

Nuôi cấy tế bào Vero đạt mật độ tế bào cao ứng dụng trong sản xuất vaccine cúm ở người

Nandini Prabhakar *, Marcus Wolschek +, Micaela Goh Yue Lyn *, Manfred Reiter +, Joachim Seipelt +, Xiangliang Lin *

* Esco Aster Pte Ltd, Singapore + Nuvonis Technologies, Austria

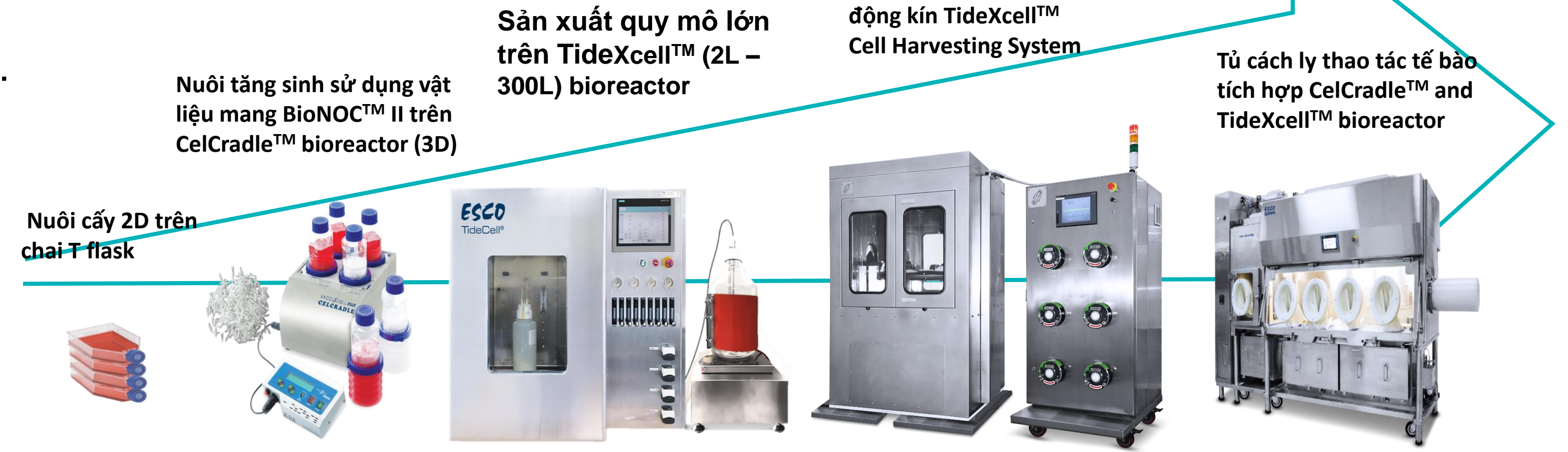


Giới thiệu

Tìm vaccine cúm thường niên là phương pháp hiệu quả để phòng nhiễm virus cúm. Tuy nhiên, việc đáp ứng đủ lượng vaccine cúm ở những nước đang phát triển đang đối mặt với nhiều khó khăn. Việc triển khai và sản xuất kịp thời vaccine cúm ở những nước không sản xuất vaccine là cần thiết. Chúng tôi tập trung vào phát triển vaccine cúm với mục đích tạo ra giải pháp sinh học hoàn hảo thay thế cho sản xuất vaccine nhờ trứng gà nhằm thúc đẩy quá trình sản xuất.

Tầm nhìn Esco Aster

Esco Aster tập trung vào hệ thống sản xuất cho chất lượng cao vaccine, các chế phẩm sinh học và sản phẩm liệu pháp tế bào. Hướng đi đầu tiên của chúng tôi là giúp các nước không sản xuất vaccine có thể tự túc sản xuất, bảo quản và phân phối vaccine, thời gian gần đây, chúng tôi đã cộng tác với công ty công nghệ sinh học Nuvonis (Áo) để thiết lập một chu trình sản xuất sinh học hiệu quả. Nó cho phép sản xuất virus cúm bằng nuôi cấy tế bào Vero trong môi trường không có huyết thanh. Chúng tôi đã chứng tỏ được hệ thống sản xuất sử dụng TideMotion được tích hợp với tủ Esco cách ly dùng thao tác tế bào giúp các quốc gia có thể tự sản xuất vaccine với chi phí phải chăng - theo CAPEX & OPEX - dành cho các nước đang phát triển.



