

# 悬浮培养 HEK-293 N3S 细胞生产重组腺病毒 Ad-GFP 的实验研究 Producing Recombinant Adenovirus Encoding Green Fluorescent Protein ( Ad-GFP ) by Suspension Cultured HEK-293 N3S Cells

田 博<sup>1</sup> 吴 彬<sup>2\*</sup> 张群伟<sup>2</sup> 毕建进<sup>2</sup> 王 澜<sup>2</sup> 朱宝珍<sup>2</sup> 耿 越<sup>1</sup> 吴祖泽<sup>2</sup>

TIAN Bo<sup>1</sup> , WU Bin<sup>2\*</sup> , ZHANG Qun-Wei<sup>2</sup> , BI Jian-Jin<sup>2</sup> , WANG Lan<sup>2</sup> , ZHU Bao-Zhen<sup>2</sup> , GENG Yue<sup>1</sup>  
and WU Zu-Ze<sup>2</sup>

1 山东师范大学生命科学学院 济南 250014

2 军事医学科学院放射与辐射医学研究所实验血液学实验室 北京 100850

1 Academy of Life Science , Shandong Normal University , Jinan 250014 , China

2 Institute of Radiation Medicine , Academy of Military Medical Science , Beijing 100850 , China

**摘 要** 利用 5L 生物反应器悬浮培养 HEK-293 N3S 细胞生产携带绿色荧光蛋白基因的重组腺病毒( recombinant adenovirus-green fluorescent protein Ad-GFP ) ,为规模化生产腺病毒基因药物建立一种稳定可行的生产工艺。复苏的种子细胞进行逐级放大最后接入 5L 搅拌式生物反应器中 ,采用含 5% 胎牛血清( FBS )的 DMEM/F12 培养基灌流培养 293 N3S 细胞 ,当细胞密度达到  $(2 \sim 4) \times 10^6$  个/mL 时感染 Ad-GFP 48h 后收获细胞 ,经两步氯化铯超速离心获得纯化的 Ad-GFP。采用紫外分光光度计比色法和高压液相色谱法( HPLC )测定病毒颗粒数和纯度 ,采用组织培养半数感染剂量( TCID<sub>50</sub> )法检测腺病毒的感染滴度。连续培养 10 ~ 12d 细胞密度可达到  $(2 \sim 4) \times 10^6$  个/mL 左右 ,纯化的 Ad-GFP 感染滴度和颗粒数分别为  $1.0 \times 10^{11}$  IU/mL 和  $1.68 \times 10^{12}$  VP/mL 比活性为 6.0% , $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.33 ,产品纯度达到 99.2%。建立了 5L 生物反应器悬浮培养 293 N3S 细胞生产重组腺病毒 Ad-GFP 的生产工艺 ,对携带其他基因的重组腺病毒药物生产具有一定的指导意义。

**关键词** 悬浮培养 ,重组腺病毒 ,HEK-293 N3S 细胞 ,生物反应器

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0915-04

**Abstract** Adenovirus vectors are one of the most promising gene transfer systems. They are of great value for gene therapy because these vectors achieve temporal high-level transgene expression and high gene transfer efficiency. To meet increasing needs of adenovirus vectors for gene therapy programs , parallel development of efficient , scalable and reproducible production processes is required. Perfusion cultivation of 293 cells is one of the most commonly used methods to produce adenovirus vectors and it is suitable for industrialized production specially. Experimental studies had been carried out to produce recombinant adenovirus containing the green fluorescent protein gene( Ad-GFP ) by perfusion cultivation of HEK-293 N3S cells in a 5L stirring bioreactors. Perfusion rate was 1 ~ 2 volume/day. To infect the 293 N3S cells with Ad-GFP at the density of  $(2 \sim 4) \times 10^6$  cells/ml. The time of collecting cells was 48 hours post infection. After three rounds of freeze/thaw and centrifugation , the crude viral lysates were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Then to get the Ad-GFP products by  $2 \times \text{CsCl}$ -gradient purification. The purity of the

Received : January 5 , 2007 ; Accepted : March 22 , 2007.

This work was supported by a grant from the Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 863 Program ) ( No. 2001AA217041 ).

