



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027117

(51)⁷ C12N 7/02; A61K 39/205

(13) B

(21) 1-2011-03032

(22) 08/04/2010

(86) PCT/FR2010/050679 08/04/2010

(87) WO/2010/116096 14/10/2010

(30) 0952310 08/04/2009 FR; 61/231,394 05/08/2009 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 27/02/2012 287A

(73) Sanofi Pasteur (FR)

14 Espace Henry Vallée, 69007 Lyon, France

(72) FABRE, Virginie (FR); ROCCA, Celine (FR); RIFFARD, Pierre (FR); CALVOSA, Eric (FR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP TINH CHẾ VIRUT BỆNH ĐẠI VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN PHÒNG BỆNH ĐẠI

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế virus bệnh dại, bao gồm một bước chạy sắc ký trao đổi ion duy nhất, trong đó bước này là bước chạy sắc ký trao đổi cation trong đó:

a) dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus này được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký trao đổi cation bao gồm chất nền polymetacrylat mà trên đó các nhóm sulfoisobutyl được ghép vào để virus bệnh dại liên kết với chất mang này, và

b) virus được rửa giải khỏi chất mang nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế virus bệnh dại thu được từ dịch nuôi cấy các tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhìn chung, sản phẩm thu hoạch virus thu được từ các dịch nuôi cấy tế bào bị nhiễm virus không chỉ chứa các virus mong muốn, mà còn chứa cả các tạp chất cần loại bỏ là protein và ADN của các tế bào. Cả lượng protein tế bào lẫn ADN được giải phóng đều lớn hơn nếu các virus này có vai trò đáng kể trong việc phân giải tế bào và/hoặc nếu việc thu hoạch virus được tiến hành muộn. Ngoài các tạp chất có bản chất tế bào, protein của môi trường chứa các tế bào bị nhiễm virus cũng là các tạp chất mà cũng cần loại bỏ trong quá trình thực hiện quá trình tinh chế virus.

Khi các virus được sử dụng để sản xuất vắc xin, các chế phẩm thu được nên có tinh khiết nhất có thể, để ngăn ngừa sự xuất hiện các phản ứng dị ứng liên quan đến các tạp chất protein này. Một số nước cũng giới hạn lượng ADN tế bào tối đa được phép có mặt trong các vắc xin chứa các sản phẩm thu được từ các dòng tế bào liên tục ở 100 pg/liều vắc xin hoặc thậm chí nhỏ hơn.

Nhiều phương pháp tinh chế virus bệnh dại đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này:

Bằng sáng chế Mỹ số 4,664,912 mô tả phương pháp tinh chế virus bệnh dại bằng cách ly tâm theo khu vực sau khi nó được bất hoạt bằng β -propiolacton. Một phương pháp khác là sử dụng kết hợp sắc ký loại theo kích thước và sắc ký trao đổi anion khi thể tích dịch thu gom virus cần tinh chế lớn.

Bằng sáng chế Mỹ số US 4,725,547 mô tả phương pháp tinh chế virus bệnh dại bằng sử dụng sắc ký ái lực trên xenlulofin sulfat (este của xenluloza với axit sulfuric).

Công bố đơn PCT số WO 97/06243 mô tả phương pháp tinh chế các virus, cụ thể là virus bệnh dại, từ dịch nuôi cấy các tế bào Vero bị nhiễm. Phương pháp

này bao gồm bước chạy sắc ký trao đổi anion sau đó là chạy sắc ký trao đổi cation và kết thúc bằng cách chạy sắc ký ái lực liên kết kim loại. Khi sử dụng phương pháp này, lượng ADN còn lại đo được sử dụng kỹ thuật “thử nghiệm tổng ADN ngưỡng” trong một liều vacxin là $\leq 30\text{-}40$ pg.

Kumar A.P và các đồng tác giả, trong tài liệu: *Microbes and Infection* (2005) 7; 1110-1116, đã so sánh hai phương pháp tinh chế virus bệnh dại từ dịch nổi nuôi cấy các tế bào Vero bị nhiễm mà được nuôi cấy trong môi trường chứa huyết thanh bào thai bê. Tài liệu này đã chỉ ra rằng phương pháp tinh chế dựa trên việc sử dụng cột sắc ký trao đổi anion (DEAE-sepharosa CL -6B) cho hiệu quả cao hơn so với phương pháp tinh chế bằng cách ly tâm theo khu vực trên gradient sucroza, vì, với mức độ tinh khiết như nhau xét về lượng protein và các axit nucleic còn lại, hiệu suất thu virus bệnh dại cao hơn so với phương pháp sắc ký. Frazatti-Gallina N.M., trong tài liệu: *Vaccine* (2004) 23; 511-517, cũng đã mô tả phương pháp tinh chế virus bệnh dại từ dịch nổi bề mặt dịch nuôi cấy các tế bào Vero bị nhiễm mà được nuôi trong môi trường không chứa huyết thanh bào thai bê. Phương pháp tinh chế này cũng thực hiện bước chạy sắc ký trao đổi anion trên chất mang dựa trên DEAE-xenluloza, sau bước lọc và cô đặc dịch thu gom virus. Khi sử dụng phương pháp này, lượng ADN còn lại được đo bằng kỹ thuật lai khe/vết <23 pg trong một liều vacxin.

Do đó, khi phương pháp tinh chế virus bệnh dại bao gồm bước chạy sắc ký trao đổi ion, thì có một điều chắc chắn là bước chạy sắc ký trao đổi anion sẽ giữ lại axit nucleic của môi trường chứa virus cần tinh chế, trên chất mang dùng trong chạy sắc ký.

Phương pháp tinh chế virus cho hiệu quả đặc biệt phải là phương pháp có thể loại bỏ tối đa các tạp chất protein và ADN tế bào đồng thời đảm bảo thu được tối đa lượng virus bệnh dại tinh khiết, và hiện nay, vẫn tồn tại nhu cầu đối với các phương pháp mới đáp ứng yêu cầu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tinh chế mới, đáp ứng yêu cầu nêu trên.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp tinh chế mà thích hợp

để tinh chế virus bệnh dại từ dịch thu gom virus mà không chứa huyết thanh động vật hoặc protein huyết thanh và cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế trong đó mọi bước được tiến hành chỉ sử dụng các sản phẩm không có nguồn gốc từ động vật.

Để đạt được các mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất:

Phương pháp tinh chế virus bệnh dại, bao gồm bước chạy sắc ký trao đổi ion duy nhất, trong đó bước này là bước chạy sắc ký trao đổi cation mà theo đó:

- a. dịch nổi bề mặt của dịch nuôi cấy tế bào bị nhiễm virus được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký trao đổi cation gồm chất nền polymetacrylat trên đó các nhóm sulfoisobutyl được ghép vào bằng liên kết đồng hóa trị để virus bệnh dại liên kết với chất mang này, và, sau đó; và
- b. virus được rửa giải khỏi chất mang nó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa huyết thanh động vật hoặc protein huyết thanh bất kỳ.

Theo một khía cạnh khác, dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa protein ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc từ động vật.

Theo một khía cạnh khác nữa, nồng độ của protein ngoại sinh có nguồn gốc không phải từ động vật trong dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại ≤ 15 mg/l.

Theo một khía cạnh khác nữa, dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc từ động vật.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại được lọc trước khi được cho tiếp xúc với chất mang dùng trong chạy sắc ký trao đổi cation.

Phương pháp tinh chế theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, lượng virus đo được trong dịch rửa giải tương ứng với ít nhất 70% lượng virus được đo trong dịch nổi được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký.

Đặc biệt hơn, phương pháp này, khác biệt ở chỗ, tổng lượng protein đo được trong dịch rửa giải tương ứng với nhỏ hơn 40% tổng lượng protein được đo trong dịch nổi được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký và khác biệt ở chỗ lượng

ADN đo được trong dịch rửa giải tương ứng với nhỏ hơn 5%, tốt hơn là nhỏ hơn 2,5%, và thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1% lượng ADN được đo trong dịch nổi được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký.

Theo một phương án khác của phương pháp theo sáng chế, sau khi rửa giải virut khỏi chất mang nó dùng trong sắc ký, dịch rửa giải được cô đặc tùy ý và sau đó được xử lý bằng nucleaza.

Theo một khía cạnh của phương pháp theo sáng chế, nucleaza là endonucleaza, như benzonaza.

Theo một phương án khác của sáng chế, dịch rửa giải sau đó được siêu ly tâm trên gradient sucroza và (các) phần của gradient chứa virut đã tinh chế được thu hồi.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, virut bệnh dại đã tinh chế sau đó bị bất hoạt bằng phương pháp dùng các chất bất hoạt virut.

Theo một khía cạnh cụ thể, chất bất hoạt virut là β -propiolacton.

Theo một khía cạnh ưu tiên, tất cả các bước của phương pháp theo sáng chế được thực hiện sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc không phải từ động vật.

Một đối tượng nữa của sáng chế là phương pháp sản xuất vacxin phòng bệnh dại, trong đó:

- a) dịch nuôi cấy tế bào bị nhiễm virut bệnh dại,
- b) virut bệnh dại được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bị nhiễm theo phương pháp của sáng chế,
- c) hỗn dịch chứa virut được tinh chế thu được trong bước b) được trộn trong đệm bảo quản, và
- d) hỗn dịch chứa virut được tinh chế thu được ở bước c) được chia thành vacxin đơn liều hoặc đa liều.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất vacxin phòng bệnh dại, trong đó:

- a) dịch nuôi cấy tế bào bị nhiễm virut bệnh dại,
- b) virut bệnh dại được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bị nhiễm theo phương pháp của sáng chế,
- c) hỗn dịch chứa virut được tinh chế thu được từ bước b) được trộn trong đệm đông khô,

- d) hỗn hợp thu được từ bước c) được chia thành dạng vacxin đơn liều hoặc đa liều, và
- e) các liều vacxin được đông khô.

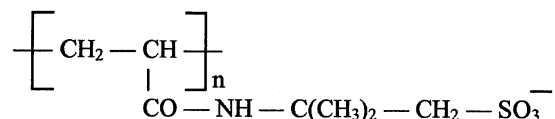
Sau cùng, sáng chế đề xuất vacxin chứa virus bệnh dại được tinh chế và bị bất hoạt, khác biệt ở chỗ, lượng ADN còn lại được xác định bằng PCR định lượng và tổng lượng protein, được đo bằng phương pháp Bradford, có mặt trong một liều hữu hiệu của vacxin (hoặc trong một liều vacxin chứa 2,5 IU theo thử nghiệm NIH) tương ứng nhỏ hơn 20 pg và nhỏ hơn 40 μ g, và tốt hơn là nhỏ hơn 10 pg và nhỏ hơn 20 μ g. Theo một khía cạnh khác, ít nhất 70% tổng lượng protein được chứa trong một liều hữu hiệu của vacxin là protein virus bệnh dại.

Sau cùng, tốt hơn là vacxin theo sáng chế không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc từ động vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp tinh chế virus bệnh dại theo sáng chế bao gồm bước chạy sắc ký trao đổi ion duy nhất, trong đó bước chạy sắc ký này là bước chạy sắc ký trao đổi cation. Tuy nhiên, cần hiểu rằng trong phạm vi của sáng chế, phương pháp tinh chế virus bệnh dại không bị giới hạn ở bước chạy sắc ký duy nhất này, mà còn có thể bao gồm một hoặc nhiều bước bổ sung, với điều kiện các bước bổ sung này không phải là bước chạy sắc ký trao đổi ion. Trái ngược với quan điểm mà các giải pháp đã biết trước đó đưa ra, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng các mức hiệu quả của việc chạy sắc ký trao đổi cation có chất mang chứa chất nền polymetacrylat trong đó các nhóm sulfoisobutyl được ghép bằng liên kết đồng hóa trị, cao hơn các mức hiệu quả của việc chạy sắc ký trao đổi anion. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết này, virus bệnh dại dường như có tính phân cực kép, dương và âm, cho phép nó liên kết với các chất mang trao đổi anion (thuộc loại DEAE) và cả với chất mang trao đổi cation (thuộc loại SO_3^-). Đối với mục đích của sáng chế, “các mức hiệu quả của sắc ký” được tính dựa trên cơ sở lượng virus bệnh dại và lượng ADN được tìm thấy trong dịch rửa giải so với lượng virus và ADN ban đầu mà được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký, trong các giới hạn khả năng tải nạp của chất mang sắc ký. Với lượng virus và ADN tương đương được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký, lượng virus được tìm thấy trong dịch rửa giải

càng cao và lượng ADN còn lại càng nhỏ, thì mức hiệu quả của chất mang sắc ký càng tốt. Các nhóm sulphisobutyl được ghép trên chất nền polymetacrylat bằng các chuỗi polyme linh động sẽ hỗ trợ cho việc tương tác của virus bệnh dại với cột trao đổi cation. Tốt hơn, nếu chuỗi polyme bao gồm một chuỗi các đơn vị monome có công thức:



Các chuỗi polyme này được thu bằng cách polyme hóa đối với monome có công thức hóa học: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ với sự có mặt của chất xúc tác dựa trên xeri mà cũng cho phép ghép vào chất nền polymetacrylat. Chúng bao gồm, trung bình, từ 15 đến 25 đơn vị monome. Chất mang sắc ký thông thường ở dạng hạt, kích cỡ của chúng thường nằm trong khoảng từ 20 đến 100 μm , tốt hơn là từ 40 đến 90 μm . Cụ thể, loại chất mang này được bán bởi MERCK dưới tên Fractogel[®] EMD SO_3^- (loại M). Kiểu chất mang này được nạp vào cột sắc ký, chiều dài và đường kính của cột này được chọn theo thể tích dịch thu gom cần tinh chế. Các kết quả được trình bày trong ví dụ 1 cho thấy rằng các mức hiệu quả tốt được thu chỉ bằng chất mang Fractogel[®] EMD SO_3^- trong số tất cả các chất mang sắc ký trao đổi anion và cation được thử nghiệm. Hiệu suất thu hồi virus rất thấp (nhỏ hơn 10% lượng virus được đưa vào được thu hồi trong dịch rửa giải) thu được với tất cả các chất mang khác được dùng trong sắc ký trao đổi cation được thử nghiệm. Hiệu suất thu hồi virus thu được bằng các chất mang sắc ký trao đổi anion tốt hơn (từ 40 đến 70%), nhưng tuy nhiên vẫn thấp hơn hiệu suất thu hồi virus thu được bằng chất mang Fractogel[®] EMD SO_3^- , mà thường lớn hơn 70% và phổ biến nhất là lớn hơn 80%.

