

· 工业生物技术 ·

高渗胁迫和灌流培养策略提高 HEK 293 细胞生产重组腺病毒载体产量

张卓曦^{1,2,3}, 白仲虎^{1,2,3}, 刘光胤^{1,2,3}, 聂简琪^{1,2,3}, 杨艳坤^{1,2,3*}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

张卓曦, 白仲虎, 刘光胤, 聂简琪, 杨艳坤. 高渗胁迫和灌流培养策略提高 HEK 293 细胞生产重组腺病毒载体产量[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3364-3378.

ZHANG Zhuoxi, BAI Zhonghu, LIU Guangyin, NIE Jianqi, YANG Yankun. Hyperosmotic stress and perfusion culture strategies increase the yield of recombinant adenoviral vector produced by HEK 293 cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3364-3378.

摘要: 由于各种疾病在全球范围内的肆虐, 国际市场对重组腺病毒载体(adenoviral vector, Adv)疫苗的需求量急剧增加, 而工艺研究是解决这一问题的有效手段之一。在细胞接毒前施加高渗胁迫可以提高分批培养模式下的 Adv 产量, 新兴的灌流培养也可以显著提高 Adv 的产量。将高渗胁迫工艺与灌流培养相结合, 有望进一步提升高细胞密度生产过程中的 Adv 产量。本研究利用摇瓶结合拟灌流培养作为生物反应器灌流培养的缩小模型, 使用渗透压为 300–405 mOsm 的培养基研究了高渗胁迫对细胞生长和 Adv 生产的影响。结果显示, 在细胞生长阶段使用 370 mOsm 的高渗透压培养基, 在病毒生产阶段使用 300 mOsm 的等渗透压培养基的灌流培养工艺有效地提高了 Adv 的产量。进一步研究发现这可能归因于病毒复制后期 HSP70 蛋白的表达量增加。将这种工艺放大至生物反应器中, Adv 的产量达到 3.2×10^{10} IFU/mL, 是传统灌流培养工艺的 3 倍。本研究首次将高渗胁迫工艺与灌流培养相结合的策略应用于 HEK 293 细胞生产 Adv, 同时揭示了高渗胁迫工艺增产 Adv 的可能原因, 为 HEK 293 细胞生产其他类型 Adv 的工艺优化提供了借鉴。

关键词: 高渗胁迫; 灌流培养; HEK 293 细胞; 腺病毒载体

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900804); 国家自然科学基金(22108100); 江苏省自然科学基金(BK20210472)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900804), the National Natural Science Foundation of China (22108100), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210472).

*Corresponding author. E-mail: yangyankun@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-02-27; Accepted: 2023-04-06; Published online: 2023-04-20

Hyperosmotic stress and perfusion culture strategies increase the yield of recombinant adenoviral vector produced by HEK 293 cells

ZHANG Zhuoxi^{1,2,3}, BAI Zhonghu^{1,2,3}, LIU Guangyin^{1,2,3}, NIE Jianqi^{1,2,3}, YANG Yankun^{1,2,3*}

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: With various diseases ravaging internationally, the demands for recombinant adenoviral vector (Adv) vaccines have increased dramatically. To meet the demand for Adv vaccine, development of a new cell culture process is an effective strategy. Applying hyperosmotic stress in cells before virus infection could increase the yield of Adv in batch culture mode. Emerging perfusion culture can significantly increase the yield of Adv as well. Therefore, combining the hyperosmotic stress process with perfusion culture is expected to improve the yield of Adv at high cell density. In this study, a shake flask combined with a semi-perfusion culture was used as a scaled-down model for bioreactor perfusion culture. Media with osmotic pressure ranging from 300 to 405 mOsm were used to study the effect of hyperosmotic stress on cell growth and Adv production. The results showed that using a perfusion culture process with a hyperosmotic pressure medium (370 mOsm) during the cell growth phase and an isosmotic pressure medium (300 mOsm) during the virus production phase effectively increased the yield of Adv. This might be due to the increased expression of HSP70 protein during the late phases of virus replication. The Adv titer in a bioreactor with such a process reached 3.2×10^{10} IFU/mL, three times higher than that of the traditional perfusion culture process. More importantly, this is the first time that a strategy of combining the hyperosmotic stress process with perfusion culture is applied to the production of Adv in HEK 293 cells. It also reveals the reason why the hyperosmotic stress process increased the yield of Adv, which may facilitate the process optimization of for producing other Adv in HEK 293 cells.

Keywords: hyperosmotic stress; perfusion culture; HEK 293 cells; adenovirus vector

腺病毒是一种无包膜病毒, 拥有二十面体的外壳和双链 DNA, 大小通常在 80–100 nm^[1]。重组腺病毒载体(adenoviral vector, Adv)由于其高效的核进入机制和较低的人类致病性而被广泛应用于疫苗开发和免疫治疗^[2-3]。HEK 293 细胞是生产重组病毒载体的主要宿主细胞系之一, 用于 Adv 或腺相关病毒(adenovirus-associated

virus, AAV)的生产^[4]。由于目前国际市场对重组 Adv 疫苗的需求量日渐增加, 因此迫切需要一种高效、稳定、低成本的重组 Adv 生产工艺^[5]。

灌流培养(perfusion culture)已经被广泛应用于 HEK 293 细胞的 Adv 生产^[6-7], 可以显著提高 Adv 的单位体积产量, 因此已应用取代传统的

分批和补料-分批培养^[8-9]。通过补料-分批培养进行高细胞密度接毒会导致“细胞密度效应”，即高细胞密度会导致单细胞的病毒生产率显著降低，从而影响病毒总产量。产生“细胞密度效应”的主要原因是代谢副产物的积累和营养物质的损耗^[10-11]，但灌流培养可以保证整个培养过程中的高营养物质水平和低代谢副产物水平，进而克服“细胞密度效应”，在高细胞密度接毒的情况下获得更高的病毒总产量^[12-14]。交替式切向流过滤(alternating tangential flow filtration, ATF)系统是目前灌流培养工艺中常用的细胞截留装置，具有剪切力低、细胞存活率高和易于放大等优点，是实施灌流培养的核心模块^[15-16]。

高渗胁迫可以通过在培养基中加入 NaCl 来实现，进而影响哺乳动物细胞的生长、代谢和生产^[17-19]。哺乳动物细胞长期暴露在高渗透压环境下，会产生一系列的反应，如细胞膜扩张、膜转运蛋白表达增加、相关物质的代谢速率改变、细胞的生长速率和细胞活率下降等^[20-21]。在生产阶段施加高渗胁迫已被用于提高中国仓鼠卵巢巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞、GS-NS0 小鼠骨髓瘤细胞和一些杂交瘤细胞的单细胞抗体产量^[22-26]。然而，高渗胁迫加速了生产阶段的细胞死亡，总产量并没有随着单细胞抗体产量的提升而显著提升。有文献报道在细胞感染后 8-16 h 施加高渗胁迫可以增加 AAV 的产量^[27]，而在细胞生长和病毒生产阶段均施加高渗胁迫则会严重抑制 HEK 293 细胞的生长和 Adv 的生产^[2]。但是，在细胞生长阶段施加适当的高渗胁迫而在接毒后移除，则可以增加分批培养模式下的 Adv 产量^[28]。

近年，已有报道在 HEK 293 细胞接毒前后施加不同强度的高渗胁迫来提高 Adv 产量的研究，但是这种方法仍然受到分批培养模式的限制，其 Adv 产量仅是传统分批培养的 2-3 倍^[28]，