Nền tảng công nghệ Tide Motion + Tủ cách ly thao tác tế bào

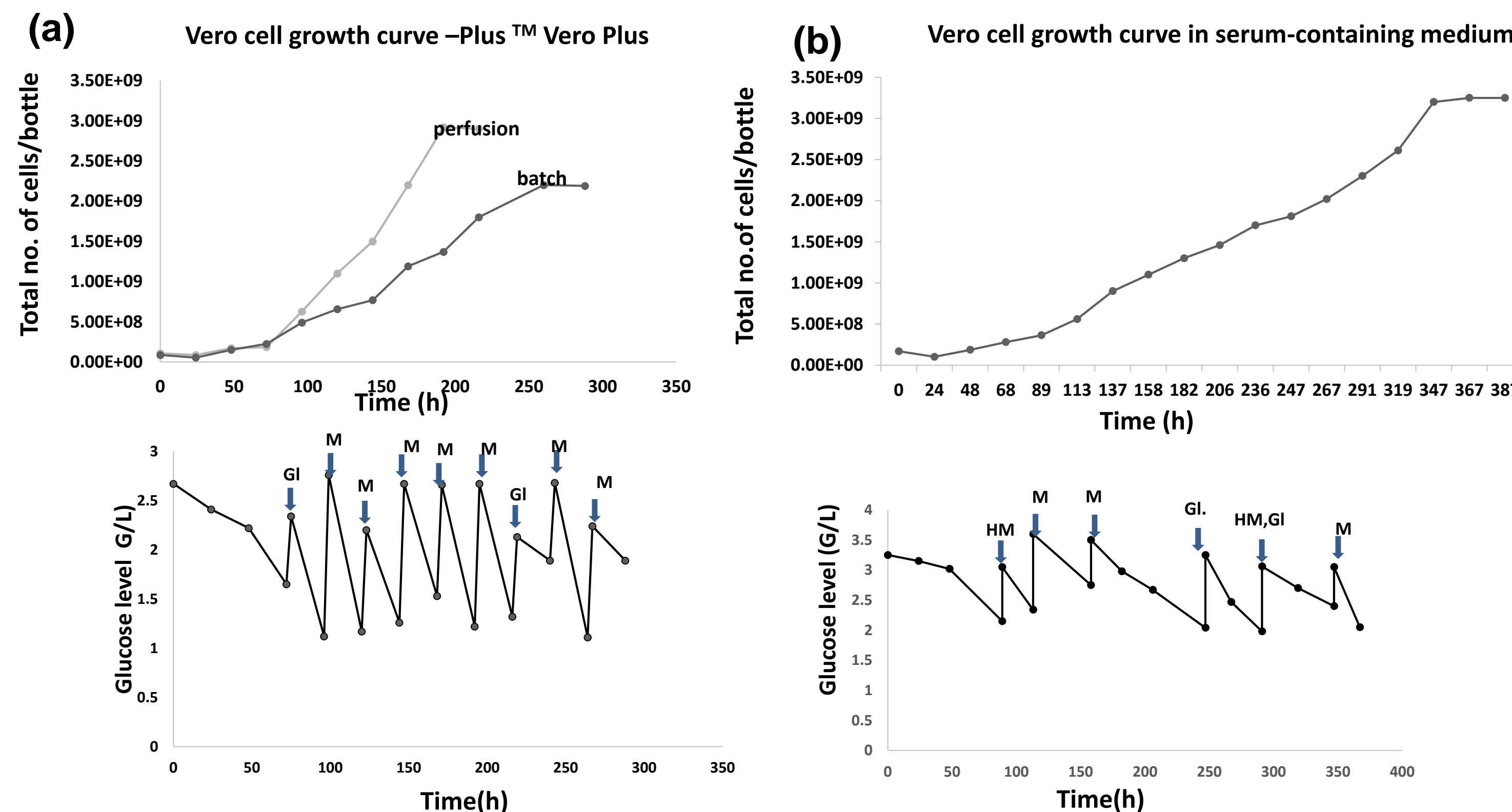
Tế bào Vero

Vero là dòng tế bào bám dính được sử dụng rộng rãi trong sản xuất vaccine. Vero có nguồn gốc từ tế bào biểu mô thận của khỉ xanh châu Phi. Chúng mang nhiều thuận lợi cho khả năng lây nhiễm virus cao và tiếp đó là tính hiệu quả trong phân lập virus. Vero rất thích hợp cho các loại vaccine từ virus, một số loại đã sản xuất từ dòng tế bào này như Cúm, Reovirus và virus viêm não Nhật Bản.

