

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN DENGUE SỐNG GIẢM ĐỘC LỰC TRÊN NUÔI CẤY TẾ BÀO VERO Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

*Đỗ Tuấn Đạt\*; Hoàng Anh Đức\*  
Hoàng Đức Lộc\*; Nguyễn Thu Vân\**

### TÓM TẮT

Nghiên cứu và thử nghiệm tất cả công đoạn của quy trình sản xuất vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào Vero nhằm tìm ra điều kiện tối ưu và thông số ổn định đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Một số nghiên cứu quan trọng được tiến hành để tìm quy trình sản xuất phù hợp nhất như: xác định điều kiện nuôi cấy virus và số mẻ gặt đơn cần thiết để thu hoạch lượng virus tối ưu; tìm hiểu thông số ổn định cho quá trình tinh sạch, cô đặc và tinh chế virus. Kết quả này sẽ là căn cứ để xây dựng một quy trình công nghệ sản xuất ổn định và tối ưu nhất tại Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1.

\* Từ khoá: Vắc xin dengue; Quy trình công nghệ; Tế bào Vero.

## ESTABLISHMENT OF PROCEDURE FOR VERO CELL LIVE ATTENUATED DENGUE VACCINE PRODUCTION IN LABORATORY SCALE

### SUMMARY

*All steps of the procedure for Vero cell dengue vaccine production have been researched in order to find optimal conditions with consistent parameters for best quality products. Several pivotal researches have been done for finding the most suitable production procedure such as research for determination of condition and number of single harvests for optimal virus yield; research for finding of clarification, concentration and purification procedures. The results will be the basics for establishment of the most consistent and optimal vaccine production procedure at the Company for Vaccine and Biological Production No 1.*

\* Key words: Dengue vaccine; Technological process; Vero cell.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dengue đang trở thành một vấn đề đáng lo ngại đối với kinh tế, xã hội và y tế công cộng. Ước tính hiện nay, virus dengue lưu hành ở hơn 120 quốc gia, 3,6 tỷ người (gần 55% dân số thế giới) có nguy cơ lây

nhiễm và 70 - 500 triệu ca nhiễm; 2,1 triệu ca bệnh nặng (sốt xuất huyết dengue/hội chứng sốc dengue), 21 ngàn ca tử vong mỗi năm. Miền Trung và Nam Mỹ, một phần vùng Caribê và Đông Nam Á cũng như Tây Thái Bình Dương là vùng dịch tễ và siêu dịch tễ của virus dengue [5]. Việc cho ra đời và

\* Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1, Hà Nội

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Đoàn Huy Hậu

sử dụng rộng rãi vắc xin dengue an toàn và hiệu quả cùng với cố gắng trong giáo dục cộng đồng, tuyên truyền biện pháp bảo vệ cá nhân và kiểm soát vector là những việc làm thiết thực để giảm thiểu gánh nặng của căn bệnh này.

Cách đây hơn 70 năm, những nghiên cứu ban đầu để phát triển vắc xin dengue được tiến hành thông qua thử nghiệm huyết thanh người nhiễm xử lý với mật bò hoặc virut trong muối sống, được bất hoạt bằng formalin để phòng ngừa lây truyền virut. Các nghiên cứu sau này phát triển và thử nghiệm vắc xin sống giảm độc lực dự tuyền bằng cách cấy truyền liên tiếp trên tế bào. Cuối những năm 1980, hướng tiếp cận mới trong phát triển vắc xin dengue là gây đột biến gen trực tiếp để giảm độc lực chủng dengue và phát triển khảm gen prM và E từ một tít dengue vào thân của virut dengue hoặc các flavivirus khác đã được giảm độc lực hoàn toàn. Kết quả, một số vắc xin dự tuyền mới được đánh giá tiền lâm sàng không chỉ trên chuột và các loài linh trưởng mà còn trên người ở giai đoạn 1 và 2 [4, 5].

Công nghệ sản xuất vắc xin dengue sống giảm độc lực được nghiên cứu và phát triển tại Công ty Vắc xin và Sinh phẩm số 1, là công nghệ sử dụng dòng tế bào thường trực Vero để nhân nuôi cả 4 tít virut giảm độc lực bằng các công nghệ tái tổ hợp gen trên virut dengue (rDEN1, rDEN2, rDEN3 và rDEN4) tiếp nhận từ Viện Sức khỏe Hoa Kỳ (NIH) [2, 3]. Nhóm nghiên cứu đã tham khảo, tìm hiểu quy trình sẵn có, đồng thời đưa ra nhiều cải tiến mới với mục tiêu: *Tìm ra điều kiện tối ưu nhất với các thông số ổn định, đảm bảo chất lượng sản phẩm ở từng bước của quy trình sản xuất. Từ đó, xây dựng quy trình sản xuất vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào Vero tại Việt Nam có chất lượng, hiệu suất và thực tiễn cao.*

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp nghiên cứu bao gồm: các bước của quy trình sản xuất và phương pháp nhằm đánh giá chất lượng của sản phẩm sau mỗi bước của quy trình sản xuất này.

