

WHITE PAPER UPSTREAM BIOPROCESSING

Khả năng mở rộng tuyến tính của sản xuất CAR lentivirus bằng thiết bị nuôi cấy TideMotion® từ quy mô phòng thí nghiệm đến quy mô công nghiệp

Giới thiệu

Thiết bị nuôi cấy dùng một lần đầu tiên được giới thiệu vào khoảng một thập kỷ trước và từ đó trở thành chuẩn mực cho sự công nhận cGMP trong ngành công nghiệp sản xuất sinh học. Nhiều thiết bị phản ứng sinh học dùng một lần như bể khuấy nuôi cấy (STR), chỉ có thể hỗ trợ các dòng tế bào sống tự do không bám. Trên thị trường hiện nay, chỉ có một số thiết bị nuôi cấy có thể thực hiện nuôi cấy quy mô lớn các dòng tế bào bám dính, một trong số đó bao gồm VaccixCell TideMotion® Bioreactor-CelCradle và TideCell®.

Chimeric Antigen Receptor (CAR-T) T-cells - Liệu pháp miễn dịch CAR-T là xu hướng mới nhất trong điều trị ung thư. Nhận được sự quan tâm nhanh chóng, nhiều đơn vị đang thúc đẩy mạnh mẽ các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm hướng lâm sàng với nhu cầu sản xuất CAR-T quy mô lớn. Một trong những thách thức phổ biến nhất vẫn là không có khả năng mở rộng tuyến tính. Trong khi nhiều thông số có thể được tái lập dễ dàng trên các thang đo, ví dụ, nhiệt độ và chỉ số pH, các thông số khác, ví dụ như tốc độ vận chuyển oxy hòa tan hoặc giảm ứng suất cắt tế bào, thì có thể không. Do đó, cần nhiều chi phí, công sức và thời gian hơn để tối ưu hóa lại sau mỗi lần mở rộng quy mô sản xuất. Những thách thức và điều kiện không mong muốn như vậy có thể dễ dàng xử lý bằng cách sử dụng thiết bị nuôi cấy sinh học TideMotion®.

Trong kết quả nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào khả năng mở rộng tuyến tính của CelCradle™ sang TideCell® trong hiệu quả tải nạp HEK-293T bằng hệ thống lentivirus 4-plasmid để hỗ trợ sản xuất LVV quy mô lớn.

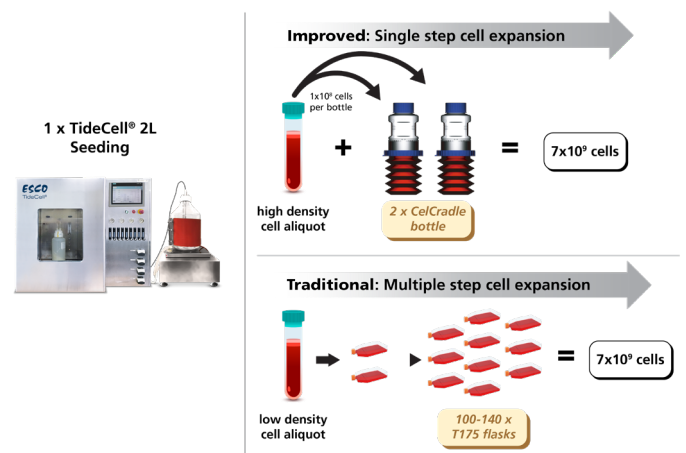
Tế bào, môi trường, và vật liệu

Thiết bị	CelCradle™ bioreactor
	TideCell® 2L matrix vessel
Dòng tế bào	Adherent HEK-293T (ATCC: CRL-3216)
Môi trường nuôi cấy	DMEM với nồng độ glucose cao (4.5 g/L); 10 % FBS 4 mM L-glutamine; 25 mM HEPES; 1X P/S
Điều kiện sinh trưởng	37°C; 5% CO ₂ ; độ ẩm 75-85 %

Tạo dòng tế bào tăng cường

Để tạo đủ tế bào cho sản xuất LV trong các thiết bị nuôi cấy lớn, các ống mật độ cao tế bào được sử dụng để cấy trực tiếp vào thiết bị CelCradle (dùng một lần), nhằm thu được số lượng tế bào cần thiết cho sản xuất LV trong TideCell®.

