[文章编号] 1003－4684(2025)01-0065-05

CD19-CAR 慢病毒生产方法的比较分析与优化

詹思建，张 帆，段海潇，汪 洋，胡 翰，刘滨磊
（湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068）

[摘 要] 为优化 CD19-CAR 慢病毒的生产方法，以获得更优的生产条件，采用慢病毒三质粒包装系统（pLVX，psPAX2，pMD2.G），并利用转染试剂（lipo8000™，Lipofectamine® 3000，PEIpro®）进行慢病毒的包装，通过超速离心和超滤技术对慢病毒进行浓缩。并利用流式细胞仪测定慢病毒滴度。研究发现，使用 Lipofectamine® 3000 转染试剂包装的慢病毒原液滴度最高；在 pLVX、psPAX2 与 pMD2.G 质量比为 4∶3∶1，质粒总量为 5 μg，质粒总量（m/μg）与转染试剂体积比（V/μL）为 1∶5 时，慢病毒的滴度达到最高。此外，使用超滤方法浓缩的慢病毒滴度高于超速离心法。尽管使用 Lipofectamine® 3000 包装慢病毒原液滴度最高，但考虑到扩大生产的成本，选择性价比更高的 PEIpro® 更为适宜。因此，本研究得出的最佳慢病毒生产方法是：使用转染试剂 PEIpro® 包装慢病毒，在 pLVX、psPAX2 与 pMD2 质量比为 4∶3∶1，质粒总量为 5 μg，质粒总量（m/μg）与转染试剂体积比（V/μL）为 1∶5，收集 48 h 和 72 h 的病毒上清液，并通过超滤方法对慢病毒进行浓缩。

[关键词] 慢病毒；病毒包装；病毒浓缩；滴度
[中图分类号] R153 [文献标识码] A

嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）是一种通过基因工程技术改造的 T 细胞，使其能够表达嵌合抗原受体，从而靶向并杀伤具有特定抗原的肿瘤细胞[1]。CAR-T 细胞因其在临床中显示出的有效和持久反应而备受关注，[2]。特别是针对 B 淋巴细胞 CD19 抗原的 CAR-T 细胞，在临床试验中已证明对多种血液瘤具有显著疗效，这些血液瘤包括急性淋巴细胞白血病（ALL）和慢性淋巴细胞白血病（CLL）[3]。值得注意的是，诺华公司的 Kymriah 和凯特制药公司的 Yescarta 这两种靶向 CD19 的 CAR-T 细胞产品，已被美国 FDA 批准用于治疗 B 细胞急性淋巴细胞白血病（B-ALL）和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）[4]。然而，在 CAR-T 细胞疗法中，将嵌合抗原受体（CAR）稳定整合到 T 细胞中是关键步骤，通常需要使用慢病毒载体来实现。

慢病毒载体因其广泛的宿主范围和对分裂和非分裂细胞的感染能力而受到青睐，尤其对于较难转染的细胞，如原代细胞、干细胞、不分化的细胞等，慢病毒载体能显著提高目的基因的转导效率，增加目的基因整合到宿主细胞基因组的概率[5]。随着慢病毒载体技术的发展，第二代慢病毒系统具有安全性好、重组概率低等优点，成为制备 CAR-T 细胞的最佳选择[6]。

尽管已有众多科研机构和公司研究针对不同肿瘤抗原的 CAR-T 细胞疗法，但 CAR-T 细胞疗法在临床应用上的成功案例仍然有限，部分原因在于制备高效、稳定的 CAR-T 细胞存在一定难度且成本较高。首先，T 细胞需要在体外激活以增强存活能力，但过度激活可能导致 T 细胞激活诱导的细胞凋亡（AICD）。其次，激活后的 T 细胞还需能耐受慢病毒的感染，而 T 细胞作为悬浮细胞，很难被慢病毒转导，为了提高转导效率，必须对慢病毒的生产过程进行优化。所以，为了制备高效、稳定的 CAR-T 细胞以供研究和临床应用，高滴度的慢病毒是必不可少的前提。

