

利用多基因缺失型杆状病毒在昆虫细胞中生产腺相关病毒

张峒¹, 蒋卓含¹, 吴奕凡¹, 李倩茹¹, 刘晨静¹, 张元兴², 刘琴^{1,2*}

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 上海海洋动物疫苗工程技术研究中心, 上海 200237

张峒, 蒋卓含, 吴奕凡, 李倩茹, 刘晨静, 张元兴, 刘琴. 利用多基因缺失型杆状病毒在昆虫细胞中生产腺相关病毒[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 473-484.

ZHANG Tong, JIANG Zhuohan, WU Yifan, LI Qianru, LIU Chenjing, ZHANG Yuanxing, LIU Qin. Production of adeno-associated virus in insect cells using multiple gene deleted baculovirus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 473-484.

摘要: 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)是基因治疗领域最常使用的病毒载体之一, 产量低、成本高是该产业面临的关键瓶颈问题。本研究旨在基于多基因缺失型杆状病毒, 建立双病毒感染昆虫细胞以生产 AAV 的技术体系。首先, 进行 AAV 生产用多基因缺失型重组杆状病毒的构建和扩增, 并检测杆状病毒滴度及其感染细胞的效果; 然后, 使用双杆状病毒共感染昆虫细胞, 并优化感染条件; 最后, 基于优化条件进行 AAV 生产, 并检测评估产量、质量等相关指标。结果表明, AAV 生产用多基因缺失型杆状病毒滴度较野生型无差异, 感染后细胞存活率下降明显减缓。使用双病毒路线进行 AAV 优化生产, Bac4.0-1 的基因组滴度为 1.63×10^{11} VG/mL, Bac5.0-2 的基因组滴度为 1.02×10^{11} VG/mL, 较野生型产量分别提升了 240%和 110%。电镜下, 3 组均具有正常的 AAV 病毒形态, 且转导活性相近。本研究建立了基于多基因缺失型杆状病毒感染昆虫细胞的 AAV 生产体系, 显著提高了 AAV 产量, 具有一定的应用价值。

关键词: 杆状病毒; 多基因缺失; 昆虫细胞; 腺相关病毒; 生产工艺

资助项目: 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地项目(2021 Sci&Tech 03-28)

This work was supported by the Shanghai Frontiers Science Center of Optogenetic Techniques for Cell Metabolism Grant (2021 Sci&Tech 03-28).

*Corresponding author. E-mail: qinliu@ecust.edu.cn

Received: 2023-04-27; Accepted: 2023-08-24

Production of adeno-associated virus in insect cells using multiple gene deleted baculovirus

ZHANG Tong¹, JIANG Zhuohan¹, WU Yifan¹, LI Qianru¹, LIU Chenjing¹,
ZHANG Yuanxing², LIU Qin^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Maricultured Animal Vaccines, Shanghai 200237, China

Abstract: Adeno-associated virus (AAV) is one of the most frequently used viral vectors in the field of gene therapy. However, the industrial production of AAV is facing key bottlenecks such as low yield and high-cost. The aim of this study was to establish a technology system for production of AAV in the double virus infected insects by using multiple-gene deleted baculovirus. First, a multiple gene deleted baculovirus for AAV production was constructed, and the baculovirus titer and its effect on infected cells was examined. Subsequently, the insect cells were co-infected with the double baculovirus and the infection conditions were optimized. At the final stage, we performed AAV production based on optimized conditions, and evaluated relevant parameters including production titer and quality. The results showed that the titer of AAV produced in the multiple gene deleted baculovirus was not different from that of the wild type, but the rate of cell death was significantly slower upon infection. Using the double virus route for optimized production of AAV, the genome titers were 1.63×10^{11} VG/mL for Bac4.0-1 and 1.02×10^{11} VG/mL for Bac5.0-2, which were elevated 240% and 110%, respectively, compared with that of the wild-type. Electron microscopy observations revealed that all three groups exhibited normal AAV viral morphology and they showed similar transduction activity. Taken together, we developed an AAV production system based on the infection of insect cells using multiple-gene deleted baculovirus, which significantly improved the virus yield and showed application potential.

Keywords: baculovirus; multiple gene deletion; insect cell; adeno-associated virus; manufacturing process

以腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为载体的基因治疗药物已经有多种上市,数千项临床项目正在进行中,说明 AAV 的市场价值巨大^[1-3]。但是,AAV 的生产成本极高,使得其药物价格高昂,给患者以及社会医疗体系带来了极大的负担^[4],目前已有包括 zolgensma^[5]、hemgenix^[6]在内的多种药物定价超过 200 万美元/人份。

目前生产 AAV 的最主要方式是三质粒共

转染哺乳动物细胞的形式^[7],但是生产符合《药品生产质量管理规范》(Good Manufacturing Practice of Medical Products, GMP) (https://www.samr.gov.cn/zw/zfxgk/fdzdgknr/bgt/art/2023/art_d5e1dbaa8f284277a5f6c3e2fc840d00.html) 规定的质粒成本极高,整个转染流程较为复杂且难度高,导致对操作人员的技术要求高,生产规模难以放大^[8]。因此,AAV 的工业化生产仍然面临着巨大挑战。

杆状病毒昆虫细胞表达系统具有表达量高、成本低以及易放大等优点,因此也被用于 AAV 的生产。不过,杆状病毒感染昆虫细胞生产 AAV 的过程是一个典型的病毒感染过程,随着感染时间的增加,昆虫细胞会因为被病毒感染而发生细胞凋亡^[9],也会引起蛋白的降解^[10]。因此,在使用杆状病毒表达系统进行外源蛋白生产时,表达时间不适宜过长。目前,常用的杆状病毒表达载体进行了一些基因的缺失,包括 *chiA* 和 *v-cath* 等,上述缺失型杆状病毒表现出了更为稳定、高效的蛋白表达能力^[11-12]。但是,更多基因的缺失还没有进行过试验,潜力有待验证。

