การเพาะเลี้ยง Vero Cells เพื่อเพิ่มจำนวนสำหรับการผลิตวัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์

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

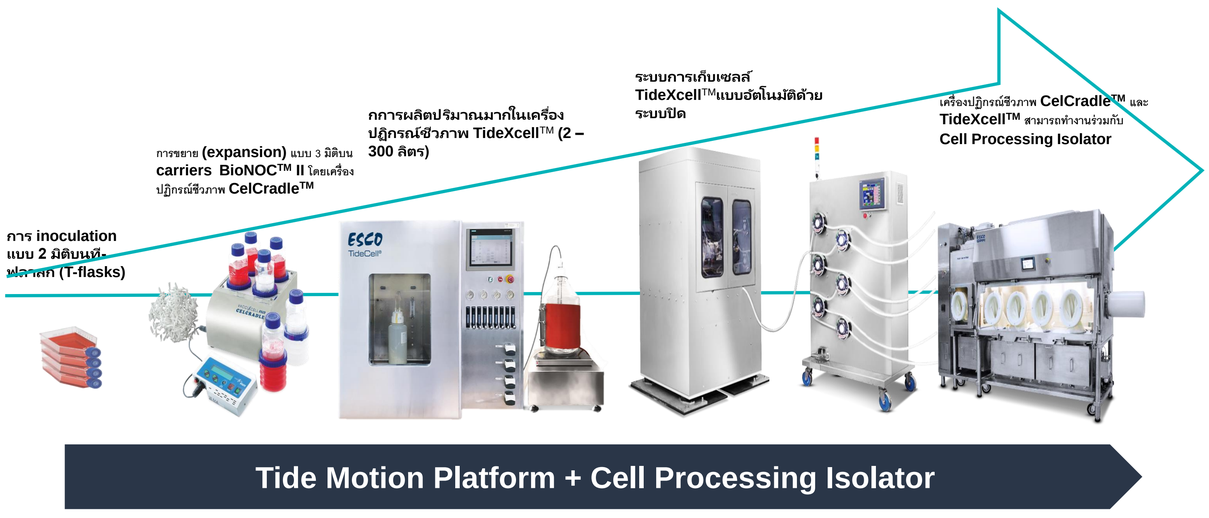
* Esco Aster Pte Ltd,Singapore + Nuvonis Technologies, Austria

บทนำ

การฉีดวัคซีนประจำปีเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมวัคซีนให้เป็นไปตามความต้องการในประเทศที่กำลังพัฒนานั้นเป็นสิ่งที่มีความท้าทายเป็นอย่างมาก การผลิตและการใช้วัคซีนไข้หวัดใหญ่ในเวลาที่เหมาะสมนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็นในประเทศที่ไม่ได้ผลิตวัคซีน เราจึงมุ่งพัฒนาวัคซีนไข้หวัดใหญ่ให้มีความรวดเร็วด้วยเป้าหมายเพื่อแก้ไขปัญหาในกระบวนการทางชีวภาพที่สมบูรณ์แบบเพื่อเป็นทางเลือกที่จะทดแทนการใช้ไข่ไก่ซึ่งสามารถช่วยให้กระบวนการผลิตเร็วขึ้น.

วิสัยทัศน์ของบริษัท Esco Aster

Esco Aster มีความมุ่งมั่นในการผลิตวัคซีนทางชีวภาพ , ผลิตผลทางชีวภาพ และผลิตภัณฑ์เซลล์บำบัดที่มีคุณภาพสูง ตามวิสัยทัศน์หลักของเราเพื่อช่วยให้ประเทศที่ไม่ได้ ผลิตวัคซีนสามารถผลิต, จัดเก็บ และจำหน่ายวัคซีนได้อย่างเพียงพอ และในขณะนี้เราได้ร่วมมือกับ Nuvonis (Austria) เพื่อสร้างกระบวนการทำงานในการผลิตทางชีวภาพได้ อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งทำให้สามารถสร้างไวรัสไข้หวัด ใหญ่โดยใช้ serum-free Vero cell banks ของบริษัท Nuvonis โดยเราได้แสดงให้เห็นว่าการผลิตแบบ Tide Motion ร่วมกับเครื่องมือการแยกเซลล์ของ Esco ช่วยทำให้การผลิตวัคซีนในแต่ละท้องที่มีราคาถูกลงตามหลักการของ CAPEX และ OPEX ในประเทศกำลังพัฒนา