\* Corresponding author. Tel : + 86-10-66932202 ; E-mail : wubin63@ yahoo. com. cn

国家高技术研究与发展计划( 863 计划 )项目资助( No. 2001AA217041 ) © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

products was determined by the  $A_{260}/A_{280}$  ratio and a high performance liquid chromatography (HPLC) assay. The infective titer was determined by a TCID<sub>50</sub> assay. The culture term was 10 ~ 12 days. The infectious titer, the number of virus particle and the ratio of infectious titer to virus particle for the product were  $1.0 \times 10^{11}$  IU/mL,  $1.68 \times 10^{12}$  VP/mL and 6.0% IU/VP respectively. The  $A_{260}/A_{280}$  ratio was 1.33, and the purity determined by HPLC was 99.2%. The cell specific productivity was around 1000IU/cell. By perfusion cultivation of 293 N3S cells in a 5L stirring bioreactors, we established the production process for Ad-GFP, which paves a way to produce other recombinant adenovirus for gene therapy.

**Key words** suspension culture, recombinant adenovirus, HEK-293 N3S cells, bioreactor

腺病毒载体 (adenovirus vector, AdV) 作为基因治疗的运载系统近年来发展较快, 目前已经报道 1000 多种基因治疗的临床方案中, 约 26% 是用腺病毒作为载体。AdV 的优点是可以在包装细胞内高滴度复制, 另外, 它是上呼吸道自然存在的温和病毒, 宿主范围广, 可以感染多种分裂期和非分裂期的细胞。各种基因重组腺病毒在抗肿瘤、瘢痕修复、治疗遗传病等方面的研究越来越被人们重视, 基因重组的腺病毒产品在临床前及临床治疗的需求量已经越来越大<sup>[1]</sup>。因此需要设计和建立一种高效且成本低廉的重组腺病毒生产工艺, 生产出足量的符合临床标准的腺病毒基因药物产品。我们采用 HEK-293 N3S 细胞作为重组腺病毒 Ad-GFP 的包装细胞, 研究了在磁力搅拌瓶和 5L 搅拌式生物反应器中用含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (简称 DF) 悬浮培养 293 N3S 细胞生产 Ad-GFP 的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

本实验中使用的 HEK-293 N3S 细胞购自 American Type Culture Collection (ATCC), 293 N3S 是经驯化适应悬浮培养的 HEK-293 亚型。

### 1.2 重组腺病毒

携带绿色荧光蛋白基因的重组腺病毒由美国百特医疗用品公司基因治疗部 (Baxter Healthcare Corp., Gene Therapy Unit) 提供, 我们实验室按常规方法进行扩增、纯化和滴度测定。

### 1.3 培养基

低糖 DMEM 和 F12 为 GIBCO 公司产品, 两种培养基按 1:1 比例配制, 调节 pH 值 7.2 左右, 添加 FBS 至终浓度 5%。

### 1.4 仪器设备

磁力搅拌系统由控制系统和磁力搅拌瓶组成, 型号为 MCS-104L, 分别配备 250mL, 500mL, 1000mL 搅拌瓶各一个, 由英国 Techne 公司生产。Biostat B 5L 生物反应器为 B. Braun Biotech 公司产品, 最大工作体积 4L, 能自动控制温度、pH、转速、溶氧含量。通过气体混合器 (B. Braun Biotech 公司产品) 改变氮

气、氧气、空气和二氧化碳的流量来控制溶解氧和 pH, 采用长 10.4m, 直径 3mm × 3.7mm 薄壁硅胶管无泡气体交换系统, 孔径 75 $\mu$ m 的不锈钢旋转滤器截流细胞颗粒。Waters 高效液相色谱仪。BECKMAN 紫外分光光度计 DU640。

### 1.5 培养条件及方式

采用方瓶 → 磁力搅拌瓶 → 5L 生物反应器逐级放大培养。最后置于 5L 生物反应器中进行灌流培养, 温度为 37 $^{\circ}$ C, pH 为 7.0, 通气速率为 3L/min。细胞接种密度为  $(2 \sim 5) \times 10^5$  个/mL 左右, 接种最初 24h 内不进行灌流, 此后灌流率由细胞密度决定,  $1 \times 10^6$  个/mL 以下采用 1Vol/d (罐体积/天),  $1 \times 10^6$  个/mL ~  $4 \times 10^6$  个/mL 采用 2Vol/d, 期间每 12h 取样测定细胞密度和活力, 观察细胞颗粒形态。当细胞密度达到  $(2 \sim 4) \times 10^6$  个/mL 左右时, 按 20 MOI (multiplicity of infection) 的感染强度加入 Ad-GFP 病毒 48hp (hours post infection) 收获罐内细胞, 反复冻融裂解后纯化或保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用<sup>[2]</sup>。