本研究旨在优化 CD19-CAR 慢病毒的制备工艺，为实验室后续的 CAR-T 细胞的制备及功能研究提供基础。为了制备高滴度的慢病毒，本研究从转染体系、转染试剂选择、慢病毒浓缩时间和方法等方面进行比较，以确定最佳的慢病毒生产条件。

1 实验材料

人胚胎肾细胞系 293T，本实验室保存；慢病毒载体质粒 pLVX-EF1α-PuroR-CAR-IRES-EGFP（pLVX-PuroR-EGFP）、psPAX2、pMD2.G，本实验室保存；慢病毒载体质粒 pLVX-EF1α-IRES-Zs-

[收稿日期] 2022－12－21
[第一作者] 詹思建（1999－），男，湖北麻城人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为生物与医药。
[通信作者] 刘滨磊（1962－），男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

Green1(pLVX-ZsGreen1)，购自优宝生物；DME/F-12 培养基，购自 Hyclone 公司；胎牛血清，购自四季青公司；重组人白介素-2，购自 Peprotech 公司；人源 T 淋巴细胞分离磁珠，购自 BD 公司；人源 CD3/CD28 激活磁珠，购自 Gibco 公司；PE-CD19 蛋白，购自 Acrosystem 公司；lipo8000™转染试剂，购自碧云天公司；Lipofectamine® 3000 转染试剂，购自 ThermoFisher 公司；PEIpro®，购自 Polyplus 公司。高速冷冻离心机，ThermoFisher，Multifuge X1R；细胞计数仪，ThermoFisher，Countess Ⅱ；超速离心机，Beckman，Optima XE；流式细胞仪，BD，Accuri-C6。

2 实验方法

2.1 不同转染试剂的比较

将 293T 细胞以 6×10^5 个/孔的密度接种于六孔板中次日，待细胞汇合度达到 80%时，更换为新鲜的含 10% FBS-DME/F-12 培养基，并使用 lipo8000™、Lipofectamine 3000® 和 PEIpro® 三种不同的转染试剂进行慢病毒的制备，具体操作步骤详见各试剂的说明书。转染后 48 和 72 h 收取上清，通过0.45 μm滤头过滤后，测定病毒滴度。

2.2 不同转染体系的比较

将 293T 细胞以 6×10^5 个/孔的密度接种在六孔板中。次日，待细胞汇合度达到 80%时，更换为新鲜的含 10%FBS-DME/F-12 培养基，并采用不同的转染体系转染制备慢病毒。实验中设置 m(pLVX)∶m(psPAX2)∶m(pMD2.G)=4∶3∶1 和 m(pLVX)∶m(psPAX2)∶m(pMD2.G)=4∶2∶1两种条件；质粒总量分别为 2.5 μg 和 5 μg；转染试剂体积和质粒总量比为1∶1、3∶1和5∶1。转染后 48 和 72 h 收取上清，通过 0.45 μm 滤头过滤后，测定病毒滴度。

2.3 不同离心时间的比较

将 293T 细胞以 4×10^6 个/皿的密度接种在 10 cm培养皿中。次日，待细胞汇合度达到 80%时，更换为新鲜的含 10%FBS-DME/F-12 培养基并进行转染。转染后 48 和 72 h 收取上清，通过0.45 μm 滤头过滤后，将慢病毒上清液加入超速离心管中并配平(误差控制在±0.01 g 以内)，在 4℃的条件下，以 72000×g 分别离心 0.5、1、1.5 和 2 h。离心完成后，弃去上清液，用等量的 PBS 重悬病毒颗粒，并测定病毒滴度。

2.4 不同慢病毒主质粒的比较

将 293T 细胞以 4×10^6 个/皿的密度接种于 10 cm培养皿中。次日，待细胞汇合度达到80%时，更换为新鲜的含 10%FBS-DME/F-12 培养基并进行转染。分别用使用 pLVX-PuroR-EGFP 和 pLVX-ZsGreen1 作为主质粒进行慢病毒的包装。转染后 48 和 72 h 收取上清，通过 0.45 μm 滤头过滤后，采用超速离心的方法浓缩慢病毒，并测定病毒滴度。