而只使用灌流培养已将 Adv 产量提高到传统分批培养的 6-8 倍^[12]。因此，将高渗胁迫工艺与灌流培养相结合有望提高 Adv 产量到更高水平。

本文采用摇瓶培养结合生物反应器灌流培养的模式研究提高 HEK 293 细胞生产重组 Adv 产量的策略。即使用含有不同浓度 NaCl 的培养基，分别研究高渗胁迫对细胞生长和 Adv 生产的影响，通过表征高渗胁迫对 HEK 293 细胞的状态参数(细胞生长速率、细胞活率、细胞形态、细胞代谢和 HSP70 蛋白表达等)和 Adv 生产参数(病毒侵染效率、病毒颗粒浓度和病毒滴度等)的影响，提出了渗透压影响 Adv 产量的可能原因。最后，将摇瓶水平确定的最佳高渗胁迫工艺放大至带有灌流系统的 3 L 生物反应器中培养，Adv 产量达到 3.2×10^{10} IFU/mL，显著提高了 Adv 的生产水平。

1 材料与方法

1.1 细胞系和病毒

无血清 HEK 293 悬浮培养细胞来源于实验室种子库，重组 Adv 来源于实验室毒种库。

1.2 培养基

HEK 293 培养基(cat. no. JN293HEK, OPM)为实验室定制。此培养基的基础渗透压为 300 mOsm，经过高浓度无菌 NaCl 溶液调节后可达到 335、370 和 405 mOsm。

1.3 细胞传代

对培养 4 d 的 HEK 293 细胞取样计数，依照细胞计数结果，用 125 mL 一次性带挡板三角摇瓶，按活细胞密度 3.0×10^5 cells/mL、培养体积 40 mL 进行接种，随后将摇瓶置于 37 °C、5% CO₂、125 r/min 带固定摇床的二氧化碳培养箱中培养，每 4 天传代 1 次。

1.4 细胞拟灌流培养

将在相应渗透压培养基中经过 3 次及以上

传代适应的 HEK 293 细胞以 3.0×10^5 cells/mL 的活细胞密度接种到摇瓶中, 经过 4 d 的分批培养后, 转变为拟灌流培养。拟灌流培养的方法如下: 将摇瓶中的培养基转移到离心管中, 800 r/min 离心 5 min, 弃去无细胞上清液, 用等体积的新鲜培养基重悬细胞, 并将重悬液转移回摇瓶中继续培养。每天 1 次(1 RV/d)或每天 2 次(2 RV/d)拟灌流培养。在细胞接毒前, 选择 1 RV/d 的拟灌流速度。在培养过程中定期取样, 用于细胞计数及营养物质(葡萄糖、谷氨酰胺)和代谢副产物(乳酸、铵根离子)的浓度检测。

1.5 细胞接毒后培养

当活细胞密度达到 1.3×10^7 cells/mL 左右时, 800 r/min 离心 5 min, 随后将细胞重悬在相同或不同渗透压的新鲜培养基中, 调整活细胞密度至 1.3×10^7 cells/mL, 并以 3.6 IFU/cell 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)进行细胞的 Adv 接毒(整个研究都使用 3.6 IFU/cell 的 MOI), 在 53.3 hpi (病毒感染后小时数, hours post-infection)收获。对接毒后的细胞进行 2 RV/d 的拟灌流培养。在 0、3、24 和 53.3 hpi 取样, 检测病毒滴度、病毒颗粒浓度以及胞内 HSP70 蛋白的表达情况。

1.6 生物反应器灌流培养

最佳高渗胁迫工艺: HEK 293 细胞使用 3 L 生物反应器(Applikon)进行培养, 培养体积为 2 L, 接种密度为 3.0×10^5 cells/mL, 培养基渗透压为 370 mOsm, 温度为 37 °C, pH 值为 7.15, 转速为 120 r/min, 溶解氧为 40%空气饱和度。使用 ATF 系统(Repligen)和孔径为 0.2 μm 、过滤面积为 0.13 m^2 的中空纤维柱(Repligen)进行灌流。利用一个双泵头蠕动泵(Masterflex)来实现新鲜培养基的连续补加和无细胞旧培养基的连续移除。灌流于 3.5 d 开启, ATF 的流速设定为 0.7 L/min, 灌流培养基与接种培养基保持一

致。灌流速度保持在 1 RV/d, 当活细胞密度达到 9.0×10^6 cells/mL 时, 改为 2 RV/d。当活细胞密度达到约 1.4×10^7 cells/mL 时, 将灌流培养基切换为 300 mOsm 培养基, 并以 15–20 RV/d 的灌流速度快速换液 5 h。随后停止灌流, 在进行接毒的同时将活细胞密度调整至 1.3×10^7 cells/mL。在 3 hpi 选用 300 mOsm 培养基恢复 2 RV/d 的灌流, 并于 53.3 hpi 收获。

传统灌流培养工艺: 在生产全程均选用 300 mOsm 培养基, 并在接毒前补充一定量的谷氨酰胺, 以保证细胞接毒后的谷氨酰胺供应, 此外, 其他工艺参数的选择均与最佳高渗胁迫工艺保持一致。

每天取样检测活细胞密度、细胞活率、营养物质(葡萄糖、谷氨酰胺)和代谢副产物(乳酸、铵根离子)浓度、渗透压和病毒滴度。

1.7 Western blotting

使用 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解离心的细胞颗粒。用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白样品浓度。蛋白样品被稀释到相同的蛋白浓度, 并与上样缓冲液混合煮沸, 随后储存在 -80 °C 备用。利用 10%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)以相同的上样量分离蛋白质。电泳后, SDS 凝胶可以用考马斯亮蓝染色, 进行灰度分析后可以实现总蛋白的归一化定量, 或者将 SDS 凝胶内分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上进行 Western blotting。特异性一抗是 HSP70 protein monoclonal antibody (cat. no. 66183-1-Ig, protein teach), 二抗是 Goat anti-Mouse IgG (H+L) and HRP (FMS-MS01, FcMACS), 选择 Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)进行化学发光。

1.8 细胞分析方法

活细胞密度、活细胞直径和细胞活率由 VI-CELL BLU (Beckman coulter)测定。

为了确定在传代适应过程中细胞扩增倍数的稳定趋势, 设定传代稳定性系数 (passing stability coefficient, PSC) 为细胞扩增稳定的指标。连续多代的低 PSC 意味着细胞已经适应了相应的培养基, 并可以稳定地生长。PSC 的计算方法如下:

$$PSC_n = \sqrt{(P_n - P_{Ave})^2} / P_{Ave} \times 100\%$$

其中 PSC_n 为第 n 代的 PSC, P_n 为第 n 代的扩增倍数, P_{Ave} 为细胞在传代全程的平均扩增倍数。

1.9 比消耗速率和比生成速率的计算

使用 BioProfile Flex2 Analyzer (Nova Biomedical) 测量培养基上清液中的葡萄糖、谷氨酰胺、铵根离子、乳酸和 Na^+ 浓度。

拟灌流过程中的比消耗速率和比生成速率是通过一定时间段内的平均活细胞密度和相应物质的浓度变化量来计算的。计算方法如下:

$$dS / dt = -q_s X$$

$$dP / dt = q_p X$$

其中 X 是活细胞密度, q_s 和 q_p 是比消耗速率和比生成速率, S 是培养基中的营养物质浓度, P 是培养基中的代谢副产物浓度。

1.10 Adv 滴度和病毒颗粒浓度的检测

使用 QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kit (Cell BioLabs) 检测 Adv 的病毒滴度, Adv 滴度通常用感染单元 (infectious units, IFU) 来表示。

在接毒后, Adv 的侵染通常在 3 hpi 达到饱和, 因此通常利用 3 hpi 上清液中的病毒滴度来计算病毒侵染效率, Adv 在 3 hpi 的病毒侵染效率的计算公式如下:

$$VIE = 1 - VT_{3hpi} / (MOI \times VCI)$$

其中 VIE 是病毒侵染效率, MOI 是感染复数, VCI 是接毒时刻的活细胞密度, $VT_{3 hpi}$ 是 3 hpi 无细胞上清液中的病毒滴度。

病毒颗粒浓度由 Adv 外壳蛋白浓度换算而来, 通常以 VP/mL 为单位, 通过间接酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法测定, 所使用的抗体与病毒滴度检测相同。