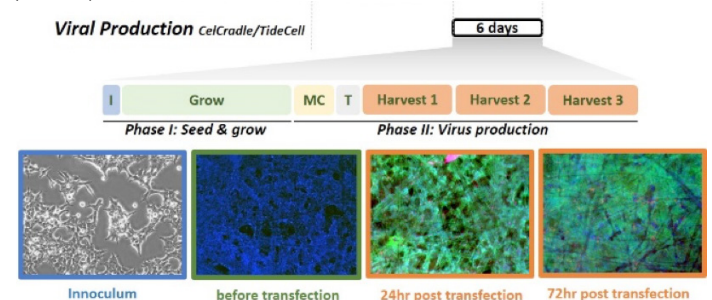
Mô hình tạo dòng tế bào tăng cường này, trái ngược với tạo dòng thông thường, mang lại hiệu quả làm việc, thời gian, chi phí và hiệu quả nhân lực (Hình 1)



Hình 1: So với các phương pháp nuôi cấy truyền thống thu giống đủ thực hiện 1 lần chạy TideCell, cần ít nhất 100 đến 140 chai T175. Phương pháp nuôi cấy tế bào nhiều bước này rất tốn công so với việc sử dụng CelCradle và phương pháp tạo dòng mật độ cao, chỉ cần một bước thực hiện, nhờ đó giảm đáng kể thời gian, chi phí, công sức.

Trực tiếp chuyển đổi quy trình từ CelCradle sang TideCell® sản lượng nền thu được tuyến tính theo quy mô của sản xuất LVV

Thông thường, các tế bào HEK-293T được cấy vào ngày 0, được tải nạp vào hệ thống lentivirus 4-plasmid vào ngày 2 để cảm ứng sản xuất LVV. Dịch virus sau đó sẽ được thu cứ sau 24 giờ với tổng số ba lần (Hình 2).



Hình 2: Sản xuất LVV từ nuôi cấy tế bào giống đến thu hoạch virus mất khoảng 2 tuần. Sản xuất virus phải mất 5 ngày bao gồm cấy tế bào, tăng sinh, tải nạp vào hệ thống virus bằng PEI và thu hoạch dịch nuôi virus.

WHITE PAPER UPSTREAM BIOPROCESSING

Quy trình sản xuất LVV được áp dụng trên cả quy mô phòng thí nghiệm (CelCradle™) và quy mô sản xuất (TideCell®). Đơn vị chuẩn độ lây nhiễm (TU) được xác định bằng cách sử dụng FACs cùng với đọc GFP reporter. Cả hai mô hình của thiết bị nuôi cấy đều thể hiện khả năng mở rộng quy mô tuyến tính rõ ràng với hiệu giá virus cao lần lượt là 1.0×10^9 TU và 2.0×10^{10} TU trong CelCradle™ và TideCell® 2L.

	CelCradle™	TideCell® 2L
Phương tiện tạo tế bào giống	5 x Chai T175	2 x CelCradle™
BioNOC II Carriers	5.5 g	110 g
Số lượng tế bào cấy	23,000 tế bào/cm ²	
Thể tích nuôi cấy	500 ml	10L
Thời gian bám tế bào	180 phút	
Hiệu suất bám tế bào	87% ± 7%	95% ± 4%
Thời điểm tải nạp	Ngày thứ 2 sau khi cấy	
Số tế bào (ngày tải nạp)	27,000 tế bào/cm ²	
Hóa chất dùng cho tải nạp	PEI "Max"	
DNA/tế bào	4.2×10^{-12} g/tế bào	
Tỉ lệ plasmid	2:1:1:1 (pCDH: pMDL: pVSVG: pREV)	
Số giờ tải nạp	6-7 giờ	
Các thời điểm thu hoạch	24h, 48h, 72h (3 lần thu hoạch)	
Hiệu giá virus/tế bào	3 TU/tế bào	
Hiệu giá vector virus	1.0×10^9 TU	2.0×10^{10} TU

Bảng 1: So sánh khả năng mở rộng tuyến tính quy mô sản xuất LVV ở thang đo sinh học TideMotion khác nhau khi quy trình trên CelCradle được áp dụng trực tiếp vào TideCell.

