



(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) 
1-0020925

(51)⁷ **A61K 39/12, C12N 7/00**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2013-02894 | (22) | 14.02.2012 | | |
| (86) | PCT/EP2012/052476 | 14.02.2012 | (87) | WO2012/110490 | 23.08.2012 |
| (30) | 61/444,071 | 17.02.2011 | US | | |
| (45) | 27.05.2019 | 374 | (43) | 25.11.2013 | 308 |
| (73) | BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (DE)
Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Germany | | | | |
| (72) | BERRY, Elizabeth Jane (US), HADDADIN, Fuad Tawfiq (JO),
KHAZRAEINAZMPOUR, Ali (US), KROLL, Jeremy (US), MALBURG, Sonia
Regina Cantisano (BR), SANDOVAL BASURTO, Edgar Arnulfo (MX),
SCHEERER, Stephen (US) | | | | |
| (74) | Công ty Luật TNHH T&G (TGVN) | | | | |
-

(54) **PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VIRUT GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN HÔ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN (PRRSV) VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA PRRSV**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV) và phương pháp sản xuất chế phẩm chứa PRRSV trên quy mô thương mại.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến việc sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-PRRSV) còn sống, giảm độc lực có thể được sử dụng trong sản xuất vắc xin chứa virus này trên quy mô thương mại và việc sử dụng chúng trong điều trị bệnh cho lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngày nay, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome-PRRS) được xem là bệnh tác động chủ yếu đến nền công nghiệp chăn nuôi lợn trên toàn thế giới. Hội chứng này được mô tả lần đầu tiên vào năm 1987 ở Hoa Kỳ là "bệnh bí hiểm ở lợn" và gia tăng nhanh chóng trên toàn cầu. Hội chứng này gây tổn thất nghiêm trọng đến quy trình sinh sản, làm tăng mức độ tử vong do nhiễm khuẩn thứ phát và làm giảm sự chuyển hóa thức ăn và giảm sự tăng trưởng khối lượng trung bình theo ngày. Không may, việc kiểm soát virus gây PRRS là khó khăn.

Virus PRRS (PRRS virus-PRRSV) là virus ARN mạch đơn có vỏ bao được phân loại thuộc họ Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). Virus này gây nên một căn bệnh phổ biến ở lợn mà được mô tả lần đầu tiên là "bệnh bí hiểm ở lợn" ở Hoa Kỳ vào năm 1987 (Hill, 1990). Bệnh này thể hiện là bệnh về đường hô hấp ở lợn trong tất cả các độ tuổi dẫn đến chết ở một số con lợn nhỏ và là vấn đề nghiêm trọng về sinh sản ở lợn cái trong độ tuổi sinh sản.

Sự truyền PRRSV có thể, và thường xảy ra qua tiếp xúc trực tiếp giữa con lợn bị nhiễm virus và lợn dễ bị ảnh hưởng. Sự truyền virus xảy ra qua đường không khí ở khoảng cách rất ngắn hoặc cũng có thể qua tinh dịch. Khi bị nhiễm, virus có thể ở lại trong máu của lợn trưởng thành trong khoảng từ hai đến bốn tuần và ở trong cơ thể lợn đã bị nhiễm từ một đến hai tháng hoặc lâu hơn. Ở lợn lòi đực bị nhiễm virus, virus có thể ở lại trong tinh dịch lâu hơn 100 ngày. Khoảng thời gian nhiễm trùng máu làm tăng đáng kể nguy cơ truyền virus. Hơn nữa, virus PRRS có thể có thể đi vào nhau trong

giai đoạn thai nghén thứ ba cuối cùng để nhiễm vào con lợn con ở trong tử cung và gây chết non hoặc làm cho con lợn con sinh ra bị yếu.

Tất cả các loại và nhóm vật nuôi có kích cỡ khác nhau, bao gồm lô vật nuôi có tình trạng sức khỏe tốt hoặc bình thường hoặc các lô vật nuôi ở ngoài trời hoặc trong nhà, đều có thể bị nhiễm virus PRRS. Nhóm vật nuôi bị nhiễm virus này có thể bị giảm khả năng sinh sản nghiêm trọng, cũng như tăng mức độ bị viêm phổi sau khi cai sữa với sự phát triển kém. Giai đoạn sinh sản điển hình kéo dài từ hai đến ba tháng; tuy nhiên, các vấn đề sau khi cai sữa thường trở nên lan rộng. Các bệnh về sinh sản được đặc trưng bởi sự bùng nổ sẩy thai mà ảnh hưởng đến cả lợn mẹ và lợn con trong giai đoạn cuối thai kỳ. Xảy ra đẻ non trong khoảng thời gian từ 109 đến 112 ngày của thai kỳ. Số lợn bị chết non và sinh ra bị yếu tăng và dẫn đến tăng đáng kể tỷ lệ tử vong trước khi cai sữa.

Giai đoạn hô hấp truyền thống đã được xem xét ở trong trại lợn con, cụ thể là trại lợn con hoạt động liên tục. Tuy nhiên, các vấn đề về hô hấp do virus PRRS cũng có thể thấy trong giai đoạn hoàn thiện như là một phần của bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (porcine respiratory disease complex-PRDC). Sự giảm tốc độ sinh trưởng, tăng phần trăm lợn không thể tiêu thụ được và tăng tỷ lệ tử vong sau khi cai sữa có thể xảy ra. Các nghiên cứu về triệu chứng thấy rằng tỷ lệ bị bệnh viêm phổi cao có liên quan đến virus PRRS cùng với nhiều loại vi khuẩn khác thường được xem là tác nhân truyền nhiễm thứ phát. Vi khuẩn phân lập có thể bao gồm trong số *Streptococcus suis*, *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, và *Pasteurella multocida*. Tác nhân virus thường bao gồm virus cúm lợn và virus corona gây bệnh hô hấp ở lợn. Các con lợn bị nhiễm bệnh hiếm khi đáp ứng lại với liều thuốc cao và tất cả các phương thức đều không kiểm soát được bệnh.

Virus PRRSV tồn tại ở hai kiểu gen được đề cập đến là kiểu "Hoa Kỳ" và "châu Âu" mà có chung khoảng 50% mức độ tương đồng về trình tự (Dea S et al. (2000). Arch Virol 145:659-88). Hai kiểu gen này cũng có thể được phân biệt bởi đặc tính miễn dịch học của chúng. Hầu hết thông tin giải trình tự trên sự phân lập khác nhau đều dựa trên protein cấu trúc, cụ thể là protein vỏ GP5 mà chiếm khoảng 4% hệ gen của virus, trong khi chỉ một số ít thông tin giải trình tự được biết dựa trên protein không cấu trúc (non-structural proteins-nsp). Sự phân lập PRRSV và sản xuất vắc xin

đã được mô tả trong một số công bố (WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930).

Chủng ngừa là phương pháp quan trọng để giảm bớt tổn hại do virus PRRS gây ra khi lợn đã hồi phục sau khi nhiễm virus PRRS sẽ phát triển đáp ứng miễn dịch, mà ở điều kiện bình thường sẽ bảo vệ chúng kháng lại cùng chủng virus đó. Tuy nhiên, virus PRRS có khả năng biến đổi do nhiều sự đột biến thường xảy ra ở virus ARN chuỗi đơn, dương; và do đó có thể xuất hiện chủng virus mới. Trong các trường hợp này, có thể không có sự bảo vệ chéo giữa các chủng và có thể thấy sự bùng phát bệnh ở các nông trại mà đã có sự nhiễm virus trước đây. Do đó, vẫn còn nhu cầu thêm về vaccin.

Phương pháp thường được sử dụng nhất để sản xuất vaccin virus sống giảm độc lực là cấy truyền hàng loạt virus trong cơ chất (thường là canh trường tế bào với một dòng tế bào mà chấp nhận virus) khác với chủ thể tự nhiên (S) cho đến khi virus này trở nên bị giảm độc lực phù hợp (nghĩa là, giảm độc tính hoặc giảm khả năng gây bệnh) để sử dụng làm vaccin. Với lần cấy truyền thứ nhất, canh trường tế bào được nhiễm chất để chủng ngừa lựa chọn. Sau khi thu được dấu hiệu rõ ràng về sự tái bản virus (ví dụ, tác dụng gây bệnh ở tế bào (cytopathic effects-CPE) do virus trong các tế bào bị nhiễm), một thể tích nhỏ môi trường nuôi cấy tế bào, hoặc các tế bào bị nhiễm, hoặc cả hai, của lần cấy truyền thứ nhất được sử dụng để nhiễm vào canh trường tế bào thứ hai. Quy trình này được lặp lại cho đến khi một hoặc nhiều đột biến quyết định trong hệ gen của virus gây ra sự suy yếu phù hợp để virus có thể được sử dụng an toàn làm vaccin. Mức độ suy yếu thường được xác định theo kinh nghiệm bằng cách để phối nhiễm chủ thể tự nhiên (S) với virus đã qua các lần cấy truyền tăng dần.

Quy trình trên về cơ bản là hợp lý và đã được sử dụng thành công để phát triển nhiều loại vaccin để sử dụng cho người và trong thú y. Tuy nhiên, khi quy trình này được sử dụng trên quy mô công nghiệp, vẫn còn nhu cầu về phương pháp sản xuất PRRSV có hiệu quả và có lợi về chi phí.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất virus PRRS sống để sử dụng trong sản xuất vaccin. Phương pháp mô tả ở đây có thể được sử dụng để sản xuất virus PRRS trên quy mô lớn, bao gồm nhưng không giới hạn ở chủng PRRSV 94881 đã được đưa vào trong Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật châu Âu (European Collection of Cell

Cultures-ECACC) có số hiệu lưu giữ ECACC 11012501 và ECACC 11012502 được đưa vào ngày 25 tháng 1 năm 2011 theo hiệp ước Budapest, hoặc bất kỳ thể hệ sau nào của các chủng đã đề cập.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV) trên quy mô thương mại, trong đó phương pháp này bao gồm:

- a) gieo đồng thời môi trường nuôi cấy cùng với dòng tế bào động vật có vú mà tùy ý nhiễm RRSV ở quy mô lớn vào bình phản ứng sinh học và gây nhiễm tế bào động vật có vú này với virus PRRSV.
- b) nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày sau khi gây nhiễm;
- c) thực hiện bước thu hoạch lần thứ nhất bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó;
- d) lại đổ đầy môi trường này vào bình phản ứng sinh học và nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 1 đến 4 ngày;
- c) thực hiện bước thu hoạch lần thứ hai bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó;
- d) lại đổ đầy môi trường vào bình phản ứng sinh học và nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 1 đến 4 ngày; và
- c) thực hiện bước thu hoạch lần thứ ba bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó.

Theo các phương án cụ thể, phương pháp này có thể bao gồm thêm ít nhất một bước nạp lại nguyên liệu và thu hoạch sau bước thu hoạch lần thứ ba bao gồm đổ đầy lại môi trường vào bình phản ứng sinh học và nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 1 đến 4 ngày và thực hiện bước thu hoạch lần thứ tư bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập virus đã nhân giống ra khỏi đó.

Tốt hơn, trong phương pháp sản xuất này, tính bội nhiễm (multiplicity of infection-MOI) hướng đến nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,30 và các tế bào động vật có vú được nuôi cấy ở mật độ nằm trong khoảng từ 7×10^8 đến $1,0 \times 10^9$ tế bào trong một bình phản ứng sinh học có dung tích 300l. Cụ thể hơn, mật độ nuôi cấy tế bào có

giá trị khoảng $1,0 \times 10^9$ tế bào trong một bình phản ứng sinh học dung tích 300l. Trong các phương án cụ thể, MOI có giá trị khoảng 7×10^8 hạt virut.

Phương pháp này có thể bao gồm việc kiểm soát nồng độ dextroza trong môi trường, trong đó bước thu hoạch lần thứ nhất được thực hiện vào ngày thứ nhất khi nồng độ dextroza trong môi trường giảm đến nhỏ hơn 0,1g/l.

Trong phương pháp sản xuất ở quy mô thương mại, tốt hơn bước thu hoạch lần thứ hai được thực hiện sau khi nạp lại môi trường vào 1 hoặc 2 ngày, và bước thu hoạch lần thứ ba được thực hiện sau khi nạp lại môi trường lần thứ hai từ 1 đến 4 ngày.

Theo các phương án cụ thể, môi trường nuôi cấy được bổ sung vào bình phản ứng sinh học vào ngày bổ sung dòng tế bào động vật có vú và PRRS vào hoặc vào trước ngày đó. Tốt hơn, môi trường nuôi cấy được bổ sung vào bình phản ứng sinh học vào ngày trước khi bổ sung dòng tế bào động vật có vú và PRRS. Nhiệt độ của bình phản ứng sinh học được đặt ở giữa 34°C và 38°C.

Theo một phương án cụ thể, môi trường nuôi cấy chứa 5% thể tích/thể tích huyết thanh bào thai bê đã được chiếu xạ.

Phương pháp này có thể được sử dụng để sản xuất PRRSV trên quy mô thương mại, bao gồm nhưng không giới hạn ở PRRSV được chọn từ lô bao gồm chủng PRRSV 94881 PRRSV 94881 được đưa vào Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật châu Âu (European Collection of Cell Cultures-ECACC) có số hiệu lưu giữ ECACC 11012501 và ECACC 11012502 được đưa vào ngày 25 tháng 1 năm 2011 theo Hiệp ước Budapest, chủng virut VR 2332, Lelystad (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), hoặc các chủng khác như chủng được đưa vào có số hiệu lưu giữ ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, số hiệu lưu giữ CNCM I-1140, số hiệu lưu giữ CNCM I-1387, số hiệu lưu giữ CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 và VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, hoặc ECACC V93070108; ATCC VR-2332, ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 và ATCC VR 2402, hoặc bất kỳ thể hệ sau nào của một trong các chủng đã đề cập ở trên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm chứa PRRSV trên quy mô thương mại, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a. gieo đồng thời tế bào động vật có vú tùy ý nhiễm PRRSV và PRRSV vào bình phản ứng sinh học chứa môi trường phù hợp cho sự phát triển của tế bào; và

b. thực hiện ba bước thu hoạch liên tiếp, trong đó PRRSV được thu hoạch sau mỗi lần thu hoạch thứ nhất và thứ hai, môi trường lại được đổ đầy vào, và trong đó:

i. thực hiện bước thu hoạch lần thứ nhất vào ngày thứ nhất mà nồng độ dextroza trong môi trường giảm đến nhỏ hơn 0,1 g/l;

ii. thực hiện bước thu hoạch lần thứ hai sau khi bổ sung môi trường vào sau bước thu hoạch thứ nhất 1 hoặc 2 ngày; và

iii. thực hiện bước thu hoạch lần thứ ba sau khi bổ sung môi trường vào sau bước thu hoạch thứ hai từ 1 đến 4 ngày. Phương pháp khác cũng bao gồm việc sử dụng quy trình xảy ra trong chai quay mà tương đương với quy trình trong bình phản ứng sinh học đã mô tả ở trên. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV) trên quy mô thương mại, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) gieo đồng thời môi trường nuôi cấy ở quy mô lớn cùng với dòng tế bào động vật có vú mà tùy ý gây nhiễm PRRSV vào trong chai quay và gây nhiễm tế bào động vật có vú với PRRSV; b) nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày sau khi gây nhiễm; c) thực hiện bước thu hoạch lần thứ nhất bằng cách lấy môi trường ra khỏi chai quay và phân lập virus đã nhân giống ra khỏi đó; d) đổ đầy lại môi trường vào trong chai quay và nhân giống virus trong thời gian khoảng 2 ngày; e) thực hiện bước thu hoạch lần thứ hai bằng cách lấy môi trường ra khỏi chai quay và phân lập virus đã nhân giống ra khỏi đó; f) đổ đầy lại môi trường vào trong chai quay và nhân giống virus trong khoảng thời gian 2 ngày và g) thực hiện bước thu hoạch lần thứ ba bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập virus đã nhân giống ra khỏi đó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến PRRSV MLV chứa PRRSV được sản xuất ra theo phương pháp đã mô tả ở đây được tạo chế phẩm với chất bổ trợ hoặc chất mang phù hợp để phân phối vào lợn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện quy trình đồng thời để sản xuất PRRSV 94881 trên quy mô lớn.

Fig.2 thể hiện sự xác định và tiến độ của quy trình trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l

Fig.3 thể hiện độ chuẩn virus và đặc trưng dextroza trong ba quy trình đồng thời trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l.

Fig.4 thể hiện độ chuẩn virus và đặc trưng glutamin trong ba quy trình đồng thời trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l.

Fig.5 thể hiện độ chuẩn virus và đặc trưng DO trong ba quy trình đồng thời trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l.

