

April 21, 2020

Keywords or phrases:

BHK-21 cells, chemically defined medium, suspension, veterinary vaccine

Medio CD 4Cell® BHK-21

Adaptación de las células BHK-21 a la suspensión utilizando un medio químicamente definido

Aziz Cayli¹, Burcu Tongul¹, Francis Nguyen², Adrien Lugari³, Érica Schulze^{4*}

1. Florabio AS, IYTE Kampusu, A7 Binasi no: 4, 35400 Urla, Turkey

2. Sartorius Stedim North America Inc., 545 Johnson Avenue, Bohemia, NY 11716

3. Sartorius Stedim FMT S.A.S., ZI des Paluds, Avenue de Jouques – CS 91051, 13781 Aubagne Cedex

4. Sartorius Stedim Biotech GmbH, August-Spindler-Strasse 11, 37079, Goettingen

* Correspondencia

E-Mail: Info_CellCultureMedia@sartorius.com

Abstracto

Las cepas de células BHK-21 se han utilizado durante varios años como plataforma para las vacunas veterinarias y la fabricación de proteínas recombinantes. Sin embargo, estas células dependen del anclaje, lo que requiere el uso de agentes de disociación que ralentizan y son traumáticos para las células, al tiempo que crean limitaciones de escalamiento. Por el contrario, la cultura en suspensión facilita los procesos a gran escala, ofrece opciones para la intensificación del proceso y contribuye a reducir los costos de fabricación debido a la menor complejidad del proceso. Las células en suspensión BHK-21 cultivadas en medios sin suero que producen altos títulos de virus son deseables para desarrollar vacunas asequibles en todo el mundo.

Aunque algunas líneas celulares utilizadas en la producción de vacunas todavía requieren suplementos de suero, se ha demostrado que los cultivos de BHK-21 se propagan en medios sin suero. El deseo de eliminar del cultivo los posibles contaminantes no controlados, productos naturales y subproductos condujo al desarrollo de medios más complejos. Dichos medios químicamente definidos demostraron que el suero se podía omitir, sin adaptación celular, si se realizaban las modificaciones nutricionales y hormonales apropiadas.

En este estudio, adaptamos con éxito las células BHK-21 dependientes del suero de anclaje a la suspensión en un medio Sartorius sin suero, químicamente definido (CD). Esto fue desarrollado para un rendimiento más consistente, una purificación más fácil y un procesamiento posterior que cumple con los requisitos reglamentarios y permite una producción de vacunas rentable.

Conozca más: www.sartorius.com/en/products-es

Introducción

El propósito de este estudio de aplicación es evaluar el rendimiento del medio químicamente definido 4Cell® BHK-21 durante la adaptación escalonada de una línea celular BHK-21 desde la adherencia hasta el crecimiento en suspensión.

Las líneas celulares BHK-21 se han utilizado ampliamente durante años como plataforma para la fabricación de virus y proteínas.

Históricamente, las células BHK-21 se cultivaron comúnmente en medios que contenían suero, sin embargo, el suero puede conducir a una variabilidad en el rendimiento debido a la variación de un lote a otro, así como a la presencia de agentes adventicios indefinidos.

Recientemente, el uso de suero también ha planteado preocupaciones regulatorias debido a un mayor potencial de contaminación en los productos sanitarios. Estas preocupaciones sobre la contaminación impulsaron la recomendación de la industria farmacéutica de eliminar el suero (y todas las demás materias primas no definidas cuando sea posible) en la producción de productos biológicos para terapia o vacunas [1, 2].

Para abordar estas preocupaciones regulatorias, Sartorius desarrolló un medio químicamente definido, de origen no animal (NAO).

En comparación con otras alternativas de medios libres de suero y de origen animal, se ha demostrado que esta formulación estimula la producción tanto celular como viral en las células BHK-21 adaptadas a la suspensión.

