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

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

(11) **1-0035677**

(51)[2006.01] **C07D 487/04**; A61K 31/5377; A61K 39/00; C12N 7/00; A61K 45/06; A61K 31/519; A61K 39/12

(13) **B**

(21) 1-2018-02818
(22) 20/01/2017
(86) PCT/US2017/014267 20/01/2017
(87) WO2017/132059 03/08/2017
(30) 62/287,488 27/01/2016 US
(45) 25/05/2023 422
(43) 26/11/2018 368A
(73) ELANCO US INC. (US)
2500 Innovation Way, Greenfield, Indiana 46140, United States of America
(72) DIAZ, Leyla (US); WU, Stephen (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ VIRUT CÓ VỎ BỌC ĐƯỢC LÀM BẤT HOẠT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACXIN CHỨA VIRUT CÓ VỎ BỌC

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm: trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch metyl β-xyclodextrin (MBCD) thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai đã nêu trong một khoảng thời gian thứ hai. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất vacxin chứa virut có vỏ bọc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vacxin chứa hạt virut có vỏ bọc, vỏ bọc của chúng được loại lipit bằng cách sử dụng metyl β-xyclodextrin (MBCD).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut là yếu tố di truyền di động không có hoạt tính trao đổi chất trên chính nó. Vì vậy, virut cần phải lây nhiễm vào tế bào chủ và sử dụng năng lượng và các quy trình của tế bào chủ để tái sinh. Một số virut là "trần" có nghĩa là hạt virut riêng rẽ, hoặc virion, chỉ bao gồm vỏ capsid bao quanh hệ gen virut và có thể bao gồm một số ít protein không cấu trúc được mã hóa bởi virut. Ở các virut khác, vỏ capsid được chứa trong màng hoặc vỏ bọc. Do hệ gen virut thường quá nhỏ để mã hóa protein tham gia vào quá trình tổng hợp lipit, các virut có vỏ bọc như vậy cần phải xây dựng vỏ bọc của chúng từ các lipit của tế bào chủ. Vì vậy, hàm lượng lipit của lớp vỏ bọc của virut thay đổi tùy thuộc vào đặc tính lipit của tế bào chủ.

Các virut thích nghi tốt với với sinh vật chủ của chúng và thường có khả năng gây bệnh, gây bệnh và thậm chí là tử vong cho vật chủ của chúng. Các virut có thể có tác động lớn đến nền kinh tế, bằng cách lây nhiễm cho con người và/hoặc động vật đồng hành của chúng, hoặc bằng cách ảnh hưởng đến thực vật và động vật là nguồn thực phẩm. Vacxin là phương pháp ưu tiên để bảo vệ động vật chủ khỏi sự lây nhiễm virut. Vacxin tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ đối với các virut chứa kháng thể và khả năng miễn dịch của tế bào. Cả hai loại đáp ứng thường được đòi hỏi để giảm sự lây nhiễm mới của tế bào chủ và để loại bỏ các hạt virut và các tế bào bị nhiễm ra khỏi vật chủ.

Gần 40 năm trước, Moore và các đồng tác giả (J. Virol. 27(2): 320 – 329, 1978) bằng cách sử dụng các túi không chứa cholesterol đã chứng minh rằng việc làm suy kiệt cholesterol từ lớp vỏ bọc của virut có thể làm giảm khả năng các hạt virut nhiễm vào tế bào đích của chúng. Ngược lại, các điều tra viên khác đã báo cáo rằng để virut có khả năng lây nhiễm, bắt buộc phải có mặt cholesterol trong màng tế

bào đích mà không phải trong lớp vỏ bọc của virut. Tuy nhiên, những người khác đã đưa ra giả thuyết rằng quá trình loại bỏ cholesterol, chứ không phải là thiếu cholesterol trong lớp vỏ bọc, là nguyên nhân khiến cho khả năng lây nhiễm giảm. Bất kể là vai trò của cholesterol trong chức năng virut là gì, sự mất hoàn toàn và vĩnh viễn khả năng lây nhiễm vẫn chưa được chứng minh đối với các virut đã được làm suy kiệt cholesterol, cũng như không chỉ ra các virut đã được làm suy kiệt cholesterol là hữu hiệu trong các vacxin an toàn và hiệu quả.

Các phương pháp hóa học để làm suy kiệt cholesterol đã được báo cáo, ví dụ như, sử dụng xyclodextrin, n-butanol, di-isopropyl ete (DIPE), floete như sevofluran, các chất hoạt động bề mặt như TRITON X-100™ (polyetylen glycol p-(1,1,3,3-tetrametylbutyl)-phenyl ete hoặc polyoxyetylen octyl phenyl ete) hoặc TWEEN 20™ (PEG (20) sorbitan monolaurat), dietyl ete, và tổ hợp của chúng. Một số phương pháp hóa học đã được chứng minh là quá khắc nghiệt, dẫn đến sự tổn hao protein virut từ virion hoặc dẫn đến sự thay đổi cấu trúc đối với các protein còn lại. Sự có mặt và cấu hình tự nhiên của các protein sẽ là cần thiết để các virion đã bị suy kiệt cholesterol là hữu hiệu trong vacxin, đặc biệt là các vacxin mà kích thích sản sinh các kháng thể trung tính hướng đến protein thuộc lớp vỏ bọc của virut.

Trong một số trường hợp, sự suy kiệt cholesterol được nhận thấy là có thể đảo ngược. Việc bổ sung cholesterol ngoại sinh có thể giúp hoàn nguyên lớp vỏ bọc của virut và phục hồi khả năng lây nhiễm. Điều này có thể gây ra mối lo ngại về độ an toàn liên quan đến việc sử dụng các virut đã được làm suy kiệt cholesterol trong các vacxin, do cholesterol và các lipit khác có mặt trong máu hoặc các dịch thể khác, hoặc thậm chí màng tế bào chủ tiếp xúc với các virion đã được làm suy kiệt cholesterol, có thể có khả năng hoàn nguyên virion này và phục hồi khả năng lây nhiễm.

Các vacxin chứa các virut đã được làm yếu thường được xem là hữu hiệu nhất trong việc tạo ra tính miễn dịch bảo vệ. Tuy nhiên, có mối lo ngại về độ an toàn rằng các virut đã được làm yếu có thể bị đột biến hoặc tái tổ hợp và do đó quay trở lại trạng thái độc. Các virut đã được làm bất hoạt (chẳng hạn virut chết) thường được xem là an toàn để dùng trong vacxin, nhưng các phương pháp làm bất hoạt thường

làm thay đổi hoặc phá hủy các epitop kháng nguyên một cách hữu hiệu khi các chất kích thích khả năng miễn dịch bảo vệ bị giảm hoặc bị mất.

Do không có các vacxin hữu hiệu, các virut có vỏ bọc tiếp tục gây ra rủi ro về mặt sức khỏe cho người và động vật không phải người, và bệnh gây ra bởi các virut có vỏ bọc này có ảnh hưởng lớn đến nền kinh tế. Cần có các vacxin cải tiến mà vừa an toàn vừa hiệu quả. Ví dụ, phương pháp cải tiến để làm bất hoạt virut có vỏ bọc mà vẫn bảo toàn được tính sinh miễn dịch của kháng nguyên virut, duy trì được tình trạng nguyên vẹn của virion, và gây ra ít hoặc không gây ra nguy cơ rủi ro về độ an toàn sẽ có lợi trong việc làm nhẹ bớt các bệnh gây ra bởi virut có vỏ bọc. Đơn sáng chế này bộc lộ phương pháp cải tiến để bất hoạt virut như vậy, bao gồm bước loại lipit của lớp vỏ bọc của virut bằng MBCD.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai. Nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất ít nhất là 5 mM đến khoảng 100 mM. Ngoài ra, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất là khoảng 20 mM đến khoảng 40 mM. Thêm nữa, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất bằng khoảng 20 mM, khoảng 30 mM, hoặc khoảng 40 mM.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ hai ít nhất là từ 10 mM đến khoảng 100 mM. Ngoài ra, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ hai là khoảng 30 mM đến khoảng 50 mM. Thêm nữa, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất bằng khoảng 30 mM, khoảng 40 mM, hoặc khoảng 50 mM.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó khoảng thời gian thứ nhất là khoảng 15 phút đến khoảng 24 giờ. Ngoài ra, khoảng thời gian thứ nhất là khoảng 4 giờ đến khoảng 24 giờ. Thêm nữa, khoảng thời gian thứ nhất là khoảng 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, hoặc 24 giờ.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó khoảng thời gian thứ hai là khoảng 4 giờ đến khoảng 48 giờ. Ngoài ra, khoảng thời gian thứ hai là khoảng 24 giờ đến khoảng 48 giờ. Thêm nữa, khoảng thời gian thứ hai là khoảng 24, 30, 36, 40, 44, hoặc 48 giờ.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó nhiệt độ của hỗn hợp thứ nhất trong suốt khoảng thời gian thứ nhất là nhiệt độ trong phòng, hoặc khoảng 20 °C đến khoảng 25 °C. Ngoài ra, nhiệt độ của hỗn hợp thứ nhất trong khoảng thời gian thứ nhất là từ khoảng 22 °C đến khoảng 24 °C.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó nhiệt độ của hỗn hợp thứ hai trong suốt khoảng thời gian thứ hai là nhiệt độ trong

phòng, hoặc từ khoảng 20 °C đến khoảng 25 °C. Ngoài ra, nhiệt độ của hỗn hợp thứ hai trong suốt khoảng thời gian thứ hai là từ khoảng 22 °C đến khoảng 24 °C.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó virut có vỏ bọc được phân lập từ hỗn hợp thứ nhất trước bước thu nhận hỗn hợp thứ hai. Theo cách khác và không giới hạn, dung dịch MBCD thứ hai có thể được trộn trực tiếp với hỗn hợp thứ nhất. Việc trộn trực tiếp có thể được thực hiện trong cùng một thùng vô hoạt ở dạng hỗn hợp trộn thứ nhất, hoặc hỗn hợp thứ nhất có thể được chuyển đến một thùng vô hoạt mới trước khi trộn với dung dịch MBCD thứ hai.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó khoảng thời gian thứ nhất còn bao gồm bước trộn hỗn hợp thứ nhất. Việc khuấy có thể là khoảng 30 vòng/phút đến khoảng 100 vòng/phút. Tốt hơn là, việc khuất có thể là khoảng 40 vòng/phút đến khoảng 60 vòng/phút. Tốt nhất là, việc khuấy có thể là khoảng 50 vòng/phút.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó khoảng thời gian thứ hai còn bao gồm bước trộn hỗn hợp thứ hai. Việc khuấy có thể là khoảng 30 vòng/phút đến khoảng 100 vòng/phút. Tốt hơn là, việc khuấy có thể là khoảng 50 vòng/phút.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm bước trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó virut có vỏ bọc là virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS). Virut có vỏ bọc cũng có thể là virut gây dịch bệnh tiêu chảy ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea Virus - PEDV).