Fig.6 thể hiện kết quả PCR thời gian thực RT-PCT thể hiện % nhiễm trùng huyết trong cơ thể động vật có vú được chủng ngừa vắc xin với PRRSV 94881.

Fig.7 thể hiện quy trình đồng thời để sản xuất PRRSV 94881 trong chai quay.

Fig.8 thể hiện sự xác định và tiến độ của quy trình xảy ra trong chai quay.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV) còn sống trên quy mô lớn để sử dụng trong sản xuất vắc xin và các chế phẩm khác. Trong phương pháp sản xuất điển hình, virus phát triển trên dòng tế bào tùy ý nhiễm PRRSV. Tuy nhiên, trong các phương pháp chung này dòng tế bào được phát triển đến hoặc gần đến mức nhập dòng trước khi nhiễm PRRSV. Trong sáng chế, tác giả đã chứng tỏ một cách đáng ngạc nhiên rằng dòng tế bào này không cần phải được nuôi cấy và phát triển trước khi nhiễm PRRSV, mà PRRSV và dòng tế bào này còn có thể được đưa vào quy trình canh trường tế bào một cách đồng thời. Do đó sáng chế cho ra ưu điểm đáng kể trong việc tiết kiệm thời gian, chi phí và nguyên liệu khi virus được sản xuất ra nhiều trên quy mô thương mại. Thuật ngữ quy mô thương mại đề cập đến thể tích của canh trường tế bào lớn hơn 10l. Ví dụ, quy mô thương mại đề cập đến quy mô sản xuất PRRSV sống nằm trong khoảng từ 10l đến 3000l. Theo phương án cụ thể hơn, thể tích này nằm trong khoảng từ 30l đến khoảng 300l.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất chủng PRRSV bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở chủng PRRSV được đưa vào Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật có số hiệu lưu giữ ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429,

VR 2474 và VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, hoặc ECACC V93070108. Theo phương án ưu tiên cụ thể, phương pháp theo sáng chế được sử dụng để sản xuất chủng PRRSV 94881 được Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Germany đưa và Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật châu Âu (European Collection of Cell Cultures-ECACC), Porton Down, Salisbury, 30 Wiltshire, SP4 0JG, Great Britain, có số hiệu lưu giữ ECACC 11012501 (chủng gốc) và ECACC 11012502 (MSV đã suy yếu qua nhiều lần cấy chuyển) được đưa vào Bộ sưu tập chủng giống vi sinh vật châu Âu vào ngày 25 tháng 1 năm 2011 theo Hiệp ước Budapest, hoặc bất kỳ thể hệ sau nào của một trong các chủng đã đề cập ở trên. Các virus phát triển có thể là virus bất kỳ đã đề cập ở trên ở dạng giảm độc lực của chúng. Ngoài ra, các virus này có thể bị biến đổi gen để chứa một hoặc nhiều axit nucleic khác loại mà ghi mã các nhân tố quyết định kháng nguyên khác của một hoặc nhiều bệnh ở lợn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng có một số dòng tế bào tùy ý bị nhiễm PRRSV. Tế bào, ví dụ, các tế bào đại thực bào túi phôi ở lợn như tế bào thu được từ các tế bào MARC-145. Các tế bào khác có thể bị nhiễm PRRSV bao gồm tế bào MA-104; tế bào thận chuột con (Baby Hamster Kidney-BHK); tế bào buồng trứng chuột Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary-CHO); và tế bào thận khi xanh châu Phi khác với tế bào MA-104 hoặc tế bào MARC-145, như tế bào VERO; được chuyển nạp. Hơn nữa, tế bào có thể là tế bào phôi của lợn đã được làm thích nghi với sự phát triển lâu dài trong canh trường. Tế bào chủ phù hợp cụ thể là dòng tế bào khi MA-104, tế bào Vero, hoặc đại thực bào túi phôi ở lợn. PRRSV ưu tiên phát triển trên đại thực bào túi phôi (Wensvoort et al., 1991). Một số ít dòng tế bào, như CL2621 và các dòng tế bào khác được tách dòng từ dòng tế bào thận khi MA-104 (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993) cũng nhạy cảm với virus này và có thể được sử dụng trong phương pháp sản xuất trên quy mô lớn như đã mô tả ở đây.

Trong phương pháp ví dụ theo sáng chế được thể hiện trong ví dụ 1 dưới đây để xuất quy trình đồng thời để sản xuất PRRSV 94881 MLV. Trong khi quy trình này được thể hiện cho PRRSV 94881 MLV để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng quy trình này có thể được sử dụng dễ dàng cho bất kỳ quy trình sản xuất PRRSV trên quy mô lớn nào khi cần.

Virut được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng trong bất kỳ ứng dụng nào mà hiện nay sử dụng PRRSV. Theo phương án cụ thể, virut được tạo ra bằng phương pháp mô tả ở đây được sử dụng để bào chế PRRSV MLV.

Chủng virut phát triển theo phương pháp theo sáng chế có thể là virut PRRS độc, virut PRRS giảm độc lực hoặc virut PRRS từ thực vật đã bị biến đổi để đưa thêm các đặc tính mong muốn khác vào chúng. Có thể thực hiện việc này bằng kỹ thuật nhân giống và chọn lọc cổ điển; như nhân giống liên tục trong tế bào chủ phù hợp để đạt đến kiểu hình giảm độc lực. Ngoài ra, các chủng này bị biến đổi di truyền bằng sự đột biến có hướng trình tự axit nucleic trong hệ gen của các chủng này bằng kỹ thuật di truyền phù hợp. Hệ gen của PRRSV đã được giải trình tự hoàn toàn hoặc một phần (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, Murthaugh et al., 1995) và ghi mã, bên cạnh ARN polymeraza phụ thuộc ARN (ORFs 1a và 1b), sáu protein cấu trúc trong đó bốn glycoprotein vỏ có tên là GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) và GP5 (ORF5), protein màng không glycosyl hóa M (ORF6) và protein nucleocapsid N (ORF7) (Meulenberg et al. 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). Đặc trưng miễn dịch và sự giải trình tự nucleotit của chủng PRRSV typ châu Âu và Hoa Kỳ đã xác định sự khác biệt nhỏ về kháng nguyên trong chủng PRRSV trong protein virut cấu trúc (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

Thực vậy, virut ví dụ được phát triển theo sáng chế là virut PRRSV 94881. Trong khi chủng bị giảm độc lực được phát triển bằng cách sử dụng phương pháp đã mô tả ở đây, virut này có thể là virut PRRSV 94881 mà được tạo thành virut khảm trong đó khung của virut PRRSV 94881 có số hiệu lưu giữ ECACC là 11012502 hoặc của chủng gốc được đưa vào có số hiệu lưu giữ ECACC là 11012501 bị biến đổi để thay thế trình tự nội sinh của một hoặc nhiều ORF 1a, ORF 1b, ORF 2, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6, hoặc ORF 7 bằng ORF tương ứng của chủng virut PRRS khác. Ví dụ, chủng khác của virut PRRS có thể là chủng châu Âu khác như chủng virut Lelystad (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), hoặc các chủng khác như chủng được đưa vào có số hiệu lưu giữ là ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, số hiệu lưu giữ CNCM là I-1140, số hiệu lưu giữ CNCM là I-1387, số hiệu lưu giữ CNCM là I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 và VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, hoặc ECACC V93070108 hoặc có thể là chủng Hoa Kỳ như virut PRRS Bắc Mỹ, pT7P129A; ATCC VR-2332, ATCC

VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 và ATCC VR 2402.

Kỹ thuật tái tổ hợp để tạo ra trình tự biến đổi đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và thường sử dụng bản sao ADN bổ sung có chiều dài đầy đủ (dòng lây nhiễm) của hệ gen virus mà sau đó có thể bị biến đổi bằng phương pháp tái tổ hợp ADN và phương pháp thao tác (như đột biến định hướng vị trí, v.v.). Theo cách này, ví dụ, vị trí kháng nguyên hoặc đặc điểm enzym của protein virus có thể bị biến đổi. Dòng lây nhiễm của chủng virus PRRS trong hệ gen châu Âu và Bắc Mỹ đã được báo cáo trong tài liệu này và có thể được phát triển bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế.

Tốt hơn, vaccin theo sáng chế là vaccin sống bị biến đổi chứa một hoặc nhiều chủng này vẫn còn sống trong chất mang phù hợp, nhưng virus đã bị bất hoạt có thể được sử dụng để bào chế vaccin chết (killed vaccine-KV). MLV được bào chế chế phẩm điển hình để cho phép sử dụng từ 10^1 đến 10^7 hạt virus trong một liều, tốt hơn từ 10^3 đến 10^5 hạt trong một liều, tốt hơn nữa từ 10^4 đến 10^5 hạt trong một liều ($4,0-5,0 \log_{10}$ TCID₅₀). KV có thể được bào chế chế phẩm dựa trên độ chuẩn đã bị bất hoạt trước chứa từ 10^3 đến 10^{10} hạt virus trong một liều. Vaccin này có thể chứa chất mang được dùng, ví dụ dung dịch muối sinh lý. Vaccin này có thể chứa chất bổ trợ hoặc không chứa chất bổ trợ. Ví dụ về chất bổ trợ phù hợp là α -tocopherol axetat có thể có được dưới tên thương mại Diluvac Forte®. Ngoài ra, có thể sử dụng chất bổ trợ chứa phen.

Lợn có thể bị nhiễm PRRSV qua con đường mũi-miệng. Virus trong phổi bị đại thực bào túi phổi bắt giữ và trong đó sự tái bản tế bào của PRRSV được hoàn thành trong thời gian 9 giờ. PRRSV đi từ phổi đến hạch lympho trong phổi trong thời gian 12 giờ và đến hạch lympho ngoại biên, tủy xương và lá lách trong thời gian 3 ngày. Ở các vị trí này, chỉ một số ít chủng tế bào dương tính với kháng nguyên virus. Virus này ở trong máu trong ít nhất 21 ngày và thường lâu hơn. Sau thời gian 7 ngày, tìm thấy kháng thể cho PRRSV trong máu. Sự có mặt của cả virus và kháng thể trong lợn bị nhiễm PRRS thể hiện rằng sự nhiễm virus có thể tiếp tục trong một thời gian dài, mặc dù ở mức độ thấp, dù cho có mặt kháng thể. Trong vòng ít nhất 7 tuần, mật độ của tế bào túi phổi trong phổi khác với trong phổi SPF bình thường.

Vaccin có thể được thể hiện ở dạng chế phẩm đông lạnh chứa virus sống, được hoàn nguyên bằng dung môi, tạo ra dung dịch để tiêm. Do đó, sau các bước thu hoạch theo sáng chế, virus có thể được thu gom lại và được sấy đông khô. Dung môi có thể là, ví dụ nước, nước muối sinh lý, hoặc đệm, hoặc dung môi chất hỗ trợ. Dung môi có thể chứa chất hỗ trợ, ví dụ a-tocopherol axetat. Sau đó, vaccin đã hoàn nguyên có thể được tiêm vào trong cơ thể lợn, ví dụ, tiêm trong cơ hoặc trong da vào cổ. Để tiêm trong cơ, có thể tiêm 2ml, để tiêm trong da có thể tiêm 0,2ml. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vaccin, được chứa trong các vật chứa riêng biệt, chế phẩm sấy đông khô chứa virus và dung môi để hoàn nguyên, và tùy ý chứa thêm tờ giấy in rời chứa hướng dẫn sử dụng.

Vaccin bào chế từ virus được tạo ra theo phương pháp trong sáng chế không chỉ chứa một hoặc nhiều chủng đã đề cập ở trên, mà còn có thể chứa thêm các thành phần khác có hoạt tính chống lại PRRS hoặc các bệnh do virus hoặc vi khuẩn ở lợn khác, như virus circovirus ở lợn hoặc virus gây sốt lợn cổ điển. Do đó, sáng chế đề cập đến vaccin như đã mô tả, khác biệt ở chỗ trong vaccin này chứa ít nhất một kháng nguyên có hoạt tính kháng lại bệnh ở lợn mà không phải là PRRS. Hơn nữa, vaccin này có thể chứa các chất hỗ trợ được dùng hoặc dùng được trong thú y. Chất hỗ trợ đó là α -tocopherol. Do đó, vaccin mới, cụ thể, vaccin virus PRRS chứa PRRSV 94881 có thể được cải thiện thêm bằng cách bổ sung chất hỗ trợ vào. Sự cải thiện này bao gồm việc bào chế vaccin trong tổ hợp với chất hỗ trợ để nâng cao hiệu quả của vaccin để có đáp ứng/hiệu quả lâm sàng tốt hơn khi sử dụng tổ hợp của chất hỗ trợ và vaccin này so với khi chỉ sử dụng một mình vaccin. Ví dụ, vaccin theo sáng chế có thể bao gồm vaccin virus PRRSV 94881 và chất hỗ trợ được chọn từ lô bao gồm MCP-1, các phân đoạn *Haemophilus sonnus*, Carbapol™ và tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, vaccin virus bao gồm vaccin virus PRRSV 94881, mà có thể là vaccin tiểu đơn vị tái tổ hợp hoặc có thể là vaccin virus sống giảm độc lực. Một ví dụ về vaccin sống là Ingelvac®PRRS MLV và PRRSV 94881 có thể được bào chế theo cách tương tự với Ingelvac®PRRS MLV.

Ngoài các thành phần ở trên, vaccin có thể chứa thêm các thành phần khác miễn là các thành phần khác này không làm ảnh hưởng đến đặc tính của chất hỗ trợ MCP-1, các phân đoạn *Haemophilus sonnus*, Carbapol™ hoặc carbomer khác hoặc vaccin virus cơ sở. Các thành phần khác này bao gồm, ví dụ, chất kết dính, chất tạo

màu, chất làm khô, chất khử trùng, chất thấm ướt, chất ổn định, chất bổ trợ, chất bám dính, chất làm mềm dẻo, chất dính, chất gây lắng, nguyên liệu đắp, bazơ mỡ, chất loại bỏ keratin, cơ chất bazơ, chất hoạt hóa hấp thụ, axit béo, este của axit béo, rượu bậc cao, chất có hoạt tính bề mặt, nước và chất đệm. Các thành phần khác mà được ưu tiên là chất đệm, bazơ mỡ, axit béo, chất khử trùng, cơ chất bazơ hoặc chất có hoạt tính bề mặt.

Hàm lượng hoặc lượng chất bổ trợ sử dụng theo sáng chế có thể thay đổi và có thể được xác định bằng cách xem xét ví dụ, hoạt tính của vacxin virus PRRS sử dụng, và dạng bào chế. Chất bổ trợ có thể chiếm, ví dụ từ 1 đến 100% trọng lượng. Chế phẩm chứa PRRSV 94881 theo sáng chế được sản xuất ra bằng cách chỉ trộn lẫn thành phần chất bổ trợ và thành phần vacxin virus với nhau, hoặc trộn cùng với các thành phần khác khác nhau. Chế phẩm này có thể là chế phẩm mà vacxin virus và chất bổ trợ cùng ở trong một chế phẩm hoặc, chất bổ trợ và vacxin ở trong các chế phẩm riêng biệt có thể được sử dụng đồng thời hoặc lần lượt.

Thành phần chất bổ trợ này có thể được sử dụng tách biệt với vacxin virus khi sử dụng cho cơ thể. Ngoài ra, chất bổ trợ theo sáng chế, cùng với vacxin virus, có thể được sử dụng như là một vacxin đơn. Vacxin virus có thể là bất kỳ vacxin virus nào. Phương án cụ thể hơn bao gồm việc sử dụng vacxin virus PRRS chứa PRRSV 94881. Hơn nữa, vacxin này có thể được kết hợp với các vacxin khác như Ingelvac® PRRS MLV và/hoặc Porcilis® PRRS. Đây chỉ đơn thuần là vacxin virus PRRS ví dụ và các vacxin khác này có thể được tạo huyền phù với các chất bổ trợ đã mô tả ở đây.

Chế phẩm gây miễn dịch mô tả ở đây có ưu điểm cụ thể trong sản xuất kháng thể đáp ứng lại virus PRRS. Cụ thể, sáng chế thể hiện rằng việc sử dụng các chất bổ trợ cụ thể, và cụ thể là, MCP-1, làm tăng cường đáp ứng miễn dịch với virus PRRS khi sử dụng kết hợp chất bổ trợ và vacxin virus PRRS so với khi chỉ sử dụng một mình vacxin. Việc sử dụng này thể hiện làm giảm bớt mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng lâm sàng, như tổn thương phổi, chán ăn, đổi màu da, hôn mê, các dấu hiệu hô hấp, lợn bị khô héo, ho, tiêu chảy và sự kết hợp của các triệu chứng này, do bị nhiễm PRRSV. Quả thực vậy, quan sát thấy sự giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng lâm sàng do nhiễm virus PRRS khi sử dụng kết hợp vacxin và chất bổ trợ là nhiều hơn so với sự giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng đó khi chỉ sử dụng một mình vacxin mà không có chất bổ trợ.