Materiales y Métodos

Materiales

Consumibles

- Corning®: T-25 flask
- Corning®: Matraces agitadores de polycarbonato Erlenmeyer de 125 mL y 250 mL
- Corning®: tubo de centrifuga cónico Falcon™ de 50 mL
- Corning®: tubo de centrifuga cónico Falcon™ de 15 mL
- Medios de cultivo celular:
- Sartorius: 4 Cell® BHK-21 CD Medium (Cat: CFV3FA0001, Lot: MSC11001P)
- Sigma: DMEM (Cat: D5523, Lot: SLBS0097V)
- Gibco: FCS (Origen Sudamérica, Lote: 10270-098, Ref: 42G9551 K)

Línea celular

- BHK-21 celdas (Clon 13 - ATCC® CCL-10™)

Equipo

- Vi-CELL™ (Beckman Coulter)
- Biorreactores BIOSTAT®A



Fig 1. BIOSTAT®A utilizado para el cultivo de células en suspensión BHK-21 y medio CD 4Cell® BHK-21

Métodos

■ Enumeración celular:

La concentración celular y la viabilidad se determinaron usando un Vi-CELL™ (Beckman Coulter) para proporcionar Exclusión de Tinte Azul Tripán automatizada.

■ Prueba de promoción del crecimiento:

Las células se cultivaron en matraces agitadores de 125mL con fondo liso de tapa plana. La inoculación se realizó a 3×10^5 células viables/mL con un volumen de trabajo de 25 mL. Los cultivos se llevaron a cabo a $36,5^\circ\text{C}$ con una frecuencia de agitación inicial de 125 rpm, 7% de CO_2 en atmósfera humidificada.

También se realizaron experimentos de crecimiento celular en biorreactores Biostat®A. La inoculación se realizó a 3×10^5 células viables/mL con un volumen de trabajo de 1L. Los cultivos se llevaron a cabo a $36,5^\circ\text{C}$ con una velocidad de agitación inicial de 100 rpm, pH 7,2, aire / N_2 / CO_2 en el espacio de cabeza, O_2 en el rociador, punto de consigna de OD 50%.

■ Producción de virus de la rabia:

La cepa del virus de la rabia BHK-21 (adaptada al Clon 13 de BHK-21 - ATCC® CCL-10™ cultivada en monocapa) fue proporcionada por la Universidad de Ankara. El virus se cultivó en suspensión en medio 4Cell® BHK-21 CD para evaluar la producción de virus. Se infectaron células en suspensión BHK-21 (7×10^6 células / ml) con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 en matraces de agitación de 125 ml (volumen de trabajo de 25 ml).

El Ensayo de Foco Fluorescente (AAF) se realizó como se describe en el Manual Terrestre [3]. Brevemente, las células BHK-21 Clon 13 - ATCC® CCL-10™ producidas en placas de 96 pocillos durante 24 horas se infectaron con una dilución de virus 10 veces mayor (50 μl por pocillo) en cuatrillizos. Las células infectadas incubadas durante 72 horas se fijaron y se tiñeron con conjugado antirrábico de FITC. La prueba se evaluó después de observar la superficie total del pozo mediante microscopía fluorescente.

Adaptación gradual de las células BHK-21 a las condiciones de suspensión en medio 4Cell® BHK-21 CD:

Los siguientes pasos ayudan a una adaptación exitosa:

- Asegúrese de que las células crezcan bien en su medio estándar (que contiene, por ejemplo, suero de ternero fetal al 10% - FCS) en su procedimiento de cultivo estándar.
- Cambiar las condiciones de crecimiento. Adaptar las células a las condiciones de crecimiento en suspensión en el mismo medio.
- Cambiar de medio. Transfiera las células de su medio de referencia al medio 4Cell® BHK-21 CD.
- Reducir el FCS de manera escalonada.
- Disminuir la concentración de células de inóculo.
- Ejecute cultivo de stock el tiempo suficiente bajo el

nuevo estándar de condición.

Asegurar un buen crecimiento de las células:

- Después de descongelar, las células adherentes BHK-21 se pasaron un mínimo de cuatro veces para asegurar un rendimiento constante. Posteriormente, se inocularon cinco matraces T175cm² (volumen de trabajo de 35mL) con 1×10^4 a 2×10^4 células/cm² y se removieron hasta la confluencia durante tres a cuatro días para preparar la adaptación de la suspensión.

Cambiar las condiciones de crecimiento:

- Después del crecimiento hasta la confluencia, las células BHK-21 de los cinco matraces T175 se combinaron y se centrifugaron a 1000 rpm (revoluciones por minuto) durante cuatro minutos a temperatura ambiente. El sedimento celular se re-suspendió en 20 ml de DMEM con FCS al 10% a una concentración entre 0.8×10^6 to 1.2×10^6 células viables/mL (volumen de trabajo 20mL). Las células se transfirieron a un matraz de agitación de 125 ml y se cultivaron durante tres días con agitación (125 rpm) a $36,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ y CO_2 al 7%..