Sáng chế đề xuất virut có vỏ bọc đã được loại lipit thu được bằng phương pháp trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai. Tốt hơn là, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất ít nhất là từ 5 mM đến khoảng 100 mM, hoặc khoảng 20 mM đến khoảng 40 mM. Tốt hơn là, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ hai ít nhất là từ 10 mM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 30 mM đến khoảng 50 mM, hoặc khoảng 30 mM, khoảng 40 mM, hoặc khoảng 50 mM. Tốt hơn là khoảng thời gian thứ nhất là từ khoảng 15 phút đến khoảng 24 giờ, hoặc khoảng 4 giờ đến khoảng 24 giờ, hoặc khoảng 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, hoặc 24 giờ. Tốt hơn là khoảng thời gian thứ hai là khoảng 4 giờ đến khoảng 48 giờ, hoặc khoảng 24 giờ đến khoảng 48 giờ, hoặc khoảng 24, 30, 36, 40, 44, hoặc 48 giờ. Tốt hơn là nhiệt độ của hỗn hợp thứ nhất trong suốt khoảng thời gian thứ nhất là nhiệt độ trong phòng, hoặc khoảng 20 °C đến khoảng 25 °C, hoặc thậm chí khoảng 22 °C đến khoảng 24 °C. Tốt hơn là, nhiệt độ của hỗn hợp thứ hai trong suốt khoảng thời gian thứ hai là nhiệt độ trong phòng, hoặc từ khoảng 20 °C đến khoảng 25 °C, hoặc thậm chí từ khoảng 22 °C đến khoảng 24 °C. Tốt hơn là, virut có vỏ bọc được phân lập từ hỗn hợp thứ nhất trước bước thu nhận hỗn hợp thứ hai. Theo cách khác và không giới hạn, dung dịch MBCD thứ hai có thể được trộn trực tiếp với hỗn hợp thứ nhất. Việc trộn trực tiếp có thể được thực hiện trong cùng một thùng vô hoạt ở dạng hỗn hợp trộn thứ nhất, hoặc hỗn hợp thứ nhất có thể được chuyển đến một thùng vô hoạt

mới trước khi trộn với dung dịch MBCD thứ hai. Tốt hơn là, khoảng thời gian thứ nhất còn bao gồm bước trộn hỗn hợp thứ nhất, trong đó việc khuấy có thể là từ khoảng 30 vòng/phút đến khoảng 100 vòng/phút, từ khoảng 40 vòng/phút đến khoảng 60 vòng/phút, hoặc khoảng 50 vòng/phút. Tốt hơn là, khoảng thời gian thứ hai còn bao gồm bước trộn hỗn hợp thứ hai, trong đó việc khuấy có thể là từ khoảng 30 vòng/phút đến khoảng 100 vòng/phút, từ khoảng 40 vòng/phút đến khoảng 60 vòng/phút, hoặc khoảng 50 vòng/phút. Tốt hơn là, virut có vỏ bọc là virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) hoặc virut gây dịch bệnh tiêu chảy ở lợn (PEDV).

Sáng chế đề xuất vacxin chứa virut có vỏ bọc đã được loại lipit thu được bằng phương pháp trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai. Tốt hơn là, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất ít nhất là từ 5 mM đến khoảng 100 mM, hoặc khoảng 20 mM đến khoảng 40 mM. Tốt hơn là, nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ hai ít nhất là từ 10 mM đến khoảng 100 mM, hoặc từ khoảng 30 mM đến khoảng 50 mM, hoặc khoảng 30 mM, khoảng 40 mM, hoặc khoảng 50 mM. Tốt hơn là khoảng thời gian thứ nhất là từ khoảng 15 phút đến khoảng 24 giờ, hoặc khoảng 4 giờ đến khoảng 24 giờ, hoặc khoảng 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, hoặc 24 giờ. Tốt hơn là khoảng thời gian thứ hai là khoảng 4 giờ đến khoảng 48 giờ, hoặc khoảng 24 giờ đến khoảng 48 giờ, hoặc khoảng 24, 30, 36, 40, 44, hoặc 48 giờ. Tốt hơn là nhiệt độ của hỗn hợp thứ nhất trong suốt khoảng thời gian thứ nhất là nhiệt độ trong phòng, hoặc khoảng 20 °C đến khoảng 25°C, hoặc thậm chí khoảng 22°C đến khoảng 24°C. Tốt hơn là, nhiệt độ của hỗn hợp thứ hai trong suốt khoảng thời gian thứ hai là nhiệt độ trong phòng, hoặc từ khoảng 20°C đến khoảng 25°C, hoặc thậm chí từ khoảng 22°C đến khoảng 24°C. Tốt hơn là, virut có vỏ bọc được phân lập từ hỗn hợp thứ nhất trước bước thu nhận hỗn hợp thứ hai. Theo cách khác và không giới hạn, dung dịch MBCD thứ hai có thể được trộn trực tiếp với hỗn hợp thứ nhất. Việc trộn trực tiếp có thể được thực hiện trong cùng một thùng vô hoạt ở dạng hỗn

hợp trộn thứ nhất, hoặc hỗn hợp thứ nhất có thể được chuyển đến một thùng vô hoạt mới trước khi trộn với dung dịch MBCD thứ hai. Tốt hơn là, khoảng thời gian thứ nhất còn bao gồm bước trộn hỗn hợp thứ nhất, trong đó việc khuấy có thể là từ khoảng 30 vòng/phút đến khoảng 100 vòng/phút, từ khoảng 40 vòng/phút đến khoảng 60 vòng/phút, hoặc khoảng 50 vòng/phút. Tốt hơn là, khoảng thời gian thứ hai còn bao gồm bước khuấy hỗn hợp thứ hai, trong đó việc khuấy này có thể là khoảng 30 vòng/phút đến khoảng 100 vòng/phút, hoặc khoảng 50 vòng/phút. Tốt hơn là, virut có vỏ bọc là virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) hoặc virut gây dịch bệnh tiêu chảy ở lợn (PEDV).

Sáng chế đề xuất vacxin chứa virut có vỏ bọc đã được loại lipit thu được bằng phương pháp trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó vacxin này còn chứa ít nhất một trong số tá dược, chất ổn định, chất bảo quản, chất pha loãng hỗn hợp trộn. Tốt hơn là, tá dược là tá dược polyme trong nước, trong đó polyme là acrylat hoặc polyacrylat. Tốt hơn là, chất ổn định bao gồm ít nhất một trong số đường, hydrat cacbon, protein, và gelatin. Tốt hơn là, chất bảo quản là hợp chất kháng sinh hoặc hợp chất tĩnh lực học sinh vật mà làm chậm, ức chế hoặc ngăn ngừa sự phát triển, hoạt tính chuyển hóa, hoặc sự nhân lên của vi sinh vật. Tốt hơn là, chất pha loãng hỗn hợp trộn là nước, dung dịch muối đệm phosphat, môi trường nuôi cấy tế bào, hoặc dung dịch khác có độ mặn và độ pH sinh lý.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng virut có vỏ bọc đã được loại lipit thu được bằng phương pháp trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai; trong đó việc sử dụng này bao gồm bước điều trị bệnh hoặc triệu chứng gây ra bởi virut có vỏ bọc.

Sáng chế đề xuất việc sử dụng virut có vỏ bọc đã được loại lipit trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc triệu chứng gây ra bởi virut có vỏ bọc; trong đó virut có vỏ bọc đã được loại lipit này thu được bằng phương pháp trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch MBCD thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất; ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất; trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và ủ hỗn hợp thứ hai này trong một khoảng thời gian thứ hai.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "virut có vỏ bọc" là virut bất kỳ có màng kép lipit, hoặc vỏ bọc, bao quanh lõi nucleoprotein. Lớp vỏ bọc của virut thường có nguồn gốc từ màng tế bào chủ và chứa phospholipit, glycolipit, sphingolipit, và các sterol như cholesterol. Virut có vỏ bọc bao gồm virut có hệ gen được mã hóa bởi ADN hoặc ARN. Các loài virut có vỏ bọc bao gồm, nhưng không giới hạn ở: herpesvirut, poxvirut, iridovirut, hepadnavirut, retrovirut, orthomyxovirut, arenavirut, bunyavirut, paramyxovirut, mononegavirut, rhabdovirut, filovirut, coronavirut, arterivirut, flavivirut, và togavirut. Các virut có vỏ bọc mới đượcphát hiện ra, và virut có vỏ bọc được phân loại và được phân loại lại do mỗi virut được mô tả đặc tính kỹ hơn. Mô tả hoàn thiện hơn về virut có vỏ bọc có thể được tìm thấy trong các tài liệu như Fields Virology (D.M. Knipe and P.M. Howley, eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2013), xuất bản lần thứ sáu.

Thuật ngữ "virut" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể có nghĩa là loài virut hoặc, có thể thay thế cho nhau, một đơn vị lây nhiễm riêng biệt hoặc các đơn vị chứa axit nucleic, protein, và vỏ bọc. "Hạt virut" là đơn vị lây nhiễm riêng biệt, và thuật ngữ này là đồng nghĩa với thuật ngữ "virion."

"Loại lipit" là quá trình loại bỏ hoặc làm suy kiệt lipit khỏi lớp vỏ bọc của virut. Việc loại lipit được xác định bởi lượng cholesterol được loại ra từ hạt virut bằng MBCD. Tuy nhiên, MBCD cũng có thể chiết, loại bỏ hoặc làm suy kiệt các lipit khác, như phospholipit. MBCD cũng được nhận thấy là tương tác với một số

protein, mặc dù quá trình được mô tả ở trong bản mô tả này làm giảm thiểu sự hao hụt protein từ protein virut do sự loại lipit qua trung gian MBCD.