Do đó chế phẩm này nâng cao đáng kể hiệu quả lâm sàng trong các con vật bị bệnh so với hiệu quả khi chỉ sử dụng một mình vaccin virus PRRS. Trong các phương án cụ thể, hiệu quả lâm sàng được nâng cao là sự giảm phần trăm bị tổn thương phổi so với các con vật không được nhận chế phẩm gây miễn dịch kết hợp với chất bổ trợ đã nói. Trong các phương án cụ thể, hiệu quả lâm sàng được nâng cao là sự giảm phần trăm bị tổn thương phổi so với các con vật không được nhận chế phẩm gây miễn dịch kết hợp với chất bổ trợ đã nói.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vaccin được cải tiến, cụ thể hơn là vaccin virus PRRS được cải tiến, trong đó sự cải tiến này bao gồm việc trộn lẫn vào vaccin virus một chất bổ trợ được chọn từ lô bao gồm MCP-1, các phân đoạn *Haemophilus sonnus*, carbapol và tổ hợp của chúng. Vaccin theo sáng chế có thể chứa thêm chất mang dược dụng. Hơn nữa, vaccin có thể chứa thêm các thành phần hoạt tính khác bao gồm HS, ORF 5, INF alpha, Poly ICLC, IL-12 để tăng cường thêm chức năng của vaccin PRRS. Các chất bổ trợ này có thể được bổ sung vào một mình hoặc trong tổ hợp với MCP-1.

Vaccin theo sáng chế có thể được bào chế theo bất kỳ phương pháp bào chế đã biết nào trong tình trạng kỹ thuật, ví dụ, được bào chế thành dạng bào chế lỏng, huyền phù, thuốc mỡ, bột, thuốc xức ngoài da, nhũ tương W/O, nhũ tương O/W, nhũ tương, kem, thuốc đắp, miếng đắp và gel và ưu tiên được sử dụng làm thuốc. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa thành phần vaccin ở trên. Vaccin theo sáng chế, khi sử dụng cho da, có thể gây sản sinh ra kháng thể một cách đáng kể. Do đó, theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất vaccin có thể được bào chế ở dạng chế phẩm áp da.

Hơn nữa, như mô tả ở trên, virus và chất bổ trợ theo sáng chế có thể được dùng cho cơ thể, cùng với nhau là vaccin đơn, hoặc là chế phẩm chất bổ trợ tách biệt và khác biệt với thành phần virus PRRS kháng nguyên của vaccin, nhờ đó chất bổ trợ hoạt động theo cách để lượng kháng thể được sinh ra trong cơ thể đáp ứng lại với vaccin virus PRRS có thể tăng đáng kể so với khi chỉ dùng một mình vaccin virus PRRS. Do đó, theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng lượng kháng thể sinh ra chống lại virus PRRS, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa vào cơ thể sinh vật lượng vaccin virus PRRS có hiệu quả gây miễn dịch và chất bổ trợ được chọn từ lô bao gồm MCP-1, phân đoạn *Haemophilus sonnus*,

carbapol và tổ hợp của chúng ở dạng đơn lẻ hoặc trong tổ hợp với thành phần khác được chọn từ lô bao gồm HS, ORF 5, INF alpha, Poly ICLC, IL-12 và các tổ hợp của chúng, với lượng có hiệu quả hỗ trợ miễn dịch đồng thời hoặc lần lượt.

Khi chất bổ trợ và vaccin virus PRRS được đưa vào cơ thể sinh vật, kết quả lâm sàng ở động vật được tăng lên. Lượng có hiệu quả của chất bổ trợ và lượng có hiệu quả gây miễn dịch của vaccin virus PRRS có thể được xác định một cách phù hợp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách xem xét, ví dụ, loại và đặc điểm của chất kháng nguyên, loại sinh vật, độ tuổi, trọng lượng cơ thể, mức độ nghiêm trọng của bệnh, loại bệnh, thời gian dùng và phương pháp dùng và sử dụng thêm lượng kháng thể sinh ra kháng lại chất kháng nguyên trong cơ thể sinh vật như là một chỉ số.

Vaccin virus PRRS, chất bổ trợ hoặc tổ hợp của chúng có thể được đưa vào cơ thể sinh vật bằng phương pháp bất kỳ phù hợp được chọn phụ thuộc vào, ví dụ, tình trạng bệnh lý của bệnh nhân và đặc điểm của bệnh. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm, dùng qua màng bụng, dùng qua da (ví dụ, tiêm dưới da, tiêm bắp và tiêm trong da), đưa qua đường mũi, dùng đường uống, dùng qua niêm mạc (ví dụ, dùng đường trực tràng, dùng đường âm và dùng đường giác mạc). Trong số các phương pháp này, tốt hơn là tiêm bắp.

Liều lượng trị liệu ví dụ của PRRSV MLV là khoảng hai mililit (2ml). Người có trình độ sẽ nhận ra rằng lượng liều lượng này có thể thay đổi dựa vào nòi giống, kích cỡ và các yếu tố vật lý khác của từng chủ thể, cũng như chế phẩm cụ thể của PRRSV MLV và đường dùng. Tốt hơn là, PRRSV MLV được sử dụng ở dạng liều đơn; tuy nhiên, các liều bổ sung cũng có thể được sử dụng. Hơn nữa, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng liều lượng và số liều bị ảnh hưởng bởi độ tuổi và tình trạng cơ thể của lợn, cũng như các xem xét thông thường khác trong công nghiệp và tình trạng bệnh lý cụ thể khi sử dụng PRRSV MLV.

Theo các phương án khác, vaccin có thể là vaccin đa giá gồm có hai hoặc nhiều virus PRRS, trong đó ít nhất một trong các virus PRRS là virus 94881 được làm giảm độc lực với số hiệu lưu giữ ECACC là 11012502. Virus PRRS khác có thể là một hoặc nhiều chủng được chọn từ lô bao gồm chủng PRRSV được đưa vào với số hiệu lưu giữ là chủng virus Lelystad (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91) hoặc các chủng khác như chủng được đưa vào có số hiệu lưu giữ ECACC 04102703, ECACC 04102702,

ECACC 04102704, số hiệu lưu giữ CNCM I-1140, số hiệu lưu giữ CNCM I-1387, số hiệu lưu giữ CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 và VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 hoặc ECACC V93070108 hoặc thực tế có thể là chủng U.S. như virus PRRS Bắc Mỹ, pT7P129A; số hiệu lưu giữ ATCC VR-2332, số hiệu lưu giữ ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 và ATCC VR 2402.

Vaccin chứa virus PRRS có thể được sử dụng để chủng ngừa cho cả lợn nái và lợn con. Theo một khía cạnh của sáng chế, chế độ liều lượng cụ thể được lựa chọn dựa trên độ tuổi và kháng nguyên được lựa chọn để sử dụng. Điều này sẽ cho phép các con lợn ở bất kỳ độ tuổi nào đều nhận được liều lượng có hiệu quả nhất dựa trên phát hiện của sáng chế rằng sự nhiễm PRRSV (từ cả sự phơi nhiễm kiểu đại và chủng ngừa) rõ ràng là nhanh hơn ở động vật lớn tuổi hơn. Do đó, theo một số khía cạnh, việc chủng ngừa cho các con vật lớn tuổi hơn được ưu tiên, nhưng việc chủng ngừa cho các con lợn ít tuổi, bao gồm con lợn ba tuần tuổi và ít hơn giúp gây ra sự miễn dịch chủ động và vẫn rất có lợi. Độ tuổi của con vật có thể là yếu tố quan trọng trong việc kiểm soát PRRS và có thể là yếu tố ảnh hưởng đến sự chủng ngừa và sự phát triển của đáp ứng miễn dịch hiệu quả. Do đó, độ tuổi, sự kiểm soát bệnh, ngành chăn nuôi và miễn dịch tự nhiên và chủ động là rất quan trọng và cần được xem xét trong chiến lược kiểm soát bệnh.

Vaccin PRRSV 94881 có thể được dùng ở dạng thông thường bất kỳ và trong một số phương pháp ưu tiên dùng là đường mũi. Tốt hơn là, vaccin PRRSV được dùng cho ra các lợi ích của nó trong việc điều trị hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tác động đến sự nhiễm PRRSV sau một liều đơn, như Ingelvac®, tuy nhiên, nếu các kháng nguyên khác hoặc tổ hợp hoặc vaccin đa giá được lựa chọn, nên hiểu rằng chúng có thể được sử dụng ở dạng thông thường, mà có thể bao gồm một hoặc nhiều liều bổ sung sau lần sử dụng đầu tiên. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể xác định các mức liều lượng phù hợp dựa trên vaccin PRRSV được lựa chọn và phạm vi độ tuổi của con vật mà kháng nguyên được đưa vào đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1:

Ví dụ về việc sản xuất PRRSV 94881 MLV trên quy mô lớn

Quy trình sản xuất PRRSV 94881 trên quy mô lớn trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l sử dụng các tế bào MA104 ở giữa 64 đến 84 lần cấy chuyển. Các tế bào này được phát triển trong các chai quay 850cm² (Corning). Các tế bào được nuôi cấy đồng thời bị nhiễm virus trong bình phản ứng sinh học sục khí dung tích 300l. Trong quy trình nuôi cấy, nồng độ dextroza/lactat trong môi trường được kiểm soát theo g/l. Khi thu hoạch chất lỏng được lấy ra và các mẫu virus được giữ lại.

Thành phần môi trường như được thể hiện trong bảng sau:

Thành phần	Số lượng
Huyết thanh bào thai bò Phóng xạ gamma	5%
MEM không có bột đỏ phenol	9,6g/l
Neomycin sulfat	30mg/l
Natri bicacbonat	1,4g/l
Axit clohydric	Điều chỉnh pH

Môi trường MEM không có đỏ phenol, neomycin và 1,4g/l natri bicacbonat được chuẩn bị và được lọc. FBS được bổ sung vào môi trường đồng thời với môi trường để đưa vào bình phản ứng sinh học. Lượng neomycin bổ sung vào được tính toán bằng: thể tích(l) x 30mg/l ÷ hàm lượng (mg/g bazơ).

Quy trình để phát triển PRRSV 94881 bao gồm nuôi cấy tế bào AK MA104 trong bình phản ứng sinh học và gây nhiễm đồng thời tế bào với hạt virus PRRSV 94881. Fig.1 thể hiện quy trình đồng thời. Fig.2 đề xuất tiến độ của quy trình đồng thời trong Fig.1.

Trong quy trình đồng thời, một thể tích môi trường là 270l được lọc vô trùng vào bình phản ứng sinh học. Môi trường này được bổ sung vào bình vào ngày bổ sung tế bào và huyết thanh vào hoặc vào trước ngày đó. Nếu môi trường được bổ sung vào bình phản ứng sinh học vào ngày trước khi bổ sung tế bào và huyết thanh, bộ điều khiển nhiệt độ cần được kích hoạt để môi trường được giữ ở nhiệt độ 35°C, pH ở chế

độ điều khiển để pH được giữ ở $7,25 \pm 0,1$ và chế độ kiểm soát và khuấy trộn DO ở tốc độ 35 vòng/phút. Vào ngày bổ sung tế bào và huyết thanh bào thai bò đã được chiếu xạ (irradiated fetal bovine serum-IFBS), bộ điều khiển nhiệt độ được đặt ở nhiệt độ 36°C . IFBS được bổ sung vào bình phản ứng sinh học sau khi bổ sung môi trường và trước khi gieo hạt các tế bào. Nồng độ mong muốn của IFBS là 5% thể tích/thể tích, mà trong 270l thể tích có 14,0l thể tích IFBS trong một bình phản ứng sinh học.

Thực hiện trong ba bình phản ứng sinh học tròn có dung tích 300l. Các thông số trong bình phản ứng sinh học là: nhiệt độ ở 36°C , pH ở 7,25 trong chế độ điều khiển, bộ kiểm soát và khuấy trộn DO ở tốc độ 35 vòng/phút. Bảng 3, 4 và 5 thể hiện dữ liệu ghi lại cho %DO từ OIT, dextroza và Lactat từ YSI, và pH và L -glutamin từ NOVA. Độ chuẩn PD chỉ để tham khảo. Độ chuẩn QC là độ chuẩn chính thức.

Bảng 3. Kết quả chạy lô 001PD-X trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l								
ngày	pH	%DO	Dextroza g/l	Lactat g/l	Gln mmol/l	độ chuẩn	độ chuẩn	Bình luận
						PD	QC	
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7,24	168	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Chỉ có môi trường
0PI	7,2	92	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1PI	7,26	168	1	0,073	2,63	3,67	N/A	N/A
2PI	7,25	83	0,95	0,12	2,36	4,9	N/A	N/A
3PI	7,23	74	0,742	0,262	2,14	5,88	N/A	N/A
4PI	7,24	63	0,408	0,58	1,72	6,45	7,0	N/A
5PI	7,06	30	0,044	0,921	1,19	6,50	7,3	Kiểm soát DO
6PI	7,25	30	0,011	0,902	0,74	6,38	6,7	trong
7PI	7,24	30	0	0,855	0,49	7,40	7,4	đục

Bảng 3 thể hiện kết quả của lô 001PD-X trong 7 ngày nhiễm. Các mẫu được lấy hàng ngày và kết thúc chạy vào ngày 7PI. pH được đặt ở 7,25 và được giữ nguyên trong khi chạy ngoại trừ ngày 4PI khi pH giảm xuống dưới 7,0. Vào ngày 4PI, glucoza giảm xuống 0,4 từ 0,74 của ngày trước đó, glutamin bắt đầu được tiêu thụ và độ chuẩn

bắt đầu đi lên khoảng một log. Độ chuẩn đỉnh được quan sát vào ngày 5PI khi glucoza được tiêu thụ toàn bộ ($\leq 0,1$ g/l). Cũng vào ngày 5PI, DO giảm xuống 30% và bắt đầu điều khiển để tránh DO giảm xuống không qua đêm. Ngày 6PI độ chuẩn giảm và sau đó tăng đến 7,4 vào ngày 7PI. Mẫu bị đục vào ngày 7 PI.

Bảng 4. Kết quả chạy lô 002PD-X trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l								
ngày	pH	%DO	Dextroza g/l	Lactat g/l	Gln mmol/l	độ chuẩn	độ chuẩn	Bình luận
						PD	QC	
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7,27	116	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Môi trường bổ sung vào
0PI	7,2	83	1,04	0	N/A	N/A	N/A	Tế bào/huyết thanh/hạt bổ sung vào
1PI	7,25	75	1,01	0,073	1,64	3,88	n/a	N/A
2PI	7,25	74	0,954	0,105	1,73	5,5	n/a	N/A
3PI	7,24	70	0,762	0,223	1,41	5,93	6	N/A
4PI	7,19	60	0,409	0,561	1,25	6,62	6,5	N/A
5PI	7,21	30	0,005	0,881	0,9	6,79	7,5	Thu hoạch-I
R0PI (re-fed)	7,24	116	0,001	0,858	0,64	N/A	N/A	Đầu dò DO bị lỗi
R1PI	6,99	116	0,247	0,726	1,38	7,13	7,5	N/A
R2PI	7,15	116	0,0	0,894	0,95	7,06	7,0	dextroza là không có
R3PI	7,13	116	0,0	0,865	0,66	6,69	7,5	trong
R4PI	7,13	116	0,0	0,819	0,21	7,52	7,5	trong
R5PI	7,13	116	0,0	N/A	0,1	7	7,3	Một số vẫn đục

Bảng 4 thể hiện kết quả từ lô 002PD-X(R0P1 là điểm tại đó canh trường được nạp vào lại). Dựa vào kết quả độ chuẩn từ lô 001PD-X, ngày thu hoạch được đặt ở

ngày 5PI. Lô 002PD-X các ngày từ 1PI đến 5PI phù hợp với lô 001PD-X. Bình phản ứng sinh học được thu hoạch và sau đó được nạp lại nguyên liệu vào ngày 5PI. Đường tăng trưởng trong lần thu hoạch II được thiết lập. Các mẫu được lấy hàng ngày trong 5 ngày. Dextroza được tiêu thụ hoàn toàn vào ngày R2PI. Độ chuẩn ở đỉnh trong 5 ngày (thay đổi 0,5 log trong sai số thử nghiệm). Glutamin được tiêu thụ hoàn toàn vào ngày R5PI. Đầu dò DO giảm sau khi nạp nguyên liệu lại vào. Các mức DO không thể đo được (hầu hết gần bằng không). Vào ngày R4PI các tế bào vẫn bị giữ lại do mẫu trong chai còn trong. Vào ngày R5PI, quan sát được một số vẩn đục ở chai mẫu thể hiện rằng các tế bào có thể bắt đầu bị bong ra.

