

## NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT KHÁNG THỂ BÁN PHẦN CHUỖ ĐƠN TRUNG HÒA SARS-CoV-2 TỪ *ESCHERICHIA COLI* DÙNG TRONG ĐIỀU TRỊ COVID-19

Nguyễn Thùy Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Hòa<sup>1</sup>, Đinh Công Minh Trí<sup>1</sup>  
Nguyễn Trương Trọng Nghĩa<sup>1</sup>, Vũ Văn Thắng<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Trúc<sup>1</sup>  
Đoàn Chính Chung<sup>1</sup>, Nguyễn Mai Khôi<sup>1</sup>, Ưng Trọng Thuấn<sup>1</sup>, Trần Thị Như Mai<sup>1</sup>  
Trịnh Thanh Hùng<sup>4</sup>, Đỗ Quyết<sup>2</sup>, Hoàng Văn Lương<sup>2</sup>, Nguyễn Trường Giang<sup>2</sup>  
Đỗ Minh Trung<sup>3</sup>, Bruce May<sup>1</sup>, Hồ Nhân<sup>1</sup>, Đỗ Minh Sĩ<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Nghiên cứu và sản xuất kháng thể bán phần chuỗi đơn trung hòa SARS-CoV-2 dùng trong điều trị COVID-19. **Đối tượng và phương pháp:** Gen mã hóa cho scFv CR3022 được đưa vào vector pIKanT7 và dòng hóa trong tế bào *E.coli* BL21 (DE3), tối ưu hóa biểu hiện protein scFv CR3022 trên 03 loại môi trường (M4, TB, MTB), protein scFv CR3022 được tinh sạch bằng phương pháp FT (Flow-through), cô mẫu và trao đổi dung dịch đệm bảo quản được tiến hành bằng hệ thống TFF (Tangential flow filtration), thử hoạt tính trung hòa SARS-CoV-2. **Kết quả:** Nghiên cứu đã tạo thành công dòng tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 có mức độ biểu hiện protein cao đạt 43,1%. Protein scFv CR3022 tinh sạch đạt 98%, tỷ lệ thu hồi đạt 72%. Protein tinh sạch có khả năng trung hòa virus SARS CoV-2 đạt 47% dương tính ở nồng độ 100 µg/mL, với nồng độ 500 µg/ml có khả năng trung hòa SARS-CoV-2 tại độ pha loãng 1/640. **Kết luận:** Nghiên cứu và sản xuất thành công kháng thể bán phần chuỗi đơn scFv 3022 từ *E.coli* với sản lượng, độ tinh sạch cao, có khả năng trung hòa SARS-CoV-2, phục vụ trong điều trị COVID-19.

\* Từ khóa: COVID-19, SARS-CoV-2; Kháng thể trung hòa SARS-CoV-2; Kháng thể bán phần chuỗi đơn scFv.

### ***Production of Sars-Cov-2 Neutralizing Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody in Escherichia Coli Cells for Treatment of COVID-19***

#### **Summary**

**Objectives:** To research and produce SARS-CoV-2 neutralizing single-chain variable fragment antibody to treat COVID-19 disease. **Subjects and methods:** The gene encoding scFv CR3022 was cloned into pIKanT7 vector and expressed in *E.coli* BL21 (DE3), the optimal expression of protein scFv CR3022 in three different culture media (M4, TB, MTB), The FT (Flow-through)

<sup>1</sup> Công ty Cổ phần Công nghệ Sinh học Dược Nanogen

<sup>2</sup> Học viện Quân y

<sup>3</sup> Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

<sup>4</sup> Bộ Khoa học Công nghệ

Người phản hồi: Đỗ Minh Sĩ (minhsi@nanogenpharma.com)

Ngày nhận bài: 11/6/2021

Ngày bài báo được đăng: 26/6/2021

method were used for protein scFv CR3022 purification, protein concentration and buffer exchange steps were performed with TFF systems (Tangential flow filtration), neutralization antibody test (NT) SARS-CoV-2. **Results:** This study has successfully established an *E.coli* cell line capable of producing CR3022 scFv (single-chain fragment variable) antibody with high target protein expression levels of 43.1%. The subsequent protein purification process achieved a purity of 98% with a recovery rate of 72%. Purified CR3022 scFv had the neutralization ability against SARS-CoV-2 of over 47% at a concentration of 100 µg/mL, with a concentration of 500 µg/mL purified CR3022 scFv had the neutralization ability against SARS-CoV-2 at a dilution of 1/640. **Conclusion:** The single-chain fragment variable antibody (scFv 3022) has been successfully produced in *E.coli* with high yield, high purity, and neutralization ability against SARS-CoV-2, used in the treatment of COVID-19.