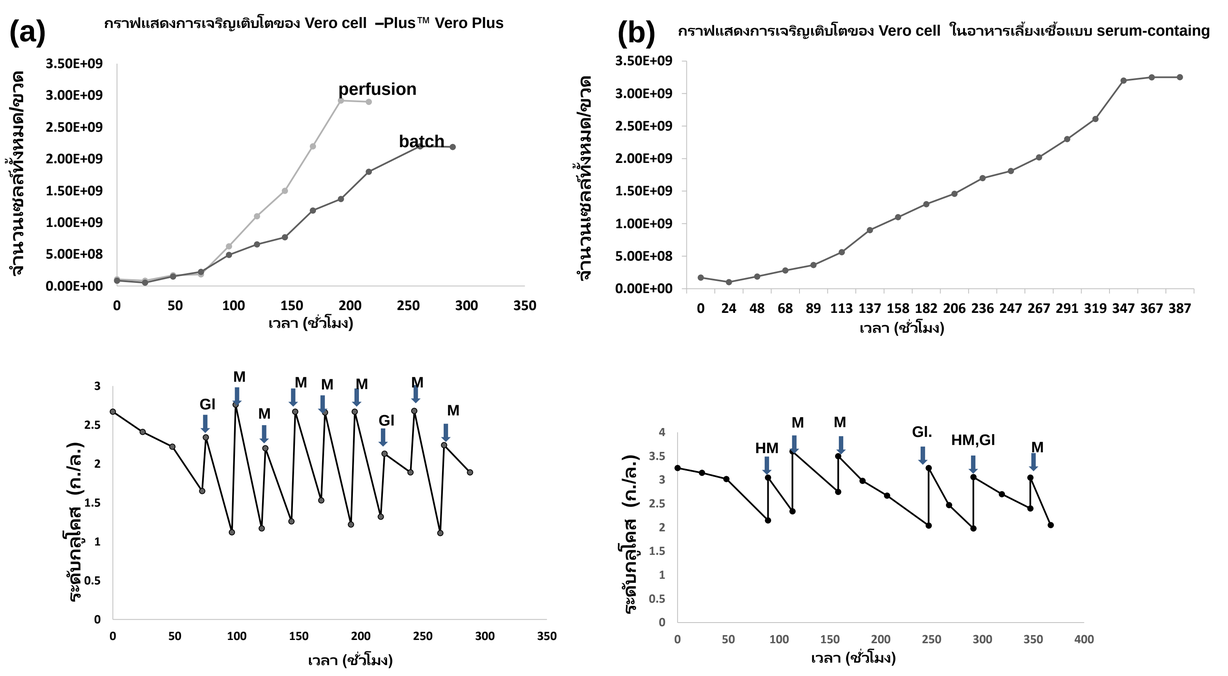
Vero Cells

Vero Cells เป็นเซลล์ที่ต้องยึดเกาะซึ่งมีการนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนกันอย่างแพร่หลาย เซลล์เหล่านี้ได้มาจากเซลล์เยื่อบุผิวของไตของลิงสีเขียวแอฟริกัน ซึ่งมีข้อดีหลายประการในแง่ของการติดเชื้อไวรัสได้สูงและการแยกไวรัสหลักได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึง arrayของไวรัสที่ Vero Cells อ่อนแอ และมีวัคซีนไวรัสหลายชนิดที่สามารถผลิตได้ในเซลล์เหล่านี้ ได้แก่ โรคไข้หวัดใหญ่ โรคพิษสุนัขบ้า รีโอไวรัส และไข้สมองอักเสบ

