

21 de Abril, 2020

Palavras-chave ou frases:

Células BHK-21, meio quimicamente definido, suspensão, vacina veterinária

Meio 4Cell[®]BHK-21 CD

Adaptação de células BHK-21 à suspensão usando meio quimicamente definido

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

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

2. Sartorius Stedim North America Inc., 545 Johnson Avenue, Bohemia, Nova Iorque 11716, Estados Unidos

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

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

* Correspondência

E-Mail: Info_CellCultureMedia@sartorius.com

Resumo

As células BHK-21 têm sido utilizadas por vários anos, como uma plataforma para vacinas veterinárias e fabricação de proteína recombinante. No entanto, essas células são dependentes de ancoragem, exigindo o uso de agentes de dissociação que atrasam o processo downstream, e são traumáticas para as células, ao mesmo tempo que criam limitações de escalonamento. Em contraste, a cultura em suspensão facilita processos em larga escala, oferece opções para intensificação do processo e contribui para a redução dos custos de fabricação devido à menor complexidade do processo. Desta forma, o cultivo de células BHK-21 em suspensão, utilizando-se meio de cultura quimicamente definido e livre de soro para a produção de alta titulação viral é desejável no desenvolvimento de vacinas com preços acessíveis em todo o mundo.

Embora algumas linhagens celulares usadas na produção de vacinas ainda exijam suplementação de soro, as culturas de BHK-21 demonstraram ser propagadas em meio sem soro. O desejo de remover potenciais contaminantes não controlados, produtos naturais e subprodutos da cultura, levou ao desenvolvimento de meios mais complexos. Esses meios quimicamente definidos demonstraram que o soro poderia ser omitido, sem adaptação celular, se modificações nutricionais e hormonais apropriadas fossem feitas.

Neste estudo, adaptamos com sucesso células BHK-21 dependentes de soro e de adesão para suspensão em um meio Sartorius quimicamente definido (CD), sem soro. Isso foi desenvolvido para um desempenho mais consistente, purificação mais fácil e posterior processamento, que atende aos requisitos regulamentares e permite a produção de vacinas com custo reduzido

Saiba mais: www.sartorius.com

Introdução

O objetivo deste estudo de aplicação é avaliar o desempenho do meio 4Cell® BHK-21 quimicamente definido durante a adaptação gradual de uma linhagem celular BHK-21 de aderência ao crescimento em suspensão.

As linhagens celulares BHK-21 têm sido amplamente utilizadas há anos como uma plataforma para a fabricação de vírus e proteínas. Historicamente, as células BHK-21 foram comumente cultivadas em meios contendo soro, no entanto, o soro pode levar à variabilidade no desempenho celular, devido à variação lote a lote, bem como à presença de agentes adventícios indefinidos.

Recentemente, o uso de soro também levantou preocupações regulatórias, devido ao aumento do potencial de contaminação em produtos de saúde. Essas preocupações com a contaminação estimularam a recomendação da indústria farmacêutica de eliminar o soro (e todas as outras matérias-primas indefinidas, quando possível) na produção de produtos biológicos para terapia ou vacinas [1, 2].

Para tratar dessas questões regulatórias, a Sartorius desenvolveu um meio quimicamente definido de origem não animal (NAO | xeno-free). Em comparação com outras alternativas de meios livres de soro e de origem animal, esta formulação mostrou aumentar a produção celular e viral em células BHK-21 adaptadas à suspensão.

Materiais e métodos

Materiais

Consumíveis

- Frasco Corning®:T-25
- Frascos shaker Erlenmeyer de policarbonato Corning®: 125 mL e 250 mL
- Corning®:tubo centrífugo Falcon™ Conical 50 mL
- Corning®: tubo centrífugo Falcon™ Conical 15 mL
- Meio de cultura:
- Sartorius: meio 4 Cell®BHK-21 CD (Cat: CFV3FA0001, Lote: MSC11001P)
- Sigma: DMEM (Cat: D5523, Lote: SLBS0097V)
- Gibco: FCS (Origem América do Sul, Lote: 10270-098, Ref: 42G9551 K)

Linhagem celular

- BHK-21 (Clone 13 - ATCC®CCL-10™)

Equipamentos

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



Fig 1. BIOSTAT®A usado para o cultivo de células em suspensão BHK-21 e meio 4Cell® BHK-21 CD.