"Khả năng lây nhiễm" là khả năng virut tạo ra sự lây nhiễm trong tế bào chủ, mà là tế bào bất kỳ từ người hoặc động vật không phải người có khả năng trợ giúp cho sự tái bản virut. Khả năng lây nhiễm có thể được xác định, chẳng hạn bởi số lượng hoặc tỷ lệ phần trăm tế bào chủ bị lây nhiễm bởi một số lượng hạt virut, hoặc bởi số lượng hoặc tỷ lệ phần trăm hạt virut cần để lây nhiễm tế bào chủ. Các hạt virut có thể được đếm dựa trên toán tử, như bằng cách xác định số đơn vị hình thành vệt hòa tan (đơn vị hình thành vệt hòa tan - PFU) trong một thể tích hạt virut. Các hạt virut cũng có thể được xác định dựa trên vẻ bề ngoài, như bởi sự có mặt của protein virut cụ thể được phát hiện, ví dụ, bởi thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), hoặc bằng cách xác định số lượng bản sao của hệ gen virut có mặt trong dung dịch, được phát hiện, chẳng hạn, bằng phan ứng chuỗi polymeraza định lượng (quantitative polymerase chain reaction - qPCR) thời gian thực.

"Kháng nguyên" là phân tử bất kỳ có khả năng được phát hiện đặc hiệu bởi hệ miễn dịch của một sinh vật. Điển hình, kháng nguyên virut là protein virut được mã hóa bởi hệ gen virut. Sự có mặt của kháng nguyên virut có thể được phát hiện đặc hiệu bởi cả lympho bào T và lympho bào B. "Khả năng sinh miễn dịch" dùng để chỉ khả năng một kháng nguyên gây ra đáp ứng miễn dịch. Đối với vacxin, khả năng sinh miễn dịch của kháng nguyên virut tốt hơn là sẽ gây ra sự miễn dịch bảo vệ ở động vật mà sẽ làm giảm, làm dịu bớt, hoặc cải thiện sự nhiễm virut.

Ngược lại với kháng nguyên, "tá dược" là chất kích thích không đặc hiệu của đáp ứng miễn dịch. Tá dược có thể kích thích đáp ứng miễn dịch bẩm sinh bằng cách gắn kết và hoạt hóa thụ thể nhận biết khuôn mẫu (pattern recognition receptor - PRR). Các chất kích thích như vậy của các PRR có thể là, ví dụ, axit nucleic virut hoặc vi khuẩn, lipit từ vi khuẩn hoặc vật ký sinh, hoặc protein hoặc độc tố vi khuẩn, hoặc các chất bắt chước các phân tử này được xây dựng nhân tạo. Tá dược cũng bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các hợp chất vô cơ mà kết tập các kháng nguyên để tạo điều kiện cho việc nhận biết bởi lympho bào B hoặc hấp thu bởi thể thực bào,

như phèn, hydroxit nhôm, nhôm phosphat, canxi phosphat hydroxit hoặc amoni sulfat; dầu; và các chất làm sạch. Tá dược cũng có thể là các chất trung gian của vật chủ truyền tín hiệu miễn dịch, như, không giới hạn ở, xytokin, lymphokin, chemokin, interferon, anaphylatoxin, các yếu tố sinh trưởng, các yếu tó biệt hóa, và phân tử kết dính.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "điều trị", "để điều trị", hoặc "việc điều trị", bao gồm việc ngăn cản, làm chậm, làm dừng, làm giảm, làm thuyên giảm, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nặng của triệu chứng, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc bệnh hiện có. Việc điều trị có thể được áp dụng để phòng ngừa hoặc để chữa bệnh.

Như được sử dụng ở đây, "việc dùng cho động vật" bao gồm dùng cho da, dưới da, trong cơ, niêm mạc, dưới niêm mạc, qua da, dùng theo đường miệng hoặc dùng trong mũi. Việc dùng có thể bao gồm tiêm hoặc dùng khu trú.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ thí nghiệm sau đây minh họa về các quy trình loại lipit. Cần hiểu rằng các phương án và ứng dụng khác sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ và sáng chế không giới hạn ở các ví dụ minh họa cụ thể hoặc các phương án được ưu tiên này. Virut có vỏ bọc chứa các mức cholesterol khác nhau trong vỏ bọc của chúng, tùy thuộc vào, ví dụ nhưng không giới hạn ở, loại và loài virut có vỏ bọc và tế bào chủ trong đó virut có vỏ bọc tái bản. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng, quy trình loại lipit được mô tả ở đây có thể đòi hỏi sự tối ưu hóa đối với mỗi giống gốc virut cụ thể. Màng vi sinh vật có thể chứa cholesterol, hopanoid, hoặc các sterol và các phân tử tương tự sterol khác, và vì vậy các mầm bệnh khác ngoài virut cũng có thể bị vô hoạt bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

Ví dụ 1

Chủng virut cúm H1N1 A/WSN/33 ở người được loại lipit bằng cách sử dụng các quy trình dưới đây. Trong các ví dụ dưới đây, việc loại lipit của virut cúm (IFV) làm suy giảm khả năng lây nhiễm. Do phương pháp loại lipit theo sáng chế bảo vệ

protein thuộc lớp vỏ bọc của virut, mong đợi là động vật được chủng ngừa bằng IFV đã được loại lipit phát triển đáp ứng miễn dịch mà bảo vệ chúng khỏi sự lây nhiễm virut độc lực ở liều lượng gây bệnh.

Chất phản ứng:

Chủng virut cúm H1N1 A/WSN/33 ở người và dòng tế bào chủ MDCK của nó là sẵn có từ Wuxi AppTec (Shanghai, China). Các chất phản ứng khác bao gồm MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA); EMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); ULTRAMDCK™ Serum-Free Medium (Lonza, Inc., Allendale, NJ); huyết thanh bào thai bò (FBS; Invitrogen); 0.25% Trypsin-EDTA (axit etylendiamintetraaxetic; Invitrogen); metyl-β-xyclodextrin (MBCD, Sigma-Aldrich); AMPLEX Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen); PIERCE™ BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL); và MTT (Sigma-Aldrich).

Sự nhân lên của virut cúm H1N1 A/WSN/33 trong dòng tế bào MDCK:

Các tế bào được cấy với IFV theo quy trình sau đây. Môi trường được loại ra khỏi tế bào MDCK được phát triển trong bình thót cổ T-75, các lớp đơn tế bào MDCK được rửa bằng 5 mL PBS ở nhiệt độ trong phòng, và các tế bào được tách ra bằng 1,5 mL trypsin/EDTA ở 37 °C. Tế bào được tái tạo huyền phù trong 10 mL MEM chứa 10% FBS và được kết viên bằng cách ly tâm ở 800 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Tế bào được tái tạo huyền phù trong MEM chứa 10% FBS, và mật độ tế bào được điều chỉnh đến 2,5 x 10^5 tế bào/mL. Mười lăm mL huyền phù chứa tế bào MDCK được cấy vào mỗi bình thót cổ T-75, và các bình thót cổ này được đặt ở 37 °C với 5% CO_2 và được ủ qua đêm.

Khi các tế bào MDCK nhập dòng lớn hơn 90%, MEM được loại khỏi bình T75, 5 mL môi trường duy trì EMEM chứa 1% FBS và 1 µg/mL trypsin được bổ sung, và các tế bào được lây nhiễm với virut cúm ở tỷ lệ gây nhiễm (Multiplicity of Infection - MOI) là 0,01. Bình được ủ trong 60 – 90 phút ở 37 °C với 5% CO_2 và được lắc nhẹ 15 phút một lần. Mười mL EMEM môi trường duy trì chứa 1% FBS và 1 µg/mL trypsin được bổ sung vào mỗi bình, và các bình được ủ trong 48 giờ ở 37 °C và 5% CO_2. Khi xấp xỉ 80% hiệu quả gây bệnh cho tế bào (cytopathic effect -

CPE) của virut đạt được (thường sau khoảng 48 giờ), dịch nổi nuôi cấy tế bào được thu hồi để thu được IFV.

Tinh chế và chuẩn độ IFV H1N1 A/WSN/33:

IFV được tinh chế theo quy trình sau đây. Dịch nổi nuôi cấy đã thu nhận được ly tâm ở 3.000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ các mảnh vụn tế bào, và phần dịch nổi được gộp lại. Phần dịch nổi được ly tâm ở 38.000 vòng/phút trong 60 phút để kết viên IFV. Viên kết IFV được tái tạo huyền phù trong thể tích thích hợp dung dịch muối đệm sinh lý (physiologically buffered saline - PBS) để tạo ra độ chuẩn cuối cùng >1,0 x 10^9 đơn vị hình thành vệt hòa tan/mL (PFU/mL). Các phần phân ước 100 µL của dung dịch gốc IFV cô đặc được bảo quản ở -80 °C.

IFV được chuẩn độ khả năng lây nhiễm *in vitro* bằng cách sử dụng quy trình sau. Bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy tế bào và quy trình vận chuyển nêu trên, các tế bào MDCK được tạo huyền phù trong MEM chứa 10% FBS ở mật độ cuối là 2,5 x 10^5 tế bào/mL. Hai mL MDCK huyền phù chứa tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 6 lỗ, và đĩa được ủ qua đêm ở 37 °C với 5% CO_2. Giống gốc virut được làm tan giá trong chậu nước 37 °C, sau đó bằng cách ly tâm ở 500 x *g* trong 10 phút ở 4 C. Dãy pha loãng 1/10 dung dịch gốc được điều chế và bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng, bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh ULTRAMDCK™ và 2,5 µg/mL trypsin làm dung dịch đệm pha loãng.

Khi các tế bào đạt mức nhập dòng ít nhất 90%, môi trường được loại bỏ, và 0,5 mL dung dịch đệm pha loãng và 0,5 mL dịch pha loãng virut được bổ sung vào mỗi lỗ. Đối với mẫu đối chứng âm tính, 1,0 mL dung dịch đệm pha loãng được sử dụng. Đĩa được lắc nhẹ ngay sau khi mỗi dịch pha loãng được thêm vào. Đĩa được ủ trong 60 – 90 phút ở 37 °C trong 5% CO_2 và lwacs mạnh 15 một lần. Tiếp theo, mỗi lỗ của mỗi đĩa 6 lỗ được phủ bằng 3 mL hỗn hợp gồm 2,5% agaroza có điểm nóng chảy thấp trong dung dịch PBS và dung dịch đệm pha loãng ở 37 °C theo tỷ lệ 1:4. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút để cho phép hỗn hợp phủ đặc lại; tiếp theo các đĩa được ủ ở 37 °C với 5% CO_2 trong 3 ngày.

Vệt hòa tan được nhìn bằng mắt thường bằng cách sử dụng quy trình sau. Sau khi vệt hòa tan được hiện màu hoàn toàn (3 ngày sau khi lây nhiễm), 1 mL 4% paraformaldehyt được bổ sung, và các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Agaroza hòa tan được loại bỏ, và 0,1 mL 0,5% tím tinh thể được bổ sung vào mỗi lỗ. Số vệt hòa tan được đếm sau 15 phút ủ và được chuyển thành độ chuẩn dựa trên hệ số pha loãng.

