

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮCXIN ĐẠI TRÊN NUÔI CẤY TẾ BÀO VERO Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

**ĐỖ TUẤN ĐẠT, HOÀNG ANH ĐỨC,
PHẠM HƯƠNG LIÊN, NGUYỄN THU VÂN,
Công ty Vắcxin và Sinh phẩm số 1, Hà Nội**

TÓM TẮT

Tất cả các công đoạn của quy trình sản xuất vắc xin đại trên nuôi cấy tế bào Vero đều được nghiên cứu và thử nghiệm nhằm tìm ra các điều kiện tối ưu với các thông số ổn định đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Một số nghiên cứu chủ chốt đã được

tiến hành nhằm tìm ra quy trình sản xuất phù hợp nhất như nghiên cứu nuôi cấy tế bào Vero trên các chai nuôi cấy một tầng và nhiều tầng; Xác định thời gian và số mẻ gặt đơn cần thiết để thu hoạch được lượng vi rút tối ưu; Tìm hiểu các thông số cho quá trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt hỗn dịch vi rút;

Siêu ly tâm trong gradient đường Sucrose để thu các phân đoạn có kháng nguyên vi rút dại tinh khiết. Kết quả của các thay đổi này sẽ là căn cứ để xây dựng một quy trình công nghệ sản xuất ổn định và tối ưu nhất tại Công ty vắc xin và sinh phẩm số 1 (VABIOTECH).

Từ khoá: Quy trình công nghệ, vắc xin dại, tế bào Vero

SUMMARY

All the steps of a procedure for Vero cell rabies 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 suitable production procedure such as research for Vero cell culture in single or multiple level flasks; research for determination of timing and number of single harvests for optimal virus volume; research for finding of clarification, concentration and inactivation procedures, research for collecting purified virus fractions by sucrose gradient ultracentrifugation. The results from those changes will be the basics for establishment of most consistent and optimal vaccine production procedure in Company for vaccine and biological production No 1 (VABIOTECH).

Keywords: Vero cell, vaccine.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dại ở chó là nguồn lây nhiễm chiếm đến 99% sang cho người và là nguy cơ đe dọa tính mạng trên 3,3 tỷ người, chủ yếu tại các nước châu Á và châu Phi. Cùng với chó nuôi tại nhà, nhiều giống thú ăn thịt và dơi cũng có thể làm lây truyền bệnh dại sang cho người. Khi đã có biểu hiện trên lâm sàng, phần lớn các ca bệnh dại đều tử vong [1].

Trên 100 năm trước đây, Louis Pasteur và cộng sự đã phát triển vắc xin dại thô đầu tiên để tiêm phòng sau khi bị cắn dựa trên việc bất hoạt virút trên mô thần kinh. Từ đây trở đi một số loại vắc xin đã được phát triển và sử dụng trên thế giới. Vắc xin thế hệ thứ nhất là các vắc xin sử dụng mô động vật để có được hỗn dịch chứa virút. Các vắc xin này đều đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới cho cả người và động vật. Các vắc xin thế hệ thứ hai là các vắc xin được sản xuất trên nuôi cấy tế bào. Vắc xin sản xuất trên tế bào lưỡng bội người là vắc xin được đưa vào sử dụng đầu tiên vào năm 1967. Vắc xin này có tính an toàn và công hiệu cao do đó được các nước phát triển lựa chọn để tiêm phòng cho người trước và sau khi phơi nhiễm với virút. Với cố gắng tìm ra các vắc xin có giá thành thấp hơn và nhưng đặc tính lại tương đương với vắc xin sản xuất trên tế bào lưỡng bội người, trong những năm gần đây vắc xin tinh khiết trên tế bào phôi gà và vắc xin tinh khiết trên nuôi cấy tế bào Vero đã được phát triển [1,2].

Công nghệ sản xuất vắc xin dại được nghiên cứu và phát triển tại Công ty Vắc xin và sinh phẩm số 1 (VABIOTECH) là công nghệ sử dụng dòng tế bào thường thực Vero để nhân nuôi vi rút dại chủng Pasteur (PV), từ đó tinh chế ra kháng nguyên vi rút

đặc hiệu để pha thành vắc xin [3,4]. Nhóm nghiên cứu đã tham khảo, tìm hiểu quy trình đồng thời đưa ra nhiều cải tiến mới để tìm ra một quy trình sản xuất vắc xin dại trên nuôi cấy tế bào Vero tại Việt Nam có chất lượng, hiệu suất và tính thực tiễn cao.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các phương pháp nghiên cứu bao gồm các bước của quy trình sản xuất và các phương pháp nhằm đánh giá chất lượng của các 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 141 bằng môi trường MEM có chứa huyết thanh bê. Tế bào được xác định hình thái và số lượng trên bề mặt chai nuôi cấy bằng phương pháp quan sát dưới kính hiển vi lộn ngược và đếm số lượng tế bào.