Hơn nữa, lượng ADN bị loại bỏ ít hơn khi sử dụng các chất mang sắc ký trao đổi anion. Đáng ngạc nhiên là chỉ chất mang sắc ký trao đổi cation bao gồm chất nền polymetacrylat trên đó các nhóm sulphisobutyl, mà đóng vai trò làm các phối tử, được ghép bằng liên kết đồng hóa trị khiến nó có thể tinh chế, ở các mức hiệu quả tốt, virus từ dịch nuôi cấy tế bào bị nhiễm virus bệnh dại. Trong bước chạy sắc ký trao đổi cation, hơn 60% tổng lượng protein, và ít nhất 2,5 $\log_{10}$ của lượng ADN, tốt hơn là ít nhất 3,0 $\log_{10}$ của lượng ADN và thậm chí tốt hơn nữa là

ít nhất $3,5 \log_{10}$ của lượng ADN (mà tương ứng với việc loại bỏ hơn 99% lượng ADN tế bào) được loại bỏ, trong khi đó vẫn giữ được hiệu suất thu hồi virus bệnh dại ở ít nhất là 70% (nghĩa là lượng virus bệnh dại có mặt trong dịch rửa giải tương ứng với ít nhất là 70% lượng virus ban đầu được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký) và tốt hơn là ít nhất 80%. Các mức hiệu quả này được quan sát thấy, cụ thể là khi dịch nổi nuôi cấy tế bào nhiễm virus bệnh dại không chứa huyết thanh động vật hoặc protein huyết thanh như albumin. Do đó, lượng của protein tổng số và lượng ADN đo được trong dịch rửa giải sau khi chạy sắc ký chứa, lần lượt nhỏ hơn 40% tổng lượng protein có mặt trong thể tích của dịch nổi nuôi cấy tế bào nhiễm virus bệnh dại mà được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký và nhỏ hơn 5%, tốt hơn là nhỏ hơn 2,5%, và thậm chí tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1% lượng ADN có mặt trong thể tích dịch nổi nuôi cấy tế bào nhiễm virus bệnh dại mà được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký. Nói cách khác, ít nhất 70% và tốt hơn là ít nhất 80% của lượng virus bệnh dại có mặt trong thể tích dịch nổi được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký được phát hiện thấy trong dịch rửa giải.

Với mục đích của sáng chế, “protein tổng số” chỉ tất cả protein có mặt trong nguyên liệu được phân tích. Thuật ngữ này bao gồm protein của virus bệnh dại, protein tế bào, protein của môi trường nuôi cấy tế bào và/hoặc của môi trường nhiễm virus và protein mà được đưa vào trong khi thực hiện phương pháp sản xuất và tinh chế virus bệnh dại (ví dụ, trypsin và/hoặc benzonaza). Protein tế bào và protein của môi trường nuôi cấy và/hoặc của môi trường nhiễm virus và cả protein mà được đưa vào trong suốt quá trình sản xuất và/hoặc tinh chế virus bệnh dại, đều là các tạp chất (các tạp chất protein) mà dự định được loại bỏ, trong khi đó mục đích là giữ lại protein virus bệnh dại nhiều nhất có thể. Protein virus bệnh dại là glycoprotein G, nucleoprotein N, phosphoprotein P, protein gian bào N và ARN polymeraza L.

Lượng virus bệnh dại được đánh giá trên cơ sở đo glycoprotein virus bệnh dại G. Việc đo này thường được thực hiện bằng phương pháp ELISA “bánh kẹp”, bằng cách sử dụng hai kháng thể tốt hơn là nhận biết hai epitop cấu dạng của protein G như được mô tả trong ví dụ 1. Ví dụ, kháng thể trung hòa nhận biết epitop cấu dạng nằm ở vị trí kháng nguyên IIc của glycoprotein G (Journal of Clinical investigation (1989), tập 84, trang từ 971 đến 975) có thể được sử dụng

làm kháng thể bất giữ, và kháng thể trung hòa nhận biết epitop cấu dạng nằm ở vị trí kháng nguyên III của glycoprotein G (Biologicals (2003), tập 31, các trang từ 9 đến 16) có thể được sử dụng làm kháng thể phát hiện. Các kết quả được biểu thị theo IU trên cơ sở dùng chất chuẩn tham chiếu mà được định cỡ so với chất tham chiếu quốc tế NIBSC.

Phương pháp Bradford, mà đã được biết rõ đối với người có kỹ năng về lĩnh vực này, được sử dụng để định lượng protein tổng số.

Để định lượng ADN, tốt hơn là sử dụng phương pháp định lượng PCR (PCR quantitative - qPCR) dựa trên việc định lượng đoạn ADN của bộ gen của tế bào (tốt hơn là nhắm tới đoạn ADN mà lặp lại nhiều lần trong bộ gen của tế bào). Khi virus bệnh dại được tạo ra từ các tế bào Vero, việc định lượng ADN còn lại trong quá trình tinh chế virus được thực hiện dựa trên việc định lượng đoạn ADN vệ tinh alpha của khỉ xanh châu Phi sau khi khuếch đại PCR sử dụng phương pháp tương tự với phương pháp được mô tả bởi J.A và các đồng tác giả trong tài liệu: Developments in Biologicals (2006), tập 123, các trang 35-44, và phần mô tả chi tiết được đưa ra trong ví dụ 1. Phương pháp này là rất thuận lợi vì nó có thể định lượng các ADN tế bào có hơn 200 cặp bazơ.

Dịch nuôi cấy chứa virus bệnh dại được sản xuất từ dịch nuôi cấy tế bào bị nhiễm virus bệnh dại. Dịch nuôi cấy bất kỳ của các tế bào trong đó virus bệnh dại sao chép, đều thích hợp cho đối tượng của sáng chế. Các dịch nuôi cấy này có thể là các dịch nuôi cấy ban đầu của các mô động vật, như các dịch nuôi cấy phôi gà ban đầu (ví dụ, các dịch nuôi cấy nguyên bào sợi phôi gà ban đầu (PCEF)), các dịch nuôi cấy của não chuột mới sinh ban đầu, hoặc các dịch nuôi cấy thận khỉ, thỏ, chuột đồng hoặc chó ban đầu, nhưng dịch nuôi cấy các tế bào có nguồn gốc từ các dòng tế bào được xác định mà thu được từ các dịch nuôi cấy ban đầu của các mô động vật được ưu tiên sử dụng. Các dòng tế bào cụ thể là các dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật linh trưởng, như dòng tế bào VERO, WI-38, MRC5 hoặc PERC.6 hoặc dòng 293, từ ngựa, từ bò (như dòng MDBK), từ cừu, từ chó (như dòng MDCK), từ mèo hoặc từ bộ gặm nhấm (như dòng BHK21, HKCC hoặc CHO).

Đặc biệt tốt hơn nếu dòng tế bào Vero được sử dụng, dòng này có nhiều ưu điểm: Nó là dòng tế bào liên tục mà dễ dàng nuôi cấy ở quy mô công nghiệp, mà

có khả năng gây đột biến rất yếu và rất nhạy cảm với virus bệnh dại.

Các tế bào có thể được nuôi cấy trong hỗn dịch hoặc trên chất mang tùy theo việc liệu chúng có tính chất kết dính hay không, theo chế độ mẻ hoặc chế độ cung cấp theo mẻ hoặc theo kiểu nuôi cấy cung cấp liên tục. Trong trường hợp dịch nuôi cấy dòng tế bào ở quy mô công nghiệp hoặc bán công nghiệp, thùng nuôi cấy sinh học thường được sử dụng, thể tích của nó lớn hơn 10 lít và có thể tăng lên đến hơn 2000 lít, bao gồm hệ thống khuấy, thiết bị phun dòng khí CO₂ và thiết bị tạo oxy. Thùng này cũng được trang bị đầu dò để đo các thông số bên trong của thùng nuôi cấy sinh học, như độ pH, lượng oxy hòa tan, nhiệt độ, áp suất của thùng, hoặc một số thông số hóa lý của dịch nuôi cấy (như mức tiêu thụ glucoza hoặc glutamin hoặc mức sản xuất lactat và các ion amoni). Đầu dò độ pH, oxy và nhiệt độ được kết nối thùng nuôi cấy sinh học để liên tục điều chỉnh các thông số này. Trong trường hợp các dòng tế bào kết dính được nuôi cấy trong các thùng nuôi cấy sinh học, thì môi trường nuôi cấy chứa các vi chất mang mà là các vi hạt để gắn các tế bào. Các vi chất mang này được giữ trong hỗn dịch bằng cách khuấy cơ học, hoặc bằng các dòng khí. Trong trường hợp các tế bào của dòng tế bào Vero, thường sử dụng các vi chất mang có chất nền tĩnh điện kết dính dựa vào dextran được thể bằng các nhóm N,N-diethylaminoethyl, mà cụ thể được bán bởi Amersham Biosciences dưới tên Cytodex 1 hoặc Cytodex 2. Các vi hạt Cytodex 3 được bán bởi Amersham Biosciences có thể cũng được sử dụng làm các vi chất mang.

Môi trường được sử dụng để nuôi cấy các tế bào, cũng được biết như môi trường nuôi cấy tế bào, có thể được bổ sung hoặc không được bổ sung huyết thanh có nguồn gốc động vật, hoặc chứa một hoặc nhiều protein huyết thanh như albumin, hoặc không chứa protein bất kỳ có nguồn gốc động vật, hoặc thậm chí là không chứa protein bất kỳ. Tốt hơn là sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh động vật bất kỳ hoặc protein huyết thanh bất kỳ như albumin mà có thể phát triển các phản ứng quá mẫn ở cá thể được chủng (Swanson M.C. et al., Journal of Infectious Disease (1987); 155(5):909-913). Đặc biệt tốt hơn là, sử dụng môi trường nuôi cấy không chứa protein có nguồn gốc động vật bất kỳ, hoặc thậm chí là không chứa sản phẩm có nguồn gốc động vật bất kỳ. Thuật ngữ “protein hoặc sản phẩm có nguồn gốc động vật” chỉ protein hoặc sản phẩm mà

phương pháp sản xuất chúng bao gồm ít nhất một bước sử dụng nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật hoặc từ người. Điều này có thể làm giảm nguy cơ truyền bệnh như BSE mà có liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm sinh học có nguồn gốc động vật. Môi trường nuôi cấy thường chứa lượng protein rất thấp sẽ được sản xuất, ví dụ, ở dạng các protein tái tổ hợp hoặc được chiết từ các thực vật (đậu tương, gạo, .v.v.) hoặc từ nấm men. Nồng độ protein nhìn chung ≤ 15 mg/l, được đo bằng phương pháp Bradford. Môi trường nuôi cấy thường chủ yếu chứa protein có trọng lượng phân tử thấp (≤ 10 KDA) mà thực tế là các polypeptit. Cụ thể, đây là trường hợp của môi trường VP SFM được bán bởi Invitrogen mà thích hợp cho phương pháp của sáng chế, cụ thể là để nuôi cấy các tế bào Vero. Cũng có thể kể tới các môi trường như Opti ProTM không chứa huyết thanh (Invitrogen), Episerf (Invitrogen), Ex-cell[®] MDCK (Sigma-Aldrich), Ex-cellTM Vero (SAFC biosciences), MP-BHK[®] không chứa huyết thanh (MP Biomedicals), SFC-10 không chứa huyết thanh biểu hiện BHK (Promo cell), SFC-20 không chứa protein biểu hiện BHK (Promo cell), HyQ PF Vero (Hyclone Ref. SH30352.02), Hyclone SFM4 Megavir, môi trường MDSS2 (Axccl biotechnology), môi trường DMEM cải biến của Iscove (Hyclone), môi trường dinh dưỡng Ham (Ham's -F10, Ham's -F12) và môi trường Leibovitz L-15 (Hyclone), mà là các môi trường không chứa sản phẩm bất kỳ có nguồn gốc động vật và thường chứa lượng protein thấp (≤ 15 mg/l).

