

WHITE PAPER UPSTREAM BIOPROCESSING

Nuôi cấy tế bào Vero trong môi trường không có huyết thanh để đạt mật độ cao tế bào trong sản xuất Vaccine cúm

Giới thiệu

Tiêm phòng hàng năm là một phương pháp hiệu quả để phòng ngừa nhiễm cúm. Tuy nhiên, việc mở rộng sử dụng vaccine cúm ở khu vực châu Á - Thái Bình Dương phải đối mặt với nhiều thách thức. Việc sản xuất và triển khai kịp thời vaccine cúm chống lại đại dịch cúm mùa và bắt buộc ở các nước không sản xuất vaccine (nhiều trong số này vẫn còn tồn tại ở châu Á-Thái Bình Dương). Trong bài báo khoa học này, chúng tôi tập trung vào sự phát triển nhanh của vaccine cúm với mục tiêu tạo ra một giải pháp sinh học hoàn hảo có thể đẩy nhanh quá trình sản xuất thay thế cho sản xuất trứng gà.

Esco Aster, một tổ chức sản xuất và phát triển hợp đồng độc lập (CDMO) có trụ sở tại Singapore tập trung vào sản xuất vaccine, sinh phẩm và các sản phẩm trị liệu tế bào chất lượng cao, có đủ các dịch vụ và chúng tôi có những đối tác toàn cầu từ giai đoạn đầu nghiên cứu đến khi sản phẩm được sử dụng tại thị trường.

Để tầm nhìn chính của chúng tôi có thể giúp các quốc gia không sản xuất vaccine có thể tự túc trong sản xuất, bảo quản và phân phối vaccine, gần đây chúng tôi đã hợp tác với công ty công nghệ sinh học Nuvonis (Áo) để thiết lập quy trình sinh học hiệu quả cho phép tạo ra virus cúm bằng cách sử dụng tế bào Vero tại Nuvonis không dùng huyết thanh. Các tế bào Vero của Nuvonis được cung cấp bởi WHO và được thích nghi với sự tăng trưởng không có thành phần tăng trưởng từ động vật/huyết thanh. Ngân hàng tế bào của Nuvonis được sử dụng để chứng minh rằng Esco Vaccixcell CelCradle-500AP có thể được sử dụng để tạo ra mật độ tế bào cao trong điều kiện không dùng huyết thanh, mà không cần thời gian tối ưu hóa dài.

Tóm tắt

Các tế bào Vero (Nuvonis) được nuôi cấy trong điều kiện không có huyết thanh bằng thiết bị nuôi cấy EscoVaccixcell CelCradle-500 (single-use) có chứa vật liệu mang BioNOC™.

Thu được tổng số tế bào $1,7 \times 10^9$ sau 167 giờ (ước tính 7 ngày) nuôi cấy tế bào Vero trong điều kiện không có huyết thanh. Thời gian nhân đôi của các tế bào Vero là 36 giờ, điều này tương tự đối với các tế bào được nuôi trong các chai nuôi cấy.

Các tế bào Vero được lây nhiễm một chủng cúm A với tỷ lệ MOI mong muốn là 0,01. Sau khi nhiễm virus, môi trường được thay 7 lần. Hiệu giá virus nhiễm ở mỗi phần môi trường thu được xác định bằng xét nghiệm huỳnh quang (FFA). Trong tổng số 10,45 log₁₀ FFU/ml virus lây nhiễm đã được tạo ra.

Môi trường và tế bào

Ngân hàng tế bào nghiên cứu Vero không chứa huyết thanh (passage 144-160) được sử dụng. Môi trường không huyết thanh đã bổ sung L-glutamine trước khi sử dụng. Glucose trong môi trường được đo bằng thiết bị GlucCell™ và Esco Vaccixcell GlucCell™ Glucose Test Strips.

Một loại virus cúm A mô hình tái tổ hợp đã được sử dụng cho việc khẳng định nghiên cứu này. Hiệu giá virus nhiễm được xác định bằng xét nghiệm huỳnh quang (FFA).

Nuôi cấy tế bào Vero không dùng huyết thanh trong thiết bị CelCradle-500

Các tế bào từ 5 chai nuôi cấy T175 được thu bằng xử lý trypsin, ly tâm trong 5 phút ở 275xg và được trộn lại trong môi trường nuôi cấy. Các tế bào được trộn với môi trường với tổng thể tích 500 ml và được chuyển sang CelCradle-500AP.

Để đảm bảo tốt việc cố định tế bào, các tham số CelCradle được thiết lập như sau:

Tốc độ lên	Thời gian giữ phía trên	Tốc độ xuống	Tốc độ giữ phía dưới
2.0mm/giây	20 giây	2.0mm/giây	0 giây

Sau 1 giờ 45 phút, thu mẫu môi trường và đếm tế bào bằng nhuộm trypan blue về khả năng sống của tế bào. Nếu 85% các tế bào đã gắn kết ổn định với các carrier BioNOCTM II, các tham số CelCradle được cài đặt như sau:

Tốc độ lên	Thời gian giữ phía trên	Tốc độ xuống	Tốc độ giữ phía dưới
1.0mm/giây	10 giây	1.0mm/giây	10 giây

Môi trường sau đó được thay và bổ sung theo bảng thời gian biểu dưới đây.

