

天津科技大学研究生学位论文

(申请硕士学位)

慢病毒生产工艺及转染条件优化

OPTIMISATION OF LENTIVIRAL PRODUCTION PROCESS AND TRANSFECTION CONDITIONS

学 科 名 称: 药 学 (医)

指 导 教 师: 张同存 教授

研 究 生 姓 名: 李 欣

申请学位级别: 全日制医学硕士

论文提交日期: 2024 年 6 月

分类号: Q813.1+1

密级: 公开

学校代码 10057

研究生学号: 21813026

慢病毒生产工艺及转染条件优化

Optimisation of Lentiviral Production Process and Transfection Conditions

学 科 名 称: 药 学 (医)

指导教师姓名: 张同存 教授

研 究 生 姓 名: 李 欣

申请学位级别: 全日制医学硕士

论文提交日期: 2024 年 6 月

论文课题来源: 国家重点研发计划

学位授予单位: 天津科技大学

摘要

慢病毒载体 (Lentiviral vector, LV) 已成功应用于临床试验, 以治疗不常见的疾病, 尤其是初级免疫缺陷和神经退行性疾病。同时, LV 载体也被用于治疗更为常见的遗传和获得性疾病, 包括 β -地中海贫血、帕金森病以及基于嵌合抗原受体的癌症免疫疗法, 这些应用已经在临床上进行了评估, 并获得鼓舞人心的结果。人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 所衍生的慢病毒载体 (LV) 作为一种用于细胞治疗的基因递送工具, 其优势是传统基因转移技术所无法比拟的。然而, 随着细胞治疗产业的快速发展, 大规模生产慢病毒成为工艺瓶颈。因此, 优化 293T 细胞生长和包毒条件以获得高滴度和高纯度的 CAR 慢病毒载体的生产工艺显得至关重要。

本研究首先优化包装慢病毒的载体 293T 贴壁细胞; 其次, 在其基础上优化提高该慢病毒包装能力的条件; 最后, 对影响优化慢病毒载体中出现悬浮细胞结团生长的因素进行探索。分别采用快速、慢速驯化方式将 293T 贴壁细胞驯化为悬浮培养, 并比较其细胞形态、细胞密度、细胞活率、慢病毒包装能力和冻存复苏后稳定一致性, 筛选出最优的悬浮驯化条件。并对慢病毒包装方法中的转染条件采取单因素变量实验进行 DNA: PEI 比例和质粒配比的优化。针对悬浮细胞结团现象, 通过调节 Ca^{2+} 浓度和 EDTA 添加量来研究比较细胞结团生长状况。

结果证明, 使用无血清培养基 OPM-293 CD05 Medium 可以将 293T 贴壁细胞快速驯化出较优状态的 293T 悬浮细胞, 并且制备出的慢病毒滴度优于贴壁细胞的包装滴度 (* $P<0.05$)。在最有效的慢病毒包装方法优化中, DNA:PEI 比例为 1: 3 时和质粒配比为 18: 10: 6: 5 时包装能力较佳。同时得出 Ca^{2+} 浓度会影响细胞结团大小, 添加 EDTA 能有效分离分散非必要的细胞抱团生长。研究结果显示, 传统 293T 贴壁细胞可以使用无血清培养基 OPM-293 CD05 溶剂快速驯化成悬浮细胞; 不同 DNA: PEI 比例和质粒配比会对慢病毒包装滴度有很大差异。在一定范围内, Ca^{2+} 浓度越高细胞所结团块及粒径越大, EDTA 添加量越高细胞所结团块及粒径变小。这为优化慢病毒载体包装工艺和悬浮培养条件, 同时为体外规模化细胞培养放大和生产奠定了理论基础, 具有一定的实用价值。

关键词: 慢病毒载体; 293T 细胞; 悬浮驯化; 慢病毒包装; 悬浮细胞培养; 结团

ABSTRACT

LV vectors have been successfully applied in clinical trials for the treatment of uncommon diseases, particularly primary immunodeficiencies and neurodegenerative diseases. LV vectors are also being used to treat more common genetic and acquired diseases, including β -thalassaemia, Parkinson's disease, and chimeric antigen receptor-based cancer immunotherapies, applications that have been evaluated in the clinic with encouraging results. The advantages of human immunodeficiency virus (HIV-1)-derived lentiviral vectors (LVs) as a gene delivery tool for cellular therapies lie beyond the reach of conventional gene transfer techniques. However, with the rapid development of cell therapy, large-scale production of lentivirus has become a bottleneck in the process. Therefore, optimisation of the 293T to obtain high-titer and high-purity CAR lentiviral vector production process becomes crucial.

In this work, we have first optimized the lentiviral packaging vector 293T wall cells; then, we have optimized the conditions to enhance this lentivirus's packaging capacity; and lastly, we have investigated the phenomenon of suspended cells clumping in the optimized lentiviral vector and identified the factors influencing the clumping. Fast and slow domestication techniques were used to domesticate the 293T adherent cells into suspension culture. The best suspension domestication conditions were determined by evaluating the cell morphology, viability, density, ability to package lentivirals, and stability consistency following freeze recovery. One-way variability tests for the DNA:PEI ratio and plasmid ratio were used to optimize the transfection parameters in the lentiviral packaging process. The Ca^{2+} content and the addition of EDTA were changed to compare the increase of cell clumping in the suspension phenomena.

The outcomes showed that 293T wall cells could be quickly domesticated into 293T suspension cells using the serum-free solution OPM-293 CD05 solvent (medium), and that the lentiviral titers produced were better than the wall cell packing titres (* $P < 0.05$). When the DNA:PEI ratio was 1:3 and the plasmid ratio was 18:10:6:5, the packing capacity was improved in the optimization of the most efficient lentiviral packaging technique. It was also determined that the size of cell clusters is influenced by Ca^{2+} concentration and that non-essential cell clustering development could be effectively separated and dispersed by adding EDTA. The study's findings demonstrated that standard 293T wall cells could be quickly domesticated into suspension cells using the serum-free solution OPM-293 CD05 solvent; lentiviral packing titres would change significantly depending on DNA:PEI and plasmid ratios. Within a particular range, the larger the clumps and larger the size of the cells, the higher the concentration of Ca^{2+} , and the smaller the

clumps and smaller the size of the cells, the greater the addition of EDTA. This has established a theoretical basis for the optimization of the conditions for suspension culture and the packaging process of lentiviral vectors, as well as for the in vitro scaling up and cell culture manufacturing, which has some practical applications.

Key words: Lentiviral vectors , 293T cells , suspension domestication , lentiviral packaging, suspension cell culture, agglomeration

目 录

1 前言.....	1
1.1 慢病毒概述.....	1
1.1.1 慢病毒相关的基本结构.....	1
1.1.2 慢病毒载体的发展.....	4
1.1.3 慢病毒载体的应用.....	6
1.2 慢病毒生产的细胞系及培养方式	7
1.2.1 HEK-293T 细胞.....	7
1.2.2 用于病毒生产的细胞培养系统.....	7
1.3 慢病毒载体生产.....	8
1.3.1 小规模生产慢病毒载体.....	8
1.3.2 大规模生产慢病毒载体.....	8
1.4 无血清培养基的悬浮驯化培养	10
1.4.1 无血清培养基的发展概述.....	10
1.4.2 无血清培养基的分类和特点.....	10
1.4.3 细胞株无血清驯化培养.....	11
1.5 本课题的研究目的和意义	12
2 材料与方法.....	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 细胞系及质粒.....	13
2.1.2 主要试剂和材料.....	13
2.1.3 主要仪器与设备	14
2.1.4 主要溶液配置.....	15
2.2 方法.....	15
2.2.1 细胞复苏.....	15
2.2.2 细胞传代.....	16
2.2.3 快速驯化法.....	16
2.2.4 慢速驯化法.....	17
2.2.5 细胞的病原检测.....	19
2.2.6 293T 驯化悬浮细胞不同接种量下的生长曲线制作	19
2.2.7 293T 驯化悬浮细胞的慢病毒包装验证以及与贴壁细胞慢病毒制备能力的比较	19
2.2.8 对冻存后的悬浮细胞进行复苏培养验证细胞生长情况及慢病毒包装能力	22
2.2.9 293T 悬浮细胞转染条件优化	23

2.2.10 钙离子浓度对悬浮 293 细胞结团和生长的影响	23
2.2.11 EDTA 螯合剂通过溶解钙粘连原理对结团细胞生长情况的影响	23
2.3 统计分析.....	24
3 结果与讨论.....	25
3.1 293T 贴壁细胞的快速悬浮驯化	25
3.2 293T 贴壁细胞的慢速悬浮驯化	27
3.3 病原检测结果.....	29
3.3.1 无菌检查结果.....	29
3.3.2 支原体检查结果.....	29
3.4 接种量对 293T 悬浮细胞生长曲线的影响.....	29
3.5 驯化 293T 悬浮细胞病毒包装能力验证	31
3.6 293T 悬浮细胞冻存复苏后稳定性的验证	33
3.7 293T 悬浮细胞慢病毒包装的转染条件优化	35
3.7.1 PEI 对慢病毒包装滴度的影响.....	35
3.7.2 质粒对比对慢病毒活滴的影响.....	36
3.8 Ca^{2+} 浓度对悬浮 293T 细胞结团和生长的影响.....	36
3.9 EDTA 螯合剂通过溶解钙粘连原理对结团细胞生长情况的影响	39
3.10 讨论.....	41
4 结论.....	44
4.1 全文总结.....	44
4.2 论文的创新点.....	44
4.3 论文的不足之处.....	45
5 展望.....	46
6 参考文献.....	47

1 前言

1.1 慢病毒概述

慢病毒属于逆转录病毒科家族,其病毒特征在于利用逆转录酶(RT)和整合酶(IN)将病毒基因组信息稳定地插入宿主基因组中。与其他逆转录病毒不同,慢病毒可以在非分裂细胞中复制,并在其特定宿主(人、猴、猫、马、牛、山羊和绵羊)中引起缓慢进展的疾病,包括免疫缺陷、贫血、肺炎和脑炎^[1-9]。尽管源自不同生物种类的慢病毒在基因组结构、受体用途以及致病特性等方面呈现多样性,然而绝大部分慢病毒载体均以人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 为基础。

目前,慢病毒载体(LV)作为临床试验中应用最为广泛的载体之一,已经成为基础生物学研究、功能基因组学和基因治疗领域普遍采用的载体。尽管已经开发了几种非人类灵长类替代品,如猫免疫缺陷病毒(FIV)或马传染性贫血病毒(EIAV),但在基因治疗中最常用的病毒载体是源自人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1)。LV 转导增殖和非增殖细胞的能力以及它们通过基因组整合提供的长期表达,使其成为多种基因疗法的首选载体^[10, 11]。免疫细胞(例如 T 细胞)的有效转导使它们成为癌症免疫疗法中有吸引力的工具,从而增加了人们对这些载体的兴趣^[12, 13]。在过继性 T 细胞癌症疗法中,自体 T 淋巴细胞经过基因改造以表达 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR),以扩展或重定向其抗原谱以针对恶性肿瘤细胞。在 5 年里,两种基于 CAR-T 的 LV 治疗产品已获得市场批准,其中一些产品正在进行临床试验,增加了 LV 制造需求^[14-16]。然而, LV 的工业生产一直充满挑战,产量低且成本效益低^[17]。为了满足商业临床需求,开发新的或优化慢病毒生产细胞系已被证明是最有效的方法。

1.1.1 慢病毒相关的基本结构

根据基因组结构,逆转录病毒科被分为简单逆转录病毒和复杂逆转录病毒,例子分别是致癌逆转录病毒(例如 MLV)和慢病毒(例如人类免疫缺陷病毒(HIV)-1)。慢病毒包括灵长类和非灵长类逆转录病毒,前者的例子有 HIV 和 SIV(猿猴免疫缺陷病毒),后者的例子有 FIV(猫免疫缺陷病毒)、BIV(牛免疫缺陷病毒)、CAEV(山羊关节炎-脑炎病毒)、EIAV(马传染性贫血病毒)和 visna 病毒。它们的基因组由 gag、pol 和 env 基因组成。gag 编码结构蛋白,而 Pol 基因编码伴随 ssRNA 的酶。其中,逆转录酶将病毒 RNA 逆转录为 DNA,整合酶催化原病毒 DNA 整合到宿主基因组中,蛋白酶参与 gag-pol 切割和病毒粒子成熟,env 编码病毒包膜^[18]。此外,复杂的逆转录病毒具有辅助基因,其协同作用调节病毒基因表达、组装和复制^[19]。另外,逆转录病毒基因组包含顺式作用序列,例如两个长末端重复序列(LTR),其中包含基因表达、逆转录和整合到宿主染色体中所需的元件。其他重要成分包括包装信号(ψ 或 ψ) (将特定的 RNA 包装成新形成的病毒体所需的)和多嘌呤束(PPT),后者是反转录过程中启动正链 DNA 合成的部位^[20-22]。

1.1.1.1 慢病毒 HIV-1

LV 原型载体系统源自人免疫缺陷型病毒 (HIV-1) [23]。HIV 具有长度约为 9kb 的单链正义 RNA 基因组, 编码九种病毒蛋白。编码三种主要结构蛋白: gag、pol 和 env。除了这些主要蛋白外, 病毒基因组还编码调节蛋白 tat 和 rev, 它们分别激活病毒转录并控制病毒转录物的剪接和核输出。另外四个基因编码辅助蛋白 vif、vpr、vpu 和 nef, 病毒基因组的两侧是病毒转录、逆转录和整合所需的 LTR (长末端重复序列), 基因组二聚化和包装信号 ψ 位于 5' -LTR 和 gag 基因之间[24]。HIV-1 侵入人体细胞后通过逆转录酶合成 dsDNA, 然后通过整合酶嵌入宿主 DNA 基团, 整合后的病毒被逆转录为病毒 RNA, 最后在宿主体内组装成病毒颗粒[23]。基因编辑的 HIV-1 病毒感染宿主细胞后不会组装成具有传染性的病毒颗粒, 因为只能完成宿主感染的“一个周期”[25]。因此, LV 载体在临床研究中具有较高的安全性。人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 作为慢病毒载体的基因转移介质治疗遗传疾病均进入临床阶段[26-28]。

1.1.1.2 慢病毒包装元件

作为最常用的慢病毒原型的 HIV-1 的基因结构模式如图 1-1 所示。存在三个主要结构蛋白: gag, 编码病毒衣壳蛋白; pol, 编码病毒酶; 以及 env, 编码包膜糖蛋白。以 HIV 为原型, gag 和 pol 基因被编码在未剪接的病毒信息上。

gag 多蛋白最初作为 Pr55 前体合成, 然后被病毒自身的蛋白酶切割成至少四个组成片段。最 N 端片段是基质蛋白 (MA), 在病毒颗粒中, 它占据包膜内的外围位点, 并参与将包膜蛋白锚定到病毒粒子中[29, 30]。病毒进入细胞后, MA 似乎还参与将整合复合物靶向细胞核, 并允许原病毒整合到非分裂细胞中[8]。MA 的 C 端是衣壳 (CA), 它是病毒核心的主要结构蛋白, 它也是一些商业 ELISA 病毒颗粒 (HIV-1 中的 p24) 检测中识别的蛋白质, 它负责病毒核心结构的完整性[31]。P9 或核衣壳 (NC) 蛋白是 gag 的第三个片段, 它有两个锌指状 CCHC 基序, 并参与将基因组 RNA 包裹在病毒内, 以保护其免受降解[32]。在病毒进入后, 它还具有促进病毒 RNA 反转录的功能[33]。研究表明 CA 和 NC 之间的“间隔”肽 P2 可能会影响 RNA 衣壳化[34]。

pol 基因产物最初以 gag/pol 融合蛋白的形式产生。对于 HIV, 这种情况发生在翻译过程中, 其中在 gag 开放框末端发生-1 移码, 导致核糖体开始在 pol 中翻译[35]。表达的融合蛋白是 Pr160 gag/pol 前体。pol 基因产物包括从 N 端将 gag 和 gag/pol 蛋白裂解成其组成部分的蛋白酶 (PR), 负责将 RNA 基因组转换为双链 DNA 分子的逆转录酶 (RT), 以及能够根据病毒 LTRs 中的特定识别序列将双链前病毒插入细胞染色质的整合酶 (INT)。

env 蛋白由单剪接 RNA 翻译而来。主要剪接供体位于非翻译区 5' gag 的上游, env 剪接受体位于 env 起始密码子的上游。单剪接转录本也编码 nef。env 蛋白被翻译在内质网 (ER) 结合的核糖体上产生 gp160 前体。gp160 易位到 ER 腔中, 被细胞蛋白酶裂解为跨膜 gp41 (TM) 和表面 gp120 (SU) 蛋白。这些非共价结合, 经历复杂的糖基化并输出到细胞表面, 可能作为三聚体或可能是四聚体复合物。

此外, HIV 具有许多小的开放阅读框, 大多数慢病毒中都存在同源物^[36]。tat 是一种强大的转录反式激活因子, 编码在双剪接信息上, 通过在 LTR 转录起始位点下游区域形成的 RNA 茎环结构, 以反式作用增强 RNA 聚合酶的持续合成能力, 这被称为 tat 响应 (TAR) 茎环。在早期感染中, 由于 env 内含子 (即 gag 和 pol 序列) 和 env 基因本身中发现的不稳定序列 (INS), 全长信使 RNA 被快速加工成双剪接形式^[37]。因此, tat 是生命周期早期的主要基因产物, 并积极反馈, 增强其自身的合成。

rev 蛋白由与 tat 外显子重叠的两个外显子编码。这种蛋白质在生命周期早期也大量产生, 随着它的积累, 它能够与环境编码区的 rev 反应元件 (RRE) 相互作用, 促进单个剪接和未剪接的信使 RNA 从细胞核输出到细胞质。Rev/rre 相互作用似乎克服了 INS 的影响, INS 有利于剪接。这就对病毒 RNA 的表达进行了时间控制, 在早期阶段产生了大量编码调节蛋白的 RNA, 然后由 rev 介导的切换到产生编码病毒结构和酶蛋白的单剪接和全长信使 RNA。

nef 基因位于 3' 末端, 该病毒具有许多功能。虽然最初被鉴定为负转录调节因子, 但它在体内似乎还有其他更重要的功能, 包括下调感染细胞表面的 CD4^[38, 39], 以及尚未确定的基本功能, 这些功能导致 nef (在 SIV 中) 的微小突变在体内传代时由病毒修复, 但在体外传代时重新出现^[40]。

vif 是一种辅助蛋白, 在某些系统中是无细胞感染所必需的。病毒的细胞间传播在 vif 阳性或阴性病毒中发生, 但在许多细胞系中, 只有在 vif 存在的情况下才能发生无细胞感染^[39]。有证据表明, vif 被包装在病毒颗粒中, 可能会影响病毒脱壳的早期步骤^[41]。

vpu 具有提高病毒输出效率的作用。这似乎有两个组成部分: 首先, 它解聚感染细胞的包膜蛋白和 CD4 蛋白之间的复合体, 在输出这两种蛋白质的过程中, 这些复合体出现在内质网中, 从而允许包膜输出; 其次, 它具有更普遍的输出功能, 在没有 vpu 的情况下, HeLa 细胞无法输出病毒或无包膜的 gag 颗粒^[39, 42, 43]。

vpr 是一种蛋白质, 具有许多建议和确定的功能^[44]。它被结合到病毒颗粒中^[45] (与 vpu 不同)。它具有比 tat 弱的反式激活能力^[39]。它似乎有助于艾滋病毒将其基因组整合到一个未分裂的细胞中^[46]。它已被证明在一些细胞系中诱导 G2 期细胞周期停滞^[47]。因此, 从向量的角度来看, 它既有想要的属性, 也有不想要的属性。

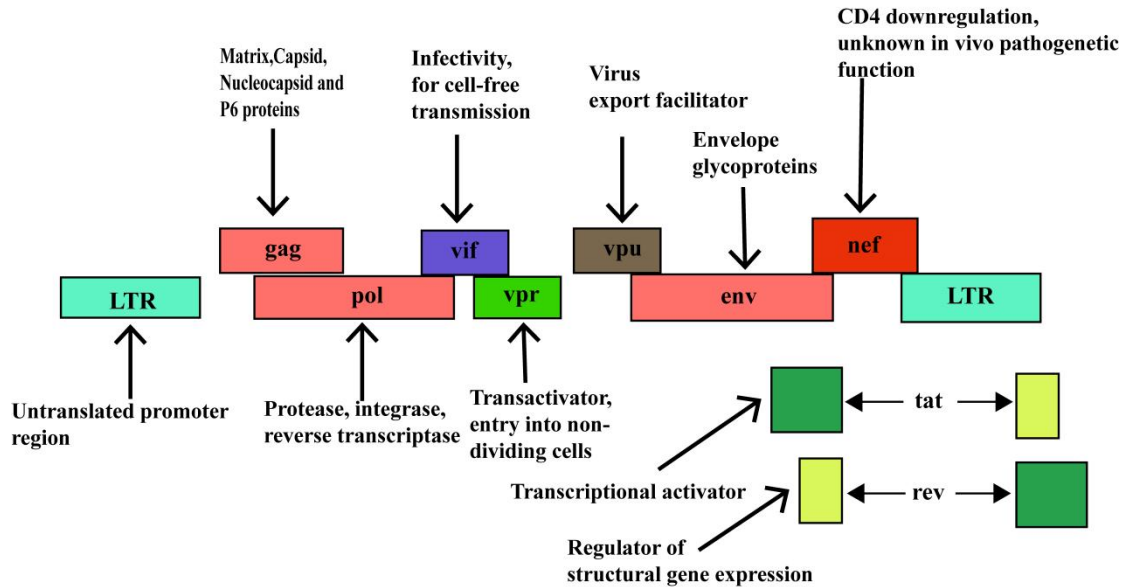


图 1-1 作为慢病毒原型的 HIV 基因结构和基因产物功能

Fig. 1-1 HIV gene structure and gene product function as a lentiviral prototype

1.1.2 慢病毒载体的发展

病毒作为细胞内的寄生物，已发展为有效运输 DNA 或 RNA 至宿主细胞的载体。不同特性的病毒被广泛鉴定，并可应用于基因治疗，包括重组腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒、逆转录病毒等，它们在实验室和临床上的应用已被广泛探讨。以 MLV 等逆转录病毒为基础的载体是最早被开发出来的载体之一，并被“成功地”用于基因治疗试验^[48-51]。