本实验室前期进行了杆状病毒系列缺失株的构建和筛选工作,发现部分基因的组合缺失不会影响杆状病毒的包装和扩增能力,在感染阶段对细胞死亡的诱导作用明显减缓,并在外源蛋白表达上表现出了一定的优势^[13-14]。基于上述研究基础,本研究选取实验室已建立的 2 个缺失型杆状病毒株 Bac4.0-1 及 Bac5.0-2,使用双病毒感染路线进行 AAV 生产,以探索建立更为稳定、高效的 AAV 生产技术。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株及质粒

所用的菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、含有野生型杆状病毒质粒的 DH10Bac,为本实验室保有;含有多基因缺失型杆状病毒质粒的 Bac4.0-1 和 Bac5.0-2,为本实验室构建保种;所用的质粒 Bacmid、pFastBac1,为本实验室保有。草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) Sf9 细胞和 HEK293T 细胞来自实验室保种。AAV 的 *cap* 基因、*rep* 基因和带有反向末端重复序列(inverted terminal repeat, ITR)的重组 AAV 基因组来自金斯瑞公司合成并连接到

pFastBac1 质粒上。

1.2 主要试剂

DNA 聚合酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 购自宝日医生物技术(北京)有限公司。无缝克隆试剂盒 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。DNA Marker III 和质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。卡那霉素、氨苄青霉素、庆大霉素、四环素、氯霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吲哚基 β -D-吡喃半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, X-gal) 购自 Inalco 公司。质粒大提试剂盒 NucleoBond[™] Xtra Midi 购自 MACHERY-NAGEL 公司。SF-SFM 昆虫细胞培养基购自苏州沃美生物有限公司。DMEM 培养基购自 Gbico 公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Biosera 公司。转染试剂 Cellfectin[®] Reagent II 购自 Invitrogen 公司。台盼蓝试剂购自 Merck 公司。Western 及 IP 细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司。抗 AAV2 VP1/VP2/VP3 多克隆抗体(DPAB2423)和抗 AAV2 REP 单克隆抗体(Clone A227.8) (DMAB6346)购自北京安必奇生物科技有限公司。过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)多克隆抗体和过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (H+L)多克隆抗体购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。MonAmp[™] SYBR[®] Green qPCR Mix 购自莫纳生物科技有限公司。

1.3 仪器

细胞培养箱购自上海剑革电子科技有限公司。荧光显微镜购自 Motic 公司。化学发光仪购自上海天能生命科学有限公司。qPCR 仪购自杭州朗基科学仪器有限公司。电转仪购自伯乐生命医学产品公司。透射电镜(JEOL)为华东理工大学分析测试中心设备。

1.4 杆状病毒包装及扩增

分别装载了 AAV 的包装元件 *cap* 基因、*rep* 基因和带有 ITR 的重组 AAV 基因组的 pFastBac1 载体质粒上,按照 Bac-to-Bac[®]系统操作手册进行转座反应制备重组杆状病毒质粒。经过蓝白斑筛选和测序验证后,得到带有 AAV 包装元件的重组杆状病毒质粒菌株,其中包含 *cap*、*rep* 基因的杆状病毒称为 BacX-RC,包含 ITR 的重组基因组的杆状病毒称为 BacX-ITR, X 代表杆状病毒载体名称,包含野生型(wild type, WT)、Bac4.0-1 和 Bac5.0-2 这 3 种。将测序正确的菌株保种,并使用质粒大提试剂盒提取杆状病毒质粒。

使用细胞存活率大于 95% 的悬浮培养的 Sf9 细胞,进行细胞铺板,在 6 孔板中按 9×10^5 cells/孔进行接种,混合均匀后于 27 °C 静置培养 2 h。转染前先配制转染混合液, A 液:向 EP 管中加入 100 μ L SF-SFM 培养基和 1 μ g 杆状病毒质粒 DNA,轻轻混匀; B 液:向 EP 管中加入 100 μ L SF-SFM 培养基和 6 μ L Cellfectin[®] II Reagent 转染试剂,轻轻混匀;将 A 液和 B 液混匀,室温下孵育 30 min 后,加入 800 μ L 培养基,混匀。吸出 6 孔板中的培养基,用 SF-SFM 培养基洗涤 2 次,加入转染混合液,27 °C 静置培养 5 h,吸去转染混合液,加入完全培养基(含有 2.5% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 SF-SFM 培养基)。27 °C 继续培养 72 h,持续观察细胞状态,当 Sf9 细胞出现明显肿大,并且荧光显微镜下大部分细胞发出绿色荧光时,收获上清,获得的病毒为 P1 代重组病毒。

向新鲜铺板的 Sf9 细胞中加入 100 μ L P1 代重组杆状病毒进行感染,27 °C 培养制备 P2 代重组病毒。P2 代病毒进行 Sf9 细胞的再次感染获得 P3 代重组病毒。

1.5 TCID₅₀ 法检测重组杆状病毒滴度

对 P3 代杆状病毒进行滴度检测。Sf9 细胞按照 3×10^4 cells/孔的细胞密度铺至 96 孔板,27 °C 静置培养 2 h; P3 代重组病毒进行连续梯度稀释至 10^{-11} ;吸去孔板内培养基,每孔中加入 100 μ L 稀释好的病毒液,每个稀释梯度加入 8 个孔,一个稀释梯度 3 个平行,未加病毒液的细胞作为对照;感染后连续 7 d 观察孔内感染情况直至不再有新的孔内出现绿色荧光,记录有荧光的孔数,计算每个稀释度的阳性孔比率。本研究采用 Karber 法计算病毒滴度: $\lg \text{TCID}_{50} = L - D(S - 0.5)$, 式中 L 为最高稀释度的对数, D 为稀释度对数之间的差, S 为阳性孔比率总和。