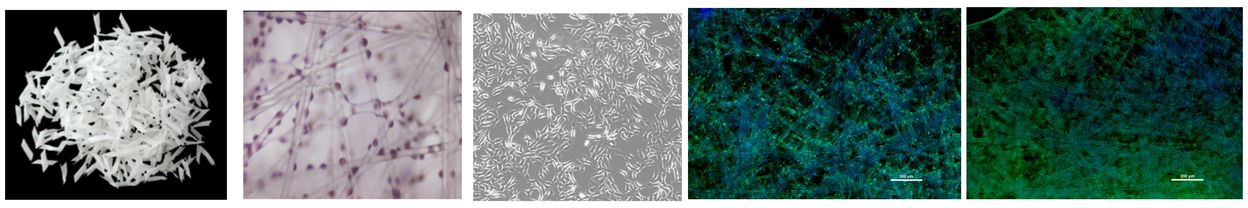
เมื่อพิจารณาผลดีอันมีมากมายของ Vero Cells จึงมีความต้องการเพาะเซลล์นี้มากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไวรัส ซึ่งเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้บน T-flasks และ Roller bottles ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ 2 มิติแบบดั้งเดิม เราจึงเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากหรือมีความหนาแน่นที่เหมาะสมโดยใช้ macrocarriers - BioNOC ™ II ที่เป็นหัวใจของเทคโนโลยีเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเลี้ยง Vero Cells ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Tide Motion

A serum-free Vero cell research cell bank (บทความ 144-160) ได้ถูกนำมาใช้งาน ทั้ง MCB และ WCB ซึ่งมีคุณลักษณะที่สมบูรณ์ รวมถึงมีการทดสอบคุณสมบัติในการก่อมะเร็งในขั้นตอนสิ้นสุดการผลิต (EOP) Serum-free media มีการเติม L-glutamine ก่อนนำไปใช้งาน นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในการวิเคราะห์การเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ และมีการวัดกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้อุปกรณ์ GlucCell ™และแถบทดสอบกลูโคส Esco VacciXcell GlucCell ™ จากรูปที่ 1 (a) และ (b) ด้านล่างแสดง growth kinetics และรูปที่ (c) และ (d) แสดงปริมาณการใช้กลูโคส และอัตราการใช้กลูโคส



รูปที่ 1 เส้นโค้งการเจริญเติบโตของ Vero cell (a) Plus ™ Vero Plus และ (b) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรั่มและความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อของอาหารแต่ละชนิดตามลำดับ M = การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ HM = การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อครึ่งหนึ่ง GI = กลูโคส

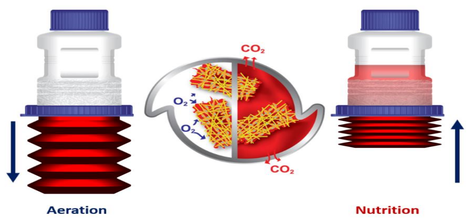


รูปที่ 2 การเจริญเติบโตของ Vero cell โดย BioNOC™ II macrocarriers ซึ่งมีพื้นผิวขนาดใหญ่ในการเจริญเติบโต (L) BioNOC™ II macrocarriers และ (R) Vero cell ด้วยการขยาย 4 เท่า เซลล์จะถูกย้อมด้วยสารเคมีตรวจสอบความมีชีวิต (FDA) และ Hoechst stain ทางด้านขวาสุด ซึ่งทางด้านซ้ายแสดงการเพาะเลี้ยงเชื้อช่วงต้น และทางด้านขวาแสดงการเพาะเชื้อช่วงปลาย

การเพาะเลี้ยง Vero Cells ในการผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่

เซลล์จากฟลาสก์ T-175 ถูกเก็บเกี่ยวโดยการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน นำมาเหวี่ยงตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาทีที่ 275 x g. และนำมาละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเซลล์ได้รับการผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มล. และถ่ายโอนไปยัง CelCradle-500AP™ (perfusion) โดยใช้พารามิเตอร์ Tide Motion หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง 45 นาทีจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ด้วยการทดสอบการย้อมสีน้ำเงินในเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่ง 85% ของเซลล์ติดอยู่กับ carrier และพารามิเตอร์การเคลื่อนที่การเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่

อัตราการเพิ่ม	ค้างไว้	อัตราการลด	ลดเวลาลง
2.0 มม./วินาที	20 วินาที	2.0 มม./วินาที	0 วินาที