2.5 不同浓缩方法的比较

将 293T 细胞以 4×10^6 个/皿的密度接种于 10 cm培养皿中次日，待细胞汇合度达到 80%时，更换为新鲜的含 10%FBS-DME/F-12 培养基并进行转染。转染后 48 和 72 h 收取上清，通过 0.45 μm 滤头过滤后，分别采用超速离心和超滤的方法对慢病毒进行浓缩，并测定病毒滴度。超速离心的方法同前文，超滤浓缩的方法就是将慢病毒上清液加入 100 kg/mol 的超滤管中，配平(误差控制在±0.01 g 以内)，然后用 4000×g 的转速在 4℃条件下进行 40 min 的高速冷冻离心后收集滤膜上方的液体。

2.6 慢病毒滴度测定

将 293T 细胞以 4×10^4 个/孔的细胞密度接种至 96 孔板中。次日，待细胞汇合度达到 80%时，更换添加了 polybrene(终浓度为 7 μg/mL)的含 10% FBS-DME/F-12 培养基，并放入细胞培养箱中静置 20 min。用梯度稀释法以 10 的梯度依次稀释慢病毒后，以 10 μ/孔的量加入到静置后的 96 孔板中。72 h 后，用胰酶消化并收集细胞，再用 PBS 洗涤两遍后，用流式细胞仪检测 GFP 的阳性率来计算滴度：

$$T=\frac{A\times B\times N}{C} \tag{1}$$

式中：T 为慢病毒滴度，TU/mL；A 为接种慢病毒时的 HEK-293T 细胞数(个)；B 为一定稀释倍数下 GFP(绿色荧光蛋白)表达率，%；N 为稀释倍数；C 为病毒体积，mL。

3 实验结果

3.1 不同转染试剂的比较

比较了三种不同转染试剂 lipo8000、Lipofectamine 3000® 和 PEIpro® 在制备慢病毒时的效果。通过流式细胞术分析了 293T 细胞感染慢病毒后的 GFP 阳性率，结果如图 1 所示。具体而言，使用 lipo8000、Lipofectamine 3000® 和 PEIpro® 转染后得到的 GFP 阳性率分别为 8.7%(A)、20.2%(B)和 14.5%(C)。根据滴度计算公式，得出使用这三种转染试剂收集的慢病毒滴度分别为 1.01×10^5、2.35×10^5 和 1.59×10^5 TU/mL，如图 1 中 E 的柱状统计图所示。

实验结果表明,使用 Lipofectamine 3000® 转染后获得的慢病毒滴度最高,但是从性价比的角度来看,PEIpro® 转染试剂的性价比更高一些。

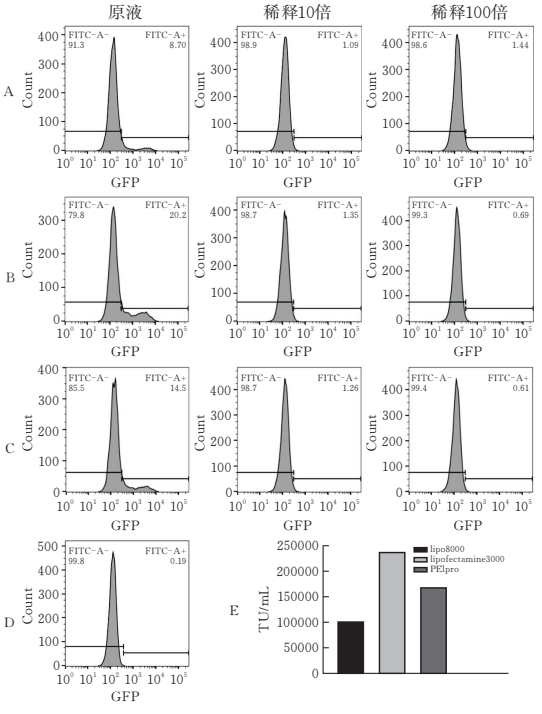


图 1　不同转染试剂转染获得的慢病毒感染 293T 细胞后 GFP 阳性率

A:用 lipo8000TM 转染制备的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T。B:用 Lipofectamine® 3000 转染制备的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T。C:用 PEIpro® 转染制备的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T。D:293T 空白对照组。E:由 A、B、C 的 GFP 阳性率计算出的慢病毒滴度柱状图。