1.11 统计学分析

利用 IBM SPSS Statistics 进行实验数据分析。 t 检验被用于比较各实验组间差异的显著性, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HEK 293 细胞适应高渗透压培养基的最佳传代次数

为了确定 HEK 293 细胞适应高渗透压培养基的最佳传代次数, 将在等渗透压培养基 (300 mOsm) 中培养的 HEK 293 细胞分别转移到 335、370 和 405 mOsm 培养基中, 并连续传代 8 次。在高渗透压培养基 (335 mOsm 和 370 mOsm) 中, 细胞的 PSC 随着传代次数的增加逐步降低, 在 3-4 次传代后稳定在 5% 左右 (图 1A)。在等渗透压培养基 (300 mOsm) 中, PSC 一直维持在 5% 左右。然而, 在 405 mOsm 培养基的细胞传代过程中, 细胞扩增倍数持续波动, 没有呈现出稳定的趋势 (数据未展示)。在同一代次中, 活细胞直径随着培养基渗透压的增加而增加 (图 1B)。长期暴露在高渗环境下的活细胞直径增加与先前文献中报道的结果一致^[20]。

上述实验结果表明, HEK 293 细胞于 335 mOsm 和 370 mOsm 培养基中至少要进行 3 次传代适应, 细胞生长才能趋于稳定, 并且细胞无法适应 405 mOsm 培养基。因此, 后续研究均使用在相应渗透压培养基中经过 3 次及以上传代适应的细胞。

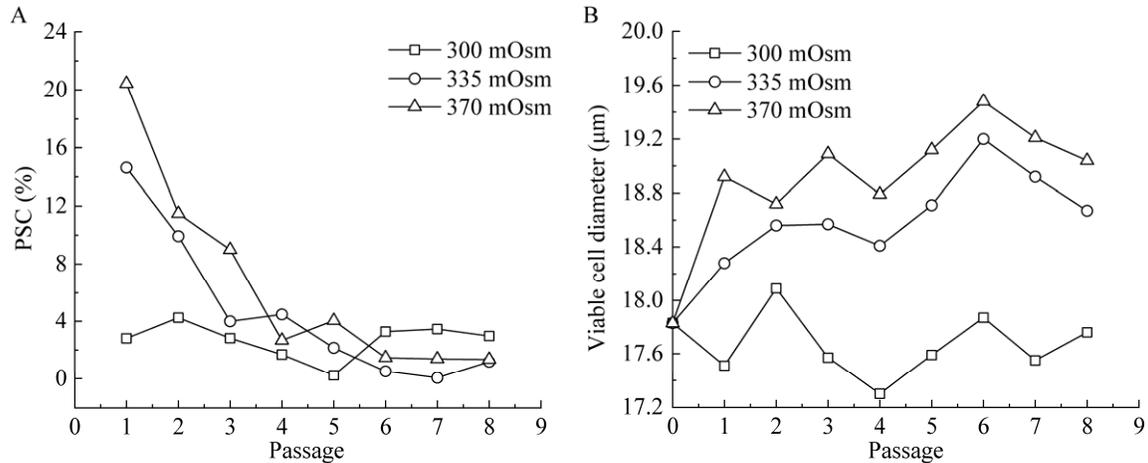


图 1 HEK 293 细胞在 300、335 和 370 mOsm 培养基中连续传代的细胞参数变化 A: PSC. B: 活细胞直径

Figure 1 Changes in cell parameters of HEK 293 cells in successive passages grown in 300, 335, and 370 mOsm media. A: PSC. B: Viable cell diameter.

2.2 高渗胁迫下的 HEK 293 细胞拟灌流培养

为研究高渗胁迫对细胞拟灌流培养的影响,使用 300、335、370 和 405 mOsm 培养基对 HEK 293 细胞进行为期 9 d 的拟灌流培养。从第 4 天开始,随着拟灌流的推进,300、335 和 370 mOsm 培养基中的活细胞密度迅速增加,在第 9 天达到 2.5×10^7 cells/mL 左右,且细胞生长速率受到培养基渗透压的影响较小(图 2A)。405 mOsm 培养基中的细胞扩增在 6 d 停滞,随后活细胞密度在 3.7×10^6 cells/mL 附近波动。300、335 和 370 mOsm 培养基中的细胞活率一直维持在 90% 以上,405 mOsm 培养基中的细胞活率在 80%–90% 之间波动(图 2B)。

300、335 和 370 mOsm 培养基中细胞的营养物质(葡萄糖、谷氨酰胺)比消耗速率和代谢副产物(乳酸、铵根离子)比生成速率随着时间的推移呈现出相同的趋势:细胞的代谢强度随着分批培养阶段向拟灌流培养阶段的转变而增强,之后随着拟灌流培养的进行逐渐降低(图 2C–2F)。对于在 300、335 和 370 mOsm 培养基中的细胞,乳酸比生成速率和葡萄糖比

消耗速率受培养基渗透压的影响较小(图 2C、2D),谷氨酰胺比消耗速率不受培养基渗透压的影响(图 2E),铵根离子比生成速率随着培养基渗透压的增加而大幅增加(图 2F),细胞在 370 mOsm 培养基中的铵根离子比生成速率在培养过程中与 300 mOsm 培养基相比一直存在 55%–389% 的提升。由于谷氨酰胺的代谢速率并没有受到显著影响,且细胞在 300–370 mOsm 培养基中生长稳定,因此铵根离子的比生成速率提升可能源于谷氨酰胺外的某些氨基酸的消耗速率提升。

上述实验结果表明,335 mOsm 和 370 mOsm 的高渗胁迫会大幅增加铵根离子比生成速率,但是对细胞的增殖和其他物质的代谢强度仅有较小的影响,并且在拟灌流的条件下可以实现高细胞密度培养。细胞无法在 405 mOsm 的高渗胁迫下正常生长代谢,并且无法实现高细胞密度培养。因此在后续的研究中,在接毒前的细胞生长阶段仅选用 300、335 和 370 mOsm 培养基。