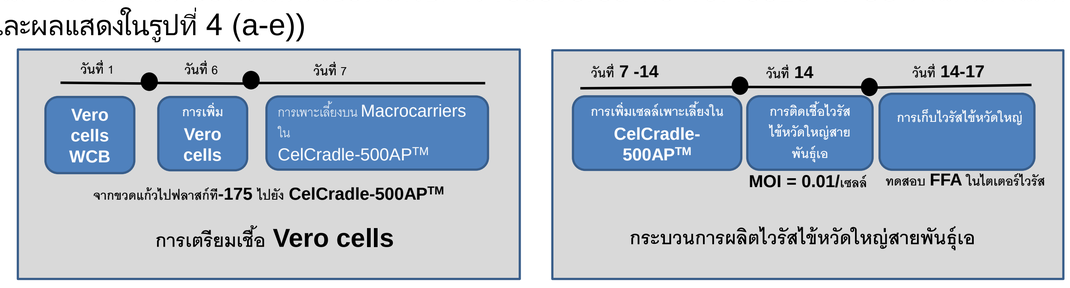
วิธีการติดเชื้อไวรัส (Virus Infection Method)

จำนวนเซลล์ทั้งหมด 1.7e9 เซลล์ สามารถเลี้ยงด้ภายใน 167 ชั่วโมง (7 วัน) หลังจากการเพาะเลี้ยง Vero cells ในสภาวะ serum-free condition และได้ doubling time ของการเลี้ยง Vero cells ในเวลา 36 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในที-ฟลาสก์

Vero cells ที่ได้ถูกทำให้ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอโดยการติดเชื้อหลายระดับ desired multiplicity of infection (MOI) 0.01

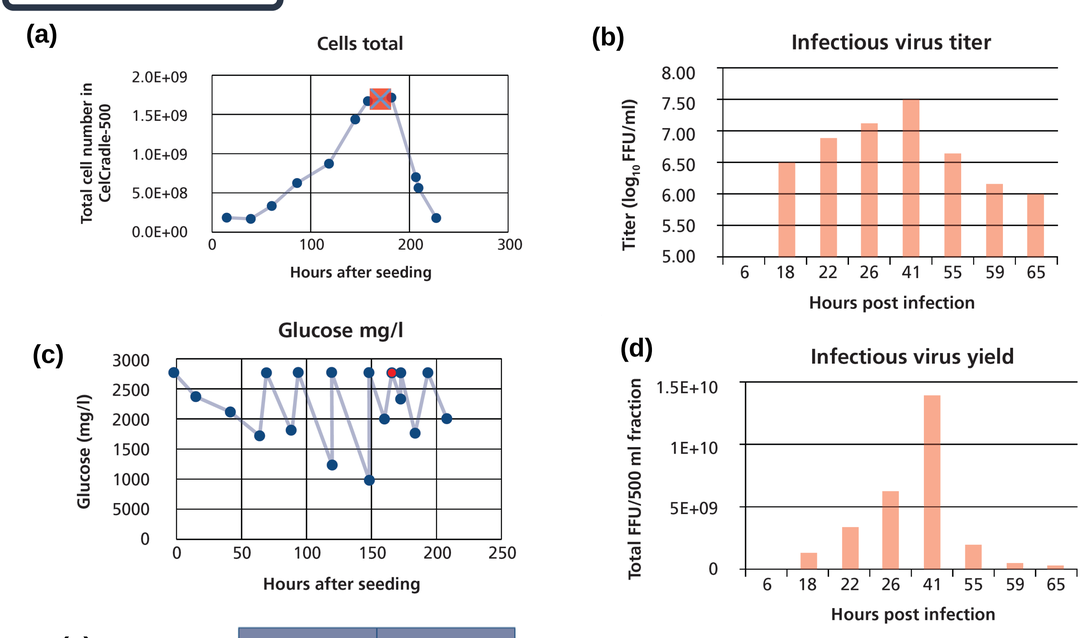
หลังจากติดเชื้อไวรัสแล้วทำการเปลี่ยนอาหารเจ็ดรอบ ทำการติดเชื้อไตเตอร์ไวรัส infectious virus titre ในแต่ละส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยการใช้วิธีการทดสอบฟลูออเรสเซนต์โฟกัส fluorescent focus assay (FFA)

สรุปรวมจำนวนทั้งหมดของไวรัสติดเชื้อที่ได้รับการ recovered คือ 10.45e10 FFUs ดังแผนผังแสดงในรูปที่ 3 และผลแสดงในรูปที่ 4 (a-e))