2. Quy trình gây nhiễm vi rút vào tế bào Vero

Chủng vi rút dại sản xuất được gây nhiễm vào hỗn dịch sau khi tách chai nuôi cấy tế bào đời 141. Các điều kiện gây nhiễm khác nhau được nghiên cứu là liều lượng, thời gian và cách thức hấp phụ vi rút vào tế bào. Các phương pháp xác định hiệu giá vi rút sau khi nuôi cấy (xem phần 2.3) sẽ giúp đánh giá hiệu quả của các điều kiện gây nhiễm khác nhau.

3. Quy trình nuôi cấy vi rút và thu hoạch nước nổi

Sản phẩm của quy trình này là vi rút dại do vậy việc đánh giá các điều kiện nuôi cấy vi rút và thu hoạch nước nổi khác nhau được xây dựng dựa trên các phương pháp xác định hiệu giá vi rút dại sống như phương pháp xác định hiệu giá LD50 của vi rút dại trên chuột, phương pháp xác định hiệu giá FFD50 bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, phương pháp định lượng glycoprotein của vi rút dại bằng thử nghiệm ELISA. Các thông số của quy trình nuôi cấy cũng được đánh giá sẽ là: nhiệt độ nuôi cấy, ngày thay môi trường duy trì, số mẻ gạt đơn và điều kiện bảo quản hỗn dịch vi rút sau nuôi cấy

4. Quy trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt vi rút

Quy trình tinh sạch và cô đặc vi rút sẽ tìm hiểu về hiệu quả thu hoạch vi rút sau khi sử dụng các loại màng lọc và cô đặc khác nhau. Quá trình bất hoạt cũng được đánh giá với các hoạt chất và điều kiện bất hoạt khác nhau. Bên cạnh phương pháp định lượng glycoprotein của vi rút dại bằng thử nghiệm ELISA thì phương pháp quan sát hình thể vi rút dưới kính hiển vi điện tử cũng được áp dụng để đánh giá kết quả của các quy trình này. Đặc biệt thử nghiệm xác định tính an toàn đặc hiệu trên chuột sẽ giúp đánh giá xem liệu vi rút dại đã được bất hoạt hoàn toàn hay chưa.

5. Quy trình tinh chế vi rút

Vi rút dại được tinh chế bằng phương pháp siêu ly tâm trong gradient đường sucrose. Các cách thức siêu ly tâm khác nhau sẽ được nghiên cứu và đánh giá để tìm ra một phương pháp tinh chế vi rút dại hiệu quả nhất. Phương pháp định lượng glycoprotein của vi rút dại bằng thử nghiệm ELISA, định lượng protein bằng

phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 280nm, xác định 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 vi rút sau tinh chế.

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

Công thức pha bán thành phẩm cuối cùng và chất lượng của vắc xin sau khi đông khô được đánh giá qua các kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm đặc biệt là công hiệu của vắc xin trên chuột và xác định độ ẩm tồn dư.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

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

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

Quá trình nuôi cấy này phải tuân thủ theo đúng các hướng dẫn về nuôi cấy tế bào cho sản xuất vắc xin. Tế bào Vero sẽ được cấy chuyển từ đời bảo quản trong ngân hàng tế bào sản xuất - đời 137 đến đời 141, đời cấy chuyển cuối cùng trước khi được gây nhiễm vi rút. Đếm số lượng tế bào trong từng chai nuôi cấy và quan sát tế bào kín 1 lớp dưới kính hiển vi lộn ngược được xem là cách thức để đánh giá chất lượng của tế bào sau khi nuôi cấy (dữ liệu không công bố). Các nghiên cứu đã xác định được số lượng chai tế bào, loại chai tế bào (1 tầng hay nhiều tầng) qua từng đời cấy chuyển, số ngày nuôi cấy cần thiết để đạt được số lượng tế bào nhiều nhất cho sản xuất vắc xin.