3.2　不同转染体系的比较

通过流式细胞术分析,不同转染体系获得的慢病毒感染 293T 细胞后 GFP 阳性率(图 2)。在相同转染条件下,V(pLVX):V(psPAX2):V(pMD2.G)=4:3:1 时,慢病毒感染 293T 细胞后的 GFP 阳性率要高于,V(pLVX):V(psPAX2):V(pMD2.G)=4:2:1 时;质粒总量 5 μg 时慢病毒感染 293T 细胞后的 GFP 阳性率要高于质粒总量 2.5 μg 时;转染试剂体积和质粒总量比为 5:1 时慢病毒感染 293T 细胞后的 GFP 阳性率要高于 1:1 和 3:1 时。因此,当 V(pLVX):V(psPAX2):V(pMD2.G)=4:3:1,

质粒总量为 5μg,质粒总量(m/μg)与转染试剂体积比(V/μL)为 1:5 时,慢病毒滴度最高。

3.3　不同离心时间的比较

如图 3 所示,通过流式细胞术分析,慢病毒经超速离心机离心 0.5、1、1.5 和 2 h 后,稀释 10 倍感染 293T 细胞的 GFP 阳性率分别为:22.3%(B)、25.8%(C)、42.8%(D)和 59.9%(E)。如图 3 中 G

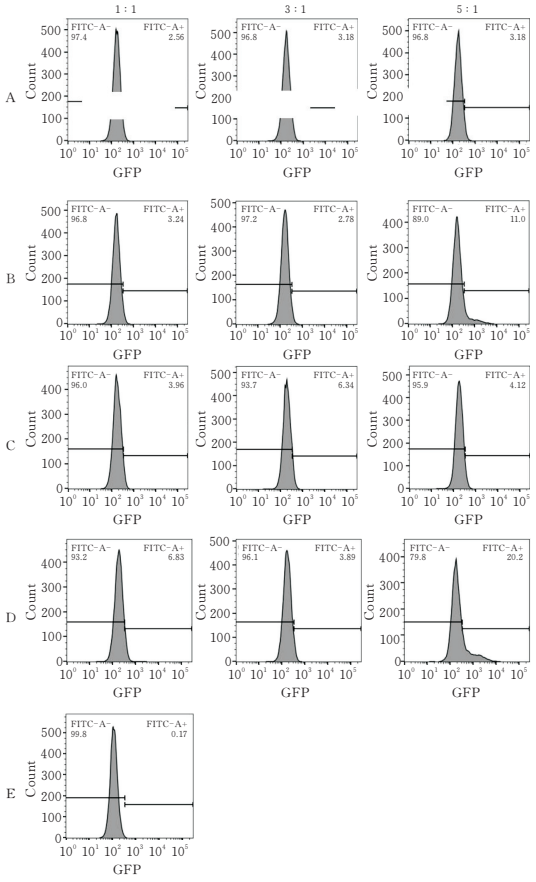


图 2　不同转染体系获得的慢病毒感染 293T 细胞后 GFP 阳性率

A:在 m(pLVX):m(psPAX2):m(pMD2.G)=4:2:1,质粒总量为 2.5 μg,转染试剂体积和质粒总量比分别为 1:1,3:1,5:1 时制备的慢病毒,感染 293T 后的 GFP 阳性率。B:在 V(pLVX):V(psPAX2):V(pMD2.G)=4:2:1,质粒总量为 5 μg,转染试剂体积和质粒总量比分别为 1:1,3:1,5:1 时制备的慢病毒,感染 293T 后的 GFP 阳性率。C:在 m(pLVX):m(psPAX2):m(pMD2.G)=4:3:1,质粒总量为 2.5 μg,转染试剂体积和质粒总量比分别为 1:1,3:1,5:1 时制备的慢病毒,感染 293T 后的 GFP 阳性率。D:在 V(pLVX):V(psPAX2):V(pMD2.G)=4:3:1,质粒总量为 5 μg,转染试剂体积和质粒总量比分别为 1:1,3:1,5:1 时制备的慢病毒,感染 293T 后的 GFP 阳性率。E:293T 空白对照组。