### 1.6 纯化方法

根据文献[3], 细胞裂解液按照两步氯化铯 (CsCl) 密度梯度超速离心法纯化。把上清液置于 CsCl 不连续梯度液中超速离心, 收集病毒带并加入适量 CsCl 进行第二次梯度离心, 收集病毒带, 透析过夜后即可获得浓缩的纯化腺病毒产品。

### 1.7 检测方法

**1.7.1 细胞计数和活力检测** 采用血球计数板点样计数细胞, 每样计数 3 次取平均值, 用台盼蓝拒染法检测细胞活力。

**1.7.2 病毒产品纯度检测** 病毒产品的纯度测定包括  $A_{260}/A_{280}$  比值、HPLC 纯度和电泳检测。 $A_{260}/A_{280}$  比值和病毒颗粒数测定采用紫外吸收法<sup>[4]</sup>。HPLC 法检测产品纯度, 选定色谱条件为 SOURCE<sup>TM</sup> 15Q (4.6mm × 100mm) 色谱柱, 流动相 A 液: 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0); B 液: 1 mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)。梯度洗脱: A 液 → B 液, 0 → 40min, 流速 0.6mL/min, 检测波长 260nm。取腺病毒产品 100 $\mu$ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按面积归一化

法计算纯度<sup>[5]</sup>。SDS-PAGE 电泳检测腺病毒产品蛋白图谱,上样  $4 \times 10^{10}$  VP,考马斯亮蓝染色。

**1.7.3 病毒感染滴度测定** 采用组织培养半数感染剂量法 (TCID<sub>50</sub>)对培养上清、细胞裂解液和纯化病毒进行感染滴度测定。

## 2 结果

### 2.1 磁力搅拌瓶内的 293 N3S 细胞生长情况

细胞接入磁力搅拌瓶内进行流加培养,接种细胞密度为  $(1 \sim 2) \times 10^5$  个/mL,初始培养体积为 150mL 搅拌速度为 60r/min。此后每 12h 计数细胞密度和细胞活力,绘制细胞生长曲线如图 1,细胞活力都在 98% 以上。当细胞密度达到  $1.6 \times 10^6$  个/mL 时将 150mL 细胞悬液接入生物反应器内。

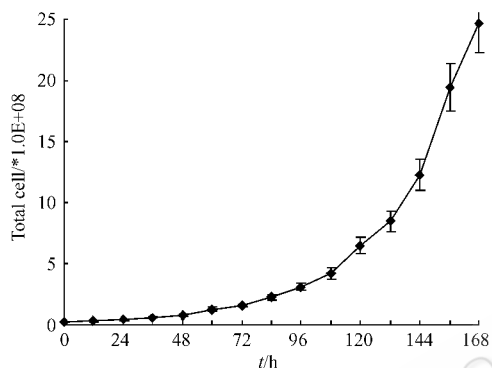


图 1 磁力搅拌瓶细胞生长曲线

Fig. 1 The cell growth curve of the magnetism stirring flask

### 2.2 5L 生物反应器内的 293 N3S 细胞生长情况

5L 生物反应器中的细胞接种密度为  $(2 \sim 5) \times 10^5$  个/mL。每 12h 计数细胞密度并绘制细胞生长曲线如图 2,随细胞密度增大将灌流率从 1Vol/d 加大至 2Vol/d。每天取样测定细胞活力都在 95% 以上。当细胞密度达到  $(2 \sim 4) \times 10^6$  个/mL 时,加入 Ad-GFP 感染细胞,48h 后收获细胞。