Método

▪ Contagem celular:

A concentração celular e a viabilidade foram determinadas usando um Vi-CELL™ (Beckman Coulter) para fornecer exclusão automática de corante azul de tripano.

▪ Análise de crescimento celular:

As células foram cultivadas em frascos shaker de 125 mL com fundo plano de tampa plana. A inoculação foi feita a 3×10^5 células viáveis / mL com volume de trabalho de 25 mL. Os cultivos foram realizados a $36,5^\circ\text{C}$ com uma frequência de agitação inicial de 125 rpm, 7% de CO_2 em uma atmosfera umidificada.

Os experimentos de crescimento celular também foram realizados em biorreatores Biostat®A. A inoculação foi feita a 3×10^5 células viáveis / mL com 1 L de volume de trabalho. Os cultivos foram realizados a $36,5^\circ\text{C}$ com uma taxa de agitação inicial de 100 rpm, pH 7,2, $\text{Ar} / \text{N}_2 / \text{CO}_2$ no headspace, O_2 no aspersor, ponto de ajuste DO 50%.

▪ Produção de vírus da Raiva:

Cepas do vírus da raiva BHK-21 (adaptado ao clone BHK-21 13 - ATCC® CCL-10™ cultivado em monocamada) foram fornecidos pela Universidade de Ankara. O vírus foi cultivado em suspensão em meio 4Cell® BHK-21 CD para avaliar a produção de vírus. As células em suspensão BHK-21 (7×10^6 células / mL) foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 em frascos de agitação de 125 mL (volume de trabalho de 25 mL).

O Ensaio de Foco Fluorescente (AAF) foi realizado conforme descrito no Manual Terrestre [3]. Resumidamente, células BHK-21 Clone 13 - ATCC® CCL-10™ produzidas em placas de 96 poços por 24 horas foram infectadas com diluição de vírus de 10 vezes (50 μl por poço) em quartuplicata. As células infectadas incubadas por 72 horas foram fixadas e marcadas com conjugado FITC anti-raiva. O teste foi avaliado após através de microscopia por fluorescência, levando-se em consideração a área total do poço.

Adaptação gradual das células BHK-21 às condições de suspensão no meio 4Cell® BHK-21 CD:

As etapas a seguir ajudam para uma adaptação bem-sucedida:

- Garanta um bom crescimento das células em seu meio padrão (contendo, por exemplo, 10% de soro fetal de bezerro - FCS) em seu procedimento de cultivo padrão.
- Altere as condições de crescimento. Adapte as células às condições de crescimento em suspensão no mesmo meio.
- Altere o meio. Transfira células de sua referência do seu meio de cultura atual 4Cell® BHK-21 CD.
- Reduza a suplementação com FCS de maneira gradual.
- Diminua a concentração de células de inóculo.

- Execute a cultura de estoque por tempo suficiente sob a nova condição padrão.

Garanta um bom crescimento celular:

- Após o descongelamento, as células BHK-21 aderentes foram passadas no mínimo quatro vezes para garantir um desempenho consistente. Posteriormente, cinco frascos T175 cm^2 (volume de trabalho de 35 mL) foram inoculados com 1×10^4 a 2×10^4 células / cm^2 e cultivados até a confluência por três a quatro dias, para preparar a adaptação da suspensão.

Alterar as condições de crescimento:

- Após o crescimento até a confluência, as células BHK-21 dos cinco frascos T175 foram reunidas e centrifugadas a 1000 rpm (rotações por minuto) durante quatro minutos à temperatura ambiente. O pellet celular foi ressuscitado em 20 mL de DMEM com 10% de FCS a uma concentração entre $0,8 \times 10^6$ a $1,2 \times 10^6$ células viáveis / mL (volume de trabalho 20 mL). As células foram transferidas para um frasco de agitação de 125 mL e cultivadas por três dias sob agitação (125 rpm) a $36,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ e 7% de CO_2 .