自 1981 年观察到第一例获得性免疫缺陷综合症（AIDS）流行病以来，人们就开始研究慢病毒。由于 HIV-1 LV 源自一种众所周知的、可能致命的人类病原体，其在基因治疗中的使用引起了安全问题。于是，以尽量减少产生具有复制能力的慢病毒（RCL），并消除任何致病性的 LV 载体工程便取得进展。科学家们开发了慢病毒包装系统来解决这些安全问题，同时试图最大限度地提高载体转导效率。这些包装系统采用分裂基因组方法，并经过不同世代的发展以提高安全性^[52, 53]。

第一代 LV 由三个表达质粒组成。其中一个表达 gag-pro-pol 并包含所有必需的反式作用基因，5' 长末端重复序列（LTR）被异源巨细胞病毒（CMV）启动子（FIG）取代（图 A）。第二个质粒含有包膜（env）基因。天然 HIV 包膜糖蛋白被水疱性口炎病毒（VSV-G）的异源病毒糖蛋白 G 取代。最后，在内部异源启动子的控制下，第三个质粒含有目的基因，该质粒含表达所需的所有顺式作用序列、包装信号（ ψ ）和 rev 响应元件序列（RRE）。尽管该系统提供了高滴度，但 RCL 可能是通过 gag-pro-pol 和转基因盒中重复的病毒序列之间发生的同源重组产生的^[24]。

第二代 LV 保留了三个质粒系统，并通过去除辅助基因来提高安全性，辅助基因对于载体生产不是必需的，但对于作为病原体的 HIV-1 很重要（vif、vpr、vpu 和 nef），

降低了病毒感染的可能性。RCL 的产生、细胞毒性和致病性。尽管如此，tat 和 rev 调控基因仍被保留（图 B）^[24]。

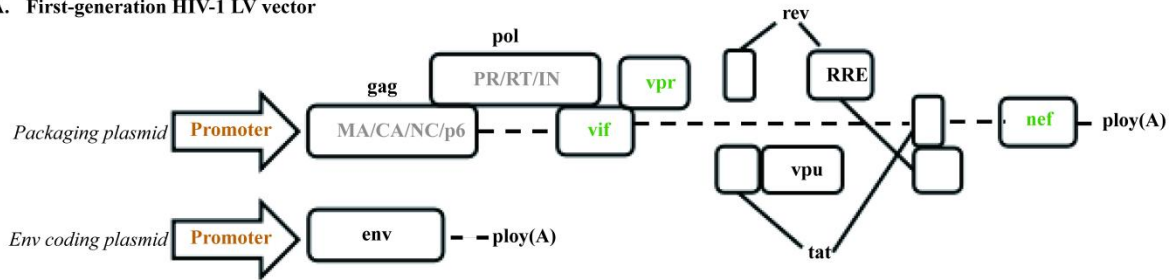
第三代系统是目前最常用的研发和临床系统（图 1C）。此外，通过将转移载体中 5' LTR 的 U3 启动子区域替换为巨细胞病毒、Rous 肉瘤病毒或 7tetO 诱导型启动子序列的强病毒异源启动子，实现了 tat 的独立性^[54]。由于保留的同源序列较少，因此安全性更高。虽然这种系统更安全，但由于需要额外的质粒，病毒滴度较低^[52, 55]。

第四代系统设计了独立的 rev，以减少 gag-pro-pol 和转基因质粒之间剩余的残留序列同源性（图 D）。通过密码子优化，也消除了对 rev 蛋白的需求。另一种方法是消除导致病毒转录本不稳定和 mRNA 降解的抑制序列（INS）。尽管如此，由于这些方法中 LV 滴度产量较低，第三代系统仍然是最常用的^[55-57]。

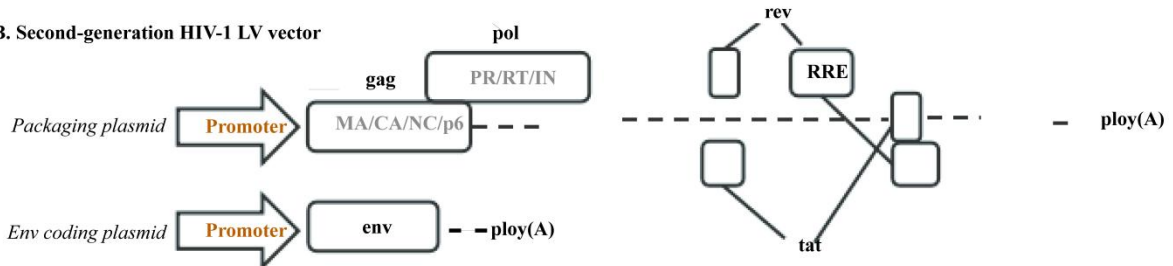
最近，对转基因构建体进行了进一步的修饰。设计了一种新颖独特的基因组结构，称为 LTR1，以避免 HIV-1 野生型序列转移到患者细胞中。 ψ 和 RRE 遗传元件放置在 3' LTR 下游，确保高效加工和包装^[58, 59]。

尽管为改进 LV 结构付出了很多努力，但仍需要进一步研究以提高其转导效率和制造^[60]。

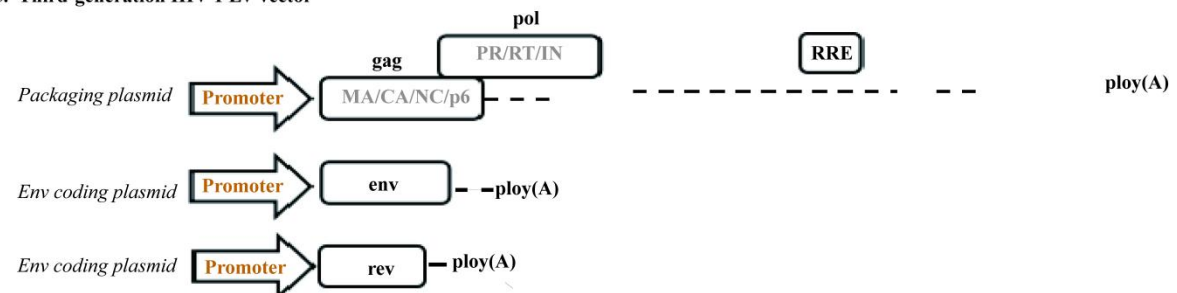
A. First-generation HIV-1 LV vector



B. Second-generation HIV-1 LV vector



C. Third-generation HIV-1 LV vector



D. Fourth-generation HIV-1 LV vector

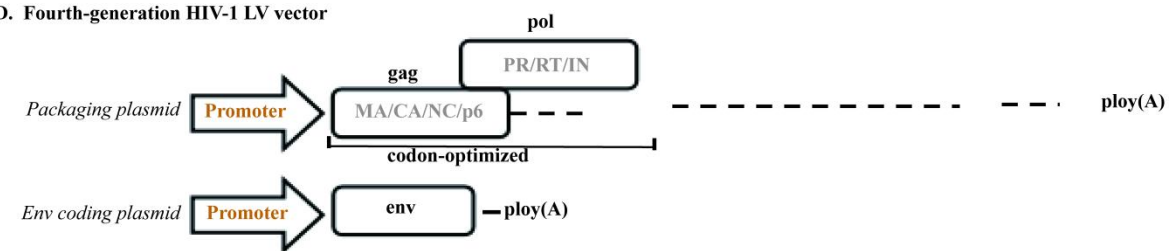


图 1-2 慢病毒载体发展开发的各种包装和结构示意图

Fig. 1-2 Schematic representation of the various packages and structures developed for lentiviral vector development

1.1.3 慢病毒载体的应用

LV 已被证明可以在体内转导中枢神经系统 (CNS) 内的大多数细胞类型, 包括神经元、星形胶质细胞、成体神经元干细胞、少突胶质细胞和神经胶质细胞^[12, 61-65]。LV 已广泛用于基因转移到中枢神经系统和神经系统疾病模型中的基因治疗^[65-68]。使用 LV 将基因转移到 CNS 的挑战之一是它们不能轻易穿过血脑屏障^[69]。利用 LV 转导这些不同组织的能力为影响这些不同器官的遗传性、获得性或复杂疾病的基因治疗开辟了新的可能性 (例如, 神经退行性疾病, 包括肾上腺脑白质营养不良 (ALD)、异

色性脑白质营养不良、帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症、先天性失明、肝脏疾病、血友病、代谢性疾病和溶酶体储存障碍等)。已经证实, LV 可以在模拟人类同类疾病的临床前动物模型中对这些不同的疾病进行有效的基因治疗^[64-76]。LV 还适用于各种干细胞/祖细胞的转导, 特别是包括造血干细胞(HSCs)。在多种血液和代谢疾病(例如, 血红蛋白疾病、严重的联合免疫缺陷、血友病等)的 LV 转导 HSC 后, 转基因在治疗相关水平上得到稳定表达^[77, 78]。在 LV 的背景下使用珠蛋白特异性调控元件获得红系特异性表达能力对于在球状细胞病动物模型中获得稳健和稳定的治疗效果至关重要^[79-81]。这些临床前的进展为 β -地中海贫血患者的第一阶段基因治疗临床试验铺平了道路^[82-84]。使用系统特异性调控元件可以有效阻止感兴趣基因在其他细胞类型中的异常表达, 从而增强了造血干细胞导向的 LV 方法的整体功效和安全性^[84]。

目前, 慢病毒最成功的应用是 CAR-T 疗法。嵌合抗原受体(CAR) T 细胞疗法是目前最成功的免疫疗法, 也是唯一获得批准的 T 细胞疗法^[85]。其原理是抽取患者或供体的 T 细胞, 利用慢病毒等载体将特定的受体基因导入 T 细胞, 使 T 细胞具有靶向性, 从而特异性地识别并杀死肿瘤细胞^[86]。迄今为止, 全球共有九种 CAR-T 产品获得批准。其中, 五种 CAR-T 产品使用慢病毒作为基因递送工具。

1.2 慢病毒生产的细胞系及培养方式

1.2.1 HEK-293T 细胞

当前, 多数 LV 载体生产方法都涉及首选共转染 HEK-293T 或 HEK-293 细胞。HEK-293T 细胞被优先选择的原因在于, 这些细胞内含有 SV40 T 抗原, 从而使得其在载体生产过程中具备更高的效能。此外, 与 HEK-293 细胞相比, HEK-293T 细胞表现出更高的细胞生长和转染效率。虽然目前还不能对“细胞环境”的改善做出彻底的解释, 但是, Gama-Norton 等人^[87]证明, 在稳定的 HEK-293 为基础的生产细胞系中, 含有 SV40 T 抗原的克隆比不表达 SV40 T 抗原的克隆表现出更高的载体生产率, 克隆之间的唯一区别是该抗原的表达和不表达^[87-89]。Smith 和 Shioda 在 CV-1 (SV40 T 抗原阴性) 和 COS-1 (SV40T 抗原阳性) 细胞的背景下也证明了 SV40 T 抗原存在于 LV 载体生产过程中的积极作用^[90]。HEK293 细胞与 HEK293T 细胞相比, 后一种细胞在与 LV 载体相关的筛选目的以及小规模自动化制造方面具有很高的兴趣, 因为载体质量(感染与总载体的比率更高, 污染细胞蛋白水平更低)得到了改善。然而, 使用 COS-1 细胞的主要缺点是这些细胞是强制性贴壁细胞, 而 HEK-293T 细胞可以适应在无血清培养基中悬浮生长, 特别适合大规模载体生产^[90]。

1.2.2 用于病毒生产的细胞培养系统

病毒载体的制造工艺包括多种基于贴壁或悬浮细胞生产培养物的技术。病毒载体的生产主要依赖于在二维(2D)静态系统中培养的贴壁细胞, 这些可以包括培养皿和细胞培养透气瓶中, 但更大规模的生产需要使用细胞工厂和滚瓶。培养条件的可扩展性和操作控制有限是这些系统的主要缺点。扩大培养表面积意味着增加相同平行培养

单元的数量（横向扩展），这在空间、操作、处理时间和污染风险方面提出了挑战。此外，也可以使用填充床生物反应器，例如 iCELLis®（PAL）、TideCell®（Vaccixcell）或 CelCradle™（Colifesciences）^[91]。集成灌流的固定生物反应器允许在封闭和受控的培养环境中放大贴壁细胞培养系统，提高细胞密度。大多数贴壁培养系统仍然添加动物来源的血清，如胎牛血清（FBS）。胎牛血清是最广泛使用的动物源性产品之一，但产品批次间的差异、微生物污染的风险、昂贵的价格和繁琐的下游纯化使其大规模应用非常困难。如今，各种无血清培养基可用于提供良好的胎牛血清替代品用于培养贴壁细胞，如 Pro293A-CDM 或无血清 UltraCulture™（LONZA），后者在其配方中包含重组蛋白或/和纯化的牛血清蛋白混合物以替代 FBS。

为了满足特定的工业需求，通过改变细胞的生长方式和生活环境，使细胞从贴壁生长的状态逐渐过渡到悬浮生长状态的过程称为驯化。贴壁培养细胞经过悬浮驯化可以转变为悬浮生长株^[92]。悬浮细胞的驯化过程经由人工操作，使贴壁细胞在逐渐适应悬浮培养条件时，逐渐生成对于细胞凋亡的拮抗反应，这样的反应对于细胞在无血清悬浮培养基中的存活和生长是至关重要的。如 MDCK^[93]、CHO^[94-98]、HEK 293SF^[99]、PK15、Marc-145、BHK21、Vero^[100]等 80 多种细胞已被成功驯化，用于生产诸多临床生物制品的生产领域。在工业化大规模生产中，细胞悬浮培养明显优于单层贴壁培养，是动物细胞首选模式^[101]。

1.3 慢病毒载体生产

1.3.1 小规模生产慢病毒载体

用于研发目的的小规模生产通常采用在培养皿、T 瓶、多托盘系统（细胞工厂、细胞堆栈）或 HYPERF 烧瓶中培养的表面贴壁细胞。在最佳融合状态（<50%）^[102]下，使用传统的磷酸钙法^[103]或最近开发的聚乙烯亚胺（PEI）方法^[104]将 DNA 导入，该方法具有几个优点，如独立于培养条件、不需要在转染后改变介质、适用于悬浮培养中的转染。对于小规模应用，还可使用其他高效的阳离子转染剂，包括脂质体、Fugene 或 293fectin，表达水平大幅提高^[105, 106]。

通过比较不同的细胞培养系统，Ausubel 等人没有观察到所评估的系统（T 型烧瓶、一层或十层 CF）之间产生的病毒滴度有差异^[89]。Kutner 等人发现，可能是由于氧气利用率的提高，HYPER 烧瓶中的培养物每表面单位能够产生比传统培养装置多约 10 倍的 LV 载体^[107]。另外，相对于传统培养皿培养方法中产生的上清液，载体产物原液更少受到细胞蛋白质和核酸的污染。

由于 HEK293T 细胞的附着性较弱，因此在滚瓶中进行载体生产存在一定困难，必须对转染条件进行仔细优化，以确保细胞能够有效附着。研究表明在 HEK-293 细胞中过表达 α -v 和 β -3 整合素会增强细胞的粘附能力，进而在滚瓶中实现高效的 LV 载体生产。然而，这种方法需要利用重组表达整合素的 HEK-293 细胞。

1.3.2 大规模生产慢病毒载体

在进行临床试验时，需要更大规模的载体批次，这要求生产方法做出规模扩大调整。可以选择横向扩展方法（增设额外生产单元）或者采用悬浮培养技术来实施，后者相比于贴壁细胞培养具有更佳的可扩展性。这两种方法将在下面介绍。

1.3.2.1 使用贴壁生长细胞进行大规模载体生产

LV 的大规模生产主要是小规模生产方法的直接放大（横向扩展），通过添加补充培养/生产单元来扩大培养表面。生产基本上是使用大量多托盘系统（细胞工厂（Cell Factories, CF））或细胞堆栈（CS））在平行培养中进行的。由于更容易操作，优选 10 个堆叠设备（CS-10），但原则上同样可以使用 40 个堆叠设备，但由于 CF-40 堆叠的重量增加，需要特定的处理系统。此外，所有板的气体交换和介质层可能并不相同，并且当使用 40 个堆叠装置时，使用显微镜进行生长控制非常困难。生产可以在层流气流工作台下以“开放模式”进行，也可以以半封闭模式进行，从而提高操作员、环境以及最终产品的安全性^[88, 89]。

未经处理的上清液通常含有 1 至 5×10^7 个感染颗粒（IP）/ml 的载体滴度，因此与小规模生产报告的滴度相似^[88]。然而，Greene 等人^[108]和 Ausubel 等人^[89]在大规模生产中也分别报告了 $0.5-1 \times 10^7$ 和 $0.5-2 \times 10^6$ 个转导单位（TU）/ml 的滴度^[109-111]。这些差异主要受载体成分的影响，如目的基因、所使用的启动子和任何额外的调控元件，但也受到目前尚未标准化的滴定方法的影响。

所有大规模生产方案都是针对基于 HIV-1 和 EIAV 的慢病毒载体开发的^[88, 112]。最近提出了一种基于中空纤维的半“大规模”LV 载体生产系统。将中空纤维与 HEK-293T 细胞接种，然后在附着后 24 h 用三种质粒转染^[113]。其优势在于它是一个封闭的、全自动的培养系统，其 LV 产量相当于三个 CF-10 堆叠。然而，这需要建立几个并行系统才能真正实现更大规模的生产。

1.3.2.2 使用悬浮培养物进行大规模载体生产

尽管贴壁细胞转染是生产 LV 的标准方法，但该系统不适合大规模生产。用于生产慢病毒的几个细胞系（293T、293FT 和 293SF-3F6）在（FreeStyle™293 和 F17, Invitrogen, Carlsbad CA, HyQSFM4TransF×293, HyClone, Logan, UT）培养基中适应悬浮培养。这些细胞很容易在悬浮液中生长，不需要微载体，因此它们的培养和扩增比贴壁生长的细胞容易得多^[114, 115]。此外，培养基中不含牛血清和动物源成分，降低了外来物质污染的风险，特别适合临床生产。细胞的悬浮培养可以通过在各种不同类型的容器中扩增来实现：如摇瓶、玻璃生物反应器、不锈钢生物反应器、波袋以及一次性搅拌槽。在 HEK-293T 细胞的情况下，已经在一次性使用的生物反应器中展示了 50L 规模的扩增、转染和慢病毒生产。

已有数据表明，悬浮培养细胞产生的 LV 滴度与贴壁细胞中得到的相似。悬浮细胞大量培养后获得的滴度在 $10^7 \sim 10^8$ TU/mL，而贴壁细胞系统产生的病毒滴度为 $10^6 \sim 10^8$ TU/mL^[114-116]。

在贴壁细胞中，LV 培养上清液一天可以至少收获两次（见上一节），增加了成本

效益。在悬浮液中，由于培养液不能从细胞中独立收集，这样的方法实施起来较为困难。Ansorge 等人评估了一种灌流系统，允许在 7 天内更换介质并连续收获^[115]。他们的结果显示，LV 滴度在基因转染后 48 至 96 h 达到峰值，表明多次收获也适用于悬浮培养。综上所述，悬浮细胞大规模生产 LV 是可行的，并显示出良好的生产能力

1.4 无血清培养基的悬浮驯化培养

1.4.1 无血清培养基的发展概述

细胞和组织培养已成为不可或缺的研究工具，血清通常用作细胞培养基的补充。血清中包含许多大分子、蛋白质、附着和扩散因子、以及低分子量营养物质、激素和生长因子。最常用的动物血清补充剂是胎牛血清（FBS）。使用血清的一个主要缺点是可能存在多种污染物。含 10% 血清的培养基中的蛋白质浓度范围为 6,200-10,000 mg/L，其中哺乳动物细胞中产生的特定重组蛋白的浓度范围为几至 1000 mg/L^[117]。如果蛋白质在功能上与血清蛋白相关，则可能无法将它们分离，从而使血清蛋白成为巨大的污染物。这种污染对于蛋白质药物的生产可能是灾难性的，并且也阻碍特定蛋白质性质的研究。由于血清批次之间存在差异，使用血清培养基可能难以重复实验结果，并且用于获取血清的方法受到伦理质疑。因此，生物制药行业的疫苗和治疗性蛋白的生产以及临床用途的生物技术产品应在无血清培养系统中制备^[118]。

