

SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM VẮXIN DENGUE SỐNG GIẢM ĐỘC LỰC TRÊN TẾ BÀO VERO Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

ĐỖ TUẤN ĐẠT, HOÀNG ANH ĐỨC, HOÀNG ĐỨC LỘC, NGUYỄN THU VÂN

Công ty TNHH MTV Vắcxin và Sinh phẩm số 1

Sau khi xây dựng được quy trình công nghệ ở quy mô phòng thí nghiệm, các loạt thử nghiệm vắc xin dengue sống giảm độc lực tứ giá trên tế bào Vero đã được sản xuất ra đạt yêu cầu chất lượng tại cơ sở. Đối với mỗi công đoạn của quá trình sản xuất đều phải tiến hành ít nhất trên 3 loạt liên tiếp để thẩm định về chất lượng sản phẩm và tính ổn định của quy trình. Các kết quả của quy trình sản xuất thử nghiệm này sẽ là căn cứ để lựa chọn một quy trình sản xuất tối ưu cũng như áp dụng cho sản xuất với quy mô lớn hơn trong tương lai tại Công ty TNHH MTV Vắcxin và Sinh phẩm số 1 (VABIOTECH).

Từ khoá: quy trình công nghệ, vắc xin dengue, tế bào Vero, sản xuất vắc xin.

PILOT PRODUCTION OF DENGUE LIVE-ATTENUATED VACCINE IN VERO CELL AT THE LABORATORY SCALE

Summary

After establishment of a production procedure at the laboratory scale, several pilot production lots of dengue live-attenuated vaccine in Vero cell have been conducted and met the local quality requirements. For each stage of production, at least 3 consecutive lots have been conducted in order to validate the vaccine quality and procedure stability. The results of pilot production will be the basic for the selection of optimal vaccine production procedure and application for future upscale production in Company for Vaccine and Biological Production No 1 (VABIOTECH).

Keywords: technological procedure, dengue vaccine, Vero cell, vaccine production.

Đặt vấn đề

Dengue là một trong những bệnh do virút lây truyền qua muỗi phổ biến nhất ở người, lưu hành chủ yếu tại các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới. Phạm vi ảnh hưởng và sự phân bố địa lý của bệnh này tăng nhanh chóng trong vòng 50 năm qua và Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ước tính rằng, virút dengue là nguyên nhân gây ra khoảng 50-100 triệu ca bệnh mỗi năm trên toàn thế giới. Khoảng 2 phần 5 dân số trên toàn thế giới hiện nay có nguy cơ mắc bệnh này [1, 9].

Sự lan truyền nhanh chóng của dịch sốt dengue đang đòi hỏi các tổ chức, các quốc gia tăng cường nỗ lực kiểm soát, phòng và chữa bệnh. Các phương pháp chủ yếu nhằm kiểm soát sự lây lan bệnh sốt dengue trong cộng đồng bao gồm giáo dục cộng đồng và khống chế vector truyền bệnh. Việc nâng cao ý thức, giáo dục cộng đồng về sự nguy hiểm, cách phòng và chống sốt dengue có ý nghĩa quan trọng nhưng kết quả thu được còn nhiều hạn chế. Việc khống chế vector truyền bệnh được xem là phương pháp phòng bệnh duy nhất có hiệu quả nhưng chi phí khá lớn và đòi hỏi một chiến lược lâu dài, liên tục. Hiện nay, việc nghiên cứu và phát triển vắc xin đang được hy vọng là sẽ đưa ra được một giải pháp phòng bệnh có hiệu quả cao nhất đối với bệnh sốt xuất huyết dengue. Các tổ chức y tế, các quốc gia cũng như các nhà sản xuất đã và đang nỗ lực không ngừng trong việc tìm ra vắc xin phòng bệnh sốt dengue hiệu quả và kinh tế nhằm đưa vào sử dụng rộng rãi trong các khu vực lưu hành dịch [4, 5, 6, 7].

