

TideMotion® 一次性潮式生物反应器

实现 CAR 慢病毒生产的线性可扩增性

背景介绍

自十年前一次性生物反应器首次引入商业生产后，生物制备工艺业已将其归纳为 cGMP 标准。现有的搅拌罐式反应器只能支持悬浮细胞培养，而 VaccixCell 的 TideMotion® 潮式生物反应器 CelCradle™ (500ml) 和 TideCell® (2 升-500 升)，是目前市面上仅有的少数可用于大规模培养粘壁型细胞的生物反应器。

CAR-T 免疫细胞治疗是最新的癌症免疫疗法之一。其治疗法经已获得美国 FDA 的批准，并在白血病、淋巴瘤等癌症治疗中取得了满意疗效而广受重视。此技术的需求近日迅速增加，许多企业正积极推进其研究结果以满足临床阶段对大规模 CAR-T 生产的需求。然而细胞制备工艺最常见的挑战仍停留在如何实现生产工艺的放大。其中，高径比，剪切力（通气方式、桨叶设计），通气获得 DO 效率（与搅拌系统、通气方式、气体流量）等非线性因素需要根据反应器规模的大小重新调整，从而增加人力，耗材与时间的成本。但是，TideMotion® 潮式生物反应器可实现如上非线性因素的线性化，克服这些复杂及严峻的挑战，减少工艺开发、优化与验证所需的时间。

本白皮书以第 3 代重组慢病毒包装系统转染进入 HEK-293T 贴壁细胞来实现慢病毒的扩增为例，讨论 TideMotion® 潮式生物反应器对贴壁细胞培养的线性可扩展性。

细胞，培养基和其他材料

潮式生物反应器	CelCradle™-500A TideCell®-002
细胞株	HEK-293T (贴壁细胞, ATCC: CRL-3216)
培养基成分	高糖 DMEM (4.5 g/L); 10 % 胎牛血清; 4 mM L-谷氨酰胺; 25 mM HEPES; 1X P/S
生长条件	37°C; 5% CO ₂ ; 75-85% 湿度

种子制备：高效的单步细胞扩增工艺

高密度细胞可直接作为种子接种于小型的潮式反应器 (CelCradle™)。待细胞密度在 CelCradle™ 生长之最高

密度时，直接将细胞消化下来作为 TideCell® 接种种子 (图 2 (a))。与传统的递增式滚瓶细胞扩增策略相比 (图 2 (b))，这种单步细胞扩增策略可有效地减少生物制备工艺中所需的人力物力，以及厂房面积和时间需求。

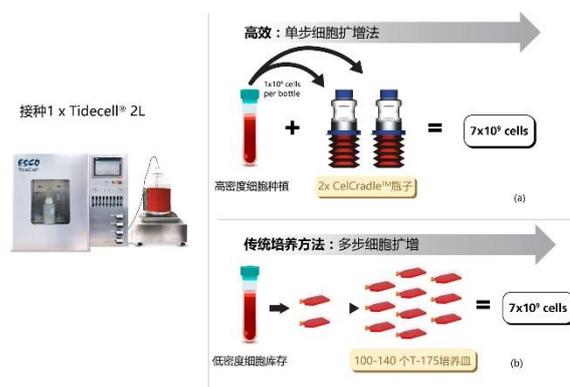


图 1：准备 TideCell® 生物反应器所需的接种细胞，可以通过：(a) 2 个 CelCradle™ 单步细胞扩增，或 (b) 用 100-140 个 T-175 培养方瓶多步骤细胞扩增法。

小量产的 CelCradle™ 和量产规模的 TideCell® 细胞扩增线性放大的对比试验。

步骤如下：在 HEK-293T 细胞接种后的第 2 天，将 4 个慢病毒质粒转染到该细胞以诱导慢病毒载体的生产。转染过后，每 24 小时可收集含有病毒的细胞培养液，共收集三次 (图 2)。