病毒滴度通常使用 PFU/mL 表示, PFU (plaque forming unit) 为空斑形成单位, TCID₅₀ 与 PFU 换算关系为 1 个 TCID₅₀ 约等于 0.7 个 PFU, 由此可换算出 PFU/mL 表示的病毒滴度。

1.6 重组杆状病毒感染昆虫细胞的能力检测

将收获的 6 种重组杆状病毒进行感染能力检测。选择细胞活力 95% 以上 Sf9 悬浮细胞,感染前按照细胞密度 1.6×10^6 cells/mL 进行接种。感染复数(multiplicity of infection, MOI)即感染时病毒和细胞的比例,按照 MOI=1 进行病毒感染,不同时间点取样进行细胞状态检测。使用台盼蓝染色法区分活细胞和死细胞,显微镜下进行计数,统计细胞存活率。对 BacX-RC 感染的样品, 1 000 \times g 离心 5 min, 细胞沉淀用 2 mL 的 Western 及 IP 细胞裂解液破碎, 12 000 \times g 离心 10 min 除去细胞碎片, 上清进行 Western blotting 检测,测定 VP 蛋白和 REP 蛋白的表达水平。

1.7 双杆状病毒共感染包装 AAV

使用双杆状病毒共感染 Sf9 悬浮细胞进行 AAV 包装生产。选择细胞活力 95% 以上的连续传代细胞,感染前按照细胞密度 1.6×10^6 cells/mL

进行接种, 使用 250 mL 摇瓶接种 50 mL 体积。将 BacX-RC 和 BacX-ITR 两种杆状病毒按照 1:1 的比例进行共感染, 按照总 MOI 分别为 0.01、0.1、1 和 5 进行感染实验。在不同时间点收获细胞, 将细胞破碎后离心, 取上清进行 Western blotting 检测。

1.8 qPCR 检测 AAV 基因组滴度

AAV 样品使用核酸酶进行游离核酸的消化。在 50 μ L 反应体系中, 核酸酶用量为 0.1 U, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后, 70 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 使核酸酶失活, 95 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 进行 AAV 衣壳的热裂解获得 AAV 基因组。

采用 qPCR 法, 以 AAV 载体装载的 *mCherry* 作为靶基因进行 AAV 基因组滴度测定。按照说明书配制 qPCR 反应体系, 使用已知浓度的 pFastBac1-ITR 质粒作为标准品, 梯度稀释后进行 qPCR 反应。根据分子量和浓度算出 qPCR 反应体系中的分子个数为 N , 使用 C_t 值和 $\lg N$ 进行线性回归得到标准曲线。将待测样品的 C_t 值代入标准曲线, 得到该样品所含的分子数, 根据样品的稀释倍数进行换算, 得到 AAV 病毒基因组的滴度。使用的引物见表 1。

1.9 AAV 转导哺乳动物细胞实验

使用生长状态较好的 HEK293T 细胞, 在转染前 1 d 进行铺板, 六孔板细胞量为 2×10^5 cells/孔, 感染前细胞汇合度约为 50%, 在感染时细胞密度较稀。将得到的病毒液进行梯度稀释, 分别感染 HEK293T 细胞, 统计不同稀释度荧光数量, 根据稀释度计算出 AAV 的感染性滴度。对得到的 AAV 病毒液进行稀释, 稀释至 2×10^8 VG/mL,

每孔加入 1 mL 的稀释 AAV 病毒液, 感染 6 h 后更换为含有 10% FBS 的 DMEM 培养基, 培养 7 d 后观察荧光情况。

1.10 透射电镜

将待测 AAV 样品取 10 μ L 滴加到铜网上, 静置 20 min, 使样品沉降到铜网上, 使用滤纸沿边缘吸去多余液体, 滴加 10 μ L 的 1% 磷钨酸溶液负染 60 s, 使用滤纸沿边缘吸去多余液体, 将铜网放置于透射电镜下观察 AAV 形态, 观测电压为 80 kV。

1.11 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 8 软件进行数据处理, 两组间显著性分析比较采用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 AAV 生产用杆状病毒构建及包装

本研究选取实验室已建立的 2 种多基因缺失型杆状病毒进行 AAV 生产体系建立。缺失了 1-4 区域的杆状病毒命名为 Bac4.0-1, 缺失 1-5 区域的杆状病毒命名为 Bac5.0-2 (表 2)。将带有 AAV 的包装元件 *cap* 基因、*rep* 基因和带有 ITR 的重组基因组的 pFastBac1 穿梭质粒上, 分别转座至不同的杆状病毒质粒上, 阳性单克隆进行质粒抽提, 转染昆虫细胞制备重组杆状病毒, 扩增收获 P3 代重组杆状病毒, 分别是 BacWT-RC、Bac4.0-1-RC、Bac5.0-2-RC、BacWT-ITR、Bac4.0-1-ITR

表 2 缺失型杆状病毒缺失基因信息

Table 2 The information of genes deleted in engineered baculovirus

Region	Knockout genes	Complemented genes
1	Ac42-44	-
2	Ac55-61	-
3	Ac15-22	Ac17-19
4	Ac69-72	Ac71
5	Ac84-91	Ac89-90

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
MCHERRY-F	AAGGGCGAGGAAGATAACATG
MCHERRY-R	GCCCTCAATCTCAAATTCGTG

和 Bac5.0-2-ITR 共 6 种, 可用于 AAV 的生产 (图 1A)。

为探究多基因缺失对杆状病毒自身的复制和包装能力的影响, 对 P3 代重组杆状病毒进行滴度检测。结果显示, BacWT-RC 的滴度为 3.18×10^8 PFU/mL, Bac4.0-1-RC 的滴度为