Troque o meio:

- Após a cultura, as células foram centrifugadas por quatro minutos a 1000 rpm e ressuscitadas em 5 mL de sobrenadante suplementado com 20 mL de meio 4Cell® BHK-21 CD + 10% FCS (25 mL de volume de trabalho total) para manter uma concentração de células de inoculação entre $0,8 \times 10^6$ a $1,2 \times 10^6$ células viáveis / mL. O objetivo das passagens subsequentes era manter entre $0,8 \times 10^6$ a $1,2 \times 10^6$ células viáveis / mL em frascos de agitação de 250 mL com volume de trabalho de 50 mL. Após a centrifugação, o pellet foi ressuscitado em 10 mL de meio condicionado, e complementado com 35 mL de meio 4Cell® BHK-21 CD e 5 mL de FCS.

Reduza o FCS de maneira gradual:

- Para reduzir a concentração sérica, as células devem dobrar consistentemente, no mínimo, a cada dois a três dias por três passagens sucessivas. Após passagem bem-sucedida no meio 4Cell® BHK-21 CD com 10% (v/v) de soro FCS, o nível de concentração foi reduzido gradualmente (ou seja, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% e 0% de soro FCS), mantendo concentração de inoculação entre $0,8 \times 10^6$ a $1,2 \times 10^6$ células viáveis / mL em um volume de trabalho de 50 mL.

Diminuir a concentração de células de inóculo:

- Após uma adaptação bem-sucedida às condições de suspensão e sem soro, a concentração de células de inoculação foi gradualmente reduzida (ou seja, 8, 6, 4 e 3×10^5 células / mL) quando a concentração de células dobrou em dois a três dias. Quando as células atingiram

uma taxa de crescimento constante (viabilidade > 90%) para várias passagens no meio 4Cell® BHK-21 CD a uma densidade de inoculação de 3×10^5 células / mL, a adaptação foi considerada bem-sucedida (consulte o diagrama de fluxo).