\* **Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2; Neutralizing antibodies; Single-chain variable fragment scFv.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng viêm đường hô hấp cấp Coronavirus disease 2019 (COVID-19) do SARS-CoV-2 gây ra. SARS-CoV-2 là virus RNA sợi đơn dương (+ssRNA), có vỏ và được xác định là một chủng  $\beta$ -coronavirus hoàn toàn mới, mà trước đó được xác định là coronavirus gây hội chứng hô hấp cấp nghiêm trọng (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus - SARS-CoV 2002 - 2003 hoặc SARS-CoV-1) hoặc hội chứng hô hấp cấp Trung Đông do Coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus - MERS-CoV) từng gây ra các ổ dịch lớn ở Quảng Đông, Trung Quốc và Saudi Arabia vào năm 2012 [3, 4]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, việc khoá hay bất hoạt protein gai của SARS-CoV-2 ức chế đáng kể khả năng bám của virus với thụ thể ACE2 của người (hACE2) và dơi (bACE2). Hơn nữa, các kháng thể đa dòng đặc hiệu cho protein S của SARS-CoV có thể phản ứng chéo với protein S của SARS-CoV-2 và trung hòa sự xâm nhập của các chủng SARS-CoV-2. Kết quả này chứng tỏ kháng thể đặc hiệu cho protein S của SARS-CoV-2 có thể sử

dụng trong điều trị bệnh do sự xâm nhiễm SARS-CoV-2 [1, 6].

CR3022, trước đây được phân lập từ một bệnh nhân (BN) nhiễm SARS sau khi hồi phục [5], là một kháng thể trung hòa nhắm vào RBD (receptor binding domain) trên protein S của SARS-CoV. Một nghiên cứu gần đây cho thấy CR3022 có thể bám vào RBD của SARS-CoV-2 với ái lực thấp hơn RBD của SARS-CoV, do sự khác biệt của vị trí N-glycosyl hóa tại N370. Epitope của CR3022 không trùng lặp với thụ thể ACE-2 và liên kết của CR3022 với RBD SARS-CoV hay RBD SARS-CoV-2 không trùng với ACE-2. Do đó, CR3022 không cạnh tranh với ACE-2 để liên kết với RBD, trong khi hầu hết các kháng thể đặc hiệu cho RBD SARS-CoV cạnh tranh với ACE-2 để liên kết với RBD. Các kết quả này chứng tỏ CR3022 có tiềm năng phát triển thành một sản phẩm trị liệu đơn hoặc kết hợp với các kháng thể trung hòa khác để phòng tránh và điều trị sự xâm nhiễm của SARS-CoV-2.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ưu tiên nghiên cứu sản xuất kháng thể bán phần chuỗi đơn scFv (single-chain fragment variable) trung hòa SARS-CoV-2

## TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ ĐẶC BIỆT CHUYÊN ĐỀ VỀ COVID-19

từ *E.coli* vì những ưu điểm sau: Thứ nhất, với kích thước nhỏ khoảng ~ 25 kDa, scFv được sản xuất với quy mô lớn bằng hệ thống tế bào vi sinh như *E.coli*, đạt năng suất cao hơn và với chi phí thấp hơn so với kháng thể hoàn chỉnh. Thứ

hai, scFv có kích thước nhỏ, thuận lợi cho việc xâm nhập vào cấu trúc mô. Thứ ba, cấu trúc scFv không chứa vùng Fc, sẽ hạn chế sự kích hoạt hệ thống miễn dịch tế bào, đồng thời làm giảm tính sinh miễn dịch.

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Đối tượng nghiên cứu

Gen mã hóa cho scFv CR3022 kích thước 769 bp (gồm chuỗi nặng (Hc), chuỗi nhẹ (Lc) và đoạn linker) được thiết kế dựa trên trình tự peptide của chuỗi nặng CR3022 khoảng 23,44 kDa và chuỗi nhẹ CR3022 khoảng 24,36 kDa được lấy từ cơ sở dữ liệu NCBI.

LOCUS	6W41_L	118 aa	linear
DEFINITION	Chain L, CR3022 Fab light chain.		
ACCESSION	6W41_L REGION: 1..118		
VERSION	6W41_L		
	deposition: Mar 9, 2020;		
	class: IMMUNE SYSTEM/VIRAL PROTEIN;		
	source: Mmdb_id: 185767, Pdb_id 1: 6W41;		
	Exp. method: X-ray Diffraction.		
ORIGIN			
	1 diqltqspds lavslgerat inckssqsvl yssinknyla wyqqkpgqpp klliywastr		
	61 esgvpdrfsg sgsqtdftlt isslqaedva vyycqyyyst pytfgqgtkv eikrtvaa		
LOCUS	6W41_H	119 aa	linear
DEFINITION	Chain H, CR3022 Fab heavy chain.		
ACCESSION	6W41_H REGION: 1..119		
VERSION	6W41_H		
	deposition: Mar 9, 2020;		
	class: IMMUNE SYSTEM/VIRAL PROTEIN;		
	source: Mmdb_id: 185767, Pdb_id 1: 6W41;		
	Exp. method: X-ray Diffraction.		
ORIGIN			
	1 qmqlvqsgte vkkpogeslki sckgsgygfii tywigwvrqm pgkglewmgi iypgdsetry		
	61 spsfqgqvti sadksintay lqwsslkasd taiyycaggs gistpmdvwg qgtvtvss		

## 2. Phương pháp nghiên cứu

\* *Tạo dòng tế bào E.coli BL21 (DE3) mang gen biểu hiện protein scFv CR3022:*

Gen scFv CR3022 được tạo dòng vào vector plkanT7 (có kích thước khoảng 2,4 kbp, gồm các trình tự sao chép ori, fl (+) origin, gen kháng NeoR/Kanamycin, trình tự promoter T7 lac, gen **LacI**<sup>q</sup>, MCS, được thiết kế bởi Nanogen) tạo thành vector tái tổ hợp plkanT7-scFv CR3022 và được chuyển vào tế bào *E.coli* BL21(DE3) (hãng Invitrogen, Mỹ), để biểu hiện protein scFv CR3022. Dòng tế bào *E.coli* BL21 (DE3) plKanT7-scFv CR3022 được sử dụng tạo ngân hàng tế bào giống và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Tiến hành phân tích biểu hiện protein scFv bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western Blot sử dụng kháng nguyên RBD (hãng Abcam, Anh).