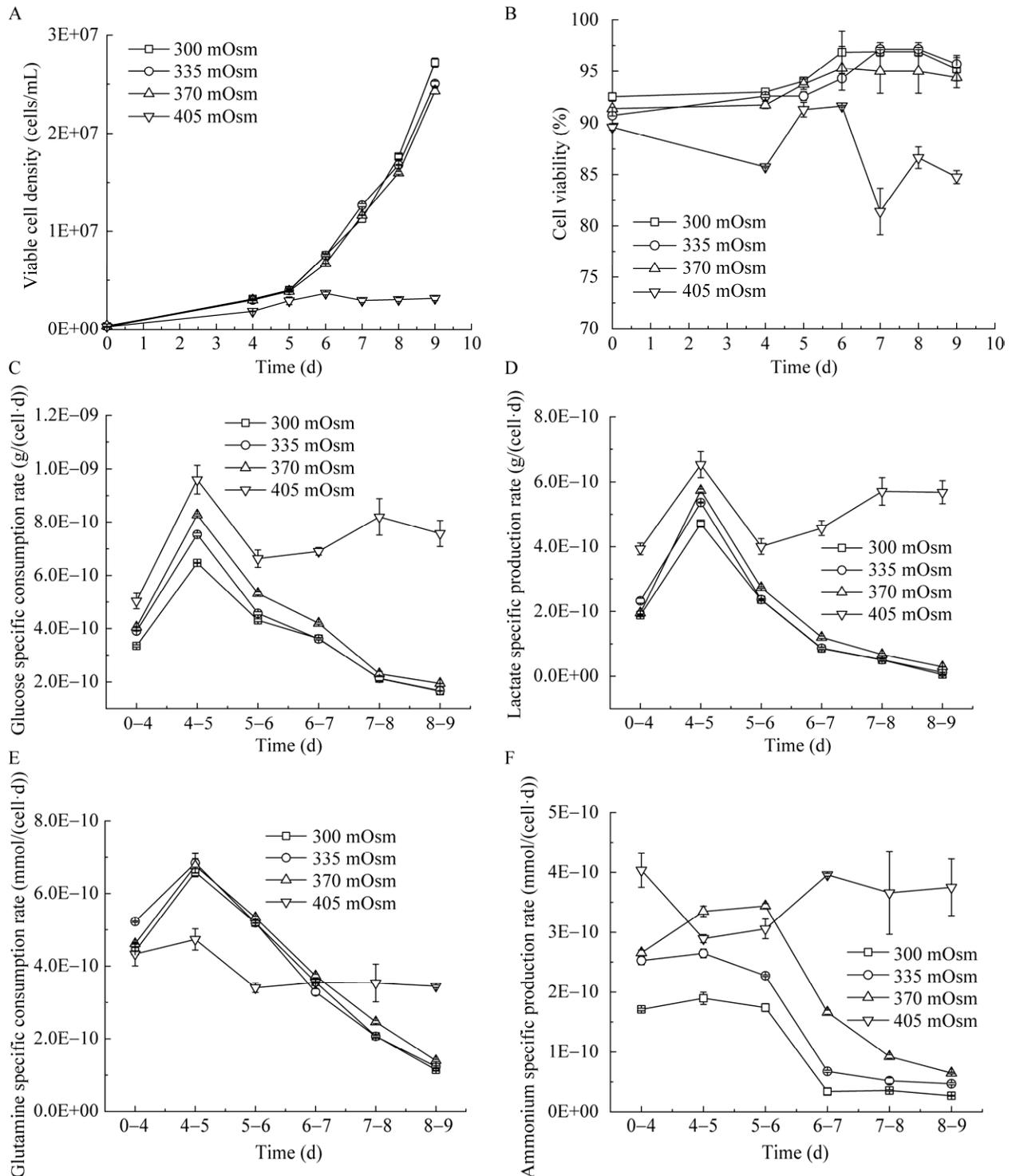


图 2 不同培养基渗透压对细胞生长和代谢的影响 A: 细胞生长曲线. B: 细胞活率曲线. C: 葡萄糖比消耗速率曲线. D: 乳酸比生成速率曲线. E: 谷氨酰胺比消耗速率曲线. F: 铵根离子比生成速率曲线

Figure 2 Effect of different medium osmotic pressure on cell growth and metabolism. A: Cell growth. B: Cell viability. C: Glucose specific consumption rate. D: Lactate specific production rate. E: Glutamine specific consumption rate. F: Ammonium specific production rate.

2.3 高渗胁迫对 Adv 生产过程的影响

2.3.1 接毒后高渗胁迫对 Adv 生产过程的影响

为研究接毒后高渗胁迫对细胞生长和 Adv 生产的影响,在接毒前的细胞生长阶段选用 300 mOsm 和 370 mOsm 培养基,在接毒后的 Adv 生产阶段选用 300、335、370 和 405 mOsm 培养基。活细胞密度和细胞活率在细胞感染 Adv 后并没有立即下降,无论高渗胁迫的强度如何,活细胞密度均在 24 hpi 达到 2.0×10^7 cells/mL 以上,同时细胞活率也保持在 95% 以上(图 3A、3B)。53.3 hpi 的活细胞密度和细胞活率相较于 24 hpi 显著下降,并且下降幅度随着接毒后高渗胁迫的强度增加。24 hpi 和 53.3 hpi 的 Adv 滴度随着接毒后高渗胁迫的强度下降(图 3C–3D)。24–53.3 hpi 为病毒包装成熟的关键阶段,在该阶段的细胞加速死亡会对 Adv 产量造成严重抑制。24 hpi 和 53.3 hpi 的病毒滴度均受到高渗胁迫的显著抑制,但是 0–24 hpi 的活细胞密度和细胞活率并没有受到高渗胁迫的显著影响,因此高渗透压环境所导致的细胞及病毒的 DNA 损伤也可能是导致病毒产量降低的直接原因^[29]。53.3 hpi 的活细胞直径随着接毒后高渗胁迫的强度增加而显著降低(图 3E)。由于 53.3 hpi 的活细胞直径会随着病毒颗粒的大量成熟而变大,因此高渗胁迫所导致的 53.3 hpi 的活细胞直径缩小与病毒生产受抑制直接相关。

在病毒生产阶段施加不同强度的高渗胁迫不会显著影响 Adv 的侵染效率(图 3F)。因此,高渗胁迫对 Adv 产量的抑制作用并非源于对病毒侵染过程的抑制。在病毒生产阶段施加不同强度的高渗胁迫也不会显著影响细胞的葡萄糖比消耗速率、谷氨酰胺比消耗速率和乳酸比生成速率(数据未展示)。在 0–24 hpi 期间,铵根离子比生成速率随着接毒后高渗胁迫的强度显著

增加(图 3G),细胞在 405 mOsm 培养基中的铵根离子比生成速率与 300 mOsm 培养基相比有 1.7 倍的提升。铵根离子比生成速率的改变,可能是 Adv 产量受到影响的部分原因。

上述结果表明,接毒后的等渗环境更有利于细胞生长和 Adv 生产,在接毒后施加高渗胁迫会加速细胞在 24–53.3 hpi 的死亡并抑制 Adv 的产生。

2.3.2 接毒前高渗胁迫对 Adv 生产过程的影响

在 2.3.1 中,在接毒前施加 370 mOsm 的高渗胁迫显著提高了收获时刻的 Adv 产量,为进一步研究接毒前高渗胁迫对 HEK 293 细胞生产 Adv 的影响,在接毒前的细胞生长阶段选用 300、335 和 370 mOsm 培养基,在接毒后的 Adv 生产阶段选用 300 mOsm 培养基。不同强度的高渗胁迫对接毒前的细胞生长速率影响较小,24 hpi 和 53.3 hpi 的活细胞密度及 53.3 hpi 的细胞活率随着接毒前高渗胁迫的强度增加(图 4A)。在营养物质充足的情况下,在病毒生产阶段维持更高的活细胞密度,可以提高单位培养体积的病毒合成速率,进而有利于病毒的大规模扩增。在接毒后维持更高的细胞活率,表明细胞整体的生长和代谢状态更好,有利于病毒基因组的复制、病毒蛋白的表达和成熟病毒颗粒的组装。

活细胞直径随着培养时间的推移逐渐增加,并在 24–53.3 hpi 急剧增加,这归因于 Adv 的大量包装成熟(图 4B)。53.3 hpi 的 Adv 滴度和病毒颗粒浓度随着接毒前高渗胁迫的强度显著提升,在接毒前施加 370 mOsm 的高渗胁迫使 53.3 hpi 的 Adv 滴度和病毒颗粒浓度提高至 1.1×10^{10} IFU/mL 和 7.4×10^{10} VP/mL,分别比接毒前等渗培养高 1.3 倍和 0.9 倍(图 4C)。由于在相同强度的高渗胁迫下,Adv 滴度的提升比例比病毒颗粒浓度高,因此在细胞接毒前施加高