血清是潜在的健康危害以及不必要的污染源。无血清、无动物源和无蛋白质培养基是细胞培养中含血清培养基的替代品，具有多种优点，培养基成分更清晰、成本以及血清中感染因子污染风险降低。无血清、无动物和无蛋白质培养基已广泛应用于生物制药行业。无血清培养物可以消除动物源性血清补充剂带来的潜在问题，例如批次差异和宿主动物病原体感染的风险。然而，让细胞适应无血清培养的过程复杂且耗时，并且结果受细胞系和培养基的影响。

1.4.2 无血清培养基的分类和特点

生长培养基可分为基于血清的、无血清的、化学成分明确的培养基。以血清为基础的培养基是最复杂的成分，其主要原因是血清是未知成分的补充，可能会被有害因素污染。无血清培养和化学成分确定培养有明显的区别，无血清培养基中可能含有未定义的动物源性产品，如血清白蛋白（从血液中提纯）、激素、生长因子、各种蛋白质等^[119]。未定义的动物源性产品含有被认为是污染物的白蛋白的脂质成分^[119]。与之形成鲜明对比的是，化学成分确定的培养基要求标识所有的成分及其浓度。

无血清培养技术的推广应用可以在很大程度上避免传统含血清培养所带来的风险和不利影响。无血清培养具有以下优缺点：

优点：

与含血清培养基相比，简化的成分比基于血清的培养基的成分更明确。污染物减少，传染源的潜在来源被消除。无血清培养基可能是更经济的选择^[120]。此外，无血清培养基还具有以下几个优点：

- (1) 更明确和许多成分已知的无血清培养，提高实验室之间和实验室内结果的重复性，为细胞的生长创造了一个更可控的环境。
- (2) 使用无血清培养基比使用含血清培养基更容易进行药物发现、生理学或基因表达研究。无血清培养基含有较少的可能干扰物。
- (3) 用于生产无血清培养基的材料大部分都是高度纯化的，因此大大降低或消除了外来物质污染培养物的风险。
- (4) 大多数无血清培养基都是即用型的，无需准备多组分试剂。

缺点：

- (1) 需要时间来适应特定细胞系在无血清培养基中的生长。细胞必须缓慢地脱离血清。
- (2) 此外，一些细胞系需要添加高成本特定于其细胞类型的生长因子或激素来克服特定培养基中的缺陷。
- (3) 无血清培养基的低蛋白质浓度（减少潜在污染源的优势）去除了剪切保护和附着生长基质中发挥作用的蛋白质。
- (4) 在无血清的培养基中细胞增殖通常较慢，有限的细胞系传代较少。
- (5) 尽管正在稳步改进，但可获得的适当质量控制的可用无血清培养基相当有限，而且产品往往比传统培养基贵。

1.4.3 细胞株无血清驯化培养

与可普遍用于各种细胞类型培养的血清培养不同，无血清培养高度依赖于细胞类型和培养基选择。有的细胞系直接更换为无血清培养基可能会导致细胞活力降低，并且由于缺乏许多生长因子而影响细胞增殖^[121, 122]。因此，从含血清培养到无血清培养需要逐步降低培养基中血清浓度^[123]。而有的细胞系在特定培养基中可在短时间内适应新的培养基条件，并且这些变化是快速引入的。无血清过渡培养的研究都集中在筛选用于建立悬浮培养物的多种商业无血清培养基，并比较细胞生长和生产效率^[124-126]。

研究发现 HEK-293 悬浮培养产生的衍生物会改变参与胆固醇生物合成的基因表达水平，并且在无血清培养基中培养的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞显示出与核苷酸合成和脂质代谢相关的基因表达水平的改变^[127, 128]。此外，一项研究强调了无血清培养对免疫刺激能力的影响，这与树突状细胞中氨基酸分解代谢和葡萄糖代谢的增强相关^[129]，这表明不同的培养基成分（例如无血清培养基）会影响细胞代谢组，并有可能影响其表型和功能能力。

除了设立无血清的培养基外，在确认合适的无蛋白质培养基时，还需注意以下几个方面：

- (1) 建立一个合理而具有适应性的驯化过程，将培养物从血清培养转变为无血清培养；
- (2) 适当提高培养细胞的接种密度；

- (3) 选择适当的细胞保护剂以抵抗损伤，由于对于含血清的培养物所选用的保护剂可能并不适用于无血清培养物；
- (4) 调整生物反应器，减小物理剪切力，并选择更精确的过程控制设置；
- (5) 制定液氮冻存细胞的方案和流程，选择合适的无血清冻存方案；
- (6) 确保用于无血清培养细胞的化学品、水和容器是干净的。

1.5 本课题的研究目的和意义

随着现如今生活习惯与生存环境的日益恶化趋势，越来越多肿瘤癌症成为危害全球性人类公共健康的重大疾病，也是一种致死率非常高的多发病和常见病^[130]。因此，肿瘤癌症准确的诊断和精准的治疗便显得尤为重要^[131]。在抗肿瘤治疗方面，CAR-T（Chimeric antigen receptor T cell）疗法具有特异靶向性、广泛应用性和持续抗肿瘤的效果，给重病抗癌患者带来曙光^[132]。CAR-T 细胞作为推出的新型精准靶向治疗肿瘤细胞技术，产品质量和治疗效果与其生产工艺密切相关，而 CAR-T 治疗的生产工艺中最关键部分就是慢病毒的生产^[133, 134]。

作为最常用的慢病毒包装细胞系就是 293T 细胞，在 HEK-293 细胞中转入猴病毒 40（simian vacuolating virus 40, SV40）大 T 抗原基因形成的高转衍生细胞株，即为 293T 细胞系^[88]。虽然 293T 包装慢病毒能够收获较高滴度的慢病毒，但是传统贴壁细胞培养方式是在含血清的培养基中贴壁生长，血清成为分离和纯化的主要障碍，因此，无血清培养基已成为细胞培养技术的发展方向^[135]。同时，悬浮细胞培养不需要胰蛋白酶消化，简化传代操作和减轻下游纯化压力，实现高密度培养，解决贴壁状态下生产空间需求大、人工成本高、产品批次质量不稳定，以及规模扩大受限等问题^[113]。在目前阶段，为了满足特定的工业需求，人们通过改变细胞的生长方式和生活环境，对细胞进行从贴壁到悬浮的驯化。贴壁培养细胞经过悬浮驯化可以转变为悬浮生长株^[93]。

综上所述，本文以 293T 细胞为研究对象，首先对贴壁细胞使用 3 种培养基分别进行快速降血清及慢速降血清的悬浮驯化方法。通过比较 FreeStyle™293、OPM-293 CD05 Medium、SMM 293-TII 培养基驯化悬浮细胞培养效果，从而选择适合 293T 悬浮细胞生长的低成本、化学成分限定、能包装出高滴度的无血清培养基，因其改变了载体细胞的生长方式，故在此基础上对转染条件进一步研究及优化。在驯化悬浮细胞的基础上，揭示了 Ca^{2+} 浓度与细胞结团尺寸的基本关系。此外，依据螯合剂（乙二胺四乙酸（EDTA））与正电荷离子有亲和力的原理，来溶解细胞表面的钙粘连，减少细胞无效聚团达到正常生长增殖。为解决细胞培养参数优化、高纯度高滴度慢病毒载体日益增加的需求，以及临床前大量的机制科研应用到临床治疗各阶段的各种难题发挥了至关重要作用。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞系及质粒

本实验涉及使用到的细胞系和质粒如表 2-1 所示：

表 2-1 实验所用细胞系及质粒

Table 2-1 Cell lines and plasmids used in the experiment

细胞系及质粒	来源
人胚肾细胞 293T 细胞	美国模式培养物保藏所 (ATCC)
慢病毒表达质粒 PTK-Kan	武汉波睿达生物科技有限公司
靶标质粒 PTK-CAR-mCD30-01	武汉波睿达生物科技有限公司
慢病毒包装质粒 pMDLg/pRRE	Addgene
慢病毒包装质粒 pRSV-Rev	Addgene
慢病毒包装质粒 pMD2.G	Addgene

2.1.2 主要试剂和材料

本实验使用的主要试剂和材料如表 2-2 所示：

表 2-2 实验材料

Table 2-2 Experimental material

名称	来源
DMEM 培养基	Gibco
Excell 胎牛血清	Excell
0.25% Trypsin-EDTA	Gibco
Typan Blue Solution, 0.4%	Gibco
0.9% 氯化钠注射液	Gibco
1×PBS	北京索莱宝科技有限公司
10×PBS	北京索莱宝科技有限公司
FreeStyle™293 表达培养基	Gibco
OPM-293 CD05 Medium	上海奥浦迈生物科技有限公司
SMM 293-TII	北京义翘神州生物技术有限公司
聚乙烯亚胺 (PEI MAX)	polysciences
Polybrene	上海普欣生物科技有限公司

无内毒素质粒大提试剂盒	天根生化科技有限公司
卡那霉素	上海国药
LB 液体培养基	自制
琼脂糖	Biowest
胰化蛋白胨	上海国药
酵母提取物	上海国药
琼脂	上海国药
异丙醇	上海国药
7-AAD Viability Staining Solution	Biolegend
mCD30 蛋白血清	武汉波睿达生物科技有限公司
Versine solution	Gibco
胎牛血清	四季青
慢病毒滴度快速检测卡（HIV-1 P24 蛋白快速检测卡）	北京博奥龙免疫技术有限公司
DMSO（二甲基亚砷）	Solarbio
无水 CaCl ₂ （分析纯）	中国国药

2.1.3 主要仪器与设备

本实验使用的仪器设备如表 2-3 所示：

表 2-3 实验仪器

Table 2-3 Instruments and apparatus

仪器名称	生产厂家
生物安全柜	ESCO
离心机	贝克曼
倒置显微镜	OLYMPUS 公司
血球计数板	Blaubrand
DW-86L628 超低温冰箱	海尔
电热恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器厂
CO ₂ 恒温培养箱	Heal Force
二氧化碳定轨摇床	苏州精骐，CO-06U
Milli-Q 纯水仪	Millipore 公司
GR60DA 立式灭菌器	南京庚辰科技有限公司
低速离心机	湘仪离心机仪器有限公司
Mr. Frosty™ 梯度降温盒	Thermo Fisher
50 L 液氮保存罐	成都金凤液氮容器有限公司

漩涡混匀器	美国 SCILOGEX 公司
流式细胞仪	贝克曼
JJ200 型精密电子天平	Li-cor Biosciences 公司
超净工作台	苏州净化
恒温摇床	上海智诚
NanoDrop 微量 UV-Vis 分光光度计	Thermo Fisher

2.1.4 主要溶液配置

- (1) 完全培养基配制: 在生物安全柜内取已 56 °C 30 min 灭活好的 ExCell 胎牛血清 10 mL 加入到 90 mL DMEM 培养液中混合均匀, 注明试液名称为 10%FBS, 4 °C 保存。
- (2) 第一混合液配制: 取 25 mL FreeStyle™293 表达培养基于 50 mL 一次性离心管中, 加入 25 mL 完全培养基混匀, 混合后的 ExCell 胎牛血清含量为 5%, 注明混合液名称为 5% FBS, 4 °C 保存。
- (3) 第二混合液配制: 取 40 mL FreeStyle™293 表达培养基于 500 mL 培养液瓶中, 加入 10 mL 完全培养基混匀, 混合后的 ExCell 胎牛血清含量为 2%, 注明混合液名称为 2%FBS, 4 °C 保存。
- (4) 第三混合液配制: 取 90 mL FreeStyle™293 表达培养基于 500 mL 培养液瓶中, 加入 10 mL 完全培养基混匀, 混合后的 ExCell 胎牛血清含量为 1%, 注明混合液名称为 1%FBS, 4 °C 保存。
- (5) OPM-293 CD05 Medium 与 SMM 293-TII 培养基梯度血清含量的配制也均按照 (2) (3) (4) 的步骤配制。

2.2 方法

2.2.1 细胞复苏

从液氮罐中取出 1 支 293T 贴壁细胞 (穿戴手套, 防止冻伤), 37 °C 水浴快速融化, 直至全部融化为液态, 立即传递至细胞房内, 喷洒 75%乙醇消毒液消毒, 使用无菌布擦干冻存管外壁后放入生物安全柜, 开盖后吸出细胞悬液, 加入已预先加入 9 mL 已复温的完全培养基至 50 mL 一次性离心管中混匀, 取样计数。

细胞计数: 使用移液器吸取 100 μ L 细胞悬液于 1.5 mL 离心管中, 加入 150 μ L 0.9%氯化钠注射液和 250 μ L Trypan Blue Solution, 0.4%稀释五倍计数, 吹打混匀, 染色 3 min。在血细胞计数板上架好盖玻片, 使用移液器吸取 10 μ L 染色后的细胞悬液加入血细胞计数板, 倒置显微镜下记下总活细胞数和染上蓝色的细胞数, 并计算出细胞密度和细胞活率 (细胞密度=总活细胞数/4 $\times$ 稀释倍数 $\times 10^4$, 细胞活率=总活细胞数/(总活细胞数+染上蓝色的细胞数) $\times 100\%$)。

将剩余的细胞以 1000 rpm 的速度在低速离心机上离心 5 分钟, 去除上清液后加入

10 mL 完全培养基重新悬浮细胞。使用移液器将所有细胞移入透气的 T75 细胞培养瓶中，然后将其放置在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。一旦细胞铺满培养瓶底部，即可进行传代。

2.2.2 细胞传代

将传代细胞放入生物安全柜中，使用移液管吸出培养基置于废液瓶中，用移液管吸取 2 mL PBS, pH7.2 (1×) 加入 T75 细胞培养瓶（透气）中，确保 PBS, pH7.2 (1×) 浸没过所有细胞后吸出所有 PBS, pH7.2 (1×)。使用移液管加入 2mL 0.05% Trypsin-EDTA 消化液（将 0.25% Trypsin-EDTA 稀释 5 倍）浸没 293T 细胞消化 2~5 min 后加入 2 mL 完全培养基终止，用移液管将所有细胞冲洗下来，吹打混匀，将所有消化细胞转入 50 mL 一次性离心管中，取样计数，计数步骤同 2.2.1。

使用低速离心机将消化后的细胞悬液在 50 mL 一次性离心管中 1000 rpm 离心 5min，吸弃上清，加入 4 mL 的完全培养基，吹打混匀细胞。使用移液管吸出细胞悬液分装至 1 瓶 T75 细胞培养瓶（透气）中，传代密度为 5×10^5 个/mL，补足新鲜完全培养基，达到 10 mL 的培养体系。在细胞培养瓶上标记细胞名称、代次，将细胞培养瓶水平放置，稍微倾斜摇晃，使细胞在细胞培养瓶底部分布均匀。将 T75 细胞培养瓶置于 37 °C，5% CO₂ 二氧化碳培养箱中培养。

细胞每 2 天传代一次，传代 ≥ 3 代后，将细胞传代六个 T75 细胞培养瓶 A、B 和 C 瓶用做快速驯化法，D、E 和 F 瓶用做慢速驯化法，传代密度为 5×10^5 个/mL，待细胞铺满细胞培养瓶底部时，进行驯化。

2.2.3 快速驯化法

按照以下 FreeStyle™293 表达培养基直接替换法、OPM-293 CD05 Medium 培养基直接替换法、SMM 293-T II 培养基直接替换法均各自进行 3 次重复实验。

2.2.3.1 FreeStyle™293 表达培养基直接替换法

- (1) 将细胞培养瓶 A 中完全培养基吸出，取 2 mL PBS, pH7.2 (1×) 加入细胞培养瓶 A 中，确保 PBS, pH7.2 (1×) 浸没过所有细胞后吸出所有 PBS, pH7.2 (1×)，加入 2 mL 0.05% Trypsin-EDTA 消化液浸没 293T 细胞消化 2~5 min，消化结束后，立即加入 2 mL FreeStyle™293 表达培养基终止消化用移液管将所有细胞冲洗下来，吹打混匀获得单细胞悬液转入 50 mL 一次性离心管中。吸取 100 μ L 细胞悬液计数，计数步骤同 2.2.1。
- (2) 使用低速离心机将消化后的细胞悬液在 50 mL 一次性离心管中 1000 rpm 离心 5 min，弃上清，加入 4 mL FreeStyle™293 表达培养基重悬细胞，吹打混匀细胞。将 293T 细胞以 3×10^5 个/mL 的密度接种至 1 瓶 125 mL 细胞培养锥形摇瓶中，FreeStyle™293 表达培养基补充体积至 25 mL，放入 37 °C，5% CO₂ 二氧化碳培养箱中的二氧化碳定轨摇床上悬浮培养，转速 130 rpm。
- (3) 细胞每 3 天传代一次（若直接替换 FreeStyle™293 表达培养基后细胞未能快速适应新培养基增殖缓慢，可延长 1 天培养时间），传代密度为 3×10^5 个/mL，体积

25 mL。传代前晃动摇瓶使细胞悬液均匀，取 100 μ L 细胞悬液计数，计数步骤同 2.2.1，根据细胞密度计算传代需要的细胞悬液体积，从原瓶取出加入到新培养瓶中，加入 FreeStyle™293 表达培养基补充至 25 mL。

- (4) 细胞连续以 3×10^5 个/mL 密度传代 3~5 次，此过程中细胞状态良好，且细胞活率均 $\geq 80\%$ ，说明此细胞已经适应悬浮细胞培养，即得 FreeStyle™293 表达培养基快速驯化细胞。
- (5) 将成功驯化获得的悬浮细胞冻存，细胞从二氧化碳培养箱内取出取样计数，计数步骤同 2.2.1。
- (6) 冻存液配制：90% FreeStyle™293 表达培养基+10%二甲基亚砷（DMSO），混合均匀，现配现用。
- (7) 将所有细胞悬液转移至 50 mL 一次性离心管中 1000 rpm 离心 5 min，去除上清。加入适量冻存液重悬细胞，将细胞密度调整为 $2.0 \sim 10.0 \times 10^6$ 个/mL，分装至 2.0 mL 外旋密盖冻存管中，每管 1 mL。将细胞冻存管放入程序降温盒中放入 -80°C 冰箱冻存不小于 16 h，转移到液氮中冻存不小于 10 天。

2.2.3.2 OPM-293 CD05 Medium 培养基直接替换法

使用细胞培养瓶 B，步骤同 2.2.3.1，所有加 FreeStyle™293 表达培养基的均替换加入 OPM-293 CD05 Medium 培养基，最后得到为 OPM-293 CD05 Medium 培养基快速驯化细胞。

2.2.3.3 SMM 293-TII培养基直接替换法

使用细胞培养瓶 C，步骤同 2.2.3.1，所有加 FreeStyle™293 表达培养基的均替换加入 SMM 293-TII培养基，最后得到为 SMM 293-TII培养基快速驯化细胞。

2.2.3.4 293T 悬浮细胞形态

在进行细胞培养传代的过程中，每一次转移细胞时，都需要记录和拍摄细胞的状态。良好的悬浮细胞形态包括细胞之间没有聚集、呈圆形、明亮、大小均匀、细胞核清晰可见，并且在培养液中悬浮均匀分布。这些记录和观察对于细胞的生长状况至关重要。

2.2.3.5 细胞比生长速率的计算

计算细胞的比生长速率 μ (d^{-1})：比生长速率 (d^{-1}) $\mu = \ln(C_t/C_0) / t$

式中 t 为时间 (d)， C_t 为时间 t 时活细胞密度 (cells/mL)， C_0 为初始接种活细胞密度 (cells/mL)。

2.2.4 慢速驯化法

2.2.4.1 FreeStyle™293 表达培养基缓慢替换法

按照以下 FreeStyle™293 表达培养基缓慢替换法、OPM-293 CD05 Medium 培养基缓慢替换法、SMM 293-TII培养基缓慢替换法均各自进行 3 次重复实验。

- (1) 将培养瓶 D 中完全培养基吸出，加入 2 mL PBS, pH7.2 (1 $\times$) 确保 PBS, pH7.2 (1 $\times$) 浸没过所有 293T 细胞后吸出所有 PBS, pH7.2 (1 $\times$)。加入 2 mL 0.25%

Trypsin-EDTA 消化液浸没 293T 细胞消化 2~5 min。消化结束后,立即加入 2 mL 第一混合液(5% FBS)终止消化用移液管将所有细胞冲洗下来,吹打混匀获得单细胞悬液转入 50 mL 一次性离心管中。吸取 100 μ L 细胞悬液计数,计数步骤同 2.2.1。