Virus bệnh dại có thể có nguồn gốc bất kỳ với điều kiện là nó sao chép trong các tế bào nhạy với virus bệnh dại. Các chủng virus bệnh dại được tạo ra từ thể phân lập ban đầu thường được sử dụng, như chủng Pasteur 2061, chủng VP-11 hoặc chủng Pitman-Moore 1.503-3 M. Các chủng rất độc này dự định được dùng để sản xuất vaccine phòng bệnh dại bất hoạt. Cũng có thể sử dụng các chủng virus bệnh dại mà đã làm giảm hiệu lực cho mục đích sản xuất vaccine phòng bệnh dại bị giảm hoạt lực sống. Chúng ví dụ là, chủng SAD Bern hoặc chủng SAD B19 hoặc các chủng thu được từ các chủng này, như các chủng SAG1 và SAG2 thu được từ chủng SAD Bern do sự tồn tại của các đột biến điểm trong glycoprotein của virus bệnh dại G (EP350398, EP583998). EP1253197 cũng mô tả các chủng virus bệnh dại khác bị giảm hoạt lực ổn định hơn chứa một hoặc nhiều đột biến điểm trong phosphoprotein P và glycoprotein G của virus bệnh dại.

Dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại thu được sử dụng môi trường nhiễm virus thay cho môi trường nuôi cấy tế bào ở thời điểm gây nhiễm các tế bào và chúng dùng để sản xuất virus bệnh dại bằng các tế bào bị nhiễm. Thành phần hóa học của môi trường nhiễm virus có thể giống hoặc có thể khác với thành phần của môi trường nuôi cấy tế bào. Môi trường nhiễm virus, giống như môi trường nuôi cấy tế bào, có thể được bổ sung huyết thanh có nguồn gốc động vật hoặc với một hoặc nhiều protein huyết thanh, nhưng môi trường nhiễm virus tốt hơn là không chứa huyết thanh động vật bất kỳ hoặc protein huyết thanh bất kỳ vì các lý do ở trên. Đặc biệt tốt hơn là, môi trường nhiễm virus không chứa protein có nguồn gốc động vật bất kỳ, hoặc thậm chí là không chứa sản phẩm có nguồn gốc động vật bất kỳ, để phòng ngừa nguy cơ truyền bệnh như BSE mà có thể liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm sinh học có nguồn gốc động vật. Thông thường, môi trường nhiễm virus chứa lượng protein rất thấp sẽ được tạo ra, ví dụ, ở dạng protein tái tổ hợp hoặc các protein được chiết từ thực vật (đậu tương, gạo, .v.v.) hoặc từ nấm men. Nồng độ protein thường ≤ 15 mg/l, được đo bằng phương pháp Bradford. Nó thường chủ yếu chứa protein có trọng lượng phân tử thấp (≤ 10 kDa) mà thực tế là các polypeptit. Theo một khía cạnh cụ thể, môi trường nhiễm virus không chứa protein có trọng lượng phân tử cao hơn 10 kDa. Môi trường nhiễm virus không chứa sản phẩm có nguồn gốc động vật bất kỳ và chứa lượng thấp protein (nồng độ ≤ 15 mg/l) có thể được kể tới là môi trường VP SFM (Invitrogen), môi trường Leibovitz L-15, môi trường MEM (Sigma-Aldrich), môi trường Hyclone SFM4MegavirTM (Hyclone) hoặc, tùy ý, một trong số các môi trường dựa trên các chất chiết thực vật như được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 99/4768. Ví dụ, khi virus bệnh dại được sản xuất từ dịch nuôi cấy các tế bào dòng Vero, thì dịch nổi nuôi cấy tế bào nhiễm virus thường được thu bằng việc sử dụng môi trường không chứa protein huyết thanh bất kỳ hoặc thậm chí là không chứa sản phẩm có nguồn gốc động vật bất kỳ, như các môi trường được đề cập ở trên, làm môi trường nhiễm virus.

Tùy theo thành phần của môi trường nuôi cấy tế bào và của môi trường nhiễm virus, dịch nổi nuôi cấy tế bào nhiễm virus bệnh dại có thể có ưu điểm sau:

- không chứa protein huyết thanh bất kỳ hoặc,
- không chứa protein ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật, hoặc thậm chí

- không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật.

Khi dịch nổi nuôi cấy tế bào nhiễm virus bệnh dại không chứa protein ngoại sinh bất kỳ hoặc không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật, thì protein ngoại sinh có nguồn gốc không phải động vật mà được phát hiện thấy trong dịch nổi thường ở nồng độ rất thấp (≤ 15 mg/l) được đo bằng phương pháp Bradford.

Thuật ngữ “protein hoặc sản phẩm ngoại sinh” được dự định dùng để chỉ sản phẩm bất kỳ hoặc protein bất kỳ không phải là thành phần của virus bệnh dại hoặc của các tế bào mà được sử dụng để tạo ra virus bệnh dại. Các protein hoặc sản phẩm ngoại sinh là các thành phần được đưa vào trong quá trình sản xuất và/hoặc tinh chế virus bệnh dại. Ví dụ, protein hoặc các sản phẩm có mặt trong thành phần của môi trường nuôi cấy, các enzym, như trypsin hoặc benzonaza, mà được đưa vào hoặc các sản phẩm được đưa vào trong quá trình sản xuất và/hoặc tinh chế virus bệnh dại là các protein hoặc sản phẩm ngoại sinh. Các protein/sản phẩm ngoại sinh có nguồn gốc động vật khi phương pháp sản xuất chúng bao gồm ít nhất một bước sử dụng nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật hoặc từ người. Các protein/sản phẩm ngoại sinh có nguồn gốc không phải động vật khi chúng được sản xuất bằng các phương thức khác, ví dụ sử dụng nguyên liệu thực vật, bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng cách tái tổ hợp gen sử dụng nấm men, vi khuẩn hoặc thực vật.

Việc thu gom các dịch nổi nuôi cấy chứa virus gây nhiễm thường bắt đầu từ 2 đến 3 ngày sau khi có các tế bào bị nhiễm, và tiếp tục trong khoảng hai tuần kể từ khi virus không tan nhiều. Sau mỗi lần thu gom, các tế bào bị nhiễm được đưa trở lại để nuôi cấy với môi trường nhiễm virus mới. Các protein được phát hiện thấy trong các dịch nổi nuôi cấy có nguồn gốc tế bào hoặc virus hoặc có nguồn gốc từ môi trường nhiễm virus và, ở mức độ rất nhỏ, từ môi trường nuôi cấy tế bào. Có thể bảo quản tất cả các dịch thu gom, hoặc chỉ giữ lại các dịch thu gom có hiệu giá gây nhiễm rất cao. Các dịch thu gom có thể được bảo quản riêng biệt. Có thể trộn nhiều dịch thu gom với nhau. Các dịch thu gom thường được giữ ở nhiệt độ khoảng $+5^{\circ}\text{C}$ hoặc dạng đông lạnh.

Để phòng ngừa, dịch nổi nuôi cấy chứa virus cần tinh chế được lọc trước bước chạy sắc ký trao đổi cation để loại bỏ các mảnh vụn tế bào thô, các khối kết

tụ có thể có mặt, và các vi chất mang còn lại khi việc nuôi cấy tế bào được thực hiện trên các vi chất mang. Phương pháp lọc bất kỳ đã biết đối với người có kỹ năng về lĩnh vực này có thể được sử dụng trong phương pháp của sáng chế. Ví dụ, có thể ly tâm các dịch nổi hoặc thực hiện chạy sắc ký loại theo kích thước để lọc dịch nổi nuôi cấy. Việc lọc thường được thực hiện bằng cách lọc qua màng tiếp tuyến và/hoặc mặt trước và/hoặc theo độ sâu sử dụng một hoặc nhiều màng lọc, độ xốp của các màng lọc này thường nằm trong khoảng từ 0,2 đến 1,5 μm , tốt hơn là từ 0,4 đến 1,0 μm . Việc lọc có thể được thực hiện bằng cách lọc một lần dịch nổi nuôi cấy trong các trường hợp có ít mảnh vụn tế bào và ít khối kết tụ. Việc lọc có thể cũng được thực hiện bằng việc kết hợp ít nhất hai quá trình lọc liên tiếp, quá trình lọc đầu tiên được thực hiện, ví dụ, bằng bộ lọc tương đối thô, ví dụ, có độ xốp từ 0,3 đến 1,5 μm , trong khi quá trình lọc thứ hai được thực hiện bằng bộ lọc tương đối mịn, ví dụ, có độ xốp từ 0,2 đến 0,5 μm . Cũng có thể sử dụng bước lọc trước, trước hết, sử dụng bộ lọc sơ bộ có độ xốp lớn (từ 2 đến 10 μm) để loại bỏ các mảnh vụn tế bào lớn. Các bộ lọc thích hợp cho mục đích của sáng chế, có thể được kể tới là các bộ lọc xenluloza, các sợi xenluloza tái tạo, các sợi xenluloza kết hợp với bộ lọc vô cơ (ví dụ, trên các tảo cát, trên peclit hoặc trên khối silic oxit), các bộ lọc xenluloza được kết hợp với các bộ lọc vô cơ hoặc các nhựa hữu cơ, hoặc các bộ lọc trên polyme, như bộ lọc, ví dụ, nylon, polypropylen, polyvinyliden được flo hóa hoặc polyetesulfon. Cụ thể, các bộ lọc này được bán dưới tên thương mại Durapore[®], Millipak[®] hoặc Millidisk[™] được phân phối bởi công ty Millipore hoặc bộ lọc được phân phối bởi công ty Pall. Với hệ thống lọc theo độ sâu, có thể kể tới bộ lọc theo độ sâu thuộc loạt sản phẩm AP (AP01), loạt sản phẩm CP (CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), loạt sản phẩm HP (HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), của dãy CA (CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90) và loạt sản phẩm SP (SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90) được cung cấp bởi công ty CUNO, bộ lọc CUNO Delipid và Delipid Plus, và bộ lọc theo độ sâu thuộc loạt sản phẩm CE (CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75) và thuộc loạt sản phẩm DE (DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE60, DE65, DE70, DE75) được cung cấp bởi công ty Millipore corp., bộ lọc thuộc loạt sản phẩm HC (A1 HC, B1HC, COHC) và bộ lọc Clarigard và Polygard từ công ty Millipore corp. Đối với hệ thống lọc khác,

có thể kể đến là bộ lọc theo độ sâu được phân phối bởi công ty ManCel (ví dụ, PR 12 UP, PH12, PR 5 UP) hoặc bộ lọc từ PALL hoặc từ công ty SeitzShenk Inc (ví dụ, Bio20, SUPRA EKIP, KS-50P). Thuận lợi là bước lọc có thể được thực hiện bằng viên nang lọc gồm hai màng có độ xốp khác nhau, lượng này đủ để thực hiện lần quá trình lọc liên tục trong một bước duy nhất. Các viên nang lọc Sartopore-2 được bán bởi Sartorius, bao gồm màng 0,8 μm và màng 0,45 μm , rất thích hợp để lọc dịch nuôi cấy. Bước lọc trước như được đề cập ở trên có thể cũng được thực hiện trước, nếu cần.

Bất kể việc dịch nuôi cấy có được lọc hay không, nếu cần độ pH phải được điều chỉnh đến pH từ 7 đến 8, tốt hơn là từ 7,0 đến 7,6. Cũng cần xác thực được việc độ dẫn điện của dịch nổi sau khi lọc ≤ 20 mS/cm, tốt hơn là từ 10 đến 20 mS/cm, và đặc biệt tốt hơn là từ 14 đến 18 mS/cm. Dịch nổi nuôi cấy sau đó được đưa vào cột sắc ký trao đổi cation chứa các hạt Fractogel[®] EMD SO_3^- (loại M) và kích thước của các hạt này phải phù hợp với thể tích dịch nổi cần tinh chế. Cột được cân bằng trước trong dung dịch đệm cân bằng có nồng độ ion thấp (≤ 200 mM). Sau đó, cột được rửa bằng đệm rửa mà thường có cùng thành phần như dung dịch đệm cân bằng. Chất rời khỏi cột phần lớn là các tạp chất protein và axit nucleic. Virut được giữ lại trên cột sau đó được rửa giải sử dụng đệm rửa giải, nồng độ ion của đệm rửa giải này ít nhất là 400 mM. Ví dụ về các dung dịch đệm thích hợp cho mục đích của sáng chế, có thể kể đến là dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl 150mM, độ pH=7,5, để làm cân bằng và rửa cột, và dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl, 600 mM, độ pH=7,5, làm đệm rửa giải virut, nhưng các dung dịch đệm tương đương khác bất kỳ có thể cũng phù hợp. Với khả năng chứa của cột được thử nghiệm, hơn 70% lượng virut được đưa vào cột ban đầu được thu hồi trong dịch rửa giải, trong khi lượng ADN và tổng lượng protein có mặt trong dịch rửa giải lần lượt thể hiện nhỏ hơn 5% và nhỏ hơn 40% lượng ADN và tổng lượng protein ban đầu đã được đưa vào cột. Các kết quả này thu được cụ thể khi các dịch nổi nuôi cấy nhiễm virut không chứa huyết thanh có nguồn gốc động vật hoặc không chứa protein huyết thanh hoặc chỉ chứa protein ngoại sinh có nguồn gốc không phải động vật ở các nồng độ thấp (≤ 15 mg/l).