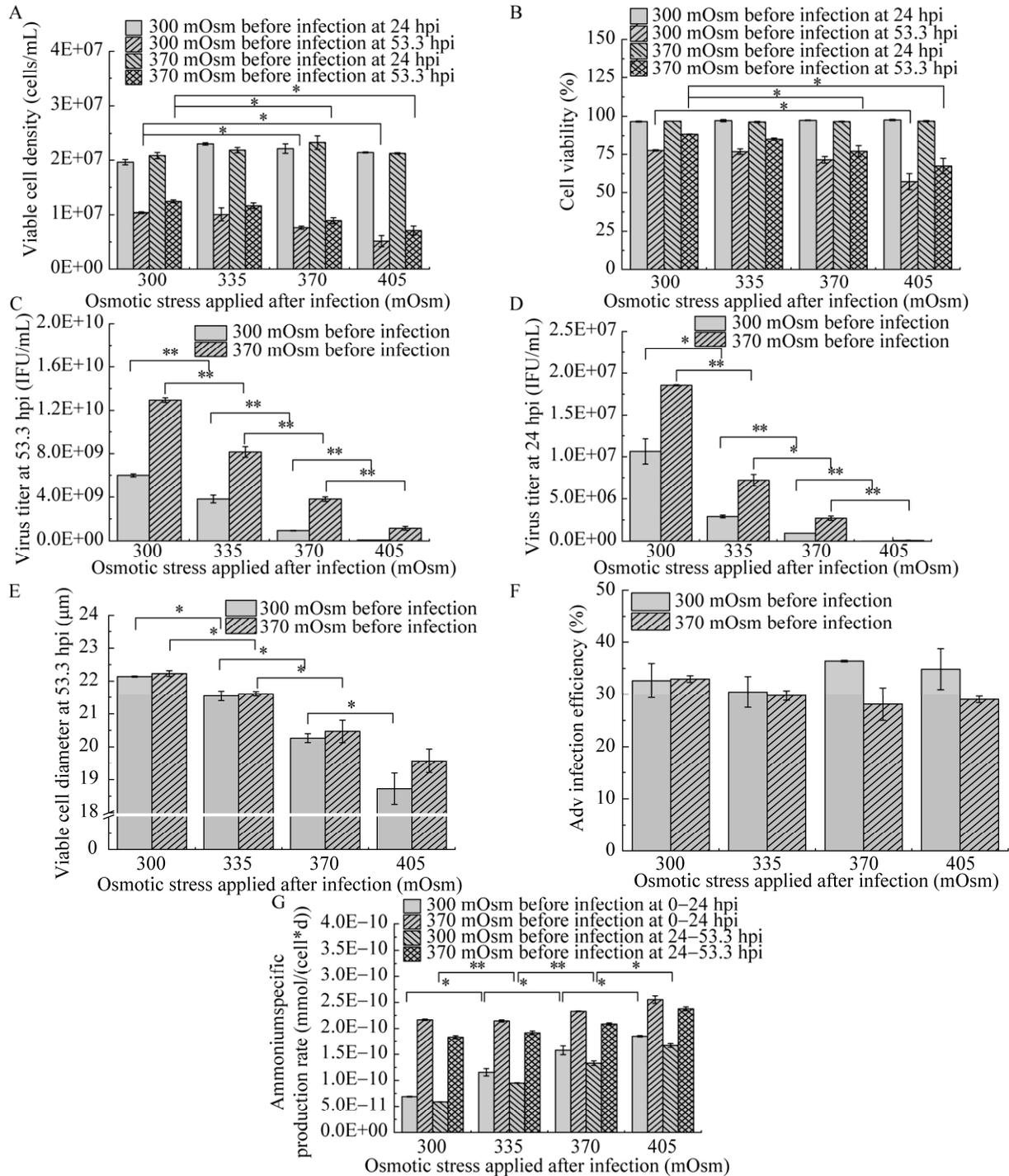


图3 在细胞接毒后施加高渗透胁迫对 Adv 生产阶段的影响 A: 24 hpi 和 53.3 hpi 的活细胞密度. B: 24 hpi 和 53.3 hpi 的细胞活率. C: 24 hpi 的病毒滴度. D: 53.3 hpi 的病毒滴度. E: 53.3 hpi 的活细胞直径. F: Adv 的感染效率. G: 铵根离子比生成速率(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

Figure 3 Effect of different hyperosmotic stresses on the Adv production phase applied after cell infection. A: Viable cell density at 24 hpi and 53.3 hpi. B: Cell viability at 24 hpi and 53.3 hpi. C: 24 hpi virus titer. D: 53.3 hpi virus titer. E: Viable cell diameter at 53.3 hpi. F: Adv infection efficiency. G: Ammonium specific production rate (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

渗胁迫能提高成熟病毒的包装效率。Adv 的侵染效率未受到接毒前高渗胁迫的显著影响,基本维持在 30% (图 4D)。在接毒前施加高渗胁迫不会显著影响病毒生产阶段细胞的营养物质(葡萄糖、谷氨酰胺)比消耗速率和代谢副产物(乳酸、铵根离子)比生成速率(数据未展示)。因此,接毒前高渗胁迫并非从提升细胞代谢速率

与病毒侵染效率方面增加 Adv 的产量。

上述结果表明,在接毒前施加高渗胁迫可以使细胞在病毒生产阶段维持更高的活细胞密度和细胞活率,与此同时,细胞的病毒颗粒形成效率和成熟病毒的包装效率也有提高,最终显著提高了 Adv 的产量。综上所述,370 mOsm 是本研究中最佳的接毒前高渗胁迫强度。

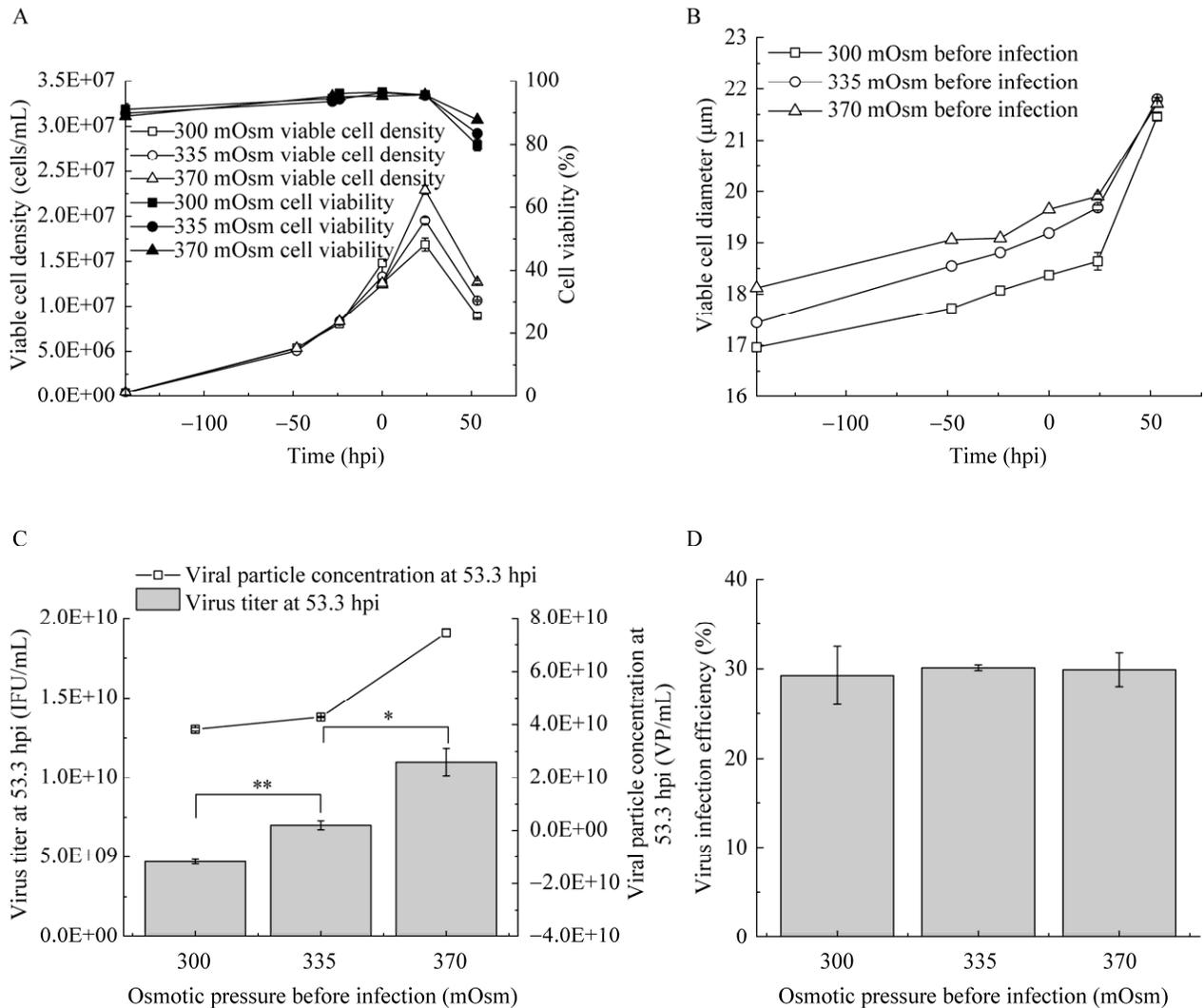


图 4 在细胞接毒前施高渗胁迫对细胞生长和 Adv 生产的影响 A: 细胞生长和细胞活率曲线. B: 活细胞直径曲线. C: 53.3 hpi 的病毒滴度和病毒颗粒浓度. D: 病毒侵染效率(*: $P<0.05$; **: $P<0.01$)

Figure 4 Effect of hyperosmotic stress on cell growth and Adv production applied before cell infection. A: Cell growth and cell viability. B: Viable cell diameter. C: 53.3 hpi virus titer and virus particle concentration. D: Virus infection efficiency (*: $P<0.05$, **: $P<0.01$).