4.65×10^8 PFU/mL, Bac5.0-2-RC 的滴度为 4.34×10^8 PFU/mL, BacWT-ITR 的滴度为 2.98×10^8 PFU/mL, Bac4.0-1-ITR 的滴度为 2.34×10^8 PFU/mL, Bac5.0-2-ITR 的滴度为 2.64×10^8 PFU/mL, 各重组杆状病毒的滴度没有显著性差异 (图 1B、1C)。以上实验结果表明,

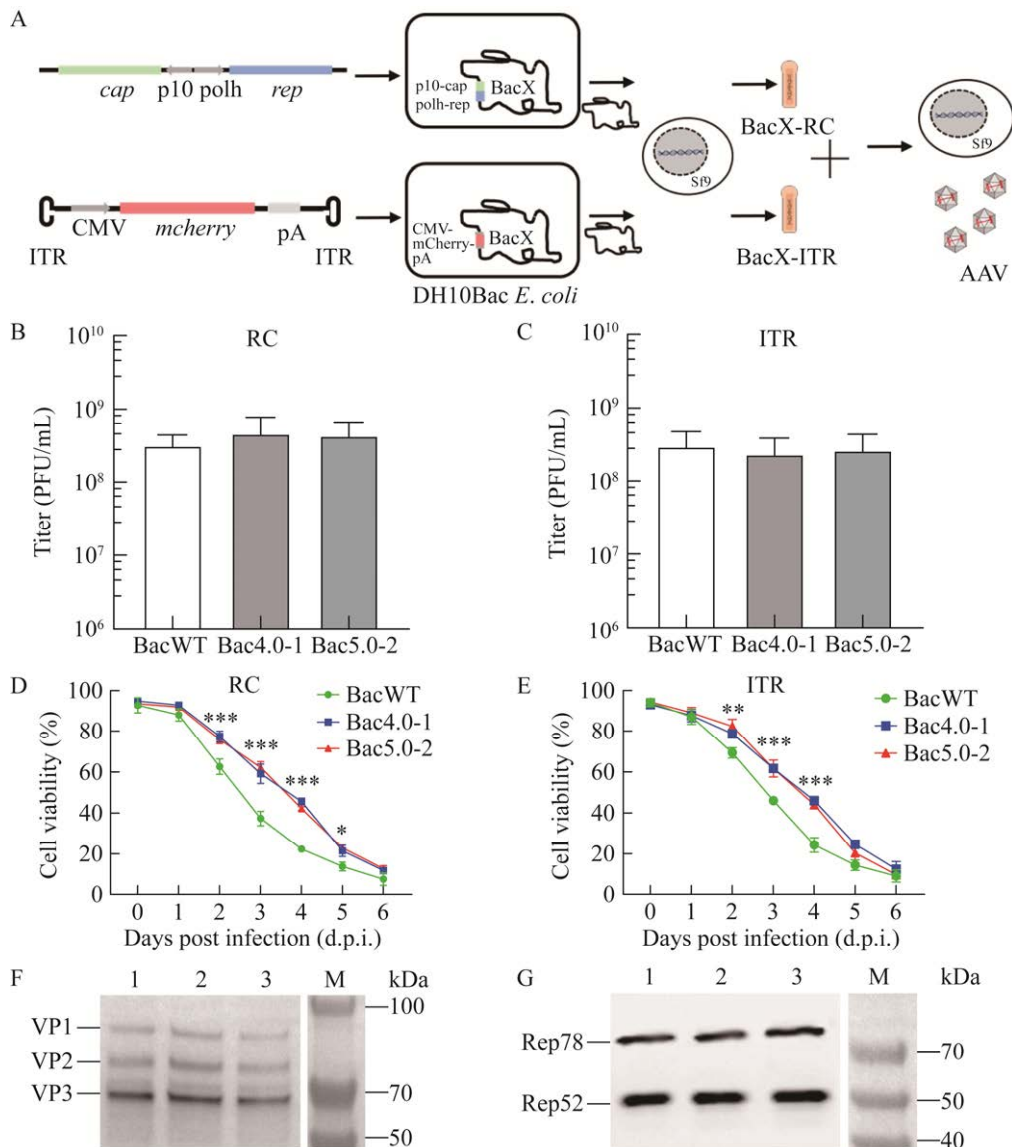


图 1 AAV 生产用杆状病毒的构建和包装

Figure 1 Construction and packaging of baculovirus for AAV production. A: Schematic of AAV production process. B, C: Baculovirus titer assay results. D, E: Cell viability assay after baculovirus infection. F: VP protein expression detection. 1: BacWT-RC; 2: Bac4.0-1-RC; 3: Bac5.0-2-RC; M: Marker. G: Rep protein expression detection. 1: BacWT-RC; 2: Bac4.0-1-RC; 3: Bac5.0-2-RC; M: Marker. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

Bac4.0-1 和 Bac5.0-2 缺失型杆状病毒具有和野生型杆状病毒一样的复制和包装能力。

在杆状病毒感染昆虫细胞的过程中, 缺失型杆状病毒可以减慢病毒感染导致的细胞死亡。通过检测病毒感染后不同时期的细胞状态, 可以发现昆虫细胞感染病毒后会发生裂解死亡, 使得细胞存活率不断降低。相比于昆虫细胞感染野生型杆状病毒的存活率, 两种缺失型杆状病毒感染后的存活率在第 2、3、4 天均更高, 但更长的感染时间会使得所有被感染的昆虫细胞存活率下降至 10%左右(图 1D、1E)。杆状病毒表达系统表达外源蛋白时细胞存活率不能过低, 一般存活率在 50%左右收获外源蛋白, 缺失型杆状病毒感染的细胞后存活率下降至 50%经历的时间更长, 可以延长外源蛋白的表达时间。因此, 这两个多基因缺失型杆状病毒在 AAV 包装生产中可能会有更大优势。