Tốc độ tăng	Giữ phía trên
0	Cấy
71.5	Thay môi trường
95.25	Thay môi trường
121.25	Thay môi trường
148.75	Thay môi trường
167	Thay môi trường, thu mẫu và lây nhiễm
173.5	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus
189.5	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus
193.5	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus
208.75	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus
213	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus
217	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus
233	Thay môi trường, thu mẫu cho chuẩn độ virus

WHITE PAPER UPSTREAM BIOPROCESSING

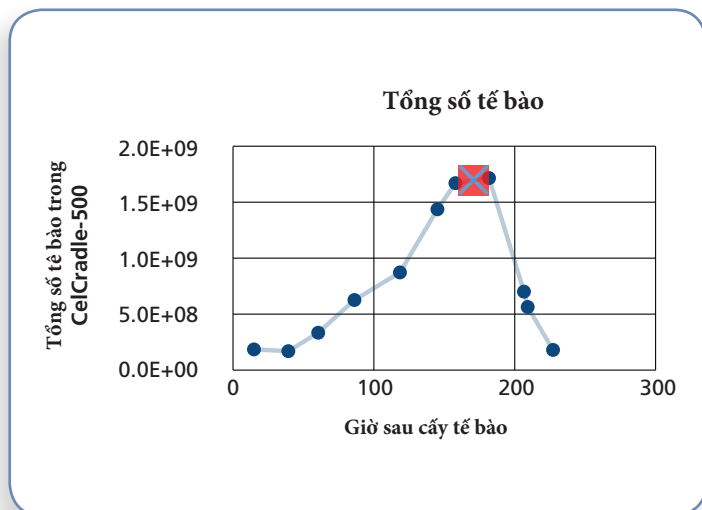
Sự bám tế bào

235x10E6 tế bào Vero đã được cấy vào 500 ml thể tích môi trường nuôi tế bào.

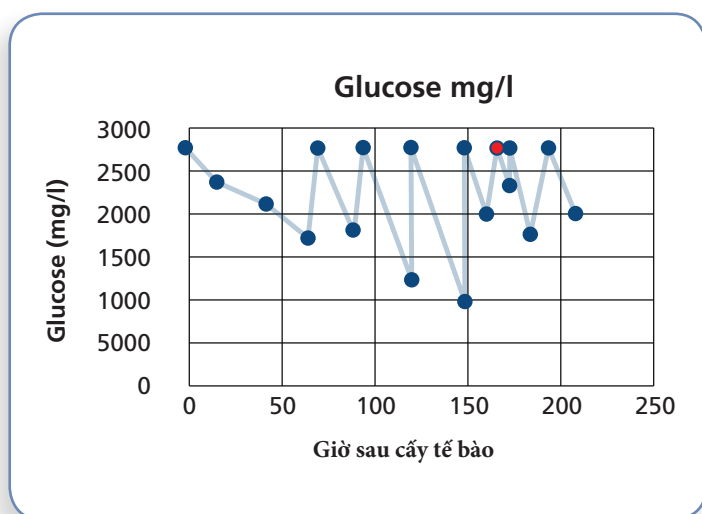
Sinh trưởng tế bào

Sau pha lag (khoảng 48 giờ), quan sát thấy khoảng trung bình 0,66 lượng tế bào trong quần thể nhân đôi mỗi ngày, tương ứng với thời gian nhân đôi dân số là 36 giờ.

Tổng số tế bào là 1.6 x10E9 thu được trong 161 giờ sau khi cấy. Sau đó, các tế bào được nhiễm chủng virus cúm A mô hình.



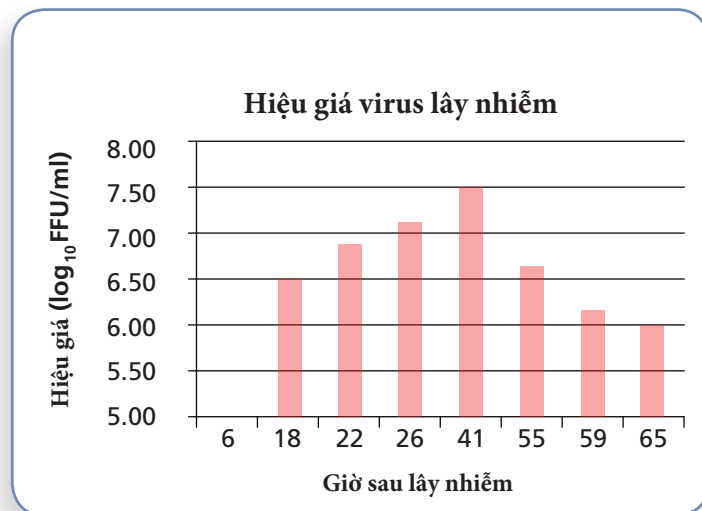
Hình 1: CelCradle-500AP: Tăng trưởng tế bào Vero trong môi trường OptiPro SFM không huyết thanh. Hình vuông màu đỏ cho biết thời điểm lây nhiễm ở 161 giờ sau khi cấy.