2.4 在接毒前施加的高渗胁迫对胞内 HSP70 蛋白表达的影响

过去的研究表明, HSP70 蛋白与 Adv 外壳蛋白相互作用, 并具有支持 Adv 后期基因表达的未知的活性^[30-31]。2.3.2 的结果表明, 接毒前的高渗胁迫增加了 53.3 hpi 的病毒颗粒浓度和病毒合成过程中的包装效率。为确定在接毒前施加高渗胁迫所诱导的 Adv 产量提高是否由 HSP70 蛋白的过度表达引起, 对 0、24 和 53.3 hpi 的胞内 HSP70 蛋白的表达量进行了检测。接毒前的高渗胁迫没有显著影响 0 hpi 和 24 hpi 的胞内 HSP70 蛋白表达, 胞内 HSP70 蛋白在 53.3 hpi 的表达量随着接毒前高渗胁迫的强度增加(图 5A)。与等渗培养相比, 在细胞生长阶段施加 370 mOsm 的高渗胁迫使胞内 HSP70 蛋白的表达量在 53.3 hpi 增加 1 倍(图 5B)。综上所述, Adv 复制后期的 HSP70 蛋白的过表达可能与收获时刻病毒颗粒浓度和病毒滴度的增加相关。

2.5 Adv 在生物反应器灌流培养的结果

将摇瓶实验确定的最佳高渗胁迫工艺与传统灌流培养工艺放大至 3 L 生物反应器中进行灌流

培养。在高渗胁迫工艺的生物反应器验证过程中, 活细胞密度在 -5 hpi 达到 1.4×10^7 cells/mL, 通过 5 h 的高速灌流降低生物反应器内的渗透压, 随后调整活细胞密度进行接毒(图 6A)。接毒后的活细胞密度先呈现出增加趋势, 高渗胁迫工艺与传统灌流培养工艺的活细胞密度分别在 24 hpi 达到 2.1×10^7 cells/mL 和 1.8×10^7 cells/mL, 随后呈现出下降趋势, 在 53.3 hpi 分别降至 1.6×10^7 cells/mL 和 9.8×10^6 cells/mL。细胞活率在 24 hpi 前一直维持在 90% 以上, 在 24 hpi 后缓慢下降, 在 53.3 hpi 降至 90% 以下。在生物反应器中的葡萄糖浓度一直维持在 1.0 g/L 以上(图 6B), 谷氨酰胺浓度也一直维持在 1.0 mmol/L 以上(图 6C)。在高渗胁迫工艺的生物反应器放大过程中, 乳酸的积累会使生物反应器内的 pH 值下降, 从而促进碱性缓冲液的补加, 进而导致 Na^+ 浓度的波动, 最终影响生物反应器内的渗透压(图 6D)。在 -5 hpi 前, 生物反应器中的渗透压在 370–380 mOsm 波动, 经过 5 h 的快速灌流后在 0 hpi 降低至 308 mOsm; 细胞接毒后, 乳酸的积累量急剧增加, 生物反应器中的渗透压在 53.3 hpi

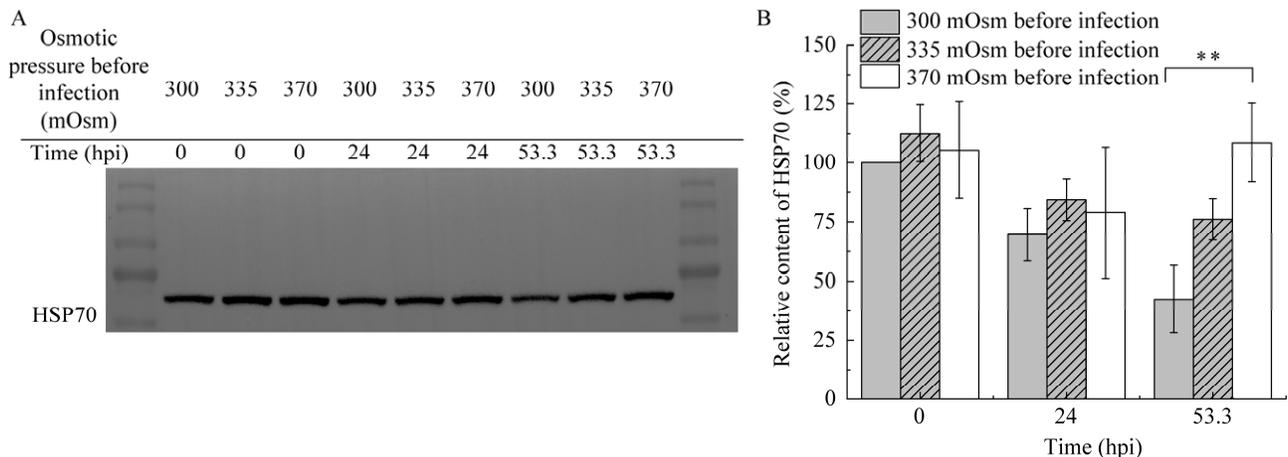


图 5 在细胞接毒前施加的高渗胁迫对等渗透压 Adv 生产阶段的胞内 HSP70 蛋白表达的影响 A: 胞内 HSP70 蛋白的 Western blotting 分析. B: HSP70 蛋白的相对含量分析结果(**: $P < 0.01$)

Figure 5 Effect of hyperosmotic pressure on intracellular HSP70 protein expression during the Adv production phase under iso-osmotic pressure conditions applied before cell infection. A: Western blotting for detecting the intracellular HSP70 protein. B: Relative content of HSP70 protein (**: $P < 0.01$).

