

**EuLV**®

## 基于稳定细胞系的慢病毒生产系统

- ➔ 无需质粒及转染试剂
- ➔ 无血清悬浮培养工艺
- ➔ 病毒载体一致性强



扫码观看视频介绍

# EuLV®慢病毒载体生产系统

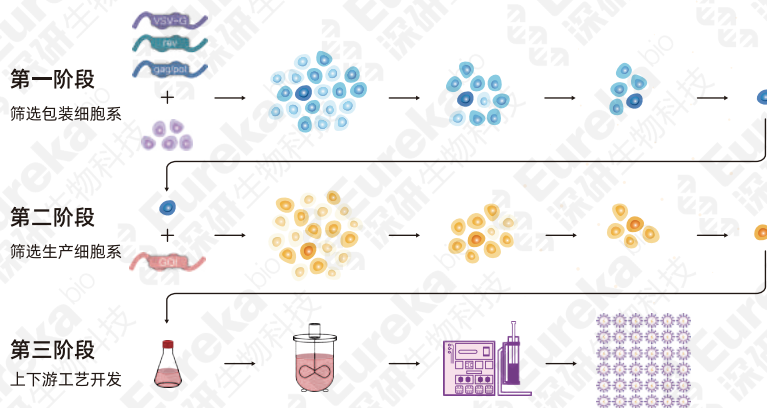
深研生物开发的EuLV®系统是一个基于稳定细胞系的慢病毒载体生产系统，使用可诱导稳定生产细胞系，通过高细胞密度悬浮培养，在化学成分限定培养基（CDM）中生产慢病毒载体。EuLV®慢病毒载体生产系统不再需要进行质粒转染，系统将所需要的VSV-G, gag/pol, rev以及目的基因GOI稳定插入293T细胞基因组中，再通过药物进行诱导表达慢病毒载体。

## EuLV®系统技术路线

第一阶段，将所有慢病毒包装基因(VSV-G, gag/pol, rev)和分子开关稳定插入293T细胞基因组中，构建EuLV®包装细胞系，并筛选和测试最优克隆。

第二阶段，将目标基因GOI稳定插入EuLV®包装细胞系中，并进行筛选和测试，获得高产且稳定的单克隆生产细胞系。

第三阶段，以高细胞密度悬浮培养，在化学成分限定培养基(CDM)中，以高细胞密度悬浮培养的方式，大规模培养EuLV®生产细胞，添加诱导剂和补料生产慢病毒载体。

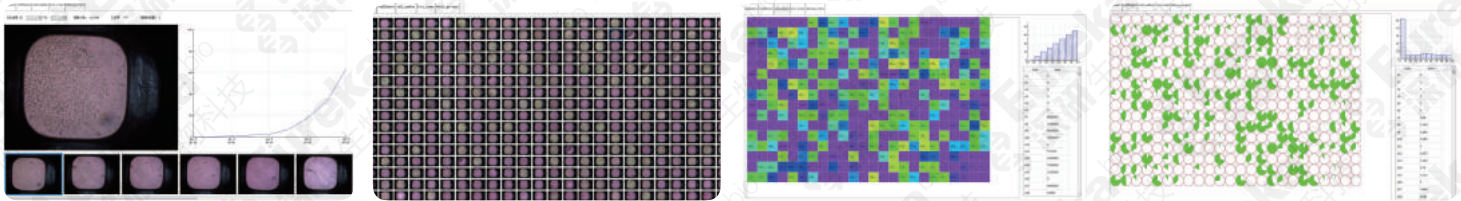
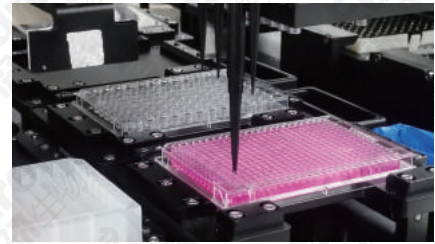
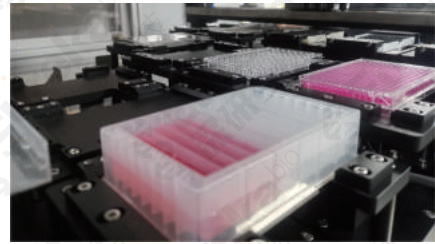
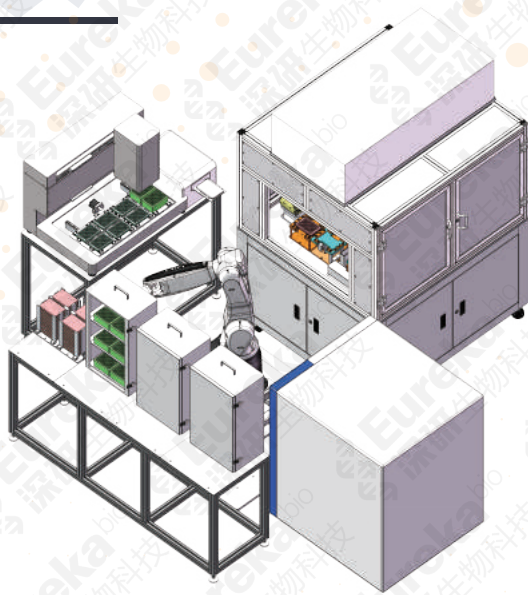


