

## WHITE PAPER UPSTREAM BIOPROCESSING

# Sự nhân lên của virus Viêm não Nhật Bản trong tế bào Vero trong sản xuất Vaccine sử dụng TideMotion Bioreactor

### Giới thiệu

Virus viêm não Nhật Bản (JEV) lần đầu tiên được phân lập từ não của một trường hợp tử vong ở người ở Nhật Bản vào năm 1934. Mặc dù các ca viêm não Nhật Bản có triệu chứng rất hiếm, nhưng tỷ lệ tử vong có thể lên tới 30%. Trong số những người sống sót, 30-50% bị các vấn đề về trí tuệ, hành vi hoặc thần kinh vĩnh viễn. Với hơn 3 tỷ người ở khu vực Đông Nam Á và Tây Thái Bình Dương có nguy cơ bị nhiễm JEV, tiêm phòng là cách phòng ngừa tốt nhất.

Việc phát triển vắc-xin viêm não Nhật Bản bắt đầu từ những năm 1940 với vaccine có nguồn gốc từ não chuột bị bất hoạt bởi formalin. Mặc dù có hiệu quả trong tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ, rất nhiều vaccine có nguồn gốc từ chuột đã được ngừng sử dụng vào tháng 5 năm 2011 vì các tiêu chuẩn quốc tế trong phát triển vaccine viêm não ngày nay không cho phép tiếp tục thực hiện phương pháp sản xuất này.

Trong bài báo này, chúng tôi mô tả sự phát triển của quy trình tạo vaccine viêm não Nhật Bản bằng cách sử dụng hệ thống nuôi cấy tế bào packed-bed. Chúng tôi đã chứng minh một giải pháp sinh học hiệu quả về chi phí và quy trình sản xuất nhanh phù hợp để thay thế vaccine có nguồn gốc từ não chuột.

### Tổng quan

Các tế bào Vero được nuôi cấy bằng môi trường MEM / FBS tiêu chuẩn sử dụng cho thiết bị nuôi cấy tế bào Vaccixcell CelCradle-500AP có chứa vật liệu mang(carrier) BioNOCTM II. Tổng số tế bào  $1,2 \times 10^9$  tế bào thu được sau 96 giờ cấy.

Về thời gian nhân đôi của tế bào, các tế bào nhân lên trong CelCradle (CC) trong ~32 giờ trong khi sinh trưởng trong chai nuôi cấy cần ~40 giờ. Quan sát thu được minh chứng rõ ràng rằng công nghệ TideMotion® cung cấp điều kiện phát triển tốt hơn cho các tế bào, có khả năng tăng hiệu quả việc trao đổi các chất dinh dưỡng/oxy giữa các tế bào và môi trường nuôi cấy.

Các tế bào Vero được lây nhiễm virus JE với tỷ lệ lây nhiễm mong muốn (MOI) là 0,01. Sau khi nhiễm virus, thu một lượng nhỏ môi trường chứa virus mỗi ngày đồng thời bổ sung môi trường mới trong bảy ngày sản xuất virus. Hiệu giá virus trên mỗi lần thu được xác định bằng plaque assay (golden standard). Tổng cộng,  $1,1 \times 10^{11}$  plaque (pfu) lây nhiễm thu được từ một CelCradle bioreactor.

### Vật liệu

Thiết bị	Dòng tế bào /Sản phẩm	Môi trường nuôi cấy	Tế bào giống
CelCradle-500AP	Tế bào Vero/JEV	MEM/10%FBS/2mM L-Glutamine	$1,4 \times 10^8$

Bảng 1: Vật liệu cần cho pha I – Sinh trưởng tế bào Vero.