分别收获 BacWT-RC、Bac4.0-1-RC 和 Bac5.0-2-RC 这 3 种病毒感染后的细胞进行破碎, 检测上清中蛋白表达情况。结果显示 3 种重组病毒所装载的 *cap* 基因编码的 VP1、VP2 和 VP3 这 3 种衣壳蛋白均可以正常表达(图 1F), *rep* 基因编码的 Rep78 和 Rep52 蛋白也可以正常表达(图 1G)。

上述实验结果表明, 两种多基因缺失型杆状病毒具有正常的病毒复制增殖能力, 在感染过程中可以延缓宿主细胞的死亡, 并且能够正常表达 AAV 包装所需的蛋白, 将进一步进行生产条件优化。

2.2 AAV 生产条件优化

为了提高 AAV 的产量, 首先需要对 3 种杆状病毒包装 AAV 的生产条件进行优化。分别按照总 MOI=0.01、0.1、1 和 5 进行感染, Bac-RC:Bac-ITR=1:1。并且分别在感染第 1、2、3、4、5、6 天后收获样品进行 VP 蛋白表达测

试, 优化生产条件。

对各蛋白印迹进行灰度分析, 野生型杆状病毒感染第 3 天的样品作为对照组, 各感染条件下的 VP3 蛋白条带灰度值除以对照样品进行标准化。从结果可以看出, 在感染早期, 随着 MOI 增加蛋白表达量增加, 但随着感染时间的延长后蛋白表达量下降; 野生型杆状病毒在感染后 4 d 左右即可达到表达量最大值, 感染时间延长后表达量有所下降; 多基因缺失型杆状病毒最大表达量出现在感染后第 4 天到第 5 天, 并且表达量与野生型相比有一定提高(图 2)。以上结果表明, 多基因缺失型杆状病毒能够延长表达时间进而提高表达效果; 并且各杆状病毒载体进行 VP3 蛋白表达最优的生产条件分别是: Bac4.0-1 按 MOI=1 感染, 第 4 天收获; Bac5.0-2 按 MOI=1 感染, 第 4 天收获; BacWT 按 MOI=0.01 感染, 第 4 天收获。

2.3 AAV 产量分析

为探究多基因缺失型杆状病毒对 AAV 产量的影响, 按照优化后的感染条件进行了 AAV 的生产, 并且对 AAV 的基因组滴度和感染性滴度进行了检测。结果显示, 以优化后的生产条件进行 AAV 的生产可以得到的基因组滴度为: 野生型 4.76×10^{10} VG/mL, Bac4.0-1 缺失型 1.63×10^{11} VG/mL, Bac5.0-2 缺失型 1.02×10^{11} VG/mL, 两种多基因缺失型杆状病毒所生产的 AAV 基因组滴度较野生型提升了 240% 和 110% (图 3A)。各杆状病毒载体所生产的 AAV 感染性滴度分别是: 野生型 6.77×10^7 TU/mL, Bac4.0-1 缺失型 2.50×10^8 TU/mL, Bac5.0-2 缺失型 1.44×10^8 TU/mL, 两种多基因缺失型杆状病毒所生产的 AAV 感染性滴度较野生型提升了 270% 和 110% (图 3B)。因此, 多基因缺失型杆状病毒显著提高了 AAV 的产量, 与 WT 相比, 在 AAV 生产上具有明显优势。