## EuLV®系统优势

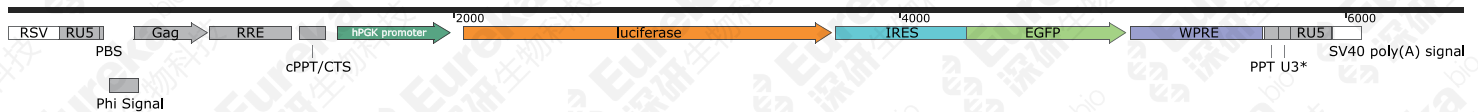
与传统的瞬时转染的生产方法相比，深研生物的EuLV®系统具有多方面优势：

|             | 传统质粒转染方式                                | EuLV®系统                             |
|-------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| 生产方法        | 质粒+转染试剂                                 | 稳定细胞系+诱导剂                           |
| 培养方式        | 贴壁培养 或 悬浮培养                             | 悬浮培养                                |
| 培养基         | 需要血清                                    | 化学成分限定培养基                           |
| 工艺稳定性       | 低                                       | 高                                   |
| 病毒一致性       | 低                                       | 高                                   |
| 病毒比活        | 约 $1 \times 10^5$ TU/ng P24(ELISA)      | 大于 $1 \times 10^6$ TU/ng P24(ELISA) |
| 病毒滴度（培养基原液） | $2 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ TU/mL | 最高 $8 \times 10^8$ TU/mL，表达量与GOI相关  |
| 生产成本        | 高                                       | 低                                   |

# EuLV® 细胞系开发及筛选

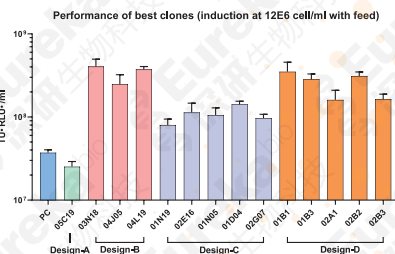
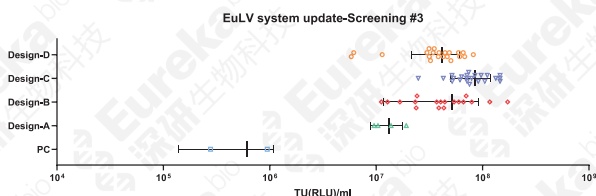
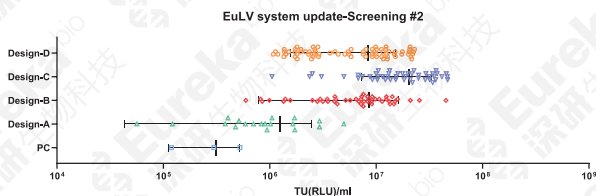
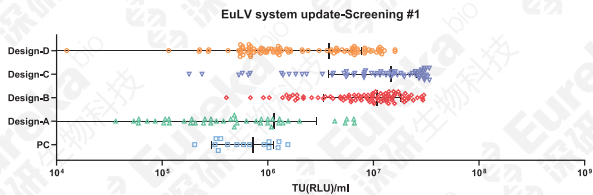