Bảng 5. Kết quả chạy lô 003PD-X trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l								
ngày	pH	%DO	Dextroza g/l	Lactat g/l	Glutamin mmol/l	độ chuẩn PD	độ chuẩn QC	Bình luận
			YSI	YSI	NOVA	TCID 50	TCID 50	
0PI	7,49	78	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1PI	7,25	69	0,987	0,078	2,05	4,38	4,7	Kiểm soát DO/điều khiển pH
2PI	7,23	66	0,935	0,107	1,9	5,13	5,7	N/A
3PI	7,22	60	0,783	0,221	1,71	6,2	6,5	N/A
4PI	7,29	53	0,453	0,519	1,45	6,36	6,6	N/A
5PI	7,1	30	0,049	0,899	1,17	6,36	7,0	Thu hoạch-I
0PI (refeed)	7,19	71	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Kiểm soát DO
R1PI	6,98	18	0,305	0,702	2,69	7,26	7,3	N/A
R2PI	7,23	7	0,0	0,917	1,82	6,85	7,5	Thu hoạch-II
0PI 2 nd refeed	7,21	74	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2R1PI	6,91	13	0,097	0,853	1,69	7,0	7,5	Kiểm soát DO

								ở 10%
2R2PI	7,19	3	0,0	0,883	0,82	7,2	7,3	Kiểm soát DO
2R3PI	7,17	2	N/A	N/A	0,42	7,46	7,5	đục
2R4PI	7,24	18	N/A	N/A	0,22	7,0	7,5	DO tăng
2R5PI	7,24	47	N/A	N/A	0,13	6,68	7,0	đục
2R6PI	7,22	62	N/A	N/A	0,06	6,5	7,0	đục
2R7PI	7,24	68	N/A	N/A	0,04	6,36	6,2	đục

Bảng 5 thể hiện kết quả từ lô 003PD-X. Dựa vào kết quả độ chuẩn từ lô 002PD-X, ngày thu hoạch II được đặt ở ngày 1PI hoặc 2PI. Quyết định thu hoạch chất lỏng vào ngày 2PI để cho ra tính linh động trong sản xuất. Đường cong phát triển cho lần thu hoạch III được thiết lập trong 7 ngày. Các mẫu được lấy hàng ngày. Dextroza được tiêu thụ hoàn toàn vào ngày 2R2PI. Độ chuẩn ở đỉnh trong 4 ngày và sau đó giảm xuống 7,0 trong 2 ngày (thay đổi 0,5 log trong sai số thử nghiệm này), sau đó giảm xuống 6,2 vào ngày 7PI. Glutamin được tiêu thụ hoàn toàn vào ngày 2R5PI. Không điều khiển DO vào ngày 2R2PI để kiểm sát sự chết của tế bào.

Giai đoạn thu hoạch I để nhân giống virus trên quy mô 300l:

Đường cong phát triển cho lần thu hoạch I (lô 001PD-X) thể hiện rằng các hạt virus tiếp tục phát triển đến ngày 7PI dù cho dextroza đã được tiêu thụ hoàn toàn ($\leq 0,1$ g/l) vào ngày 5PI. Sự tiêu thụ glutamin bắt đầu khi dextroza còn khoảng bằng một nửa nồng độ ban đầu là 1g/l (ngày 4PI), và sau đó sau khi dextroza đã được tiêu thụ, glutamin dường như là nguồn năng lượng chính. Sự mâu thuẫn khi đọc glutamin trong 2 đến 3 ngày đầu có thể do sự thay đổi bất thường trong thiết bị NOVA do môi trường chỉ chứa 2mmol/l. Mức DO giảm trong suốt sự chuyển hóa dextroza/glutamin và sự nhân giống virus.

Động lực của sự nhân giống virus đề xuất thu hoạch virus vào 5 đến 7 ngày PI. Sự biến đổi trong độ chuẩn QC ở giữa ngày 4 PI và 7 PI ở trong sự biến đổi của thử nghiệm ($\pm 0,71$ logs/ml). Tiêu chuẩn thu hoạch I là thời gian khi dextroza được tiêu thụ hoàn toàn ($\leq 0,1$ g/l) mà phù hợp với dữ liệu 31 (Study# 6127-1310-09K-198). Do đó, việc đo gián tiếp dextroza bắt đầu từ ngày 4 PI là cần thiết để thu được các mức dextroza. Bảng 3 thể hiện rằng virus PRRSV 94881 ổn định trong 3 ngày (5 đến 7 ngày

PI) trong bình phản ứng sinh học 300l sau khi dextroza bị tiêu thụ hết. Tuy nhiên, nếu lần thu hoạch thứ hai được thực hiện, dựa trên kết quả từ bảng 4 và 5, đề xuất rằng lần thu hoạch I được thực hiện vào ngày thứ nhất khi nồng độ dextroza $<0,1$ g/l (sử dụng thiết bị YSI) để đảm bảo tế bào bám vào lò xo (vật mang) trong bình phản ứng sinh học.

Giai đoạn thu hoạch II để nhân giống virus trên quy mô 300l:

Với lô 002PD-X và 003PD-X, sau khi thực hiện lần thu hoạch I vào ngày 5PI, môi trường mới và 5% huyết thanh được bổ sung vào để sinh ra chất lỏng virus cho lần thu hoạch thứ hai (bảng 4 và 5). Môi trường MEM (270-280L) có IFBS (5% thể tích/thể tích) được bổ sung vào bình phản ứng sinh học theo cùng quy trình như đã chỉ ra khi bổ sung nguyên liệu thu hoạch lần thứ nhất vào. Đường cong phát triển của lần thu hoạch II được thực hiện trong 5 ngày ở lô 002PD-X và thu được độ chuẩn đỉnh vào ngày 1 sau khi nạp lại nguyên liệu vào (xem bảng 4). Độ chuẩn ổn định trong 4 ngày. Độ chuẩn virus vào ngày 1 sau khi nạp lại nguyên liệu vào được so sánh với độ chuẩn của lần thu hoạch thứ nhất (bảng 2). Dextroza bị tiêu thụ hoàn toàn vào ngày 2 PI. Có thể sử dụng khoảng thời gian bốn ngày sau khi nạp lại nguyên liệu vào để làm tiêu chuẩn cho lần thu hoạch thứ hai. Tuy nhiên, thực hiện lần thu hoạch thứ hai vào ngày 4PI có ảnh hưởng đến lần thu hoạch thứ ba do quan sát thấy một số vẩn đục trong mẫu chất lỏng được lấy ra vào ngày 4PI mà thể hiện sự chết của tế bào hoặc tế bào rời ra khỏi lò xo. Cũng cho lô 003PD-X lần thu hoạch II được thực hiện vào ngày 2PI. Dựa vào dữ liệu từ lô 003PD-X chỉ ra lần thu hoạch II vào ngày 1-2PI nếu việc nạp lại nguyên liệu lần thứ hai và lần thu hoạch thứ ba tiếp tục được thực hiện.

Giai đoạn thu hoạch III để nhân giống virus trên quy mô 300l:

Với lô 003PD-X (bảng 5) sau lần thu hoạch II mà được thực hiện vào ngày 2PI, môi trường bổ sung và huyết thanh được bổ sung vào bình để sinh ra chất lỏng virus cho lần thu hoạch thứ ba (bảng 5). Môi trường MEM (270-280l) có IFBS (5% thể tích/thể tích) được bổ sung vào bình phản ứng sinh học theo cùng quy trình như đã chỉ ra khi bổ sung nguyên liệu cho lần thu hoạch lần thứ nhất. Đường cong phát triển của lần thu hoạch III được thực hiện trong 7 ngày và thu được độ chuẩn đỉnh vào ngày 1 sau khi nạp lại nguyên liệu vào (xem bảng 5). Độ chuẩn ổn định trong 4 ngày. Độ chuẩn virus vào ngày 1 sau khi nạp lại nguyên liệu vào được so sánh với độ chuẩn của

lần thu hoạch thứ hai (bảng 4 và 5). Dextroza bị tiêu thụ hoàn toàn vào ngày 1PI. Có thể sử dụng khoảng thời gian bốn ngày sau khi nạp lại nguyên liệu để làm tiêu chuẩn cho lần thu hoạch thứ ba.

Ba sơ đồ dưới đây thể hiện đặc trưng của dextroza, glutamin và DO, và độ chuẩn cho ba lần chạy trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l. Mục đích của các sơ đồ này để thể hiện sự nhất quán của ba lần chạy.

Fig.3 thể hiện tóm tắt về ba lần chạy ở quy mô 300l cho sự tiêu thụ dextroza và độ chuẩn virut. Đặc trưng thu hoạch I cho ba lần chạy là rất nhất quán, dextroza được tiêu thụ hoàn toàn ($\leq 0,1$ g/l) vào ngày 5PI và trùng với độ chuẩn đỉnh trong ba lần chạy. Sau khi nạp lại nguyên liệu vào lần thứ nhất, dextroza giảm xuống 0,3g/l ở lô 002PD và 003PD vào ngày 1PI và độ chuẩn đã ở đỉnh. Vào ngày 2PI, dextroza được tiêu thụ hoàn toàn và độ chuẩn virut ở đỉnh. Để thu hoạch III trong lô 003PD, khi lần nạp lại nguyên liệu thứ hai được thực hiện vào ngày R2PI, dextroza giảm xuống nhỏ hơn 0,1 g/l vào ngày 2R1PI và độ chuẩn ở đỉnh.

Fig.4 thể hiện tóm tắt về toàn bộ ba lần chạy ở quy mô 300l cho sự tiêu thụ glutamin và độ chuẩn virut. Như có thể thấy ở đặc trưng lần thu hoạch I, ba lần chạy là rất nhất quán. Glutamin giảm xuống còn một nửa nồng độ ban đầu của nó là 2 mmol/l vào ngày 5PI và nó trùng với độ chuẩn đỉnh khi thực hiện ba lần chạy. Sau lần nạp lại nguyên liệu thứ nhất vào, glutamin giảm xuống còn một nửa nồng độ ban đầu của nó vào ngày 2PI ở lô 002PD và 003PD và độ chuẩn đạt đỉnh từ ngày 1PI. Để thu hoạch III trong lô 003PD, khi nạp lại nguyên liệu lần thứ hai được thực hiện vào ngày R2PI. Glutamin được tiêu thụ từ từ đến còn 0 vào ngày 5 PI và độ chuẩn virut là phù hợp, khi đó tế bào bắt đầu chết và độ chuẩn giảm vào ngày 7PI.

Như có thể thấy ở đặc trưng thu hoạch I, ba lần chạy là rất nhất quán, DO giảm đến 30% vào ngày 5PI và phù hợp với độ chuẩn đỉnh trong ba lần chạy. Sau lần nạp lại nguyên liệu thứ nhất, đầu dò DO giảm ở lô 002PD-X, vì vậy dữ liệu không có, ở lô 003PD-X DO giảm vào ngày 1PI, phù hợp với độ chuẩn đỉnh. Để thu hoạch III trong lô 003PD, khi lần nạp lại nguyên liệu thứ hai được thực hiện vào ngày R2PI DO giảm nhanh chóng cho đến ngày 3PI khi các tế bào bắt đầu chết và DO bị tiêu thụ đến 0 vào ngày 5PI và độ chuẩn virut là phù hợp, sau đó tế bào bắt đầu bị chết và độ chuẩn giảm vào ngày 7PI.

Bảng 6. Tóm tắt các điều kiện và kết quả của quy trình đồng thời trong khi chạy bình phản ứng sinh học dung tích 300l*.

lô	PCD	MOI	TOH1	độ chuẩn H1	TOH2	độ chuẩn H2	TOH3	độ chuẩn H3
001PD-X	7,0 x 10 ⁹	0,1	5	7,3	N/A	N/A	N/A	N/A
002PD-X	7,0 x 10 ⁹	0,1	5	7,5	1-4	7,5	N/A	N/A
003PD-X	7,0 x 10 ⁹	0,1	5	7,0	2	7,5	1-4	7,5

*Điều kiện cuối cùng (0,1MOI, 7,0 x 10⁹ tổng số tế bào trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l, pH = 7,25, và nhiệt độ 36°C)

(H1): là lần thu hoạch thứ nhất vào ngày sau khi nhiễm.

(H2): là lần thu hoạch thứ hai vào ngày sau khi nhiễm.

(H3): là lần thu hoạch thứ ba vào ngày sau khi nhiễm.

Chất lỏng virus từ lô 001PD-X được làm mất màu và loại ra. Một lít từ lô 002PD-X ở lần thu hoạch I được gửi lại và SGS được bổ sung vào (25% thể tích/thể tích) để nghiên cứu, phần chất lỏng còn lại được làm mất màu và loại ra. Hai lít từ lô 003PD-X ở lần thu hoạch II được giữ đông lạnh để cô đặc, phần chất lỏng còn lại được làm mất màu và loại ra.

Phạm vi mật độ tế bào nuôi cấy (Planting Cell Density-PCD) ở quy mô 300l:

Mật độ tế bào nuôi cấy (planting cell density-PCD) đạt được là 7,0 x 10⁹ tổng số tế bào trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l với thể tích thực là 270-280l. Dựa vào dữ liệu từ Báo cáo chuyển hóa quy trình cuối cùng 30l (6127-1310-09K-198), tổng số tế bào nuôi cấy nằm trong khoảng ở giữa 7,0 x 10⁸ - 1,0 x 10⁹ trong bình phản ứng sinh học dung tích 30l. Do hạn chế về thời gian chỉ đánh giá được mật độ nuôi cấy tế bào cuối cùng.

Khoảng tính bội nhiễm (Multiplicity of Infection-MOI) ở quy mô 300l:

MOI cuối cùng là 0,1 là lý tưởng để nhân giống PRRSV 94881 trong hệ sinh trường này. Các mức độ MOI thấp và cao lần lượt là 0,01 và 0,3 được nghiên cứu trong bình phản ứng sinh học dung tích 30l.

Phân tích rủi ro: các thông số của quy trình đồng thời trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l được đưa ra trong bảng 11. Chỉ có thông số cuối cùng được thử nghiệm và được xem xét có quyết định đến quy trình này hay không. Các phạm vi này được đánh giá ở quy mô 30l. Các định nghĩa như sau:

Thông số quyết định là thông số quyết định đến chất lượng của sản phẩm cuối cùng;

Thông số không quyết định là thông số có thể được kiểm soát trực tiếp trong phạm vi xác định hoặc có phạm vi hoạt động rộng mà một sự lệch ra khỏi điểm thiết lập thì không nghiêm trọng. Thông số không quyết định giúp kiểm soát các thông số quyết định trong phạm vi xác định.

Thông số "chỉ để cung cấp thông tin" là thông số được kiểm tra để thu thêm thông tin về quy trình, nhưng không có liên hệ trực tiếp đến thuộc tính của sản phẩm cuối cùng.

Bảng 7: Tóm tắt về các thông số của quy trình đồng thời trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l cho PRRSV 94881 MLV

Thông số	*Giới hạn dưới được thử nghiệm	*Giới hạn trên được thử nghiệm	*Phạm vi được chấp nhận	Kết quả được chấp nhận	Quyết định/không quyết định
MOI	0,01	n/a	0,01-0,30	0,10	NC*
Mật độ nuôi cấy tế bào	$7,0 \times 10^9$ tế bào	$1,0 \times 10^{10}$ tế bào #	từ $7,0 \times 10^8$ tế bào đến 10×10^9 tế bào	$7,0 \times 10^9$ tế bào	NC*
Thời gian thu hoạch lần thứ nhất (ngày sau khi nhiễm)	Ngày 4	Ngày 7	Ngày 5 – ngày 7PI	Ngày 5 – 7PI	Quyết định **
Nhiệt độ	35°C	38°C	$36 \pm 1^\circ\text{C}$	36°C	NC*
pH	6,5	7,9	6,9 – 7,9	7,2	NC*

Thời gian thu hoạch lần thứ hai (ngày sau khi nạp lại nguyên liệu)	Ngày 1	Ngày 5	Ngày 1 – ngày 4	1-2	Quyết định***
Thời gian thu hoạch lần thứ ba (ngày sau khi nạp lại nguyên liệu)	Ngày 1	Ngày 7	Ngày 1 – ngày 4	1-4	Quyết định

*Không quyết định trong phạm vi nghiên cứu ở quy mô 30l.

