

使用 VIPS 與 InstiGRO 補充劑改善 HEK293 細胞株系列之克隆生長

介紹

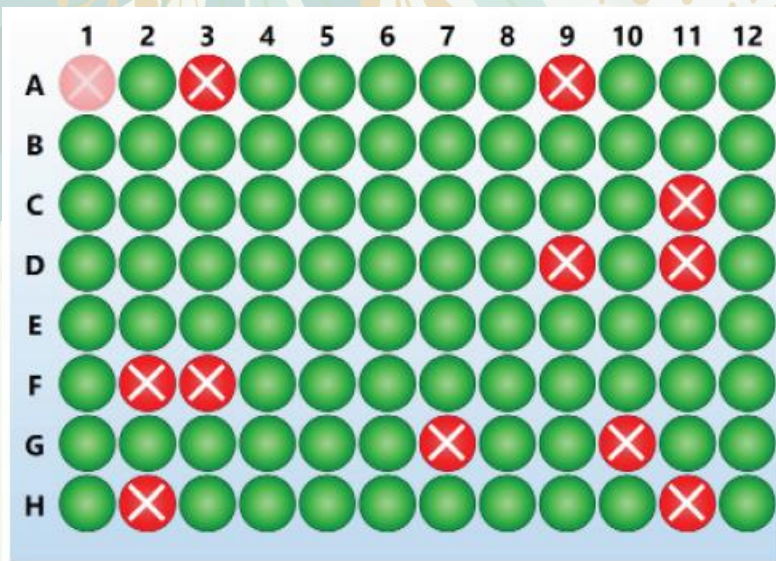
基因和細胞治療工作流程經常利用 HEK293/293T 細胞生產病毒載體。正如2020年 FDA 關於細胞和基因治療的 CMC 和 IND 指南中所述，監管機構和製造商都在尋求標準化病毒載體生產工作流程的最佳實踐⁽¹⁾。出於對患者安全的敏銳關注，指南中強調避免使用動物源性試劑 (Animal-derived reagents)，並使用克隆性保證 (Assurance of Clonality) 作為生產質量控制的一部分⁽²⁾。

本篇評估了兩種適用於 HEK 細胞的技術，這兩種技術都已在基於 CHO 細胞株開發工作流程中得到廣泛接受。這些技術是經過驗證的原位孔盤接種 (Verified In-situ Plate Seeding, VIPS™) 儀器，一種提供監管保證的基於圖像原理之高效單細胞接種儀，以及一種支持早期單細胞生長的無動物性成分之細胞生長補充劑 InstiGRO™ HEK，都可從 Solentim (Advanced Instruments) 購得。

材料和方法

使用 VIPSTM 儀器將四種不同 HEK 細胞株：293T (ECACC)、HEK293 (ECACC)、Exp293FTM (Thermo Fisher) 和 HEK293 6E (由GSK提供) 進行單細胞接種 (Single cell seeding) 到 Corning 96孔盤 (#3596) 中。根據 VIPSTM 工作流程，在播種 (Cell seeding) 後立即收集每個孔中存在單個細胞的證明 (通過液滴中的Z軸成像和分析)，並在第0天通過全孔成像 (Whole well imaging) 後填充培養基。每孔在播種後定期成像，記錄 Colony 生長的圖像。紀錄並統計不同細胞培養基條件下的克隆生長 (Clonal outgrowth, 單細胞生長成集落 colony的百分比)。Expi293、293T 和 HEK293 細胞株在補充了30%條件培養基 (Conditioned media, CM) 的基礎培養基，以及基礎培養基加入 InstiGRO™ HEK 中生長。

HEK293 6E 細胞在三種培養基下進行測試條件：Balan CD HEK 293 Irvine (Irvine Scientific) 加 InstiGRO™ HEK、加 25% CM，以及加25% CM 和 ITS 補充劑 (Stem Cell Technologies)。



用於 HEK293 細胞高效接種的VIPSTM 單細胞評估示意圖



VIPSTM automated single cell seeder，具有基於圖像的監管證據

結果

第一個關鍵點是播種效率 (Seeding efficiency)。本篇實驗中發現 VIPSTM 在細胞接種後的液滴中以及填充培養基後的全孔圖像中，都可以立即並有效地識別單顆 HEK 細胞。這些數據一起建立了一個“雙鎖 (Double lock)”保證，可以作為克隆性證據 (Evidence of clonality) 提供監管審核。

HEK293T cell in the VIPS droplet



Corresponding HEK293T cell as observed in whole well imaging at day 0



圖1. VIPS™ 播種後的 HEK293T 圖像，用於記錄本篇所有細胞類型的高接種效率(具有單顆細胞的 Well 數量百分比)(見表1)

Cell Type	Media Type	Average Seeding Efficiency from at least 3 plates at different conditions
293T	Media + Conditioned	69%
	Media Media + InstiGRO HEK	69.3%
HEK293	Media + Conditioned Media Media +	64%
	InstiGRO HEK	62%
Exp293F	Media + Conditioned Media	75%
	Media + InstiGRO HEK	80%
HEK293 6E	Media + InstiGRO	81%
	Media + Conditioned Media	83%
	Media + Conditioned Media + ITS	83%

