将 CO_2 浓度维持在 3－5%之间。

在另一优选例中，在步骤(d)和/或(i)中，将 Vq1/Vh1 之比为 5－10。

在另一优选例中，步骤(c)、(d)、和(e)的总时间为 72-216 小时。(转染前)

在另一优选例中，步骤(f)、(g)、(h)、(i)和(j)的总时间为 72-120 小时。(转染后)

在另一优选例中，在步骤(f)中，采用的多质粒转染包括三质粒转染、四质粒转染。

在另一优选例中，所述的四质粒转染是用质粒 CAR、gag/pol、rev、和 VSVG 进行转染。

在另一优选例中，所述的培养容器是一次性培养容器。

在另一优选例中，所述的培养容器的容积为 20-120L，较佳地 30-100L，更佳地为 50-80L。

在另一优选例中，经合并的含病毒的清液中含有的病毒总数为 1×10^{12}Tu。

在另一优选例中，经合并的含病毒的清液中病毒滴度为为 8×10^{7}Tu/ml。

在另一优选例中，所述的包装细胞是人胚胎肾上皮细胞。

在另一优选例中，所述的包装细胞是人胚胎肾上皮细胞 HEK293F 或其衍生细胞。

在另一优选例中，所述的无血清培养基是 LV-MAX™ Production Medium (Gibco™)。

在另一优选例中，在步骤(l)中，所述的纯化包括：超滤和层析。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，通过对生产工艺的探索和工艺参数的筛选，首次开发了一种 GMP 级大规模无血清悬浮细胞慢病毒生产的方法。本发明方法不仅可以适用于 50 升或更大体积的大规模生产，而且极其高效地制备高效价的慢病毒，而且由于全程采用无血清培养条件，因此避免了因使用血清而引入的动物源性蛋白和其它污染物的风险。此外，本发明方法生产的各批次慢病毒之间的波动性极小，从而可以满足 GMP 生产对于生产质量的高要求。在此基础上完成了本发明。

术语

如本文所用，术语“本发明的包装细胞”、“包装细胞 HEK293F”、“本发明的包装细胞 HEK293F”等可互换使用，指本发明第一方面中所述的用于包装和生产慢病毒的细胞。

包装细胞和包装体系

在本发明中，可采用的慢病毒包装体系没有特别限制，优选地，可以采用三质粒和四质粒系统。

一种特别优选的包装系统是采用 HIV-1 来源的慢病毒载体，其中采用四质粒代替三质粒系统，通过敲除 tat 调节基因，并把 gag/pol 和 rev 的携带质粒由一个拆成两个，从而减少了产生复制型病毒的可能性，大大增加载体系统的安全性。

在本发明的优选例中，通过使用四质粒系统进行慢病毒的生产，进一步确保慢病毒产品的安全可靠。

本发明的主要优点包括：

(a) 本发明的细胞为悬浮培养细胞，配合自动控制系统，能进行工艺放大，从而能够大规模化生产重组慢病毒载体料液，使生产成本可控。

(b) 本发明所述的细胞培养工艺采用一次性培养技术，使用无血清、无蛋白成分的培养基，免除了终产品存在异源蛋白和疯牛病病毒污染的风险，极大提高了产品临床应用的安全性，从而用于细胞或基因药品的生产。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

通用方法和材料

培养基：无血清、无蛋白且化学成分明确的培养基。

培养条件：CO_2为 3%~5%；温度为 30~37 摄氏度。

(1) 转染试剂的配置：

a)1×HBS (pH7.4)：将 8.76 g NaCl 溶解于 900 ml 超纯水，加入 20 ml 1 M 的 HEPES，调 pH 值到 7.4，定容至 1 L，过滤(0.2 μm 滤膜)后储存于 4℃备用。

b)称取 125 mg PEI 粉末溶解于 50 ml 1×HBS (pH7.4)中，0.2 μm 滤膜过滤，储存于 4℃备用。

实施例 1

大规模生产慢病毒方法

本发明提供了一种 GMP 级无血清悬浮细胞大规模生产慢病毒的方法。

本发明的方法，包括步骤：

(a) 提供一种用于生产慢病毒的包装细胞的种子液，所述的包装细胞是悬浮生长的包装细胞；

(b) 将所述种子液接种于置于培养容器中的第一培养液中，获得第一培养物，其中，所述的第一培养液是无血清的细胞培养液，并且接种密度为 1×10^6-5×10^6细胞/ml，并且第一培养液的体积为预定的大体积(如 3-100 升)；

(c) 对所述第一培养物进行包装细胞的传代培养，其中，传代培养的条件设定为在温度为 30~38° C，溶氧为 35~55%，CO_2浓度为 2~10%和 pH 6.9-7.4 下