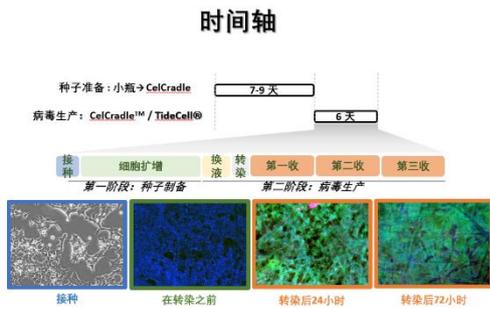


图2: 慢病毒载体从种子培养至收集病毒需要约2周。其中, 慢病毒生产需5天, 包括接种, 生长, 使用 PEI 进行病毒转染以及收集上清液中的病毒。

分析病毒滴度单位 (TU) 采用绿色荧光蛋白(GFP)基因标记, 再使用流式细胞仪(FACS)分析。测试表明, CelCradle™-500A 优化过的制成方案, 放到 TideCell®量产, 出现明显的线性可扩增性 (详见表 1)

潮式生物反应器	CelCradle™	TideCell®
表面积	15,000 cm ²	300,000 cm ²
BioNOC II 载体	5.5 g	110 g
细胞数量	23,000 细胞/cm ²	
培养基量	500ml	10.0L
贴附时间	180 分钟	
贴附效率	87 ± 7%	95 ± 4%
转染时间点	播种后第 2 天	
细胞数量 (转染当日)	27,000 细胞/cm ²	
转染试剂	PEI "Max"	
DNA/细胞	4.2 x 10 ⁻¹² g/细胞	
质粒比例	2:1:1:1 (pCDH: pMDL: pVSVG: pREV)	
转染时间	6 小时	
收获时间点	24h, 48h, 72h (3 次收成)	
病毒 (TU) /细胞	3 TU /细胞	
病毒载体滴度	1.0 x 10 ⁹ TU	2.04 x 10 ¹⁰ TU

表 1: 将 CelCradle™-500A 优化过的制成方案, 放到 TideCell®量产, 出现明显的线性可扩增性。

TideMotion®潮式生物反应器细胞总产量与成本比率最高

与其他培养平台比较, TideMotion® 潮式生物反应器显著的降低了慢病毒颗粒制备的成本和一次性材料的消耗。

	CelCradle™ 500A	TideCell® -002
病毒载体总量	1.0 x 10 ⁹ TU	2.0 x 10 ¹⁰ TU
相当于 10cm 的培养皿 (估计~4x10 ⁷ TU)	25 个	500 个
相当于滚瓶 (估计~4x10 ⁸ TU)	3 个	60 个
相当于 CF-10 (估计~3x10 ⁹ TU)	0.3 个	6 个

表 2: 生产同样的数量的慢病毒载体和同等病毒, 潮式反应器 CelCradle™ 和 TideCell® 与其他培养平台的比较。

	TideCell® -002	10cm 培养皿	滚瓶	CF-10
TideCell® 002	1X	500X	60X	6X
人力	+	+++++	+++	+
操作时间	+	+++++	+++++	+
贴壁面积	++	+++++	+++++	+

封闭的系统	有	否	否	否
洁净室	无需	需要	需要	需要
总体成本效益	+++++	+	+	+

表 3: 使用 TideMotion® 生物反应器比其他 2D 平台更具成本效益。

总结

TideMotion®潮式生物反应器是少数几种可满足贴壁细胞大规模培养的一次性生物反应器。使用此新型高效细胞扩增法, 仅需一步就可将细胞制备放大。TideMotion®专利潮式生物反应器具有高速率溶氧传质和低剪切作用的培养环境, 可确保高密度细胞扩增和生物制品的高生产率。使用者可从 TideMotion®潮式生物反应器平台轻松收集高密度细胞, 病毒或分泌性生物制品。最重要的是, 我们的系统具有线性可扩展性, 从一个规模直接转换为另一个规模, 最小化优化步骤, 节省宝贵的时间和精力。



© 2018 Esco Aster 私人有限公司保留所有权利。除非另有说明, 否则所有商标均为 Esco 的财产。

了解更多请见:

<http://www.vaccixcell.com/products-and-brands/celcradle/>

<http://www.escoaster.com>

联系方式:

Esco Vaccixcell
mail@vaccixcell.com

Esco Aster (cGMP CDMO): mail@escoaster.com