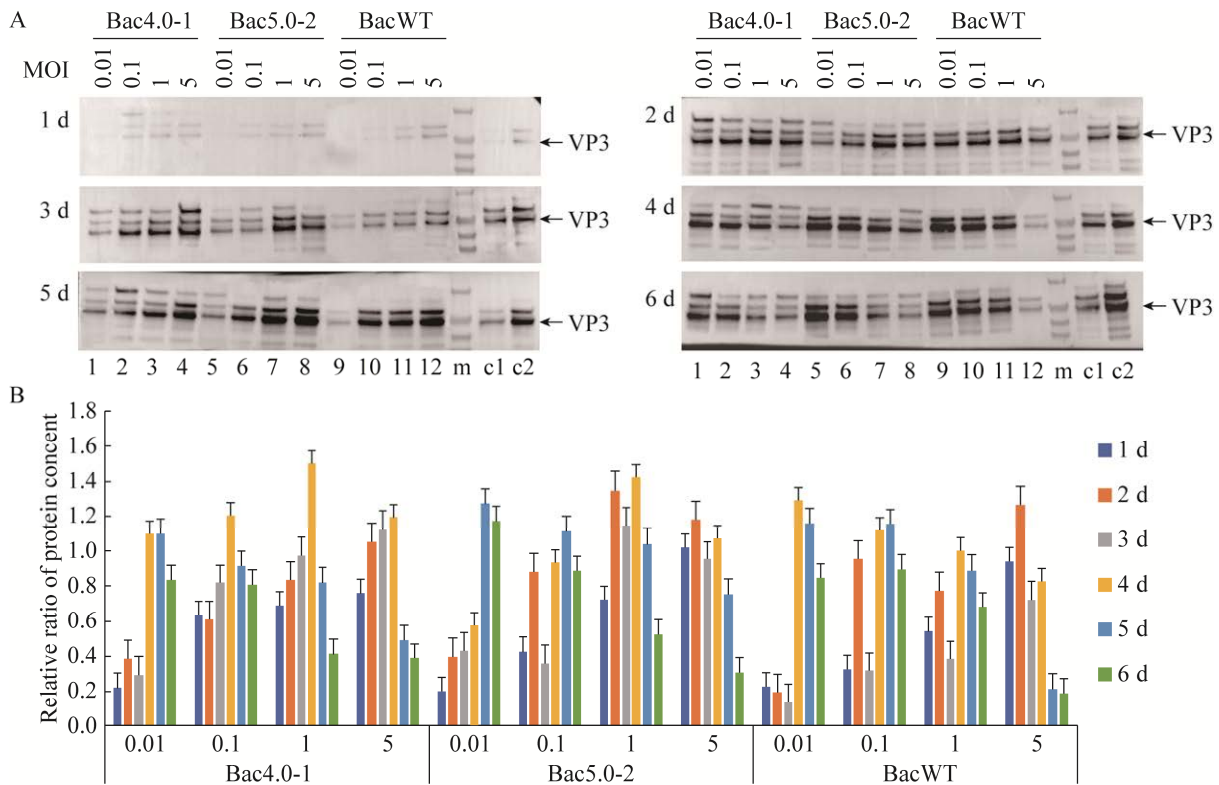


图2 缺失型及野生型杆状病毒进行 AAV 生产条件优化

Figure 2 Optimization of the deletion strain and wild type for AAV production conditions. A: VP protein expression was measured by WB under different conditions. Lane 1–4 are the results of Bac4.0-1 multiplicity of infection of 0.01, 0.1, 1, and 5; 5–8 are the results of Bac5.0-2 multiplicity of infection of 0.01, 0.1, 1, and 5; 9–12 are the results of BacWT multiplicity of infection of 0.01, 0.1, 1, and 5, respectively, m is the protein marker and c1 and c2 are the control at different concentrations. B: Gray density value scans were quantified by VP3 as a ratio to c2.

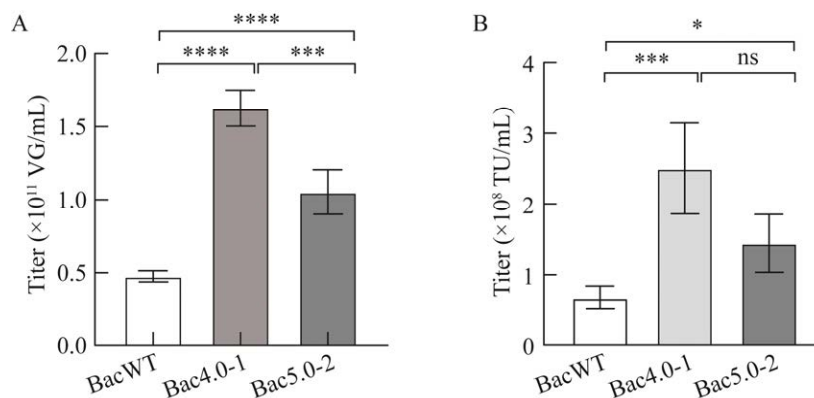


图3 AAV 生产能力检测

Figure 3 AAV production capacity assay. Comparison of AAV viral genome titers (A) and AAV infectious titers (B) between multiple gene deleted strain and wild-type strain. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant ($P > 0.05$).

2.4 AAV 质量分析

为了探究多基因缺失型杆状病毒对所生产的 AAV 质量的影响,用所得 AAV 按 MOI=1 000 进行 HEK293T 细胞转导实验,通过荧光强度测定,进行相对转导活性的比较。结果显示,多

基因缺失型杆状病毒生产的 AAV 荧光表达强度与 WT 相近, AAV 荧光表达强度均接近 1, 3 种病毒生产的 AAV 活性无明显差异(图 4A)。荧光显微镜下观察被转导的细胞,可见明显红色荧光,并且表达水平相近(图 4B)。对不同杆状病