Với mong muốn nghiên cứu và phát triển vắc xin dengue tại Việt Nam nhằm mau chóng tiếp cận với các công nghệ sản xuất vắc xin tiên tiến trên thế giới cũng như sớm có được vắc xin phục vụ cộng đồng, Công ty TNHH MTV Vắcxin và Sinh phẩm số 1 (VABIOTECH) đã tiến hành thành công các nghiên cứu lựa chọn và xây dựng hệ thống chủng giống cho sản xuất vắc xin từ các chủng virút có các đặc tính tốt nhất về di truyền và miễn

dịch của Viện Sức khỏe Quốc gia Hoa Kỳ (NIH), xây dựng thành công quy trình công nghệ sản xuất vắc xin dengue sống giảm độc lực tứ giá ở quy mô phòng thí nghiệm. Nghiên cứu sản xuất các loạt vắc xin thử nghiệm này là bước tiếp theo sau khi có được quy trình công nghệ sản xuất vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào Vero ở quy mô phòng thí nghiệm. Chính các sản phẩm có được sẽ là căn cứ để kiểm chứng mức độ ổn định và chất lượng của quy trình sản xuất đã được xây dựng.

Nội dung và phương pháp nghiên cứu

Quy trình công nghệ sản xuất vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào được nghiên cứu và phát triển tại Việt Nam là quy trình nhân nuôi chủng virút dengue cố định trên dòng tế bào Vero. Dựa trên các nghiên cứu đã có của NIH bao gồm các nghiên cứu nhân nuôi chủng, kiểm tra tính ổn định hệ gen của chủng, kiểm tra độc tính và hiệu quả gây đáp ứng miễn dịch của các chủng trên động vật và đặc biệt là các kết quả thử nghiệm lâm sàng với từng chủng đơn lẻ cũng như đối với cả 4 chủng cùng có mặt trong thành phần vắc xin (vắc xin tứ giá) cho thấy 4 chủng virút tái tổ hợp rDEN1 (rDEN1Δ30), rDEN2 (rDEN2/4Δ30(ME)), rDEN3 (rDEN3Δ30/31) và rDEN4 (rDEN4Δ30) đã có được các đặc tính tốt nhất và phù hợp để được lựa chọn tiếp tục cho nghiên cứu vắc xin dengue sống giảm độc lực tại VABIOTECH [2, 3, 8]. Các bước 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 có được các thông số ổn định đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Các thông số đã được thiết lập này tiếp tục được kiểm chứng rõ ràng hơn trong quá trình sản xuất thử nghiệm vắc xin ở quy mô phòng thí nghiệm. Các bước chính của quá trình sản xuất vắc xin bao gồm:

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. 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 đảo pha và đếm số lượng tế bào.

Gây nhiễm virút vào tế bào Vero

Chủng virút dengue sản xuất được gây nhiễm vào chai nuôi cấy tế bào đời 142 sau khi tế bào kín một lớp. Quan sát tế bào và phương pháp xác định hiệu giá virút sau khi nuôi cấy sẽ giúp đánh giá hiệu quả sau khi gây nhiễm. 4 chủng virút thuộc 4 týp dengue khác nhau được gây nhiễm riêng rẽ để tìm hiểu các thông số gây nhiễm cho từng chủng.

Nuôi cấy virút và thu hoạch nước nổi

Sản phẩm của quy trình này là virút dengue thuộc các

týp khác nhau, do vậy việc đánh giá các điều kiện nuôi cấy virút và thu hoạch nước nổi khác nhau được xây dựng dựa trên phương pháp xác định hiệu giá virút dengue sống giảm độc lực (PFU) - phương pháp nhuộm miễn dịch xác định đám hủy hoại (immunostain plaque) sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu cho từng týp. Các thông số của quy trình nuôi cấy được đánh giá là: nhiệt độ nuôi cấy, thể tích thu hoạch và hiệu giá virút.

Tinh sạch và cô đặc hỗn dịch virút

Quy trình tinh sạch và cô đặc virút sẽ tìm hiểu về hiệu quả thu hoạch virút sau khi sử dụng ly tâm, lọc và siêu lọc. Hiệu giá virút (PFU/ml) cũng được xác định theo phương pháp nhuộm miễn dịch xác định đám hủy hoại tử.

Tinh chế virút

Quy trình tinh chế virút được tiến hành với mục đích loại bỏ tối đa các thành phần protein tạp từ tế bào và môi trường nuôi cấy cũng như ADN tồn dư của tế bào Vero có trong hỗn dịch virút sau thu hoạch. Các phương pháp tinh chế virút bao gồm cắt axit nucleic và siêu lọc. Phương pháp xác định hiệu giá virút và xác định hàm lượng ADN tế bào tồn dư được sử dụng để đánh giá hiệu suất và độ tinh sạch của virút sau tinh chế.