\* *Tối ưu biểu hiện trên 03 loại môi trường nuôi cấy tế bào E.coli sản xuất scFv CR3022:*

Nuôi cấy tế bào *E.coli* BL21 (DE3) plKanT7-scFv CR3022 sản xuất kháng thể scFv CR3022 được thực hiện qua 2 giai đoạn: Nuôi cấy nhỏ (1L) để tối ưu hóa các tham số cần thiết và lên men (50L). Các nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy tế bào sản xuất scFv CR3022 gồm môi trường nuôi cấy (môi trường M4, TB và MTB), thời gian nuôi cấy (20 giờ, 22 giờ, 24 giờ) [2]. Quá trình lên men lớn sản xuất scFv CR3022 được tiến hành bằng hệ thống bồn lên men 50l (Shanghai BaiLun Bio-technology).

\* *Nghiên cứu quy trình tinh chế kháng thể scFv CR3022:*

Quy trình tinh chế scFv CR3022 gồm các bước tiến hành như sau: Sắc ký trao

đổi cation (cation exchange chromatography), sắc ký lọc gel (gel filtration) và cô mẫu (protein concentration).

Quá trình tinh chế scFv CR3022 được tiến hành trên hệ thống Akta Pilot và Akta Purifier (hãng GE healthcare, Mỹ): Bước đầu sử dụng sắc ký trao đổi cation (phương pháp FT (Flow-through) qua cả hai cột SP Sepharose 6 Fast Flow gel và Q Sepharose 6 Fast Flow để loại bỏ endotoxin, protein tế bào chủ và DNA tế bào chủ trong mẫu. Đồng thời, loại bỏ điểm và các scFv CR3022 thủy phân bằng phương pháp lọc gel. Quá trình cô mẫu và trao đổi dung dịch đệm bảo quản được tiến hành bằng hệ thống TFF (Tangential flow filtration) (hãng Satorius, Pháp).

\* *Đánh giá hoạt tính trung hòa SARS-CoV-2:*

- Phương pháp trung hòa virus thay thế (sVNT):

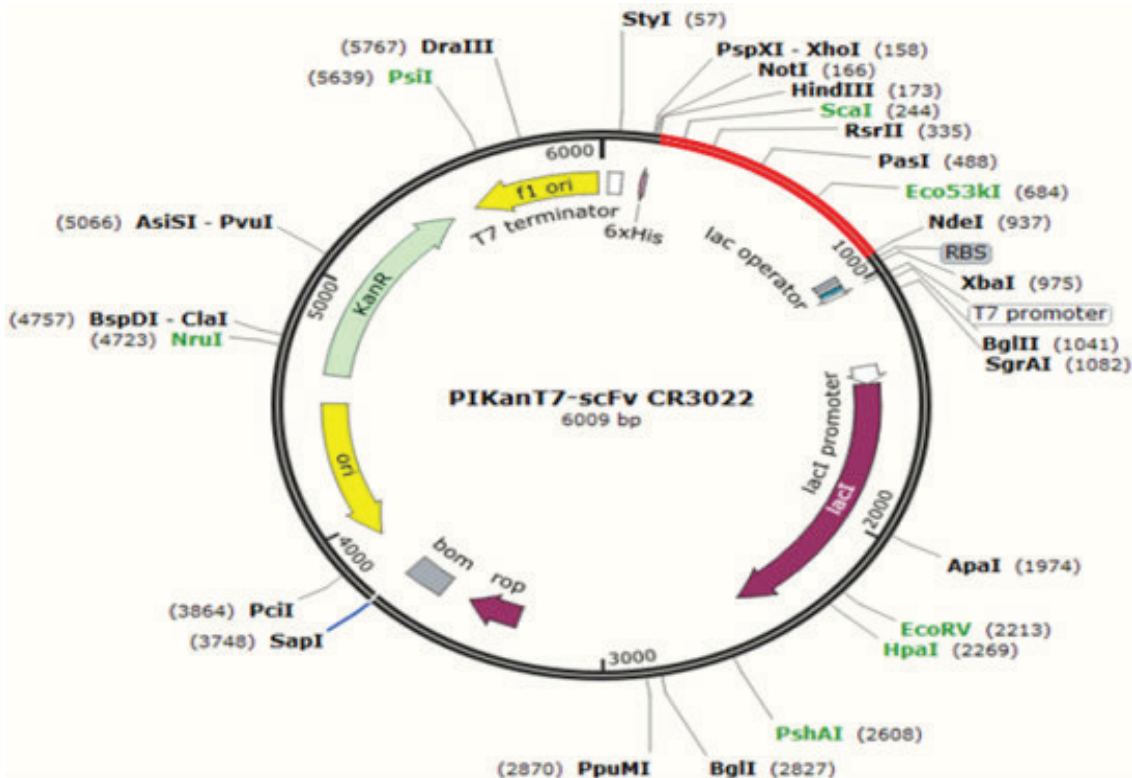
Hoạt tính trung hòa SARS-CoV-2 của scFv CR3022 được xác định bằng bộ kit SARS-CoV-2 surrogate virus (hãng Genscript, Singapore). Kết quả của thử nghiệm phát hiện kháng thể trung hòa SARS-CoV-2 là dương tính khi giá trị cut off  $\geq 20\%$ , âm tính khi giá trị cut-off  $< 20\%$ .