รูปที่ 3 การเตรียมเชื้อ Vero cells และกระบวนการผลิตไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอในCelCradle-500AP™; WCB - ธนาคารเซลล์ที่ทำงาน; MOI – การติดเชื้อจำนวนมาก ;FFA - ทดสอบฟลูออเรสเซนต์ โฟกัส

ผลผลิตไวรัส



(e)

	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 cm²	15.000 cm²
To obtain 1.6E9 cells	1.6 x CF10	1 X 500 ml CelCradle

รูปที่ 4 (a) CelCradle-500AP™: การเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซีรั่ม (SFM) และสี่เหลี่ยมสีแดงหมายถึงเวลาของการติดเชื้อที่ 161 ชั่วโมงหลังจากใส่เชื้อ (b) ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (c) ไตเตอร์ของไวรัสที่ติดเชื้อในลอก FFU / ml (d) ผลผลิตไวรัสที่ติดเชื้อใน FFU ต่อ 500 มล. (e) ความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะ 3 มิติเมื่อเทียบกับการเพาะปลูกแบบ 2 มิติ

สรุป

จากการพิสูจน์แนวคิดนี้แสดงให้เห็นว่า Vero cell สามารถเพาะเลี้ยงให้เติบโตได้ความหนาแน่นเซลล์สูงมากถึง 2.9e9 (5e6 เซลล์ / มล.) และได้เซลล์ถึง 3.25e9 (6e6cells / มล.) ต่อ 500 มล. โดยการเลี้ยงด้วย CelCradle™ โดยใช้ Serum Free medium SFM และSerum-containg media ตามลำดับ

ได้แสดงให้เห็นถึงการทำงานของกระบวนการทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพของการเลี้ยงแบบ single-useซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนการผลิตวัคซีนชีวภาพได้สูงขึ้นในราคาไม่แพงโดยใช้เทคโนโลยี Tide Motion นี้ ซึ่งการศึกษานี้ดำเนินการโดยพาร์ทเนอของเราที่โรงงาน Rand D ในประเทศออสเตรีย

การศึกษาในอนาคต

จากผลลัพธ์มีแนวโน้มที่แน่นอน และได้พิจารณาแล้วว่าเซลล์เพาะเลี้ยงเป็น“สิ่งสำคัญของอุตสาหกรรมการผลิตวัคซีน” ทั้งไวรัสสายพันธุ์อื่น / เส้นสายไวรัสอื่น สามารถเพาะเลี้ยงได้มากขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้เทคโนโลยีการเคลื่อนที่ตามกระแสที่มีศักยภาพสำหรับโรงงานผลิตมาตรฐาน cGMP ในการสำรองวัคซีนจำนวนมาก หรือในกรณีที่มีโรคระบาด

ถึงแม้ว่าผลลัพธ์มีแนวโน้มที่แน่นอน แต่เราสามารถปรับปรุงได้โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในระบบ CelCradle-500AP™ ซึ่งอาจใช้ในโรงงานผลิต cGMP เพื่อเพิ่มการผลิตวัคซีนจำนวนมาก

วิถีทาง Esco Aster's Vero
- การพัฒนาวัคซีน
- PD, การทำให้บริสุทธิ์, การให้คำปรึกษาสำหรับวัคซีน
- กระบวนการย้าย,เทคโนโลยีระดับโลก

กิตติกรรมประกาศ

เราขอแสดงความขอบคุณบริษัท Nuvonis Technologies GmbH เป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นบริษัทเทคโนโลยีชีวภาพที่ตั้งอยู่ในกรุงเวียนนาประเทศออสเตรียสำหรับสายการผลิตเซลล์เพาะเลี้ยง และการผลิตไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ได้รับมาตรฐาน GMP

© 2019 Esco Aster Pte Ltd. All rights reserved.
All trademarks are the property of Esco unless otherwise stated.

© 2562 บริษัทเอสโค แอสเตอร์ ประเทศสิงคโปร์ สงวนลิขสิทธิ์
เครื่องหมายการค้าทั้งหมดเป็นทรัพย์สินของเอสโคเว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

TIDEMOTION® เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และ บริการพัฒนากระบวนการ

สามารถหาข้อมูลเพิ่มเติมได้ที่ http://www.escoaster.com
สามารถสอบถามข้อมูลได้ที่ : mail@escoaster.com