Các tác giả sáng chế cũng cho thấy rằng, bằng việc kết hợp bước chạy sắc ký trao đổi cation trên chất mang bao gồm chất nền polymetacrylat trên đó các

nhóm sulfoisobutyl được ghép bởi liên kết đồng hóa trị, với bước tiêu hóa axit nucleic bằng enzym, cũng có thể làm giảm mức ADN dư đến khoảng 1,5 đến $2 \log_{10}$ nữa, đến mức mà, bằng cách kết hợp hai bước này, ít nhất $4,0 \log_{10}$ lượng ADN được loại bỏ thành công. Bằng cách so sánh, sử dụng phương pháp loại bỏ các axit nucleic dựa vào sự tiêu hóa axit nucleic bằng enzym mà được lặp lại hai lần, thu được mức loại bỏ ADN không vượt quá $3,5 \log_{10}$, bước tiêu thụ thứ hai không cho phép mức ADN dư giảm dưới 0,5 đến $1 \log_{10}$ nữa (xem ví dụ 2). Tác nhân enzym dùng để tiêu hóa axit nucleic có thể được kể tới là một hoặc nhiều enzym, tốt hơn là ARNza và/hoặc ADNza, hoặc hỗn hợp của các endonucleaza đã được biết với người có kỹ năng về lĩnh vực này, ví dụ PulmozymeTM. Theo nội dung mô tả phương pháp của sáng chế, BenzonazaTM, tốt hơn là được thu bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen, thường được sử dụng, trong khoảng nồng độ thường từ 1 đến 50 U/ml. Nó là endonucleaza mà hoạt động bằng cách phân cắt nhanh chóng ADN và ARN tế bào ở dạng các mảnh nhỏ xiu và làm giảm độ nhớt của môi trường. Nhiệt độ và khoảng thời gian xử lý bằng enzym là các thông số mà có thể dễ dàng kiểm soát bởi người có kỹ năng về lĩnh vực này và phụ thuộc vào nồng độ endonucleaza ban đầu trong môi trường phản ứng. Để ngăn ngừa hiện tượng kết tụ bất kỳ, một lượng rất nhỏ chất hoạt động bề mặt, mà tốt hơn là không phân ly, như poloxamer 188 (Pluronic F 68) có thể được thêm vào ở nồng độ rất thấp vào dịch rửa giải sắc ký. Trước bước xử lý bằng enzym, dịch rửa giải tùy ý có thể được cô đặc khi thể tích lớn hơn. Bước cô đặc thường được thực hiện bằng phương pháp siêu thẩm lọc có ngưỡng phân loại từ 100 kDa đến 300 kDa, tốt hơn là từ 100 kDa đến 200 kDa. Quá trình siêu lọc này đặc trưng bởi dòng chảy tiếp tuyến qua màng tạo ra lực cho phép các phân tử khuếch tán qua màng xốp. Dòng được đưa vào bằng bơm tái tuần hoàn sẽ được chia thành hai thành phần: dòng tái tuần hoàn sẽ thực hiện việc cuốn (hoặc dòng ra không qua màng) và dòng dịch lọc (dòng thấm qua) mà đi qua màng. Thành phần của màng có thể, theo cách không bị giới hạn, được tạo ra từ xenluloza tái tạo, từ polyetesulfon, từ polysulfon hoặc từ các dẫn xuất của các sản phẩm này. Nó có thể ở dạng tấm phẳng nằm bên trong băng catxet (cụ thể dùng để siêu lọc kiểu tiếp tuyến) hoặc ở dạng các sợi rỗng. Các màng này cụ thể được bán bởi Pall dưới tên màng OmegaTM, bởi Millipore dưới tên màng BiomaxTM, và bởi Sartorius dưới tên Sartocon®. Áp suất

ngược có thể cũng được đưa vào từ phía dịch lọc (thẩm lọc) để làm giảm áp suất qua màng, như được mô tả trong WO 2006/108707. Khi dịch rửa giải đi qua màng, thể tích dịch rửa giải giảm và virus không đi qua màng được cô đặc. Khi dịch rửa giải được siêu lọc, thể tích của nó có thể giảm một hệ số mà có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 100, hoặc thậm chí 150, do đó có thể thu được thể tích cuối cùng mong muốn. Bước cô đặc này có thể được hoàn thành với bước thẩm tách có thể thay đổi thành phần của dung dịch đệm tuy nhiên không làm thay đổi thể tích của dòng ra không qua màng. Điều này được khuyến cáo khi thành phần của dung dịch đệm trong dòng ra không qua màng, do việc giảm thể tích dịch rửa giải, không còn tương thích với hoạt tính enzym tốt của endonucleaza. Dung dịch đệm, mà có thành phần tương thích với hoạt tính enzym tốt của endonucleaza, sau đó được thêm vào dòng tái tuần hoàn dòng ra không qua màng. Ví dụ, và không bị giới hạn về bản chất, có thể kể đến các thành phần đệm tương thích với hoạt tính enzym cao của endonucleaza như BenzonazaTM: chúng chứa dung dịch đệm Tris với khoảng nồng độ tính theo mol từ 10 đến 50 mM, MgCl₂ với khoảng nồng độ thường từ 1 đến 10 mM và, tùy ý, một muối khác, như NaCl, với khoảng nồng độ từ 100 mM đến 600 mM, độ pH của các dung dịch đệm này nằm trong khoảng pH từ 7,0 đến 8,0. Như được chỉ ra ở trên, dịch rửa giải thu hồi được sau bước sắc ký có thể cũng được xử lý trực tiếp bằng cách thêm MgCl₂ trong khoảng nồng độ thường từ 1 đến 10 mM và sau đó endonucleaza, như BenzonazaTM, ở nồng độ mong muốn.

Để hoàn thành việc loại bỏ các tạp chất protein và loại bỏ benzonaza, cụ thể, dịch rửa giải đã được xử lý bằng endonucleaza sẽ được siêu ly tâm với gradient sucroza, có thể lặp lại bước siêu ly tâm này một hoặc nhiều lần. Việc siêu ly tâm cho phép virus bệnh dại được phân lập bằng cách điều chỉnh độ chênh lệch của hệ số lắng giữa nhiều thực thể khác nhau có mặt trong dịch rửa giải: các tạp chất protein di chuyển tới nơi có mật độ sucroza thấp ($\leq 35\%$ sucroza), trong khi virus bệnh dại ở nơi có mật độ sucroza cao hơn ($\geq 35\%$ sucroza). Bước siêu ly tâm theo gradient sucroza thường được thực hiện theo phương pháp “dòng liên tục” khi các thể tích cần xử lý lớn, hoặc theo kiểu quay khi các thể tích tương đối nhỏ. Việc siêu ly tâm theo gradient sucroza thường được thực hiện trên “lớp đệm sucroza” ở nhiệt độ khoảng 5°C. Dịch rửa giải đã xử lý bằng endonucleaza có thể

ở dạng không cô đặc hoặc ở dạng được cô đặc 10 lần, 20 lần, 50 lần, 100 lần, 150 lần, hoặc nhiều hơn. Tỷ lệ giữa tổng thể tích dịch rửa giải được siêu ly tâm và tổng thể tích gradient sucroza thường từ 0,5 đến 2,0, và tốt hơn là từ 0,5 đến 1,5. Mật độ của “lớp đệm” sucroza tỷ trọng thấp thường nằm trong khoảng từ 10% đến 35% trọng lượng, trong khi mật độ của “lớp đệm” sucroza tỷ trọng cao thường nằm trong khoảng từ 40% đến 60% trọng lượng. Thể tích của sucroza tỷ trọng thấp thường lớn hơn thể tích của sucroza tỷ trọng cao, chúng lớn hơn nhiều nếu thể tích của dịch rửa giải trải qua bước siêu ly tâm lớn. Tỷ lệ giữa thể tích của sucroza tỷ trọng cao và thể tích của sucroza tỷ trọng thấp thường từ 0,3 đến 0,7. Khoảng thời gian siêu ly tâm phụ thuộc tốc độ ly tâm, mà thường ≥ 30000 g. Thời gian siêu ly tâm 2 giờ thường là đủ khi tốc độ siêu ly tâm ≥ 65000 g. Sau khi siêu ly tâm, sản phẩm được phân phối theo gradient được lấy ra sử dụng bơm nhu động và được phân đoạn. Lượng sucroza chứa trong mỗi phân đoạn được đo sử dụng khúc xạ kế. Lượng virus bệnh dại trong mỗi phân đoạn cũng được đo, trên cơ sở phân tích glycoprotein gpG bằng ELISA, cũng như tổng lượng protein trong mỗi phân đoạn, bằng phương pháp Bradford. Profin phân tách do đó được tạo ra. Vào thời điểm cuối của quá trình phân tích này, các phân đoạn của gradient chứa chủ yếu là virus bệnh dại sẽ được chọn và được kết hợp. Trong suốt bước này, hơn 85% và tốt hơn là hơn 90% tổng lượng protein được loại bỏ, chúng chủ yếu là các tạp chất protein vì hiệu suất thu hồi virus bệnh dại $\geq 70\%$ và tốt hơn là $\geq 80\%$.

Do đó, theo phương pháp tinh chế của sáng chế, khi bước lọc dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại, bước chạy sắc ký trao đổi cation trên chất mang được cấu thành từ chất nền polymetacrylat trên đó các nhóm sulfoisobutyl được ghép vào bằng liên kết đồng hóa trị, tùy ý sau đó là cô đặc và/hoặc thẩm lọc bằng cách siêu ly tâm dịch rửa giải, bước xử lý dịch rửa giải bằng endonucleaza và bước siêu ly tâm theo gradient sucroza được kết hợp, chế phẩm virus bệnh dại đã tinh khiết sẽ được thu, mà có lượng virus bệnh dại tương ứng với 4,5 IU (trên cơ sở đo gpG bằng ELISA) hoặc ở liều hữu hiệu của vacxin, chứa ít hơn 50 pg ADN dư, tốt hơn là ít hơn 20 pg ADN dư và thậm chí tốt hơn nữa nếu ít hơn 10 pg ADN dư (được đo bằng qPCR) và chứa ít hơn 40 μ g tổng lượng protein, tốt hơn là ít hơn 20 μ g tổng lượng protein (được đo bằng phương pháp Bradford). Ít

nhất 70% tổng lượng protein thường là protein virus. Tổng hiệu suất thu hồi virus tinh khiết ít nhất là 45%, tốt hơn là ít nhất là 50%, và đặc biệt tốt hơn là ít nhất là 60%. Tổng hiệu suất thu hồi virus tinh khiết được tính trên cơ sở tỷ lệ của lượng virus có mặt trong (các) phân đoạn gradient được thu hồi sau khi siêu ly tâm so với lượng virus ban đầu có mặt trong thể tích dịch nổi virus đã xử lý. Đồng thời, hơn 4 log₁₀ lượng ADN và hơn 95% tổng lượng protein được loại bỏ (xem Bảng I). Tốt hơn, nếu dịch nổi nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa protein huyết thanh bất kỳ hoặc không chứa protein ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật, hoặc thậm chí không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật để cụ thể đảm bảo độ an toàn sinh học lớn hơn cho chế phẩm vắc xin.

Ví dụ, bảng I dưới đây thể hiện, cho mỗi bước của phương pháp tinh chế virus bệnh dại từ dịch nổi nuôi cấy các tế bào Vero bị nhiễm, lượng virus thu hồi được và tương tự lượng ADN và lượng protein được loại bỏ.

Bảng I: Bảng tổng kết các bước khác nhau của phương pháp tinh chế virus bệnh dại cùng với các năng suất thu được virus và lượng ADN và lượng protein được loại bỏ.

Bước	Lượng virus được thu hồi (bằng %)*		Lượng protein được loại bỏ (bằng %)**		Lượng ADN được loại bỏ (bằng log ₁₀)***	
	trong bước	tổng	trong bước	tổng	trong bước	tổng
Lọc	90	90	ND	ND	ND	ND
Chạy sắc ký trên chất mang EMD/SO ₃ ⁻	89	80	60	60	ND	ND
Siêu lọc/thẩm lọc	97	77	18	67	2,7	2,7
Xử lý bằng zenzonaza + siêu ly tâm trên lớp đệm sucroza	70	54	88	96	1,6	4,3

*: lượng virus bệnh dại được xác định trên cơ sở phân tích glycoprotein G của virus bệnh dại bằng ELISA theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

**: tổng lượng protein được đo bằng kỹ thuật Bradford.

***: lượng ADN được đo bằng qPCR theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

ND: không xác định được

Virut bệnh dại tinh khiết được thu hồi sau bước siêu ly tâm thường ở dạng được cô đặc quá mức và thường được pha loãng để ngăn ngừa việc hình thành các khối kết tụ virut trong suốt thời gian bảo quản. Dung dịch đệm phosphat ở độ pH xấp xỉ 8, tùy ý được bổ sung dung dịch nước muối, ví dụ dung dịch natri clorua, thường được sử dụng làm dung dịch đệm pha loãng. Theo phương pháp của sáng chế, hỗn dịch chứa virut bệnh dại tinh khiết thu được có thể được sử dụng làm vacxin virut sống hoặc bị giảm hoạt lực hoặc làm vacxin virut bị bất hoạt. Khi vacxin này được dự định làm thuốc cho người, thì hỗn dịch chứa virut tinh khiết thường bị bất hoạt.

Bước bất hoạt virut

Phương pháp tinh chế virut bệnh dại như được mô tả trong sáng chế kết thúc bằng bước bất hoạt virut khi virut được dự định dùng để sản xuất vacxin bị bất hoạt. Việc bất hoạt virut có thể được thực hiện bằng cách dùng các chất hóa học đã được biết đến đối với người có kỹ năng về lĩnh vực này, như formaldehyt, glutaraldehyt hoặc β -propiolacton. Cũng có thể sử dụng phương pháp bất hoạt như được mô tả trong WO 2005/093049, mà bao gồm bước cho dung dịch virut tinh khiết tiếp xúc với hợp chất kỵ nước quang hoạt và để hỗn hợp này dưới ánh sáng. Trong số các hợp chất kỵ nước quang hoạt, có thể kể tới azidobenzen, 1-azidonaphtalen, 4-azido-2-nitro-1-(phenylthio)benzen, 1-azido-4-iodobenzen, 1-azido-5-iodonaphtalen, 3-phenyl-3H-diaziren, 3-phenyl-3-(triflometyl)-3H-diaziren, 3-(3-iodophenyl)-3-(triflometyl)-3H-diaziren, 1-azidopyren, adamantin diaziren, axit 12-(4-azido-2-nitrophenoxy)stearic, axit béo w-(m-diazirinophenoxy), axit 12-[(azidocarbonyl)oxy]stearic, axit 12-azidostearic, axit 11-(3-azidophenoxy)undecanoic hoặc axit w-(m-diazirinophenoxy)undecanoic hoặc 1,5-iodonaphtyl azit. Tốt hơn, nếu β -propiolacton (BPL) được sử dụng bởi vì nó đồng thời là chất bất hoạt virut và chất alkyl hóa dẫn tới việc phân cắt ADN. Vì thế, có thể cũng góp phần vào việc làm giảm mức ADN dư và việc ức chế hoạt tính sinh học của nó. Việc bất hoạt virut bệnh dại được thực hiện bằng dung dịch β -propiolacton được pha loãng đến nồng độ từ 1/3500 đến 1/4000 (nồng độ thể tích cuối cùng trong dung dịch chứa virut tinh khiết) ở nhiệt độ xấp xỉ 12°C. Với nồng độ β -propiolacton càng thấp, thì thời gian cần để bất hoạt virut càng dài hơn.

Thông thường, việc bất hoạt virus được thực hiện trong khoảng thời gian từ 12 giờ đến 48 giờ. Hoạt tính của β -propiolacton được trung hòa bởi việc làm nóng đơn giản dung dịch này ở nhiệt độ xấp xỉ 37°C trong xấp xỉ 2 giờ. Sau đó, xác nhận rằng pH của dung dịch $> 7,0$. Độ pH được tinh chỉnh, nếu cần, bằng dung dịch natri hydroxit loãng, hoặc theo cách khác, trước khi xử lý bằng β -propiolacton, dung dịch chứa virus tinh khiết được đệm với dung dịch dựa trên dung dịch đệm phosphat, pH ~ 8 , do đó ngăn ngừa sự axit hóa bất kỳ của dung dịch trong khi thủy phân β -propiolacton.

Hỗn dịch chứa virus được tinh chế theo phương pháp của sáng chế thường được bảo quản trong đệm bảo quản như, ví dụ, đệm Tris hoặc đệm phosphat. Mặc dù hỗn dịch chứa virus tinh khiết có thể được trộn trực tiếp bằng đệm bảo quản, nhưng bước thẩm lọc bằng cách siêu lọc vào đệm bảo quản thường được thực hiện, với bước cô đặc được bổ sung vào, nếu cần, nếu virus tinh khiết không đủ đặc. Khi bước siêu lọc được thực hiện, màng được sử dụng, ngưỡng phân loại của chúng thường từ 5 kDa đến 100 kDa, tốt hơn là từ 8 kDa đến 50 kDa. Dung dịch gốc chứa virus tinh khiết được sản xuất theo cách này cuối cùng được vô trùng bằng cách lọc qua màng có độ xốp $\leq 0,2 \mu\text{m}$, và sau đó được bảo quản ở gần $+5^{\circ}\text{C}$, tốt hơn là ở dạng đông lạnh trước khi được chia thành dạng vắc xin đơn liều hoặc đa liều. Bước đông khô bổ sung đối với các chế phẩm vắc xin nêu trên có thể cũng được bao gồm. Trong trường hợp này, thành phần của đệm bảo quản được chọn theo cách sao cho nó có thể được đông khô. Tổng hiệu suất thu hồi virus tinh khiết bất hoạt, được tính toán ở đây trên cơ sở tỷ lệ của lượng virus có mặt trong dung dịch gốc chứa virus tinh khiết thu được sau bước lọc vô trùng cuối cùng so với lượng virus ban đầu có mặt trong thể tích dịch nổi mang virus (trước khi lọc) đã được xử lý, ít nhất vẫn là 40%, điều này cho thấy ưu điểm của phương pháp này nếu áp dụng trên quy mô công nghiệp.

Cuối cùng, vắc xin chứa virus bệnh dại tinh khiết có thể được sản xuất với năng suất rất cao và độ tinh khiết rất cao bằng cách sử dụng phương pháp trong đó bao gồm các bước sau:

- sản xuất một lô tế bào từ ngân hàng tế bào, thường từ ngân hàng tế bào đang hoạt động,
- sản xuất virus bệnh dại sau khi gây nhiễm lô tế bào này, và

- tinh chế virus bệnh dại từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bị nhiễm, tất cả các bước trên được thực hiện sử dụng các sản phẩm ngoại sinh không có nguồn gốc động vật.

Bằng phương pháp này, vaccine thu được không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất vaccine phòng bệnh dại, theo đó:

- a) một lô tế bào được tạo ra,
- b) lô tế bào này được gây nhiễm virus bệnh dại,
- c) virus bệnh dại được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bị nhiễm theo phương pháp của sáng chế,
- d) hỗn dịch chứa virus tinh khiết được trộn vào đệm bảo quản, và
- e) hỗn hợp này được chia thành vaccine dạng liều đơn hoặc đa liều.

Theo một khía cạnh khác của phương pháp theo sáng chế dùng để sản xuất vaccine, đệm bảo quản là đệm đông khô. Trong trường hợp này, hỗn dịch chứa virus tinh khiết được trộn với đệm đông khô, hỗn hợp này được chia thành vaccine đơn liều hoặc đa liều và sau đó, các liều vaccine này được đông khô.

Theo một khía cạnh ưu tiên khác của phương pháp theo sáng chế dùng để sản xuất vaccine, tất cả các bước của phương pháp này được thực hiện sử dụng các sản phẩm không có nguồn gốc động vật. Trong trường hợp này, vaccine thu được không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật và do đó, đem lại độ an toàn sinh học lớn hơn.

Cuối cùng, đối tượng của sáng chế là vaccine chứa virus tinh khiết bệnh dại trong đó lượng ADN còn lại được đo bằng PCR định lượng và tổng lượng protein có mặt trong một liều vaccine hiệu quả nhỏ hơn 20 pg ADN dư và nhỏ hơn 40 µg protein. Tốt hơn, nếu một liều vaccine hiệu quả chứa ít hơn 10 pg ADN dư và ít hơn 20 µg tổng lượng protein. Tốt hơn nữa nếu ít nhất 70% tổng lượng protein được chứa trong liều hiệu quả là protein virus bệnh dại. Thuận lợi là, chế phẩm vaccine có thể cũng không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật. Virus bệnh dại chứa trong vaccine có thể bị bất hoạt hoặc bị giảm hoạt lực. Phân tích protein điện di thông qua đo mật độ đối với mẫu vaccine, thu được sau khi điện di trên gel polyacrylamit và quan sát bằng cách nhuộm màu xanh

coomassie, thực tế cho thấy rằng hơn 70% protein có nguồn gốc virus. Về cơ bản, 5 protein virus bệnh dại (nghĩa là glycoprotein G, nucleoprotein N, phosphoprotein P, protein gian bào M, ARN polymeraza L) được phát hiện thấy trên gel polyacrylamit (SDS-PAGE) được tạo ra khi có mặt 2-mercaptoetanol.

Hơn thế nữa, việc phân tích cỡ hạt của mẫu vaccine bằng máy Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), mà đo chuyển động Brownian của các hạt trên cơ sở tán xạ ánh sáng chuẩn đàn hồi (tán xạ ánh sáng động - Dynamic Light scattering), cho thấy sự tồn tại của một quần thể duy nhất gồm các hạt có kích cỡ từ 100 đến 300 nm với giá trị trung bình là 180 nm, mà tương ứng với kích thước trung bình của virus bệnh dại. Việc phân tích mẫu vaccine bằng cách soi dưới kính hiển vi điện tử cũng cho thấy sự có mặt của các hạt virus có dạng vỏ thông thường. Do đó, vaccine theo sáng chế ở dạng hỗn dịch đồng nhất của virus bệnh dại toàn phần tinh khiết trong đó việc phân tích kích cỡ hạt bằng máy Zetasizer Nano ZS cho thấy sự tồn tại của đỉnh đơn xấp xỉ từ 100 đến 300 nm. Hỗn dịch đồng nhất chứa các virus bệnh dại tinh khiết có các đặc tính tinh khiết như được mô tả có thể thu được bằng việc thực hiện phương pháp tinh chế như được mô tả trong sáng chế.

Thử nghiệm chính thức được WHO phê chuẩn dùng để đánh giá hiệu quả của vaccine phòng bệnh dại là thử nghiệm NIH (được mô tả cụ thể trong chuyên luận của Dược điển Châu Âu số 216 liên quan đến vaccine phòng bệnh dại được bào chế từ dịch nuôi cấy tế bào và được dự định làm thuốc cho người). Để có hiệu quả, liều vaccine nên chứa ít nhất 2,5 IU theo thử nghiệm NIH. Việc dùng liều hiệu quả của vaccine phòng bệnh dại (nghĩa là ít nhất 2,5 IU theo thử nghiệm NIH) trong cơ thể người theo quy trình tiêm chủng hoặc tiêm chủng huyết thanh thường được khuyến cáo làm phát triển tính miễn dịch bảo vệ. Hơn thế nữa, đã thấy rằng, khi lượng virus bệnh dại chứa trong liều vaccine thu được theo phương pháp của sáng chế ít nhất là 4,5 IU trên cơ sở đo glycoprotein G bằng ELISA, lượng này tương ứng với ít nhất một liều vaccine hiệu quả (nghĩa là chứa ít nhất 2,5 IU theo thử nghiệm NIH).

Thử nghiệm NIH là thử nghiệm thử thách được thực hiện trên chuột, trong đó xác định lượng vaccine thử nghiệm cần để thu được mức bảo vệ tương đương trên chuột chống lại các tác động gây chết người của chế phẩm virus bệnh dại đã

chuẩn độ trước được dùng trong não như những gì quan sát được đối với một lượng chế phẩm vaccin phòng bệnh dại tham chiếu. Chế phẩm vaccin phòng bệnh dại tham chiếu được định cỡ theo đơn vị quốc tế (international unit - IU). Đơn vị quốc tế (international unit - IU) là hoạt tính có mặt trong một lượng nhất định của chất chuẩn quốc tế. Tương đương về IU của chất chuẩn quốc tế được thiết lập bởi WHO. Sau khi xác thực được rằng các thông số đối chứng của thử nghiệm hiệu quả được quan sát là đúng, số lượng IU có mặt trong vaccin thử nghiệm sau đó được xác định trên cơ sở các giá trị của liều bảo vệ 50% của vaccin được thử nghiệm và của chế phẩm tham chiếu (định cỡ bằng IU). Ít nhất là 2,5 IU nên có mặt trong một liều để đem lại hiệu quả trong việc tiêm chủng.

Liều hiệu quả của vaccin được tiêm trong cơ ở người thường được chứa trong thể tích từ 0,5 đến 1 ml hỗn dịch lỏng mà sẵn sàng để dùng hoặc thu được bằng cách giã đông đơn giản hoặc theo cách khác, thu được ngay bằng cách hoàn nguyên sản phẩm đông khô bằng dung môi.

Các quy trình chủng vaccin được sử dụng để bảo vệ người chống lại bệnh dại đã được biết đến và chúng khác nhau, phụ thuộc vào việc chủng vaccin đó để phòng bệnh hay chữa bệnh. Thông thường, trong trường hợp chủng vaccin để phòng ngừa, quy trình chủng vaccin đầu tiên bao gồm chủng liều vaccin hiệu quả với hai hoặc 3 mũi tiêm trong cơ. Các mũi chủng vaccin tăng cường sau đó được dùng, ở khoảng thời gian đều nhau, bằng việc dùng liều vaccin đơn hiệu quả. Trong trường hợp chủng vaccin chữa bệnh, các quy trình chủng vaccin khác nhau tùy thuộc vào liệu cá nhân đó đã phơi nhiễm với virus bệnh dại đã được chủng ngừa hay chưa và tùy theo nước. Quy trình chủng vaccin thường được khuyến cáo ở các cá thể chưa được gây miễn dịch hoặc có khả năng miễn dịch kém, song song với việc dùng huyết thanh kháng bệnh dại, bao gồm 5 mũi tiêm trong cơ liên tiếp của liều vaccin hiệu quả trong khoảng thời gian 1 tháng, sau đó là tiêm nhắc lại sau ba tháng. Số lần tiêm được giảm xuống 3, hoặc thậm chí xuống tới một, khi các cá thể phơi nhiễm với virus đã được chủng ngừa đầy đủ trước đó. Các quy trình tiêm chủng khác trong trường hợp tiêm chủng để chữa bệnh ở các cá thể không được gây miễn dịch hoặc có khả năng miễn dịch kém có thể làm giảm số lần tiêm và/hoặc lượng kháng nguyên vaccin được dùng có thể được sử dụng trong nội dung của sáng chế. Cụ thể, đó là quy trình “Zagreb”, bao gồm 4 lần tiêm

bắt một liều vacxin hiệu quả (với 2 lần tiêm ở các vị trí khác nhau được dùng vào ngày D0, tiếp theo tiêm vào ngày D7 và sau đó vào ngày D21), hoặc quy trình tiêm chủng trong da.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế này sẽ được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ sau đây mà chúng chỉ có tác dụng minh họa, chứ không làm hạn chế phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: So sánh các chất mang khác nhau dùng trong sắc ký trong phương pháp tinh chế virus bệnh dại

1-1) Sản xuất virus bệnh dại trên các tế bào VERO trong môi trường không chứa huyết thanh

Các tế bào thuộc dòng tế bào VERO, sau khi được làm thích nghi với các điều kiện nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh như được mô tả trong WO 01/40443, được chuyển vào thùng nuôi cấy sinh học có dung tích từ 10 đến 20 lít chứa các vi chất mang cytodex 1 trong môi trường VP SFM (Invitrogen). Sau thời kỳ nuôi cấy từ 3 đến 4 ngày ở 37°C với độ pH duy trì xấp xỉ $7,2 \pm 0,2$, mức bão hòa oxy được duy trì ở $25\% \pm 10\%$ và môi trường được khuấy nhẹ, các tế bào bị nhiễm virus bệnh dại với hệ số bội nhiễm là 0,01 trong môi trường nhiễm trùng virus chứa môi trường VP SFM (Invitrogen). Trong trường hợp các thử nghiệm được thực hiện với chất mang sắc ký là Fractogel EMD-SO₃⁻, việc sản xuất virus bệnh dại được thực hiện ở quy mô 150 lít, sử dụng các thùng nuôi cấy sinh học dung tích 150 lít. Các dịch nổi nuôi cấy tế bào bị nhiễm được thu gom vào các ngày D7 (H1), D11 (H2) và D15 (H3). Sau mỗi lần thu gom, môi trường nhiễm trùng virus mới lại được đưa vào.

1-2) Lọc và phân tích dịch thu gom

Bước lọc được thực hiện bằng cách sử dụng hai quá trình lọc trực diện liên tiếp; quá trình lọc đầu tiên sử dụng bộ lọc sơ bộ làm từ polypropylen 8 µm (Sartopure PP2, SARTORIUS) để loại bỏ vài vi chất mang lẫn vào trong quá trình thu gom, các tế bào VERO được tách ra khỏi chất mang và các mảnh vụn tế bào lớn; quá trình lọc thứ hai sử dụng bộ lọc PES, được chế tạo từ tổ hợp hai bộ lọc, 0,8 µm và 0,45 µm (Sartopore 2, SARTORIUS), để loại bỏ các khối kết tụ.

Lượng virus bệnh dại có mặt trong dịch thu gom đã lọc được xác định bằng

cách đo lượng glycoprotein G (gpG) được đo bằng phương pháp ELISA dưới đây:

Xấp xỉ 0,12 µg/100 µl dung dịch kháng thể đơn dòng kháng gpG 1112-1 (các đặc tính của chúng được mô tả trong tài liệu: Journal of Clinical investigation (1989), tập 84, các trang từ 971 đến 975), được pha loãng sẵn trong dung dịch đệm phủ (dung dịch đệm carbonat/bicarbonat 0,2M, độ pH=9,6), được phân tán vào các lỗ của vi đĩa ELISA. Sau khi ủ qua đêm trong phòng lạnh, sau đó rửa nhiều lần trong dung dịch đệm rửa (dung dịch đệm phosphat được bổ sung Tween 20 0,05%), 100 µl dung dịch đệm bão hòa (dung dịch đệm phosphat được bổ sung albumin huyết thanh bò 1%) được phân tán vào mỗi lỗ. Sau khi ủ trong một giờ ở 37°C, tiếp tục rửa vài lần, loạt dung dịch pha loãng của mỗi mẫu thí nghiệm được pha chế trong dung dịch đệm pha loãng (dung dịch đệm phosphat được bổ sung Tween 20 0,05% và albumin huyết thanh 0,1%). Đồng thời, loạt dung dịch pha loãng của chất chuẩn tham chiếu, mà được định cỡ theo chất tham chiếu quốc tế của NIBSC (ví dụ, PISRAV), được điều chế trong mỗi vi đĩa. Sau khi ủ thêm trong một giờ ở 37°C, tiếp tục rửa vài lần, 100 µl dung dịch kháng thể đơn dòng chuột kháng gpG D1 (các đặc tính của chúng được mô tả trong tài liệu: Biologicals (2003), tập 31, các trang từ 9 đến 16), được biotiny hóa và sử dụng sau khi pha loãng đến nồng độ 1/5000 trong dung dịch đệm pha loãng, được phân phối vào mỗi lỗ. Các đĩa này được để ở 37°C trong 1 giờ và sau đó rửa nhiều lần trước khi phân phối vào 100 µl dung dịch streptavidin liên kết peroxydaza (Hiệp hội kỹ thuật sinh học Miền Nam - Southern Biotechnology Associates), được pha loãng trước đến nồng độ 1/15000 trong dung dịch đệm pha loãng, vào mỗi lỗ. Sau khi ủ thêm ở 37°C trong một giờ, tiếp tục rửa vài lần, 100 µl dung dịch của dung dịch đệm xitrat 0,05M, độ pH=5, chứa cơ chất phát hiện (O-phenylendiamin), được phân tán vào mỗi lỗ. Sau thời gian ủ 30 phút ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong bóng tối, phản ứng phát hiện được ngừng lại bằng việc thêm dung dịch H₂SO₄ 2N với thể tích 50 µl /lỗ. Việc ghi phổ quang kế của các vi đĩa được thực hiện ở hai bước sóng (492 nm và 620 nm). Mật độ quang được đo là độ chênh lệch giữa hai lần ghi có tính đến sự hấp thu của nhựa. Hoạt tính tương đối được tính bằng phương pháp đường song song theo khuyến cáo của được điển châu Âu. Hiệu giá virus bệnh dại trong mẫu được tính toán dựa trên việc xác định nồng độ của glycoprotein G của virus bệnh dại, được biểu diễn bằng đơn vị IU/ml

so với tham chiếu.

Tổng lượng protein có mặt trong các dịch thu gom đã lọc được đo bằng cách sử dụng phương pháp Bradford thông thường thông qua bộ kit được bán bởi Biorad (ref: 500-0006).

Lượng ADN có mặt trong các dịch thu gom đã lọc được đo bằng qPCR. Quy trình làm việc tương tự quy trình được mô tả bởi Lebron J.A. và các đồng tác giả, trong tài liệu: *Developments in Biologicals* (2006), tập 123, các trang 35-44. Sau khi chiết ADN dư khỏi các dịch thu gom đã lọc bằng bộ kit Extractor có bán sẵn từ Wako Pure Chemicals, lượng cố định ADN ngoại sinh, mà dùng làm đối chứng nội để khuếch đại PCR, được đưa vào mỗi mẫu. Đồng thời, mẫu ADN hệ gen có nguồn gốc các tế bào VERO được phân giải bằng cách làm đông lạnh/giã đông liên tiếp, sau đó được xử lý bằng Rnaza A, với tỷ lệ 2 mg RNaza A/2,5x10⁵ tế bào, được tạo ra và sau đó, cuối cùng, tinh chế sau đó bằng cách sử dụng kit QIAamp Virut BioRobot 9604 (QIAGEN). ADN tinh khiết được định lượng bằng đo quang phổ ở 260 nm. Bằng cách sử dụng ADN tinh khiết này (ADN chuẩn), khoảng hiệu chuẩn được tạo ra bằng cách pha loãng gấp 10 lần. Các mẫu thu được từ dịch thu gom đã lọc và các mẫu nằm trong khoảng hiệu chuẩn sau đó được đưa vào chu kỳ khuếch đại PCR, sau khi bổ sung, với mỗi thử nghiệm, mẫu dò huỳnh quang Alpha –MPH3, hai đoạn môi và hỗn hợp trộn sẵn 2X QuantiTect Probe Master Mix (Qiagen) trong thể tích nước hoàn toàn không chứa nucleaza (vừa đủ 50 µl). Chu trình khuếch đại được thực hiện bằng cách sử dụng máy Light Cycler 480 (Roche Applied Science) sử dụng chương trình: 95°C, 15 phút; 40 chu kỳ bao gồm hai bước 95°C, 15 giây; 60°C, 60 giây. Lượng ADN còn lại được chiết từ dịch lọc đã lọc sau đó được tính toán, bằng phép nội suy, trên cơ sở giá trị đo ánh sáng huỳnh quang nhận được so khoảng hiệu chuẩn đã được thiết lập với ADN chuẩn. Lượng ADN còn lại được điều chỉnh bằng hệ số hiệu chỉnh tương ứng với hiệu quả tích điện được đo cho mẫu bằng cách định lượng ADN ngoại sinh. Thông thường, nồng độ glycoprotein G (tương ứng với hiệu giá của virut bệnh dại), nồng độ protein tổng và nồng độ của ADN trong dịch thu gom đã lọc nằm trong phạm vi từ 1 đến 3 IU/ml đối với glycoprotein G, từ 50 đến 100 µg/ml đối với protein tổng và từ 5 đến 50 ng/ml đối với ADN.

1-3) Xác định các mức hiệu quả của các chất mang khác nhau dùng trong sắc ký

về khả năng loại bỏ axit nucleic và giữ lại virus bệnh dại của chúng

Khả năng loại bỏ ADN tế bào ra khỏi các dịch thu gom đã lọc được đánh giá trên các chất mang sắc ký sau đây:

Chất mang anion

- Fractogel® EMD TMAE (Merck) (chất mang trao đổi anion mạnh)
- Fractogel® EMD DEAE (Merck) (chất mang trao đổi anion yếu)
- Màng tích điện dương Q Sartobind® (Sartorius)
- Màng tích điện dương Q Mustang® (Pall)

Chất mang cation

- Fractogel® EMD SO₃⁻ (Merck) (chất mang trao đổi cation mạnh).

Các thí nghiệm sơ bộ được thực hiện trên màng tích điện dương Sartobind® để xác định nồng độ muối tốt nhất để rửa giải virus bằng sắc ký trao đổi anion. Các thí nghiệm này đã cho thấy rằng virus được rửa giải hoàn toàn qua gradient muối, bao gồm ở 1M. Điều này cũng đúng đối với các chất mang anion khác được thử nghiệm. Các protein rửa giải thu được được dùng để chọn nồng độ NaCl mạnh để rửa giải tối đa lượng virus. Khi ADN được bắt đầu rửa giải từ 350-400 mM, để cân bằng chọn nồng độ NaCl là 450 mM.

Các chất mang anion sau đó được cân bằng trong dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl 150 mM, độ pH=7,5. Các dịch thu gom đã lọc sau đó được cho tiếp xúc với nhiều chất mang khác nhau được nghiên cứu. Các chất mang anion sau đó được rửa trong dung dịch đệm Tris 20 mM bao gồm NaCl 150 mM, độ pH=7,5. Virus sau đó được tách ra khỏi chất mang bằng đệm rửa giải Tris 20 mM chứa NaCl 450 mM, độ pH=7,5.

Các thí nghiệm trên cột Fractogel® được thực hiện sử dụng dịch thu gom đã lọc H1. Từ 35 đến 50 IU virus bệnh dại và từ 13 đến 25 µg ADN được tiêm vào 1 ml gel.

Các thí nghiệm trên màng được thực hiện bằng cách sử dụng dịch thu gom đã lọc H2. 13 IU virus bệnh dại và từ 350 đến 450 ng ADN được tiêm trên một cm² màng.

Các điều kiện làm việc được sử dụng cho sắc ký trao đổi cation trên chất mang Fractogel® EMD SO₃⁻ cũng được tối ưu hóa. Chất mang Fractogel® EMD SO₃⁻ được cân bằng sử dụng dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl

150 mM, độ pH =7,5. Các thí nghiệm trên chất mang Fractogel® EMD SO₃⁻ được thực hiện sử dụng dịch thu gom đã lọc H1. Độ dẫn điện của môi trường (từ 14 mS/cm đến 18 mS/cm) và pH (từ 7,5 đến 7,7) được xác thực. Xấp xỉ 50 IU (trên cơ sở phân tích glycoprotein G) virus bệnh dại được tiêm vào 1 ml gel. Sau khi thu gom dịch lọc để xác định lượng virus liên kết với cột, chất mang sau đó được rửa trong dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl 150 mM, độ pH=7,5. Sau đó, virus được rửa giải trong dung dịch đệm Tris 20 mM chứa 600 mM NaCl, pH=7,5, đồng thời thu hồi đỉnh virus trong phân đoạn độc lập. Cuối cùng, chất mang được tái tạo trong dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl 1M, pH=7,5. Các kết quả thu được được nêu trong bảng II bên dưới.

Bảng II: Mức độ hiệu quả của các chất mang khác nhau dùng trong sắc ký

Loại chất mang sắc ký	Hiệu suất thu hồi virus	Lượng ADN còn lại (ng/ml)	Lượng ADN được loại bỏ (tính theo %).
Mustang Q	47%	4**	93%
Sartobind Q	50%	1**	98%
Fractogel EMD-TMAE	54%	196**	48%
Fractogel EMD-DEAE	70%	161**	73%
Fractogel EMD-SO ₃ ⁻	89%	4,15***	99,7%***

*: hiệu giá của virus bệnh dại được xác định trên cơ sở đo glycoprotein G bằng ELISA

**: Lượng ADN còn lại được đo bằng qPCR trực tiếp trên sản phẩm được thu hồi

***: Lượng ADN còn lại được đo bằng qPCR sau khi cô đặc dịch rửa giải với hệ số 6 bằng cách siêu lọc.

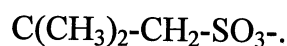
Các chất mang màng tích điện dương (Sartobind® (Sartorius) hoặc Mustang® Q (Pall)) dễ dàng loại bỏ ADN (hơn 90% ADN được loại bỏ trong phân đoạn được thu thập), nhưng mặt khác, hiệu suất thu hồi virus lại tương đối thấp ($\leq 50\%$). Đối với các chất mang dựa trên các gel tích điện dương (Fractogel® EMD TMAE (Merck), Fractogel® EMD DEAE (Merck)), quan sát thấy xu hướng trái ngược, nghĩa là hiệu suất thu hồi virus cao hơn ($\geq 50\%$) nhưng hiệu quả loại bỏ ADN lại giảm (73% ADN được loại bỏ trong trường hợp tốt nhất

trong số các trường hợp này). Mặt khác, khi chất mang cation Fractogel® EMD SO₃⁻ được sử dụng, cả hiệu quả loại bỏ ADN rất tốt (hơn 95% ADN được loại bỏ trong phân đoạn được thu thập) lẫn hiệu suất thu hồi virus cũng rất tốt (≥ 70%). Các mức hiệu quả của chất mang cation Fractogel® EMD SO₃⁻ dùng trong sắc ký theo đó cũng tốt hơn so với các mức nhận được khi sử dụng các chất mang anion dùng trong sắc ký.

1-4) Xác định mức hiệu quả của các chất mang cation khác nhau dùng trong sắc ký

Từ các thí nghiệm trước đã cho thấy rằng chất mang sắc ký trao đổi cation mạnh có mức hiệu quả cao hơn so với các chất mang anion, các tác giả đã xác định được các đặc tính của chất mang sắc ký trao đổi cation mạnh mà đem lại mức hiệu quả tốt nhất bằng cách thí nghiệm các chất mang khác nhau dùng trong sắc ký trao đổi cation mạnh mà khác nhau, cụ thể là ở chất nền và các nhóm của chúng (các phối tử). Đặc tính của các chất mang khác nhau được thí nghiệm được nêu bên dưới:

- Màng tích điện âm Sartobind® S (Sartorius): màng xenluloza được ghép các nhóm axit sulfonic (các phối tử) trên đó;
- Màng tích điện âm MustangTM S (Pall): màng polyetesulfon được ghép các nhóm axit sulfonic (các phối tử) trên đó;
- Gel CaptoTM S (GE Healthcare): gel mà có chất nền dựa trên agarosa, trên đó các nhóm sulfoethyl (các phối tử) được ghép vào nhờ các nhánh trung gian dựa trên dextran;
- Gel SP Sepharose XL (GE Healthcare): gel có chất nền dựa trên agarosa trên đó các nhóm sulfopropyl (các phối tử) được ghép vào nhờ các nhánh trung gian dựa trên dextran;
- Toyopearl® SP-650 C (Tosoh): nhựa có chất nền dựa trên polymetacrylat, trên đó các nhóm sulfopropyl (các phối tử) được ghép vào;
- Fractogel® EMD SO₃⁻ (Merck): gel có chất nền dựa trên polymetacrylat, trên đó các nhóm sulfoisobutyl được ghép vào nhờ các nhánh trung gian bao gồm các chuỗi polyme thu được bằng cách polyme hóa monome có công thức hóa học: CH₂=CH-CO-NH-



Các gel có các phối tử được ghép trên chất nền bằng nhờ các nhánh trung gian có cấu trúc “xúc tu” mà thường hỗ trợ tương tác phối tử/protein.

Nhiều thông số khác nhau được đánh giá dựa cho sắc ký trên màng Sartobind® S (Sartorius) (thể tích chất mang: 7 ml): độ pH của dịch thu gom đã lọc được tiêm, nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0, độ dẫn điện của dịch thu gom đã lọc được tiêm, nằm trong khoảng từ 4,5 mS/cm đến 17,9 mS/cm, và lượng virus tải nạp được tiêm, nằm trong khoảng từ 4 IU/ml đến 11 IU/ml chất mang. Bất cứ thông số nào được nghiên cứu, thì hiệu suất thu hồi virus luôn luôn là $\leq 35\%$.

Trong trường hợp chạy sắc ký trên màng Mustang™ S (Pall) (thể tích chất mang: 10 ml), độ pH và độ dẫn điện của dịch thu gom đã lọc lần lượt là 7,5 và 14 mS/cm, trong khi lượng virus tải nạp là 32 IU/ml chất mang. Hiệu suất thu hồi virus rất thấp ($\leq 10\%$).

Cùng quy trình hoạt động như đã được sử dụng để chạy sắc ký trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- được sử dụng để chạy sắc ký gel khác (xem phần 1-3). Chỉ có sự khác biệt duy nhất liên quan việc tái tạo gel Toyopearl® SP-650 C, là được thực hiện trong dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl 2M, độ pH=7,5. Các điều kiện về độ pH và độ dẫn điện giống như trong chạy sắc ký trên Fractogel® EMD SO_3^- được sử dụng. Các giới hạn về khả năng chứa của các chất mang khác nhau dùng trong sắc ký cũng cần lưu ý khi tiêm tải lượng virus chứa trong dịch nổi bề mặt được lọc.

Không giống như chất mang Fractogel® EMD SO_3^- , trong đó xấp xỉ 5% tổng lượng virus tiêm vào được phát hiện thấy trong dịch lọc, lượng virus được phát hiện thấy trong dịch lọc sau khi chạy sắc ký trên ba loại chất mang khác (Gel Capto™ S, Gel SP Sepharose XL và gel Toyopearl® SP-650 C) nằm trong khoảng từ 80 đến 99% tổng lượng virus được tiêm. Hiệu suất thu hồi virus từ các dịch rửa giải theo đó rất thấp ($< 10\%$).

Cấu trúc của các phối tử và của chất nền trong các chất mang sắc ký trao đổi cation mạnh theo đó đóng vai trò quan trọng, bởi vì chỉ chất mang chứa chất nền polymetacrylat trên đó các nhóm sulfoisobutyl được ghéo vào có thể thu được dịch rửa giải trong đó ít nhất 70% virus bệnh dại được thu hồi. Kết luận, trong số tất cả các chất mang sắc ký anion và cation được thí nghiệm, thì chất mang

Fractogel® EMD SO_3^- (Merck) là chất mang duy nhất thể hiện các mức hiệu quả mà thực sự có thể khai thác được từ quan điểm công nghiệp, do hiệu suất thu hồi bệnh đại $\geq 70\%$ trong khi hơn 95% ADN được loại bỏ.

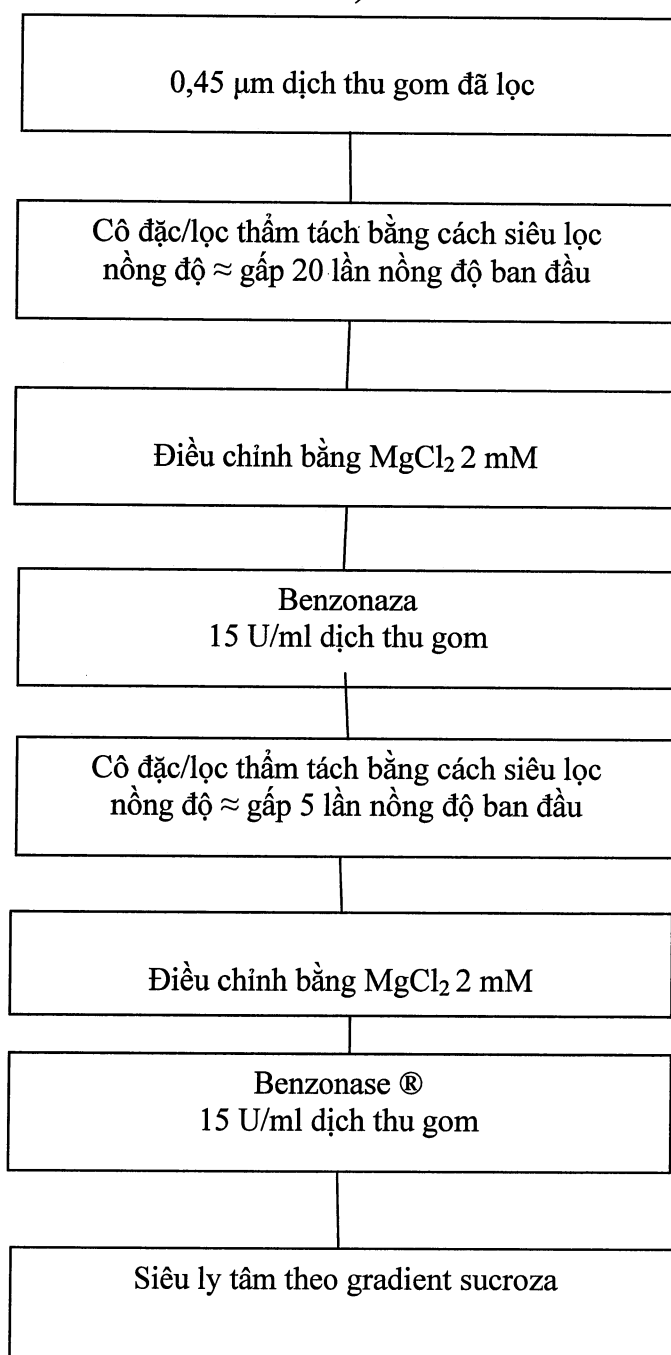
Ví dụ 2: Ưu điểm của việc kết hợp bước chạy sắc ký trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- với bước xử lý bằng benzonaza trong phương pháp tinh chế virus bệnh đại.

Để đánh giá ưu điểm của việc kết hợp này, phương pháp nêu trên được so sánh với phương pháp tinh chế virus bệnh đại bằng cách xử lý benzonaza hai lần. Việc xử lý benzonaza thông thường được sử dụng để loại bỏ các axit nucleic mà chứa trong sản phẩm sinh học. Khi việc xử lý bằng enzym này được lặp lại, lượng ADN được loại bỏ tăng lên.

Phương pháp tinh chế virus bệnh đại mà sử dụng “việc xử lý bằng benzonaza hai lần” được so sánh với quy trình của sáng chế, trong đó bước chạy sắc ký trao đổi cation trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- được kết hợp với việc xử lý bằng benzonaza.

Trong trường hợp xử lý bằng benzonaza hai lần (UF-Bz-UF-Bz), quy trình tinh chế được sử dụng tương ứng với quy trình được mô tả trong Bảng III dưới đây:

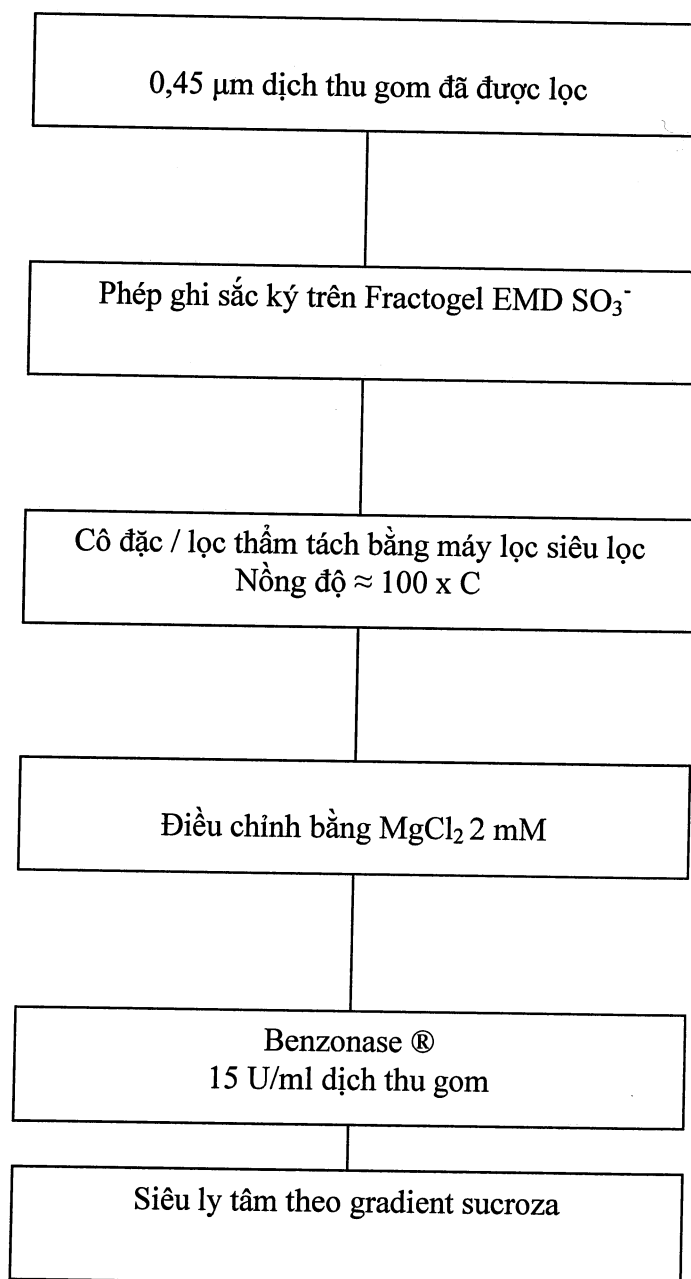
Bảng III – Tinh chế virus bệnh dại bằng việc xử lý bằng benzonaza hai lần (UF-Bz-UF-Bz).



Trong trường hợp việc xử lý kết hợp phép sắc ký trao đổi cation trên chất mang Fractogel® EMD SO₃⁻ và việc xử lý bằng benzonaza (CEX- UF-Bz), thì phương pháp tinh chế được sử dụng tương ứng với phương pháp được mô tả trong Bảng IV dưới đây:

Bảng IV

Tinh chế virus bệnh dại bằng việc kết hợp phép sắc ký trao đổi cation trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- và việc xử lý benzonaza (CEX-UF-Bz).



Trong cả hai trường hợp, phương pháp tinh chế được thực hiện bắt đầu từ cùng dịch thu gom đã lọc H1 có thể tích xấp xỉ 20 lít mà được chia thành hai phần bằng nhau.

Trong trường hợp của phương pháp UF-Bz-UF-Bz, hai nồng độ được thực hiện trên màng PES Medium Screen 100KDA (PALL) kết hợp với thẩm lọc trong dung dịch đệm Tris 20 mM chứa NaCl 150 mM, pH = 7,5 bằng cách siêu lọc,

bước siêu lọc đầu tiên làm giảm thể tích dịch thu gom đã lọc với hệ số xấp xỉ 20, trong khi bước siêu lọc thứ hai làm giảm thể tích dịch thu gom đã lọc với tổng hệ số xấp xỉ 100. Trước mỗi lần xử lý bằng benzonaza, dung dịch $MgCl_2$ được thêm vào sao cho nồng độ trong dịch giữ lại là 2 mM. Việc xử lý bằng benzonaza được thực hiện bằng cách thêm 15 U/ml dịch thu gom thô vào môi trường phản ứng và để môi trường phản ứng trong 2 giờ ở nhiệt độ thí nghiệm.

Trong trường hợp của phương pháp CEX- UF-Bz, bước sắc ký được thực hiện theo các phương pháp được mô tả trong đoạn 1-3. Dịch rửa giải chứa virus tinh khiết sau đó được cô đặc với hệ số xấp xỉ 5 và được thẩm lọc và sau đó được xử lý bằng benzonaza sử dụng quy trình giống hệt như quy trình được sử dụng trong phương pháp UF-Bz-UF-Bz.

Trong cả hai phương pháp, bước siêu ly tâm được thực hiện trên các đệm lót 34-60% sucroza với khối quay kiểu 45 Ti ở 21000 vòng/phút trong 2 giờ ở +5°C. Các phân đoạn của gradient chứa virus tinh khiết được thu hồi, kết hợp, và sau đó phân tích hàm lượng ADN, virus và protein tổng số.

Bảng V dưới đây thể hiện, ở các giai đoạn tinh chế khác nhau, hàm lượng ADN, gpG và protein tổng số thu được dưới hàm của phương pháp được sử dụng.

Bảng V: Đánh chất mang về hai phương pháp tinh chế

Giai đoạn tinh chế	Thông số	Phương pháp UF-Bz-UF-Bz	Phương pháp CEX-UF-Bz
Dịch thu gom đã lọc	Thể tích	9620 ml	9620 ml
	Hàm lượng ADN (ng/ml)	270 1,7 713×10^3 pg/4,5 IU	
	Hàm lượng gpG (IU/ml)		
	ADN/gpG		
UF-Bz-UF	Thể tích	100 ml	
	Hàm lượng ADN (pg/ml)	NT	
	Hàm lượng gpG (IU/ml)	106,6 IU/ml	
CEX-UF	thể tích		100 ml
	Hàm lượng ADN (pg/ml)		NT
	Hàm lượng gpG (IU/ml)		113 IU/ml
Sau UC	thể tích	800 ml	800 ml
	Hàm lượng ADN (pg/ml)	$1,1 \times 10^3$	<0,1
	Hàm lượng gpG (IU/ml)	9,7	8,46
	Tổng lượng protein/gpG	36 μ g/4,5 IU	24 μ g/4,5 IU
	ADN/hàm lượng gpG	510 pg/4,5 IU	<50 pg/4,5 IU
Log ₁₀ tổng lượng ADN giảm		3,47	>4,5

Hiệu suất thu hồi virus *	63%	55%
---------------------------	-----	-----

UF/Bz/UF: tương ứng với dịch giữ lại thu được sau lần siêu lọc thứ hai và chỉ trước bước xử lý bằng benzonaza lần thứ hai trong quy trình UF-Bz-UF-Bz.

CEX/UF: tương ứng với dịch được giữ lại thu được sau bước siêu lọc và trước bước xử lý bằng benzonaza trong quy trình CEX- UF-Bz.

Sau UC: tương ứng với giai đoạn ở đó các phân đoạn của gradien chứa virus tinh khiết được kết hợp sau khi siêu ly tâm và sau khi tổng thể tích được điều chỉnh sao cho đặc gấp 12,5 lần so với thể tích của dịch thu gom đã lọc.

*: hiệu suất thu hồi virus được tính trên cơ sở hàm lượng gpG ELISA.

Các kết quả trong bảng V đã cho thấy rằng việc kết hợp sắc ký trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- với việc xử lý bằng benzonaza sau đó (phương pháp CEX-UF-Bz) cho hiệu quả hơn nhiều trong việc loại bỏ ADN so với việc xử lý bằng benzonaza hai lần (phương pháp UF-Bz-UF-Bz). Cũng có thể làm giảm lượng ADN còn lại ít nhất là thêm 1 Log_{10} nữa sử dụng phương pháp CEX-UF-Bz. Các kết quả này cũng được xác nhận ở các quy mô thể tích khác nhau.

Cũng lưu ý rằng phương pháp CEX-UF-Bz cũng loại bỏ các protein tạp nhiễm hiệu quả hơn phương pháp UF-Bz-UF-Bz, khi có gần một nửa protein tổng số trong một đơn vị virus (được biểu diễn dưới dạng IU của gpG) ($5,4 \mu\text{g}$ trong phương pháp CEX-UF-Bz thay cho $8 \mu\text{g}/\text{IU}$ của gpG trong phương pháp UF-Bz-UF-Bz). Các kết quả này tới từ thực tế là hơn 65% protein được loại bỏ trong bước chạy sắc ký trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- . Các kết quả này cho thấy việc kết hợp bước chạy sắc ký trên chất mang Fractogel® EMD SO_3^- với bước xử lý bằng benzonaza trong phương pháp tinh chế virus bệnh dại tạo ra tác dụng kết hợp để loại bỏ loại bỏ ADN trong các dịch thu gom virus bệnh dại đã lọc lớn hơn nhiều so với tác dụng được quan sát thấy trong khi xử lý bằng benzonaza hai lần.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tinh chế virus bệnh dại bao gồm một bước sắc ký trao đổi ion duy nhất, trong đó bước này là bước chạy sắc ký trao đổi cation theo đó:
 - a) dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus này được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký trao đổi cation bao gồm chất nền polymetacrylat mà trên đó các nhóm sulfoisobutyl được ghép vào bằng liên kết cộng hóa trị sao cho virus bệnh dại liên kết với chất mang này, và
 - b) virus được rửa giải khỏi chất mang nó.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa huyết thanh động vật hoặc protein huyết thanh bất kỳ.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa protein ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó nồng độ của protein ngoại sinh có nguồn gốc không từ động vật trong dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại là ≤ 15 mg/l.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại không chứa sản phẩm ngoại sinh bất kỳ có nguồn gốc động vật.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virus bệnh dại được lọc trước khi cho tiếp xúc với chất mang sắc ký trao đổi cation.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, khác biệt ở chỗ, lượng virus đo được trong dịch rửa giải tương ứng với ít nhất 70% lượng virus đo được trong dịch nổi được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký.
8. Phương pháp theo điểm 7, khác biệt ở chỗ, lượng protein tổng số đo được trong dịch rửa giải tương ứng với nhỏ hơn 40% lượng protein tổng số đo được trong dịch nổi tiếp xúc với chất mang sắc ký và ở chỗ, lượng ADN đo được trong dịch rửa giải tương ứng với nhỏ hơn 5%, tốt hơn là nhỏ hơn 2,5%, và tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1% lượng ADN đo được trong dịch nổi được cho tiếp xúc với chất mang sắc ký.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó dịch rửa giải tùy ý được cô đặc và sau đó được xử lý bằng nucleaza.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó nucleaza là endonucleaza như benzonucleaza.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó dịch rửa giải sau đó được siêu ly tâm trên gradient sucroza và (các) phần gradien chứa virut tinh khiết được thu hồi.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó virut bệnh dại tinh khiết sau đó được bất hoạt bằng chất bất hoạt virut.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó chất bất hoạt virut là β -propiolacton.
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó tất cả các bước của phương pháp này được thực hiện bằng cách sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc không từ động vật.
15. Phương pháp sản xuất vacxin phòng bệnh dại, trong đó:
 - a) dịch nuôi cấy tế bào được gây nhiễm virut bệnh dại,
 - b) virut bệnh dại được tinh chế từ dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virut theo phương pháp được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14,
 - c) hỗn dịch chứa virut tinh khiết thu được từ bước b) được trộn vào đệm bảo quản, và
 - d) hỗn dịch chứa virut tinh khiết thu được từ bước c) được chia thành vacxin đơn liều hoặc đa liều.
16. Phương pháp sản xuất vacxin phòng bệnh dại, trong đó:
 - a) dịch nuôi cấy tế bào được gây nhiễm virut bệnh dại,
 - b) virut bệnh dại được tinh chế từ dịch nuôi cấy tế bào đã nhiễm virut theo phương pháp được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14,
 - c) hỗn dịch chứa virut tinh khiết thu được từ bước b) được trộn vào

đệm đông khô,

d) hỗn hợp thu được từ bước c) được chia thành dạng vacxin đơn liều hoặc đa liều, và

e) các liều vacxin này được đông khô.