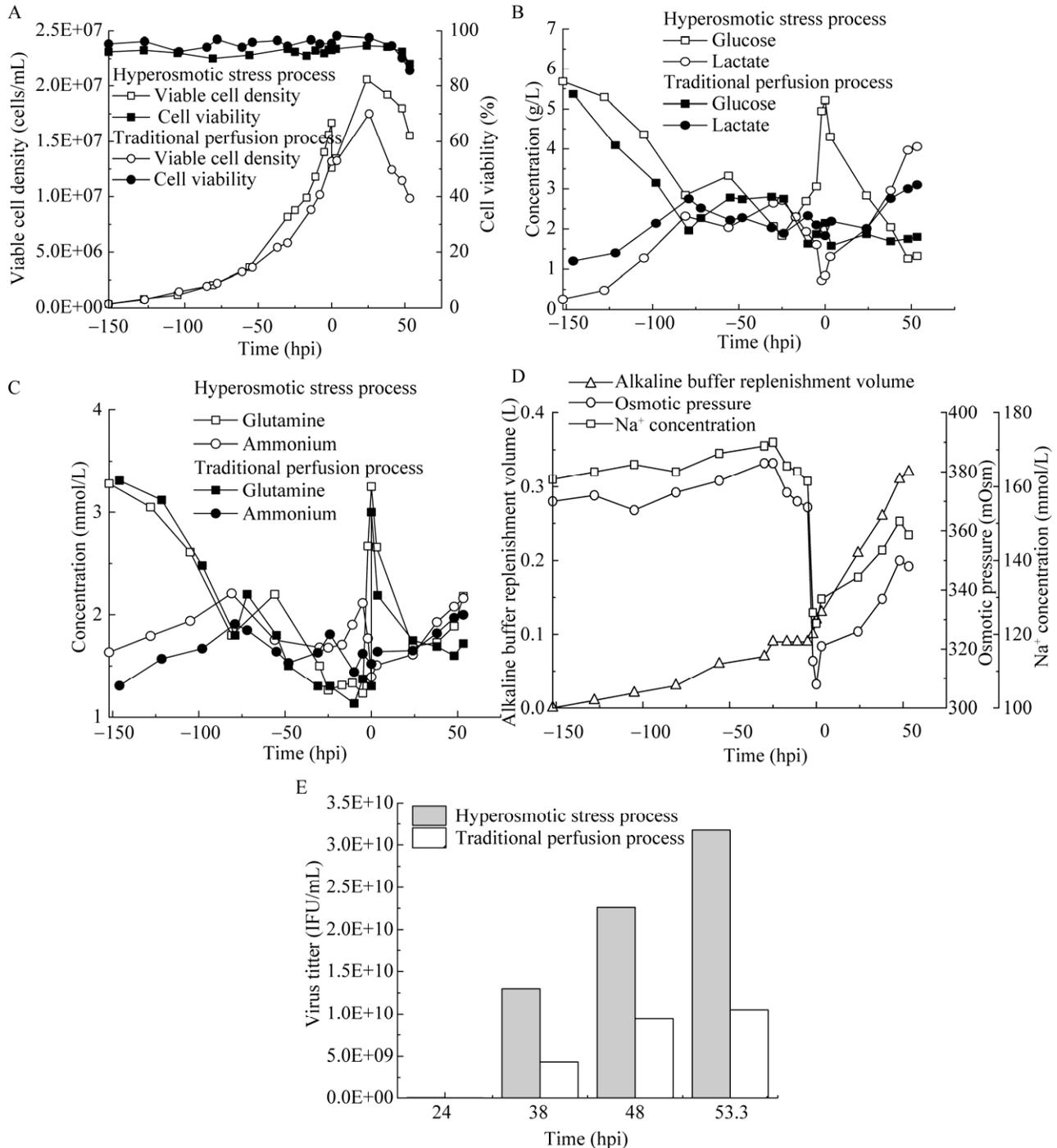


图6 最佳高渗胁迫工艺与传统灌流培养工艺的3 L生物反应器放大 A: 细胞生长曲线. B: 乳酸和葡萄糖的代谢曲线. C: 谷氨酰胺和铵根离子的代谢曲线. D: 高渗胁迫工艺中的渗透压、Na⁺浓度和碱性缓冲液补加体积曲线. E: 病毒滴度

Figure 6 Scale-up of 3 L bioreactor for optimal hyperosmotic stress process and traditional perfusion culture process. A: Cell growth. B: Lactate and glucose metabolism. C: Glutamine and ammonium metabolism. D: Osmotic pressure, Na⁺ concentration, and alkaline buffer replenishment volume during the hyperosmotic stress process. E: Virus titer.

达到 350 mOsm。高渗胁迫工艺在 53.3 hpi 的 Adv 产量达到了 3.2×10^{10} IFU/mL, 是传统灌流培养工艺的 3 倍(图 6E)。上述结果表明, 摇瓶水平的高渗胁迫工艺在 3 L 生物反应器中成功实现了放大, 相较于同工艺水平的传统灌流培养工艺具有绝对的产量优势, 与已报道的灌流培养工艺相比, Adv 产量提高了 3 倍^[12]。

3 讨论

Adv 作为一种优秀的基因治疗载体, 由于其治疗效果好、生产成本低、产量高, 而被广泛用于人类和兽类疫苗中^[5]。由于 Adv 独特的侵染特性, 其疫苗接种可以通过注射、口服和吸入的方式进行, 极大地提高了疫苗接种的便利性^[32]。

由于国际市场对 Adv 的需求迅速增加, 通过工艺优化来提高 Adv 产量的方法层出不穷。灌流培养是提高 Adv 产量的最有效方法之一, 可以克服高细胞密度接毒所导致的“细胞密度效应”, 获得极高的 Adv 产量^[9]。在过去的研究中, 通过长时间的温度转换或添加化学品, 可以提高接毒时刻处于 S 期的细胞比例, 从而实现 Adv 产量的大幅提高^[33]。然而, 由于其生产周期过长和化学品的高毒性, 这项策略并没有被广泛接受。近年来出现的高渗胁迫工艺通过在接毒前后切换不同渗透压的培养基, 实现了 Adv 的增产, 但是该工艺还停留在分批培养模式, 其 Adv 产量的增加并没有灌流培养显著, 而且增加了工艺操作的复杂性, 所以在 Adv 生产中并没有被广泛使用^[28]。

本研究提出了一种将高渗胁迫工艺与灌流培养相结合的新策略。实验结果表明, 该策略不仅克服了传统高渗胁迫工艺的“细胞密度效应”, 还打破了传统灌流培养的高产瓶颈, 使 Adv 产量达到了 3.2×10^{10} IFU/mL, 显著高于已报道的灌流培养工艺(7.8×10^9 IFU/mL)^[12]。生物

反应器放大的结果表明, 利用 ATF 系统进行 5 h 的高速灌流就可以在不改变培养体积的情况下实现生物反应器中渗透压的下调, 为该策略在工业生产中的应用提供了极大的便利, 该方案完全优于仅能依赖于低渗透压培养基混合才能实现生物反应器内渗透压下调的传统高渗胁迫工艺^[28]。

细胞的生理状态受到细胞生长阶段和 Adv 生产阶段的理化条件的共同影响, 这直接关系到细胞的 Adv 生产力。细胞对高渗透压的耐受性大幅改变了细胞结构和代谢状态^[34], 即使在接毒后切换到等渗培养基中也不能立即消除这些细胞生理状态的变化, 这些无法消除的生理状态变化极大地影响了细胞的 Adv 生产力。接毒前的高渗胁迫使细胞在病毒生产阶段保持较高的活细胞密度和细胞活率, 最终显著提高了 Adv 产量。接毒后的高渗胁迫加速了细胞感染 Adv 后的死亡, 显著降低了 53.3 hpi 的活细胞密度和细胞活率, 最终表现为 Adv 产量的下降。由于 Adv 诱导的细胞死亡途径还没有明确的文献报道, 因此无法研究高渗胁迫通过哪些途径加速或延缓了接毒后的细胞死亡。一些研究表明, DNA 损伤和活性氧(reactive oxygen species, ROS)可能参与了 Adv 复制所诱导的细胞死亡^[35]。

Adv 的感染会导致 HSP27、HSP70 和 HSP90 基因的转录增加^[36]。HSP90 蛋白与 Adv 早期基因的转录密切相关^[37], HSP70 蛋白与 Adv 外壳蛋白相互作用, 并具有支持 Adv 后期基因表达的未知活性^[30-31]。此外, 许多病毒可以利用 HSP70 蛋白来折叠它们的蛋白质, 削弱感染病毒后宿主细胞的炎症反应, 并增加病毒在不利宿主条件下的存活机会^[38], 这些研究结果都表明这种蛋白质对病毒感染的普遍重要性。接毒前的高渗胁迫显著提高了 Adv 复制后期的胞内 HSP70 蛋白表达, 这可能与 Adv 产量的增加相关。

由摇瓶拟灌流培养确定的最佳高渗胁迫工

艺成功放大至 3 L 生物反应器中。在生物反应器生产的过程中,随着接毒后乳酸生成速率的激增,碱性缓冲液大量补加,生物反应器内的渗透压急剧上升,这与摇瓶拟灌流培养有很大不同。通过一些策略将生物反应器内的接毒后渗透压有效控制在等渗水平,有望进一步提高产量。目前的工艺条件仅在 3 L 生物反应器中成功放大,对于 50、200 和 1 000 L 的生物反应器放大,还需要进一步验证。