进行；

(d) 当满足换液触发条件时，启动换液操作，

其中，所述换液操作包括：将位于所述培养物的无细胞清液从所述培养容器中排出；然后，向所述培养容器中补加培养液，形成包装细胞培养物；

(e) 重复步骤(c)和(d) n 次，n 为 1、2、或 3 次；

(f) 当满足转染触发条件时，启动转染操作，

其中，所述的转染操作包括：将用于生产所述慢病毒的生产质粒与转染试剂混合后，加入所述培养容器，从而导入所述的包装细胞，形成经转染的包装细胞；

(g) 任选地进行转染后换液；

(h) 对经转染的包装细胞进行培养，其中，培养的条件设定为在温度为 30~37° C，溶氧为 35~55%，CO_2浓度为 2~10%和 pH 6.9-7.4 下进行；

(i) 当满足换液触发条件时，启动收获与换液操作，

其中，所述换液操作包括：将位于所述培养物的无细胞的含病毒的料液进行回收；

(j) 重复步骤(h)和(i) m 次，m 为 1、2、或 3 次，其中在重复之前，向所述培养容器中补加培养液，形成转染细胞培养物；

(k) 将各次回收的回收液进行合并，获得经合并的含病毒的清液；和

(l) 对所述的经合并的含病毒的清液进行纯化处理，从而得到经纯化的慢病毒载体；

其中，在上述所有步骤中采用的培养液均为无血清的细胞培养液。

在本发明中，换液触发条件是经过优化的，有助于减少各生产批次的质量波动，并有助于获得高效价和高产量的医用级的慢病毒。典型地，所述的换液触发条件包括：

(s1) 实时 pH≤6.9，较佳地≤7.0，较佳地≤7.05；

(s2) 通过调控氧气、空气、氮气和/或 CO_2浓度，实时 pH 值仍呈现下降趋势；和

(s3) 传代培养时间≥72 小时；

在本发明中，转染触发条件是经过优化的，有助于减少各生产批次的质量波动，并有助于获得高效价和高产量的医用级的慢病毒。典型地，所述的转染触发条件包括：

(t1) 细胞总量为 0.05~2×10^{11}个细胞；

(t2) 细胞密度为 0.5~5×10^{6}个细胞/ml；

(t3) 细胞活率≥90%；和

(t4) 总的培养时间≥72 小时；

典型地，在本发明的一个具体实施例中，所述方法包括步骤：

种子液的制备；

接种(接种于 25L 培养液)，接种密度 1-5×10^{6}细胞/ml；

包装细胞传代培养（期间通过 pH 和溶氧，自动调控溶 CO_2、氮气、空气的通气比例，以及换液启动模式），控制 pH 在 6.9-7.4，较佳地 7.0-7.3，更佳地 7.1-7.2；

第一次换液(当 pH≤6.9，较佳地≤7.0 可触发换液)，例如 25L →2-10L(较佳地 3-7L)；

补加无血清培养液，继续培养 24-96 小时，较佳地 36-72 小时，更佳地 40-60 小时；培养至 300h 时，细胞数为 5×10^{10}；

加入质粒，对所述包装细胞进行多质粒转染；

任选的步骤：转染后，培养 2-10 小时，较佳地 4-6 小时，再次进行换液(先排放掉一定量的培养混合物，然后加入无血清培养液)；

通用步骤：在转染后，进行继续培养，当 pH≤6.9，较佳地≤7.0 可触发转染后的第一换液，并且在转染后的换液时，将排出的液态培养混合物(无细胞的含病毒的清液)进行回收，记为回收液 R1，保存于 2~8 摄氏度；

换液后，继续培养，并且当触发换液条件时，进行转染后的第 i 次换液，其中 i 为 2、3、4、和 5；每次换液时，回收排出的液态培养混合物无细胞的含病毒的清液，记为回收液 Ri，其中，该步骤重复 1、2 或 3；

将各次回收的回收液进行合并，获得经合并的含病毒的清液；

对所述的经合并的含病毒的清液进行纯化处理，从而得到经纯化的慢病毒载体，滴度为 1×10^{8}-1×10^{9}Tu/mL。

对比例 1

重复实施例 1，不同点在于：初始 pH 为 6.9-7.4，但是传代过程中，不实时监控所述第一培养物的实时 pH 值，而是在 24~96 小时进行传代。

结果：培养至 300h 时，细胞数为 4×10^{9}（少于优选例）。

对比例 2

重复实施例 1，不同点在于：不调节 CO_2 含量。

结果：慢病毒生物滴度为优选例的 20%。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。