Cambio medio:

- Después del cultivo, las células se centrifugaron durante cuatro minutos a 1000 rpm y se re-suspendieron en 5 ml de sobrenadante complementado con 20 ml de medio 4Cell® BHK-21 CD + FCS al 10% (volumen de trabajo total de 25mL) para mantener una concentración de células de inoculación. entre 0.8×10^6 a 1.2×10^6 células viables/mL. El objetivo de los pases posteriores fue mantener entre 0.8×10^6 to 1.2×10^6 células viables/mL en matraces de agitación de 250mL de volumen de trabajo de 50mL. Después de la centrifugación, el sedimento se resuspendió en 10mL de medio acondicionado y se aumentó con 35 ml de medio 4Cell® BHK-21 CD y 5 ml de FCS.

Reducir FCS de manera escalonada:

- Para reducir la concentración sérica, las células deben duplicarse constantemente, como mínimo, cada dos o tres días durante tres pases sucesivos. Después de pasar con éxito en 4Cell® BHK-21 CD Medium con suero FCS al 10% (v/v), el nivel de concentración se redujo gradualmente (es decir, suero FCS al 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% y 0%) mientras se mantenía concentración de inoculación entre 0.8×10^6 to 1.2×10^6 células viables/mL en 50mL de volumen de trabajo.

Disminuir la concentración de células de inóculo:

- Después de una adaptación exitosa a la suspensión y las condiciones libres de suero, la concentración de células de inoculación se redujo gradualmente (es decir, 8, 6, 4, y 3×10^5 células/mL) cuando se demostró que la concentración de células se duplicaba en dos o tres días. Cuando las células alcanzaron una tasa de crecimiento constante (viabilidad > 90%) durante varios pases en medio

4Cell® BHK-21 CD a una densidad de inoculación de 3×10^5 células / ml, la adaptación se consideró exitosa (ver diagrama de flujo).