深研生物开发的自动化单克隆筛选平台EuBioX，可自动完成细胞培养的常规操作，例如单克隆细胞系筛选、细胞检测、病毒滴度定量、DoE物料准备。平台已经适应了384孔板至6孔板的操作，并包含非染色活细胞分析系统。平台可以记录、跟踪、分析和挑选性能最佳的单克隆细胞系，在单轮实验中，单次筛选和检测的细胞系克隆数目超过10000个。



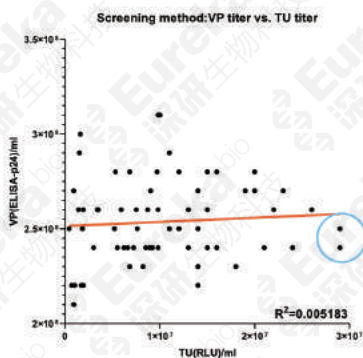
● 插入片段长度3.5kb

在包装细胞系的开发过程中，3.5kb的hPGK-Luciferase-IRES-EGFP被插入包装细胞系中，通过荧光定量的方法或流式细胞仪检测，在HT1080细胞中进行相应细胞系所生产的慢病毒载体的转导滴度定量。



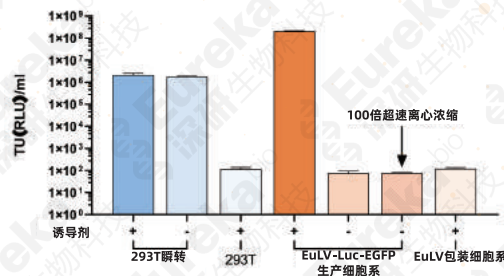
通过对细胞系构建方法、细胞筛选方法、慢病毒基因组转录盒的设计和病毒生产过程的优化，EuLV®系统进行了一系列优化升级。左图显示了4个设计方案在三轮筛选过程中的病毒滴度结果。每个点代表一个单克隆细胞系，X轴是病毒滴度，经过几轮从384孔板到悬浮培养的筛选后，设计方案B、C、D的平均病毒滴度均高于 $1 \times 10^8$  TU/mL，其中设计方案B和D中最佳单克隆细胞系所生产的病毒滴度高于 $4 \times 10^8$  TU(RLU)/mL。

## 比活/空壳率指标的筛选



EuLV®在筛选生产细胞系的过程中可以优先挑选具有转导滴度高同时物理滴度低特点的单克隆细胞系，这类细胞系生产出的慢病毒载体比活高、空壳率低，例如上图中蓝色圈内的两个单克隆。

## 零泄漏的诱导系统

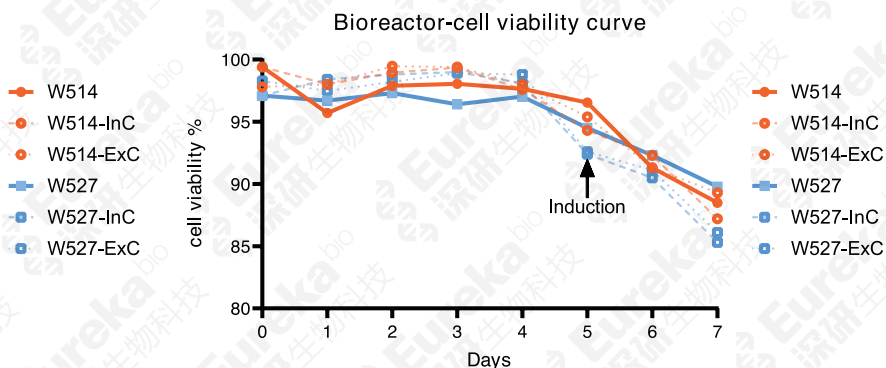
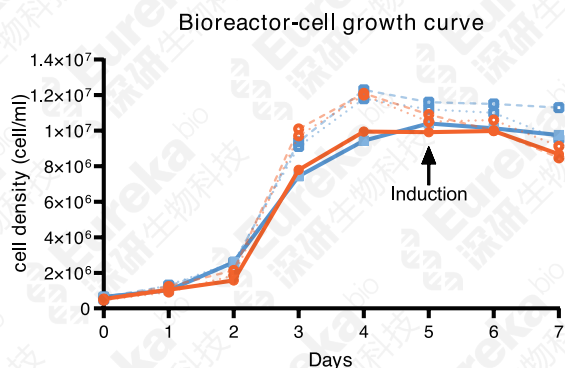