- Phương pháp trung hòa giảm đám hoại tử virus SARS-CoV-2-PRNT<sub>50</sub>:

Tổng số các đám hoại tử xuất hiện sau 96 giờ gây nhiễm được xác định, số lượng đám hoại tử giảm 50% so với chứng virus tại độ pha loãng cuối cùng được xác định là hiệu giá của kháng thể trung hòa (giá trị PRNT<sub>50</sub>). (Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương - NIHE)

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Tạo dòng tế bào E.coli BL21(DE3) mang gen biểu hiện protein scFv CR3022

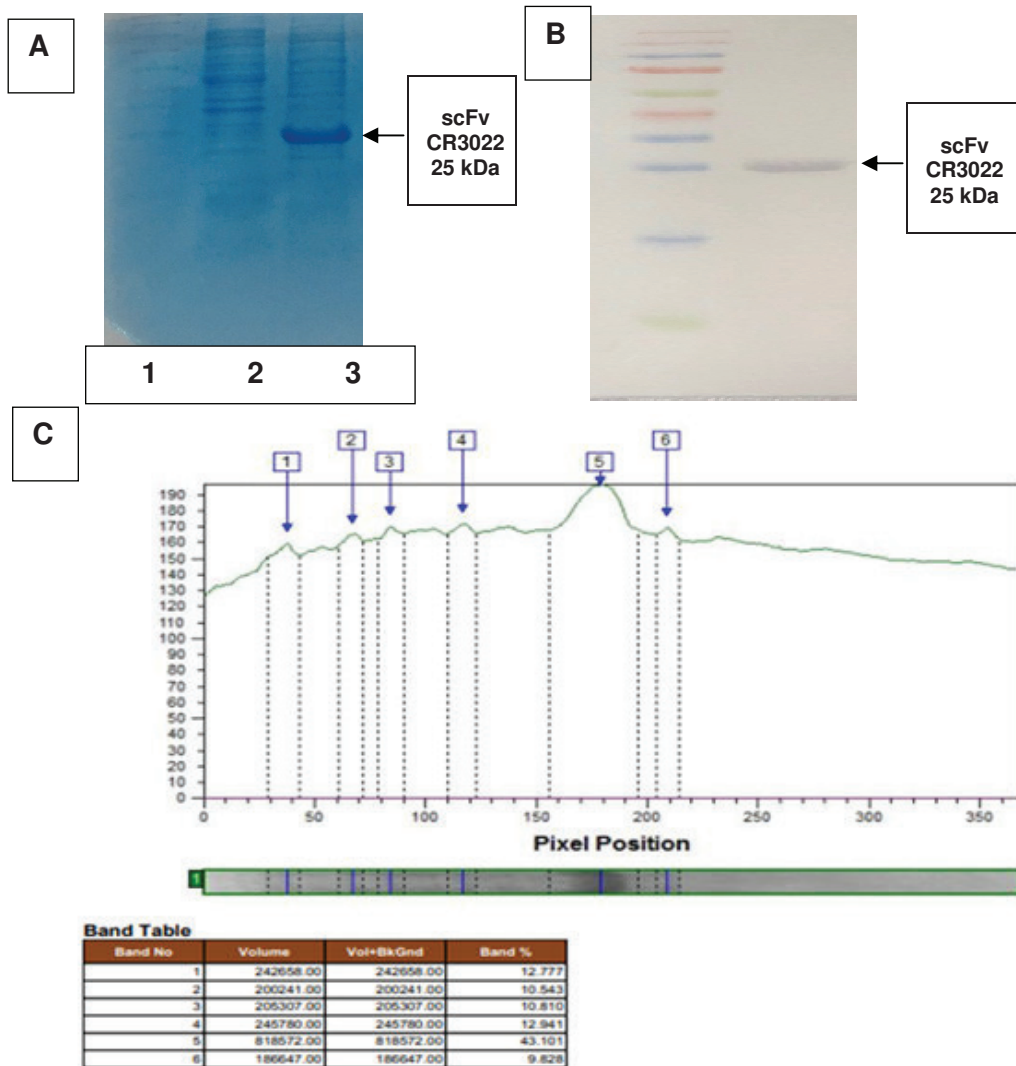


Hình 1: Vector biểu hiện pKanT7 mang gen mã hóa cho kháng thể scFv CR3022.