总之,本研究首次将高渗胁迫工艺与灌流培养相结合的策略应用于 HEK 293 细胞生产 Adv,在略微增加工艺复杂性的基础上大幅提高了 Adv 的产量,并探究了高渗胁迫工艺增产 Adv 的原因。本研究结果也为科研和工业中重组 Adv 疫苗的生产工艺优化与放大提供了借鉴。

REFERENCES

- [1] CRYSTAL RG. Adenovirus: the first effective *in vivo* gene delivery vector[J]. *Human Gene Therapy*, 2014, 25(1): 3-11.
- [2] FERREIRA TB, FERREIRA AL, CARRONDO MJT, ALVES PM. Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(22): 1809-1813.
- [3] VOLPERS C, KOCHANNEK S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2004, 6(S1): S164-S171.
- [4] NADEAU I, KAMEN A. Production of adenovirus vector for gene therapy[J]. *Biotechnology Advances*, 2003, 20(7/8): 475-489.
- [5] FERREIRA TB, ALVES PM, AUNINS JG, CARRONDO MJT. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines[J]. *Gene Therapy*, 2005, 12(suppl 1): S73-S83.
- [6] KYUNG YS, PESHWA MV, GRYTE DM, HU WS. High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements[J]. *Cytotechnology*, 1994, 14(3): 183-190.
- [7] VOISARD D, MEUWLY F, RUFFIEUX PA, BAER G, KADOURI A. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(7): 751-765.
- [8] HENRY O, PERRIER M, KAMEN A. Metabolic flux analysis of HEK-293 cells in perfusion cultures for the production of adenoviral vectors[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(5/6): 467-476.
- [9] LIU H, LIU XM, LI SC, WU BC, YE LL, WANG QW. A high-yield and scalable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(5): 524-529.
- [10] HENRY O, DORMOND E, PERRIER M, KAMEN A. Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 86(7): 765-774.
- [11] MARANGA L, AUNINS JG, ZHOU WC. Characterization of changes in PER.C6 cellular metabolism during growth and propagation of a replication-deficient adenovirus vector[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 90(5): 645-655.
- [12] CORTIN V, THIBAUT J, JACOB D, GARNIER A. High-titer adenovirus vector production in 293S cell perfusion culture[J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(3): 858-863.
- [13] GÁLVEZ J, LECINA M, SOLÀ C, CAIRÓ JJ, GÒDIA F. Optimization of HEK-293S cell cultures for the production of adenoviral vectors in bioreactors using on-line OUR measurements[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157(1): 214-222.
- [14] KAMEN A, HENRY O. Development and optimization of an adenovirus production process[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2004, 6(S1): S184-S192.
- [15] BOSCO B, PAILLET C, AMADEO I, MAURO L, ORTI E, FORNO G. Alternating flow filtration as an alternative to internal spin filter based perfusion process: impact on productivity and product quality[J]. *Biotechnology Progress*, 2017, 33(4): 1010-1014.
- [16] WALTHER J, MCLARTY J, JOHNSON T. The effects of alternating tangential flow (ATF) residence time, hydrodynamic stress, and filtration flux on high-density perfusion cell culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(2): 320-332.
- [17] BURG MB, FERRARIS JD, DMITRIEVA NI. Cellular response to hyperosmotic stresses[J]. *Physiological Reviews*, 2007, 87(4): 1441-1474.
- [18] GARCIA-PEREZ A, BURG MB. Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells[J]. *Hypertension*, 1990, 16(6): 595-602.
- [19] YANCEY PH, CLARK ME, HAND SC, BOWLUS RD, SOMERO GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems[J]. *Science*, 1982, 217(4566): 1214-1222.

- [20] CASALI CI, WEBER K, FAVALE NO, TOME MCF. Environmental hyperosmolality regulates phospholipid biosynthesis in the renal epithelial cell line MDCK[J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(3): 677-691.
- [21] OZTURK SS, PALSSON BO. Effect of medium osmolality on hybridoma growth, metabolism, and antibody production[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, 37(10): 989-993.
- [22] KIM N, LEE G. Response of recombinant Chinese hamster ovary cells to hyperosmotic pressure: effect of Bcl-2 overexpression[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 95 (3) 237-248.
- [23] PARK SY, LEE GM. Enhancement of monoclonal antibody production by immobilized hybridoma cell culture with hyperosmolar medium[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 48(6): 699-705.
- [24] RYU JS, KIM TK, CHUNG JY, LEE GM. Osmoprotective effect of glycine betaine on foreign protein production in hyperosmotic recombinant Chinese hamster ovary cell cultures differs among cell lines[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 70(2): 167-175.
- [25] DIMOPOULOS G, WU MH, MANTALARIS A, VARLEY J. The effect of hyperosmotic pressure on antibody production and gene expression in the GS-NS0 cell line[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2004, 40(1): 41.
- [26] ZHU MM, GOYAL A, RANK DL, GUPTA SK, VANDEN BOOM T, LEE SS. Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 21(1): 70-77.
- [27] YU CH, TRIVEDI PD, CHAUDHURI P, BHAKE R, JOHNSON EJ, CATON T, POTTER M, BYRNE BJ, CLÉMENT N. NaCl and KCl mediate log increase in AAV vector particles and infectious titers in a specific/timely manner with the HSV platform[J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2021, 21: 1-13.
- [28] SHEN CF, KAMEN A. Hyperosmotic pressure on HEK 293 cells during the growth phase, but not the production phase, improves adenovirus production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 157(1): 228-236.
- [29] KÜLTZ D, CHAKRAVARTY D. Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1999-2004.
- [30] MACEJAK DG, LUFTIG RB. Association of HSP70 with the adenovirus type 5 fiber protein in infected HEp-2 cells[J]. *Virology*, 1991, 180(1): 120-125.
- [31] ATWAN Z, WRIGHT J, WOODMAN A, LEPPARD KN. Promyelocytic leukemia protein isoform II inhibits infection by human adenovirus type 5 through effects on HSP70 and the interferon response[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(8): 1955-1967.
- [32] WU SP, HUANG JY, ZHANG Z, WU J, ZHANG JL, HU H, ZHU T, ZHANG J, LUO L, FAN PF, WANG BS, CHEN C, CHEN Y, SONG XH, WANG YD, SI WX, SUN TJ, WANG XH, HOU LH, CHEN W. Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolized adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) in adults: preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2021, 21(12): 1654-1664.
- [33] FERREIRA TB, PERDIGÃO R, SILVA AC, ZHANG CH, AUNINS JG, CARRONDO MJT, ALVES PM. 293 cell cycle synchronisation adenovirus vector production[J]. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(1): 235-243.
- [34] ALFIERI RR, PETRONINI PG. Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses[J]. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2007, 454(2): 173-185.
- [35] YAMAUCHI S, KAWAMURA K, OKAMOTO S, MORINAGA T, JIANG YY, SHINGYOJI M, SEKINE I, KUBO SJ, TADA YJ, TATSUMI K, SHIMADA H, HIROSHIMA K, TAGAWA M. Replication-competent adenoviruses with the type 35-derived fiber-knob region achieve reactive oxygen species-dependent cytotoxicity and produce greater toxicity than those with the type 5-derived region in pancreatic carcinoma[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(12): 1587-1598.
- [36] SIMON MC, KITCHENER K, KAO HT, HICKEY E, WEBER L, VOELLMY R, HEINTZ N, NEVINS JR. Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(8): 2884-2890.
- [37] IGA D, OLGA G, DOROTA S, MACIEJ P, PAWEL B. Heat shock protein 90 chaperones E1A early protein of adenovirus 5 and is essential for replication of the virus[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 2020.
- [38] MAYER MP. Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies[M]//*Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004: 1-46.

(本文责编 郝丽芳)