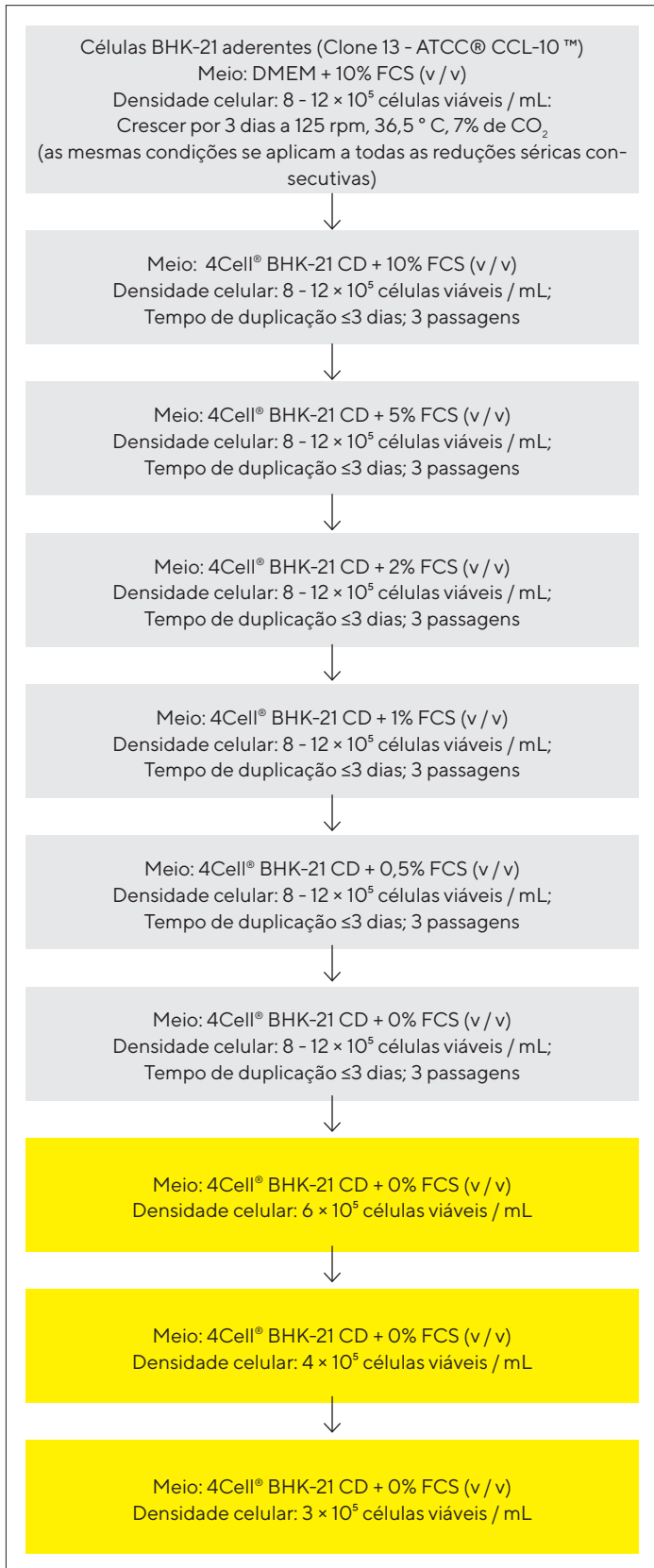


Figura 2. Diagrama de fluxo para adaptação da célula aderente BHK-21 para meio 4Cell® BHK-21 CD sem soro quimicamente definido.

Resultados e discussão

1. Estabilidade de suspensão

Células BHK-21 após adaptação passo a passo do cultivo aderente com soro, para condições de cultura sem soro em suspensão no meio 4Cell® BHK-21 CD (ver métodos), as células foram avaliadas quanto à sua estabilidade. As células no meio 4Cell® BHK-21 CD foram subcultivadas por mais de 20 passagens (Figura 3, n = 2).

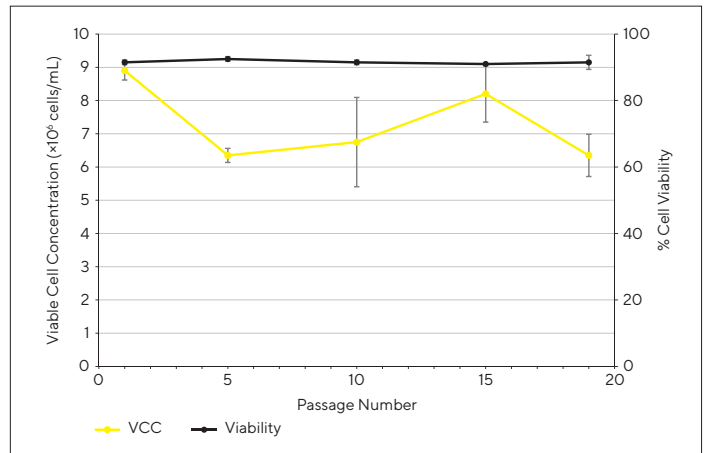


Fig. 3: Estabilidade de células BHK-21 em meio Sartorius 4Cell® BHK-21 CD. As células são estáveis no meio até mais de 20 passagens (n = 2). VCC = concentração de células viáveis.

Ao longo de 20 passagens de BHK-21, as células alcançaram consistentemente uma média de $6,5 \times 10^6$ células viáveis / mL e mais de 90% de viabilidade em meio 4Cell® BHK-21 CD Medium.

2. Crescimento da suspensão

O meio de cultura 4Cell® BHK-21 CD suporta o crescimento rápido para densidades mais altas (VCC 7×10^6 células viáveis / mL), quase seis vezes, em comparação com o meio de referência sem soro NAO (origem não animal), como mostrado em Figura 4. Ao longo de quatro dias de crescimento do lote, as células mantiveram consistentemente uma viabilidade acima de 80%.