### Pha I: Nuôi cấy tế bào Vero

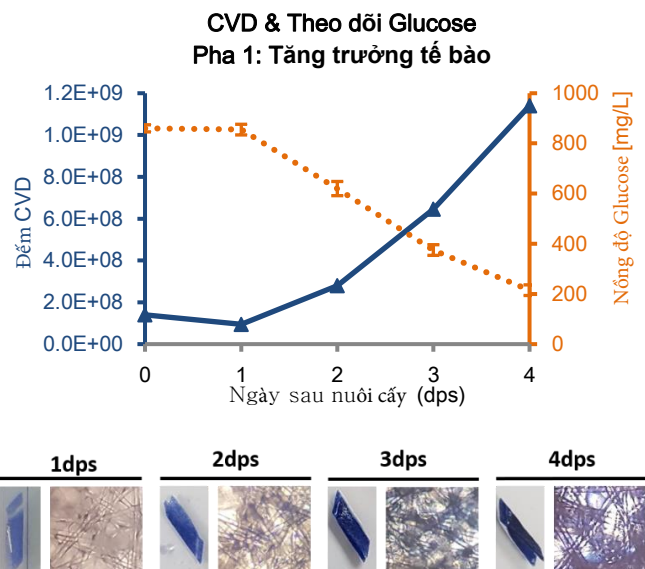
Thu tế bào từ bốn chai nuôi cấy T175 bằng xử lý trypsin và ly tâm 3 phút với tốc độ 400xg. Chuyển 120 ml dung dịch chứa  $1,4 \times 10^8$  sang một chai CelCradle-500AP có nắp màu trắng.

Tế bào được cấy bằng cách úp ngược chai CelCradle đã thay bằng nắp trắng, toàn bộ carrier được nằm hoàn toàn trong dung dịch môi trường. Việc cấy tế bào được thực hiện trong tủ ấm CO<sub>2</sub> 37°C trong 3 giờ, cứ 15-30 phút lắc xoay nhẹ nhàng. Hiệu quả cấy đạt 99,51% sau 1 giờ. Để các tế bào bám dính hiệu quả, Bổ sung 500 ml môi trường nuôi cấy, đặt chai 2.2L vào thiết bị với thông số như sau:

Thể tích CelCradle	Thông số trên TideMotion	Thời gian tăng trưởng
500 ml	Uprate: 1 mm/giây Uphold: 10 giây Downrate: 1 mm/giây Downhold: 10 giây	96 giờ (4 ngày)
<b>Thể tích chai truyền môi trường</b>	<b>Thông số cấp môi trường</b>	
2200 ml	Bơm: 1 Thể tích: 1999 ml Số chu kỳ/Ngày: 24 Chu trình: 1111111	

Bảng 2: Sinh trưởng tế bào trên CelCradle và thông số tự cấp môi trường pha I: Sinh trưởng tế bào.

Thu mẫu vật liệu mang hàng ngày và thực hiện: (1) Đếm CVD và; (2) quan sát trực quan về sự tăng trưởng và phân bố tế bào bằng nhuộm màu methanol/trypan-blue.



Hình 1: (Trên): Đếm tế bào hàng ngày bằng CVD tối thiểu 10 vật liệu mang ngẫu nhiên thu từ chai CelCradle-500AP. (Dưới): 3 carrier được cố định methanol, nhuộm 1x trypan-blue 5 phút nhiệt độ phòng, rửa PBS 2 lần và quan sát dưới kính hiển vi.

### Pha II: Lây nhiễm và tăng sinh virus

Các tế bào được nhiễm JEV với MOI 0,01 và tổng thể tích 500 ml. Lấy nhiễm virus và để virus nhân lên trong 7 ngày, các tham số cài đặt cho thiết bị như sau:

Thời gian	Thông số TideMotion
<b>Pha II A: Lấy nhiễm virus</b>	
Ngày 0 (1.5 giờ)	Uprate: 1 mm/giây Uphold: 15 phút Downrate: 1 mm/giây Downhold: 10 giây
<b>Pha II B: Nhân lên của virus</b>	
Ngày 0, 1, 2, 3	Uprate: 1 mm/giây Uphold: 10 giây Downrate: 1 mm/giây Downhold: 10 giây
Ngày 4	Uprate: 1 mm/giây Uphold: 10 giây Downrate: 1 mm/giây Downhold: 1 phút
Ngày 5, 6, 7	Uprate: 1 mm/giây Uphold: 0 giây Downrate: 1 mm/giây Downhold: 2 phút

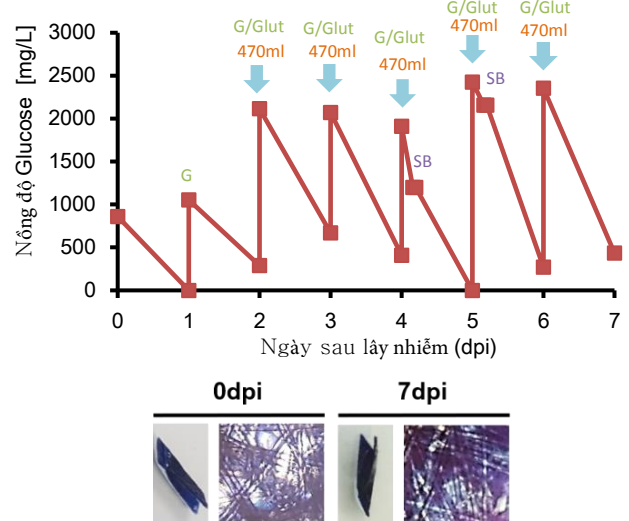
Bảng 3: Thông số CelCradle Pha II.