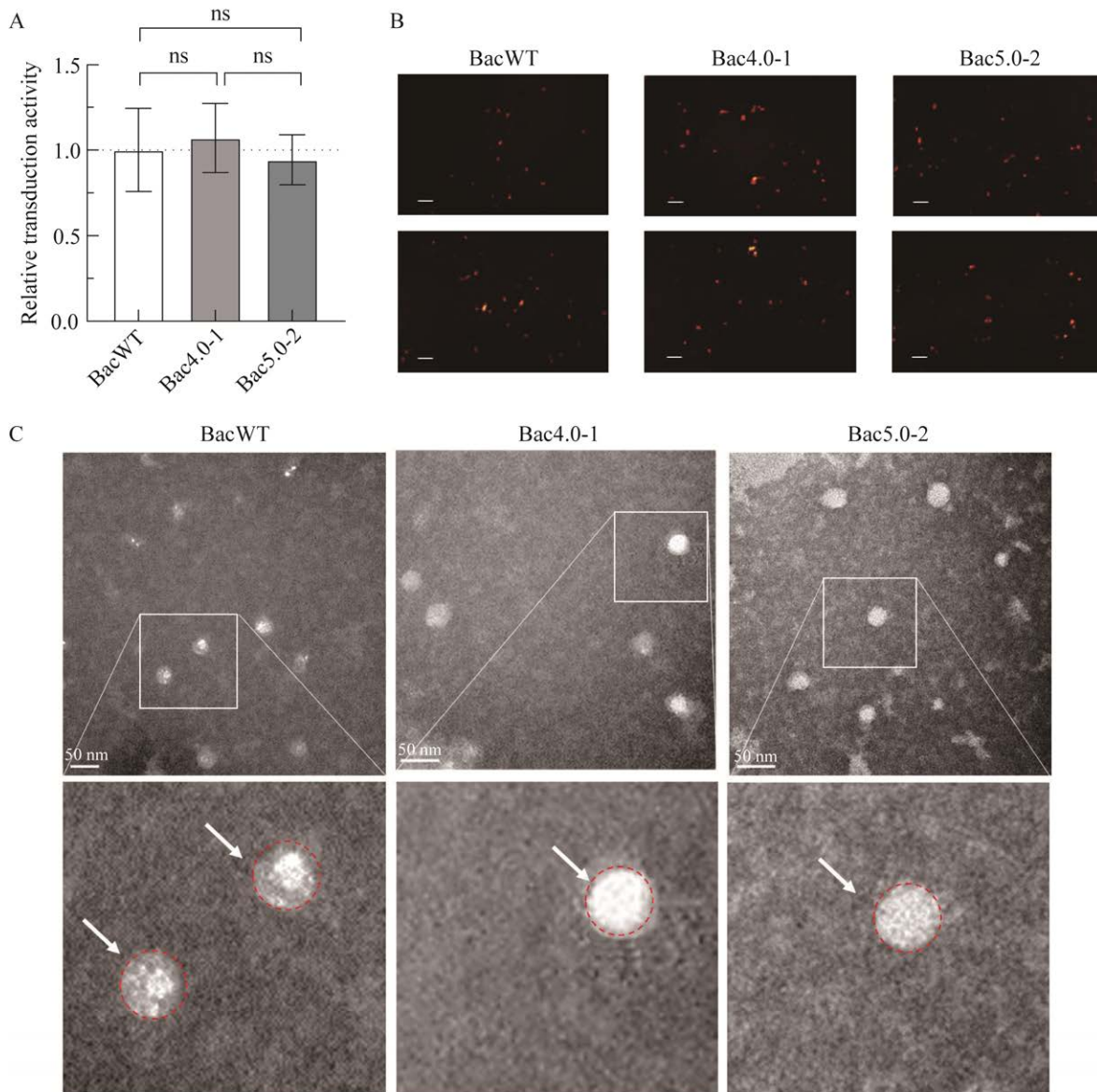


图 4 AAV 质量检测

Figure 4 AAV production capacity assay. A: Relative transduction efficiencies of AAV in multiple-gene deleted strain and wild-type strain. ns: Not significant ($P>0.05$). B: Deletion strains and wild type for HEK293T cell transduction results, scale bar=40 μm . C: Virion morphology was observed at 200 000 \times magnification by transmission electron microscopy, the red dashed lines show the morphological outline of AAV, scale bar=50 nm.

毒生产的 AAV 进行基因组测序, 均测得完整的重组 AAV 基因组, 说明 3 种病毒均可包装出完整的 AAV。使用透射电镜观察病毒粒子形态, 发现 3 种病毒生产的 AAV 均可见实心球形病毒颗粒, 形态无明显差别(图 4C)。以上结果表明, Bac4.0-1 和 Bac5.0-2 两种多基因缺失型杆状病毒能够生产正常形态的 AAV, 并且质量与 WT 相近, 可以应用于 AAV 的实际生产中。

3 结论与讨论

近年来随着基因治疗领域的快速发展, AAV 作为最主要的递送载体之一, 有巨大的生产需求缺口, 杆状病毒表达系统在规模化生产 AAV 上有一定优势, 因此有越来越多的人开始使用杆状病毒感染昆虫细胞来进行 AAV 生产^[15-17]。

重组 AAV 颗粒的组装需要同时具备 ITR、*cap*、*rep* 和辅助病毒 4 个部分。ITR 部分为包装进 AAV 衣壳的重组基因组, 两端为 AAV 的 ITR 序列, 中间野生型 AAV 病毒基因组上的 *cap*、*rep* 基因被去除掉, 替换为外源基因的表达盒, 实现外源基因的递送。*cap* 基因表达病毒的衣壳蛋白, *rep* 基因表达病毒的非结构蛋白。辅助病毒如腺病毒、单纯疱疹病毒和杆状病毒等提供辅助功能, 本研究所使用的杆状病毒载体可以提供辅助功能, 因此同时具备 ITR、*cap*、*rep* 即可进行 AAV 的组装。基于此, 研究人员对杆状病毒表达系统进行了多次的优化, 开发了三病毒、双病毒和单病毒等生产路线以及感染稳转昆虫细胞系的路线^[18]。双病毒路线是较为常用的生产路线, 一方面是减少了病毒的使用种类, 使得单个细胞可以在更低的 MOI 下感染含有包装 AAV 所需的所有元件的杆状病毒, 另一方面可以更加灵活调整各个元件的表达比

例, 使 AAV 的包装效果更好。

本研究使用多基因缺失型的杆状病毒载体, 装载 AAV 包装所需要的元件, 采用双病毒共感染昆虫细胞的方式进行 AAV 生产。多基因缺失的杆状病毒具有正常的病毒包装扩增能力, 并且能够在感染过程中延缓宿主细胞的死亡, 一定程度上延长了外源蛋白的表达时间。本研究中所使用的两种多基因缺失型病毒, 缺失的基因均为非必需基因, 并且已经证实了这些基因的缺失不会对杆状病毒的复制包装能力产生影响, 宿主细胞死亡速率的延缓可能与这些基因有关, 但是已有的研究尚未证实这些非必需基因的功能, 这些基因如何影响病毒感染过程中细胞活性, 还有待进一步研究。使用多基因缺失型以及野生型杆状病毒进行 AAV 优化生产, 通过对 AAV 衣壳蛋白表达水平和 AAV 的滴度两方面指标的评价检测, 多基因缺失型的杆状病毒都具有更好的表达效果, 并且 AAV 的基因组滴度较 WT 可提升 240%, 具有一定的应用潜力。

目前杆状病毒感染昆虫细胞生产 AAV 的产量在 1×10^{10} – 3×10^{11} VG/mL 之间^[19-20], 哺乳动物细胞中进行 AAV 生产比较高的产量在 1×10^{11} VG/mL 左右^[21-23], 本研究建立的多基因缺失型杆状病毒共感染昆虫细胞的 AAV 生产体系的产量处于相对较高的水平。

关于杆状病毒基因组的优化, 本研究只选择了前期测试结果较好的 Bac4.0-1 和 Bac5.0-2 两个版本, 其他版本的测试结果与野生型相当或更低, 因此未进行其他版本的 AAV 生产测试^[13]。多基因缺失型杆状病毒的使用一定程度上提升了杆状病毒昆虫细胞表达系统的 AAV 生产效率, 为解决当前基因治疗领域 AAV 病毒载体生产这一难题提供了参考。