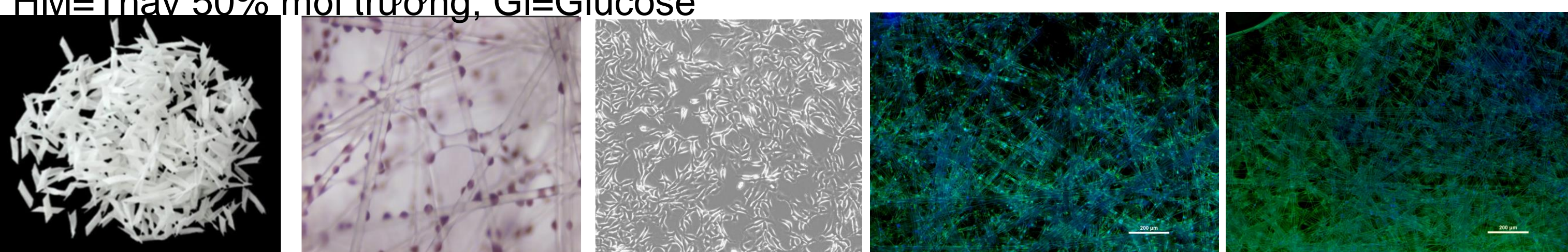
Với nhiều lợi thế đã được nhận định, Vero được kỳ vọng nuôi cấy đạt mật độ cao và tối ưu trong sản xuất virus. Tế bào được nuôi cấy thông thường trên chai nuôi cấy T-flask hoặc chai lăn (nuôi cấy 2D). Chúng tôi đã nuôi cấy Vero đạt mật độ tối ưu sử dụng vật liệu mang macrocarriers - BioNOC™ II - được coi là thành phần quan trọng của hệ thống nuôi cấy này.

Nuôi cấy Vero sử dụng công nghệ Tide Motion

Ngân hàng tế bào Vero không sử dụng huyết thanh (passage 144-160) được sử dụng trong các ứng dụng Ngân hàng tế bào - MCB và WCB - đã được thực hiện đầy đủ các kiểm tra bao gồm cả đặc tính hình thành khối u ở cấp độ sản xuất cuối (end of production level - EOP). Môi trường không chứa huyết thanh được bổ L-glutamine trước khi sử dụng. Môi trường chứa huyết thanh được sử dụng trong phương pháp xác định sự sinh trưởng tế bào nhằm tối ưu mật độ tế bào. Nồng độ Glucose trong môi trường được xác định bằng thiết bị GlucCell™ và Esco VacciXcell GlucCell™ Glucose Test Strips. Sự sinh trưởng được thể hiện trên hình 1 (a) và (b) như bên dưới. Sự tiêu thụ Glucose và tốc độ tiêu thụ Glucose được thể hiện (c) và (d)



Hình 1 Đường cong sinh trưởng của Vero (a) Plus™ Vero Plus và (b) môi trường không chứa huyết thanh và nồng độ Glucose trong môi trường lần lượt. M=Thay môi trường; HM=Thay 50% môi trường; GI=Glucose