Kháng thể scFv CR3022 có trình tự peptide như sau:

QMQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYGFITYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGD  
 SETRYSPSFQGGQVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAIYYCAGGSGISTPMDVWGQG  
 TTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSIN  
 KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY  
 YCQQYYSTPYTFGQGTKVEIKRTVAA

Gen mã hóa protein scFv CR3022 được tạo dòng vào vector pKanT7 gồm chuỗi nặng (Hc), chuỗi nhẹ (Lc) và đoạn linker, có trọng lượng phân tử khoảng 25 Kda (Hình 1). Tế bào E.coli biểu hiện protein scFv CR3022 được nuôi cấy ở quy mô nhỏ, tiến hành thu nhận mẫu để kiểm tra biểu hiện protein mục tiêu bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western Blot.



Hình 2: Điện di SDS-PAGE và Western Blot protein scFv CR3022.

- (A) 1: Thang protein (hãng Thermo Scientific, Anh),  
 2: *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7, 3: *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022;  
 (B) Western Blot định tính scFv CR3022;  
 (C) Phân tích % biểu hiện protein bằng phần mềm Phoretix 1D.

Theo kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 2, A), chủng tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7 không mang gen mã hóa scFv CR3022 không biểu hiện protein, còn chủng tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 mang gen mã hóa scFv CR3022 cho vạch protein có kích thước khoảng 25 kDa.

Ngoài ra, chúng tôi tiến hành phương pháp màng lai ủ với kháng nguyên RBD, hiện màu. Kết quả xuất hiện 1 vạch với kích thước khoảng 25 kDa khi so sánh với thang chuẩn protein (Hình 2, B).

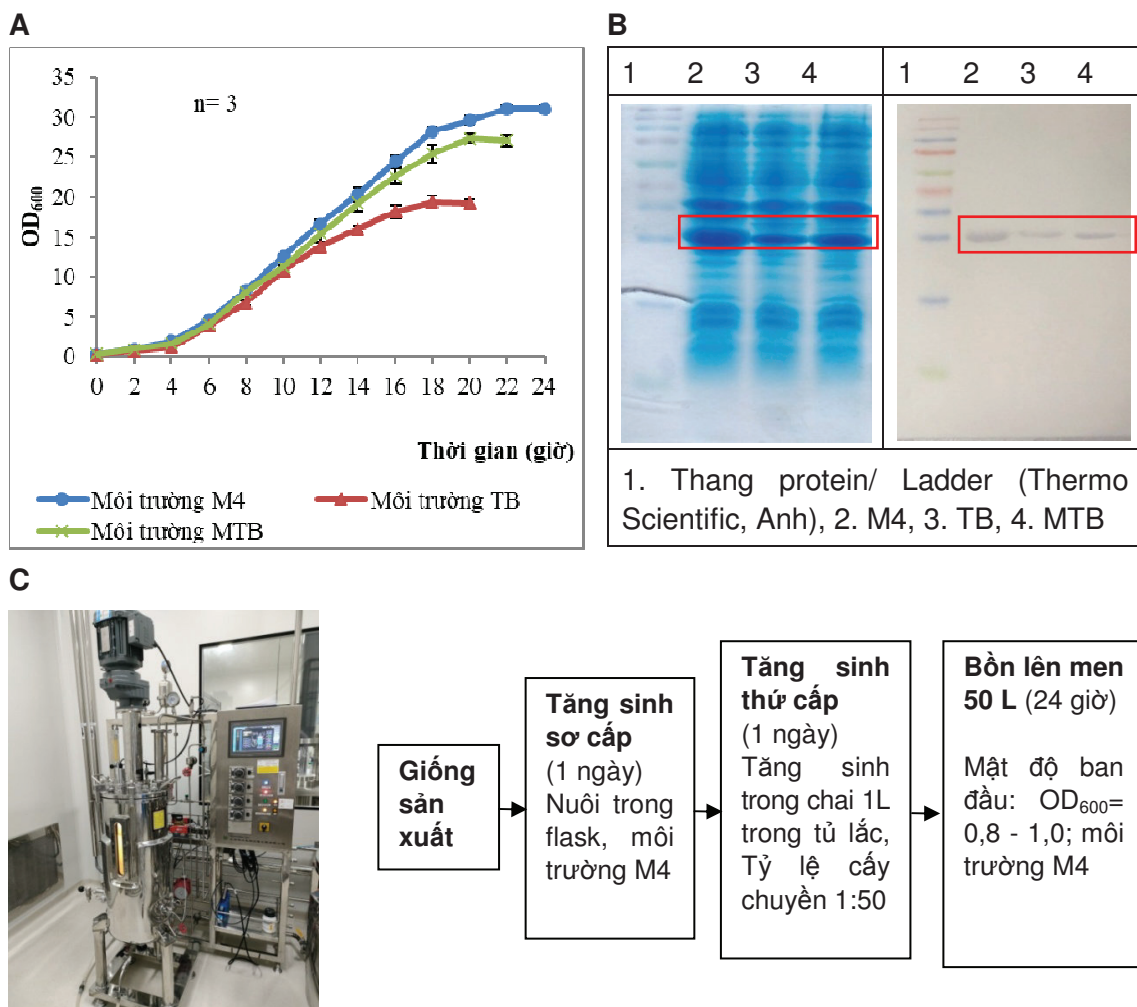
**TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ ĐẶC BIỆT CHUYÊN ĐỀ VỀ COVID-19**

Bằng phần mềm phân tích gel Phoretix 1D, protein scFv CR3022 chiếm khoảng 43,1% tổng lượng protein của dòng tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 (Hình 2, C).