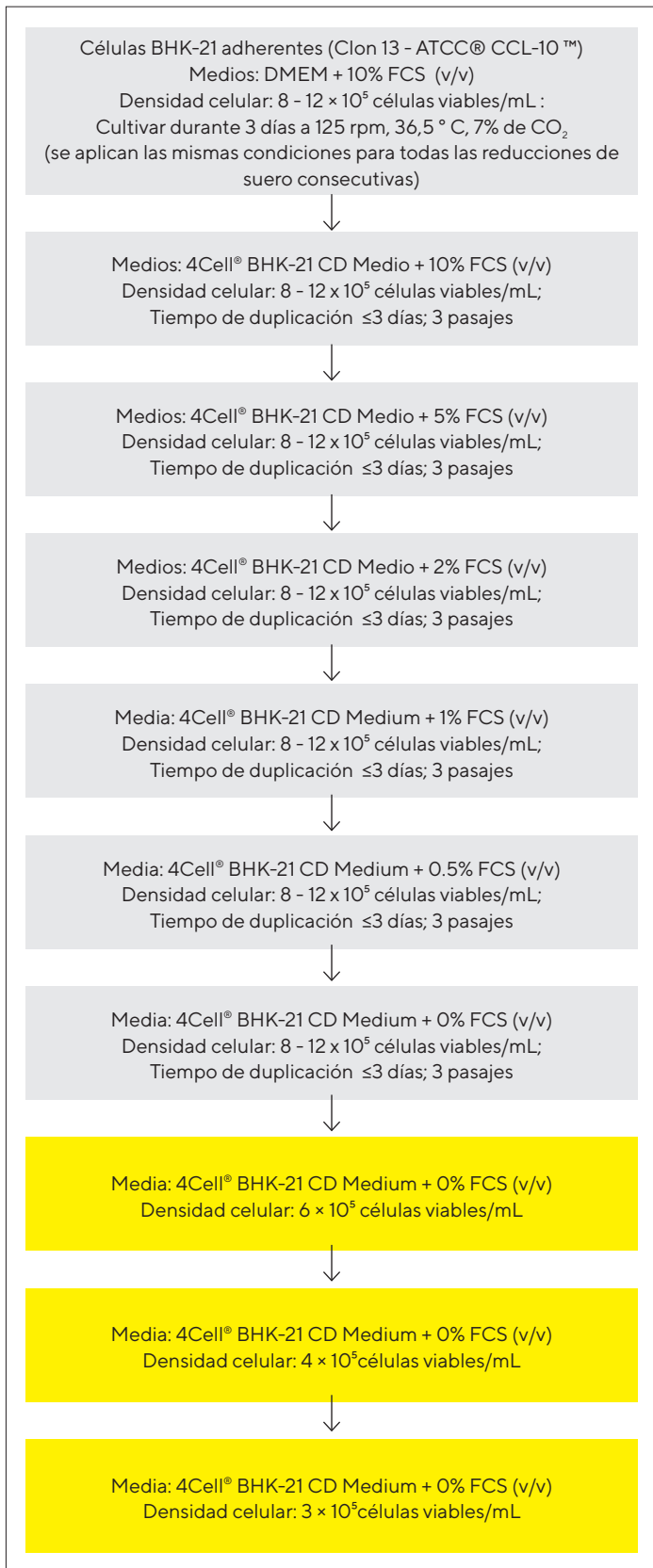


Figura 2. Diagrama de flujo para la adaptación de la celda adherente BHK-21 a Medio 4Cell® BHK-21 CD químicamente definido sin suero.

Resultados y Discusión

1. Estabilidad de la Suspensión

Después de la adaptación paso a paso de las células BHK-21 de adherentes con suero a condiciones de cultivo sin suero en suspensión en medio 4Cell® BHK-21 CD (ver métodos), se evaluó la estabilidad de las células. Las células en medio 4Cell® BHK-21 CD se subcultivaron durante más de 20 pases (Figure 3, n=2).

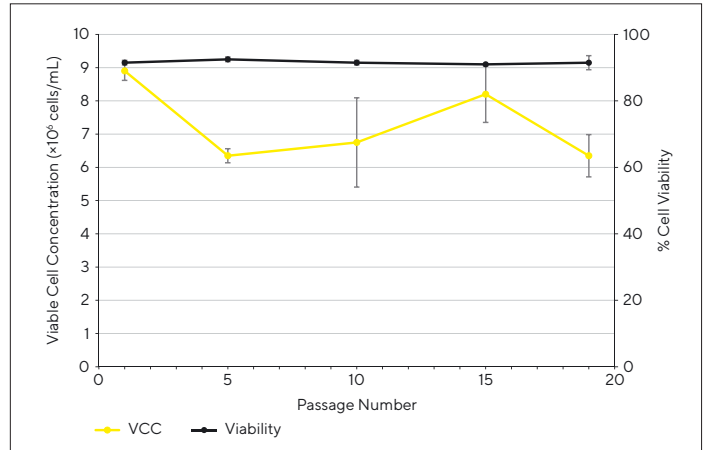


Fig. 3: Estabilidad de las células BHK-21 en medio CD Sartorius 4Cell® BHK-21. Las células son estables en el medio hasta más de 20 pases (n=2).

VCC = Concentración Celular Viable.

A lo largo de 20 pases de BHK-21, las células lograron consistentemente un promedio de 6.5×10^6 células viables/mL y más del 90% de viabilidad en medio 4Cell® BHK-21 CD Medium.

2. Crecimiento de la suspensión

Células BHK-21 El medio 4Cell® BHK-21 CD admite un crecimiento rápido a densidades más altas (VCC 7×10^6 células viables/mL), casi seis veces, en comparación con el medio NAO (origen no animal) de referencia sin suero, como se muestra en Figura 4. A lo largo de cuatro días de crecimiento por lotes, las células mantuvieron constantemente una viabilidad por encima del 80%.