2. Quy trình gây nhiễm vi rút vào tế bào Vero

Các yếu tố ảnh hưởng đến quy trình gây nhiễm vi rút đại vào tế bào Vero là liều lượng vi rút, thời gian hấp phụ và cách thức hấp phụ vi rút đại vào tế bào Vero. Kết quả nghiên cứu (dữ liệu không công bố) đã đưa ra liều lượng gây nhiễm tối ưu là 0,01 MOI với thời gian hấp phụ ít nhất là 15 phút và vi rút được hấp phụ vào hỗn dịch tế bào sau khi tách chai nuôi cấy đời 141.

3. Quy trình nuôi cấy vi rút và thu hoạch nước nổi

Các thông số được đề cập đến trong quá trình nuôi cấy và thu hoạch vi rút là nhiệt độ nuôi cấy, ngày dự định thay môi trường duy trì và gặt vi rút, số mẻ gặt đơn cần thiết và nhiệt độ bảo quản hỗn dịch vi rút sau thu hoạch.

Bảng 1. Kết quả thu hoạch vi rút đại theo thời gian nuôi cấy

Ngày sau khi thay môi trường duy trì	Hình ảnh tế bào	Hiệu giá vi rút	
		Trên chuột (LD50/ml)	Miễn dịch huỳnh quang (FFD50/0,05ml)
1	Đều, kín một lớp	10-6,0	10-4,86
2	Đều, kín một lớp	10-6,0	10-4,71
3	Đều, kín một lớp	10-6,75	10-4,0
4	Đều, kín một lớp	10-5,88	10-3,71
5	Đều, kín một lớp	10-5,33	10-3,89
6 (thay môi trường)	Đều, kín một lớp	10-5,96	10-4,19

7	Đều, kín một lớp	10-5,13	10-3,89
8	Co nhỏ, rụng ít	10-5,88	10-4,71
9	Co nhỏ, rụng ít	10-5,88	10-4,94
10 (thay môi trường)	Co nhỏ, rụng ít	10-6,13	10-4,25
11	Co nhỏ, rụng ít	-	10-4,0
12	Co nhỏ, rụng ít	-	10-4,4
13 (thay môi trường)	Co nhỏ, rụng ít	10-6,0	10-4,13
14	Rụng còn thừa thớt	-	10-3,13
15	Rụng còn thừa thớt	-	10-4,0
16	Rụng còn thừa thớt	10-5,0	10-3,67
17 (thay môi trường)	Rụng còn thừa thớt	10-5,67	10-2,4
18	Rụng còn thừa thớt	-	10-3,19
19	Rụng còn thừa thớt	-	10-3,58
20	Rụng còn thừa thớt	10-4,5	10-3,0

Theo Bảng 1, sau khi chuyển sang môi trường duy trì, đỉnh hiệu giá vi rút trên chuột đạt được cao nhất vào ngày thứ 3, sau đó tiếp tục được lập lại vào ngày thứ 6. Theo dõi ở các ngày tiếp theo cũng cho thấy đỉnh hiệu giá vi rút được lập lại từ 3-4 ngày sau khi thay môi trường nuôi cấy mới và dự tính sau ngày thứ 17-18 hiệu giá vi rút sẽ giảm xuống dưới 10-5,5 LD50/ml, không thích hợp để đưa vào sản xuất trong các bước tiếp theo. Như vậy, giống với kết quả có được từ nhiều nghiên cứu của các quy trình sản xuất khác, thời gian thay môi trường duy trì để nhân nuôi vi rút đại thường là 3-4 ngày/lần và số lần thu hoạch tối đa sẽ là 5-6 mẻ gặt đơn [3,5].

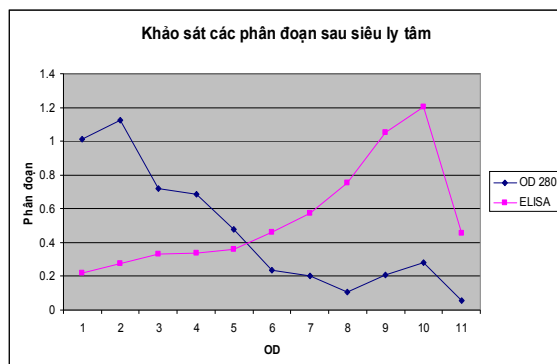
4. Quy trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt vi rút