Từ các kết quả trên cho thấy chúng tôi đã tạo thành công tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 biểu hiện protein scFv 3022.

**2. Tối ưu biểu hiện trên 03 loại môi trường nuôi cấy tế bào E.coli sản xuất scFv CR3022**

Các tham số của quy trình nuôi cấy tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 sản xuất kháng thể scFv CR3022 được tối ưu hóa bao gồm: Môi trường (M4, TB và MTB), thời gian nuôi cấy (20 giờ, 22 giờ, 24 giờ).



Hình 3: Nghiên cứu quy trình nuôi cấy sản xuất scFv CR3022.

(A) Đường cong tăng trưởng của tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 khảo sát trên 03 loại môi trường (M4, TB và MTB); (B) Điện di SDS-PAGE và Western Blot định tính protein scFv CR3022; (C) Quy trình nuôi cấy scFv CR3022 trong bồn 50L.

Kết quả cho thấy môi trường M4 giúp tế bào đạt mật độ cao nhất và có thời gian nuôi cấy nhiều nhất trong 3 loại môi trường khảo sát ( $OD_{600} = 31,07 \pm 0,38$  và 24 giờ). Ở môi trường MTB,  $OD_{600} = 27,10 \pm 0,7$  và thời gian nuôi cấy là 22 giờ. Trong khi đó, môi trường TB chỉ giúp tế bào đạt mật độ  $OD_{600} = 19,20 \pm 0,5$  và thời gian nuôi cấy là 20 giờ. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mật độ tế bào giữa môi trường M4 và 2 loại môi trường còn lại ( $p_{\text{valueM4-MTB}} = 0,0019 < 0,05$  và  $p_{\text{valueM4-TB}} = 0,0001 < 0,05$ ) (Hình 3, A).

Kết quả SDS-PAGE cho thấy dịch nuôi cấy của cả 3 loại môi trường M4, MTB và TM đều chứa một vạch protein có kích thước vào khoảng 25 kDa tương ứng với kích thước của scFv (Hình 3, A). Kết quả Western Blot cho thấy các vạch 25 kDa này đều bắt đặc hiệu với kháng nguyên RBD; trong đó, scFv đạt nồng độ cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường M4, thấp hơn lần lượt trong môi trường MTB và TB (Hình 3, B).

Vì môi trường M4 giúp tế bào tăng sinh và biểu hiện scFv tốt nhất nên M4 được chọn làm môi trường nuôi cấy cho các nghiên cứu tiếp theo.

Quy trình nuôi cấy tế bào *E.coli* BL21 (DE3)-pKanT7-scFv CR3022 sản xuất kháng thể scFv CR3022 trong bồn lên men 50L được đề xuất theo (Hình 3, C).

### 3. Tinh chế kháng thể scFv CR3022

- Sắc ký trao đổi cation:

Chúng tôi phát triển phương pháp tinh sạch scFv theo phương pháp FT qua lần lượt cột SP Sepharose 6 Fast Flow và Q Sepharose 6 Fast Flow ở pH 5,2 và độ dẫn điện 5,5 mS đạt được kết quả như sau:

*Bảng 1:* Kết quả thu mẫu các phân đoạn theo phương pháp FT.

Phân đoạn	Thể tích (ml)	Độ tinh sạch SDS	Nồng độ protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hiệu suất (%)	Endo-toxin	Protein tế bào chủ	DNA tế bào chủ
FT	3800	98%	271	72,18	Đạt	Đạt	Đạt
Elute SP	625	35,6%	-	-	-	-	-
Elute Q	750	85%	-	-	-	-	-

Theo kết quả SDS PAGE cho thấy mẫu ScFv được FT đồng thời qua 2 cột SP Sepharose 6 Fast Flow và Q Sepharose 6 Fast Flow đạt được độ tinh sạch theo tiêu chuẩn nguyên liệu, đồng thời hiệu suất thu hồi tăng gần gấp 4 lần từ 18,56% lên 72,18%. Kết quả kiểm tra endotoxin, kiểm tra dư lượng protein tế bào chủ, kiểm tra dư lượng DNA tế bào chủ đều đạt (Bảng 1).

Như vậy, phương pháp được sử dụng để tinh chế scFv là FT mẫu đồng thời qua cột SP Sepharose 6 Fast Flow và Q Sepharose 6 Fast Flow ở điều kiện pH 5,2 và độ dẫn điện 5,5 ms/cm.

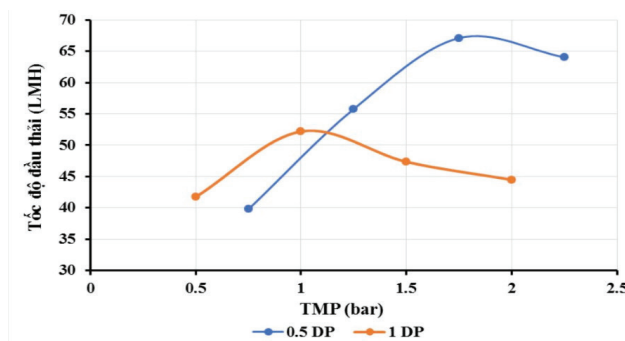


## TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ ĐẶC BIỆT CHUYÊN ĐỀ VỀ COVID-19

\* Tối ưu hóa quá trình cô mẫu:

Bảng 2: Các điều kiện áp suất khảo sát.