### 1. Quá trình nuôi cấy và chuẩn bị tế bào Vero.

Tế bào Vero đời 137 từ điều kiện bảo quản của ngân hàng tế bào sản xuất được cấy chuyển đến đời 142 bằng môi trường MEM có chứa huyết thanh bê. Xác định hình thái và số lượng tế bào trên bề mặt chai nuôi cấy bằng phương pháp quan sát dưới kính hiển vi đảo pha và đếm số lượng tế bào.

### 2. Quy trình gây nhiễm virut vào tế bào Vero.

Gây nhiễm chủng virut dengue sản xuất vào chai nuôi cấy tế bào đời 142 sau khi tế bào kín một lớp. Các điều kiện gây nhiễm khác nhau bao gồm: liều lượng, thời gian nhiệt độ hấp phụ virut vào tế bào. Quan sát tế bào và phương pháp xác định hiệu giá virut sau nuôi cấy sẽ giúp đánh giá hiệu quả các điều kiện gây nhiễm khác nhau. Cả 4 chủng virut thuộc 4 tít dengue khác nhau được gây nhiễm riêng để tìm hiểu điều kiện gây nhiễm cho từng chủng.

### 3. Quy trình nuôi cấy virut và thu hoạch nước nổi.

Sản phẩm của quy trình này là virut dengue thuộc các tít khác nhau, do vậy, việc đánh giá điều kiện nuôi cấy và thu hoạch nước nổi khác nhau dựa vào phương pháp xác định hiệu giá virut dengue sống giảm độc lực - phương pháp nhuộm miễn dịch xác định đám hủy hoại (immunostain plaque) sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho từng tít. Đánh giá thông số của quy trình

nuôi cấy bao gồm: nhiệt độ nuôi cấy, ngày thay môi trường duy trì và số mẻ gặt đơn.

#### **4. Quy trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt virus.**

Sau khi ly tâm, lọc và cô đặc sẽ tìm hiểu hiệu quả thu hoạch virus. Xác định hiệu giá virus (PFU/ml) theo phương pháp nhuộm miễn dịch xác định đám hoại tử.

#### **5. Quy trình tinh chế virus.**

Mục đích của quy trình này là loại bỏ tối đa các thành phần protein tạp từ tế bào và môi trường nuôi cấy cũng như AND tồn dư của tế bào Vero có trong hỗn dịch virus sau thu hoạch. Phương pháp tinh chế virus bao gồm: cắt axit nucleic và siêu lọc. Điều kiện để cắt axit nucleic và siêu lọc như nồng độ men, thời gian và nhiệt độ cắt men, pH dung dịch đệm sẽ được nghiên cứu và đánh giá nhằm tìm phương pháp tinh chế virus dengue hiệu quả nhất. Phương pháp xác định hiệu giá virus và hàm lượng ADN tế bào tồn dư và điện di mẫu trên gel SDS-PAGE được sử dụng để đánh giá hiệu suất và độ tinh sạch của virus sau tinh chế.

#### **6. Quy trình pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm.**

Đánh giá công thức pha bán thành phẩm cuối cùng với nồng độ của từng týp virus dengue, từng thành phần trong đệm đông khô qua kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm, đặc biệt, công hiệu của vắc xin và xác định độ ẩm tồn dư.

### **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN**

Đánh giá và nhận định đều dựa trên kết quả nghiên cứu từng quá trình trung gian, từ đó tìm ra quy trình sản xuất tổng thể tối ưu nhất.

#### **1. Quy trình nuôi cấy và chuẩn bị tế bào Vero.**

Quá trình này phải tuân thủ theo đúng các hướng dẫn về nuôi cấy tế bào cho sản xuất vắc xin. Tế bào Vero cấy chuyển từ đời bảo quản trong ngân hàng tế bào sản xuất - đời 137 đến đời 142, đời cấy chuyển cuối cùng trước khi gây nhiễm virus. Đếm số lượng tế bào trong từng chai nuôi cấy và quan sát tế bào kín 1 lớp dưới kính hiển vi đảo pha. Lượng tế bào trong các đời cấy chuyển sau thường tăng gấp 6 lần so với đời cấy chuyển trước (từ  $1,4 \times 10^7$  tế bào ở đời 138 đến  $2 \times 10^{10}$  tế bào ở đời 142). Đây là lượng nhân nuôi tối đa đạt được đối với dòng tế bào Vero (theo nhiều nghiên cứu trước đây đã tiến hành) [1].