** Tiêu chuẩn thu hoạch lần thứ nhất được quyết định bởi thời gian tiêu thụ hoàn toàn dextroza trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày PI. Tuy nhiên nếu lần thu hoạch thứ hai được thực hiện thì lần thu hoạch thứ nhất nên ở ngày thứ nhất mà nồng độ dextroza là 0,1g/l

*** Chất lỏng ổn định trong 5 ngày. Tuy nhiên nếu lần thu hoạch thứ ba được thực hiện, nên thu hoạch ở giữa ngày 1 và 2

Dựa trên dữ liệu 30l cho quy mô lớn

Kết luận và khuyến cáo quy trình: quy trình đồng thời trên quy mô lớn trong bình phản ứng sinh học từ 30l đến 300l được thực hiện một cách thành công. Lần thu hoạch I ở trong phạm vi của bình phản ứng sinh học dung tích 30l trong các ngày thu hoạch và độ chuẩn. Lần thu hoạch II cũng thành công với các độ chuẩn có thể so sánh với lần thu hoạch I. Độ chuẩn của lần thu hoạch lần thứ hai ổn định trong 4 ngày. Thu hoạch thêm (lần thứ ba) với độ chuẩn có thể so sánh được với lần thu hoạch I và II. Độ chuẩn của lần thu hoạch thứ ba ổn định trong ít nhất 4 ngày.

Khuyến cáo cho quy trình đồng thời trong bình phản ứng sinh học dung tích 300l được ưu tiên cho PRRSV 94881 MLV như sau:

Nhân giống virus, thu hoạch I: thành phần môi trường gồm có MEM không có đỏ phenol, 30mg/l neomycin và 1,4g/l natri bicacbonat. Các tế bào MA104 được nuôi cấy ở mật độ 7×10^9 /bình phản ứng sinh học lò xo dung tích 300l trong 270 đến 280l

môi trường được bổ sung 14,0l huyết thanh bào thai bò 5% thể tích/thể tích (phạm vi: 7×10^9 - 1×10^{10} /bình phản ứng sinh học lò xo dung tích 300l). Nhiệt độ của bình phản ứng sinh học được kiểm soát ở $36 \pm 1^\circ\text{C}$. DO được đặt ở "chế độ kiểm soát". Kiểm soát DO hoạt hóa ở điểm đặt là 10% khi DO giảm xuống từ 10 đến 30%. pH = 7,2 được đặt ở chế độ kiểm soát. Thông số PID được sử dụng cho pH cao (bổ sung CO₂) là:

Thu được	300,00
Thiết lập lại số phút trong một lần lặp lại	2,20
Tốc độ, phút	0,50
Đơn vị pH van chính xác	0,03
Giới hạn CV van chính xác	5%

Lưu lượng dòng khí được đặt ở 2,0 SLPM; lưu lượng CO₂ ở 2,0 SLPM; lưu lượng O₂ ở 2,0 SLPM; lưu lượng N₂ đặt ở 2,0 SLPM và tốc độ phun khí tổng số nên ở 2,0 SLPM.

MOI thu được là 0,1 (phạm vi từ 7×10^8 đến 1×10^9 hạt virus/bình phản ứng sinh học lò xo dung tích 300l).

Với tiêu chuẩn thu hoạch I, việc lấy mẫu gián tiếp trong khi đo dextroza được thực hiện vào ngày 4PI. Xu hướng DO có thể được sử dụng làm chỉ thị. Lần thu hoạch I nên được thực hiện khi dextroza $\leq 0,1\text{g/l}$ (phạm vi 2 ngày +/-) mà thường xảy ra ở giữa 5 đến 7 ngày PI. Tuy nhiên nếu lần thu hoạch thứ hai được thực hiện thì lần thu hoạch thứ nhất nên ở ngày thứ nhất mà nồng độ dextroza $\leq 0,1\text{g/l}$

Nạp lại nguyên liệu lần thứ nhất - thu hoạch-II: sau lần thu hoạch thứ nhất, nạp lại nguyên liệu vào bình phản ứng sinh học có 270 đến 280l thành phần môi trường MEM mà không có đỏ pheno, neomycin và 1,4g/l natri bicacbonat được tạo huyền phù với 14,0l huyết thanh bào thai bò (5% thể tích/thể tích). Việc nạp lại nguyên liệu được thực hiện ở cùng điều kiện như đã thiết lập cho môi trường thu hoạch lần thứ nhất (xem các thông số thu hoạch lần thứ nhất ở trên). Duy trì kiểm soát pH ở điểm cài đặt 7,2. Thông số PID được sử dụng cho pH cao (bổ sung CO₂) là:

Thu được	300,00
----------	--------

Thiết lập lại số phút trong một lần lặp lại	2,20
Tốc độ, phút	0,50
Đơn vị pH van chính xác	0,03
Giới hạn CV van chính xác	5%

Duy trì kiểm soát nhiệt độ ở điểm cài đặt $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Cài đặt kiểm soát DO ở chế độ điều khiển.

Nạp lại nguyên liệu lần thứ hai - thu hoạch-III: Ngay sau lần thu hoạch thứ hai, nạp lại nguyên liệu vào bình phản ứng sinh học chứa 270 đến 280l thành phần môi trường MEM mà không có đỏ pheno, neomycin và 1,4g/l natri bicarbonat được tạo huyền phù với 14,0l huyết thanh bào thai bò (5% thể tích/thể tích). Thực hiện nạp lại nguyên liệu dưới cùng điều kiện như đã thiết lập cho môi trường thu hoạch lần thứ nhất (xem các thông số của lần thu hoạch thứ hai ở trên). Duy trì kiểm soát pH ở điểm cài đặt 7,2. Thông số PID được sử dụng cho pH cao (bổ sung CO₂) là:

Thu được	300,00
Thiết lập lại số phút trong một lần lặp lại	2,20
Tốc độ, phút	0,50
Đơn vị pH van chính xác	0,03
Giới hạn CV van chính xác	5%

Duy trì kiểm soát nhiệt độ ở điểm cài đặt $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Cài đặt kiểm soát DO ở chế độ kiểm soát. Kết quả thử nghiệm hiện tại thể hiện rằng thời gian tối ưu để thu hoạch chất lỏng virus lần thứ ba là ở giữa 1 và 4 ngày sau khi nạp lại nguyên liệu.

Cần hiểu rằng quy trình ở trên là quy trình mẫu và có thể được biến đổi thêm để nâng cao hiệu suất và/hoặc giảm chi phí chạy trong bình phản ứng sinh học. Ví dụ, sự thay đổi thông số có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: giảm nồng độ huyết thanh ở lần thu hoạch thứ hai và thứ ba, giảm mật độ nuôi cấy tế bào, bổ sung tế bào và hạt vào cùng một chai và khuấy, vì vậy thời gian nhân giống virus có thể được rút ngắn lại cho lần thu hoạch I. Hơn nữa, hiệu suất thu virus có thể được tăng thêm bằng cách thêm một lần nạp lại nguyên liệu vào để có thể thu hoạch IV. Thành phần môi trường sử dụng để nạp lại nguyên liệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, glucoza và glutamin

Ví dụ 2

Trong ví dụ cụ thể PRRSV 94881 được sản xuất ra theo phương pháp mô tả ở trên được sử dụng để xác định hiệu quả của PRRSV 94881 trong lợn được chủng ngừa. Trong nghiên cứu này, các con lợn con từ 4 đến 13 ngày tuổi được chủng ngừa bằng tiêm bắp bằng chế phẩm chứa $10^{7,6}$ TCID₅₀ trong 2 ml (ngày 0 của nghiên cứu). Vào ngày 13, các con lợn con được cai sữa và được giám sát các thông số bệnh khác nhau đến ngày 90. Các thông số nghiên cứu bao gồm theo dõi nhiễm trùng huyết, sự có mặt của virus trong mô và sự bài tiết, quan sát lâm sàng, tổn thương phổi và tăng cân.

Mỗi nhóm nghiên cứu: các con lợn được chủng ngừa, lợn chỉ báo và lợn đối chứng được cân vào ngày nghiên cứu 0, 14, 28, 56 và 90. Lấy mẫu máu vào mỗi ngày luân phiên nhau ở giữa ngày 0 và 14 và một lần trong một tuần đến ngày 90 cho cả nhóm lợn được chủng ngừa và nhóm lợn chỉ báo và một lần trong một tuần trong suốt thời gian nghiên cứu cho nhóm đối chứng cho đến ngày 90.

Lấy mẫu nước mũi, niêm mạc miệng và phân vào mỗi ngày luân phiên nhau ở giữa ngày 0 và 14 và một lần trong một tuần đến ngày 56 cho cả nhóm lợn được chủng ngừa và nhóm lợn chỉ báo và một lần trong một tuần trong suốt thời gian nghiên cứu cho lô đối chứng cho đến ngày 56.

Tiến hành mổ hai con lợn trong nhóm chủng ngừa trong mỗi ngày khác nhau từ ngày 0 đến 14 và một lần trong một tuần từ ngày 14 đến ngày 90 và ở các con lợn còn lại ở ngày 90. Trong nhóm chỉ báo, mổ 5 con lợn ở ngày 56 và mổ các con lợn còn lại ở ngày 90. Ở nhóm đối chứng, mổ 2 con lợn vào mỗi ngày khác nhau ở giữa từ ngày 0 đến ngày 14, một lần trong một tuần ở ngày 14 và ngày 56 và mổ các con lợn còn lại ở ngày 90.

Quan sát lâm sàng vào mỗi ngày.

Thực hiện RT-PCR định lượng bằng cách sử dụng môi đặc hiệu châu Âu PRRSV cho dạng mẫu máu, niêm mạc miệng, phân và nước mũi, cũng như nước rửa phổi.

Từ các dữ liệu nghiên cứu này thể hiện rằng các con lợn con có sức khỏe bình thường ngoại trừ một số con lợn bị khập khiễng. Khám nghiệm tử thi thấy không có gì

bất thường ngoại trừ 1-2 con vật thể hiện các dấu hiệu hạch bạch huyết bẹn lan rộng nhỏ. Quan trọng, không thấy tổn thương phổi ở các con lợn được chủng ngừa.

Fig.6 thể hiện phần trăm các con vật bị nhiễm trùng huyết trong lô chỉ báo khi so với lô được chủng ngừa bằng chế phẩm chứa chủng virus PRRS đã bị giảm độc lực có số hiệu lưu giữ ECACC 11012502 thể hiện hiệu quả của virus PRRS được sản xuất ra theo phương pháp trong sáng chế trong việc tạo ra sự miễn dịch bảo vệ cho lợn.

Ví dụ 3

Các thiết bị và chất phản ứng sau (bảng 8) được sử dụng để phát triển quy trình đồng thời trong chai quay cho EU PRRS 94881:

Bảng 8. Thiết bị:

Bước của quy trình	Quy trình	Thiết bị
Duy trì tế bào MA104 (cấy chuyển 58-78) và AK-MA104 (cấy chuyển 64-84). Cùng dòng tế bào, các lần cấy chuyển khác nhau	Duy trì và trên quy mô lớn, theo hồ sơ quy trình BPF-777 và BPF-778	Chai quay 850cm ² (CORNING)
Đếm tế bào	Đếm tự động	Vi-Cell
Canh trường tế bào	Nuôi cấy tế bào	chai quay 850cm ² (CORNING)
Sản xuất virus	Nhiễm	Giá quay và tủ ủ
	Nồng độ dextroza/Lactat g/l (sai số thử nghiệm $\pm 5\%$)	YSI 2700
	Lấy mẫu	Pipet

MEM có môi trường đỏ phenol và 1,4g/l natri bicacbonat thu được từ SAFC. Bảng 9 mô tả thành phần môi trường, cộng với nồng độ huyết thanh. Môi trường này được sử dụng để nhân giống virus bao gồm tất cả các lần nạp lại nguyên liệu vào chai quay.

Bảng 9: Thành phần môi trường MEM.

Catalog/Item #	Thành phần	Số lô	Số lượng trong một chai quay
700754	Huyết thanh bào thai bò Chiếu xạ gama, US	10D837	20 ml (5% thể tích/thể tích)
62892- 1000M3056	MEM có đỏ phenol	10L259	400ml

Quy trình đồng thời có ba lần thu hoạch:

Môi trường bổ sung vào quy trình đồng thời bao gồm huyết thanh, tế bào AK-MA104 và hạt virus EU PRRS 94881 trong vật chứa. Sau đó, các thành phần trong vật chứa được trộn lẫn lại và được phân bố vào các chai quay (TOI bằng không ở ngày PP). Fig.7 minh họa phương pháp trong quy trình đồng thời và Fig.8 minh họa việc xác định và tiến trình của quy trình này.

Chuẩn bị chai quay và môi trường:

Thử nghiệm ở đây là một mẻ có 5 chai quay. Kích cỡ thực của mẻ có thể thay đổi.

Dưới điều kiện vô trùng, 2000ml môi trường MEM và 100ml huyết thanh bào thai bò đã chiếu xạ được bổ sung vào vật chứa. Sau đó 5×10^7 tế bào AK-MA104 và hạt virus EU PRRS ở MOI là 0,1 được bổ sung vào. Các nguyên liệu này được trộn lẫn và ở điều kiện vô trùng, được phân bố khoảng 400ml vào trong một chai quay Corning 850cm². Sau đó chai quay được ủ ở nhiệt độ 37°C trong giá quay ở tốc độ 0,5 vòng/phút. Đến lần thu hoạch thứ ba thực hiện hai lần nạp lại nguyên liệu vào.

Tiêu chuẩn thu hoạch và khả năng được chấp nhận:

Tiêu chuẩn thu hoạch chai quay dựa trên điểm cài đặt/kết quả của các thông số quan trọng từ quy trình trong bình phản ứng sinh học 300l phù hợp trong ví dụ 1 và 2, như thể hiện trong bảng 10 dưới đây.

Lần thu hoạch I được thực hiện vào ngày 5 đến 7 PI và nồng độ dextroza $\leq 0,1\text{g/l}$. Lần thu hoạch II được thực hiện vào ngày 2PI sau khi nạp lại nguyên liệu vào và lần thu hoạch III được thực hiện vào ngày 2PI sau lần nạp lại nguyên liệu thứ hai vào.

Khả năng thu hoạch ở cả ba chai quay có thể $\geq 10^{5,5}$ TCID₅₀/ml.

Bảng 10. Tiêu chuẩn thu hoạch/khả năng được chấp nhận EU PRRS 94881 MLV

Thông số	Mục tiêu được chấp nhận
Thời gian thu hoạch lần thứ nhất (ngày sau khi gây nhiễm)	Ngày 5 đến 7 PI
Nồng độ dextroza ở lần thu hoạch thứ nhất	$\leq 0,1$ g/l
Thời gian thu hoạch lần thứ hai (ngày sau khi nạp lại nguyên liệu)	2
Thời gian thu hoạch lần thứ ba (ngày sau khi nạp lại nguyên liệu)	2
Khả năng	$\geq 10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml

Thông số quyết định là thông số quyết định đến chất lượng của sản phẩm cuối cùng.

Chạy chai quay

Bảng 11: Thử nghiệm ban đầu để phát triển quy trình xảy ra trong chai quay EU PRRS 94881 và kết quả độ chuẩn

Mã chai quay	Mật độ nuôi cấy tế bào/RB	MOI	H-I + nạp lại nguyên liệu	Dextroza g/l	TCID ₅₀ /ml	H-II+ nạp lại nguyên liệu	TCID ₅₀ /ml	H-III cuối cùng	TCID ₅₀ /ml
A	$3,5 \times 10^6$	0,1	5PI	0,304	$\leq 5,5$	7PI	6,5	9PI	$\leq 6,0$
B	$3,5 \times 10^6$	0,1	6PI	0,048	6,5	8PI	6,6	10PI	$\leq 5,7$
C	$3,5 \times 10^6$	0,1	7PI	0,006	$\leq 5,5$	9PI	$\leq 6,3$	11PI	6,7
D	$3,5 \times 10^6$	0,005	5PI	N/A	$\leq 5,6$	7PI	6,5	9PI	$\leq 5,5$
E	$3,5 \times 10^6$	0,005	6PI	0,057	$\leq 5,5$	8PI	$\leq 5,5$	10PI	7,4
F	$3,5 \times 10^6$	0,005	7PI	0,0	$\leq 5,5$	9PI	$\leq 5,5$	11PI	$\leq 5,5$
G	7×10^6	0,1	5PI	0,066	6,6	7PI	6,9	9PI	$\leq 6,3$
H	7×10^6	0,1	6PI	0,009	6,5	8PI	7,3	10PI	6,7
I	7×10^6	0,1	7PI	0	$\leq 6,2$	9PI	7,0	11PI	6,6

J	1×10^7	0,1	5PI	0,095	6,9	7PI	6,6	9PI/10PI	6,36,7
K	1×10^7	0,1	6PI	0	7,3	8PI	7,5	10PI/11PI	6,5/6,6
L	1×10^7	0,1	7PI	0	7,7	9PI	$\leq 5,5$	11PI/12PI	7,2/6,6
M	1×10^7	0,005	5PI	0,118	$\leq 5,6$	7PI	7,5	9PI	$\leq 6,0$
N	1×10^7	0,005	6PI	0,014	7,0	8PI	6,7	10PI	6,7
O	1×10^7	0,005	7PI	0	6,7	9PI	7,3	11PI	6,7
Thử nghiệm đối chứng: Quy trình thông thường trong chai quay cho EU PRRS 94881									
Mã chai quay	Mật độ nuôi cấy tế bào	TOI	MOI	Thu hoạch I + nạp lại nguyên liệu	TCID ₅₀ /ml	Thu hoạch II + nạp lại nguyên liệu	TCID ₅₀ /ml	Thu hoạch III cuối cùng	TCID ₅₀ /ml
P	2×10^7	3 ngày	0,005	3PI	6,7	6PI	7,4	9PI	6,9
Q	2×10^7	3 ngày	0,005	4PI	6,7	7PI	7,7	10PI	6,7
R	2×10^7	3 ngày	0,005	5PI	7,0	8PI	7,2	11PI	6,6
S	2×10^7	Sau 3 ngày, các tế bào được đếm để tính toán MOI cho RBs P,Q và R							

Bảng 11 thể hiện thử nghiệm ban đầu được thiết kế để xác định quy trình xảy ra trong chai quay dựa trên các thông số sau từ quy trình mô tả trong ví dụ 1 và 2 và thực hiện báo cáo về virus giống sản xuất trong bảng 12a.

