

# Tide Motion® : Nền tảng công nghệ với nhiều quy mô ứng dụng sản xuất Vector Virus bằng nuôi cấy tế bào bám dính



Calista NG, Pei-Wen YONG, Jun-Wei CHEW, Jing-Qin ONG, Sihui KOO and Xiangliang LIN

## Tổng quan

Adeno virus (AAV), lentivirus (LV) and retrovirus (RV) là những vector virus điển hình và phổ biến được sử dụng như phương tiện vận chuyển gene trong các liệu pháp gene. Các phương pháp sản xuất vector virus hiện nay thường có hiệu quả thấp và còn nhiều hạn chế trong khả năng nâng quy mô. Các quy trình sản xuất vector virus hiện nay phần lớn xây dựng theo theo kinh nghiệm và chưa được mô tả rõ ràng. Những nhược điểm điểm này dẫn đến giá thành cao khi các sản phẩm về liệu pháp gene được cung cấp ra thị trường.

Esco Aster đã phát triển hệ nuôi cấy tế bào ứng dụng TideMotion (nguyên lý vận động thủy triều) có khả năng nâng quy mô lớn ứng dụng nuôi cấy tế bào bám. Esco Aster đã thiết lập quy trình toàn diện, hiệu quả vượt trội và có khả năng phát triển quy mô đồng thời linh động cho sản xuất nhiều loại vector virus. Chúng tôi đưa ra những kết quả nghiên cứu của giai đoạn đầu trong sản xuất lentivirus thế hệ thứ 3 bằng ứng dụng công nghệ TideMotion.

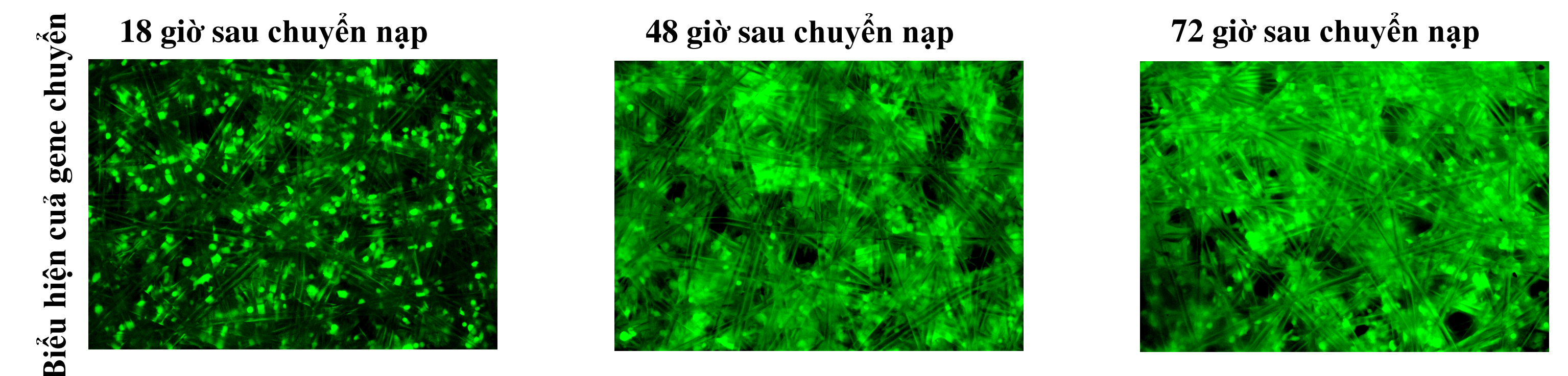
Esco Aster đồng thời cung cấp các dịch vụ trong nghiên cứu phát triển quy trình sản xuất vector virus ở các giai đoạn bằng ứng dụng nền tảng TideMotion (TideMotion® Platform)

## Thách thức gặp phải khi sản xuất virus bằng thiết bị nuôi cấy tế bào bám

<b>Thách thức #1</b> Hiệu quả chuyển nạp Plasmid thấp	<b>Thách thức #3</b> Khó khăn trong chuyển từ quy trình nuôi cấy 2D sang hệ thống nuôi cấy dạng khuấy (Stirred Tank Bioreactors)	<b>Thách thức #4</b> Hiệu quả thấp khi thu Virus bằng ly giải tế bào trực tiếp trên các vật liệu mang
<b>Thách thức #2</b> Hiệu giá virus thấp		