- (2) 使用低速离心机将消化后的细胞悬液在 50 mL 一次性离心管中 1000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入 4 mL 第一混合液(5% FBS)重悬细胞,吹打混匀细胞。吸出细胞悬液分装至 T75 细胞培养瓶(透气)中,传代密度为 5×10^5 个/mL,补足第一混合液(血清含量 5%)至 10 mL。放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 二氧化碳培养箱中静置培养。细胞每 2 天传代一次,传代 2 次后,进行下一步操作。
- (3) 降低血清浓度,第二混合液(2% FBS)以 5×10^5 个/mL 的密度接种细胞至 1 瓶 T75 细胞培养瓶(透气)中,体积 10 mL, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 二氧化碳培养箱中静置培养;细胞每 2 天传代一次,传代 2 次后,进行下一步操作。
- (4) 降低血清浓度,第三混合液(1% FBS)重悬细胞,以 5×10^5 个/mL 的密度接种细胞至 1 瓶 T75 细胞培养瓶(透气)中,体积 10 mL, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 二氧化碳培养箱中静置培养;细胞每 2 天传代一次,传代 2 次后,进行下一步操作。
- (5) 降低血清浓度,FreeStyle™293 表达培养基(无血清)接种细胞悬浮培养,以 3×10^5 个/mL 的密度接种至 1 瓶 125 mL 细胞培养锥形摇瓶中,培养体系 25 mL,放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 二氧化碳培养箱中的二氧化碳定轨摇床上悬浮培养,转速 130 rpm。细胞每隔 2 天传代一次,传代密度为 3×10^5 个/mL,体积 25 mL;传代前晃动摇瓶使细胞悬液均匀,取 100 μ L 细胞悬液计数,计数步骤同 2.2.1,根据细胞密度计算传代需要的细胞悬液体积,从原瓶取出加入到新培养瓶中,保持接种密度 3×10^5 个/mL,培养体系 25 mL;传代 2 次,此过程中细胞无明显结团现象,且 3 次细胞传代的活率均 $\geq 80\%$,说明此细胞已经适应悬浮细胞培养,即得 FreeStyle™293 表达培养基慢速驯化细胞。
- (6) 细胞传代过程中如发现细胞有结团现象,可采取用移液管轻轻吹打细胞悬液分散细胞。
- (7) 将获得的 FreeStyle™293 表达培养基慢速驯化细胞冻存,细胞从二氧化碳培养箱内取出取样计数,计数步骤同 2.2.1。
- (8) 冻存液配制:90% FreeStyle™293 表达培养基+10%二甲基亚砷(DMSO),混合均匀,现配现用。
- (9) 将所有细胞悬液转移至 50 mL 一次性离心管中 1000 rpm 离心 5 min,去除上清。加入适量冻存液重悬细胞,将细胞密度调整为 $2.0 \sim 10.0 \times 10^6$ 个/mL,分装至 2.0 mL 外旋密盖冻存管中,每管 1 mL。将细胞冻存管放入程序降温盒中放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存不小于 16 h,转移到液氮中冻存不小于 10 天。

2.2.4.2 OPM-293 CD05 Medium 培养基缓慢替换法

使用细胞培养瓶 E,步骤同 2.2.4.1,所有使用 FreeStyle™293 表达培养基的均

替换为 OPM-293 CD05 Medium 培养基，最后得到为 OPM-293 CD05 Medium 培养基慢速驯化细胞。

2.2.4.3 SMM 293-TII培养基缓慢替换法

使用细胞培养瓶 F，步骤同 2.2.4.1，所有使用 FreeStyle™293 表达培养基的均替换为 SMM 293-TII培养基，最后得到为 SMM 293-TII培养基慢速驯化细胞。

2.2.4.4 293T 悬浮细胞形态

在慢速驯化时，每进行一次传代均需进行拍照记录留存细胞在贴壁，半贴壁以及悬浮形态时的状况，最终适应悬浮细胞的状态特征应为：细胞透亮单一，在培养液中悬浮生长。

2.2.4.5 细胞比生长速率的计算

比生长速率 μ (d^{-1}) 计算公式同 2.2.3.5

2.2.5 细胞的病原检测

2.2.5.1 无菌检查

无菌检查按照《中华人民共和国药典（2015 年版三部）》进行检查。配制硫乙醇酸盐流体培养基与胰酪大豆胨液体培养基，在硫乙醇酸盐流体培养基中接种生孢梭菌，32 °C培养 2 天，全部有菌生长；在胰酪大豆胨液体培养基接种枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌，25 °C培养 3 天，全部有菌生长。结果说明配制的两种培养基符合无菌性检查的要求。

2.2.5.2 支原体检查

支原体检查培养法按照《中华人民共和国药典（2015 年版三部）》和《中华人民共和国兽药典（2015 年版三部）》进行检查。支原体检测前，检查支原体培养系统的活力。首先，盲传两代支原体生长培养基。接着，将肺炎支原体（ATCC 15531）分别以 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 的稀释度接种到支原体肉汤培养基中，培养七天后， 10^{-7} 、 10^{-8} 培养基变黄，表明支原体肉汤培养基的灵敏度达到了必要的标准。将口腔支原体

（ATCC 23714）分别以 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 的接种稀释度接种到精氨酸支原体肉汤培养基中。培养 7 天后， 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 培养基变红，表明培养基具有必要的灵敏度符合要求。

2.2.6 293T 驯化悬浮细胞不同接种量下的生长曲线制作

符合要求的驯化悬浮细胞将每隔 2 天进行一次传代，当存活率均高于 90%时，将以 3×10^5 个/mL 的细胞密度进行传代，以 25 mL 体系在培养锥形摇瓶中进行培养（条件为 37 °C、5%二氧化碳下，转速为 130 r/min）。从稳定培养中选择第四代的细胞，分别以 2×10^5 个/mL， 3×10^5 个/mL， 4×10^5 个/mL， 5×10^5 个/mL 为 A 组、B 组、C 组、D 组，以四组细胞密度分别培养 8 天，每 24 h 采集一次观察，并用台盼蓝染色法来记录细胞的生长状况。

2.2.7 293T 驯化悬浮细胞的慢病毒包装验证以及与贴壁细胞慢病毒制备能力的比较

2.2.7.1 靶标质粒和慢病毒包装质粒的提取

本文章使用的是第三代四质粒慢病毒包装系统,把所使用到的靶标质粒和三种包装质粒分别按一定量和 Kan 抗性加入到各自对应的 100 mL LB 液体培养基中,在经过一夜 220 rpm/min 摇床培养后,采用无内毒素质粒大提试剂盒来提取质粒,具体步骤如下:

使用前请确保先在漂洗液 PW 中加入 200 mL 无水乙醇,在 P1 中加入 RNaseA。

- (1) 收集细菌,室温 8500 g,离心 3 min (注意:最佳情况是菌液的用量应能充分降解)。
- (2) 向(1)中菌体沉淀加 8 mL P1,保证充分摇晃混匀沉淀。
- (3) 继续加入 8 mL P2,立刻轻柔混匀 5-6 次,室温放置 5 min。
- (4) 添加 8 mL P4,立刻轻柔充分混匀 7-8 次,室温放置 10 min。8500 g,离心 10 min,收集滤液至干净离心管。
- (5) 处理吸附柱 CP6,加入 2.5 mL BL,8500g,离心 2min,弃掉废液,吸附柱备用。
- (6) 向(4)滤液加入约 0.3 倍体积的异丙醇,充分混匀分量分次加入吸附柱 CP6 中,每次均为 8500 g,离心 2 min,弃废液收集在吸附柱。
- (7) 向 CP6 中加入 10 mL PW,8500 g,离心 2 min,弃废液。
- (8) 重复步骤(7)的操作。
- (9) 向 CP6 中加入 3 mL 无水乙醇,8500 g,离心 2 min,弃废液。
- (10) 吸附柱空离,8500 g,离心 2 min,去除漂洗液。
- (11) 将吸附柱 CP6 重新放到干净离心管,向吸附柱膜中间滴加
- (12) 将吸附柱 CP6 置于一个干净的 50 mL 收集管中,将 1-2 mL 的洗脱缓冲液 TB 滴加至吸附膜中间位置的,放置 7 min,离心 2 min, -20 °C 保存备用。

2.2.7.2 293T 悬浮细胞的慢病毒包装验证

根据以上驯化重复实验比较,选取快速和慢速 6 种驯化方法中效果良好的悬浮细胞株进行复苏扩增培养至 125 mL 细胞培养锥形摇瓶中,培养 72±4 h 后进行下一次传代,传代次数不小于 3 代。

- (1) 第 4 代培养 72±4 h 后进行包毒,细胞包毒前取样计数,记录转染前细胞密度及活率,若细胞活率>80%,不论细胞密度高低,按照当前密度直接进行转染;若细胞活率<80%,细胞丢弃。
- (2) 测量待转染的细胞悬液体积,取其体积的 1.5%~5% (通常取 5 mL) 的培养基,分别加入到两个 50 mL 离心管中,并在管子上做上标记,一个标记为 T,另一个标记为 D。
- (3) 转染体系比例: 12: 10: 6: 5 (PTK 为三代载体,四质粒包装体系)
(以 100 mL 细胞悬液体系为例)

D 管:

DNA Mix	DNA 量/皿
PTK 靶标质粒	36.4 μg
pMDLg/pRRE	30.4 μg
pRSV-Rev	18.2 μg
pMD2.G	15.2 μg

T 管:

试剂名称	体积/皿
PEI (1 mg/mL)	300 μL
对应的培养基	5 mL

- (4) 在 D 管中加入适量的质粒，在 T 管中加入 PEI MAX，盖上盖子，摇动混合一分钟，然后在室温下放置 5 min。随后，用移液器将 T 管中的液体逐渐转移到 D 管中，添加时轻轻摇晃 D 管。全部添加完毕后，盖上盖子，在涡旋振荡器上充分混合，并在室温下放置 30 min。
- (5) 静置期结束后，将 D 管中的液体放入细胞摇瓶中轻轻摇动混合，然后将待转染的细胞摇瓶从培养箱中取出。在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下，以 130~150 rpm 的转速将细胞摇瓶重新放入二氧化碳水平摇床上。
- (6) 细胞转染 72 $\pm$ 4 h 后，使用移液管将细胞悬液移到 50 mL 一次性离心管中 300 g 离心 5 min 去除细胞沉淀，收集上清液至新的 50 mL 一次性离心管中再 3000 g 离心 25 min，保留上清液。取 100 μL 离心上清液加入慢病毒滴度快速检测卡（HIV-1 P24 蛋白快速检测卡）检测孔，10~15 min 后对快检卡显色条带进行观察。要确定慢病毒储备液上清液中是否含有 P24 蛋白，使用慢病毒滴度快速检测卡。P24 快速检测卡无效需要重新检测时 C 带不显色，T 带不着色且为阴性，表明 mCD30-02 慢病毒储备液的上清液中没有 P24 蛋白。C 带着色，T 带不着色，则表明呈阴性无 P24 蛋白。T 带和 C 带有颜色则为阳性，表明 mCD30-02 慢病毒储备液上清液中含有 P24 蛋白。另取 1 mL 病毒上清液到 1.5 mL 灭菌离心管中留做滴度检测。
- (7) 慢病毒原液活性滴度：六孔板铺板，293T 贴壁细胞密度 5×10^5 个，每孔 2 mL。将适量的病毒上清按梯度和 4 $\mu\text{g/mL}$ polybrene 加入到提前铺好的六孔板中摇晃均匀，放入培养箱培养 3 天后上流式检测滴度。滴度计算公式： $q=X\times 5\times 10^5\times 1000/N$ （式中：q 为病毒滴度，单位为 TU/mL，代表每 mL 液体中可转导载体细胞的病毒颗粒数；X 为阳性细胞比例，一般取 10%-20%；N 为病毒终体积，单位为 μL 。
- (8) 慢病毒原液活性滴度检测结果出来后，对包毒能力最高的对应组进行重复包毒

实验。

2.2.7.3 贴壁细胞慢病毒制备

- (1) 将 293T 贴壁细胞从液氮取出快速复融培养，连续贴壁扩增传代次数不小于 3 代。
- (2) 将细胞从培养箱取出，显微镜观察确认细胞长势及贴壁形态正常。移液管小心吸弃培养瓶中的上清悬液，加入 5 mL PBS 进行冲洗吸弃，再取 8 mL PBS+2 mL 0.05% Trypsin-EDTA 消化后加 10 mL DMEM 完全培养基阻止消化，反复吹打混匀转移到无菌 50 mL 离心管中，取少量进行计数。离心管中细胞 300 g，离心 5 min，弃掉上清，根据计数结果及需要细胞量取完全培养基重悬细胞。
- (3) 将 $4\sim5\times10^6$ 个细胞转移到 100 mm 的培养皿中，加入完全培养基至 10 mL，盖上培养皿，按前后和左右方向混合 4 次，注意不要将细胞翻转，否则会导致细胞分布不均。在 37 °C 和 5% CO₂ 温度下培养 16-24 h。
- (4) 第二天用 10 倍放大镜检查细胞，观察用做慢病毒包装细胞的融合度是否达到 80%-90%，如若达到即可进行慢病毒包装。
- (5) 以一个 100 mm 皿为例配制转染体系

D 管：

DNA Mix	DNA 量/皿
PTK 靶标质粒	3.64 µg
pMDLg/pRRE	3.04 µg
pRSV-Rev	1.82 µg
pMD2.G	1.52 µg

T 管：

试剂名称	体积/皿
PEI (1 mg/mL)	30 µL
DMEM 培养基	500 µL

- (6) 按照 D 管中的比例加入到 500 µL 无血清 DMEM 培养基中，静置 5 min；混合 D 管和 T 管，充分吹打摇晃均匀，室温静置 25 min。
- (7) 将 D 管和 T 管混合物逐滴加入 (2) 中培养皿，上下左右摇晃均匀，放入培养箱。
- (8) 16-24 h 补 5 mL 的 DMEM 完全培养基，转染后的 72±4 h 吸取培养皿中的慢病毒上清，使用移液管将细胞悬液移到 50 mL 一次性离心管中 300 g 离心 5 min 去除细胞沉淀，收集上清液至新的 50 mL 一次性离心管中再 3000 g 离心 25 min，保留上清液。另取 1 mL 病毒上清液到 1.5 mL 灭菌离心管中。
- (9) 慢病毒活性滴度检测方法同 2.2.6.1 (7) 一致。

2.2.8 对冻存后的悬浮细胞进行复苏培养验证细胞生长情况及慢病毒包装能力

将 2.2.3 与 2.2.4 快速慢速驯化效果良好的冻存悬浮细胞进行快速复融到 125 mL 的培养瓶培养（使用对应培养基），每隔两天一传代，连续培养 14 代，每次传代时取样用台盼蓝染色法来记录细胞密度和细胞活率并记录细胞生长形态，对细胞传代稳定性进行监测并验证复苏后悬浮细胞是否仍具有慢病毒包装能力，慢病毒包装及检测方法见 2.2.6.1。

2.2.9 293T 悬浮细胞转染条件优化

在许多领域中，都有比较规律的、共通的优化模式，然而当几种优化模式结合在一起时，并没有一种特别固定的模式。在选择变量和水平时，有必要查阅相关的科学文献，并咨询借鉴各种实验室的经验来进行确定。细胞主要的慢病毒转染方法同 2.2.7.2，为了获得最精确的优化结果，通常采用单因素实验以及将两种或两种以上优化技术结合起来。

2.2.9.1 DNA:PEI 比例优化

使用以上实验驯化方法筛选出的最佳 293T 悬浮细胞，运用上述生长曲线得出的最佳接种密度将其进行接种放大扩增培养，每隔两天传代一次，转染前进行取样计数，控制细胞的转染密度为 2×10^6 个/mL。此次实验的研究条件质粒浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，按照 12: 10: 6: 5 的质粒配比，分别采取 DNA: PEI=1: 1、DNA: PEI=1: 2、DNA: PEI=1: 3、DNA: PEI=1: 4 的添加量，进行三组平行实验。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 转染，72 $\pm$ 4 h 收毒。使用六孔板铺板检测慢病毒活性滴度（方法同 2.2.7.2（7））。

2.2.9.2 质粒配比优化

同样使用筛选出的最佳驯化 293T 悬浮细胞，用最优接种密度进行扩增培养，转染前取样计数。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下控制转染密度为 2×10^6 个/mL，质粒浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，用上述优化 DNA: PEI 比例，分别采取靶标质粒: BZ1K: BZ2K: BZ3K=12: 10: 5: 6、12: 10: 6: 5、18: 10: 6: 5、12: 15: 9: 7.5 进行三组平行实验，72 $\pm$ 4 h 收毒。使用六孔板铺板检测慢病毒活性滴度（方法同 2.2.7.2（7））。

2.2.10 钙离子浓度对悬浮 293 细胞结团和生长的影响

考查 Ca^{2+} 浓度对 293 悬浮细胞生长和结团的影响，使用水溶性 CaCl_2 调整 Ca^{2+} 浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4 和 0.8 mmol/L 的无血清培养基，在 6 孔板中按每孔 5.0×10^5 个数接种驯化悬浮细胞，添加不同 Ca^{2+} 浓度的培养基至每孔 2 mL 的体系，放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 二氧化碳培养箱中的二氧化碳定轨摇床上悬浮培养，转速 130 r/min，24 h 和 48 h 通过计数及拍照记录细胞的状态。

2.2.11 EDTA 螯合剂通过溶解钙粘连原理对结团细胞生长情况的影响

使用驯化前期结团现象相对严重的细胞，采用 6 孔板按一定的密度接种（每孔 2 mL 的体系），留一组空白对照，其余添加一定梯度的螯合剂（EDTA），放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中的二氧化碳定轨摇床上悬浮培养，转速 130 r/min，48 h 和 72 h 通过计数及拍照记录细胞的状态。

2.3 统计分析

应用 ImageJ-win64 和 Origin 2021 软件进行图像处理。本研究数据代表了三个独立的实验，并使用 GraphPad Prism 8.0.2 (263) 进行统计分析，实验数据以均值表示，组间比较采用双因素方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示显著性或极显著差异。

3 结果与讨论

3.1 293T 贴壁细胞的快速悬浮驯化

使用快速降血清(A组:FreeStyle™293 表达培养基,B组:OPM-293 CD05 Medium,C组:SMM 293-TII培养基)与慢速降血清(D组:FreeStyle™293 表达培养基,E组:OPM-293 CD05 Medium,F组:SMM 293-TII培养基)的两种驯化方法,成功将贴壁培养 293T 驯化成悬浮生长的 293 细胞。如图 3-1 所示,采用快速驯化方法中每次传代均以 3×10^5 个/mL 接种,B组(OPM-293 CD05 Medium)细胞密度可达 2×10^6 个/mL 左右明显高于 A 组(FreeStyle™293 表达培养基)和 C 组(SMM 293-TII培养基),生长速度及倍增时间逐步稳定;同时 B 组的细胞活力稳定维持在 90%以上并高于 A 组和 C 组(见图 3-2)。在第 3 天传第一代之后,根据公式计算出细胞的比生长速率,B 组细胞的比生长速率明显高于 A 组和 C 组(图 3-3)。

图 3-4 为 B 组(OPM-293 CD05 Medium)1、3、5 代下细胞形态图,可以看出起初细胞黏团严重,会有细胞碎片,经过吹散去团多次传代驯化后,细胞黏团减少且大部分细胞散在分布,单个细胞透亮,部分细胞呈花生状分布,所以表明快速驯化方式下的 B 组(OPM-293 CD05 Medium)驯化效果比较好。

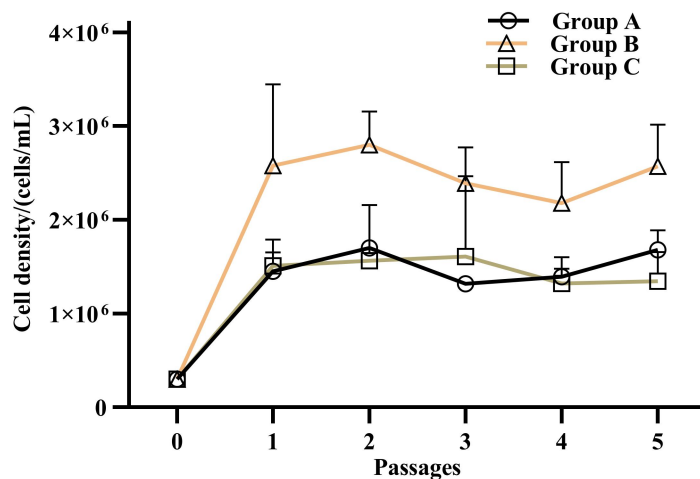


图 3-1 3 组不同培养基快速驯化时细胞生长密度曲线图

Fig. 3-1 Schematic diagram of the rapid domestication of 3 groups of different media

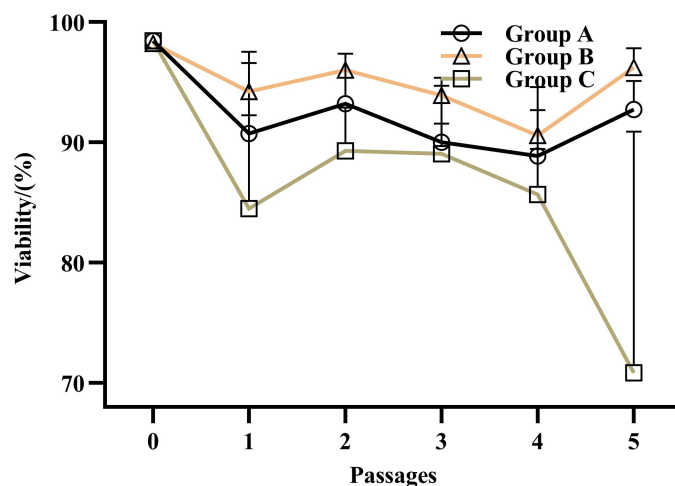


图 3-2 3 组不同培养基快速驯化时细胞活率曲线图

Fig. 3-2 Cell viability profiles during rapid domestication in 3 groups of different media

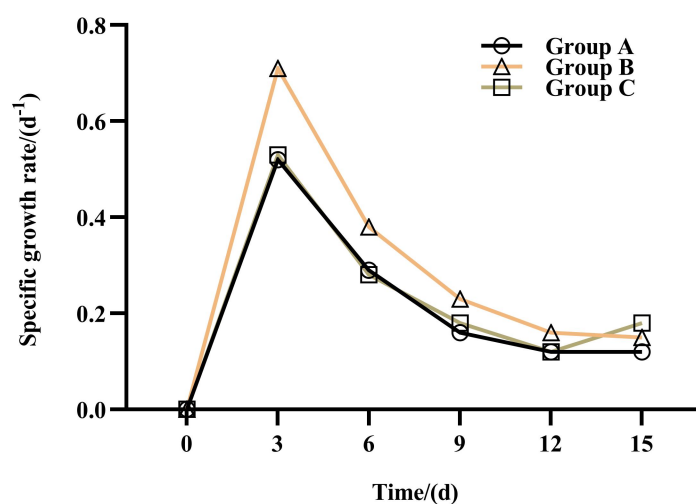


图 3-3 3 组不同培养基快速驯化时比生长速率曲线图

Fig. 3-3 Schematic diagram of the rapid domestication of 3 groups of different media

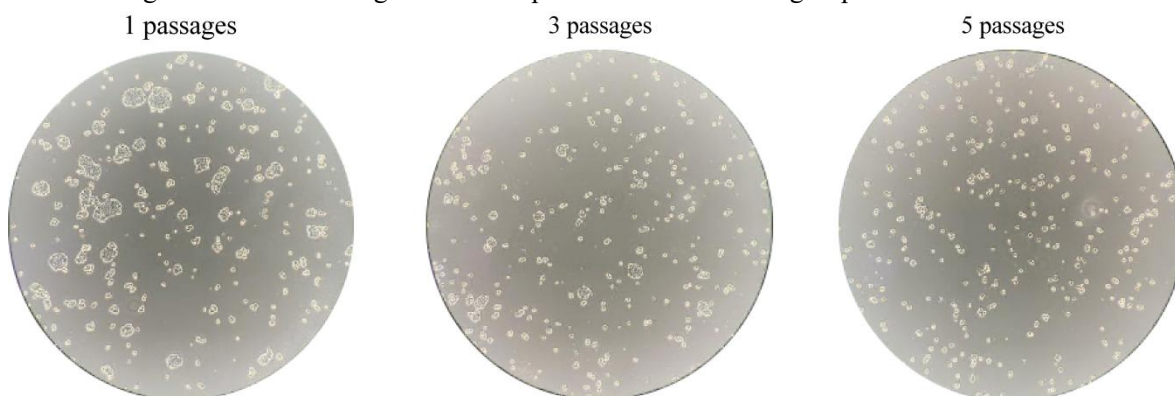


图 3-4 快速驯化时 B 组培养基 (OPM-293 CD05 Medium) 培养的 1、3、5 代 10×物镜下细胞生长密度形态图

Fig. 3-4 Morphological picture of cell growth density under 10× objective microscope of 1, 3 and 5 generations cultured in group B medium (OPM-293 CD05 Medium) during rapid domestication.