Loại lipit:

Quy trình loại lipit của IFV đã tinh chế được thực hiện theo hai phản ứng song song: xử lý bằng dung môi bao gồm bước cho IFV tiếp xúc với MBCD và giả xử lý, trong đó IFV được xử lý theo cách tương tự nhưng không tiếp xúc với MBCD. Độ chuẩn giống nhau của IFV được sử dụng trong cả xử lý bằng dung môi và giả xử lý. IFV trong giả xử lý có thể được chuẩn độ để gián tiếp tạo ra lượng IFV đã loại lipit còn lại sau khi xử lý dung môi.

Xử lý bằng dung môi và giả xử lý được tiến hành theo quy trình sau đây. Các phần phân ước (100 µL) của dung dịch gốc IFV được điều chế ở trên (>1,0 x 10^9 PFU/mL) được pha loãng vào 900 µL PBS trong ống Eppendorf để đạt được độ chuẩn cuối bằng 1,0 – 5,0 x 10^8 PFU/mL. MBCD trong PBS được bổ sung đến nồng độ cuối bằng 50 mM để xử lý bằng dung môi, hoặc một thể tích tương đương PBS được bổ sung để giả xử lý. Tiếp theo, ống Eppendorf được đậy nắp và được gắn kín bằng parafilm. Tất cả các mẫu được bảo vệ trong thiết bị lắc theo quỹ đạo trong môi trường không khí ở nhiệt độ không đổi SHZ-82 (Changzhou Guohua Appliance Co., China) được gia nhiệt trước đến 37 °C. Các mẫu đã được xử lý bằng dung môi và giả xử lý được xoay ở tốc độ quay quỹ đạo là 220 vòng/phút ở 37 °C trong khoảng 30 phút hoặc 45 phút. Các mẫu được xoay trong thiết bị vi ly tâm trong 1 phút, và phần dịch nổi chứa IFV được chuyển đến các ống siêu ly tâm. Các ống được ly tâm ở 200.000 x *g* (OPTIMA™ L-100XP; Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) trong 30 phút để kết viên IFV, và phần dịch nổi được loại bỏ. Các viên kết IFV được tái tạo huyền phù trong 1/10 thể tích ban đầu được bổ sung vào mỗi ống Eppendorf nêu trên và được bảo quản ở -80 °C cho đến khi phân tích tiếp.

Đặc trưng của IFV đã loại lipit:

Hàm lượng protein của IFV đã được giả xử lý và loại lipit được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm BCA (kit phân tích protein BCA của PIERCE™) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng cholesterol được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cholesterol (AMPLEX® Red Cholesterol Assay Kit, Life Technologies, Grand Island, NY) được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khả năng lây nhiễm *in vitro* được xác định bằng cách sử dụng quy trình chuẩn độ tương tự như đã nêu ở trên.

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu (hemagglutination - HA) được xác định như sau. Máu gà mới được phân lập được rửa ba lần với PBS, và tế bào hồng cầu (red blood cells - RBC) được tái tạo huyền phù trong PBS ở nồng độ 1%. Các dịch pha loãng virut (50 µL) được tạo ra trong PBS và được trộn với 50 µL huyền phù RBC. Hỗn hợp này được bổ sung vào mỗi lỗ riêng biệt trong đĩa 96 lỗ và RBC được để lắng trong 45 phút. Các lỗ được đánh giá là âm tính với HA (nghĩa là không có sự ngưng kết RBC) nếu có mặt một chấm nhỏ hoặc một viên kết RBC, và một lỗ được đánh giá là dwng tính nếu có mặt huyền phù nhuyễn chứa RBC.

Hai mẻ mẫu IFV đã được loại lipit và giả xử lý được điều chế theo quy trình nêu trên. Dung dịch gốc IFV được sử dụng cho các thử nghiệm có độ chuẩn bằng 2,2 x 10^{10} PFU/mL. Ở mẻ thứ nhất ("chế phẩm A"), thời gian loại lipit là 30 phút; ở mẻ thứ hai ("chế phẩm B"), thời gian loại lipit là 45 phút. Sau khi siêu ly tâm, các mẫu đã được loại lipit và giả xử lý được mô tả đặc trưng.

Khả năng lây nhiễm *in vitro* chỉ ra rằng PFU của các mẫu đã loại lipit là khoảng ~1/7.000 PFU của các mẫu giả xử lý. Kết quả về khả năng lây nhiễm được chỉ ra trong bảng 1 dưới đây. Mặc dù có sự khác biệt về độ chuẩn, hàm lượng protein của các mẫu khác nhau nằm trong phạm vi 10% của mỗi mẫu khác. Hàm lượng protein của IFV đã được loại lipit từ chế phẩm A là 97% của mẫu giả xử lý; và hàm lượng protein của IFV đã được loại lipit từ chế phẩm B là 93% của mẫu giả xử lý (*xem* bảng 1). Cũng nhận thấy rằng sau khi xử lý, khoảng 20% nguyên liệu ban đầu được thu hồi, như được xác định bởi hàm lượng protein. Tỷ lệ phần trăm thu hồi dựa trên hàm lượng protein có thể so sánh được với độ chuẩn xác định được của nguyên

liệu ban đầu (2,2 x 10^9 PFU/mL) và các mẫu được giả xử lý (4,0 x 10^8 PFU/mL, mà nó bằng 18% độ chuẩn ban đầu). Sau khi loại lipit, còn lại ít hơn 2% cholesterol, so với giả xử lý (*xem* bảng 1).

Bảng 1

Xử lý		Khả năng lây nhiễm *in vitro* (PFU/mL)	Hàm lượng protein (mg/mL)	Hàm lượng cholesterol (µg/mL)
Chế phẩm A (30 phút)	Giả xử lý	4 x 10^8	1,49	16,4
	Loại lipit	6 x 10^4 (1/6667) [a]	1,44 (97%) [b]	0,25 (1,5%) [b]
Chế phẩm B (45 phút)	Giả xử lý	2 x 10^8	1,39	15,9
	Loại lipit	3 x 10^4 (1/6667) [a]	1,29 (93%) [b]	0,1 (0,6%) [b]

Lưu ý: [a] phần khả năng lây nhiễm, so với mẫu giả xử lý;
[b] phần trăm so với mẫu giả xử lý.

Mẫu giả xử lý đã chỉ ra rằng việc xử lý vật lý (lắc và ly tâm) làm giảm độ chuẩn và protein. Việc loại lipit bởi MBCD ưu tiên loại bỏ cholesterol, mà không phải protein, từ IFV. Ngoài ra, IFV được xử lý bằng MBCD có khả năng lây nhiễm kém *in vitro*, nhưng khả năng lây nhiễm không bị loại bỏ hoàn toàn.

So sánh sự loại lipit ở IFV bằng diisopropyl ete và MBCD:

Ngoài MBCD, dung môi lipit khác, diisopropyl ete (DIPE) được sử dụng để loại lipit của IFV. Các mẫu IFV của cùng nguyên liệu ban đầu được xử lý bằng DIPE ở các nồng độ khác nhau hoặc bằng 50 mM MBCD. Các phần phân ước của cùng một lượng IFV được xử lý bằng 2%, 4%, 8%, hoặc 12% DIPE hoặc 50 mM MBCD ở 37 °C trong 30 phút. Sau khi ly tâm trong thời gian ngắn ở 2.000 x *g* trong 3 phút, dung môi nhìn thấy được loại bỏ, và nguyên liệu chứa nước được để khô trong tủ hút trong 20 phút. Tiếp theo, các mẫu được ly tâm ở 200.000 x *g* trong 30 phút để thu hồi các hạt virut. Khả năng lây nhiễm *in vitro*, hoạt tính HA, hàm lượng protein, và hàm lượng cholesterol của IFV được chỉ ra trong bảng 2.

Xử lý bằng DIPE ở nồng độ lên tới 12% nhằm loại bỏ cholesterol là không hữu hiệu bằng 50 mM MBCD trong cùng điều kiện. Trong khi 12% DIPE giúp loại bỏ khoảng 80% cholesterol từ IFV, 50 mM MBCD loại bỏ nhiều hơn 98%. Khả năng lây nhiễm IFV của hai mẫu xử lý này giảm 32 và 2250 lần, tương ứng, so với giả xử lý, như được xác định bằng cách so sánh PFU/mL. Việc loại bỏ cholesterol bằng cả hai dung môi là tương đối đặc hiệu, do hàm lượng protein giảm nhiều hơn 20% trong các mẫu xử lý khác nhau. Đối với khả năng định lượng hoạt tính ngưng kết hồng cầu (HA), 50 mM MBCD ảnh hưởng đến hoạt tính HA ở cùng mức độ như 2% – 8% DIPE.

Bảng 2

Xử lý	PFU/mL	Đơn vị HA	Protein (mg/mL)	Cholesterol (µg/mL)
Giả xử lý	$9,0 \times 10^8$	64	0,39	8,26
2% DIPE	$1,2 \times 10^8$	32	0,39 (100%) [a]	6,61 (80,0%) [a]
4% DIPE	$1,4 \times 10^8$	32	0,32 (82%) [a]	4,88 (59,1%) [a]
8% DIPE	$9,0 \times 10^7$	32	0,36 (92%) [a]	3,47 (42,0%) [a]
12% DIPE	$2,8 \times 10^7$	16	0,33 (85%) [a]	1,81 (21,9%) [a]
50 mM MBCD	$4,0 \times 10^5$	32	0,33 (85%) [a]	0,14 (1,7%) [a]

Lưu ý: [a] tỷ lệ phần trăm so với giả xử lý.

Xử lý bằng dung môi trong 45 phút:

Việc xử lý như trên được lặp lại, chỉ khác là khoảng thời gian xử lý bằng MBCD được kéo dài từ 30 đến 45 phút. Kết quả được chỉ ra dưới đây trong bảng 3.

Bảng 3

Xử lý	PFU/mL	Đơn vị HA	Protein (mg/mL)	Cholesterol (µg/mL)
Giả [a]	$1,2 \times 10^7$	32	0,42	6,16
10% DIPE [a]	$1,0 \times 10^5$	16	0,21 (50%) [c]	1,32 (21,4%) [c]
50 mM MBCD[b]	$1,0 \times 10^3$	32	0,39 (94%) [c]	0,15 (2,5%) [c]

Lưu ý: [a] lộn ngược đầu đuôi ở 37 °C trong 30 phút.
[b] lộn ngược đầu đuôi ở 37 °C trong 45 phút.
[c] tỷ lệ phần trăm so với giả xử lý.