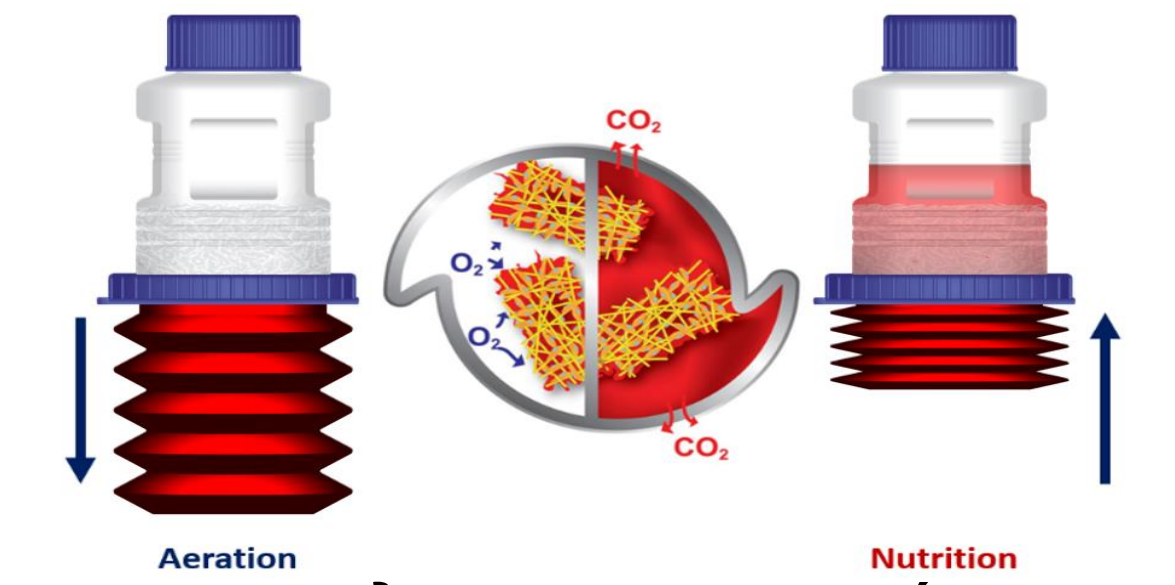


Hình 2 Sinh trưởng tế bào Vero trên BioNOC™ II macrocarriers chúng tạo ra diện tích bề mặt lớn cho sự sinh trưởng. (trái) BioNOC™ II macrocarrier and (phải) tế bào Vero dưới kính hiển vi phóng đại 4x. Các tế bào được nhuộm với Fluorescein diacetate (FDA) và Hoechst. Hình bên trái là giai đoạn đầu nuôi cấy và bên phải là giai đoạn sau nuôi cấy.

Nuôi cấy tế bào Vero cho sản xuất vaccine cúm

Tế bào Vero từ 5 chai T-175 đạt hợp lưu cao được thu hoạch bằng xử lý trypsin, ly tâm trong 5 phút ở 275 x g, và được trộn với môi trường nuôi cấy. Tế bào được trộn đều với môi trường nuôi cấy ở thể tích cuối cùng 500ml và được đặt vào thiết bị nuôi cấy CelCradle-500AP™ (perfusion) với các thông số như bên dưới (Tide Motion parameters). Sau 1 giờ 45 phút, thu mẫu môi trường, và đếm tế bào sử dụng trypan blue xác định tỉ lệ sống tế bào. 85% tế bào bám cố định trên vật liệu mang (carriers). Thông số cài đặt cho việc quá trình nuôi tế bào được cài đặt như sau:

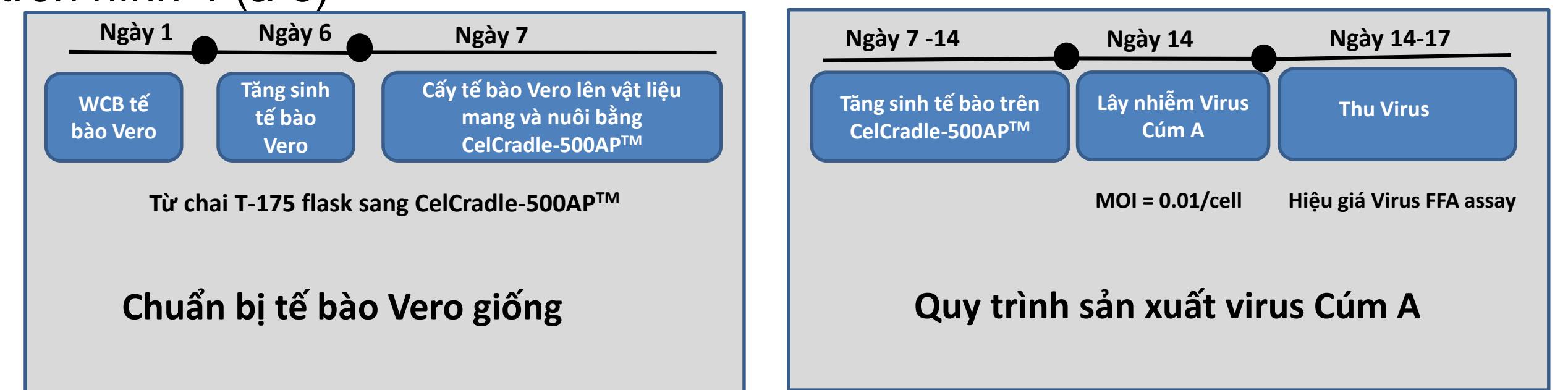
Uprate	Uphold	Downrate	Downhold
2.0 mm/s	20 sec	2.0 mm/s	0 sec