Bảng 12a: Các thông số được đánh giá để xác định quy trình xảy ra trong chai quay

Thông số:	Phạm vi	Thông tin
Mật độ nuôi cấy tế bào/RB 850cm ²	$3,5 \times 10^6$	Phạm vi nuôi cấy tế bào thấp
	$7,0 \times 10^6$	Phạm vi nuôi cấy tế bào trung bình
	$1,0 \times 10^7$	Tương đương với 300l BR dựa trên tế bào/ml
MOI	0,005	Quy trình thông thường RB
	0,1	MOI đạt được trong quy trình BR 300l

Mười lăm chai quay được cấy các tế bào MA-104 ở mật độ nuôi cấy nằm trong khoảng từ $3,5 \times 10^6$ đến 1×10^7 (xem bảng 11 cột 2). Các chai quay được dán nhãn theo thứ tự bằng chữ cái. Bộ ba chai quay này có cùng mật độ nuôi cấy tế bào và có cùng MOI nằm trong khoảng từ 0,005 đến 0,1 (bảng 11, cột ba).

Ba mật độ nuôi cấy tế bào và hai MOI được đánh giá (bảng 12). Bộ ba chai quay có cùng mật độ nuôi cấy tế bào và cùng MOI (bảng 4 cột 1). Các chai quay được thiết lập theo chai quay và môi trường như mô tả ở trên và được ủ trong giá quay ở tốc độ 0,5 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ.

Thu hoạch I các chai quay A, D, G, J và M vào ngày 5PI, và sau đó nạp lại nguyên liệu vào đó và ủ trong hai ngày. Sau đó thực hiện H-II, các chai quay được nạp lại nguyên liệu vào và được ủ và thực hiện thu hoạch lần thứ ba và lần cuối cùng sau đó hai ngày.

Thu hoạch I các chai quay B, E, H, K và N H- I vào ngày 6PI và sau đó nạp lại nguyên liệu vào các chai đó và ủ trong hai ngày. Sau đó thực hiện H-II; nạp lại nguyên liệu vào các chai quay một lần nữa và ủ lại. Thực hiện thu hoạch lần thứ ba và lần cuối cùng vào hai ngày sau đó.

Cuối cùng, thu hoạch 7PI ở các chai quay C, F, I, L và O vào ngày 7PI, và sau đó nạp lại nguyên liệu vào các chai đó và ủ trong hai ngày. Sau đó thực hiện H-II, các chai quay được nạp lại nguyên liệu vào và được ủ lại và thực hiện thu hoạch lần thứ ba và lần cuối cùng sau đó hai ngày.

Quy trình xảy ra trong các chai quay (chai quay P, Q, R và S) được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm này. Quy trình này được phát triển với hai lần thu hoạch. Lần thu hoạch thứ ba được bổ sung vào quy trình trong các thử nghiệm này cũng như khoảng thời gian thu hoạch I lên đến 5 ngày PI.

Các tế bào MA104 được nuôi cấy trong chai quay 850cm^2 ở mật độ 2×10^7 và được ủ trong 3 ngày (chai quay P, Q, R và S). Sau ba ngày, chai quay S được xử lý trypsin và các tế bào được đếm bằng Vi-cell. Việc đếm tế bào được sử dụng để tính toán MOI của virus cho các chai quay P, Q và R. Lượng virus đã tính toán được bổ sung vào các chai quay mà được ủ ở nhiệt độ 37°C trong giá quay. Sau 3 ngày thực hiện thu hoạch I trong chai quay P, mà sau đó được nạp nguyên liệu vào lại và được ủ

ở nhiệt độ 37°C. Sau 3 ngày, tiến hành thu hoạch lần thứ hai và nạp lại nguyên liệu vào lần thứ hai, và ủ thêm 3 ngày để thu hoạch lần thứ ba và lần cuối cùng.

Quy trình trong chai quay Q và R như cùng quy trình sau khi H-I, vào ngày 4PI cho RB Q và 5PI cho RB R.

Quy trình xảy ra trong chai quay không dài hơn quy trình thông thường như mô tả trong ví dụ 1 và 2 và đòi hỏi thêm nhân công, do các tế bào cần phát triển trong 3 ngày, trước khi chúng bị nhiễm virus. Hơn nữa, quy trình thông thường còn đòi hỏi mật độ nuôi cấy tế bào gấp đôi khi so sánh với quy trình đồng thời nhưng lại thấp hơn MOI. Quy trình này cho ra độ chuẩn phù hợp cao trong ba lần thu hoạch.

Xác định rằng thời gian thu hoạch (time of harvest -TOH) H-I cho quy trình xảy ra chỉ dựa vào ngày hướng đến, không quan tâm đến sự tiêu thụ dextroza. Lấy mẫu để đo hàm lượng dextroza và độ chuẩn vào ngày thu hoạch.

Dựa vào tiêu chuẩn để độ chuẩn có khả năng được chấp nhận (bảng 10), các chai quay A, B, C, D, E và F thể hiện độ chuẩn không giống nhau ở các lần thu hoạch I, II và III.

Các chai quay G, H và I có mật độ nuôi cấy tế bào 7×10^6 và MOI hướng đến là 0,1 có nồng độ dextroza ở lần thu hoạch thứ nhất nằm trong mục tiêu là $\leq 0,1$ g/l. Kết quả độ chuẩn cho các chai quay G và H là có thể chấp nhận được. Để thu hoạch II, tất cả các chai quay G, H và I đều có độ chuẩn log trên 6 và dưới 7. Để thu hoạch III, các chai quay G và H là có thể chấp nhận được với độ chuẩn lần lượt là 6,6 và 6,5. Để thu hoạch tốt nhất, bộ G, H và I có thể được chấp nhận.

Bộ thử nghiệm J, K và L tiếp theo là bộ thử nghiệm được mong muốn nhất về độ chuẩn. Dextroza bị tiêu thụ ở H-I trong tất cả RBs và độ chuẩn ở trong tiêu chuẩn chấp nhận được dựa trên bảng 10. Vào lần thu hoạch thứ hai và thứ ba, các độ chuẩn cũng đáp ứng tiêu chuẩn trong bảng 3 ngoại trừ hai chai quay. H-III cho chai quay J, K và L được kéo dài thêm một ngày nữa thể hiện rằng độ chuẩn vẫn có thể chấp nhận được (bảng 11).

Các chai quay cuối cùng M, N và O, có mật độ nuôi cấy tế bào cao và MOI thấp thể hiện kết quả độ chuẩn phù hợp ở các chai quay N và O.

Bảng 12b: So sánh các thông số giữa quy trình trong chai quay thông thường và quy trình trong bình phản ứng sinh học

Thông số	Bình phản ứng sinh học 300l	Bộ chai quay J, K và L
Thể tích thực môi trường cộng huyết thanh theo ml	283500	400
Mật độ nuôi cấy tế bào/ml	$2,53 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
MOI	0,1	0,1

Dựa trên bảng 10, kết quả ở các chai quay J, K và L TCID₅₀/ml thể hiện trong bảng 11, đáp ứng tất cả các tiêu chuẩn của lần thu hoạch I, II và III. Tỷ lệ của mật độ nuôi cấy tế bào trong một ml trong các chai quay J, K và L tương đương với mật độ nuôi cấy tế bào trong một ml trong bình phản ứng sinh học (bảng 6) dung tích 300l. Dựa trên các dữ liệu này, các thông số của chai quay J, K và L được chọn để chạy xác nhận (bảng 13).

Bảng 13: Thiết lập chạy xác nhận quy trình xảy ra trong chai quay và nồng độ dextroza ở lần thu hoạch I

Mã chai quay	Mật độ nuôi cấy tế bào/RB	MOI	Thu hoạch I + nạp lại nguyên liệu	dextroza g/l ở TOH	H II + nạp lại nguyên liệu	H III cuối cùng
J1	1×10^7	0,1	5PI	0,080	7PI	9PI
J2	1×10^7	0,1	5PI	0,128	7PI	9PI
J3	1×10^7	0,1	5PI	0,066	7PI	9PI
J4	1×10^7	0,1	5PI	0,076	7PI	9PI
J5	1×10^7	0,1	5PI	0,128	7PI	9PI
K1	1×10^7	0,1	6PI	0,137	8PI	10PI
K2	1×10^7	0,1	6PI	0,058	8PI	10PI
K3	1×10^7	0,1	6PI	0,100	8PI	10PI
K4	1×10^7	0,1	6PI	0,088	8PI	10PI
K5	1×10^7	0,1	6PI	0,087	8PI	10PI

L1	1×10^7	0,1	7PI	0,005	9PI	11PI
L2	1×10^7	0,1	7PI	0,006	9PI	11PI
L3	1×10^7	0,1	7PI	0,0	9PI	11PI
L4	1×10^7	0,1	7PI	0,013	9PI	11PI
L5	1×10^7	0,1	7PI	0,004	9PI	11PI

Bảng 13 thể hiện việc chạy xác nhận cho quy trình đồng thời lựa chọn được đánh giá trong bảng 10.

Tổng số 15 chai quay được thiết lập ở mật độ nuôi cấy tế bào 1×10^7 trong 400ml môi trường huyết thanh và hạt EU PRRS 94881 MSV+4 ở MOI 0,1. Các chai quay được chia ra và có 3 lô, mỗi lô gồm 5 chai. Thực hiện thu hoạch I vào ngày 5PI cho các chai từ J1 đến J5, vào ngày 6PI cho các chai từ K1 đến K5 và ngày 7PI cho các chai từ L1 đến L5. Đo nồng độ dextroza trong mỗi chai quay. Sau đó tích phân đã thu hoạch lại và lấy mẫu để chuẩn độ. Sau đó nạp lại nguyên liệu vào và thực hiện thu hoạch II và III lần cuối cùng.

Ở lần thu hoạch I, trung bình, tất cả mười lăm chai quay đều có nồng độ dextroza ở trong tiêu chuẩn thu hoạch $\leq 0,1\text{g/l}$ được thiết lập cho quy trình trong bình phản ứng sinh học (bảng 3), mà xác nhận rằng quy trình này phù hợp trong chai quay.

Bảng 14: Tổng kết điều kiện và kết quả TCID₅₀ của quy trình xảy ra trong chai quay

Lô (nhóm 5 chai quay)	PCD	MOI	TOH1	Dextroz a g/l ở TOH1	TCID ₅₀ / ml H1	TOH2	TCID ₅₀ / ml H2	TOH3	TCID ₅₀ / ml H3
J	$1,0 \times 10^7$	0,1	5PI	0,092	6,5	7PI	7,3	9PI	6,5
K	$1,0 \times 10^7$	0,1	6PI	0,084	6,7	8PI	7,6	10PI	6,7
L	$1,0 \times 10^7$	0,1	7PI	0,000	6,5	9PI	7,7	11PI	7,4

Bảng 14 thể hiện sự tổng kết các điều kiện và độ chuẩn virus trong TCID₅₀ /ml ở nhóm các chai quay J, K và L cho H-I, H-II và H-III cho quy trình xảy ra trong chai quay theo sáng chế.

Để bắt chước theo quy trình trong chai quay, các mẫu từ mỗi chai quay riêng biệt của bộ J (bảng 13) được tích lại và mẫu đã tích lại này được chuẩn độ. Áp dụng cùng quy trình này cho các chai quay K và L cho H-I, H-II và H-III.

Nồng độ dextroza của các mẫu đã tích H-1 là 0,0g/l cho J, K và L. Độ chuẩn cho H-I, H-II và H-III nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,7 mà có thể so sánh với quy trình trong bình phản ứng sinh học 300l (Bảng 15).

Bảng 15. Tổng kết điều kiện và kết quả TCID₅₀/ml của quy trình xảy ra trong bình phản ứng sinh học 300l đã được xác nhận

Lô	PCD	MOI	TOH1	Dextroza g/l ở TOH1	TCID50/ml H1	TOH2	TCID50/ml H2	TOH3	TCID50/ml H3
0216 10PD	7,2 x 10 ⁹	0,1	5PI	0,0	7,5	7PI	7,5	9PI	6,7
0301 10PD	7,2 x 10 ⁹	0,1	6PI	0,0	7,3	8PI	7,4	10PI	7,4
0315 10PD	7,2 x 10 ⁹	0,1	7PI	0,0	7,5	9PI	6,7	11PI	7,4

*mẫu chứa SGS làm chất ổn định

Bảng 15 thể hiện các thông số và độ chuẩn trong TCID₅₀/ml cho ba lần chạy xác nhận được thực hiện ở điều kiện cGMP. Tất cả ba lô đều có cùng mật độ nuôi cấy tế bào, cùng MOI. Nồng độ dextroza là 0,0g/l khi thu hoạch I ở tất cả ba lô. Tất cả các lần thu hoạch đều có kết quả nằm trong tiêu chuẩn được chấp nhận.

Phạm vi mật độ tế bào nuôi cấy (Planting Cell Density-PCD) trong chai quay:

Mật độ tế bào nuôi cấy (planting cell density-PCD) đạt được là $1,0 \times 10^7$ tổng số tế bào trong một chai quay có thể tích thực là 400ml. Phạm vi mật độ thấp 7×10^6 cũng được đánh giá (bảng 4) với độ chuẩn được chấp nhận. Phạm vi mật độ cao được đánh giá ở trong quy trình thông thường (bảng 11).

Phạm vi tính bội nhiễm (Multiplicity of Infection-MOI) ở chai quay:

MOI cuối cùng là 0,1 là lý tưởng để nhân giống EU PRRS 94881 trong hệ sinh trưởng này. Các mức MOI thấp và cao lần lượt là 0,01 và 0,3 được nghiên cứu trong

bình phản ứng sinh học dung tích 30l. Trong chai quay do ràng buộc thời gian chỉ đánh giá 0,1 MOI và 0,005 MOI mong muốn (bảng 10).

Phân tích:

Các thông số của quy trình xảy ra trong chai quay được đưa ra trong bảng 16. Chỉ có thông số cuối cùng được thử nghiệm và được xem xét có quyết định đến quy trình này hay không. Các định nghĩa như sau: Thông số quyết định là thông số quyết định đến chất lượng của sản phẩm cuối cùng và thông số không quyết định là thông số có thể được kiểm soát trực tiếp trong phạm vi xác định hoặc có phạm vi hoạt động rộng mà một sự lệch ra khỏi điểm thiết lập thì không nghiêm trọng. Thông số không quyết định giúp kiểm soát các thông số quyết định trong phạm vi xác định.

Bảng 16: Tóm tắt về các thông số của quy trình xảy ra trong chai quay cho EU PRRS 94881 MLV.