EuLV®系统的生产细胞系在无添加诱导剂下的产毒滴度与背景对照组中空白的293T相同，约为 $1 \times 10^2$  TU/mL，将样品超速离心浓缩100倍，病毒滴度仍与对照组中空白的293T没有区别。该实验结果表明EuLV®系统中的病毒泄漏接近于0。

# 通过EuLV<sup>®</sup>系统生产慢病毒载体的流程



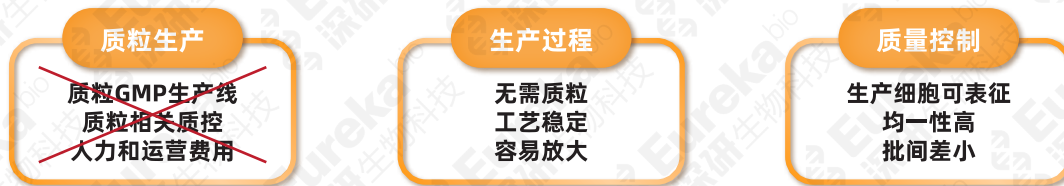
上图显示了通过EuLV<sup>®</sup>系统慢病毒载体的主要生产步骤。第1天，复苏生产细胞系，在摇瓶中培养。在细胞扩增到第7天后，将细胞转移到波浪式生物反应器中，再培养5天，当细胞密度达到每毫升 $1 \times 10^7$ 个细胞时，添加诱导剂和补料开始产生慢病毒。在第14天，收获病毒，进行纯化、制剂和分装等后续步骤。



在1升的波浪式生物反应器中培养到第五天后，细胞密度达到 $1 \times 10^7$ 个细胞每毫升，添加诱导剂，收获病毒时细胞活率大于85%。培养基原液的病毒产量为 $5.3 \times 10^{11}$  TU(RLU)/L，纯化后的病毒产量为 $1.2 \times 10^{11}$  TU(RLU)/L。

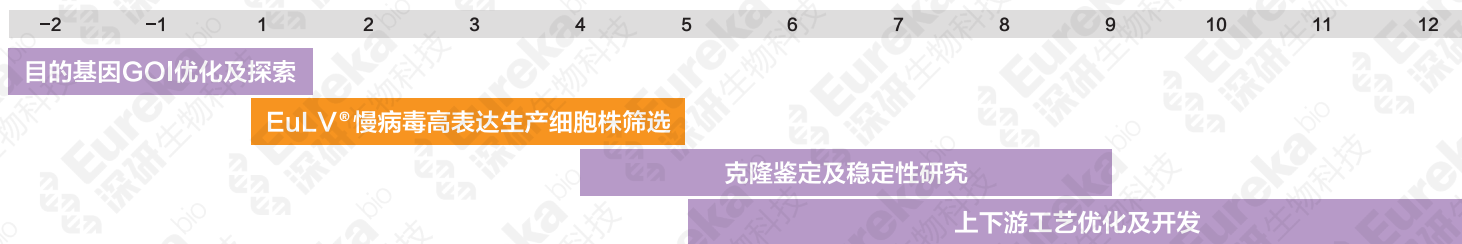
# 简化的慢病毒载体生产和质控

使用EuLV®系统生产慢病毒载体，一方面，由于生产过程中不再使用质粒，因此也不再需要专门用于质粒生产的GMP厂房和设备，减少了此部分相关的质控和运营成本，简化了慢病毒载体的生产流程。另一方面，使用单克隆细胞株进行慢病毒载体生产，克服了瞬时转染的缺点，极大提高了慢病毒载体的均一性及表达量，更有利于批间差的控制，且生产工艺易于放大。



## EuLV® CRO 项目服务时间表

开发时间表 (月)



- 核心CRO服务内容
- 可选CRO服务内容

深研生物提供EuLV®系统的CRO服务，客户只需提供基因序列或者质粒，深研生物将在4个月内交付相应的单克隆细胞系。深研生物还提供其他可选的服务，包括GOI优化、克隆鉴定及稳定性研究、上下游工艺开发等。

**Eureka<sup>bio</sup>**  
**深研生物科技**



电话: +86-755-86562586  
电邮: enquiry@eurekabio.com  
网址: www.eurekabio.com  
地址: 深圳市南山区南海大道1079号  
花园城数码大厦A座8楼