Thu môi trường chứa virus hàng ngày và bổ sung thêm môi trường trong 7 ngày nuôi virus:

Thời gian	Công việc
Ngày 0 (1.5 giờ)	Lấy nhiễm virus
Ngày 0	Sự nhân lên virus
Ngày 1	Không thu hoạch; Thu dịch nuôi cấy, Chuẩn độ virus; Bổ sung glucose
Ngày 2	Thu 470 ml; Thêm 470 ml môi trường; Bổ sung glucose/glutamine
Ngày 3	Thu 470 ml; Thêm 470 ml môi trường; Bổ sung glucose/glutamine Điều chỉnh CO <sub>2</sub> của tủ ẩm 5% đến 0%
Ngày 4	Thu 470 ml; Thêm 470 ml môi trường; Bổ sung glucose/glutamine Bổ sung Natri bicarbonate để đảm bảo pH
Ngày 5	Thu 470 ml; Thêm 470 ml môi trường; Bổ sung glucose/glutamine Bổ sung Natri bicarbonate đảm bảo pH
Ngày 6	Thu 470 ml; Thêm 470 ml môi trường; Bổ sung glucose/glutamine Bổ sung Natri bicarbonate đảm bảo pH
Ngày 7	Thu 500 ml; Kết thúc

Bảng 4: Thời điểm thu hoạch và bổ sung môi trường trong 7 ngày nuôi cấy ở pha II.

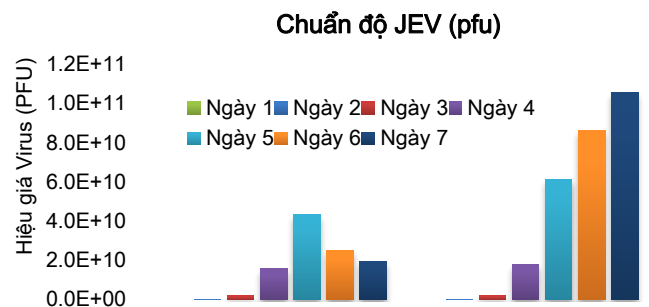
### Theo dõi thay đổi nồng độ Glucose (Pha II: Nhân lên của Virus)



Hình 2: (Trên): Nồng độ glucose được đo hàng ngày bằng thiết bị GlucCell. Mũi tên màu xanh cho một lần thu dịch virus (470 ml) và bổ sung một lượng môi trường tương đương vào chai. Môi trường thay thế đã được bổ sung glucose [G; phòng xanh lá cây] và/hoặc glutamine [Glut; phòng xanh lá cây] và/hoặc natri bicarbonate [SB; phòng tím]. (Dưới): 3 carrier được thu ngẫu nhiên từ chai CelCradle ngày 0 và 7 sau lấy nhiễm. Các carrier được cố định bằng methanol, nhuộm với 1Trypan-blue 1X trong 5 phút ở nhiệt độ phòng sau đó rửa hai lần với PBS t'ớc khi quan sát dưới kính hiển vi.

### Pha III: Định lượng JEV bằng Plaque Assay

Thu dịch chứa virus hàng ngày (sau lấy nhiễm). Bảo quản dịch virus ở -80°C cho đến khi tất cả các mẫu được thu hoạch. Hiệu giá virus được phân tích bằng plaque assay (golden standard) theo quy trình đã công bố.



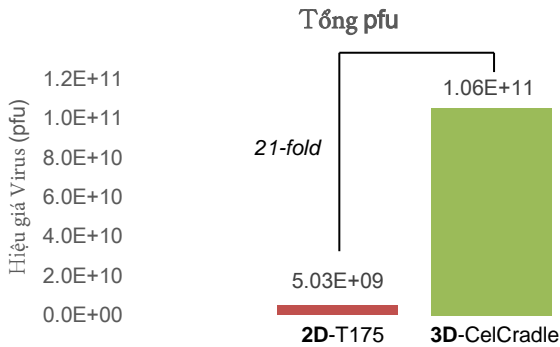
Hình 3: CelCradle-500AP. Chuẩn độ JEV bằng plaque essay (pfu).