STT	Pf (bar)	Pr (bar)	TMP (bar)	DP (bar)	Tốc độ đầu thải (ml/min)	Tốc độ đầu thải (LMH)	Tốc độ bơm (ml/min)	Hiệu suất (%)
1	1	0,5	0,75	0,5	13,25	39,75	140	99,05
2	1,5	1	1,25	0,5	18,59	55,77	370	98,91
3	2	1,5	1,75	0,5	22,37	67,11	250	99,1
4	2,5	2	2,25	0,5	21,35	64,05	420	99
5	1	0	0,5	1	13,91	41,73	240	98,98
6	1,5	0,5	1	1	17,40	52,19	208	99,04
7	2	1	1,5	1	15,78	47,34	370	98,89
8	2,5	1,5	2	1	14,82	44,47	595	98,79



Hình 4: Kết quả tối ưu điều kiện cô mẫu.

Điều kiện áp suất cô mẫu tối ưu được lựa chọn thỏa mãn các điều kiện sau: Tốc độ đầu thải nhanh, chênh áp đầu ra/ đầu vào (DP) thấp áp suất chênh màng (TMP) thấp, tốc độ bơm thấp.

Dựa trên kết quả khảo sát các điều kiện áp suất khác nhau cho thấy (Bảng 2, Hình 4). Ba thí nghiệm cho tốc độ đầu thải nhanh nhất lần lượt là 2 (67,11 LMH), 3 (64,05 LMH), 4 (55,77 LMH).

Thí nghiệm 2 (67,11 LMH) cho tốc độ đầu thải nhanh nhất, DP thấp nhất 0,5 bar (so với 1 bar), tốc độ bơm cũng thấp nhất so với các thí nghiệm 3 và 4.

Thí nghiệm 3 (64,05 LMH) cho tốc độ đầu thải nhanh, trong đó TMP cao nhất.

Áp suất đầu vào lớn nhất (2,5 bar) cộng với việc bơm hoạt động với công suất lớn nhất không phải là lựa chọn tốt cho quá trình cô mẫu.

Thí nghiệm 4 (55,77 LMH) cho đầu thải chậm hơn so với 2 và 3. Trong khi đó tốc độ bơm cao hơn đáng kể so với thí nghiệm 2.

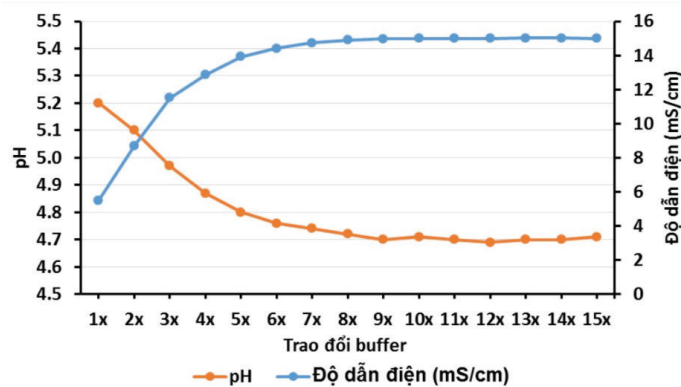
Hiệu suất sau cô mẫu của các thí nghiệm không khác biệt đáng kể và đều nằm trong khoảng đạt yêu cầu.

Như vậy, điều kiện áp suất cô mẫu tối ưu được lựa chọn theo thí nghiệm 2: Pf 2,0 bar, Pr 1,5 bar. Mẫu ban đầu được cô mẫu 10 lần sau đó tiến hành trao đổi buffer (DF - Diafiltration).

\* Tối ưu hóa quá trình trao đổi với đệm bảo quản:

Bảng 3: Kết quả tối ưu quá trình trao đổi dung dịch đệm bảo quản.

Trao đổi buffer	Độ dẫn điện (ms/cm)	pH	V dung dịch đệm đầu thải (ml)	Tốc độ đầu thải (LMH)	Hiệu suất (%)
1x	5,5	5,2	100	73,5	99,09
2x	8,67	5,1	200	74,43	99,08
3x	11,5	4,97	300	75,15	99,08
4x	12,85	4,87	400	75,96	99,01
5x	13,92	4,8	500	76,56	98,94
6x	14,42	4,76	600	77,46	98,92
7x	14,75	4,74	700	77,94	98,93
8x	14,89	4,72	800	78,06	98,85
9x	14,97	4,7	900	78,15	98,80
10x	14,99	4,71	1000	78,3	98,70
11x	14,99	4,7	1100	78,24	98,62



Hình 5: Kết quả quá trình trao đổi đệm bảo quản.