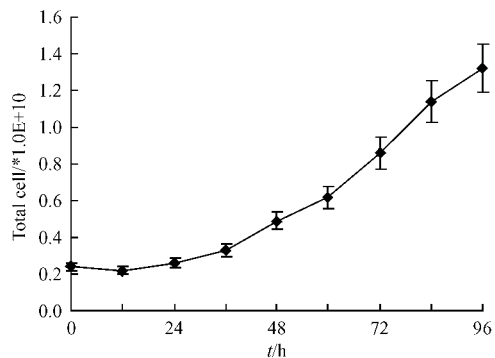


图 2 生物反应器细胞生长曲线

Fig. 2 The cell growth curve of the bioreactor

### 2.3 Ad-GFP 的纯化及纯度测定

经两步 CsCl 超速离心法纯化的病毒产品无色

透明,无肉眼可见杂质。 $A_{260}/A_{280}$  比值,病毒颗粒数(根据计算公式:病毒颗粒数 =  $A_{260} \times$  稀释倍数  $\times 1.1 \times 10^{12}$ )结果见表 1。用 SOURCE 15Q 阴离子色谱柱对产品进行 HPLC 纯度检测。用选定色谱条件进行 HPLC 分析得到的色谱图见图 3。样品主峰保留时间为 29.1min,按面积归一化法计算,产品纯度在 99.2% 以上。SDS-PAGE 电泳图谱见图 4。

表 1 两步 CsCl 梯度离心纯化结果

Table 1 The result of 2 × CsCl-gradient purification

$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	The number of virus particle(VP/mL)
$0.31 \pm 0.04$	$0.23 \pm 0.02$	$1.33 \pm 0.03$	$(1.68 \pm 0.25) \times 10^{12}$

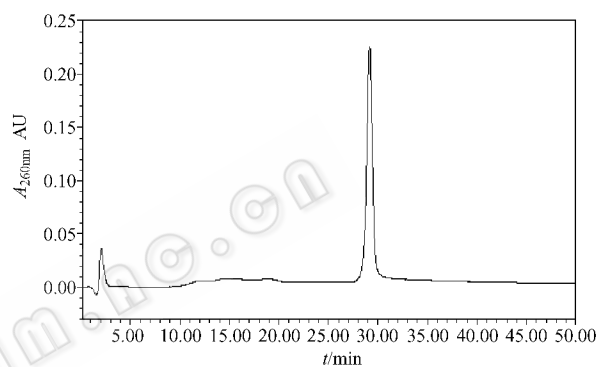


图 3 重组腺病毒产品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of recombinant adenovirus products

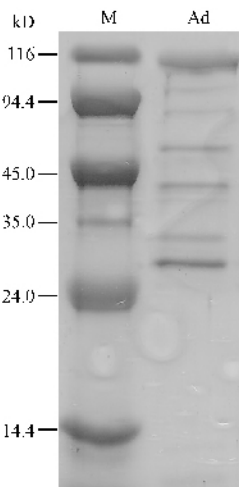


图 4 重组腺病毒产品的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant adenovirus products

M : MW marker ; Ad : Ad-GFP.

Gel was stained with Coomassie Blue.

### 2.4 病毒感染滴度测定

TCID<sub>50</sub>法检测培养上清、细胞裂解液和纯化病毒的感染滴度,结果见表 2。经两步 CsCl 超速离心纯化病毒得率为 54% 左右。比活性 (IU/VP) 为 6.0% 左右。

表 2 病毒感染滴度测定结果  
Table 2 The result of infective titers

Infective titer (IU/mL)	Volume /mL	Total infective titer/IU
Culture supernatants $(4.1 \pm 0.5) \times 10^8$	4000	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^{12}$
Crude viral lysates $(1.2 \pm 0.4) \times 10^{11}$	58 ± 7	$(7.0 \pm 2.0) \times 10^{12}$
Products $(1.0 \pm 0.3) \times 10^{11}$	38 ± 4	$(3.8 \pm 1.1) \times 10^{12}$

### 3 讨论

磁力搅拌瓶采用的流加培养模式不断补充了细胞生长所需的营养成分,同时稀释了代谢副产物(如乳酸和氨)的浓度,使细胞维持在一个相对稳定的环境中,从而达到较好的指数生长。我们经过多次磁力搅拌瓶的细胞培养实验后发现,细胞密度维持在一定范围内( $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  个/mL)时细胞生长速度比较恒定,倍增时间在 24h 左右,细胞状态良好;但当达到  $2 \times 10^6$  个/mL 以上时生长速度降低,细胞状态变差,死细胞聚集呈片状。虽然转瓶培养也能使细胞密度达到  $3 \times 10^6$  个/mL 以上,但细胞状态较差,此时感染病毒产率较低,所以流加培养难以满足大规模培养的要求。