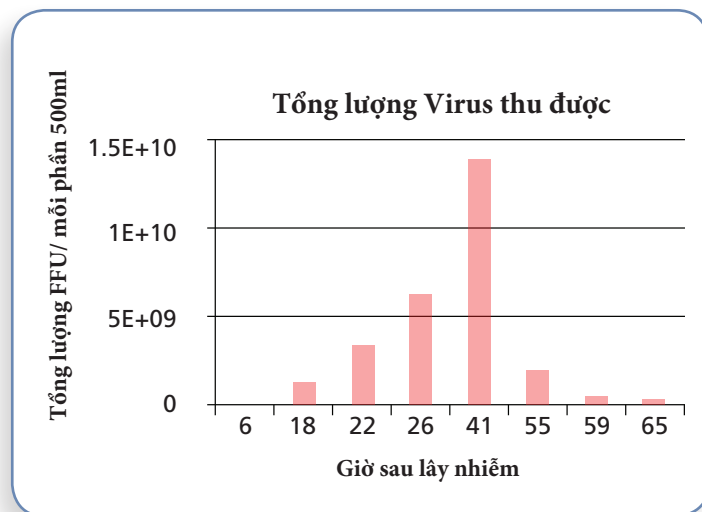
Hình 2: CelCradle-500AP: Nồng độ glucose trong môi trường. Chấm màu đỏ cho biết thời điểm lây nhiễm ở 161 giờ sau khi cấy.

Thu Virus

Các tế bào được nhiễm virus cúm A ở MOI 0,01. Môi trường nuôi cấy đã nhiễm virus được thu và bổ sung nhiều lần. Hiệu giá virus nhiễm của từng phần môi trường thu được lấy và phân tích bằng xét nghiệm FFA.



Hình 3: CelCradle-500AP: Hiệu giá virus nhiễm trong log FFU / ml.



Hình 4: CelCradle-500AP: Sản lượng virus nhiễm trong FFU trong mỗi phần 500 ml.

Hiệu giá virus đạt cực đại ở 7,45 log₁₀ FFU / ml ở 41 giờ sau khi nhiễm. Tổng thu 10,45 log₁₀ FFU virus thu được.

WHITE PAPER UPSTREAM BIOPROCESSING

So sánh nuôi cấy 2D và 3D

Ở đây, chúng tôi đưa ra so sánh các phương pháp nuôi cấy truyền thống trong 2D và 3D. Kết quả của chúng tôi cho thấy sự khác biệt rõ ràng trong việc đạt được mật độ tế bào cao trên mỗi ml trong quần thể carrier BioNOC™ II.

	Nuôi cấy tế bào 2D Factories CF10	3D BioNOC™ II carriers
Hình thái tế bào	Một lớp/Hai lớp	Phân bố dày đặc trên các carrier
Mật độ tế bào	0.7 triệu/ml	3.2 triệu/ml
Thể tích nuôi cấy	1.5L	0.5L
Diện tích bề mặt	6.320 cm ²	15.000 cm ²
Để thu được 1.6.10 ⁹ tế bào	1.6 x CF10	1 X 500 ml CelCradle

Hình 5: CelCradle-500AP: mật độ tế bào cao đạt được trong nuôi cấy 3D so với nuôi cấy 2D

Hướng nghiên cứu tương lai

Trong hướng nghiên cứu dù chưa được tối ưu này, chúng tôi đã chứng minh rằng thiết bị Celcradle với mô hình dùng một lần cho hiệu quả nuôi cấy tế bào Vero cao trên môi trường không sử dụng huyết thanh cho phép sản xuất vaccine với giá thành phải chăng. Phòng thí nghiệm R&D tại Áo hợp tác với chúng tôi đã tiến hành lặp lại nghiên cứu nuôi cấy Vero không dùng huyết thanh trên thiết bị này và cho kết quả tương tự.

Những kết quả thu được rất hứa hẹn, tuy nhiên hoàn toàn có thể được cải thiện hơn nữa bằng tối ưu hóa sự tăng trưởng của virus cúm trên thiết bị Celcradle-500AP, tiềm năng trong một đơn vị cGMP mà có khả năng mở rộng quy mô sản xuất vaccine lượng lớn



© 2018 Esco Aster Pte Ltd. All rights reserved. All trademarks are the property of Esco Group of Companies unless otherwise stated. See global site at www.escoglobal.com.

Tìm hiểu thông tin tại:
<http://www.vaccixcell.com/products-and-brands/celcradle/>
<http://www.escoaster.com>
<http://www.nuvonis.com>

Mọi thắc mắc, vui lòng liên hệ:
 Esco VacciXcell (Bioprocessing Tools): mail@vaccixcell.com
 Esco Aster (cGMP CDMO): mail@escoaster.com
 Nuvonis (Vero Cell Line Processing): office@nuvonis.com