So với việc xử lý trong 30 phút, việc xử lý trong 45 phút bằng 50 mM MBCD loại bỏ khoảng 97% cholesterol đối với IFV và khiến cho virut này lây nhiễm *in vitro* ít hơn 10.000 lần, so với mẫu giả xử lý. Ngược lại, 10% DIPE (xử lý trong 30 phút) kém hiệu quả hơn trong việc loại bỏ cholesterol (khoảng 80%) và dẫn đến giảm khoảng 120 lần về khả năng lây nhiễm *in vitro*. Hoạt tính HA không bị ảnh hưởng đáng kể bởi MBCD, trong khi nó giảm đáng kể bởi 10% DIPE. Hàm lượng protein giảm đến 50% sau khi xử lý bằng 10% DIPE, so với mức giảm 6% bởi 50 mM MBCD.

Hai bộ thí nghiệm được nêu ở đây chứng tỏ rằng 50 mM MBCD loại bỏ một cách chọn lọc cholesterol và khiến cho IFV đã được loại lipit lây nhiễm kém hơn trong khi vẫn duy trì hầu hết protein. Tuy nhiên, không mẫu xử lý nào trong số các mẫu xử lý này có khả năng hủy bỏ hoàn toàn khả năng lây nhiễm và vì vậy làm bất hoạt hoàn toàn virut, vì vậy cần tối ưu hóa tiếp theo quy trình này để làm bất hoạt hoàn toàn virut cúm. Việc tối ưu hóa tiếp theo có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gia tăng thời gian xử lý bằng MBCD và xử lý virut trong một khoảng thời gian thứ hai bằng MBCD.

Ví dụ 2

Xử lý PRRSV bằng MBCD giúp loại bỏ chọn lọc cholesterol, làm giảm khả năng lây nhiễm virut, và duy trì hầu hết hàm lượng protein của virut.

Chất phản ứng:

Chủng virut PRRSV được sử dụng trong ví dụ này là RESP (Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, China). Tế bào chủ được sử dụng là Marc-145 (Wuxi AppTec, Shanghai, China). Các chất phản ứng khác được sử dụng là giống như trong ví dụ 1 nêu trên, chỉ khác là DMEM (Invitrogen) được sử dụng khi nuôi cấy tế bào Marc-145.

Sự nhân lên của PRRSV trong tế bào Marc-145:

Các tế bào được cấy với PRRSV theo quy trình sau đây. Môi trường được loại ra khỏi tế bào Marc-145 được phát triển trong bình thót cổ T-75, các lớp đơn tế bào Marc-145 được rửa bằng 5 mL PBS ở nhiệt độ trong phòng, cad các tế bào được tách ra bằng 1,5 mL trypsin/EDTA ở 37 °C. Tế bào được tái tạo huyền phù trong 10 mL môi trường DMEM chứa 10% FBS và được kết viên bằng cách ly tâm ở 800 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường DMEM chứa 10% FBS, và mật độ tế bào được điều chỉnh đến 2,5 x 10^5 tế bào/mL. Mười lăm mL huyền phù chứa tế bào Marc-145 được cấy vào mỗi bình thót cổ T75, và các bình thót cổ được đặt ở 37 °C với 5% CO_2 và được ủ qua đêm.

Khi tế bào Marc-145 có độ nhập dòng lớn hơn 90%, DMEM được loại bỏ từ bình thót cổ T-75, 5 mL môi trường duy trì EMEM chứa 2% FBS được bổ sung, và tế bào được lây nhiễm với PRRSV ở MOI bằng 0,1. Bình được ủ trong 60 – 90 phút ở 37 °C với 5% CO_2 và được lắc nhẹ 15 phút một lần. Mười mL môi trường duy trì EMEM chứa 2% FBS được bổ sung vào mỗi bình, và các bình được ủ trong 96 giờ ở 37 °C và 5% CO_2. Khi đạt 80% CPE (thường 96 giờ), dịch nổi nuôi cấy được thu hoạch để thu được PRRSV.

Tinh chế PRRSV:

PRRSV được tinh chế theo quy trình sau đây. Dịch nổi nuôi cấy đã thu nhận được ly tâm ở 3.000 vòng/phút trong 20 phút để loại bỏ các mảnh vụn tế bào, và phần dịch nổi được gộp lại. Phần dịch nổi được ly tâm ở 100.000 x *g* trong 60 phút để kết viên PRRSV. Các viên kết PRRSV được tái tạo huyền phù trong thể tích thích

hợp dung dịch muối đệm sinh lý (PBS) đến độ chuẩn khoảng 1 x 10^9 PFU/mL. Các phần phân ước 100 µL PRRSV cô đặc được bảo quản ở -80 °C.

PRRSV được chuẩn độ khả năng lây nhiễm *in vitro* bằng cách sử dụng quy trình sau. Bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy tế bào và quy trình vận chuyển nêu trên, các tế bào Marc-145 được tạo huyền phù trong DMEM chứa 10% FBS ở mật độ cuối là 1,5 x 10^5 tế bào/mL. Hai mL Marc-145 huyền phù chứa tế bào được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa 6 lỗ, và đĩa được ủ qua đêm ở 37 °C với 5% CO_2. Các mẫu virut được làm tan giá trong chậu nước 37 °C, sau đó ly tâm ở 500 x *g* trong 10 phút ở 4 °C. Dãy pha loãng 1/10 của virut được chuẩn bị và bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng, bằng cách sử dụng EMEM làm dung dịch đệm pha loãng.

Khi các tế bào Marc-145 đạt mức nhập dòng ít nhất 90%, môi trường được loại bỏ, và 0,5 mL dung dịch đệm pha loãng và 0,5 mL dịch pha loãng virut được bổ sung vào mỗi lỗ. Đối với mẫu đối chứng âm tính, 1,0 mL dung dịch đệm pha loãng được sử dụng. Đĩa được lắc nhẹ ngay sau khi mỗi dịch pha loãng được thêm vào. Đĩa được ủ trong 60 – 90 phút ở 37 °C trong 5% CO_2 và lwacs mạnh 15 một lần. Tiếp theo, mỗi lỗ của mỗi đĩa 6 lỗ được phủ bằng 3 mL hỗn hợp gồm 2,5% agaroza có điểm nóng chảy thấp trong dung dịch PBS và dung dịch đệm pha loãng ở 37 °C theo tỷ lệ 1:4. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút để cho phép hỗn hợp phủ đặc lại, và theo các đĩa được ủ ở 37 °C với 5% CO_2 trong 96 giờ.

Vệt hòa tan được nhìn bằng mắt thường bằng cách sử dụng quy trình sau. Sau khi vệt hòa tan được hiện màu hoàn toàn (96 giờ sau khi lây nhiễm), 1 mL 4% paraformaldehyt được bổ sung, và các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Agaroza hòa tan được loại bỏ, và 0,5 mL 0,5% tím tinh thể được bổ sung vào mỗi lỗ. Số vệt hòa tan được đếm sau 15 phút ủ với tím tinh thể và được chuyển thành độ chuẩn dựa trên hệ số pha loãng.

Sự nhân lên *in vitro* của PRRSV:

Độ chuẩn PRRSV lớn hơn 1 x 10^7 PFU/mL là được ưu tiên đối với thử nghiệm protein và cholesterol. Sự nhân lên của chủng PRRSV-RESP trong các tế bào Marc-145 tạo ra mẫu virut đậm đặc có độ chuẩn > 1 x 10^8 PFU/mL.

Loại lipit của PRRSV:

Xử lý bằng dung môi và giả xử lý được tiến hành theo quy trình sau đây. Các phần phân ước 100 µL của dung dịch gốc PRRSV đậm đặc ở khoảng 1 x 10^9 PFU/mL được pha loãng thành 900 µL PBS trong các ống Eppendorf để đạt được độ chuẩn cuối bằng 1,0 – 5,0 x 10^8 PFU/mL. MBCD trong PBS được bổ sung đến nồng độ mong muốn để xử lý bằng dung môi, hoặc một thể tích tương đương PBS được bổ sung vào đối với mẫu giả xử lý. Tiếp theo, ống Eppendorf được đậy nắp và được gắn kín bằng parafilm. Tất cả các mẫu được bảo vệ trong thiết bị lắc theo quỹ đạo trong môi trường không khí ở nhiệt độ không đổi SHZ-82 (Changzhou Guohua Appliance Co., China) được gia nhiệt trước đến 37 °C. Các mẫu đã được xử lý bằng dung môi và giả xử lý được xoay ở tốc độ quay quỹ đạo là 220 vòng/phút ở 37 °C trong khoảng thời gian mong muốn. Các mẫu tương ứng được xoay trong thiết bị vi ly tâm trong 1 phút, và phần dịch nổi chứa IFV được chuyển đến các ống siêu ly tâm. Các ống được ly tâm ở 100.000 x *g* (OPTIMA™ L-100XP centrifuge; Beckman Coulter, Inc., Indianapolis IN) trong 30 phút để kết viên PRRSV, và phần dịch nổi được loại bỏ. Các viên kết PRRSV được tái tạo huyền phù trong 200 µL PBS và được bảo quản ở -80 °C cho đến khi phân tích tiếp.

Đặc trưng của PRRSV đã loại lipit:

Hàm lượng protein của PRRSV đã được giả xử lý và loại lipit được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm BCA (kit phân tích protein BCA của PIERCE™) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hàm lượng cholesterol cũng được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cholesterol (Amplex® Red Cholesterol Assay Kit, Life Technologies, Grand Island, NY) được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khả năng lây nhiễm *in vitro* được xác định bằng cách sử dụng quy trình tương tự như đã nêu ở trên.

Sự phụ thuộc vào nồng độ của MBCD:

Trong thí nghiệm loại lipit thứ nhất, PRRSV được loại lipit bằng 5, 10, 20, 30, và 50 mM MBCD trong 60 phút ở 37 °C. sau khi siêu ly tâm, các mẫu giả xử lý và loại lipit được thử nghiệm khả năng lây nhiễm *in vitro* trong các tế bào Marc-145,

và hàm lượng protein và cholesterol được xác định, bằng cách sử dụng các quy trình như đã nêu ở trên. Khả năng lây nhiễm, hàm lượng protein, và hàm lượng cholesterol của PRRSV đã được loại lipit được chỉ ra trên bảng 4.