## Sản xuất virus ngày 1: Chuyển nạp 4 plasmid trên một tế bào

	Điều kiện	Tầm quan trọng
Môi trường sinh trưởng	Môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn HEK293T	NA
Môi trường chuyển nạp	Môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn HEK293T Nồng độ huyết thanh thấp	NA
Môi trường sản xuất virus	Môi trường tải nạp có bổ sung hợp chất	Quan trọng
Chuẩn bị trước khi chuyển nạp	Thay 450 ml môi trường tải nạp	Quan trọng
Số tế bào/CelCradle™ trong ngày chuyển nạp	Bảo mật	Quan trọng
Tỉ lệ plasmid	Bảo mật	Quan trọng
PEI 'MAX' : Tỉ lệ DNA	Bảo mật	Quan trọng
DNA / tế bào	Bảo mật	Quan trọng
Thông số TideMotion (6.5 giờ chuyển nạp)	Tốc độ lên: 0.25mm/giây; Giữ phía trên: 30phút; Tốc độ xuống: 0.25mm/giây; Giữ phía dưới: 1phút	Quan trọng
Thời gian quá trình chuyển nạp	6.5 hrs	NA
Xử lý sau chuyển nạp	Thay dung dịch chuyển nạp bằng môi trường nuôi cấy tạo virus	Tùy chọn