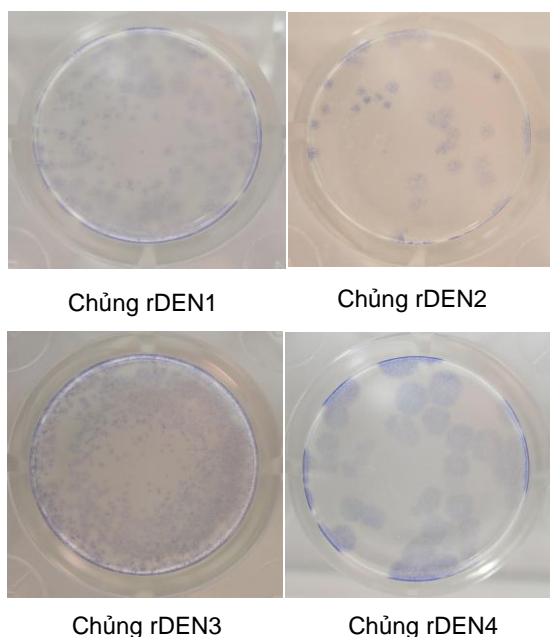
#### **2. Quy trình gây nhiễm virus vào tế bào Vero.**

Nghiên cứu xác định liều lượng gây nhiễm tối ưu cho các chủng virus dengue là 0,01 MOI, với thời gian hấp phụ 1 giờ, ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$ . Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Viện Sức khỏe Hoa Kỳ [2, 3].

#### **3. Quy trình nuôi cấy virus và thu hoạch nước nổi.**

Các thông số được đề cập đến trong quá trình nuôi cấy và thu hoạch virus như: nhiệt độ nuôi cấy, ngày dự định thu hoạch virus và số mẻ gặt đơn cần thiết được xác định đối với từng týp virus dengue khác nhau. Xác định hiệu giá virus (PFU/ml) theo phương pháp nhuộm miễn dịch xác định đám hủy hoại. Đây là chỉ số quan trọng nhất để đánh giá hiệu quả của quy trình này [2]. Hình ảnh đám hủy hoại đối với từng chủng virus dengue khác nhau thể hiện trong hình 1. Xác định ngày dự định cho mỗi mẻ gặt đơn virus tương tự ở cả 4 chủng dengue. Mẻ thu hoạch đầu tiên (H1) tiến hành vào ngày thứ 6 sau gây nhiễm virus, sau đó, cứ 3 ngày/lần thu hoạch virus cho đến mẻ gặt đơn thứ 4 (H4). Nhiệt độ nuôi cấy và hiệu giá virus thu được sau mỗi mẻ gặt đơn của

từng chủng virut dengue được trình bày trong bảng 1.



Hình 1: Hình ảnh đám hủy hoại phát hiện bằng phương pháp nhuộm hóa miễn dịch đối với 4 chủng virut dengue.

Bảng 1: Kết quả nuôi cấy và thu hoạch nước nổi đối với các chủng virut dengue khác nhau.

C H N G		rDEN1	rDEN2	rDEN3	rDEN4
Nhiệt độ nuôi cấy virut		37°C	35°C	37°C	37°C
Hiệu giá virut của mẻ gặt đơn (LgPFU/ml)	H1	6,1	6,1	6,3	6,1
	H2	5,0	5,7	5,8	6,4
	H3	5,0	5,6	5,0	6,2
	H4	4,5	5,4	4,5	6,0

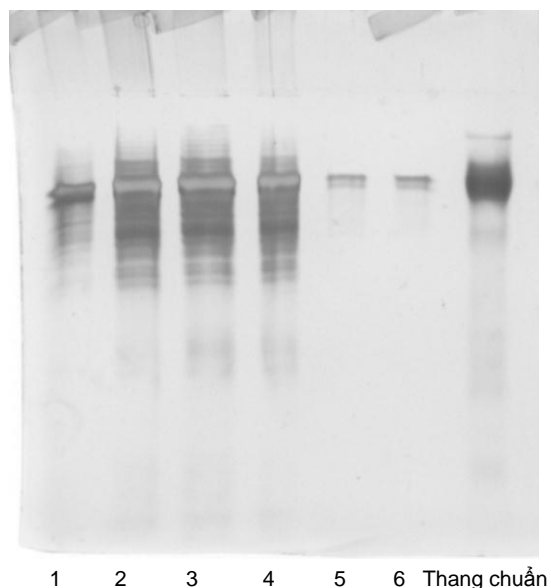
Các mẻ gặt đơn của chủng dengue khác nhau đều có hiệu giá đạt yêu cầu đưa vào sản xuất ở những bước tiếp theo ( $\geq 10^3$  PFU/ml). Sau mẻ gặt cuối cùng, do tế bào bị hủy hoại nhiều nên không thu hoạch tiếp virut được.