Pha bán thành phẩm cuối cùng và sản xuất vắc xin thành phẩm

Công thức pha bán thành phẩm cuối cùng với nồng độ của từng týp virút dengue, của từng thành phần trong đệm 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 và xác định độ ẩm tồn dư.

Kết quả và thảo luận

Nuôi cấy và chuẩn bị tế bào Vero

Tế bào Vero đời 137 từ ngân hàng tế bào Vero được nhân nuôi và cấy chuyển đến đời 142 trên chai nuôi cấy tế bào một lớp với môi trường phát triển phù hợp có chứa huyết thanh. Các chai nuôi cấy tế bào được theo dõi hàng ngày bằng phương pháp cảm quan (màu và độ trong của môi trường nuôi cấy) và kiểm tra dưới kính hiển vi soi tế bào. Sau mỗi đời nuôi cấy, hỗn dịch tế bào thu được được đếm số lượng và xác định nồng độ cấy chuyển sang các chai tế bào mới. Đã có 12 mẻ tế bào được nuôi cấy trên chai 3 tầng, hình thái tế bào dạng đa cực, số lượng và chất lượng đảm bảo để gây nhiễm virút cho sản xuất 03 loạt vắc xin dengue tứ giá.

Gây nhiễm virút vào tế bào Vero

Tế bào Vero đời cấy chuyển 142 được tách và gây nhiễm với các chủng virút dengue. Liều gây nhiễm tùy thuộc vào từng chủng virút. Tế bào Vero sau khi hấp phụ

virút được cấy chuyển vào chai nuôi cấy 3 tầng. Khoảng 5% lượng tế bào không gây nhiễm virút được nuôi cấy trong các chai nuôi cấy một lớp. Các chai tế bào chúng này sẽ được tiến hành và theo dõi song song cùng với các chai gây nhiễm trong suốt quá trình nhân nuôi virút. Môi trường sử dụng trong công đoạn này vẫn là môi trường phát triển tế bào có chứa huyết thanh. Kết quả trong bảng 1 cho thấy, quá trình gây nhiễm ổn định cho hiệu giá virút thu hoạch được đạt yêu cầu cho sản xuất.

Nuôi cấy virút và thu hoạch nước nổi

Sau 6-7 ngày gây nhiễm, tiến hành thu hoạch các mẻ gạt đơn virút. Tất cả các mẻ gạt đơn đều được kiểm tra vô trùng, xác định hiệu giá virút. Kết quả thu hoạch các mẻ gạt đơn virút được trình bày trong bảng 1. Hiệu giá virút của các loạt sản xuất thử nghiệm này đều đạt yêu cầu cho các quá trình sản xuất tiếp theo.

Bảng 1: kết quả nuôi cấy và thu hoạch nước nổi của các loạt sản xuất

Chủng/Tên chủng	Số chai gây nhiễm	Thể tích nuôi cấy/ chai (ml)	Số loạt gây nhiễm	Nhiệt độ nuôi cấy (°C)	Thể tích thu hoạch (ml/chai)	Hiệu giá lgPFU/ml		
						0113	0213	0313
rDEN1	12	180	03	37	200	7,3	7,4	7,1
rDEN2	12	180	03	35	200	7,0	6,9	7,1
rDEN3	12	180	03	37	200	5,8	5,6	5,5
rDEN4	12	180	03	37	200	7,2	7,1	7,2

Tinh sạch hỗn dịch virút

Các mẻ gạt đơn sau khi thu hoạch sẽ được trộn lại, ly tâm và lọc qua màng để loại trừ các mảnh xác tế bào và các hạt virút kết dính có kích thước lớn. Hỗn dịch virút tinh sạch được xác định hiệu giá virút. Kết quả tinh sạch hỗn dịch virút của các loạt sản xuất thử nghiệm được trình bày trong bảng 2. Các loạt sản xuất thử nghiệm có tính ổn định về thể tích thu hoạch và tổng hiệu giá virút thu được.