3.2 293T 贴壁细胞的慢速悬浮驯化

慢速驯化采用由血清含量从 10%→5%→2%→1%→0%的缓慢降血清方法将贴壁细胞驯化成 293 悬浮细胞。实验结果显示 D 组 (FreeStyle™293 表达培养基) 相对 E 组 (OPM-293 CD05 Medium) 和 F 组 (SMM 293-TII培养基) 的细胞密度及活力均呈现较优趋势 (见图 3-5、3-6)。如图 3-7 所示, 在第 2 天传第一代之后, 根据公式计算得出, D 组的细胞比生长速率高于 F 组, 明显高于 E 组。

如图 3-8 所示, 在贴壁阶段, 无血清培养液中血清含量从 10%降到 5%时, 传代 2 代后含 5% FBS 的细胞生长状态与常规细胞基本一致。血清含量从 5%降至 1%-2%的过程中, 传第一代时, 培养液中有部分漂浮细胞, 且贴壁细胞出现大量结团生长趋势, 细胞传两代后可按常规方法进行分瓶传代。细胞从贴壁转到悬浮状态时, 起悬后细胞生长速度不稳定, 起初会有大量聚团现象, 多次传代后含 0% FBS 的细胞分散性好, 细胞透亮, 生长状态好 (见图 3-8)。以上实验证明慢速驯化方式下的 D 组 (FreeStyle™293 表达培养基) 驯化效果比较好。以上两种方法 B 组和 D 组的结果说明成功完成了贴壁细胞的悬浮驯化, 但 B 组使用 OPM-293 CD05 Medium 培养基快速驯化的方法更简单快捷更省时省力, 驯化效果比较好可以应用。

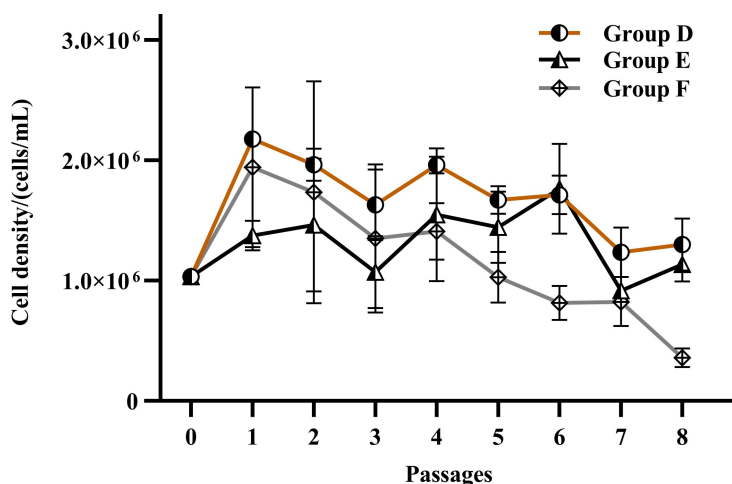


图 3-5 3 组不同培养基慢速驯化时的细胞生长密度曲线图

Fig. 3-5 Cell growth density profiles at slow domestication in 3 groups of different media

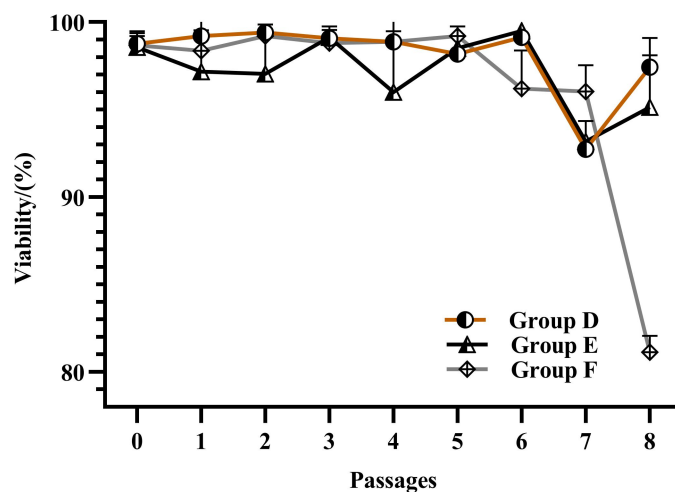


图 3-6 3 组不同培养基慢速驯化时的细胞活率曲线图

Fig. 3-6 Cell viability profiles at slow domestication in 3 groups of different media

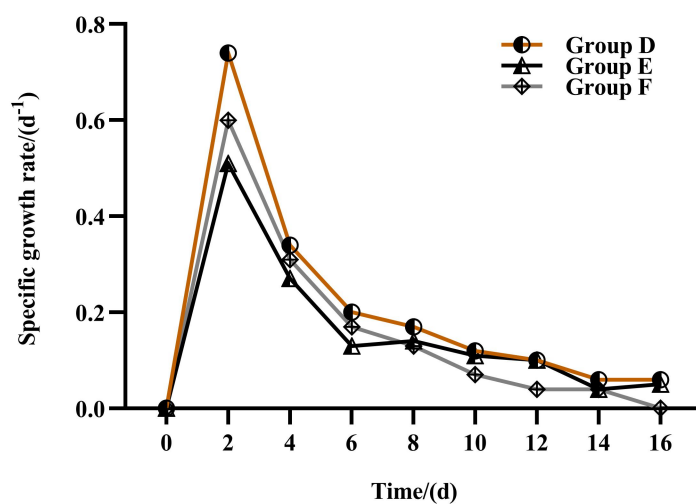


图 3-7 3 组不同培养基慢速驯化时的比生长速率曲线图

Fig. 3-7 Specific growth rate profiles of 3 groups of different media at slow rate of domestication

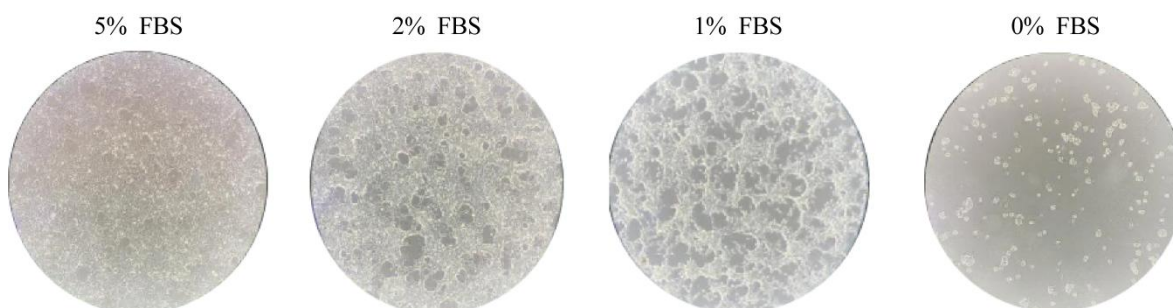


图 3-8 慢速驯化时 D 组培养基 (FreeStyle™293 表达培养基) 中依次含 5%、2%、1%、0%血清培养

Fig. 3-8 Morphology of cells cultured in group D medium (FreeStyle™293 Expression Medium) containing 5%, 2%, 1% and 0% serum sequentially during slow domestication

3.3 病原检测结果

3.3.1 无菌检查结果

直接观察检测:在对 293T 悬浮细胞扩增培养过程中的细胞状态进行显微镜观察时,发现瓶中的细胞培养液是清澈的,目测没有微生物生长或漂浮的微生物。

接种培养检测:将 293T 悬浮细胞上清液接种到硫乙醇酸盐液体培养基(培养温度:32 °C)和胰酪大豆肉汤培养基(培养温度:35 °C、25 °C)中 14 天后,未观察到细菌生长,这表明已建立的 293T 悬浮细胞系的细胞库在复苏后未受到细菌和真菌污染。

3.3.2 支原体检查结果

检测样品:使用培养三代 293T 悬浮细胞,第三代的培养期为 48 h 上清液。为了确定是否有支原体生长,可在支原体生长培养基中加入细胞培养上清液,如果变色说明有支原体生长。试验的阳性对照为肺炎支原体(ATCC15531)和口腔支原体(ATCC23714),阴性对照为支原体培养液。检测结果表明,在检测 293T 悬浮细胞的接种方法中没有支原体污染:阳性对照组在培养的第六天开始变色,而阴性对照组和待检组在培养的第二十八天均未变色。

3.4 接种量对 293T 悬浮细胞生长曲线的影响

293T 悬浮细胞(本论文此后提及的 293T 悬浮细胞均为 OPM-293 CD05 Medium 快速驯化得到)在不同接种密度下培养(其他培养条件相同),采用 4 种不同接种量进一步证明接种密度对该细胞生长的影响:2×10⁵ 个/mL (A 组),3×10⁵ 个/mL (B 组),4×10⁵ 个/mL (C 组),5×10⁵ 个/mL (D 组)。四组细胞密度均在第 6 天呈大幅度下降趋势,培养前期 C 组接种密度相对平稳上升并高于其它三组(图 3-9)。细胞活力大幅下降点时间分别为 6 天、5 天、7 天、5 天,且培养早期 C 组接种密度对细胞活力影响相对较小,活力均在 80%以上(图 3-10)。如图 3-11 所示,4×10⁵ 个/mL 密度的细胞 C 组,细胞比生长速率高于 A 组和 B 组且明显高于 D 组,所以综上所述接种密度为 4×10⁵ 个/mL 的 C 组更利于细胞的生长为最佳初始接种密度。

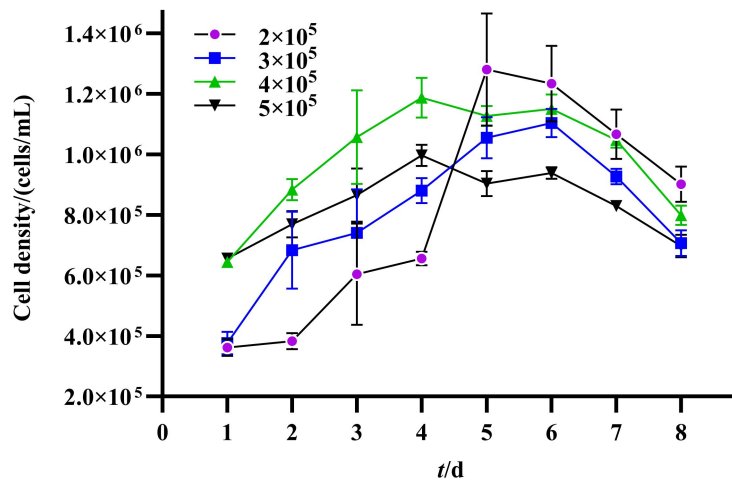


图 3-9 细胞初始接种密度对活细胞密度生长曲线的影响

Fig. 3-9 Effect of initial cell inoculation density on the density growth curve of living cells

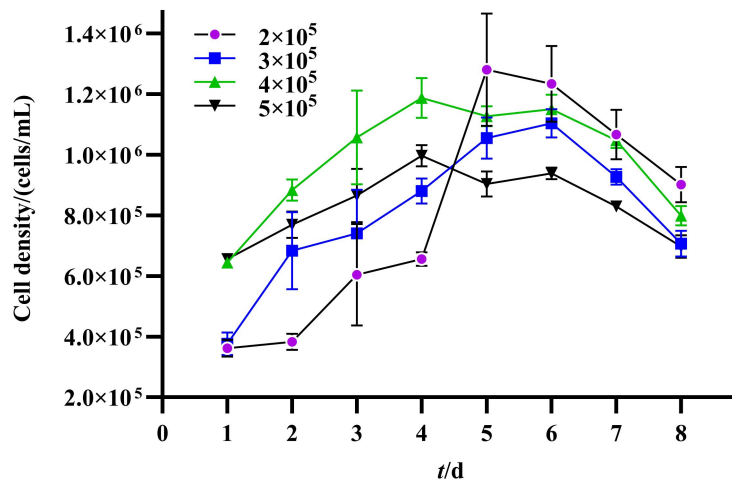


图 3-10 细胞初始接种密度对细胞活率的影响

Fig. 3-10 Effect of initial cell inoculum density on cell viability

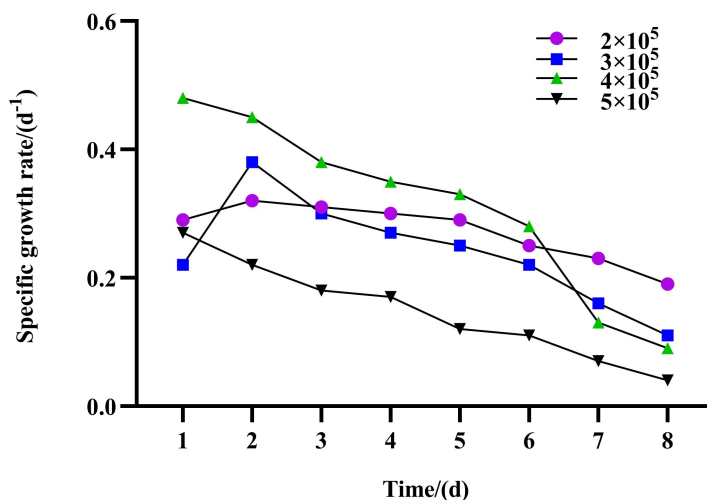


图 3-11 细胞初始接种密度对细胞比生长速率的影响

Fig. 3-11 Effect of initial cell inoculation density on specific cell growth rate

3.5 驯化 293T 悬浮细胞病毒包装能力验证

采用 PTK-CAR-CD30 目的质粒来验证悬浮细胞的病毒包装能力。悬浮细胞慢病毒载体包装 72 h 后产生的离心过滤原液转染 293T 贴壁细胞, 如图 3-12 流式检测为表达 mCD30+细胞的比例随着病毒体积的增加而升高, 用 10.7%左右的转效率计算病毒的滴度为 2.75×10^7 TU/mL。同时取 100 μ L 离心过滤原液滴定在蛋白检测卡结果显示阳性 (见图 3-14)。

如图 3-13 为使用传统 293T 贴壁细胞进行慢病毒包装的流式检测, 可以看出随着病毒体积的增加, 表达 mCD30+细胞的比例增加不明显, 用 13%左右转效的细胞率计算病毒的滴度 1.65×10^7 TU/mL。如图 3-15 进一步证明将 293T 贴壁细胞驯化成悬浮细胞后比未驯化前贴壁细胞的慢病毒包装能力强。

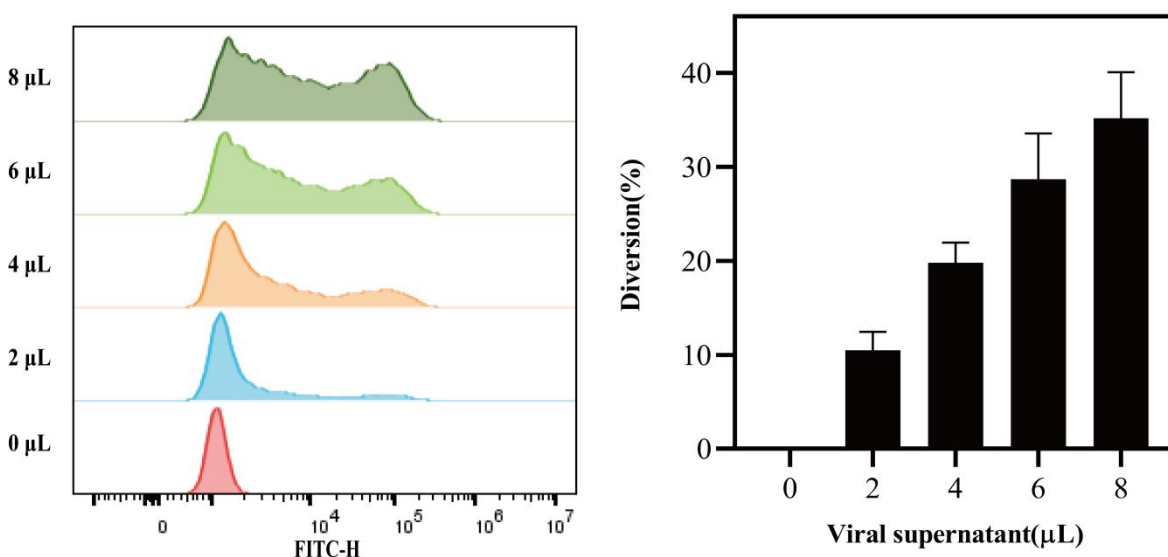
图 3-12 使用驯化悬浮细胞包装的慢病毒转染 293T 贴壁细胞, 72 h 后检测 0-8 μ L 病毒上清的流式转效图

Fig. 3-12 293T adherent cells were transfected using lentivirus packed in domesticated suspension cells and flow transcripts of 0-8 μL of viral supernatant were assayed after 72 h

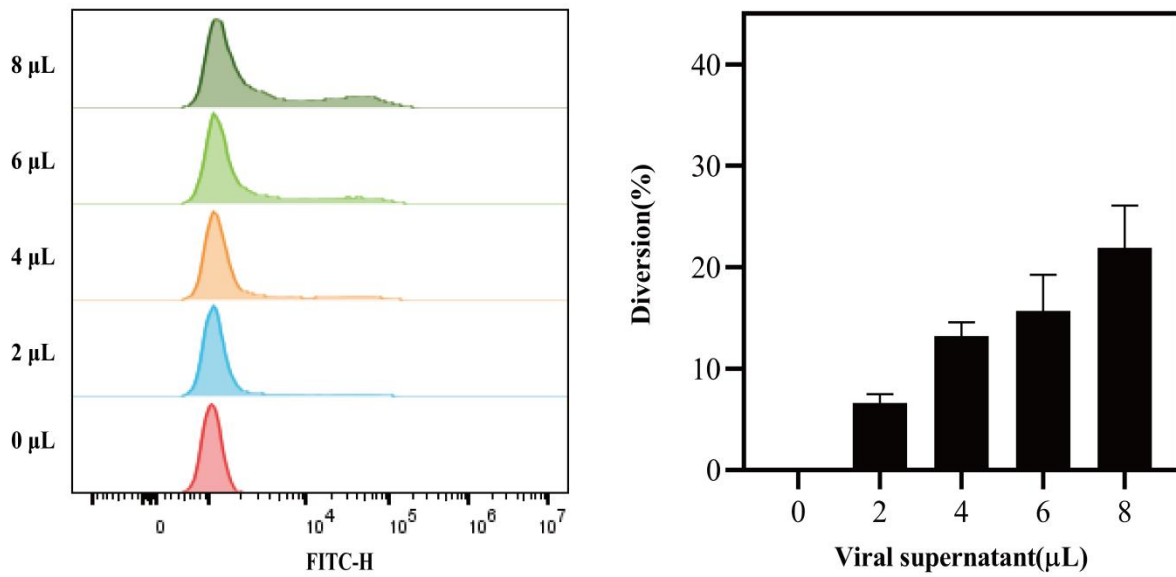


图 3-13 293T 贴壁细胞包装的病毒上清 0-8 μL 增量下 72 h 后的流式转效图

Fig. 3-13 3 Flow transcripts of viral supernatants packed in 293T-adherent cells after 72 h at 0-8 μL increments