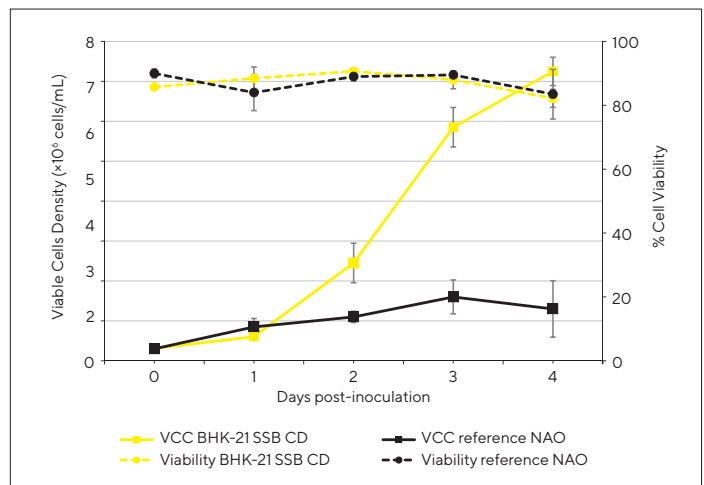


Fig. 4: O meio 4Cell® BHK-21 CD suporta o crescimento rápido para altas densidades em comparação com um meio de referência sem soro e de origem não animal em biorreatores Biostat® A (n = 3).

3. Produtividade do vírus da raiva

Para avaliar a produtividade do vírus, as células BHK-21 adaptadas à cultura em suspensão no meio 4Cell® BHK-21 CD foram infectadas com 0,01 MOI do vírus da raiva de referência, e a infecção continuou até que a densidade de células viáveis atingisse menos de 20%. O sobrenadante foi coletado e analisado por ensaio de anticorpo fluorescente. Os dados iniciais obtidos resultaram em uma titulação viral de igual a 7×10^4 FFU / mL (dados não mostrados). Os resultados precisam ser reproduzidos para obter dados estatisticamente relevantes.

Conclusão

O soro usado na indústria biofarmacêutica fornece uma infinidade de benefícios em muitos processos com sua composição única de fatores de crescimento e componentes auxiliares. Embora o uso de soro traga muitos benefícios, ele também tem sua parcela de desafios. O maior está na qualidade e consistência do produto (por exemplo, variação de lote a lote, qualidade, origem, risco de contaminação, etc).

Devido às discrepâncias desconhecidas com o uso de soro, a triagem de rotina ou micoplasma e vírus também se tornou importante. O risco associado a qualquer um desses contaminantes pode influenciar negativamente a cultura, implicando falsamente nas adequações do meio ou, em cenários de pior caso, alterando o produto final apresentando problemas de segurança para uso clínico.

Como resultado, a indústria mudou para a origem não animal, materiais quimicamente definidos e meios de comunicação. O meio Sartorius 4Cell® BHK-21 CD oferece essa alternativa.

Este estudo testou a robustez e a eficiência da adaptação de células BHK-21 aderentes à suspensão e subsequente crescimento em meio 4Cell® BHK-21 CD quimicamente definido e sem soro. A adaptação de células BHK-21 aderentes a este meio permitiu um aumento de escala do processo mais fácil, e foi capaz de suportar o crescimento celular a altas densidades e viabilidade, com resultados iniciais sugerindo que o meio 4Cell® BHK-21 CD pode fornecer uma opção viável para a produção de alta titulação de vírus da raiva.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Florabio (Turquia) por realizar os experimentos de adaptação do BHK-21 neste estudo. Eles também agradecem ao Dr. Aykut Özkul (Universidade de Ancara) pelo estudo de avaliação do vírus.

Referências


1. The Merten OW. Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines: safety issues of animal products used in serum-free media. *Dev Biol (Basel)* 2002; 111: 233-57.
2. Rourou, S., et al. An animal-component-free medium that promotes the growth of various animal cell lines for the production of viral vaccines. *Vaccine* 2014; 32(24): 2767-9.
3. Rabies, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)* 8th Edition 2018.

Brazil

Sartorius do Brasil Ltda
Avenida Senador Vergueiro, 2962
São Bernardo do Campo, SP
Cep 09600 004
Tel.: +55 11 4362 8900

USA

Sartorius Stedim North America Inc.
565 Johnson Avenue
Bohemia, NY 11716
Toll-Free +1 800 368 7178

 Para mais contatos, visite
www.sartorius.com