所示,通过滴度计算公式得出,离心 0.5、1、1.5 和2 h 后,慢病毒滴度分别为 2.14×10^6、2.48×10^6、4.11×10^6 和 5.75×10^6 TU/mL。结果表明,离心 2 h 得到的慢病毒滴度最高。

3.4　不同慢病毒主质粒的比较

如图 4 的 A、B 所示,用 pLVX-PuroR-EGFP 做为主质粒制备的慢病毒和用 pLVX-ZsGreen1 做为主质粒制备的慢病毒,感染 293T 细胞的 GFP 阳性率分别为:15.7%和 47.8%。图 4 的 D 所示,通过滴度计算式(1)得出用 pLVX-PuroR-EGFP 作为主质粒和用 pLVX-ZsGreen1 作为主质粒制备的慢病毒

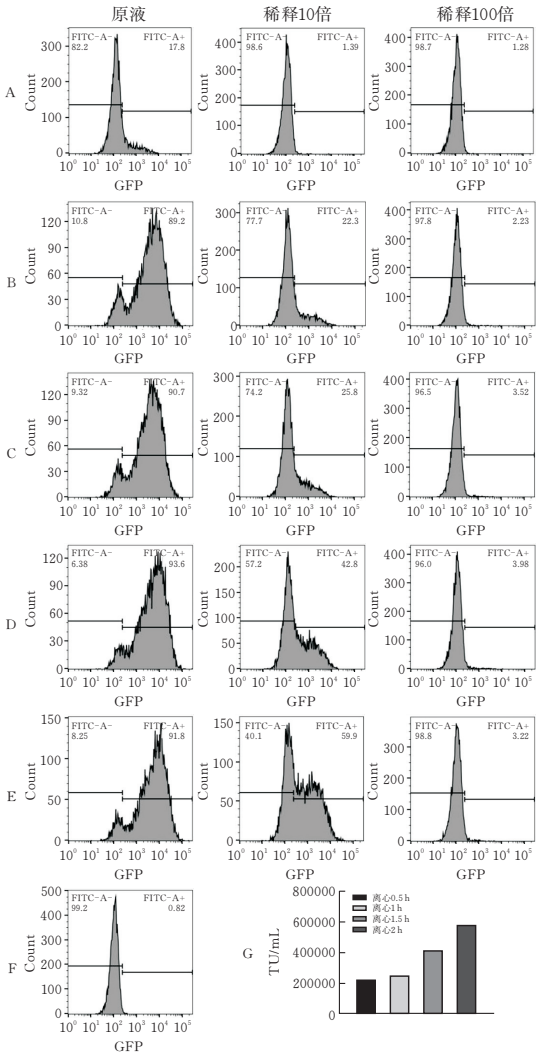


图 3 不同离心时间获得的慢病毒感染 293T 细胞后的 GFP 阳性率

A:未离心浓缩的慢病毒在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。B:离心浓缩 0.5 h 后的慢病毒在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。C:离心浓缩 1 h 后的慢病毒在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。D:离心浓缩 1.5h 后的慢病毒在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。E:离心浓缩 2 h 后的慢病毒在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。F:293T 空白对照组。G:由 A、B、C、D、E 图中的 GFP 阳性率计算出的离心后慢病毒滴度的柱状图。

滴度分别为:5.83×10^5 和 1.78×10^6 TU/mL。

从实验结果可以得出结论用 pLVX-EF1α -CAR-IRES-ZsGreen1 作为主质粒制备慢病毒远优于 pLVX-EF1α- PuroR-CAR-IRES-EGFP。