表1. 使用 VIPS™ 和不同條件的平均播種效率

與預期播種效率為30%，使用0.5個細胞/孔濃度的手動限制性稀釋 (Limiting dilution, LD) 相比，VIPS™ 記錄的播種效率在62% 和83% 之間，是 LD 的2-3倍。在實踐層面上，使用 VIPS™ 提升播種效率將可顯著減少相同實驗目標下所需消耗的細胞孔盤數。

第二個關鍵點是使用 InstiGRO™ HEK 補充劑可顯著改善單個 HEK293 細胞的存活和生長。使用 Solentim Cell Metric® 全孔成像儀監測後續克隆生長，圖2顯示了在使用 VIPS™ 接種並添加InstiGRO™ HEK 後 293T 細胞生長增加的圖像，而圖3顯示了所有細胞類型在添加 InstiGRO™ HEK 後的克隆生長百分比增加。

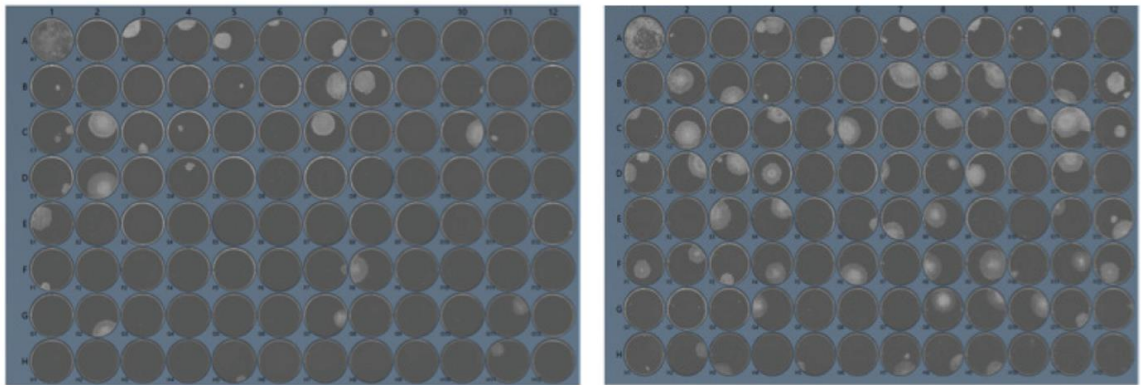


圖2. 使用(右)和不使用(左) InstiGRO™ HEK 細胞培養補充劑的克隆生長圖像。InstiGRO™ HEK 在所有測試條件下對克隆生長都有顯著的正向影響，生長增加了2.7到11.5倍

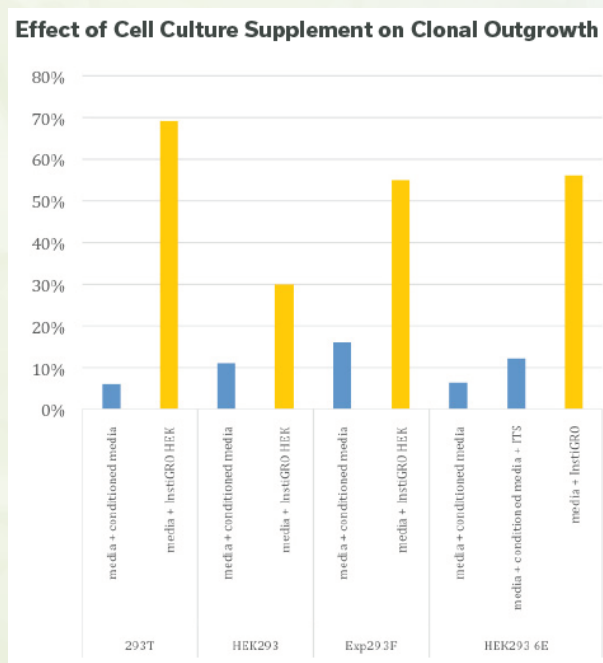


圖3. 使用(黃色組別)和不使用(藍色組別) InstiGRO™ HEK 細胞培養補充劑的克隆生長比較

結論

隨著越來越多的基因治療產品通過臨床試驗，將有更多的需求轉向穩定用於生產病毒載體的生產細胞株。VIPS™ 和 InstiGRO™ HEK 的使用被發現是開發基於 HEK 的穩定細胞株之強大組合，同時滿足對克隆衍生的主細胞庫 (Clonally-derived Master Cell Banks) 的監管要求。

Acknowledgements

Claire Richards¹, Camilla Domeneghetti¹, Emma Morris¹, Gabriela Kozejova²

1. Solentim Ltd., Solent House, Johnson Road, Fernside Business Park, Wimborne, Dorset, BH217SE
United Kingdom

2. GSK, Protein & Cell Sciences, Gunnels Wood Road, Stevenage, SG1 2NY, United Kingdom

References

1. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry, January 2020
<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug>
2. <https://www.solentim.com/news-insights/understanding-the-latest-fda-guidance-on-investigational-newdrugs-for-cell-and-gene-therapy/>

文章來源：[Improved Outgrowth For HEK 293 Cell Line Development. Clonality and improved outgrowth for HEK 293 cells when developing stable producer cell lines for viral vector production in gene therapy.](#) (Advanced Instruments)