**4. Quy trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt virut.**

Sau khi thu hoạch virut, hỗn dịch này được ly tâm để loại trừ xác tế bào, qua lọc để loại trừ thành phần tạp nhỏ hơn. Hỗn dịch sau khi tinh sạch được cô đặc bằng màng siêu lọc. Nghiên cứu cho thấy: màng lọc 0,45  $\mu$ m và màng siêu lọc 300K phù hợp để tinh sạch và cô đặc hỗn dịch virut dengue. Áp dụng các thông số này trong quy trình sản xuất để thu được hỗn dịch virut dengue với hiệu giá cao sử dụng trong những bước tinh chế tiếp theo.

**5. Quy trình tinh chế virut.**

Phương pháp tinh chế được lựa chọn là cắt axit nucleic bằng enzym và loại trừ protein tạp bằng màng siêu lọc. Khảo sát các điều kiện để cắt axit nucleic cũng như siêu lọc để đưa ra thông số tối ưu nhằm thu được virut có hiệu giá cũng như mức độ tinh khiết cao nhất.



1. Hỗn dịch virut sau thu hoạch.
2. Mẫu sau tinh sạch và cô đặc.
- 3, 4. Mẫu sau cắt axit nucleic.
- 5, 6. Mẫu sau siêu lọc tinh chế.

Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm sau tinh chế virut dengue 2 trên gel SDS-PAGE.

Sau khi tinh chế, hầu hết protein tạp của tế bào đã bị loại bỏ. Đồng thời, với phương pháp xác định hàm lượng protein cho thấy lượng protein trong sản phẩm sau tinh khiết giảm rõ rệt so với hỗn dịch virut ban đầu. Sau khi cắt axit nucleic bằng enzym, lượng ADN tế bào Vero tồn dư trong sản phẩm virut tinh khiết chỉ còn từ 0 - 0,1 ng/ml (dữ liệu không công bố). Như vậy, với phương pháp siêu lọc và cắt axit nucleic bằng enzym đã thu được sản phẩm có độ tinh khiết cao. Đồng thời, hiệu giá của chủng virut thu được sau khi tinh chế cũng đạt từ  $10^{4,4}$  -  $10^{6,4}$  PFU/ml, cao hơn nhiều so với hiệu giá yêu cầu của 1 liều tiêm vắc xin ( $10^3$  PFU/ml). Kết quả này cho thấy quy trình nghiên cứu cho sản phẩm có chất lượng và hiệu suất cao.

#### **6. Quy trình pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm.**

Sau khi tinh chế, xác định hiệu giá hỗn dịch virut đơn týp và pha về hàm lượng  $10^3$  PFU/liều tiêm trong đệm đông khô. Trong công thức pha bán thành phẩm vắc xin cuối cùng bao gồm 4 týp virut dengue. Đông khô bán thành phẩm cuối cùng và kiểm tra chất lượng. Kết quả về chất lượng của vắc xin thành phẩm sẽ quyết định công thức pha bán thành phẩm cuối cùng nào là tối ưu nhất (dữ liệu không công bố).

## **KẾT LUẬN**

Tất cả công đoạn của quy trình sản xuất vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào Vero đều được nghiên cứu và thử nghiệm nhằm tìm ra điều kiện tối ưu nhất để có được các thông số ổn định, đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Kết quả này góp phần xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin dengue sống giảm độc lực hoàn chỉnh tại Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. *Đỗ Tuấn Đạt*. Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin đại trên nuôi cấy tế bào Vero ở quy mô phòng thí nghiệm. Đề tài cấp nhà nước KC.10.27/06-10, 2010.
2. *Blaney JE, Durbin A, Murphy BR, Whitehead SS*. Development of live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunology*. 2006, 19 (1), pp.10-32.
3. *Durbin A, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Schmidt AC, Whitehead SS*. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine*. 2011, pp.7242-7250.
4. *Durbin A, Whitehead SS*. Dengue vaccine candidates in development. *Current topics in Microbiology and Immunology*. 2010, 388, pp.129-143.
5. *Thomas SJ, Endy TP*. Vaccine for the prevention of dengue: Development update. *Human Vaccines*. 2011, 7 (6), pp.1-11.

**Ngày nhận bài: 30/10/2012**

**Ngày giao phản biện: 15/11/2012**

**Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012**