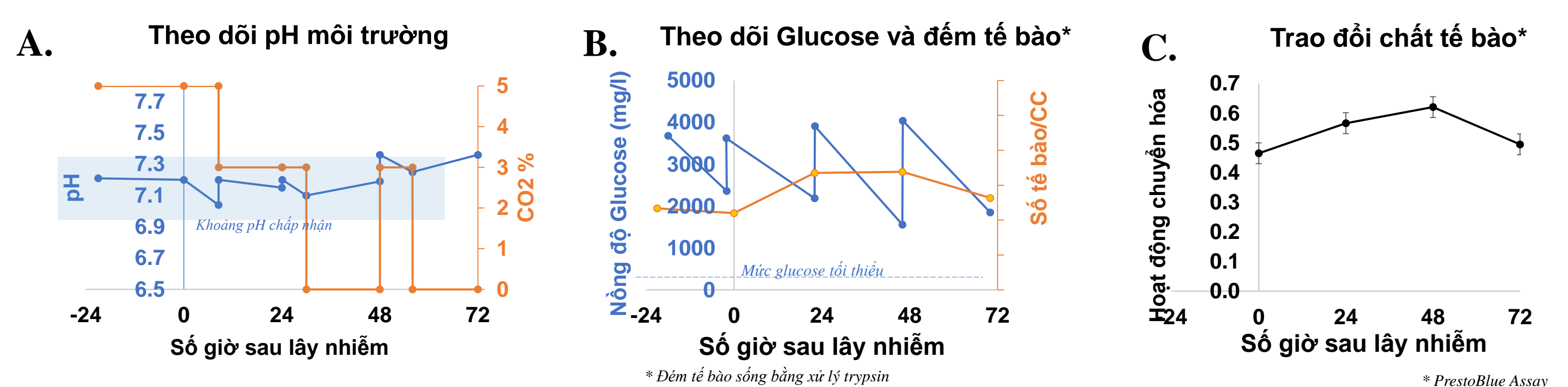


## Tế bào, môi trường và vật liệu

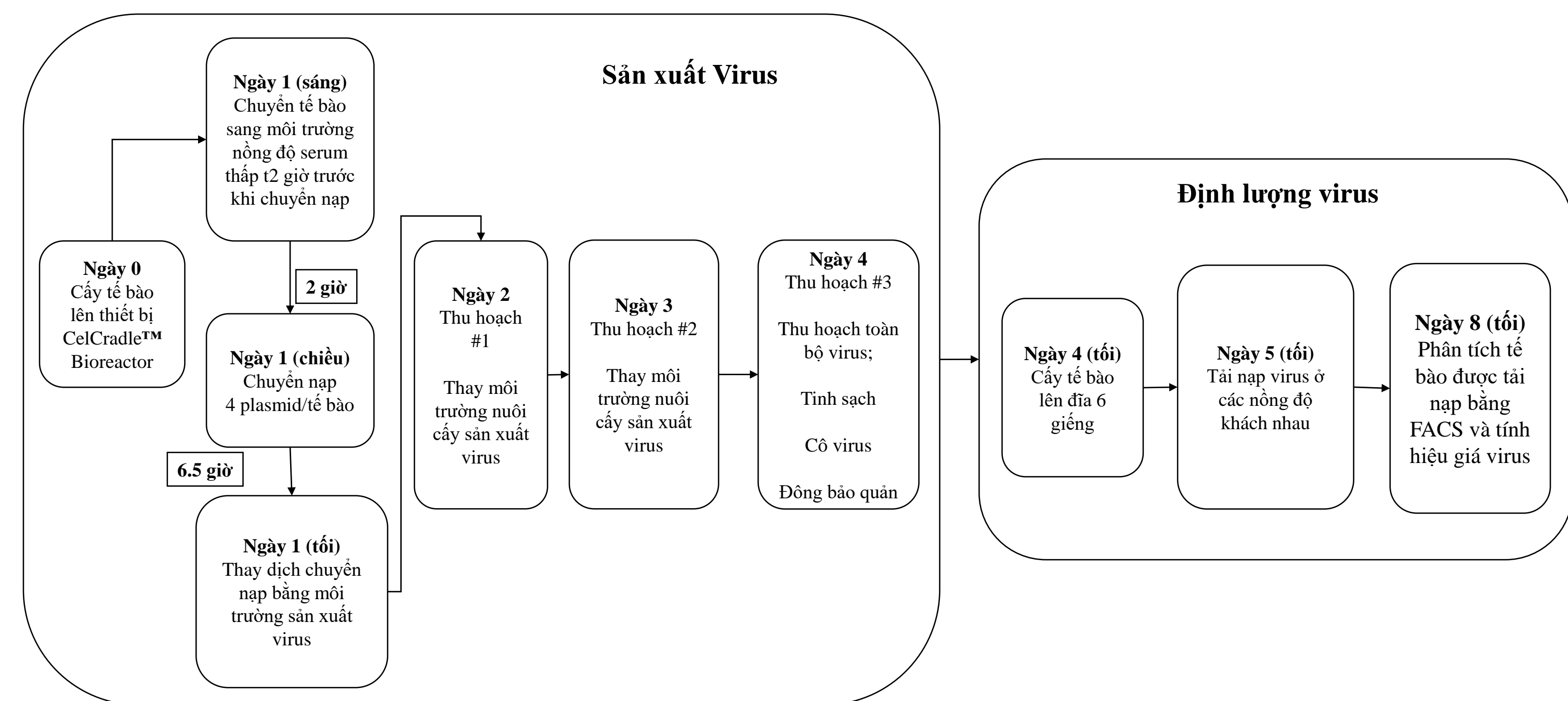
Thiết bị chính	Thiết bị nuôi cấy tế bào - CelCradle™ Bioreactor
Dòng tế bào	Tế bào bám HEK-293T (ATCC: CRL-3216)
Vector virus	Lentivirus thế hệ thứ 3
Plasmid đóng gói (từ AddGene)	pCMV-VSV-g pMDL-pRRE pRSV-Rev
Plasmid biểu hiện	
Môi trường sinh trưởng	Môi trường nuôi cấy thương mại
Hóa chất chuyển nạp	PEI 'MAX'