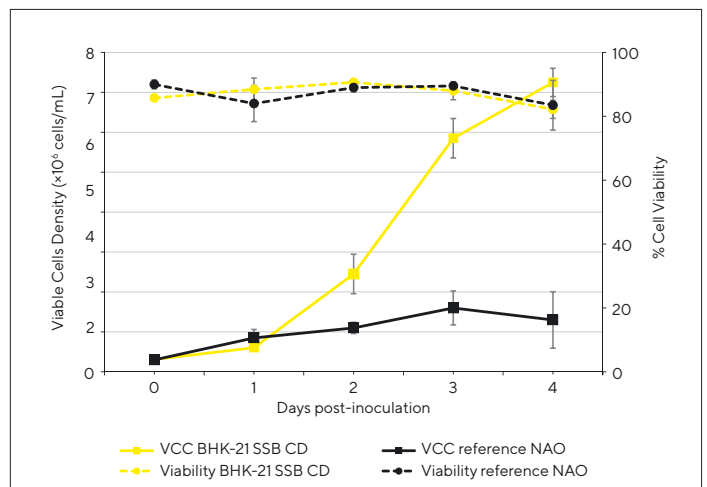


Fig. 4: El medio 4Cell® BHK-21 CD admite un crecimiento rápido a altas densidades en comparación con un medio de referencia sin suero y de origen no animal en los biorreactores Biostat® A (n=3).

3. Productividad del virus de la rabia

Para evaluar la productividad del virus, se infectaron células BHK-21 adaptadas al cultivo en suspensión en medio 4Cell® BHK-21 CD con 0,01 MOI del virus de la rabia de referencia y se dejó que la infección prosiguiera hasta que las densidades de células viables cayeran por debajo del 20 por ciento. El sobrenadante se recogió y analizó mediante un ensayo de anticuerpos fluorescentes. Los datos iniciales obtenidos dieron como resultado un virus igual a 7×10^4 FFU / mL ((datos no mostrados). Los resultados deben reproducirse para obtener datos estadísticamente relevantes.

Conclusión

El suero utilizado en la industria biofarmacéutica ha proporcionado durante mucho tiempo una multitud de beneficios en muchos procesos con su composición única de factores de crecimiento y componentes auxiliares. Aunque el uso de suero trae muchos beneficios, también tiene su parte de desafíos. El mayor es la calidad y consistencia del producto (por ejemplo, variación de lote a lote, calidad, fuente, riesgo de contaminación, etc.).

Debido a discrepancias desconocidas con el uso de suero, la detección de rutina para micoplasmas y virus también se ha vuelto importante. El riesgo asociado con cualquiera de estos contaminantes puede influir negativamente en el cultivo, ya sea implicando falsamente la idoneidad de los medios o, en el peor de los casos, alterando el producto final planteando problemas de seguridad para el uso clínico.

Como resultado, la industria se ha movido hacia materiales y medios de origen no animal, definidos químicamente. Sartorius 4Cell® BHK-21 CD Medium ofrece esta alternativa.

Este estudio probó la solidez y la eficacia de la adaptación de las células BHK-21 adherentes a la suspensión y posterior crecimiento en medio 4Cell® BHK-21 CD químicamente definido y sin suero. La adaptación de las células BHK-21 adherentes a este medio permitió un proceso de escalado más fácil y fue capaz de soportar el crecimiento celular a altas densidades y viabilidad, con resultados iniciales que sugieren que el medio 4Cell® BHK-21 CD puede proporcionar una opción viable para el producción de virus de la rabia de títulos altos.

Expresiones de Gratitud

Los autores agradecen a la empresa Florabio (Turquía) por realizar los experimentos de adaptación de BHK-21 en este estudio. También agradecen al Dr. Aykut Özkul (Universidad de Ankara) por el estudio de evaluación del virus.

Referencias

1. El Merten OW. Desarrollo de medios sin suero para el crecimiento celular y la producción de virus / vacunas virales: cuestiones de seguridad de los productos animales utilizados en medios sin suero. *Dev Biol (Basilea)* 2002; 111: 233-57.
2. Rourou, S., et al. Medio libre de componentes animales que promueve el crecimiento de varias líneas de células animales para la producción de vacunas virales. *Vacunas* 2014; 32 (24): 2767-9.
3. Rabia, Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para Animales Terrestres (Mamíferos, Aves y Abejas) 8a Edición 2018.

Germany

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen
Phone +49 551 308 0

Argentina

Sartorius Argentina S.A
Cuyo 2889
Martínez, Buenos Aires, B1640GIQ
Teléfono: +54 11 3989 8710

México

Sartorius de México
Libramiento Norte
Tepotzotlán, 54605
Teléfono: +52 55 5562 1102



Para más contactos, visite

<https://www.sartorius.com/en/products-es>