图 3-14 悬浮细胞病毒包装后, 100 μL 细胞上清液蛋白卡检测结果

Fig. 3-14 Protein card assay results of 100 μL cell supernatant after viral packaging of suspension cells

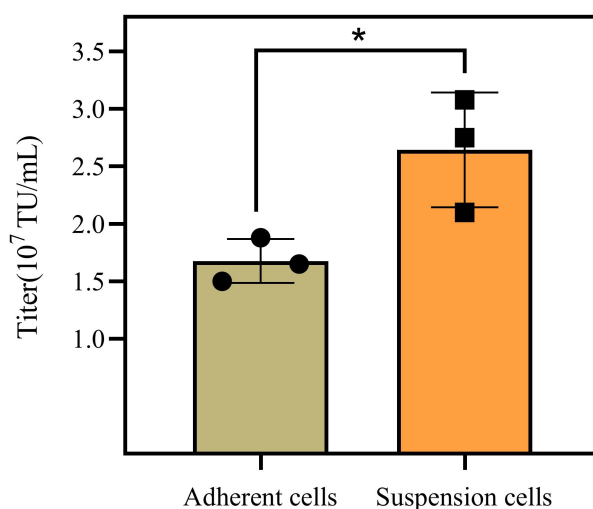


图 3-15 293T 悬浮细胞与贴壁细胞的慢病毒包装滴度比较

Fig. 3-15 Comparison of lentiviral packaging titres in 293T suspension cells and adherent cells

3.6 293T 悬浮细胞冻存复苏后稳定性的验证

为验证该驯化细胞冻存后复苏的稳定性，将驯化后细胞按初始密度 4×10^5 个/mL 连续传 14 代，细胞生长稳定，培养 72 h 后细胞密度均在 1.5×10^6 个/mL 以上，细胞活率均在 80% 以上，稳定性结果见图 3-16。

如图 3-17 所示，在培养初期，传第 2、4 代时，细胞相互粘附，2~3 个细胞或更多细胞聚集在一起，细胞结团明显，更多的细胞粘连，但很松散，轻轻吹打细胞，结团即消失。随着培养时间及传代次数的增加，在传第 5、10 代时大多数细胞散在分布，边缘清晰，部分细胞呈花生状分布。使用复苏后稳定生长期的悬浮细胞进行慢病毒包装，72 h 后产生的离心过滤原液滴定蛋白检测卡呈阳性（见图 3-18），同时转染 293T 贴壁载体细胞，如图 3-19 表达转染细胞的比例随着病毒液体积的增加而升高，用百分之十七左右转效的细胞率计算病毒的滴度有 2.18×10^7 TU/mL，表明复苏后的细胞仍然具有慢病毒包装能力。

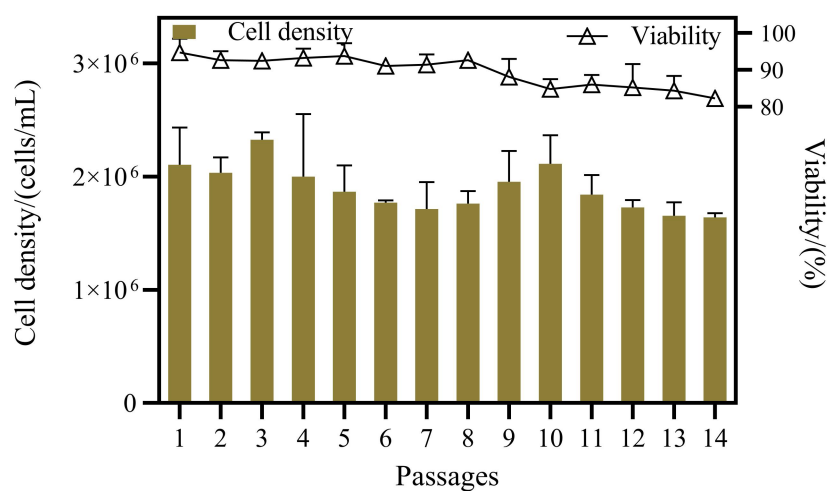


图 3-16 冻存复苏后的 293T 悬浮细胞密度和活率变化曲线图

Fig. 3-16 Plot of changes in density and viability of 293T suspension cells after cryopreservation recovery

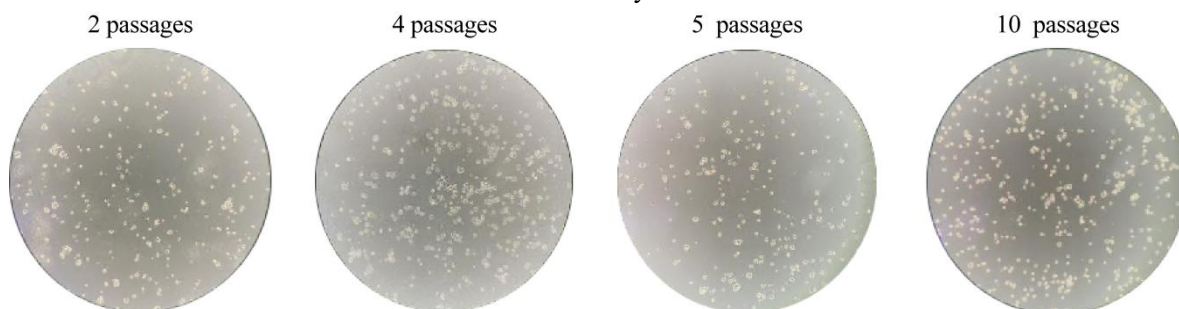


图 3-17 冻存复苏后悬浮细胞依次为第 2、4、5、10 代 B 组细胞生长形态图

Fig. 3-17 The growth morphology of the suspended cells after cryopreservation and recovery is shown sequentially for the 2nd, 4th, 5th and 10th generation of group B cells



图 3-18 冻存复苏后的 293T 悬浮细胞包装慢病毒后，100 μ L 细胞上清液蛋白卡检测结果

Fig. 3-18 Protein card assay results of 100 μ L of cell supernatant after lentivirus packaging of freeze-resuscitated 293T suspension cells

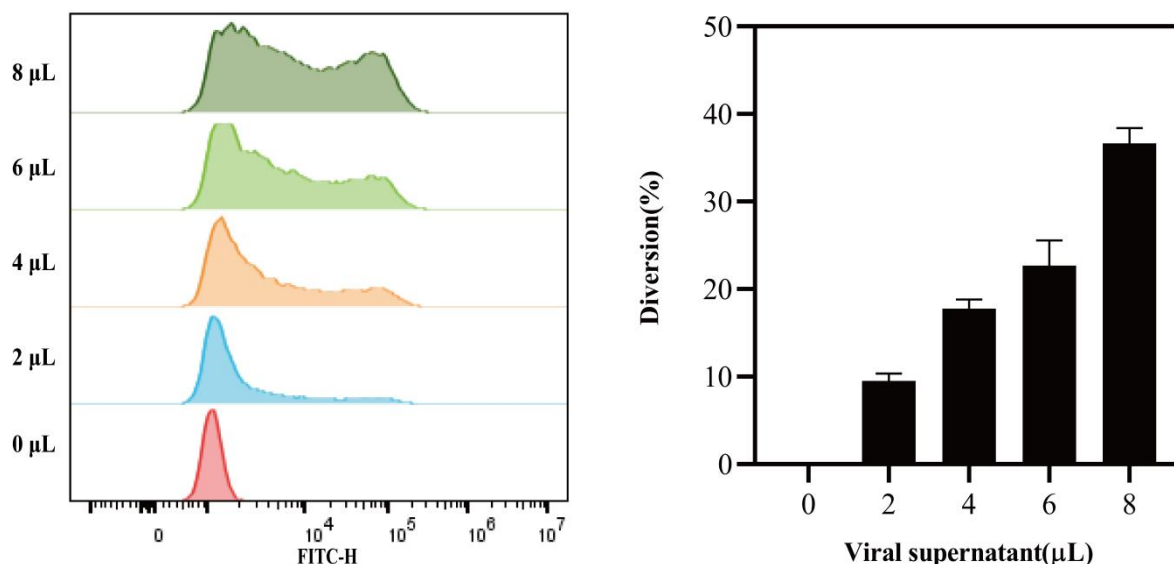


图 3-19 将冻存复苏后悬浮细胞慢病毒包装后检测病毒 0-8 μL 增量下 72 h 后的流式转效图

Fig. 3-19 Flow transcripts of lentiviral packaging of cryopreserved post-recovery suspension cells after 72 h of virus detection at 0-8 μL increments

3.7 293T 悬浮细胞慢病毒包装的转染条件优化

在驯化悬浮细胞的基础上, 为了进一步提高慢病毒包装的能力, 以下选取转染过程中的两个转染条件: DNA 与 PEI 的质量比和质粒配比进行优化探究。

3.7.1 PEI 对慢病毒包装滴度的影响

PEI 是 293T 常用的转染试剂, 该方法具有多种优点: 独立于培养条件、转染后无需更换培养基、适用性强、成本低、转染后无需更换培养基、转染效率高。然而在包装过程中过高浓度的 PEI 会改变载体细胞的功能, 并可能对细胞有毒和提高残留量。为此, 有必要优化适当的 DNA 与 PEI 比例, 在慢病毒包装过程中按照 1: 1、1: 2、1: 3、1: 4 的 DNA: PEI 比例进行转染。同时需要保持转染密度为 2×10^6 个/mL 细胞, 转染温度为 37°C , 质粒配比为 12: 10: 6: 5, 质粒浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$, 收集病毒的时间为 72 ± 4 h。结果从图 3-20 中可以看出 DNA: PEI=1: 3 和 DNA: PEI=1: 4 时病毒活性滴度最强; DNA: PEI=1: 3 和 DNA: PEI=1: 4 没有明显差异, 由于 PEI 对细胞功能有影响, 所以选择采用 DNA: PEI=1: 3 进行慢病毒包装。

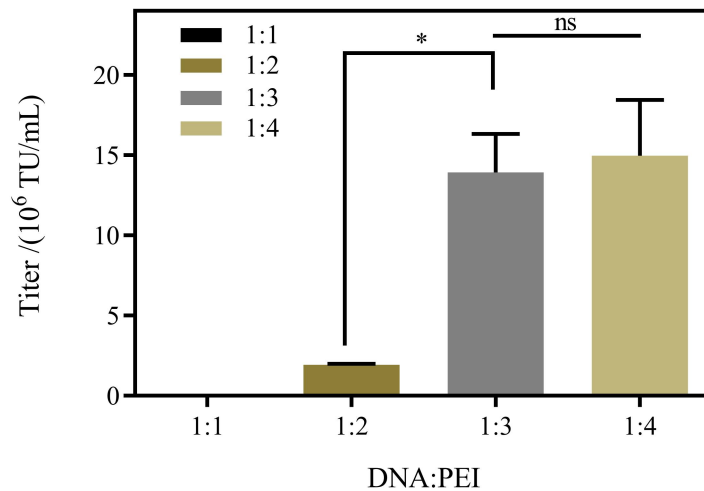


图 3-20 转染条件优化中 PEI 对慢病毒包装滴度的影响

Fig. 3-20 Effect of PEI on lentiviral packaging titres in the optimisation of transfection conditions

3.7.2 质粒比对慢病毒活滴的影响

从理论上讲，慢病毒包装需要通过特定的质粒摩尔比来完成。将细胞转染密度保持在 2×10^6 个/mL，质粒浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$ ，PEI 比例按上述优化比例 1: 3，转染温度为 37°C ，转染时间 72 ± 4 h。研究靶标质粒：BZ1K: BZ2K: BZ3K=12: 10: 5: 6、12: 10: 6: 5、18: 10: 6: 5、12: 15: 9: 7.5 不同比例下，得到的慢病毒活滴。从图 3-21 结果可以看出第 3 组包装方法的病毒活性滴度最强；1、2 组无差异，2、3 组有差异；第 3 组和第 4 组有差异 ($P < 0.05$)；综合比较下，选择采用靶标质粒：BZ1K: BZ2K: BZ3K=18: 10: 6: 5 进行慢病毒包装。

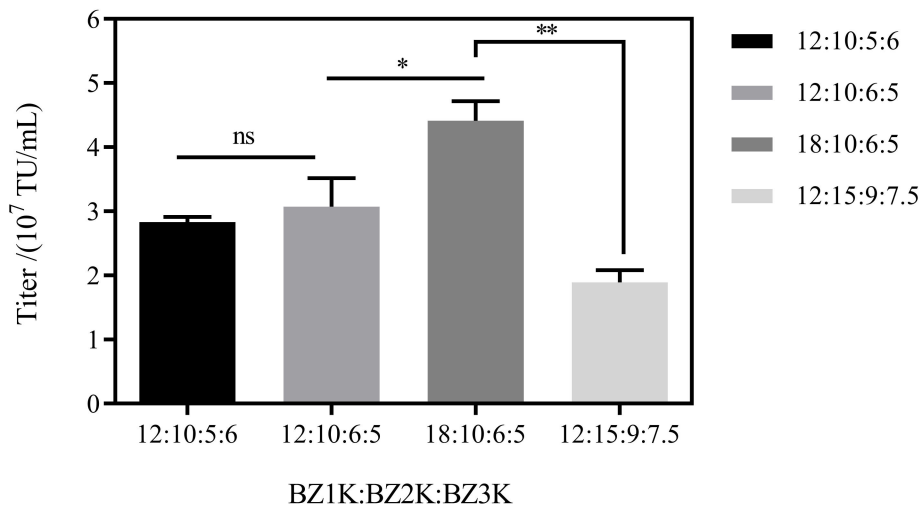


图 3-21 转染条件优化中质粒比对慢病毒包装滴度的影响

Fig. 3-21 Effect of plasmid ratios on lentiviral packaging titres in the optimisation of transfection conditions

3.8 Ca^{2+} 浓度对悬浮 293T 细胞结团和生长的影响

针对驯化悬浮细胞出现单个细胞抱团生长的现象,根据研究发现上皮细胞间钙粘素粘着会让细胞紧密连接,因此在此基础对悬浮细胞结团生长做进一步探索研究。图 3-22 显示在不同 Ca^{2+} 浓度培养的 293T 悬浮细胞, Ca^{2+} 浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4 和 0.8 mmol/L 时,比较其不同浓度时 24 h 细胞结团形态发现,随着 Ca^{2+} 浓度的增加细胞结团也随之增大增多,并且单细胞明显减少,在 0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L Ca^{2+} 浓度时,所结团块内细胞已无明显轮廓界限,呈现紧紧抱团生长趋势。随着 Ca^{2+} 浓度升高,活细胞密度及细胞活力随时间变化呈现显著下降趋势(图 3-23、图 3-24)。图 3-25 为各 Ca^{2+} 浓度下 24 h 的结团粒径分布,明显呈现出随 Ca^{2+} 浓度增加,细胞结团大小朝粒径增大的方向偏移。

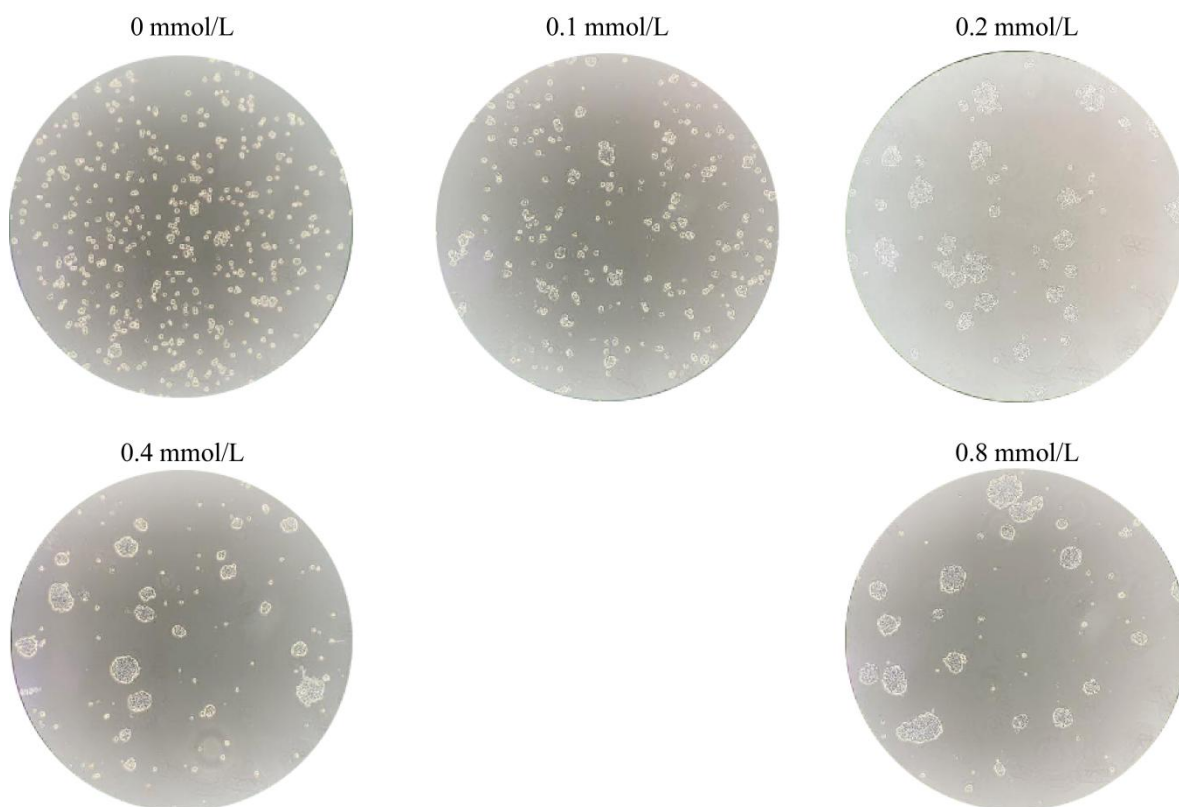
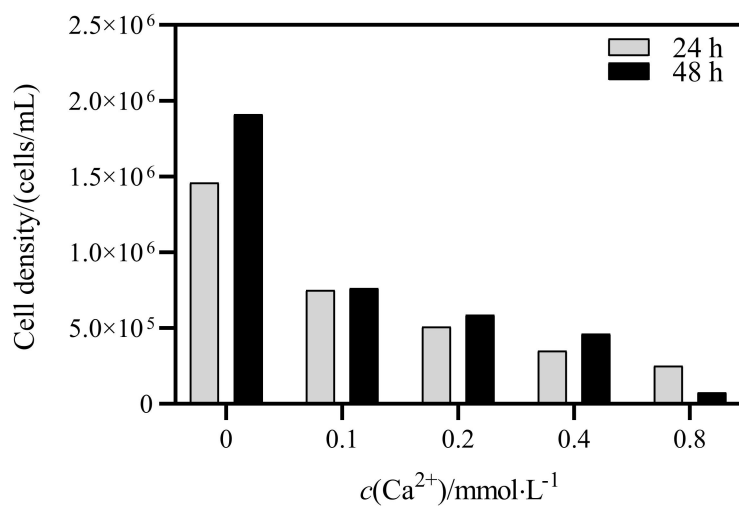
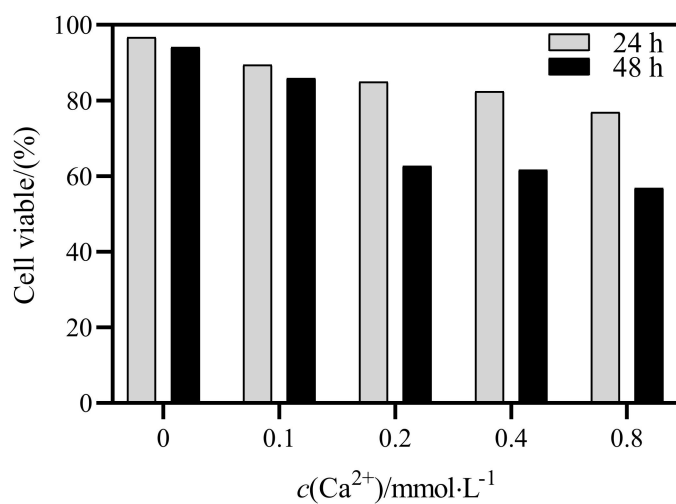


图 3-22 Ca^{2+} 浓度依次为 0、0.1、0.2、0.4 和 0.8 mmol/L 时细胞生长形态图

Fig. 3-22 Morphology of cell growth at Ca^{2+} concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mmol/L in sequence

图 3-23 不同 Ca^{2+} 浓度时 24 h 和 48 h 的生长密度图Fig. 3-23 Plot of growth density at 24 h and 48 h at different Ca^{2+} concentrations图 3-24 不同 Ca^{2+} 浓度条件下 24 h 和 48 h 的细胞活率图Fig. 3-24 Plots of cell viability at 24 h and 48 h under different Ca^{2+} concentrations