## Sản xuất Virus ngày 2 đến ngày 4: Theo dõi nuôi cấy/Thu Virus

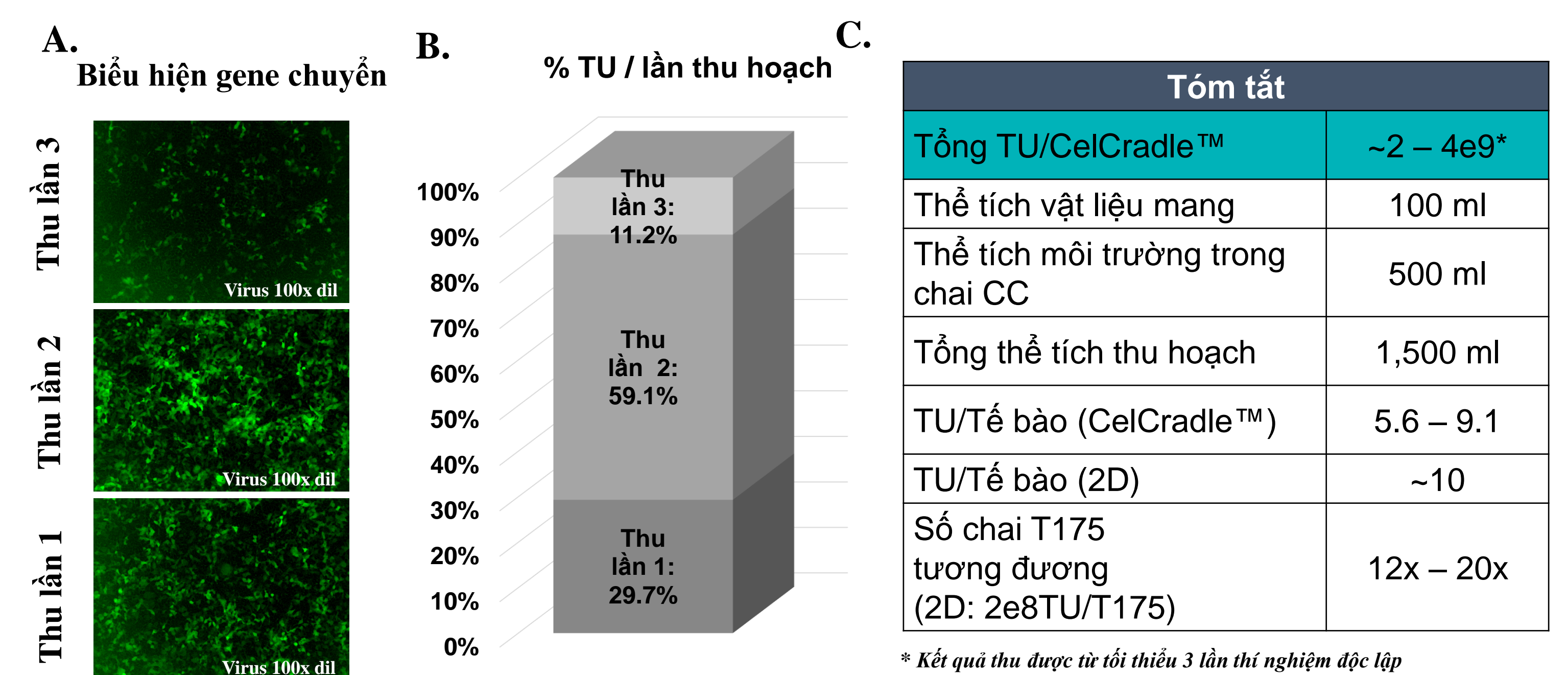
	Điều kiện	Tầm quan trọng
pH	Duy trì pH > 7.0	NA
Glucose	> 0.5g/l	NA
Thời điểm thu hoạch	24h, 48h, 72h	Quan trọng