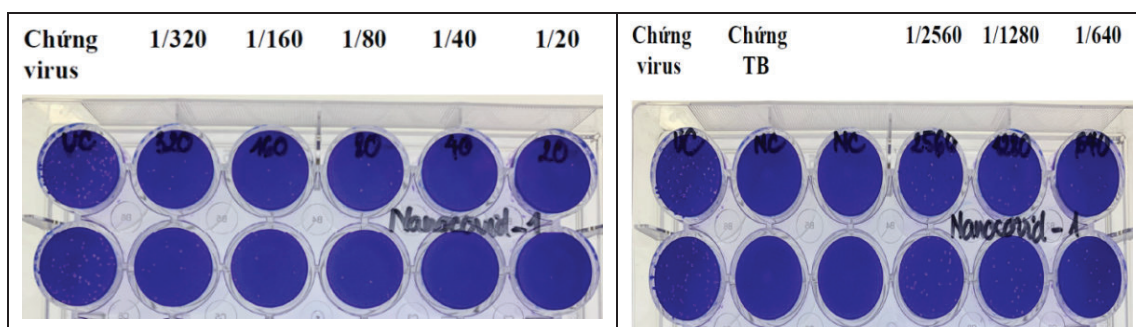
Sau khi trao đổi dung dịch đệm với 11 lần kết quả cho thấy sau 9 lần thể tích dung dịch đệm pH đạt 4,71 và độ dẫn điện đạt 14,97 ms/cm tương đương với dung dịch đệm và hiệu suất thu hồi 98,70%. Khi nhìn lên biểu đồ ta có thể thấy nếu tiếp tục trao đổi thì độ dẫn điện và pH cũng không thay đổi đáng kể nhưng lại kéo dài thời gian, tốn kém dung dịch, hóa chất và giảm hiệu suất thu hồi. Tốc độ đầu thải trung bình của quá trình trao đổi dung dịch đệm là 77,134 LMH (Bảng 3, Hình 5).

#### 4. Thử hoạt tính trung hòa SARS-CoV-2

Bảng 4: Kết quả hoạt tính trung hòa SARS-CoV-2 của scFv CR3022.

ST	Mẫu	OD450	Hoạt tính trung hòa (%)	Kết quả
1	Chứng âm	2,300		
2	Chứng dương	0,075		
3	scFv - pha về nồng độ 100 µg/ml	1,230	47%	Dương tính

Mẫu kháng thể scFv CR3022 cho kết quả thử nghiệm hoạt tính trung hòa SARS-CoV-2 đạt 47% dương tính ở nồng độ 100 µg/ml (Bảng 4).



Hình 6: Hình ảnh trung hòa SARS-CoV-2 của kháng thể scFv trong môi trường duy trì virus (DMEM bổ sung 2% FBS).

SARS-CoV-2 với nồng độ xác định được tương tác với kháng thể scFv-3022 (được pha loãng bậc 2) ở 37°C/60 phút. Sau thời gian ủ, hỗn dịch virus-kháng thể được gây nhiễm trên tế bào cảm nhiễm. Nồng độ kháng thể có khả năng trung hòa lượng virus tương ứng, các virus còn lại không bị trung hòa bởi kháng thể scFv 3022 sẽ gây nhiễm tế bào và tạo ra đám hoại tử. Tổng số đám hoại tử xuất hiện sau 96 giờ gây nhiễm được xác định, số lượng đám hoại tử giảm 50% so với chứng virus tại độ pha loãng huyết thanh cuối cùng được xác định là hiệu giá của kháng thể trung hòa scFv 3022 (giá trị  $PRNT_{50}$ ).

Mẫu kháng thể scFv CR3022 với nồng độ 500 µg/ml có khả năng trung hòa SARS-CoV-2 tại độ pha loãng 1/640 (Hình 6).

#### KẾT LUẬN

Dòng tế bào *E.coli* BL21(DE3)-pIKanT7-scFv CR3022 được thiết lập và sử dụng trong sản xuất scFv CR3022 với quy mô công nghiệp 50L. Quy trình nuôi cấy đã được tối ưu hóa với các thông số: Môi trường M4 trong thời gian 24 giờ với mật độ tế bào đạt được cao nhất với  $OD_{600} = 31,07 \pm 0,38$ , protein scFv CR3022 có mức độ biểu hiện cao đạt 43,1%.

Protein scFv CR3022 được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi cation theo phương pháp FT thu được protein có độ tinh sạch 98%, tỷ lệ thu hồi 72%. Protein scFv CR3022 có khả năng trung hòa SARS-CoV-2 đạt 47% dương tính ở nồng độ 100 µg/ml, với nồng độ 500 µg/ml có khả năng trung hòa SARS-CoV-2 tại độ pha loãng 1/640.

Như vậy, chúng tôi đã nghiên cứu và sản xuất thành công kháng thể bán phần chuỗi đơn scFv 3022 từ *E.coli* có độ tinh sạch cao, có khả năng trung hòa SARS-CoV-2, kháng thể này có thể ứng dụng trong sản xuất thuốc điều trị COVID-19.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Bertan, Melis, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody development strategies. *Turk J Biol* 2020; 44: 203-214.
2. Chuong H.V.Q. and Tran Linh Thuoc. Study on medium component and condition to synthesize the recombinant human mini-proinsulin in *E.coli* at pilot scale fermentation. *Regional Symposium on Chemical Engineering - New trends in Technology towards sustainable development. Proceedings 2005*:336-340.
3. Guo, Y-R, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak-an update on the status. *Military Medical Research* 2020; 7(1):1-10.
4. Huang, C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223): 497-506.
5. Meng Yuan, Nicholas C Wu, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 2020.
6. Tian, X, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerging Microbes & Infections* 2020; 9(1):382-385.