Phương pháp lây nhiễm Virus

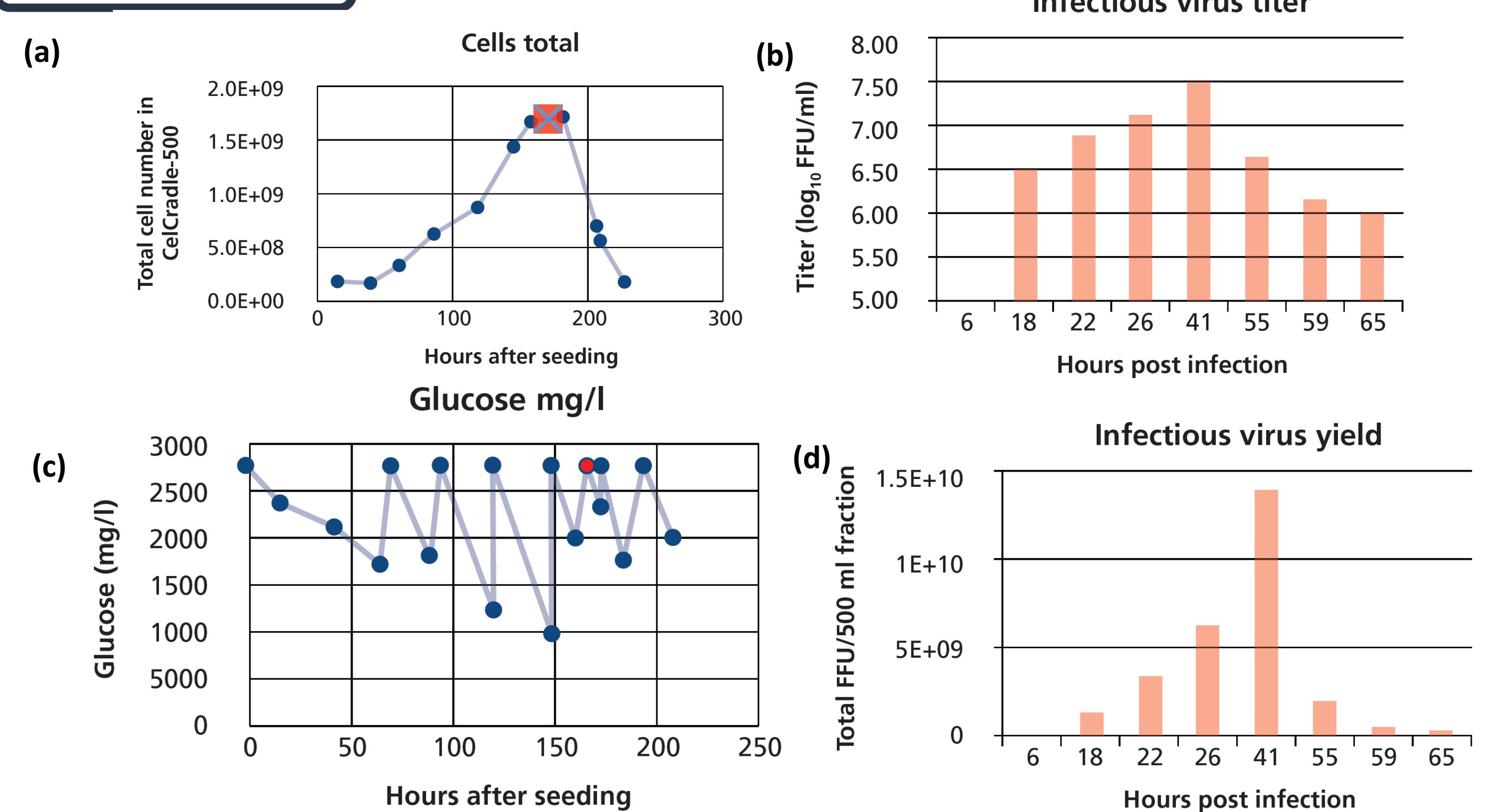
Tổng số tế bào 1.7e9 đạt được sau 167 giờ (7 ngày) nuôi kể từ sau ngày cấy Vero với môi trường không có huyết thanh. Thời gian tăng sinh gấp đôi lượng tế bào Vero là 36 giờ - tương đương với nuôi trên T flask.