Thiết bị nuôi cấy TideMotion chứng minh tỉ lệ sản lượng thu được trên chi phí cao nhất so sánh với các thiết bị nuôi cấy khác

Khi hiệu giá virus được tạo từ CelCradle™ và TideCell® được so sánh với các hệ thống nuôi cấy khác nhau, Tide Motion đã chỉ ra tính hiệu quả và kinh tế.

	CelCradle™	TideCell® 2L
Hiệu giá vector virus*	1.0×10^9 TU	2.0×10^{10} TU
Tương đương với đĩa 10-cm (ước lượng ~ 4×10^7 TU)	25 x	500 x
Tương đương với chai nuôi cấy lần (ước lượng ~ 4×10^8 TU)	3 x	60 x
Tương đương CF-10 (ước lượng ~ 3×10^9 TU)	0.3 x	6 x

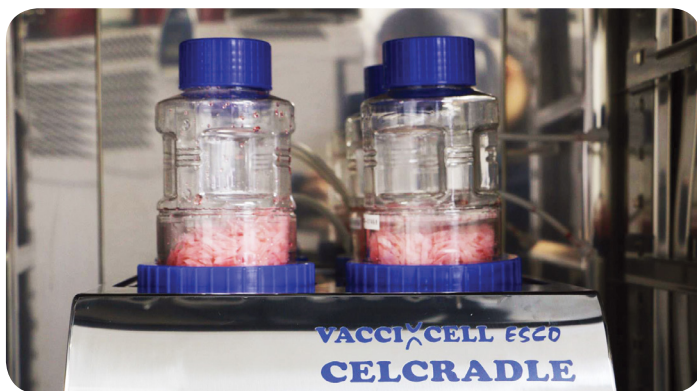
Bảng 2: Số lượng vật tư nuôi tế bào trên các hệ thống 2D được quy đổi so sánh tương đương với CelCradle™ và TideCell® với cùng sản lượng thu được

	TideCell® 2L	Đĩa 10-cm	Chai nuôi cấy lần	Cell Factory 10
1X TideCell® 2L tương đương với	1X	500X	60X	6X
Nhân lực cần	+	+++++	+++	+
Thời gian thực hiện	+	+++++	+++++	+
Small Footprint	++	+++++	+++++	+
Hệ thống kín	có	không	không	không
Cần phòng sạch	không	có	có	có
Hiệu quả chi phí	+++++	+	+	+

Bảng 3: Việc sử dụng thiết bị nuôi cấy Tide Motion® tiết kiệm chi phí hơn so với các hệ thống 2D khác.

Tóm tắt

TideMotion® (mô hình dùng một lần) là một trong thiết bị hàng đầu phục vụ cho việc mở rộng quy mô các dòng tế bào bám dính. Sử dụng mật độ cao tế bào giống, một bước thực hiện có thể mở rộng quy mô tế bào. Với khả năng trao đổi oxy cao với môi trường nuôi cấy, giảm ứng suất cắt, công nghệ TideMotion của chúng tôi đảm bảo sinh khối tế bào cao và năng suất cao các chế phẩm sinh học đích. Người sử dụng có thể dễ dàng thu tế bào, virus hoặc các sản phẩm được tiết ra từ quá trình nuôi trên TideMotion. Quan trọng nhất là khả năng chuyển đổi quy trình từ quy mô này sang quy mô khác tuyến tính, sử dụng hệ thống của chúng tôi, cho phép người sử dụng giảm thiểu các bước tối ưu, tiết kiệm thời gian và công sức.



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

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