## Tổng quan quy trình sản xuất Lentivirus giai đoạn đầu

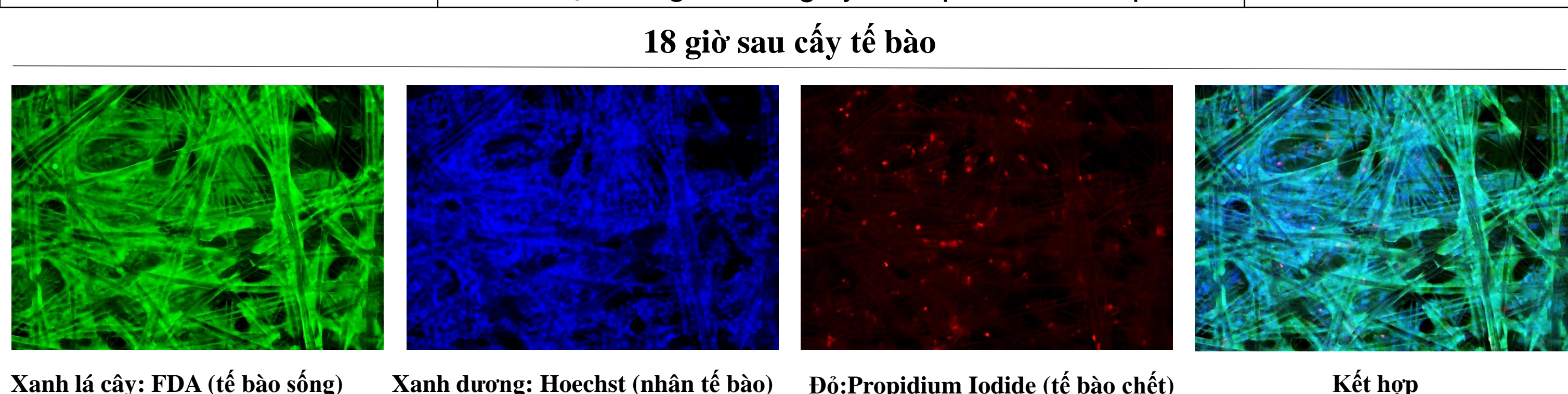


## Định lượng Virus ngày 4 đến ngày 7: Hiệu giá Virus bằng FACS



## Sản xuất Virus Ngày 0: Cấy tế bào

	Điều kiện nuôi cấy	Tầm quan trọng
Số tế bào/CelCradle™	Bảo mật	Quan trọng
Phương pháp cấy	Cấy bằng cách úp ngược chai nuôi cấy CelCradle™	Quan trọng
Thể tích cấy	~150 ml	NA
Thời gian ủ	~3-5 giờ	NA
Quy trình cấy	Cứ 30 phút xoay nhẹ chai nuôi cấy	NA
Hiệu suất cấy	> 85 %	NA
Thể tích môi trường thêm	Thêm 500 ml môi trường nuôi cấy	NA
Thông số TideMotion® (Sinh trưởng tế bào)	Tốc độ lên: 1 mm/giây; Giữ phía trên: 1 phút; Tốc độ xuống: 1 mm/giây; Giữ phía dưới: 1 phút	NA



## Tính linh động trong quy trình

Ứng dụng với các loại virus	Pha I: Cấy	Pha II: Sản xuất Virus/Thu hoạch				
LV (virus được tiết ra ngoại bào)	Cấy	Chuyển nạp 4 plasmid	Thu lần 1 (dịch ly tâm)	Thu lần 2 (dịch ly tâm)	Thu lần 3 (dịch ly tâm)	NA
RV (virus được tiết ra ngoại bào)	Cấy	Chuyển nạp 3 plasmid	Thu lần 1 (dịch ly tâm)	Thu lần 2 (dịch ly tâm)	Thu lần 3 (dịch ly tâm)	NA
AAV (virus không được tiết ra ngoại bào)	Cấy	Chuyển nạp 3 plasmid	Thu lần 1 (dịch ly tâm)	Thu lần 2 (dịch ly tâm)	Thu lần 3 (dịch ly tâm)	Thu tế bào

## Tăng quy mô nuôi cấy tế bào và đếm TU virus

	CelCradle™ (Quy mô lab)	TideXcell 2L (Quy mô thử nghiệm)	TideXcell 20L (Quy mô sản xuất)	TideXcell 50L (Quy mô sản xuất)	TideXcell 100L (Quy mô sản xuất)
Thể tích vật liệu mang	0.1 L	2 L	20 L	50 L	100 L
Mật độ cấy	4.7x10 <sup>8</sup> tế bào	9.3x10 <sup>9</sup> tế bào	9.3x10 <sup>10</sup> tế bào (quy chiếu)	2.3x10 <sup>11</sup> tế bào (quy chiếu)	4.7x10 <sup>11</sup> tế bào (quy chiếu)
LV TU / lần chạy	2-4x10 <sup>9</sup>	4-8x10 <sup>10</sup>	4-8x10 <sup>11</sup> (Quy chiếu)	1-2x10 <sup>12</sup> (Quy chiếu)	2-4x10 <sup>12</sup> (Quy chiếu)
Tương đương số chai T175 (175 cm <sup>2</sup> )	9.9X – 16.2X	198X – 324X	1980X – 3240X (quy chiếu)	4950X – 8100X (quy chiếu)	9900X – 16200X (quy chiếu)