Thời điểm Thu hoạch	Thể tích Thu hoạch	Hiệu giá Thu hoạch	Hiệu giá tích lũy	Hiệu giá tổng
Ngày 1	0 ml	-	-	1.06x10 <sup>11</sup>
Ngày 2	470 ml	1.63x10 <sup>8</sup>	1.63x10 <sup>8</sup>	
Ngày 3	470 ml	1.84x10 <sup>9</sup>	2.01x10 <sup>9</sup>	
Ngày 4	470 ml	1.57x10 <sup>10</sup>	1.78x10 <sup>10</sup>	
Ngày 5	470 ml	4.35x10 <sup>10</sup>	6.12x10 <sup>10</sup>	
Ngày 6	470 ml	2.51x10 <sup>10</sup>	8.63x10 <sup>10</sup>	
Ngày 7	500 ml	1.93x10 <sup>10</sup>	1.06x10 <sup>11</sup>	

Bảng 5: CelCradle-500AP. Chuẩn độ virus lấy nhiễm bằng plaque assay (pfu).

## So sánh sự nhân lên virus trên hệ thống 2D vs 3D

So sánh sự nhân lên virus trên chai nuôi cấy 2D T175 và CelCradle 3D. Sản xuất JEV từ một chai CelCradle tương đương với 21 chai nuôi cấy T175.



	CelCradle	T175
Diện tích bề mặt(cm <sup>2</sup> )	~ 5000	175
Tổng lượng virus thu	1.06x10 <sup>11</sup>	5.03x10 <sup>9</sup>
Virus/cm <sup>2</sup>	2.1x10 <sup>7</sup>	3.0 x10 <sup>7</sup>
pfu ~ chai T175	21	1

## Thảo luận

Ứng dụng công nghệ TideMotion trong thiết bị nuôi cấy tế bào đảm bảo mật độ tế bào cao và năng suất sinh học cao. Đây là điểm khác biệt trong việc tạo ra một môi trường nuôi cấy kết hợp trao đổi oxy cao, và giảm ứng suất cắt tế bào. Dung tích sản xuất dự kiến theo GMP cần thiết bị sinh học nuôi cấy tế bào 500L và sự phát triển quy trình rộng rãi để tối ưu hóa năng suất, giảm chi phí sản phẩm và xác định các thông số quy trình sẽ vẫn cần được tiến hành để phát triển quy trình GMP quy mô lớn. Tuy nhiên, do CelCradle sử dụng nguyên tắc chuyển động thủy triều Tide Motion tương tự như thiết bị nuôi cấy TideCell quy mô lớn, thiết bị kích thước gọn và thể tích nhỏ này cho phép tối ưu hóa quy trình và phát triển liên hợp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh rằng CelCradle-500AP có thể được sử dụng để nuôi cấy tế bào Vero và sản xuất vắc-xin JEV hiệu quả. Sản lượng virus tổng thu cho một chai CC-500AP là 1.06x10<sup>11</sup> pfu (plaque assay); tuy nhiên, một chai CC-500AP tương tự như chai nuôi cấy T175 nhưng tạo ra năng suất virus cao gấp 21 lần. Lưu ý rằng các hiệu giá này tạo ra trong các điều kiện nuôi cấy chưa được đánh giá và thử nghiệm tiếp theo để xác định các thông số vận hành tốt nhất cho việc nuôi cấy tế bào Vero và sản xuất JEV sẽ có thể tăng năng suất hơn.



© 2018 Esco Aster Pte Ltd. All rights reserved. All trademarks are the property of Esco unless otherwise specified.

Cập nhật thêm các bài nghiên cứu trên sản phẩm:

<http://www.escoaster.com/white-paper-and-protocols/white-papers/#content>

Tìm hiểu thêm thông tin tại:

<http://www.vaccixcell.com/products-and-brands/celcradle/>

<http://www.escoaster.com>

Mọi thắc mắc, vui lòng liên hệ:

Esco Vaccixcell (Bioprocessing Tools): [mail@vaccixcell.com](mailto:mail@vaccixcell.com)

Esco Aster (cGMP CDMO): [mail@escoaster.com](mailto:mail@escoaster.com)