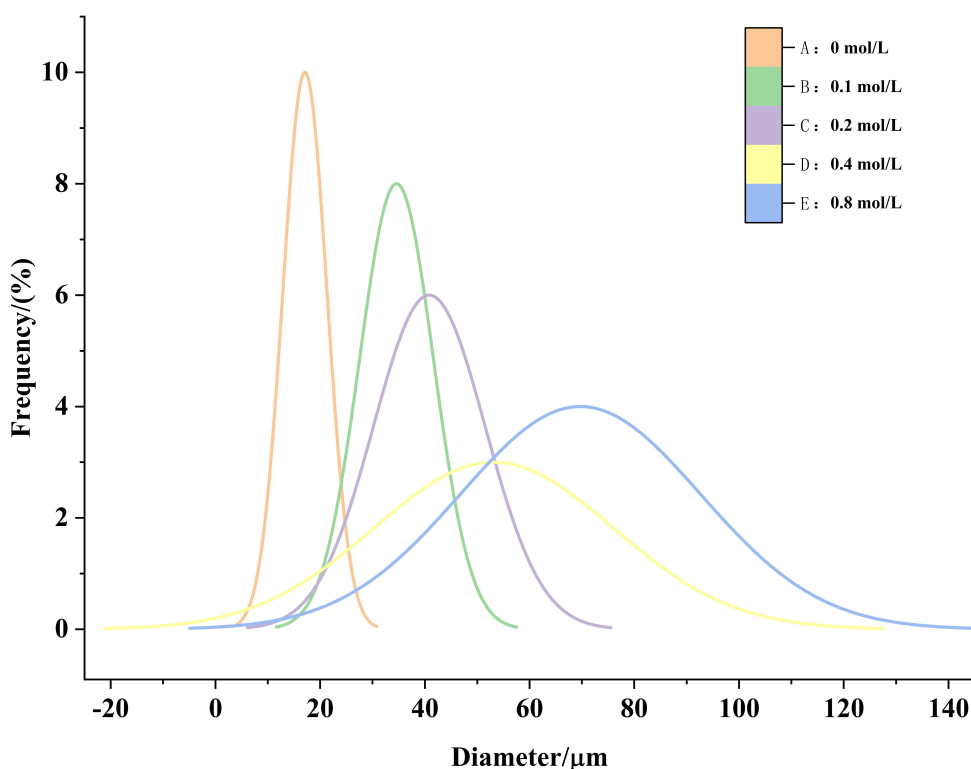


图 3-25 在 24 h 时 5 组不同 Ca^{2+} 浓度的结团粒径分布图

Fig. 3-25 Distribution of agglomerated particle sizes at 24 h for five groups with different Ca^{2+} concentrations

3.9 EDTA 螯合剂通过溶解钙粘连原理对结团细胞生长情况的影响

根据细胞聚团的性质以及螯合剂（乙二胺四乙酸（EDTA））与正电荷离子有亲和力的原理，所以使用螯合剂 EDTA 来螯合细胞间连接紧密的复合物，减少细胞无效聚团以达到正常生长增殖。图 3-27、图 3-28 则显示了随着 EDTA 梯度添加量从 0 μL 、1.0 μL 、1.5 μL 、2.0 μL 、2.5 μL 到 3.0 μL ，细胞密度及活率随时间的变化呈现上升的趋势，均大于 EDTA 为 0 μL 时的空白对照组；并且图 3-28 中 EDTA 添加量为 0 μL 的空白组细胞活力在 80% 左右，添加 EDTA 实验组活率均在 85% 以上。如图 3-26 横向观察比较 EDTA 依次添加量为 0 μL 、1.0 μL 、1.5 μL 、2.0 μL 、2.5 μL 、3.0 μL 时 72 h 细胞的结团及形态发现，随着 EDTA 添加量的增加细胞结团团块随之减少并且单个细胞也越来越致密，细胞形态也呈现良好趋势。图 3-29 是各 EDTA 梯度添加量下 72 h 的粒径分布，可以看出随着 EDTA 添加量上升，细胞所结团块及粒径越小。

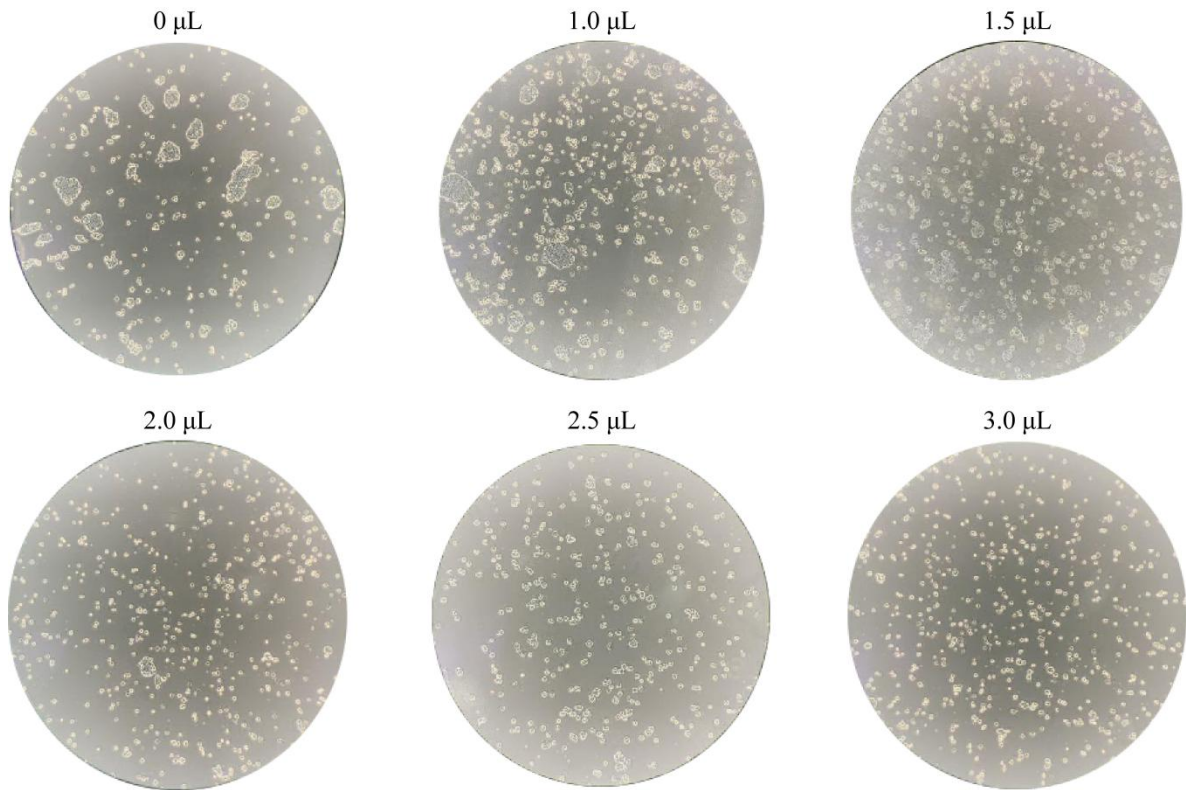


图 3-26 6 组 EDTA 添加量下 72 h 的细胞结团形态图

Fig. 3-26 Morphology of cell clusters at 72 h with 6 groups of EDTA additions

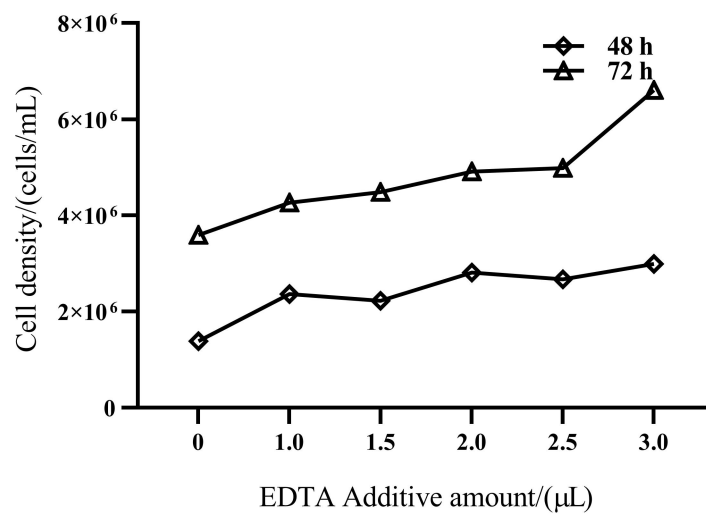


图 3-27 EDTA 不同添加量下 48 h 和 72 h 的细胞密度比较图

Fig. 3-27 Comparison of cell density at 48 h and 72 h with different additions of EDTA

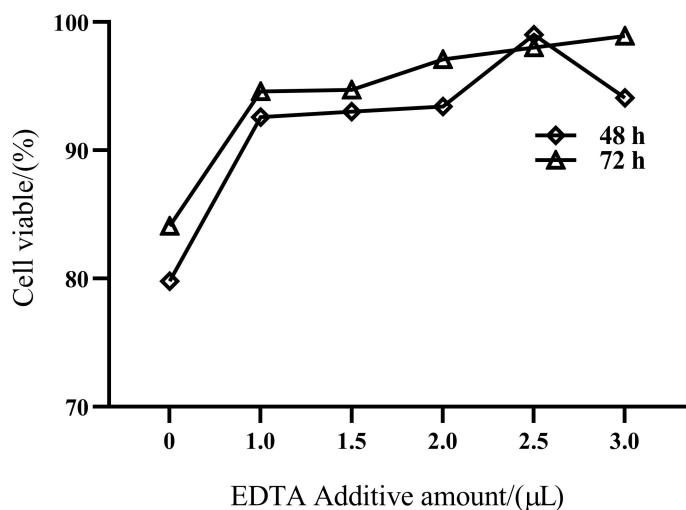


图 3-28 EDTA 不同添加量下 48 h 和 72 h 细胞活力比较图

Fig. 3-28 Comparison of cell viability at 48 h and 72 h with different additions of EDTA

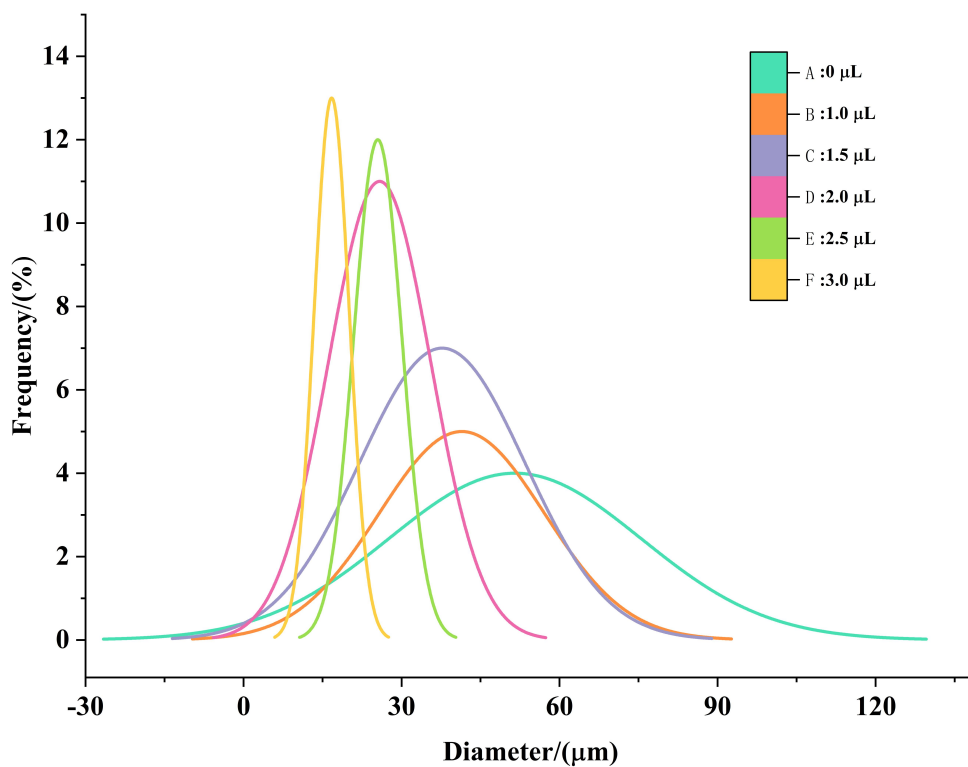


图 3-29 在 72 h 时 5 组不同 EDTA 添加量的结团粒径分布图

Fig. 3-29 Distribution of agglomerates at 72 h for five groups with different EDTA additions

3.10 讨论

贴壁培养的 293T 细胞必须加入血清才能正常生长，将最初的含血清贴壁细胞驯化为无血清悬浮培养细胞系是无血清悬浮培养过程中的一项挑战。本论文选择了 3 种

培养基, 每种培养基均研究了快速和慢速驯化的方法对 293T 贴壁细胞驯化为悬浮细胞的影响。从高血清 10% 到低血清 1% 培养后, 含 2% 血清的 293T 贴壁细胞生长速度减慢, 部分细胞出现半贴壁状态。这可能是低血清水平引起的细胞代谢变化造成的, 经过多次传代适应低血清培养, 细胞逐渐恢复状态。表明在长时间逐步降血清适应过程中, 细胞通过调整代谢途径, 维持细胞活性^[136]。此外, 在悬浮培养过程中, 易出现细胞结团和死亡现象^[137]。本文采用 2 种方法适应驯化, 通过传代丢弃死亡和结团细胞的数量, 逐步筛选出能稳定传代的 293T 悬浮细胞系。直接法用时近 1 周、间接法用时近 2 周, 2 种方法经 FreeStyle™293 表达培养基与 OPM-293 CD05 溶剂培养基驯化得到的细胞可稳定传代悬浮培养, 但快速法更省时和省力。文献报道采用类似慢速法悬浮驯化细胞用时超 20 周, 其所获得的悬浮培养细胞与本实验所获得细胞在形态上较为接近^[138]。另外, 要注意对各阶段驯化细胞进行无菌及支原体检测是否合格, 一是可避免在驯化过程中浪费大量的时间做重复工作, 二是可以建立原始种子库和工作库, 以便以后用于更大规模的生产。

293T 悬浮株在摇瓶生长稳定时, 按一定比例加入转染质粒, 并以最佳活力($\geq 90\%$)及细胞密度 4×10^5 个/mL 为接种密度, 能够稳定收获病毒液, 但病毒收获时间需要摸索, 收获太早病毒产生量未达到峰值, 太晚病毒外壳会裂解和病毒失活, 可以通过检测不同时间段病毒滴度, 确认收获时间和收获时细胞活力。众所周知, 病毒对细胞的敏感性是定向选择的, 同一种病毒对同一细胞的不同克隆株的敏感性不同, 同一细胞所处外环境不同, 同一病毒的敏感性也会有所差异。悬浮培养的病毒滴度与传统贴壁工艺差距大, 悬浮培养基无动物来源的组分, 降低终产物外源污染的风险。且摇瓶具有操作简单便捷、批间差异小、生产成本低、生产效率高等优点, 所以摇瓶规模化制备病毒可以替代传统贴壁工艺, 也是慢病毒工艺的重要发展趋势。

在贴壁细胞悬浮驯化培养过程中, 细胞聚集成团会成为影响细胞生长的主要障碍。当细胞情况不佳时, 细胞团块的直径增大, 粘附的细胞数量也增加, 使得陷于细胞团中央的细胞营养物质耗竭和代谢副产物积累的问题更为突出, 细胞活性和生长速率逐渐降低。有研究表明在悬浮培养时无论有血清还是无血清环境中的 Ca^{2+} 浓度对 293 细胞的结团性质均有影响^[139]。然而针对 Ca^{2+} 浓度高低对细胞生长规律和结团大小的影响程度未有报道, 所以我们选取驯化过程中一组细胞系统地研究 Ca^{2+} 浓度对 293T 悬浮细胞结团团块大小和生长的影响, 揭示了 Ca^{2+} 浓度对细胞结团尺寸、生长密度及活率的基本关系, 为悬浮细胞无血清培养基的开发、高密度悬浮培养过程控制及病毒大规模扩增策略的设计提供了依据。

在转染过程中较大的团会块使病毒接触细胞的几率减少, 严重影响病毒产量。因此在此往后的 293T 悬浮细胞培养基的设计中可以通过调节 Ca^{2+} 浓度来调控细胞结团尺寸的大小。但是对于其他原因导致细胞结团, 比如: 过度消化、环境压力、组织分解、过度生长等, 在保证不伤害细胞及改善细胞状态的前提下, 我们可以使用螯合剂 EDTA 来螯合细胞间连接紧密的钙离子复合物, 改变细胞表面的电荷, 使细胞维持单细胞形

态，从而改善其生存微环境，达到分离分散细胞的作用。我们相信通过进一步探索及完善可以有效减少细胞出现的抱团生长现象。

4 结 论

4.1 全文总结

嵌合抗原受体疗法 (CAR-T) 是一种很有前景的免疫疗法, 可以靶向破坏癌细胞。目前, CAR-T 已应用于血癌的临床实践。CAR-T 细胞生产的核心是 LV 的生产, 因此, 大规模生产和纯化高滴度 LV 成为主流 CAR-T 细胞制造商的关键步骤。传统的 LV 生产工艺使用含血清的培养基来培养贴壁 293T 细胞。但血清成分复杂、批次差异难以预测, 贴壁培养使用到的胰蛋白酶会导致细胞脆性等等, 因此无血清培养是当前慢病毒包装载体细胞培养技术的趋势。因此我们对慢病毒的载体 293T 贴壁细胞进行悬浮培养适应, 并进行一系列的验证及优化从而得出一些结论:

- (1) OPM-293 CD05 Medium 培养基可以在 1 周左右快速将 293T 贴壁细胞驯化为悬浮细胞;
- (2) 驯化后的悬浮细胞比未驯化前的贴壁细胞慢病毒包装能力明显增强;
- (3) 该方法驯化出的悬浮细胞在冻存复苏后的细胞活力, 状态及包装能力均具有稳定一致性;
- (4) 保持其它转染条件不变的情况下, 转染参数中的 DNA: PEI 比例与质粒配比不同, 慢病毒转染能力会有差异;
- (5) 在一定范围内, Ca^{2+} 浓度高低与螯合剂 (EDTA) 添加量不同影响细胞结团状况。

4.2 论文的创新点

细胞对悬浮生长的适应并不总是像之前描述的那样简单和成功^[140]。逐步降低 FBS 百分比以适应无血清培养条件, 通常至少需要 4-8 周。最近的研究证实, 特定细胞系在长期适应过程中也可能改变其表面受体的表达, 从而影响生产目的^[141]。与市售的 293T 悬浮细胞相比, 本实验使用的 293T 细胞系来自稳定的细胞来源, 非基因编辑, 便于生产生物医药产品和临床应用。在本研究中, 使用商业无血清培养基 OPM-293 CD05 Medium 花费约一周可以将 293T 贴壁细胞成功适应悬浮细胞。我们的方法还具有优于其他适应方法的优点, 例如易于培养、无需额外的抗聚团剂、无需基因改造以及微载体, 便可保持均匀分散的增殖。所实行的方法通过显著减少外源杂质的引入来节省时间, 比之前报道的适应过程更适合生物制品的临床生产。

然而, 经过无血清悬浮驯化培养的细胞易粘附结团是目前贴壁细胞进行悬浮培养常见的问题。293T 细胞与其他上皮细胞相似, 容易形成聚集现象, 即使在培养后的悬浮细胞中也会出现群体生长的情况, 而一个优质成功的细胞培养工艺对整个药物开发过程显得尤为重要。Schoofs 等人的研究中尝试多种方法均不能有效解决细胞结团严重的问题^[142]。Peshwa 等人发现, 钙离子浓度越高 293T 细胞结团尺寸越大但所结团块内细胞活性良好^[143]。然而, 系统地研究关于钙离子影响 293T 细胞结团程度以指导调控细胞结团大小方面尚未有报道。

综上所述，本论文的创新点有以下几个方面：

- (1) 优化慢病毒包装载体：筛选最优悬浮驯化条件，将 293T 贴壁细胞成功驯化为悬浮细胞；
- (2) 在驯化悬浮细胞基础上，进一步验证对比得出提高了慢病毒包装效率且具稳定一致性；
- (3) 优化 293T 悬浮细胞转染条件：对转染参数中的 DNA: PEI 比例与质粒配比进行优探究；
- (4) 在悬浮细胞结团现象中，揭示了在一定范围内，通过调节 Ca^{2+} 浓度与螯合剂 (EDTA) 添加量可以改变细胞结团生长状况。

4.3 论文的不足之处

本实验通过对 293T 贴壁细胞快速适应成合格的悬浮细胞后，需要冻存作为后续细胞库以备研究或工艺大规模生产时，因此冻存液的条件配制比例及成份势必会对细胞复苏后的状态和增长活力产生很大影响。由于时间有限本文中尚缺乏对冻存方法和冻存液配方稳定性的优化研究。

在慢病毒载体由贴壁转变为悬浮状态后，对其转染参数的 DNA: PEI 与质粒配比采取优化研究后，是否其它的转染参数仍继续同样适用在改变状态后悬浮微载体中，有待进一步研究验证。

5 展 望

在本研究中，建立了一种高效的方法，只需一周的适应时间，无需微载体的成本，完成了贴壁细胞到悬浮细胞的快速适应。病毒包装可直接使用悬浮的 293T 细胞进行，从而减少了细胞消化所需的时间。此外，这种方法充分利用了三维空间来生产高密度培养物，从而解决了高劳动力成本、高空间要求、产品批次质量不稳定以及在贴壁条件下扩大规模受限等问题。其中还有一些需要优化及解决的问题，接下来将继续开展如下工作：

- （1）优化慢病毒转染参数条件中的转染参数，比如：转染密度、转染温度、收毒时间、蛋白表达增强剂等的优化。
- （2）基于包装的慢病毒转染体外原代 T 细胞，制备出 CAR-T 继而探索在体外以及在老鼠体内的杀伤毒理作用。