Sau khi thu hoạch được vi rút, hỗn dịch này sẽ được ly tâm để loại trừ xác tế bào và qua lọc để loại trừ các thành phần tạp nhỏ hơn. Hỗn dịch sau khi tinh sạch được cô đặc và bất hoạt. Các nghiên cứu được tiến hành nhằm lựa chọn các thông số tối ưu cho các quá trình này (dữ liệu không công bố). Kết quả thu được cho thấy màng lọc 0,45µm và màng siêu lọc 100K là phù hợp để tinh sạch và cô đặc hỗn dịch vi rút đại. Hóa chất β-propiolactone (BPL) với nồng độ cuối là 1/4000 đã được lựa chọn để bất hoạt vi rút đại. Sản phẩm của quy trình bất hoạt này đã được kiểm tra tính an toàn đặc hiệu trên chuột đồng thời theo dõi hình thể và đặc tính kháng nguyên của vi rút bằng kính hiển vi huỳnh quang và thử nghiệm ELISA phát hiện glycoprotein của vi rút đại. Do vậy, các thông số này sẽ được áp dụng trong quy trình sản xuất để có được hỗn dịch vi rút đại với hiệu giá kháng nguyên cao và bất hoạt sử dụng trong quá trình tinh chế tiếp theo.

5. Quy trình tinh chế vi rút

Phương pháp tinh chế được lựa chọn là siêu ly tâm trong gradient đường sucrose. Việc khảo sát các phân đoạn sau siêu ly tâm sẽ chọn ra các nồng độ đường sucrose và các thông số siêu ly tâm (thời

gian, số vòng quay...) tối ưu nhằm thu được kháng nguyên vi rút có hàm lượng cũng như mức độ tinh khiết cao nhất. Các kết quả nghiên cứu quy trình tinh chế vi rút được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Kết quả siêu ly tâm tinh chế hỗn dịch vi rút. Theo kết quả trong Hình 1 sau siêu ly tâm, các phân đoạn cuối 8, 9 và 10 là các phân đoạn có hiệu giá kháng nguyên vi rút cao được xác định bằng phương pháp ELISA đồng thời ít lẫn với các protein tạp khác (giá trị OD280 thấp và chủ yếu là các vạch protein đặc hiệu trên gel SDS-PAGE). Cùng với các kết quả xác định hàm lượng ADN tế bào tồn dư và hình ảnh vi rút sau tinh chế dưới kính hiển vi điện tử đã cho thấy siêu ly tâm trong gradient đường sucrose cho kháng nguyên vi rút có độ tinh khiết cao thích hợp để pha chế thành vắc xin [3].

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

Sau khi tinh chế, kháng nguyên vi rút được pha với các công thức pha khác nhau đặc biệt là các thay đổi trong thành phần của đệm đông khô (nồng độ albumin huyết thanh người). Kết quả kiểm tra chất lượng 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). Công thức pha lựa chọn sẽ được áp dụng vào trong quy trình sản xuất vắc xin đại trên nuôi cấy tế bào Vero.

KẾT LUẬN

Tất cả các công đoạn của quy trình sản xuất vắc xin đại trên nuôi cấy tế bào Vero đều được nghiên cứu và thử nghiệm nhằm tìm ra điều kiện tối ưu nhất có được các thông số ổn định đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Một số nghiên cứu chủ chốt đã được tiến hành để làm cơ sở xây dựng lên một quy trình công nghệ sản xuất hoàn chỉnh tại Công ty Vắc xin và sinh phẩm số 1.

Nuôi cấy tế bào Vero trên các chai nuôi cấy một tầng và nhiều tầng.

Xác định thời gian và số mẻ gặt đơn cần thiết để thu hoạch lượng vi rút tối ưu.

Tim hiểu các thông số cho quá trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt hỗn dịch vi rút.

Siêu ly tâm trong gradient đường Sucrose để thu các phân đoạn có kháng nguyên vi rút đại tinh khiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO. WHO position paper on rabies vaccines. *Weekly epidemiological record*, 2007, 82, 425-436.
2. WHO. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. *WHO Expert Committee on Biological Standardization*, 2005, Annex 2.
3. Montagnon B., Faget B. Purified Vero cell vaccine for human. In: Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H. *Laboratory techniques in rabies*, 4th ed. Geneva, WHO, 1996, 285-289.
4. Perez O., Paolazzi C.C. Production methods for rabies vaccine. *J. Industrial. Micro. Biotech.*, 1997, 18, 340-347.
5. Frazzatti-Gallina N. M., Mourao-Fuches R. M., Paoli R. L., Silva M.L. N., Miyaki C., Valentini E. J. G., Raw I., Higashi H. G. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*, 2004, 23, 511-517.