哺乳动物细胞灌流悬浮培养技术是实现高密度培养的有效技术手段之一。连续灌流培养通过不断更换新鲜培养基,提供充足的营养成分且带走代谢产物,同时应用细胞截留装置使细胞保留于生物反应器内,优化了细胞培养环境,从而可达到较高的细胞密度,该技术自 60 年代末发展至今已成为哺乳动物细胞大规模培养的主要方法之一。我们在实验中发现,细胞在接入反应器后的 24h 内,细胞增殖处于停滞状态,其原因有可能是培养条件不同使得细胞生长进入一个适应期,如何优化培养条件使适应期尽量缩短甚至消失还需要进一步研究。细胞在反应器内的生长速度比在磁力瓶内略微低一些,细胞总数 24h 增加不到一倍。只有选择合适的灌流率才能既维持细胞最快生长速度又能降低成本,我们认为细胞密度在  $1 \times 10^6$  个/mL 以下采用 1Vol/d,  $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  个/mL 采用 2Vol/d, 此灌流率较为合适。

细胞密度增加而病毒产量反而降低,即所谓的“细胞密度效应”。这种现象严重影响了腺病毒的产量,其详细机制目前尚未完全明了。人们普遍认为,细胞密度效应的形成是受多种因素影响的,如营养成分的耗竭和代谢产物的累积等<sup>[6]</sup>。采用合适的补加培养基方法可以部分减轻细胞密度效应的影响,我们认为细胞密度在  $3 \times 10^6$  个/mL 时感染,之后再以 2Vol/d 灌流 24h,这样腺病毒的产量相对较高。感染收获时间也是决定产量的重要因素。如果过早收集细胞,病毒尚处于复制阶段,没有达到最大复制量;

如果收集太迟,则病毒持续复制就会使细胞裂解进而释放到培养上清中给纯化带来一定的困难,因此选择合适的收获时间也是一个重要环节。国内外文献报道大部分收获时间是 48hpi,此时收获细胞产率较高,因此我们也选择了这个时间点进行收获<sup>[7]</sup>。

两步氯化铯密度梯度超速离心法是重组腺病毒纯化的传统方法,此方法是生产小量临床级产品的有效方法,但随着基因治疗时代的到来,对重组腺病毒药物的需求量越来越大,氯化铯纯化方法无法满足商业化生产的要求,所以人们不断地研发一种可用于大规模生产的腺病毒分离纯化工艺,如离子交换、金属螯合、凝胶过滤等,以替代传统的氯化铯纯化方法<sup>[8]</sup>。

我们经过磁力搅拌瓶的流加培养和生物反应器的灌流培养,将细胞密度提高到  $3 \times 10^6$  个/mL,此时感染后病毒产率约 1 000IU/cell;经氯化铯超速离心纯化获得了较高滴度的腺病毒产品,建立了 5L 生物反应器悬浮培养 293N3S 细胞生产 Ad-GFP 的生产工艺,为进一步扩大生产规模奠定了基础,对生产其它重组腺病毒基因药物也具有一定的指导意义。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Isabelle Nadeau, Amine Kamen. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnology Advances*, 2003, **20**: 475–489.
- [2] Valerie C, Jules T, Danielle J, et al. High-titer adenovirus vector production in 293S cell perfusion culture. *Biotechnology Progress*, 2004, **20**: 858–863.
- [3] Ha XQ(哈小琴), Wang L(王澜), Wu B(吴彬), et al. Preparation and construction of a recombinant adenovirus carrying human hepatocyte growth factor gene. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, **12**(2): 71–75.
- [4] Zhang XX(张晓志), Lin H(林鸿), Yang XY(杨晓燕), et al. Quality control of clinical grade recombinant adenovirus used in gene therapy. *National Medical Journal of China(中华医学杂志)*, 2004, **84**(10): 849–852.
- [5] Li YH(李永红), Rao CM(饶春明), Zhao Y(赵阳), et al. Study of requirements for quality control of recombinant adenovirus-mediated human endostatin. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy(中国肿瘤生物治疗杂志)*, 2005, **12**(2): 138–142.
- [6] Ferreira TB, Ferreira AL, Carrondo MJ, et al. Effect of refeed strategies and non-ammonogenic medium on adenovirus production at high cell densities. *Journal of Biotechnology*, 2005, **29**(1): 1–9.
- [7] Green AP, Huang JJ, Scott MO, et al. A new scalable method for the purification of recombinant adenovirus vectors. *Human Gene Therapy*, 2002, **13**(16): 1921–1934.
- [8] Huygues BG, Liu X, Sutjipto S. Purification of type 5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography. *Human Gene Therapy*, 1995, **6**: 1403–1416.