Bảng 4

Xử lý	Khả năng lây nhiễm *in Vitro* (PFU/mL)	Hàm lượng protein (mg/mL)	Hàm lượng Cholesterol (µg/mL)
Giả xử lý	$1,6 \times 10^7$	4,46	11,64
5 mM MBCD	$1,4 \times 10^7$	3,94 (88%) [a]	9,82 (84%) [a]
10 mM MBCD	$7,0 \times 10^6$	4,00 (89%) [a]	4,66 (40%) [a]
20 mM MBCD	$2,8 \times 10^6$	4,05 (90%) [a]	4,46 (38%) [a]
30 mM MBCD	$1,2 \times 10^5$	4,36 (97%) [a]	4,00 (34%) [a]
50 mM MBCD	$4,2 \times 10^4$	4,40 (98%) [a]	3,29 (28%) [a]

Lưu ý: [a] tỷ lệ phần trăm so với giả xử lý.

Độ chuẩn của dung dịch gốc PRRSV-RESP ban đầu là $1,0 \times 10^8$ PFU/mL, 0,1 mL dung dịch gốc này được trộn với 0,9 mL PBS, cùng với lượng thích hợp MBCD. Sau khi lắc theo quỹ đạo ở 220 vòng/phút trong 60 phút ở 37 °C, các mẫu virut được kết viên bằng cách siêu ly tâm và được tạo huyền phù trong thể tích cuối là 0,2 mL PBS. Độ chuẩn của mẫu giả xử lý là $1,6 \times 10^7$ PFU/mL (TABLE 4), gợi ý rằng nhiều hơn 30% hoạt tính virut được thu hồi sau khi giả xử lý. Xử lý bằng MBCD làm giảm khả năng lây nhiễm và hàm lượng cholesterol theo cách phụ thuộc vào nồng độ ở mức lớn, trong khi 88% - 98% hàm lượng protein tổng được thu hồi ở tất cả các nồng độ MBCD (*xem bảng* 4). Sau khi xử lý bằng 50 mM MBCD, PRRSV đã loại lipit vẫn giữ lại khoảng 28% lượng cholesterol ban đầu so với mẫu giả xử lý,

và khả năng lây nhiễm PRRSV giảm khoảng 380 lần, nhưng không bị loại bỏ hoàn toàn.

Thử nghiệm cấy chuyển mù của mẫu PRRSV đã được loại lipit:

Độ chuẩn của một trong số các mẫu PRRSV đã được loại lipit (100 mM MBCD trong 90 phút) là dưới giới hạn phát hiện. Điều này đặt ra câu hỏi liệu có hạt vi rut lây nhiễm bất kỳ nào trong mẫu không. Để trả lời câu hỏi liệu có mặt hạt virut lây nhiễm nào không, một mẫu mới được loại lipit bằng 100 mM MBCD trong 90 phút và được cho tham gia thử nghiệm cấy chuyển mù được mô tả dưới đây. Trong khi mẫu PRRSV-RESP đối chứng có độ chuẩn 1,6 x 10^6 PFU/mL, không có vệt hòa tan nào được phát hiện bởi thử nghiệm cấy chuyển mù từ mẫu PRRSV được loại lipit bằng 100 mM MBCD trong 90 phút. Việc loại lipit bằng 100 mM MBCD trong 90 phút dường như làm bất hoạt PRRSV-RESP hoàn toàn.

Thử nghiệm cấy chuyển mù được thực hiện theo quy trình sau đây. Một trăm µL mẫu PRRSV đã được loại lipit được chuyển vào mỗi lỗ của đĩa 6 lỗ chứa tế bào Marc-145, được chuẩn bị bởi quy trình nêu trên. Đĩa được ủ trong 4 ngày ở 37 °C trong 5% CO_2. Thực hiện ba chu trình lạnh đông-tan giá liên tục để dung giải tế bào, và phần dịch nổi chứa PRRSV được thu nhận và ly tâm ở 800 vòng/phút trong 5 phút ở 4 °C. Bốn trăm µL phần dịch nổi được chuyển vào bình thót cổ chứa tế bào Marc-145. Các bình được ủ trong 4 ngày ở 37 °C và 5% CO_2. Các chu trình lạnh đông-tan giá được lặp lại, và phần dịch nổi được thu hoạch tiếp, được lay tâm, và chuyển đến bình thót cổ chứa các tế bào Marc-145 như trước đây. Các chu trình lạnh đông-tan giá được lặp lại một lần nữa, phần dịch nổi được thu nhận tiếp và được ly tâm, và phần dịch nổi chứa PRRSV được làm lạnh đông ở -80 °C cho đến khi sử dụng tiếp. Độ chuẩn PRRSV của các mẫu được thu hoạch cuối cùng được xác định bằng cách sử dụng các tế bào Marc-145 như đã nêu ở trên.

Ví dụ 3

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định tính phụ thuộc theo thời gian đối với sự bất hoạt PRRSV chủng ND 99-14 nhờ phương pháp loại lipit sử dụng metyl β xyclodextrin (MBCD). MBCD được mua ở dạng bột từ CTD, Inc. (Alachua, FL).

Dung dịch gốc 300 mM được điều chế bằng cách bổ sung 1000 mL nước vào 280 g MBCD để tạo ra dung dịch gốc.

Loại lipit virut:

Các thí nghiệm động học bất hoạt được thực hiện bằng cách sử dụng PRRSV chủng ND99-14, được mô tả trong đơn đang xét nghiệm US Ser. No. 62/296,658, nộp ngày 18 tháng 2 năm 2016. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm bước bổ sung MBCD ở nồng độ cuối 40 mM và trong thời gian ủ tổng cộng 72 giờ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời khuấy liên tục. Việc bổ sung MBCD xảy ra theo 2 bước, 20 mM để bắt đầu quá trình bất hoạt, 20 mM MBCD tiếp theo được bổ sung 24 giờ sau đó và được ủ thêm trong 48 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng đồng thời khuấy liên tục. Nhiệt độ trong phòng nằm trong khoảng từ 20 °C đến khoảng 25 °C, và tùy ý nằm trong khoảng từ 22 °C đến khoảng 24 °C.

Dung dịch gốc 300 mM của dung dịch MBCD ban đầu được bổ sung vào virut đến nồng độ cuối cùng là 20 mM bằng cách bổ sung 567 mL dung dịch MBCD vào 8,5 L dung dịch gốc virut. Virut được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời khuấy ở 50 vòng/phút. 30 mL virut được thu nhận ở 0 giờ, 15 phút, 4, 8, 12, 16, 20 và 24 giờ sau khi bổ sung MBCD. Các phần phân ước đối với mỗi thời điểm được bảo quản ở 4°C và -70°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Sau 24 giờ, mẫu được thu hồi, virut được chuyển đến đồ chứa mới. 20 mM MBCD nữa được bổ sung (650 mL MBCD được bổ sung vào 9,75 L dung dịch gốc virut) để đạt được nồng độ cuối cùng là 40 mM. Virut được ủ trong 48 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng. 30 mL virut được thu hồi ở 30, 36, 42, 48, 60, 72, 84 và 96 giờ sau lần bổ sung MBCD thứ nhất. Các phần phân ước đối với mỗi thời điểm được bảo quản ở 4°C và -70°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Xác định virut:

Dịch pha loãng 10 lần theo dãy nồng độ (10^{-1}-10^{-9}) của virut được giả bất hoạt và virut được bất hoạt được bổ sung vào các tế bào MARC145 được nuôi cấy trên đĩa 96 lỗ. Các đĩa được ủ ở 37°C và 5%CO_2 trong 96 giờ để cho phép virut sống lây nhiễm cho tế bào. Sự sao chép virut được xác định bằng cách quan sát hiệu quả gây

bệnh cho tế bào (CPE) do sự nhiễm virut của tế bào MARC145. Mỗi lỗ chứa dịch pha loãng virut được ghi điểm dương hoặc âm đối với CPE và số lỗ âm tính hoặc dương tính thu được đối với mỗi dịch pha loãng được sử dụng để xác định $TCID_{50}$/mL bằng cách tính $TCID_{50}$ theo Reed-Muench. Virut được giả bất hoạt được xử lý trong các điều kiện môi trường và nhiệt độ tương tự với virut được bất hoạt mà không bổ sung tác nhân gây bất hoạt.

Thực hiện ba lần cấy chuyển mù liên tiếp đối với các virut được giả bất hoạt và các virut được bất hoạt cũng như mẫu đối chứng chỉ chứa môi trường bằng cách sử dụng tế bào MARC145 được nuôi cấy trong bình thót cổ T-225. Các mẫu đã làm bất hoạt và mẫu đối chứng được bổ sung vào dịch nuôi cấy 2 ngày của các tế bào MARC145 và được ủ trong 7 ngày ở 37°C và 5%CO_2 (3 mL mẫu vào 27 mL môi trường). Các bình được kiểm tra bằng mắt thường sự có mặt của CPE. Mỗi bình thót cổ được ghi điểm là dương (+) hoặc âm (-) đối với CPE và được ghi lại. Dịch nổi từ các bình thót cổ được thu nhận và được bổ sung vào một bộ bình thót cổ T-225 chứa dịch nuôi cấy 2 ngày của các tế bào MARC-145 và được ủ trong 7 ngày ở 37°C và 5%CO_2. Các quá trình nêu trên được lặp lại hai lần để thu được sự quan sát CPE trong 3 lần cấy chuyển virut liên tiếp.

Độ chuẩn virut PRRS được xác định ở tất cả các thời điểm thu nhận trong suốt khoảng thời gian ủ 96 giờ bằng cách sử dụng các mẫu được bảo quản ở 2 nhiệt độ khác nhau như đã chỉ ra. 0 chỉ ra độ chuẩn không thể phát hiện được hoặc chưa được xác định bằng thử nghiệm xác định $TCID_{50}$ của virut sống PRRS. Các kết quả được thể hiện trong bảng 5 chứng tỏ rằng 40 mM được bổ sung vào quy trình gồm 2 bước có khả năng làm bất hoạt virut PRRS với độ chuẩn ít nhất là 8 log_{10} $TCID_{50}$/mL. Độ chuẩn cao hơn chứng tỏ sự bất hoạt không hoàn toàn với 20mM MBCD, nhưng virut không thể phát hiện được sau lần bổ sung MBCD thứ hai để mang lại nồng độ 40 mM. Kết quả cũng chỉ ra rằng thời gian là yếu tố ít góp phần vào sự bất hoạt. Thời gian ủ dài hơn ở nồng độ MBCD cho trước không làm gia tăng mức độ bất hoạt. Nồng độ 20 mM của MBCD làm giảm virut sống đi khoảng 2,5 log sau 15 phút ủ và lượng virut sống được phát hiện vẫn không đổi trong 24 giờ. Việc bổ sung 20 mM MBCD lần thứ hai ở 24 giờ ủ đã làm bất hoạt virut đến mức không

thể phát hiện được bởi mẫu được thu nhận ở thời điểm tiếp theo (30 giờ). Sự khác biệt về khả năng sống sót cũng được quan sát với sự có mặt của 40 mM MBCD ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau. Các mẫu được lấy ở các thời điểm với virut sống có thể phát hiện được khi được bảo quản ở -70°C có lượng virut ít hơn ít nhất 100 lần so với được bảo quản ở 4°C.