3.5 不同浓缩方法的比较

如图 5A、B 所示,用超速离心和超滤浓缩的慢病毒稀释 100 倍后,感染 293T 细胞的 GFP 阳性率分别为:2.51%和 6.26%。如图 5 的 D 所示,通过滴度计算公式得出用超速离心和超滤浓缩的慢病毒滴度分别为:2.11×10^7 和 5.26×10^7 TU/mL。

从实验结果可以得出结论用超滤浓缩慢病毒获得慢病毒滴度更高。

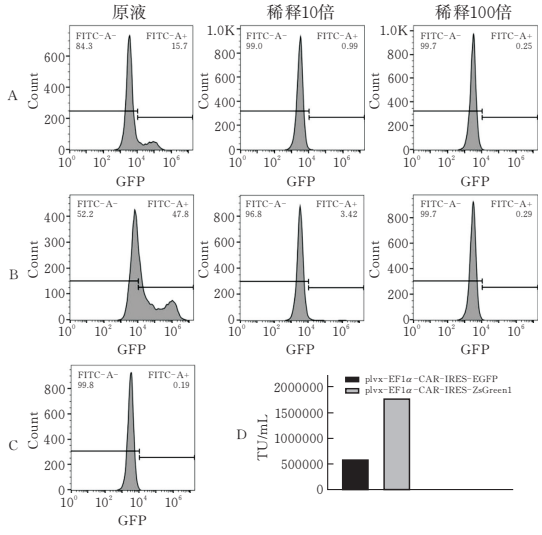


图 4 用流式检测用不同慢病毒主质粒获得的慢病毒感染 293T 细胞后的 GFP 阳性率

A:流式细胞术分析用 pLVX-EF1α- PuroR-CAR-IRES-EGFP 作为主质粒制备的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。B:流式细胞术分析用 pLVX-EF1α -CAR-IRES-ZsGreen1 作为主质粒制备的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。C:293T 空白对照组。D:由 A、B 图中的 GFP 阳性率计算出的慢病毒滴度的柱状统计图。

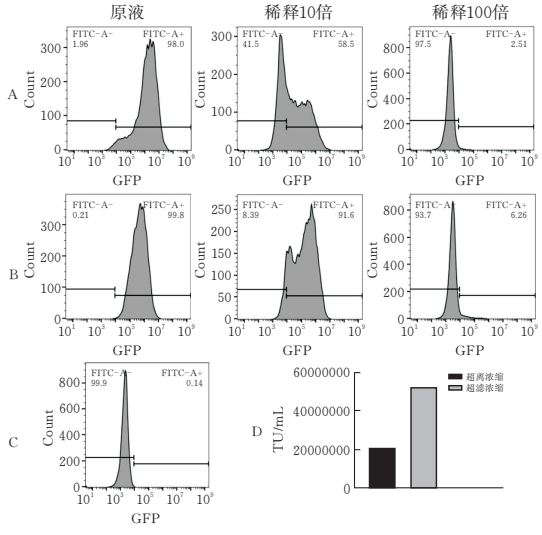


图 5 用流式检测用不同浓缩方法后慢病毒感染 293T 细胞后的 GFP 阳性率

A:流式细胞术分析用超速离心浓缩的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。B:流式细胞术分析用超滤浓缩的慢病毒,在不同稀释倍数下感染 293T 后的 GFP 阳性率。C:293T 空白对照组。D:由 A、B 图中的 GFP 阳性率计算出的慢病毒滴度的柱状统计图。