Bảng 2: kết quả tinh sạch hỗn dịch virút của các loạt sản xuất

Chủng/Tên chủng	Số loạt tinh sạch	Tổng thể tích thu hoạch (ml)	Tổng thể tích sau tinh sạch (ml)	Hiệu giá lgPFU/ml		
				0113	0213	0313
rDEN1	03	2.000	2.000	7,3	7,4	7,1
rDEN2	03	2.000	2.000	7,0	6,9	7,1
rDEN3	03	2.000	2.000	5,8	5,6	5,5
rDEN4	03	2.000	2.000	7,2	7,1	7,2

Cô đặc hỗn dịch virút

Hỗn dịch virút sau bất hoạt được tiến hành cô đặc bằng màng siêu lọc trên hệ thống pellicon cattsete. Kết quả về hiệu giá virút được xác định và thể tích hỗn dịch thu được sau cô đặc được trình bày trong bảng 3. Hiệu

giá virút của tất cả các loạt sản xuất đều đạt yêu cầu cho bước tinh chế virút tiếp theo.

Bảng 3: kết quả cô đặc hỗn dịch virút của các loạt sản xuất

Chủng/Tên chủng	Số loạt cô đặc	Tổng thể tích trước cô đặc (ml)	Tổng thể tích sau cô đặc (ml)	Hiệu giá lgPFU/ml		
				0114	0214	0314
rDEN1	03	2.000	400	7,8	7,5	7,5
rDEN2	03	2.000	400	7,4	7,2	7,3
rDEN 3	03	2.000	400	6,2	6,0	6,1
rDEN 4	03	2.000	400	7,5	7,4	7,5

Tinh chế virút

Hỗn dịch virút sau cô đặc được tinh chế bằng phương pháp cắt enzyme và thẩm tích. Hỗn dịch virút sau tinh khiết được xác định hiệu giá virút và hàm lượng ADN tế bào Vero tồn dư. Các kết quả tinh chế virút của các loạt sản xuất được trình bày trong bảng 4 và 5.

Bảng 4: kết quả kiểm tra ADN tồn dư của các loạt sản xuất

Tên mẫu	Số loạt	Thể tích sau thẩm tích (ml)	ADN tồn dư đầu vào (ng/ml)	ADN tồn dư đầu ra (ng/ml)		
				0113	0213	0313
rDEN1	03	1.000	200	8,0	4,0	6,0
rDEN2	03	1.000	400	0,4	0,2	0,32
rDEN3	03	1.000	400	0,8	0,4	0,36
rDEN4	03	1.000	320	7,5	2,0	4,0

Bảng 5: kết quả kiểm tra hiệu giá virút của các loạt sản xuất

Tên mẫu	Số loạt	Thể tích sau thẩm tích (ml)	Hiệu giá (lgPFU/ml)		
			0113	0213	0313
rDEN1	03	1.000	7,2	7,1	7,3
rDEN2	03	1.000	6,9	7,0	6,9
rDEN3	03	1.000	5,8	5,9	6,0
rDEN4	03	1.000	7,3	7,2	7,4

Sản xuất bán thành phẩm cuối cùng

Từ 3 loạt bán thành phẩm tinh chế, 3 loạt vắc xin dengue bán thành phẩm cuối cùng đã được pha. Các loạt vắc xin bán thành phẩm này đều đạt yêu cầu về hiệu giá, vô khuẩn và hàm lượng ADN tồn dư (bảng 6 và 7).

Bảng 6: kết quả sản xuất bán thành phẩm cuối của các loạt sản xuất

Chủng/Tên chủng	Thể tích (ml)		
	Loạt 0113	Loạt 0213	Loạt 0313
rDEN1	0,86	1,08	0,68
rDEN2	8,6	6,84	8,61
rDEN3	21,6	17,18	13,65
rDEN4	0,68	0,86	0,54
Đệm đông khô	380	380	380

Bảng 7: hiệu giá bán thành phẩm cuối sau pha

Chủng/Tên chủng	Hiệu giá (lgPFU/ml)		
	Loạt 0113	Loạt 0213	Loạt 0313
rDEN1	4,6	4,5	4,6
rDEN2	5,3	5,4	5,3
rDEN3	4,5	4,4	4,6
rDEN4	4,7	4,6	4,7

Sản xuất vắc xin thành phẩm

Bán thành phẩm đông khô được chia vào các lọ và đông khô. Kết quả đã sản xuất được 03 loạt vắc xin dengue tứ giá thành phẩm, mỗi loạt 700 lọ. Các loạt thành phẩm vắc xin được kiểm tra chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở tại Phòng kiểm tra chất lượng sản phẩm (QC), Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1. Kết quả kiểm tra chất lượng các loạt vắc xin thành phẩm này được trình bày trong bảng 8.

Bảng 8: kết quả kiểm tra chất lượng vắc xin thành phẩm tại cơ sở của các loạt sản xuất vắc xin dengue trên tế bào Vero

Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn cơ sở	Loạt DE-010413	Loạt DE-020613	Loạt DE-030613
Nhận dạng	Virút dengue	Virút dengue		
Tính chất vật lý	Viên xộp màu trắng, khi hoà tan bằng nước hồi chính tạo thành dung dịch trong suốt, không vón cục hoặc không có chất lạ khó tan	Đạt yêu cầu		
Vô khuẩn	Không thấy nấm và vi khuẩn mọc sau 14 ngày theo dõi	Đạt yêu cầu		
pH	6,5 - 8,0	6,89	6,91	6,91
Hiệu giá virút (PFU/0,5 ml)				
- rDEN1	$\geq 10^3$	$10^{4,0}$	$10^{3,9}$	$10^{4,0}$
- rDEN2	$\geq 10^3$	$10^{4,6}$	$10^{4,6}$	$10^{4,7}$
- rDEN3	$\geq 10^3$	$10^{4,1}$	$10^{3,9}$	$10^{4,0}$
- rDEN4	$\geq 10^3$	$10^{4,3}$	$10^{4,2}$	$10^{4,3}$
An toàn chung trên chuột lang	Chuột không chết, khỏe mạnh, tăng trọng bình thường	Đạt yêu cầu		
An toàn chung trên chuột nhắt				
An toàn đặc hiệu	Chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bệnh (liệt, chết), tăng trọng bình thường	Đạt yêu cầu		
Chất gây sốt	Tổng T° tăng của 3 thử $\leq 1,3^\circ\text{C}$. Nhiệt độ tăng của từng thử $< 0,6^\circ\text{C}$	0,4°C	0,4°C	0,4°C
Độ ẩm tồn dư	$\leq 3\%$	2,90%	2,64%	2,82%

Như vậy, cả 3 loạt thành phẩm vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào Vero đều đạt được các tiêu chuẩn cơ sở về chất lượng sản phẩm. Các mẫu vắc xin của tất cả các loạt sản xuất này sẽ được gửi đi kiểm tra chất lượng sản phẩm tại Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

Kết luận

Dựa trên quy trình công nghệ đã được xây dựng, 3 loạt vắc xin dengue trên nuôi cấy tế bào Vero đã được sản xuất thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm cho thấy tính ổn định của các thông số trong quá trình sản xuất và vắc xin thành phẩm đã đạt các tiêu chuẩn về chất lượng tại cơ sở theo đúng hướng dẫn của WHO [10].

Tài liệu tham khảo

- [1] Bhatt S. et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. Nature 496: 504-507.
- [2] Blaney J.E. et al. (2006). Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. Viral Immunol 19: 10-32.
- [3] Durbin A.P., Whitehead S.S. (2010). Dengue vaccine candidates in development. Current topic in Microbiology and Immunology, 338, 129-143.
- [4] Guy B., Almond J., Lang J. (2011). Dengue vaccine prospects: a step forward. Lancet, 377, 381-382.
- [5] Simmons M. et al. (2012). Advances in development of vaccines for dengue fever. Vaccine: Development and Therapy. 2: 1-14.
- [6] Thomas S.J. (2014). Developing a dengue vaccine: Progress and future challenges. Ann. N. Y. Acad. Sci, 1-20.
- [7] Webster D.P., Farrar J., Rowland-Janes S. (2009). Progress towards a dengue vaccine. Lancet, 9, 678-687.
- [8] Whitehead S.S., Blaney J.E., Durbin A.P., Murphy B.R. (2007). Prospect for dengue virus vaccine. Nature Reviews Microbiology, 5, 518-528.
- [9] WHO (2009). Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva: World Health Organization.
- [10] WHO (2011). Guidelines for the production and quality control of candidate tetravalent dengue virus vaccines (live). WHO technical report series 932, 43-72.