Thông số	Giới hạn dưới được thử nghiệm	Giới hạn trên được thử nghiệm	Phạm vi được chấp nhận	Mục tiêu	Quyết định/không quyết định
MOI	0,005	0,1@	0,005 -0,3&	0,10	NC
Mật độ nuôi cấy tế bào trong một chai quay	7 X 10 ⁶ tế bào	2,0 X 10 ⁷ tế bào #	7,0 X 10 ⁶ tế bào đến 2,0 X 10 ⁷ tế bào	1,0 X 10 ⁷ tế bào	NC
Thời gian thu hoạch lần thứ nhất (ngày sau khi gây nhiễm)	Ngày 5	Ngày 7	Ngày 5 – ngày 7 PI	Ngày 5 -7 PI	Quyết định **
Nhiệt độ	NT	37°C	36 + 1°C	36°C	NC
Thời gian thu hoạch lần thứ hai (ngày sau khi nạp lại nguyên liệu)	Ngày 2	Ngày 2	NT	2	Quyết định
Thời gian thu hoạch lần thứ ba (ngày sau khi nạp lại nguyên liệu)	Ngày 2	Ngày 2	2-3	2	Quyết định

**** Tiêu chuẩn thu hoạch lần thứ nhất được quyết định bởi thời gian tiêu thụ hoàn toàn dextroza trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày PI.**

dựa vào quy trình thông thường trong chai quay

@ thử nghiệm ở quy mô bình phản ứng sinh học 30l, 300l và chai quay

& thử nghiệm ở quy mô bình phản ứng sinh học 30l

Kết luận

Sự phát triển quy trình xảy ra trong chai quay là thành công và tương đương với quy trình đã mô tả ở trên về khả năng đo TCID₅₀/ml. Các thông số quyết định mong muốn cho H-I, H-II và H-III đã được mô phỏng thành công trong quy trình xảy ra trong chai quay.

Các phương án ưu tiên cho quy trình xảy ra trong chai quay cho EU PRRS 94881 MLV như sau đối với sự nhân giống virus, thu hoạch I: Thành phần môi trường MEM có 1,4g/l natri bicacbonat; mật độ nuôi cấy tế bào ở 1×10^7 /chai quay Corning 850cm² có 400ml môi trường được tạo huyền phù 20ml huyết thanh bào thai bò 5% thể tích/thể tích (phạm vi: 7×10^6 - 2×10^7 /chai quay); nhiệt độ kiểm soát ở $36 \pm 1^\circ\text{C}$; tốc độ giá chai quay là 0,5 vòng/phút; và MOI đạt được là 0,1.

Để đạt tiêu chuẩn cho lần thu hoạch I, bắt đầu lấy mẫu để đo gián tiếp dextroza vào ngày 5PI. Lần thu hoạch I nên được thực hiện khi nồng độ dextroza $\leq 0,1\text{g/l}$ mà thường xảy ra ở giữa 5 đến 7 ngày PI. Tuy nhiên, nếu lần thu hoạch thứ hai được thực hiện, nạp lại nguyên liệu lần thứ nhất, thu hoạch II.

II. Nạp lại nguyên liệu lần thứ nhất - thu hoạch II:

Nạp lại nguyên liệu có 400ml môi trường MEM và 1,4g/l natri bicacbonat được tạo huyền phù với 20ml huyết thanh bào thai bò (5% thể tích/thể tích). Việc nạp lại nguyên liệu vào được thực hiện ở cùng điều kiện như đã thiết lập cho môi trường thu hoạch lần thứ nhất (xem các thông số thu hoạch lần thứ nhất ở trên). Duy trì kiểm soát nhiệt độ ở điểm cài đặt $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Tốc độ giá chai quay là 0,5 vòng/phút.. Lần thu hoạch chất lỏng virus thứ hai được thực hiện vào ngày thứ 2 sau khi nạp lại nguyên liệu vào.

III. Nạp lại nguyên liệu lần thứ hai - thu hoạch III:

Nạp lại nguyên liệu có 400ml môi trường MEM, neomycin và 1,4g/l natri bicacbonat được tạo huyền phù với 20ml huyết thanh bào thai bò đã được chiếu xạ (5% thể tích/thể tích). Việc nạp lại nguyên liệu vào được thực hiện ở cùng điều kiện như đã thiết lập cho môi trường thu hoạch lần thứ nhất (xem các thông số thu hoạch lần thứ hai ở trên). Duy trì kiểm soát nhiệt độ ở điểm cài đặt $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Tốc độ giá chai quay là 0,5 vòng/phút.. Lần thu hoạch chất lỏng virus thứ ba được thực hiện vào ngày thứ 2 sau khi nạp lại nguyên liệu vào.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV) trên quy mô thương mại, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) gieo đồng thời một lượng lớn môi trường nuôi cấy với dòng tế bào động vật có vú mà dễ dàng bị nhiễm PRRSV vào trong bình phản ứng sinh học và gây nhiễm tế bào động vật có vú này với virus PRRSV;

b) nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày sau khi gây nhiễm;

c) thực hiện bước thu hoạch thứ nhất bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó;

d) bổ sung môi trường vào bình phản ứng sinh học ở trên và nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 1 đến 4 ngày;

e) thực hiện bước thu hoạch thứ hai bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học ở trên và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó;

f) bổ sung môi trường vào bình phản ứng sinh học ở trên và nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 1 đến 4 ngày; và

g) thực hiện bước thu hoạch thứ ba bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm thêm ít nhất một bước nạp lại nguyên liệu và thu hoạch sau bước thu hoạch thứ ba bao gồm việc bổ sung môi trường vào trong bình phản ứng sinh học và nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 1 đến 4 ngày và thực hiện bước thu hoạch thứ tư bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học và phân lập virus đã nhân giống ra khỏi đó.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ bội nhiễm (multiplicity of infection-MOI) đạt được nằm trong khoảng từ 0,01 đến 0,30.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào động vật có vú được nuôi cấy ở mật độ nằm trong khoảng từ 7×10^8 đến $1,0 \times 10^9$ trong mỗi bình phản ứng sinh học 300l.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó mật độ nuôi cấy tế bào là khoảng $1,0 \times 10^9$ trong mỗi bình phản ứng sinh học 300l.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó việc gây nhiễm là khoảng 7×10^8 hạt virus trong mỗi bình phản ứng sinh học 300l.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước kiểm soát nồng độ dextroza trong môi trường, trong đó bước thu hoạch thứ nhất được thực hiện vào ngày thứ nhất khi nồng độ dextroza trong môi trường giảm còn nhỏ hơn 0,1 g/l.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước thu hoạch thứ hai được thực hiện trong 1 hoặc 2 ngày sau khi nạp lại môi trường.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước thu hoạch thứ ba được thực hiện từ 1 đến 4 ngày sau khi nạp lại môi trường lần thứ hai.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy được bổ sung vào bình phản ứng sinh học vào cùng ngày trước khi bổ sung dòng tế bào động vật có vú và PRRS vào hoặc vào ngày trước ngày đó.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy được bổ sung vào bình phản ứng sinh học một ngày trước khi bổ sung dòng tế bào động vật có vú và PRRS.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ của bình phản ứng sinh học được đặt trong khoảng từ 34°C đến 38°C.
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường đã nêu chứa huyết thanh bào thai bò đã chiếu xạ 5% thể tích/thể tích.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó virus PRRS được chọn từ nhóm bao gồm chủng PRRSV ECACC 11012501, ECACC 11012502, VR 2332, chủng virus Lelystad (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), hoặc các chủng khác như chủng được đưa vào có số hiệu lưu giữ ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, số hiệu lưu giữ CNCM I-1140, số hiệu lưu giữ CNCM I-1387, số hiệu lưu giữ CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 và VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, hoặc ECACC V93070108; số hiệu lưu giữ ATCC VR-2332, số hiệu lưu giữ ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 và ATCC VR 2402.
15. Phương pháp sản xuất chế phẩm chứa PRRSV trên quy mô thương mại, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a. gieo đồng thời tế bào động vật có vú dễ dàng bị nhiễm PRRSV và PRRSV vào trong bình phản ứng sinh học chứa môi trường phù hợp cho sự phát triển của tế bào; và

b. thực hiện ba bước thu hoạch liên tiếp, trong đó PRRSV được thu hoạch, trong đó sau mỗi lần thu hoạch thứ nhất và thứ hai, môi trường được bổ sung lại, và trong đó:

i. thực hiện bước thu hoạch thứ nhất vào ngày thứ nhất mà nồng độ dextroza trong môi trường giảm còn nhỏ hơn 0,1 g/l;

ii. thực hiện bước thu hoạch thứ hai 1 hoặc 2 ngày sau khi bổ sung môi trường vào sau bước thu hoạch thứ nhất; và

iii. thực hiện bước thu hoạch thứ ba vào khoảng từ 1 đến 4 ngày sau khi bổ sung môi trường vào sau bước thu hoạch thứ hai.

16. Phương pháp sản xuất virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV) trên quy mô thương mại, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) gieo đồng thời lượng lớn môi trường nuôi cấy cùng với dòng tế bào động vật có vú mà dễ dàng bị nhiễm PRRSV vào chai quay và gây nhiễm tế bào động vật có vú với virus PRRSV;

b) nhân giống virus trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày sau khi gây nhiễm;

c) thực hiện bước thu hoạch lần thứ nhất bằng cách lấy môi trường này ra khỏi chai quay và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó;

d) bổ sung môi trường vào chai quay và nhân giống virus trong khoảng thời gian 2 ngày;

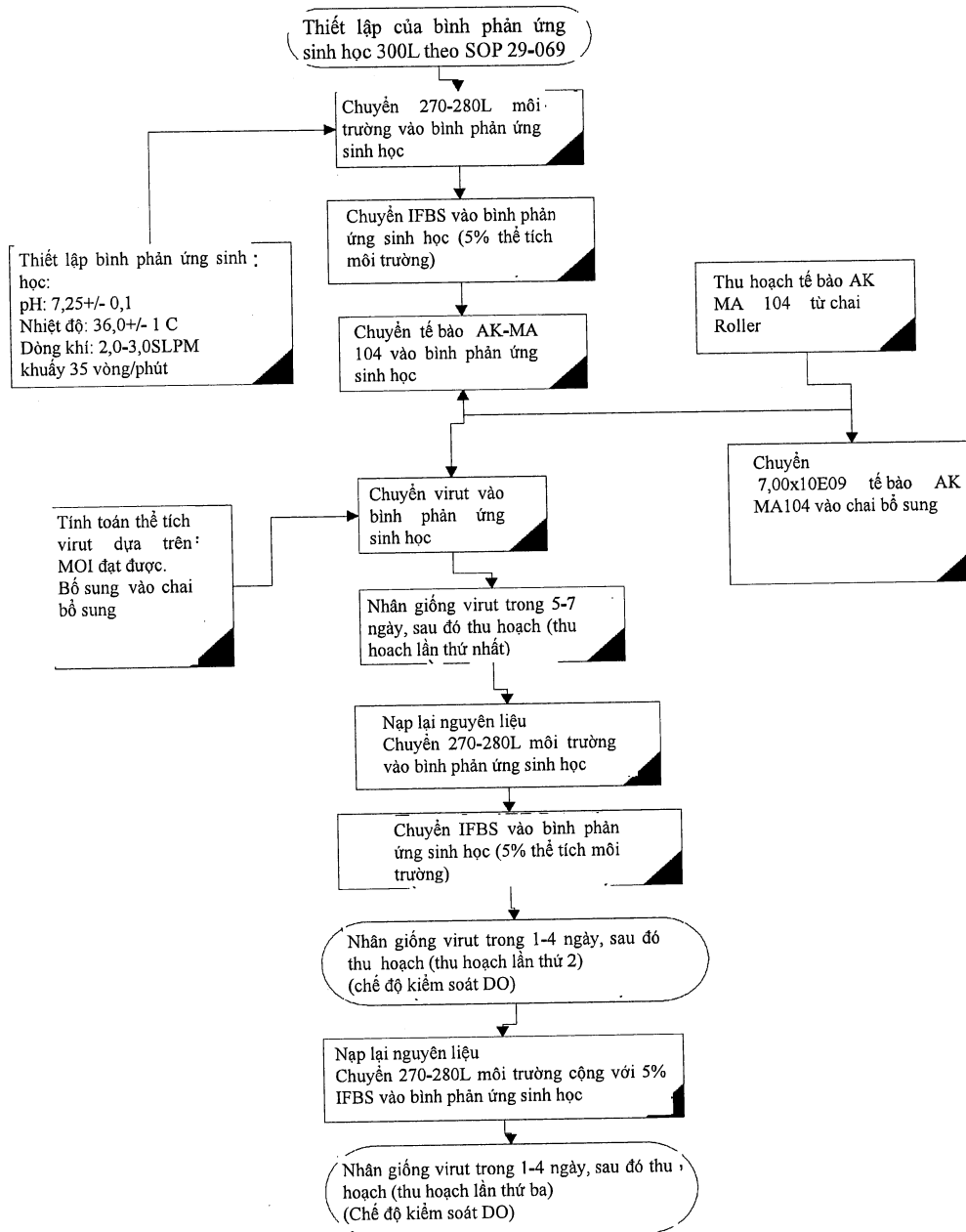
e) thực hiện bước thu hoạch lần thứ hai bằng cách lấy môi trường này ra khỏi chai quay và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó;

f) bổ sung môi trường vào chai quay và nhân giống virus trong khoảng thời gian 2 ngày; và

g) thực hiện bước thu hoạch lần thứ ba bằng cách lấy môi trường ra khỏi bình phản ứng sinh học này và phân lập các virus đã nhân giống ra khỏi đó.