4 结果与讨论

随着慢病毒载体临床应用的增加,对慢病毒滴

度的要求提高,尤其是插入片段增加时,因此优化慢病毒生产变得格外重要。本文从主质粒选择、转染试剂选择以及转染体系三个方面进行优化,同时比较了浓缩病毒时超速离心的时间,以及超速离心和超滤浓缩两种浓缩方法的慢病毒滴度。结果显示,Lipofectamine 3000 生产的慢病毒滴度最高,但 PEIpro®性价比以及扩大生产时的成本更优。使用 pLVX-EF1α-CAR-IRES-ZsGreen1 质粒分别包装的慢病毒滴度要高于 pLVX-EF1α-CAR-IRES-EGFP。且前者相较于后者少了一个 PuroR 抗性基因,并且含有更短的荧光标记基因 ZsGreen1,结构上更加简单。和预期的结果一样,用 pLVX-EF1α-CAR-IRES-ZsGreen1 包装的慢病毒滴度为 1.78×10^6 TU/mL,而用 pLVX-PuroR-EGFP 包装的慢病毒滴度只有 5.83×10^5 TU/mL。转染体系的优化上,当 m(pLVX)∶m(psPAX2)∶m(pMD2.G)=4∶3∶1,质粒总量为 5 μg,质粒总量(m/μg)与转染试剂体积比(V/μL)为 5∶1 时,慢病毒的滴度最高。当然实际操作中,需要参照转染试剂说明书以及根据转染培养皿大小进行调整。在浓缩方法的比较上,超滤浓缩后的慢病毒滴度达到了 5.26×10^7 TU/mL,远高于超速离心浓缩后的慢病毒滴度 2.11×10^7 TU/mL,这一结果也与 Nicholas P.Anagnou 所报告的结果相一致[7]。后续需评估浓缩后的慢病毒转导效率以及细胞毒性。

[参 考 文 献]

[1] GOLUBOVSKAYA V, WU L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy[J]. Cancers, 2016, 8(03): 36.

[2] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. Blood Cancer Journal, 2021, 11(04): 69.

[3] BRUDNO J N, KOCHENDERFER J N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management[J]. Blood Reviews, 2019, 34: 45-55.

[4] MA S, LI X, WANG X, et al. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors[J]. International Journal of Biological Sciences, 2019, 15(12): 2548-2560.

[5] MUNIS A M. Gene Therapy Applications of Non-Human Lentiviral Vectors[J]. Viruses, 2020, 12(10): 1106.

[6] ZHANG C, LIU J, ZHONG J F, et al. Engineering CAR-T cells[J]. Biomark Res, 2017, 5: 22.

[7] PAPANIKOLAOU E, KONTOSTATHI G, DRAKOPOULOU E, et al. Characterization and comparative performance of lentiviral vector preparations concentrated by either one-step ultrafiltration or ultracentrifugation[J]. Virus Research, 2013, 175(01): 1-11.

Comparative Analysis and Optimization of Cd19 Car Lentiviral Production Methods

ZHAN Sijian[1], ZHANG Fan[1], DUAN Haixiao[1], WANG Yang[1], HU Han[1], LIU Binlei[1,2]

(1 *Biological Engineering and Food, Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*;
2 *Wuhan Binhui Biotechnology Co., Ltd, Wuhan* 436030, *China*)

Abstract: The production method of CD19 CAR lentivirus was optimized to obtain better production conditions. Lentiviruses were packaged using a lentiviral three-plasmid packaging system (pLVX, psPAX2, pMD2.G) with transfection reagents (lipo8000 TM, Lipofectamine 3000, PEIpro), and concentrated by ultracentrifugation and ultrafiltration. The lentivirus titer was determined by flow cytometry. The highest titer of lentivirus was obtained by packaging lentivirus with Lipofectamine 3000. When pLVX: psPAX2: pMD2.G = 4∶3∶1, the total amount of plasmid was 5 μg. The ratio of transfection reagent volume and total plasmid was 5∶1; the titer of lentivirus was the highest. The titer of lentivirus concentrated by ultrafiltration was higher than that by ultracentrifugation. The original titer of lentivirus packaged with Lipofectamine 3000 was the highest, but considering the cost of expanding production, PEIpro with higher cost performance was more suitable. Therefore, the best method for lentivirus production in this study is to use the transfection reagent PEIpro to package the lentivirus. The virus supernatant was collected at 48 h and 72 h under the conditions of pLVX∶psPAX2∶pMD2.G = 4∶3∶1, the total amount of plasmid was 5 μg, and the ratio of transfection reagent volume to the total amount of plasmid was 5∶1.

Keywords: lentivirus; virus packaging; virus concentration; titer

[责任编校:张　众]