REFERENCES

- [1] AU HKE, ISALAN M, MIELCAREK M. Gene therapy advances: a meta-analysis of AAV usage in clinical settings[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 8: 809118.
- [2] DOBROWSKY T, GIANNI D, PIERACCI J, SUH J. AAV manufacturing for clinical use: insights on current challenges from the upstream process perspective[J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2021, 20: 100353.
- [3] MUHURI M, LEVY D I, SCHULZ M, MCCARTY D, GAO GP. Durability of transgene expression after rAAV gene therapy[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(4): 1364-1380.
- [4] DEVERMAN BE, RAVINA BM, BANKIEWICZ KS, PAUL SM, SAH DWY. Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(9): 641-659.
- [5] THIELEN FW, HEINE R, BERG SVD, HAM R, GROOT CAU. Towards sustainability and affordability of expensive cell and gene therapies? Applying a cost-based pricing model to estimate prices for Libmeldy and Zolgensma[J]. *Cytherapy*, 2022, 24(12): 1245-1258.
- [6] JORDAN B. A long-awaited-but prohibitively expensive-therapy[J]. *Medecine Sciences (Paris)*, 2023, 39(2): 187-190.
- [7] GRIMM D, KAY MA, KLEINSCHMIDT JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6[J]. *Molecular Therapy*, 2003, 7(6): 839-850.
- [8] GRIEGER JC, CHOI VW, SAMULSKI RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors[J]. *Nature Protocol*, 2006, 1(3): 1412-1428.
- [9] ARDISSON-ARAÚJO DMP, DAS MORGADO F, SCHWARTZ EF, CORZO G, RIBEIRO BM. A new theraphosid spider toxin causes early insect cell death by necrosis when expressed *in vitro* during recombinant baculovirus infection[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84404.
- [10] PICHARD S, TROFFER-CHARLIER N, KOLB-CHEYNEL I, POUSSIN-COURMONTAGNE P, ABDULRAHMAN W, BIRCK C, CURA V, POTERSZMAN A. Insect cells-baculovirus system for the production of difficult to express proteins: from expression screening for soluble constructs to protein quality control[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 2022, 2406: 281-317.
- [11] BERGER I, FITZGERALD DJ, RICHMOND TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(12): 1583-1587.
- [12] GUPTA K, TÖLZER C, SARI-AK D, FITZGERALD DJ, SCHAFFITZEL C, BERGER I. MultiBac: baculovirus-mediated multigene DNA cargo delivery in insect and mammalian cells[J]. *Viruses*, 2019, 11(3): 198.
- [13] YU Y, ZHANG T, LU DB, WANG J, XU ZH, ZHANG YX, LIU Q. Genome-wide nonessential gene identification of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus[J]. *Gene*, 2023, 863: 147239.
- [14] YU Y, YANG CC, ZHANG T, XU ZH, ZHANG YX, LIU Q. YBac: a novel and simple baculovirus system for heterologous protein production in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells[J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(7): e2200558.
- [15] 鲁念, 刘兴健, 胡小元, 李轶女, 易咏竹, 张志芳. 利用 *BmNPV*-家蚕表达系统包装重组腺相关病毒 2 型 (rAAV2) 研究[J]. *生物技术进展*, 2018, 8(1): 71-77, 93. LU N, LIU XJ, HU XY, LI YN, YI YZ, ZHANG ZF. Package of recombinant adeno-associated virus type 2 based on *BmNPV*-silkworm expression system[J]. *Current Biotechnology*, 2018, 8(1): 71-77, 93 (in Chinese).
- [16] 杜梦潭, 刘兴健, 胡小元, 张志芳, 李轶女. 腺相关病毒的生产方式及其在基因治疗中的应用[J]. *生物技术进展*, 2019, 9(4): 326-331. DU MT, LIU XJ, HU XY, ZHANG ZF, LI YN. The production method of adeno-associated virus and its application in gene therapy[J]. *Current Biotechnology*, 2019, 9(4): 326-331 (in Chinese).
- [17] 陈平, 张利娟, 李娜. 腺相关病毒载体的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(4): 500-507. CHEN P, ZHANG LJ, LI N. Progress in research on adeno-associated virus vectors[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2022, 35(4): 500-507 (in Chinese).
- [18] JOSHI PRH, VENEREO-SANCHEZ A, CHAHAL PS, KAMEN AA. Advancements in molecular design and bioprocessing of recombinant adeno-associated virus gene delivery vectors using the insect-cell baculovirus expression platform[J]. *Biotechnology Journal*, 2021,

- 16(4): e2000021.
- [19] JOSHI PRH, CERVERA L, AHMED I, KONDRATOV O, ZOLOTUKHIN S, SCHRAG J, CHAHAL PS, KAMEN AA. Achieving high-yield production of functional AAV5 gene delivery vectors *via* fedbatch in an insect cell-one baculovirus system[J]. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2019, 13: 279-289.
- [20] MIETZSCH M, HERING H, HAMMER EM, AGBANDJE-MCKENNA M, ZOLOTUKHIN S, HEILBRONN R. Onebac 2.0: sf9 cell lines for production of AAV1, AAV2, and AAV8 vectors with minimal encapsidation of foreign DNA[J]. *Human Gene Therapy Methods*, 2017, 28(1): 15-22.
- [21] JOSHUA G, STEPHEN S, RICHARD JS. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(2): 287-297.
- [22] GUAN JS, CHEN K, SI Y, KIM T, ZHOU Z, KIM S, ZHOU L, LIU XM. Process improvement of adeno-associated virus (AAV) production[J]. *Frontiers in Chemical Engineering*, 2022, 4: 830421.
- [23] ASAAD W, VOLOS P, MAKSIMOV D, KHAVINA E, DEVIATKIN A, MITYAEVA O, VOLCHKOV P. AAV genome modification for efficient AAV production[J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e15071.

(本文责编 陈宏宇)