1/8

FIG 1



2/8

FIG 2

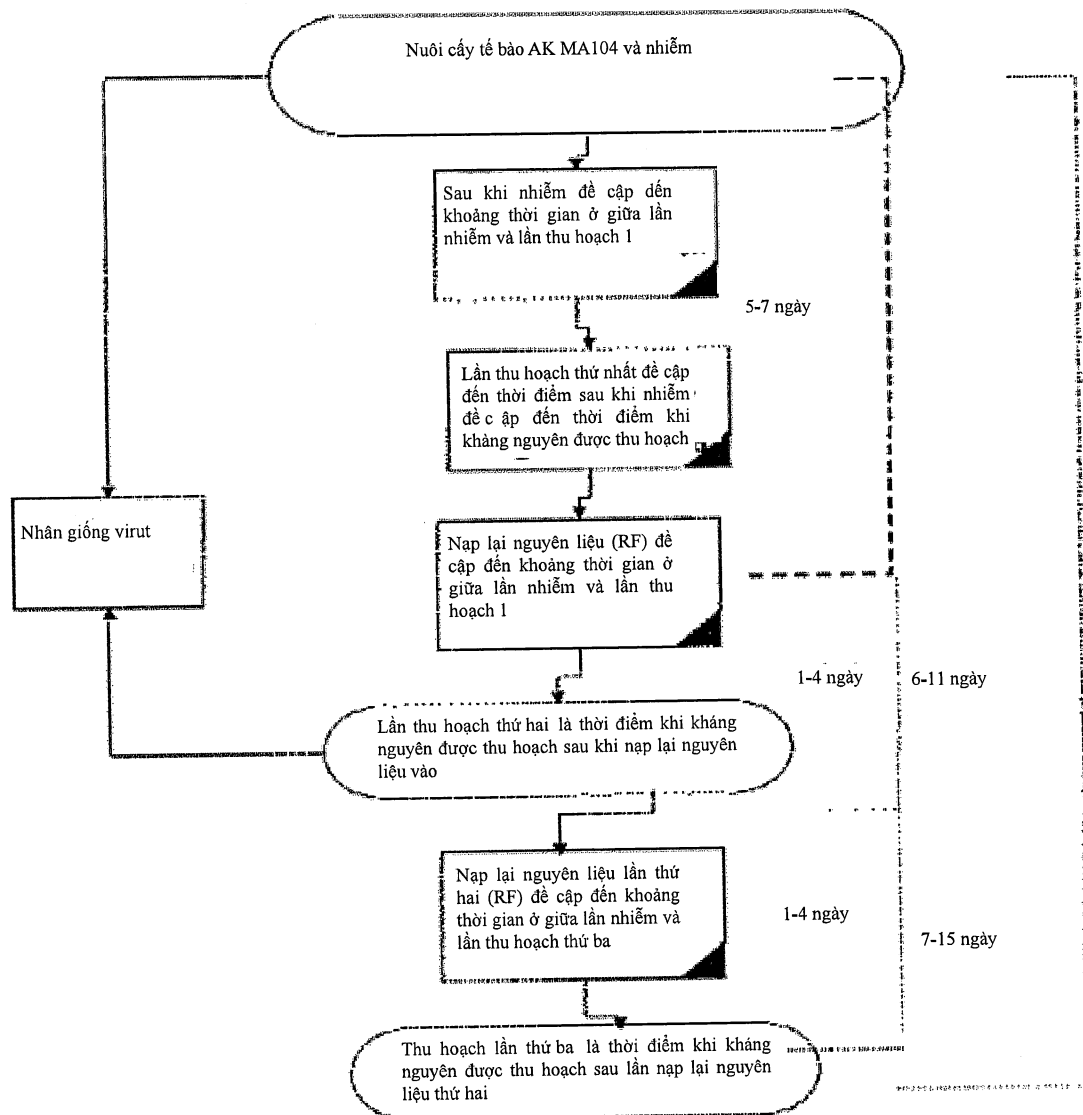
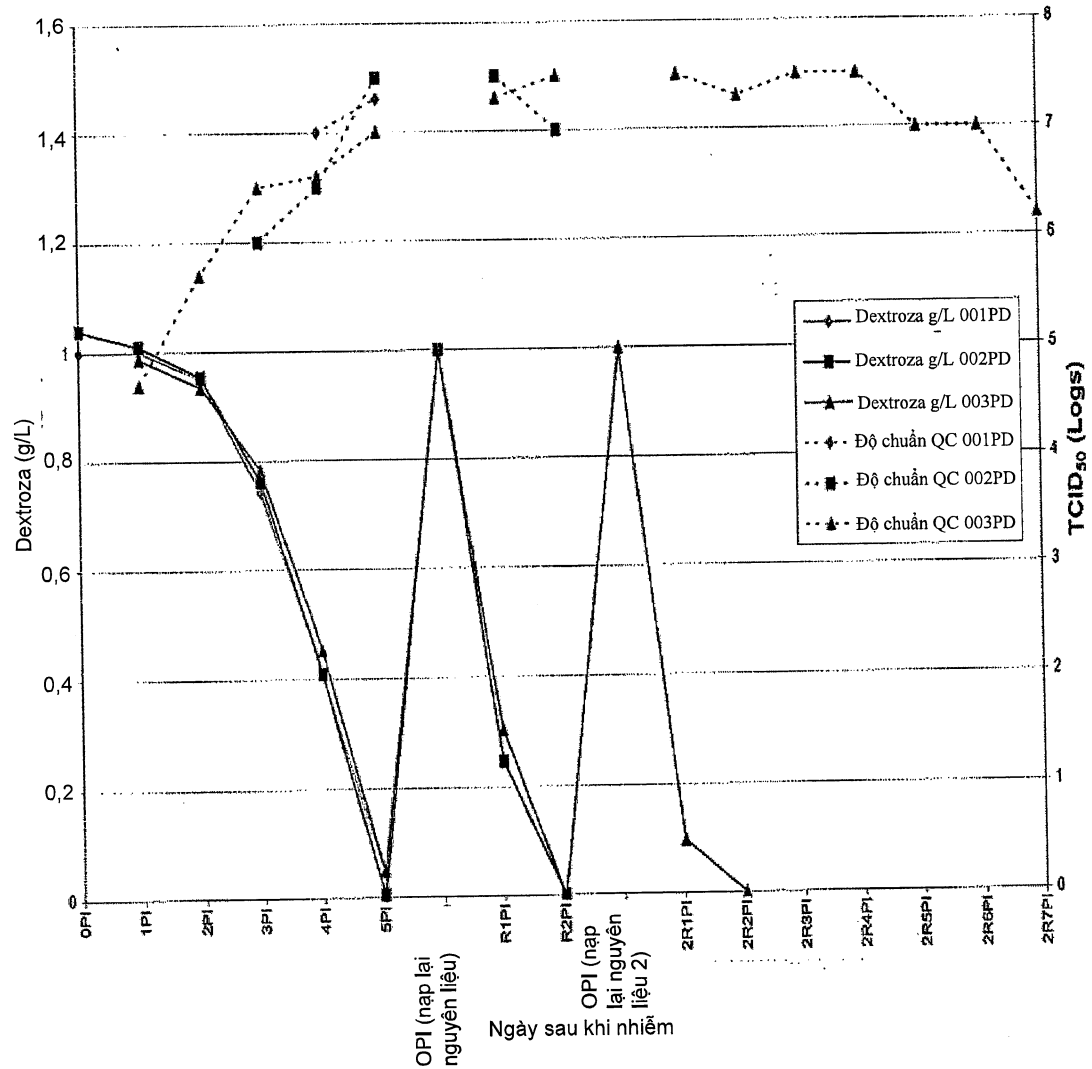
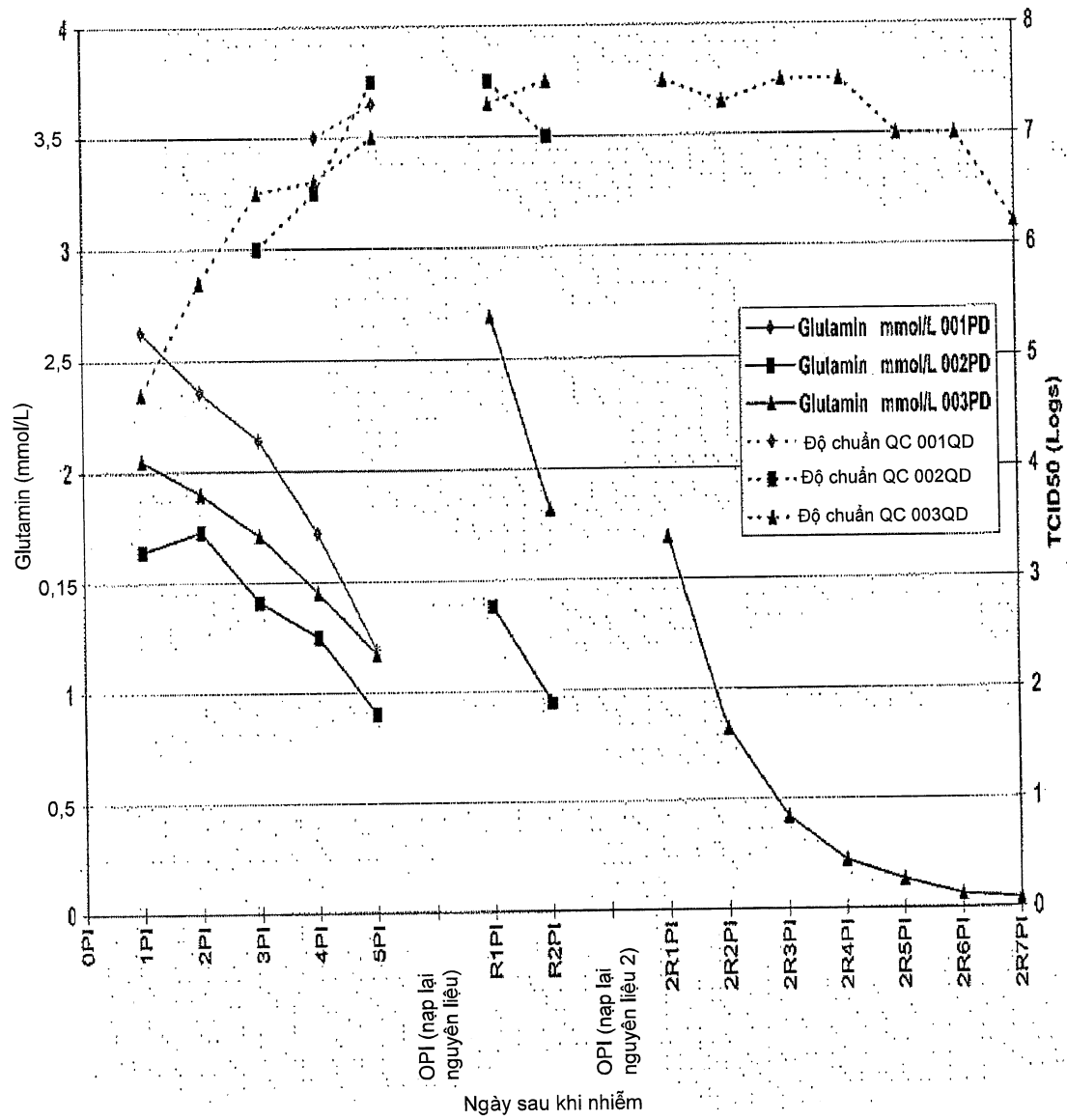


FIG 3



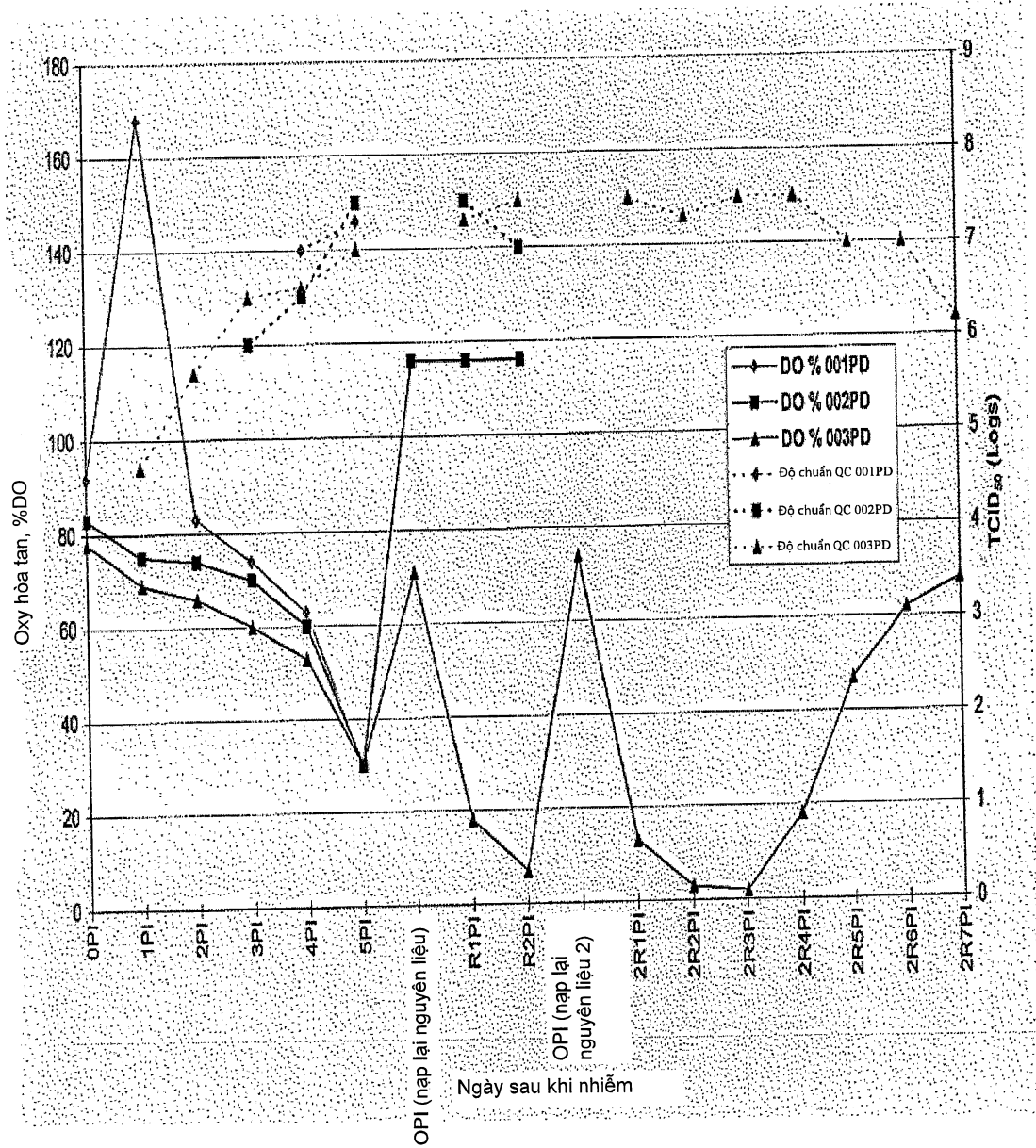
4/8

FIG 4



5/8

FIG 5



6/8

FIG 6

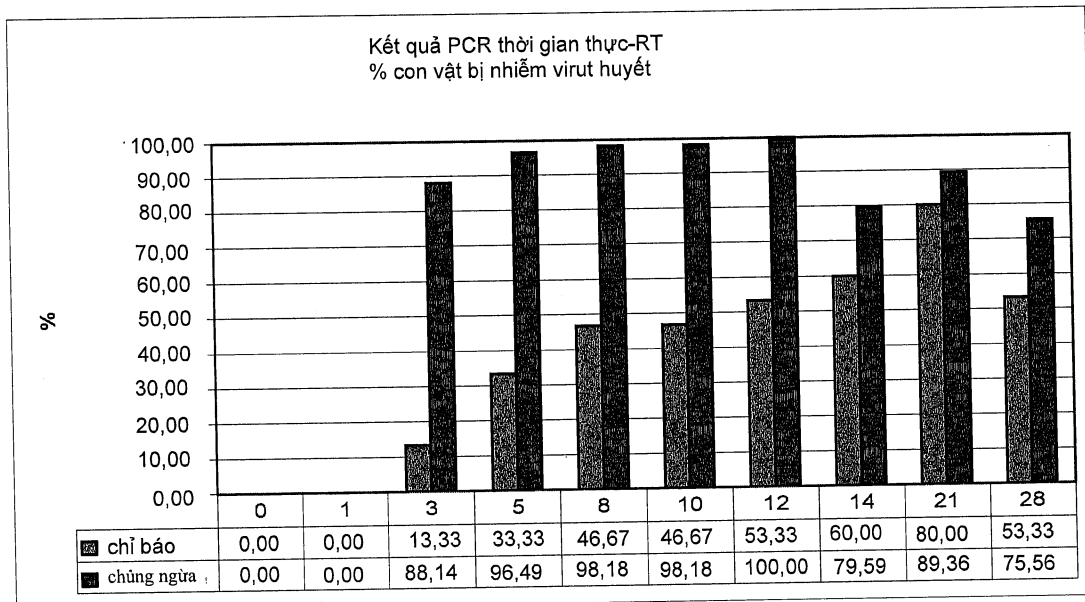


FIG 7

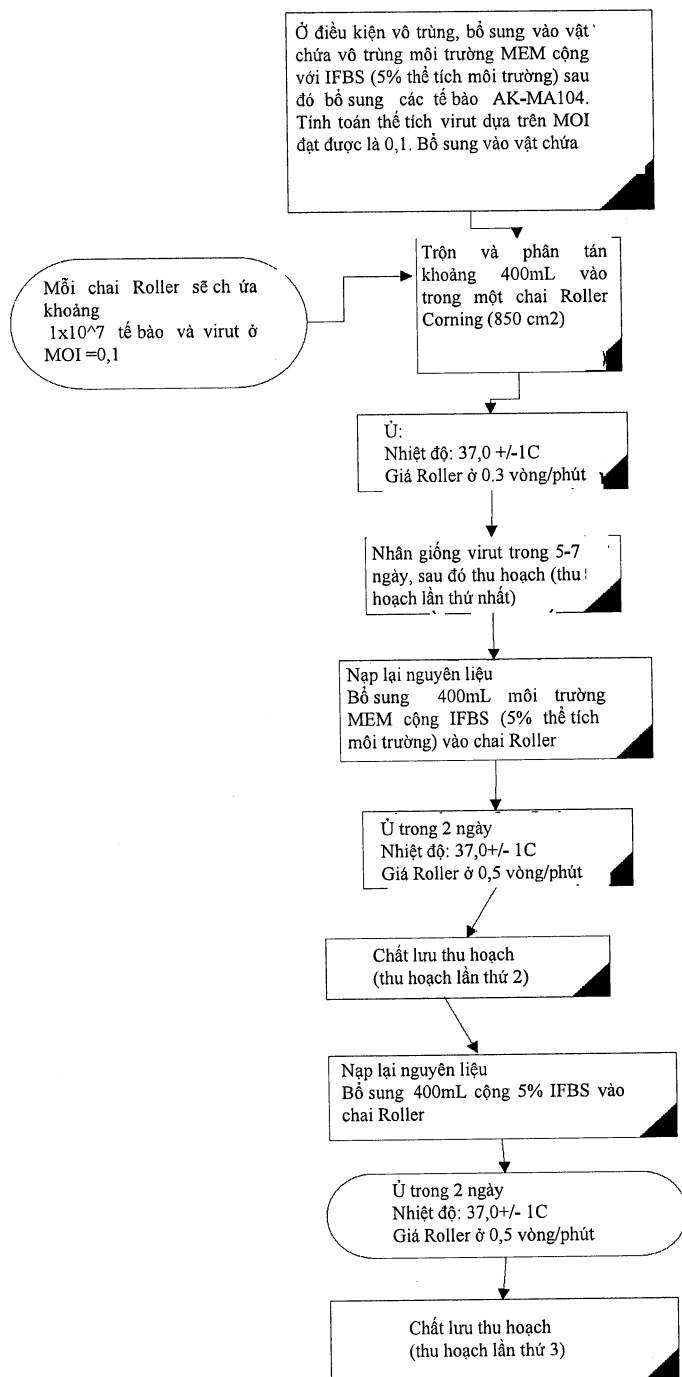


FIG 8