Tế bào Vero được lây nhiễm chủng virus cúm A với MOI (multiplicity of infection) là 0.01. Sau khi lây nhiễm virus, môi trường được thay 7 lần. Hiệu giá lây nhiễm virus được xác định bằng FFA (fluorescent focus assay). Kết quả thu được tổng 10.45e10 FFU virus lây nhiễm được sản xuất. Sơ đồ mô tả trên hình 3 và kết quả được trình bày trên hình 4 (a-e)



Hình 3 Chuẩn bị tế bào giống Vero và quá trình sản xuất virus cúm A sử dụng thiết bị CelCradle-500AP™; WCB - Working Cell Bank; MOI - Multiplicity of Infection ;FFA - Fluorescent Focus Assay.

Thu Virus



	2D Culture Cell Factories CF10	3D BioNOC™ II carriers
Cell morphology	Mono/bilayer	Densely populated carriers
Cell density	0.7 Million per ml	3.2 Million per ml
Working volume	1.5L	0.5L
Surface area	6.320 cm ²	15.000 cm ²
To obtain 1.6E9 cells	1.6 x CF10	1 X 500 ml CelCradle

Hình 4 (a) CelCradle-500AP™: Sinh trưởng tế bào Vero trong môi trường không có huyết thanh (SFM). Vị trí đánh dấu đỏ trên đồ thị chỉ thời điểm 161 giờ sau khi cấy tế bào giống (b) Nồng độ Glucose trong môi trường nuôi cấy (c) Hiệu giá virus lây nhiễm trong log FFU/ml (d) Virus thu được trong FFU trên 500 ml (e) Mật độ tế bào cao đạt được trong nuôi cấy 3D so sánh với 2D

Kết luận

Nghiên cứu thử nghiệm thiết bị đã chứng minh Vero có thể nuôi đạt mật độ cao 2.9e9 (5e6 tế bào/ml) đến 3.25e9 (6e6 tế bào/ml) trên một chai 500ml CelCradle™ trong môi trường không có huyết thanh SFM và môi trường có huyết thanh tương ứng. Nó điển hình cho quá trình sản xuất hiệu quả sử dụng vật tư 1 lần và có khả năng nâng quy mô trong sản xuất Vaccine với giá cả hợp lý sử dụng công nghệ Tide Motion. Những nghiên cứu này được thực hiện bởi đơn vị cộng tác với chúng tôi tại tại Rand D, Áo.

Hướng nghiên cứu tiếp theo

Những kết quả đạt được mang lại nhiều tiềm năng lớn. Vero được nhận định là "cỗ máy trong công nghiệp sản xuất vaccine", các chủng virus cúm khác / virus khác có thể được nuôi hiệu quả cho hiệu giá cao khi áp dụng công nghệ Tide Motion, với tiềm năng lớn xây dựng cơ sở vật chất cGMP trong sản xuất hàng loạt vaccine cho việc dự trữ hoặc trong trường hợp dịch bệnh bùng phát. Mặc dù kết quả thu được mang nhiều hứa hẹn, những kết quả này hoàn toàn có thể được cải thiện hơn bằng tối ưu hóa sự phát triển virus cúm phù hợp với hệ thống nuôi cấy CelCradle-500AP™, tiềm năng trong xây dựng cơ sở cGMP cho đến tăng quy mô sản xuất lớn vaccine.

Esco Aster - Hướng nghiên cứu trên Vero

Phát triển Vaccine

Phát triển quy trình, Tinh sạch, Tư vấn hoặc chuyển giao công nghệ toàn cầu

Lời cảm ơn

Chúng tôi chân thành cảm ơn tới Nuvonis Technologies GmbH, công ty về công nghệ sinh học có trụ sở tại Vienna, Áo vì đã cung cấp dòng tế bào Vero đạt chuẩn và cộng tác trong thử nghiệm sản xuất virus cúm.