Bảng 5

Giờ	Mẫu được bảo quản ở 4 °C	Mẫu được bảo quản ở -70 °C
0,25	5,8[a]	3,3
4	5,8	nd
8	5,9	2,8
12	5,6	3,2
16	5,6	3,2
20	5,6	3,4
24	5,6	3,6
30	0	0
36	0	0
42	0	0
48	0	0
56	0	0
64	0	0
72	0	0

84	0	0
96	0	0

[a] Log_{10} $TCID_{50}$/mL

Ví dụ 4

Mục tiêu của nghiên cứu này là để đánh giá độ an toàn và hiệu quả của các vacxin PRRSV đã được bất hoạt bằng thí nghiệm trong nghiên cứu thử thách chủng ngừa. Vacxin được đánh giá khả năng làm giảm tổn thương phổi và mức nhiễm virut huyết của nó. Đặc tính của vacxin được quan tâm bao gồm nhiệt độ bảo quản, số liều dùng (1 so với 2) và việc bổ sung tá dược. Nghiên cứu được thực hiện trong điều kiện BSL-2 ở Veterinary Resources, Inc., Cambridge, Iowa. Thử nghiệm trong phòng thí nghiệm được thực hiện ở phòng thí nghiệm chẩn đoán thú ý thuộc trường đại học bang Iowa (Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory), Ames, Iowa and South Dakota State University Veterinary Diagnostic Laboratory, Brookings, South Dakota. Sáu mươi (60) con lợn đã cai sữa khỏe mạnh về mặt lâm sàng khoảng 3 tuần tuổi mà có phản ứng huyết thanh âm tính với PRRSV được tham gia vào nghiên cứu. Lợn được xếp loại theo thể trọng giảm dần và tạo ra 10 nhóm mỗi nhóm gồm 6 con. Lợn được phân ngẫu nhiên vào một trong sáu nhóm điều trị (10 con lợn trên mỗi nhóm). Các nhóm điều trị bao gồm nhóm đối chứng không chủng ngừa (T01) và năm nhóm được chủng ngừa với các vacxin PRRSV đã được làm bất hoạt theo thí nghiệm. Các vacxin được làm bất hoạt bằng cách loại lipit có sử dụng metyl-beta-xyclodextrin (MBCD). Nhóm vacxin T02 và T03 không chứa tá dược và được bảo quản ở 2-8°C (T02) hoặc -20°C (T03). Nhóm vacxin T04 và T05 chứa tá dược MONTANIDE™ Gel 01 (Seppic) và được dùng một lần (T04) hoặc hai lần (T05). Nhóm vacxin T06 chứa tá dược MONTANIDE™ IMS 1313 VG N PR (Seppic) và được sử dụng hai lần.

Lợn được cho ăn chế độ ăn ban đầu trong điều trị theo tiêu chuẩn thương mại (CTC/DENAGARD®) (NRC, 2012) *tùy thích* nhờ thiết bị nạp liệu ở trên đầu. Lợn được uống nước uống sạch *tùy thích* nhờ nước được dẫn qua các đường ống. Tất cả

lợn tham gia nghiên cứu đều được điều trị bằng EXCEDE® 10 ngày sau khi chủng ngừa (DPV). Ngoài ra, tất cả các con lợn đều được điều trị bằng một liều đơn VITAL E®-500 và một lần điều trị khác bằng EXCEDE® 21 DPV. Tất cả dược phẩm được cho dùng theo hướng dẫn ghi trên nhãn.

Vacxin

PRRSV chủng SD 11-21 (mức cấy chuyển 84) được dùng làm kháng nguyên trong nghiên cứu này. SD11-21 là chủng thực địa đã được làm thích nghi để phát triển trong dịch nuôi cấy tế bào qua 84 lần cấy chuyển dòng tế bào MARC-145 cũng như ba vòng tinh chế vệt hòa tan và ly tâm gradient sucroza, như được mô tả trong đơn đang xét nghiệm US Ser. No. 62/296,658, nộp ngày 18 tháng 2 năm 2016. Mẫu cấy chuyển 85 (p85) được tạo ra trong thiết bị phản ứng sinh học 5 L BioBLU dùng một lần (Eppendorf, Hamburg, Germany) được cấy MARC-145 gắn với vi chất mang HILLEX II (Pall Corporation, Port Washington, NY) trong môi trường OPTI-MEM (Life Technologies, Grand Island, NY) được bổ sung 2% huyết thanh bào thai bò (Sigma, St. Louis, MO) và 50 ug/mL Gentamycin (Life Technologies, Grand Island, NY). Độ chuẩn của dung dịch gốc virut p85 đã được thu nhận là 7,3 $\log_{10}TCID_{50}$ như được xác định bằng thử nghiệm chuẩn độ virut được mô tả trong ví dụ 3.

Trong chai 1L, 19,7 mL dung dịch gốc 300 mM MBCD (Sigma, St. Louis, MO) được bổ sung vào 300 mL dung dịch gốc virut SD11-21. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời khuấy liên tục ở 50 vòng/phút trong 24 giờ. Sau khi ủ 24 giờ, 9,8 mL dung dịch gốc MBCD được bổ sung tiếp vào và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ trong phòng đồng thời khuấy liên tục ở 50 vòng/phút trong 24 giờ nữa. Nồng độ cuối cùng của MBCD là 30 mM với tổng cộng 48 giờ ủ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch gốc chứa virut đã được giả bất hoạt cũng được điều chế bằng cách bổ sung một lượng tương đương nước thay cho MBCD, thời gian ủ và khuấy là giống với virut đã được làm bất hoạt. Virut đã được giả bất hoạt được sử dụng làm mẫu đối chứng cho thử nghiệm đánh giá virut. Sau khi xử lý, virut đã được giả bất hoạt có mặt với lượng 6,5 $\log_{10}TCID_{50}$/mL, trong khi không có virut sống nào được

phát hiện trong dung dịch virut đã được làm bất hoạt bởi MBCD. Dung dịch gốc virut được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Vacxin được bào chế để chứa chất ổn định và chất bảo quản. OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium được dùng làm chất pha loãng hỗn hợp trộn. Tá dược gồm các chế phẩm thương mại MONTANIDE™ Gel 01 (Seppic) và MONTANIDE™ 1313 VG N PR (Seppic). Sản phẩm đối chứng là chế phẩm thương mại (Corning Cellgro, Mediatech Inc. của dung dịch muối đệm phosphat (PBS). Vacxin không chứa tá dược bao gồm virut đã loại lipit, 25% chất ổn định B, 25 µg/ml gentamycin làm chất bảo quản, và chất pha loãng hỗn hợp trộn. Vacxin chứa tá dược bao gồm 20% tá dược đã nêu. Chất ổn định B bao gồm 2,5% D-mannitol (Sigma), 1,2% gelatin loại A (Fisher, Pittsburgh, PA), dịch thủy phân 1% NZ amin casein (Sigma), 5% sucroza (Sigma), và 6,2% trehaloza (Fisher) trong nước siêu tinh khiết (Life Technologies) ở độ pH 7,0 – 7,2.

Chủng ngừa và thử thách

Mỗi con lợn trong số 60 con tham giá vào nghiên cứu này được chủng ngừa ở ngày thứ -35 trước khi thử thách. Lợn ở nhóm T01-T05 được tiêm với mẫu xử lý chỉ định của chúng dưới dạng liều 1,0 mL trong cơ vào phía phải của cổ. Lợn thuộc nhóm T06 được tiêm với 1,5 mL. Lợn ở các nhóm T01-T03 và T05 và T06 được chủng ngừa lại 14 ngày sau đó (-21 ngày trước thử thách) theo cách tương tự. Ở 0 DPC, nguyên liệu thử thách được điều chế bằng cách làm tan giá các phần phân ước đã được làm lạnh đông của chủng NADC-20 ngay trước khi thử thách. Độ chuẩn được xác định là $1,26x10^{5.0}$ $TCID_{50}$/ml sau khi pha loãng trong môi trường thiết yếu tối thiểu (Minimum Essential Medium Eagle) với muối Earle và L-glutamin (MEM) từ Mediatech, Inc. Mỗi con lợn được giữ để thử thách với đầu hướng lên phía trên. Xy-ranh không khóa luer 3 mL được sử dụng để phân phối một liều 2 mL trong mũi, với khoảng 1 mL một lỗ mũi.

Kết quả

Ở 14 DPC, các động vật được giết bởi người theo các thủ tục tại chỗ. Phổi được cắt và được cho điểm bởi các điều tra viên của nghiên cứu, những người không

hề biết về việc xử lý. Mỗi trong số bảy thùy phổi được đánh giá cả bằng mắt thường và bằng bắt mạch đối với thương tổn đặc trưng tổng do PRRSV gây ra. Lượng thương tổn/sự hợp nhất ở mỗi thùy phổi được cho điểm dưới dạng giá trị thực nằm trong khoảng từ 0 đến 100% của thùy phổi. Điểm đối với mỗi thùy được đưa vào công thức hiệu chỉnh để tính toán tỷ lệ phần trăm phổi bị thương tổn. Tỷ lệ phần trăm của toàn bộ phổi bị thương tổn được tính theo công thức sau: Tỷ lệ phần trăm của toàn bộ phổi bị thương tổn = {(0,10 x đỉnh trái) + (0,10 x thùy tim trái) + (0,25 x màng ngăn trái) + (0,10 x đỉnh phải) + (0,10 x thùy tim phải) + (0,25 x màng ngăn trái) + (0,10 x thùy trung gian)}.

Ngoài ra, tỷ lệ phần trăm của toàn bộ phổi bị thương tổn được biến đổi bằng cách chuyển dạng arcsin, trước khi đưa đi phân tích tiếp. Dữ liệu đã biến đổi được phân tích bằng mô hình tuyến tính kết hợp có tính đến ảnh hưởng cố định của việc điều trị (quy trình MIXED trong SAS) và ảnh hưởng ngẫu nhiên của nhóm.