6 参考文献

- [1] Garvey K J, Oberste M S, Elser J E, et al. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus[J]. *Virology*, 1990, 175(2): 91-409.
- [2] Gojobori T, Moriyama E N, Ina Y, et al. Evolutionary origin of human and simian immunodeficiency viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(11): 4108-4111.
- [3] Langley R J, Hirsch V M, O'Brien S J, et al. Nucleotide sequence analysis of f puma lentivirus (PLV-14): genomic organization and relationship to other lentiviruses[J]. *Virology*, 1994, 202(2): 853-864.
- [4] Olmsted R A, Langley R, Roelke M E, et al. Worldwide prevalence of lentivirus infection in wild feline species: epidemiologic and phylogenetic aspects[J]. *Journal of virology*, 1992, 66(10): 6008-6018.
- [5] Olmsted R A, Hirsch V M, Purcell R H, et al. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(20): 8088-8092.
- [6] Smith T F, Srinivasan A, Schochetman G, et al. The phylogenetic history of immunodeficiency viruses[J]. *Nature*, 1988, 333(6173): 573-575.
- [7] Sonigo P, Alizon M, Staskus K, et al. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus[J]. *Cell*, 1985, 42(1): 369-382.
- [8] Bukrinsky M I, Haggerty S, Dempsey M P, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells[J]. *Nature*, 1993, 365(6447): 666-669.
- [9] Freed E O, Martin M A. HIV-1 infection of non-dividing cells[J]. *Nature*, 1994, 369(6476): 107-108.
- [10] Poeschla E M. Non-primate lentiviral vectors[J]. *Current opinion in molecular therapeutics*, 2003, 5(5): 529-540.
- [11] Cavalieri V, Baiamonte E, Lo Iacono M. Non-Primate Lentiviral Vectors and Their Applications in Gene Therapy for Ocular Disorders[J]. *Viruses*, 2018, 10(6).
- [12] Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. *Science (New York, NY)*, 1996, 272(5259): 263-267.
- [13] Mochizuki H, Schwartz J P, Tanaka K, et al. High-titer human immunodeficiency

- ncy virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells[J]. *Journal of virology*, 1998, 72(11): 8873-8883.
- [14] Ginn S L, Amaya A K, Alexander I E, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update[J]. *The journal of gene medicine*, 2018, 20(5): e3015.
- [15] Oldham R A, Berinstein E M, Medin J A. Lentiviral vectors in cancer immunotherapy[J]. *Immunotherapy*, 2015, 7(3): 271-284.
- [16] Dufait I, Liechtenstein T, Lanna A, et al. Retroviral and lentiviral vectors for the induction of immunological tolerance[J]. *Scientifica*, 2012, 2012.
- [17] Lester J F, Casbard A C, Al-Taei S, et al. A single centre phase II trial to assess the immunological activity of TroVax® plus pemetrexed/cisplatin in patients with malignant pleural mesothelioma - the SKOPOS trial[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(12): e1457597.
- [18] Katz R A, Skalka A M. The retroviral enzymes[J]. *Annual review of biochemistry*, 1994, 63: 133-173.
- [19] Coil D A, Miller A D. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus[J]. *Journal of virology*, 2004, 78(20): 10920-10926.
- [20] Charneau P, Alizon M, Clavel F. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication[J]. *Journal of virology*, 1992, 66(5): 2814-2820.
- [21] Rattray A J, Champoux J J. Plus-strand priming by Moloney murine leukemia virus. The sequence features important for cleavage by RNase H[J]. *Journal of molecular biology*, 1989, 208(3): 445-456.
- [22] Watanabe S, Temin H M. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(19): 5986-5990.
- [23] Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression[J]. *The journal of gene medicine*, 2004, 6 Suppl 1: S125-138.
- [24] Sakuma T, Barry M A, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational[J]. *The Biochemical journal*, 2012, 443(3): 603-618.
- [25] 陈丹瑛, 李蕊, 张玥, 等. HIV-1 假病毒包装及感染条件优化[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(15): 2172-2174.
- [26] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease[J]. *Science (New York, NY)*, 2000, 288(5466): 669-672.

- [27] Mukherjee S, Thrasher A J. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects[J]. *Gene*, 2013, 525(2): 174-181.
- [28] Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Science (New York, N Y)*, 2013, 341(6148): 1233-1241.
- [29] Fäcke M, Janetzko A, Shoeman R L, et al. A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum[J]. *Journal of virology*, 1993, 67(8): 4972-4980.
- [30] Lee P P, Linial M L. Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal[J]. *Journal of virology*, 1994, 68(10): 6644-6654.
- [31] Mammano F, Ohagen A, Höglund S, et al. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis[J]. *Journal of virology*, 1994, 68(8): 4927-4936.
- [32] Gelderblom H R, Hausmann E H, Ozel M, et al. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins[J]. *Virology*, 1987, 156(1): 171-176.
- [33] Prats A C, Sarih L, Gabus C, et al. Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA[J]. *The EMBO journal*, 1988, 7(6): 1777-1783.
- [34] Kaye J F, Lever A M. Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation[J]. *Journal of virology*, 1998, 72(7): 5877-5885.
- [35] Parent L J, Bennett R P, Craven R C, et al. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins[J]. *Journal of virology*, 1995, 69(9): 5455-5460.
- [36] Jacks T, Power M D, Masiarz F R, et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression[J]. *Nature*, 1988, 331(6153): 280-283.
- [37] Berkhout B, Silverman R H, Jeang K T. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target[J]. *Cell*, 1989, 59(2): 273-282.
- [38] Subbramanian R A, Cohen E A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins[J]. *Journal of virology*, 1994, 68(11): 6831-6835.
- [39] Malim M H, Cullen B R. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes[J]. *Molecular and cellular biology*, 1993, 13(10): 6180-6189.

- [40] Garcia J V, Alfano J, Miller A D. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4[J]. *Journal of virology*, 1993, 67(3): 1511-1516.
- [41] Whatmore A M, Cook N, Hall G A, et al. Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence[J]. *Journal of virology*, 1995, 69(8): 5117-5123.
- [42] Liu H, Wu X, Newman M, et al. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures[J]. *Journal of virology*, 1995, 69(12): 7630-7638.
- [43] Willey R L, Maldarelli F, Martin M A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4[J]. *Journal of virology*, 1992, 66(12): 7193-7200.
- [44] Klimkait T, Strebel K, Hoggan M D, et al. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release[J]. *Journal of virology*, 1990, 64(2): 621-629.
- [45] Lang S M, Weeger M, Stahl-Hennig C, et al. Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus[J]. *Journal of virology*, 1993, 67(2): 902-912.
- [46] Kondo E, Mammano F, Cohen E A, et al. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles[J]. *Journal of virology*, 1995, 69(5): 2759-2764.
- [47] Heinzinger N K, Bukrinsky M I, Haggerty S A, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(15): 7311-7315.
- [48] Anderson W F, Blaese R M, Culver K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990[J]. *Human gene therapy*, 1990, 1(3): 331-362.
- [49] Blaese R M, Culver K W, Chang L, et al. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD 34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992[J]. *Human gene therapy*, 1993, 4(4): 521-527.
- [50] Levine F, Friedmann T. Gene therapy techniques[J]. *Current opinion in biotechnology*, 1991, 2(6): 840-844.

- [51] Mann R, Mulligan R C, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus[J]. Cell, 1983, 33(1): 153-159.
- [52] Pauwels K, Gijsbers R, Toelen J, et al. State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations[J]. Current gene therapy, 2009, 9(6): 459-474.
- [53] Sena-Esteves M, Gao G. Production of High-Titer Retrovirus and Lentivirus Vectors[J]. Cold Spring Harbor protocols, 2018, 2018(4).
- [54] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. Journal of virology, 1998, 72(11): 8463-8471.
- [55] Merten O W, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors[J]. Molecular therapy Methods & clinical development, 2016, 3: 16017.
- [56] Wagner R, Graf M, Bieler K, et al. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors[J]. Human gene therapy, 2000, 11(17): 2403-2413.
- [57] Kotsopoulou E, Kim V N, Kingsman A J, et al. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene[J]. Journal of virology, 2000, 74(10): 4839-4852.
- [58] Zufferey R, Dull T, Mandel R J, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery[J]. Journal of virology, 1998, 72(12): 9873-9880.
- [59] Berkhout B. A Fourth Generation Lentiviral Vector: Simplifying Genomic Gymnastics[J]. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 2017, 25(8): 1741-1743.
- [60] Milone M C, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors[J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1529-1541.
- [61] Naldini L, Blömer U, Gage F H, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(21): 11382-11388.
- [62] Miyoshi H, Takahashi M, Gage F H, et al. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(19): 10319-10323.

- [63] Bainbridge J W, Stephens C, Parsley K, et al. In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium[J]. *Gene therapy*, 2001, 8(21): 1665-1668.
- [64] Greenberg K P, Lee E S, Schaffer D V, et al. Gene delivery to the retina using lentiviral vectors[J]. *Advances in experimental medicine and biology*, 2006, 572: 255-266.
- [65] Lundberg C, Björklund T, Carlsson T, et al. Applications of lentiviral vectors for biology and gene therapy of neurological disorders[J]. *Current gene therapy*, 2008, 8(6): 461-473.
- [66] Valori C F, Ning K, Wyles M, et al. Development and applications of non-HIV-based lentiviral vectors in neurological disorders[J]. *Current gene therapy*, 2008, 8(6): 406-418.
- [67] Jakobsson J, Lundberg C. Lentiviral vectors for use in the central nervous system[J]. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2006, 13(3): 484-493.
- [68] Wong L F, Goodhead L, Prat C, et al. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system. therapeutic and research applications[J]. *Human gene therapy*, 2006, 17(1): 1-9.
- [69] Azzouz M, Ralph G S, Storkebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model[J]. *Nature*, 2004, 429(6990): 413-417.
- [70] Vandendriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, et al. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy[J]. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 2007, 5(1): 16-24.
- [71] Stein C S, Kang Y, Sauter S L, et al. In vivo treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors[J]. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2001, 3(6): 850-856.
- [72] Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, et al. Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats[J]. *Gene therapy*, 2003, 10(17): 1503-1511.
- [73] Azzouz M, Le T, Ralph G S, et al. Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy[J]. *The Journal of clinical investi*

- pation, 2004, 114(12): 1726-1731.
- [74] Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, et al. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice[J]. *Blood*, 2004, 103(10): 3700-3709.
 - [75] Ralph G S, Radcliffe P A, Day D M, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model [J]. *Nature medicine*, 2005, 11(4): 429-433.
 - [76] Biffi A, Naldini L. Gene therapy of storage disorders by retroviral and lentiviral vectors[J]. *Human gene therapy*, 2005, 16(10): 1133-1142.
 - [77] Miyoshi H, Smith K A, Mosier D E, et al. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors [J]. *Science (New York, NY)*, 1999, 283(5402): 682-686.
 - [78] Case S S, Price M A, Jordan C T, et al. Stable transduction of quiescent CD 34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(6): 2988-2993.
 - [79] Shi Q, Wilcox D A, Fahs S A, et al. Lentivirus-mediated platelet-derived factor VIII gene therapy in murine haemophilia A[J]. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 2007, 5(2): 352-361.
 - [80] Chang A H, Stephan M T, Sadelain M. Stem cell-derived erythroid cells mediate long-term systemic protein delivery[J]. *Nature biotechnology*, 2006, 24(8): 1017-1021.
 - [81] Hanawa H, Hargrove P W, Kepes S, et al. Extended beta-globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine beta-thalassemia[J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2281-2290.
 - [82] May C, Rivella S, Callegari J, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin[J]. *Nature*, 2000, 406(6791): 82-86.
 - [83] Lisowski L, Sadelain M. Current status of globin gene therapy for the treatment of beta-thalassaemia[J]. *British journal of haematology*, 2008, 141(3): 335-345.
 - [84] Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1054: 308-316.
 - [85] Labbé R P, Vessillier S, Rafiq Q A. Lentiviral Vectors for T Cell Engineering:

- Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives[J]. *Viruses*, 2021, 13(8).
- [86] Huang R, Li X, He Y, et al. Recent advances in CAR-T cell engineering[J]. *Journal of hematology & oncology*, 2020, 13(1): 86.
- [87] Gama-Norton L, Botezatu L, Herrmann S, et al. Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in H EK293 cells[J]. *Human gene therapy*, 2011, 22(10): 1269-1279.
- [88] Merten O W, Charrier S, Laroudie N, et al. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application[J]. *Human gene therapy*, 2011, 22(3): 343-356.
- [89] Ausubel L J, Hall C, Sharma A, et al. Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors[J]. *BioProcess international*, 2012, 10(2): 32-43.
- [90] Smith S L, Shioda T. Advantages of COS-1 monkey kidney epithelial cells as packaging host for small-volume production of high-quality recombinant lentiviruses[J]. *Journal of virological methods*, 2009, 157(1): 47-54.
- [91] van der Loo J C, Wright J F. Progress and challenges in viral vector manufacturing [J]. *Human molecular genetics*, 2016, 25(R1): R42-52.
- [92] Zhou J X, Tressel T, Yang X, et al. Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production[J]. *Biotechnology journal*, 2008, 3(9-10): 1185-1200.
- [93] Huang D, Peng W J, Ye Q, et al. Serum-Free Suspension Culture of MDCK Cells for Production of Influenza H1N1 Vaccines[J]. *PloS one*, 2015, 10(11): e0141686.
- [94] Chen T H, Liu W C, Chen I C, et al. Recombinant hemagglutinin produced from Chinese Hamster Ovary (CHO) stable cell clones and a PELC/CpG combination adjuvant for H7N9 subunit vaccine development[J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 6933-6941.
- [95] Pose A G, Morell N O, Matos D A, et al. Stable lentiviral transformation of CHO cells for the expression of the hemagglutinin H5 of avian influenza virus in suspension culture[J]. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 2014, 3: 108-116.
- [96] Nyong M P, Du L, Tseng C K, et al. Engineering a stable CHO cell line for the expression of a MERS-coronavirus vaccine antigen[J]. *Vaccine*, 2018, 36(14): 1853-1862.
- [97] Rodríguez M C, Ceaglio N, Antuña S, et al. High yield process for the production of active human α -galactosidase a in CHO-K1 cells through lentivirus tra

- pnsgenesis[J].
- Biotechnology progress*
- , 2017, 33(5): 1334-1345.
- [98] Wu J, Han D, Wei M, et al. [Domestication of suspension CHO cells and its application in the expression of anti-PSMA antibody][J]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi* = Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2016, 32(1): 1-4.
- [99] G  linas J F, Azizi H, Kiesslich S, et al. Production of rVSV-ZEBOV in serum-free suspension culture of HEK 293SF cells[J]. *Vaccine*, 2019, 37(44): 6624-6632.
- [100] Shen C F, Guilbault C, Li X, et al. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines[J]. *Vaccine*, 2019, 37(47): 6996-7002.
- [101] Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2005, 68(3): 283-291.
- [102] Marino M P, Luce M J, Reiser J. Small- to large-scale production of lentivirus vectors[J]. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 2003, 229: 43-55.
- [103] Graham F L, van der Eb A J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA[J]. *Virology*, 1973, 52(2): 456-467.
- [104] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(16): 7297-7301.
- [105] Pham P L, Kamen A, Durocher Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein[J]. *Molecular biotechnology*, 2006, 34(2): 225-237.
- [106] Kuroda H, Kutner R H, Bazan N G, et al. Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection[J]. *Journal of virological methods*, 2009, 157(2): 113-121.
- [107] Kutner R H, Zhang X Y, Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors[J]. *Nature protocols*, 2009, 4(4): 495-505.
- [108] Greene M R, Lockey T, Mehta P K, et al. Transduction of human CD34+ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line[J]. *Human gene therapy methods*, 2012, 23(5): 297-308.
- [109] Chang L J, Zaiss A K. Lentiviral vectors. Preparation and use[J]. *Methods in*

- n molecular medicine, 2002, 69: 303-318.
- [110] Follenzi A, Naldini L. HIV-based vectors. Preparation and use[J]. Methods in molecular medicine, 2002, 69: 259-274.
- [111] Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors[J]. Gene therapy, 2000, 7(11): 910-913.
- [112] Rohll J B, Mitrophanous K A, Martin-Rendon E, et al. Design, production, safety, evaluation, and clinical applications of nonprimate lentiviral vectors[J]. Methods in enzymology, 2002, 346: 466-500.
- [113] Sheu J, Beltzer J, Fury B, et al. Large-scale production of lentiviral vector in a closed system hollow fiber bioreactor[J]. Molecular therapy Methods & clinical development, 2015, 2: 15020.
- [114] Witting S R, Li L H, Jasti A, et al. Efficient large volume lentiviral vector production using flow electroporation[J]. Human gene therapy, 2012, 23(2): 243-249.
- [115] Ansorge S, Lanthier S, Transfiguracion J, et al. Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures[J]. The journal of gene medicine, 2009, 11(10): 868-876.
- [116] Sena-Esteves M, Tebbets J C, Steffens S, et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes[J]. Journal of virological methods, 2004, 122(2): 131-139.
- [117] Monterey M D, Szerlip N J, Mathupala S P. Low-cost media formulation for culture of brain tumor spheroids (neurospheres)[J]. BioTechniques, 2013, 55(2): 83-88.
- [118] Miki H, Takagi M. Design of serum-free medium for suspension culture of CHO cells on the basis of general commercial media[J]. Cytotechnology, 2015, 67(4): 689-697.
- [119] Yao S, Chen S, Clark J, et al. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(18): 6907-6912.
- [120] Froud S J. The development, benefits and disadvantages of serum-free media [J]. Developments in biological standardization, 1999, 99: 157-166.
- [121] Brunner D, Frank J, Appl H, et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database[J]. Altex, 2010, 27(1): 53-62.
- [122] Rashid M U, Coombs K M. Serum-reduced media impacts on cell viability a

- nd protein expression in human lung epithelial cells[J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(6): 7718-7724.
- [123] Biaggio R T, Abreu-Neto M S, Covas D T, et al. Serum-free suspension culturing of human cells: adaptation, growth, and cryopreservation[J]. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2015, 38(8): 1495-1507.
- [124] Rodrigues M E, Costa A R, Henriques M, et al. Comparison of commercial serum-free media for CHO-K1 cell growth and monoclonal antibody production[J]. *International journal of pharmaceuticals*, 2012, 437(1-2): 303-305.
- [125] Rodrigues M E, Costa A R, Henriques M, et al. Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production[J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2013, 169(4): 1279-1291.
- [126] Jukić S, Bubenik D, Pavlović N, et al. Adaptation of CHO cells in serum-free conditions for erythropoietin production: Application of EVOP technique for process optimization[J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2016, 63(5): 633-641.
- [127] Shridhar S, Klanert G, Auer N, et al. Transcriptomic changes in CHO cells after adaptation to suspension growth in protein-free medium analysed by a species-specific microarray[J]. *Journal of biotechnology*, 2017, 257: 13-21.
- [128] Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development[J]. *Scientific reports*, 2020, 10(1): 18996.
- [129] Calmeiro J, Mendes L, Duarte I F, et al. In-Depth Analysis of the Impact of Different Serum-Free Media on the Production of Clinical Grade Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy[J]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 593363.
- [130] Feng R M, Zong Y N, Cao S M, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics?[J]. *Cancer communications (London, England)*, 2019, 39(1): 22.
- [131] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2015, 65(2): 87-108.
- [132] Majzner R G, Mackall C L. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy [J]. *Cancer discovery*, 2018, 8(10): 1219-1226.
- [133] Kim D W, Cho J Y. Recent Advances in Allogeneic CAR-T Cells[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2).
- [134] McCarron A, Donnelley M, McIntyre C, et al. Challenges of up-scaling lenti

- virus production and processing[J]. *Journal of biotechnology*, 2016, 240: 23-30.
- [135] Even M S, Sandusky C B, Barnard N D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations[J]. *Trends in biotechnology*, 2006, 24(3): 105-108.
- [136] Sinacore M S, Charlebois T S, Harrison S, et al. CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1996, 52(4): 518-528.
- [137] Renner W A, Jordan M, Eppenberger H M, et al. Cell-cell adhesion and aggregation: Influence on the growth behavior of CHO cells[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1993, 41(2): 188-193.
- [138] Lohr V, Genzel Y, Behrendt I, et al. A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor[J]. *Vaccine*, 2010, 28(38): 6256-6264.
- [139] 赵亮, 朱明龙, 张旭, 等. 钙离子对 293 细胞结团和生长的影响[J]. *生物工程学报*, 2005, (03): 482-485.
- [140] Gallo-Ramírez L E, Nikolay A, Genzel Y, et al. Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production[J]. *Expert review of vaccines*, 2015, 14(9): 1181-1195.
- [141] de Los Milagros Bassani Molinas M, Beer C, Hesse F, et al. Optimizing the transient transfection process of HEK-293 suspension cells for protein production by nucleotide ratio monitoring[J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(3): 493-514.
- [142] Schoofs G, Monica T J, Ayala J, et al. A high-yielding serum-free, suspension cell culture process to manufacture recombinant adenoviral vectors for gene therapy[J]. *Cytotechnology*, 1998, 28(1-3): 81-89.
- [143] Peshwa M V, Kyung Y S, McClure D B, et al. Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: effect of calcium concentration of spatial distribution of viability[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1993, 41(2): 179-187.