Kết quả phân tích thống kê của điểm tổn thương phổi được tóm tắt trong bảng 6. Ảnh hưởng chủ yếu của việc xử lý là có ý nghĩa về mặt thống kê (P = 0,0003). So sánh với nhóm đối chứng (T01) cho thấy tỷ lệ phần trăm phổi thấp hơn đáng kể (P<0,05) ở các nhóm được cho dùng tá dược Gel 01 (T04 và T05). Hơn nữa, Vacxin không chứa tá dược được dùng hai lần và được bảo quản ở 2-8°C (T02) tạo ra điểm tổn thương thấp hơn đáng kể (P<0,05) so với nhóm tương tự được điều trị bằng vacxin được bảo quản ở -20°C (T03).

Bảng 6. Điểm tổn thương phổi trung bình – bao hàm tỷ lệ phần trăm phổi được biến đổi arcsin (ảnh hưởng chủ yếu của việc điều trị: P = 0,0003)

Nhóm điều trị	Ước tính[1]	Sai số chuẩn	Trung bình[2]
T01 (Giả dược)	0,4760	0,1085	20,99
T02 (không chứa tá dược, 2 liều)	0,2761	0,1105	7,43

Nhóm điều trị	Ước tính[1]	Sai số chuẩn	Trung bình[2]
T03 (PRRS bất hoạt được bảo quản ở -70 °C)	0,6338	0,1085	35,07
T04 (tá dược Gel 01, liều đơn)	0,1678	0,1085	**2,79***
T05 (tá dược Gel 01, 2 liều)	0,2128	0,1141	**4,46***
T06 (tá dược 1313, 2 liều)	0,3418	0,1085	11,24
T02 v T03	Trị số P =		**0,0013**
T04 v T05	Trị số P =		0,6692
T02 v T05	Trị số P =		0,5594

*T01 so với T04 và T05 khác biệt đáng kể ở P < 0,05
[1]Giá trị trung bình chưa được biến đổi
[2]Giá trị trung bình đã được biến đổi ngược lại

Các mẫu máu để xác định mức nhiễm virut trong máu được thu nhận ở các ngày -35 và -21 trước khi thử thách. Ngoài ra, các mẫu máu để xác định mức nhiễm virut trong máu được thu nhận ở 0, 3, 7, 10 và 14 DPC. Các mẫu được kiểm tra sự có mặt của axit nucleic của virut PRRS bằng cách sử dụng kỹ thuật qRT-PCR

Dữ liệu huyết thanh học và virut trong máu được biến đổi thành các đơn vị $\log_{10}$ trước khi phân tích, tạo ra sự phân phối không chuẩn tắc. Các giá trị đã được biến đổi được phân tích bằng cách sử dụng mô hình kết hợp đo lặp lại (quy trình MIXED). Mô hình thống kê bao gồm ảnh hưởng của việc điều trị, thời gian, và ảnh hưởng của việc điều trị theo thời gian là các ảnh hưởng cố định. Nhóm được bao gồm trong mô hình là ảnh hưởng ngẫu nhiên. Nếu tương tác của việc điều trị theo thời gian là đáng kể (P<0,05), ảnh hưởng của việc điều trị theo thời gian được đánh

giá. Nếu tương tác này là không đáng kể, ảnh hưởng chủ yếu của việc điều trị được đánh giá. Trung bình bình phương nhỏ nhất (đã được biến đổi ngược lại) và sai số tiêu chuẩn được đưa ra.

Phân tích mức độ nhiễm virut trong máu được tóm tắt trong bảng 7. Không quan sát thấy sự nhiễm virut huyết ở bất cứ con lợn nào trước khi thử thách PRRSV, cho thấy virut trong vacxin đã không được bất hoạt. Các thời điểm trước khi thử thách được loại trừ khỏi phân tích thống kê. Sau khi thử thách, tương tác của việc điều trị theo ngày là không đáng kể (P=0,0974), vì vậy ảnh hưởng chủ yếu của việc điều trị được đánh giá. Ảnh hưởng của việc điều trị là đáng kể (P = 0,0107). So sánh với nhóm đối chứng (T01) cho thấy các mức thấp hơn đáng kể (P<0,05) ở tất cả các nhóm vacxin chứa tá dược (T04, T05 và T06). Không có sự tương phản nào được dự tính trước có nghĩa thống kê.

Bảng 7. Nhiễm virut trong máu - giá trị trung bình hình học của các bản sao hệ gen PRRSV/mL ở 3, 7, 10 và 14 DPC (đã được biến đổi $\log_{10}$) (ảnh hưởng chủ yếu của việc điều trị: P = 0,011; tương tác của việc điều trị theo ngày: P = 0,097)

Xử lý	Ước tính[1]	Sai số chuẩn	Giá trị trung bình hình học[2]
T01 (Giả dược)	6,2508	0,1149	1781506
T02 (không chứa tá dược, 2 liều)	5,9855	0,1211	967187
T03 (PRRS bất hoạt được bảo quản ở -70 °C)	6,2907	0,1149	1953141
T04 (tá dược Gel 01, liều đơn)	5,8753	0,1149	**750379***
T05 (tá dược Gel 01, 2 liều)	5,7720	0,1211	**591543***
T06 (tá dược 1313, 2 liều)	5,8878	0,1149	**772251***

Xử lý	Ước tính[1]	Sai số chuẩn	Giá trị trung bình hình học[2]
T02 so với T03	Trị số P =		0,0733
T04 so với T05	Trị số P =		0,5389
T02 so với T05	Trị số P =		0,2182

*T01 so với T04, T05, T06, khác biệt đáng kể ở P < 0,05
[1]Giá trị trung bình log10 chưa được biến đổi
[2]Giá trị trung bình đã được biến đổi ngược lại

Kết luận:

Việc chủng ngừa lợn bằng một hoặc hai liều vacxin chứa tá dược Gel 01 đã được làm bất hoạt bằng MBCD là hữu hiệu trong việc làm giảm đáng kể cả tổn thương phổi và mức nhiễm virut trong máu so với nhóm đối chứng. Tổn thương phổi được giảm đáng kể ở lợn được chủng ngừa bằng các vacxin khác đã được làm bất hoạt bằng MBCD (T02 và T06) được bảo quản ở 2-8°C. Do sự thay đổi về điểm tổn thương ở phổi, sự khác biệt này là không đáng kể ở mức P<0,05. Tất cả các vacxin MBCD chứa tá dược (MONTANIDE™ Gel 01 hoặc1313) làm giảm đáng kể sự nhiễm virut trong máu. Trong các nghiên cứu trong tương lai, cỡ mẫu lớn hơn có thể được cần đến khi chủng NADC-20 được dùng làm nguyên liệu thử thách để phát hiện sự khác biệt có nghĩa về mặt sinh học ở cả hai yếu tố là tổn thương phổi và nhiễm virut trong máu.

Nhiệt độ bảo quản dường như có ảnh hưởng đến hiệu lực của vacxin. Việc bảo quản vacxin ở -20 °C có ảnh hưởng tiêu cực đến hiệu lực vacxin so với vacxin được bảo quản ở 2-8 °C.

Việc chủng ngừa bổ sung 14 ngày sau lần chủng ngừa thứ nhất không cải thiện hiệu lực vacxin hơn nữa ở lợn được chủng ngừa bằng vacxin bất hoạt bằng MBCD chứa tá dược Gel 01.

Việc đưa tá dược Gel 01 vào vacxin bất hoạt bằng MBCD không ảnh hưởng đến hiệu lực vacxin.

Vacxin bất hoạt bằng MBCD là an toàn đối với lợn đang lớn như được chứng minh bởi việc không có phản ứng toàn thân sau chủng ngừa, không có thương tổn tại vị trí tiêm và chỉ có một đáp ứng sốt nhất thời (1 hoặc 2 ngày) trong nhóm chứa tá dược Seppic MONTANIDE™ Gel 01 sau khi chủng ngừa lần thứ hai.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bào chế virut có vỏ bọc được làm bất hoạt bao gồm:

trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch metyl β-xyclodextrin (MBCD) thứ nhất để thu được hỗn hợp thứ nhất;

ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất;

trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai để thu được hỗn hợp thứ hai; và

ủ hỗn hợp thứ hai đã nêu trong một khoảng thời gian thứ hai.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất ít nhất là 5 mM đến khoảng 100 mM.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ nhất là khoảng 20 mM đến khoảng 40 mM.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ hai là khoảng 10 mM đến khoảng 100 mM.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của MBCD trong hỗn hợp thứ hai là khoảng 30 mM đến khoảng 50 mM.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó khoảng thời gian thứ nhất là khoảng 15 phút đến khoảng 24 giờ.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó khoảng thời gian thứ nhất là khoảng 4 giờ đến khoảng 24 giờ.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó khoảng thời gian thứ hai là khoảng 4 giờ đến khoảng 48 giờ.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó khoảng thời gian thứ hai là khoảng 24 giờ, khoảng 36 giờ, hoặc khoảng 48 giờ.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó nhiệt độ của ít nhất một trong số khoảng thời gian thứ nhất và khoảng thời gian thứ hai là khoảng 20°C đến khoảng 25°C.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó nhiệt độ này là khoảng 22°C đến khoảng 24°C.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó virut có vỏ bọc được phân lập từ hỗn hợp thứ nhất trước bước thu nhận hỗn hợp thứ hai.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó virut có vỏ bọc là virut hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS).

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ít nhất một trong số khoảng thời gian thứ nhất và khoảng thời gian thứ hai còn bao gồm bước khuấy hỗn hợp thứ nhất và/hoặc hỗn hợp thứ hai.

15. Phương pháp sản xuất vacxin bao gồm:

trộn dung dịch chứa virut có vỏ bọc với dung dịch metyl β-xyclodextrin (MBCD) thứ nhất chứa nồng độ MBCD ít nhất là 5 mM đến khoảng 100 mM để thu được hỗn hợp thứ nhất;

ủ hỗn hợp thứ nhất trong một khoảng thời gian thứ nhất từ khoảng 15 phút đến khoảng 24 giờ;

trộn virut có vỏ bọc từ hỗn hợp thứ nhất với dung dịch MBCD thứ hai chứa nồng độ MBCD ít nhất là 10 mM đến khoảng 100 mM để thu được hỗn hợp thứ hai;

ủ hỗn hợp thứ hai này trong khoảng thời gian thứ hai từ khoảng 4 giờ đến khoảng 48 giờ;

phân lập virut có vỏ bọc này; và

kết hợp virut có vỏ bọc đã được phân lập với ít nhất một trong số: tá dược, chất ổn định, chất bảo quản, và chất pha loãng hỗn hợp trộn;

trong đó nhiệt độ của ít nhất một trong số khoảng thời gian thứ nhất và khoảng thời gian thứ hai là khoảng 20°C đến khoảng 25°C.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó virut có vỏ bọc là virut hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS).