



(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)



1-0025042

(51)⁷ A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2015-02980

(22) 14/02/2014

(86) PCT/EP2014/052870 14/02/2014

(87) WO2014/125053 21/08/2014

(30) 13155370.3 15/02/2013 EP

(45) 25/08/2020 389

(43) 26/10/2015 331A

(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)

Wim de Körverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands

(72) FACHINGER, Vicky (DE); SNO, Melanie (NL).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP GIẢI PHÓNG VÀ TINH CHẾ CÁC HẠT GIỐNG NHƯ VIRUT
ĐƯỢC BIỂU HIỆN BỞI BACULOVIRUT

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp giải phóng các hạt giống như virus (VLP) được biểu hiện bởi baculovirus của các virus không có vỏ ra khỏi các tế bào côn trùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp giải phóng các hạt giống như virus (Virus-like Particle: VLP) được biểu hiện bởi baculovirus của các virus không có vỏ ra khỏi các tế bào côn trùng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngày nay, y học chủ yếu dựa vào vaccin để chống các bệnh truyền nhiễm. Các vaccin này có thể là vaccin sống giảm độc lực hoặc vaccin vô hoạt, cả hai loại này đều có các ưu điểm và khuyết điểm riêng. Vaccin sống giảm độc lực mô phỏng sự lây nhiễm tự nhiên giống nhất, và do đó chúng khơi mào đáp ứng miễn dịch mà có thể so sánh với đáp ứng miễn dịch được khơi mào bởi dạng cường độc của virus hoặc vi sinh vật. Tuy nhiên, chúng có thể gây ra một số tác dụng phụ không mong muốn, và mức giảm độc lực là khá quan trọng. Mặt khác, vaccin vô hoạt an toàn, nhưng trong nhiều trường hợp, chúng không có hiệu quả như các bản sao sống của chúng.

Đối với vaccin virus, một loại vaccin thứ ba đang ngày càng được quan tâm: vaccin trên cơ sở hạt giống như virus (Virus-like particle - VLP). Các hạt giống như virus là các hạt mà giống với virus kiểu đại nhất về mặt hình thái. Chúng chứa tất cả các thành phần gây miễn dịch được phát hiện ở virus kiểu đại, và bao gồm các thành phần này trong cấu tạo và hình dáng tự nhiên của chúng. Tuy nhiên, chúng khác với virus kiểu đại ở chỗ chúng không có khả năng tạo ra virus truyền nhiễm thế hệ kế tiếp bởi vì chúng thiếu hệ gen virus. Vì vậy, chúng là sự lựa chọn hấp dẫn cho cả hai loại vaccin sống đã giảm độc lực và vaccin virus được làm bất hoạt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các VLP chủ yếu được tạo ra *in vitro* trong các hệ tế bào. Và trong nhiều trường hợp, chúng được tạo ra trong hệ biểu hiện tế bào côn trùng/baculovirus. Các hệ này có ưu điểm là chúng có khả năng tạo ra lượng VLP khá lớn.

Các protein biểu hiện trong hệ vector biểu hiện Baculovirus (Baculovirus expression vector system - BEVS) có thể là các protein được tiết hoặc không được tiết.

Nghĩa là VLP không được tiết đầu tiên phải được giải phóng ra khỏi các tế bào côn trùng trước khi chúng được tinh sạch tiếp. Các phương pháp chuẩn để giải phóng VLP bao gồm phương pháp kết đông-rã đông, phương pháp dùng sóng siêu âm, các phương pháp cơ học dùng máy cắt hiệu năng cao, phương pháp dùng hạt, “bom tế bào”, sốc thẩm thấu sử dụng môi trường nhược trương, sử dụng các chất tẩy rửa và các phương pháp enzym.

Tuy nhiên, không thể tránh được là tất cả các phương pháp này cũng gây phá vỡ hoặc ly giải và giải phóng toàn bộ các thành phần tế bào: ARN, ADN, protein, cơ quan tử của tế bào, mảnh vỡ tế bào và trong trường hợp các hệ trên cơ sở baculovirut cũng như cả baculovirut sống vào môi trường xung quanh. Rõ ràng là phần lớn nếu không phải là tất cả các thành phần này phải được loại bỏ trước khi VLP sẵn sàng để sử dụng trong vacxin. Mức tinh sạch cần đạt được yêu cầu một quy trình nhiều bước khó thực hiện bao gồm nhiều bước kiểm tra chất lượng.

Do đó, cần có các phương pháp giải phóng VLP không được tiết vào dịch nuôi cấy tế bào tránh giải phóng cùng lúc lượng protein và axit nucleic đầy đủ của tế bào.

Mục đích của sáng chế là đề xuất các phương pháp giải phóng VLP làm giảm hoặc thậm chí tránh được các vấn đề nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: thể hiện hiệu quả của việc dùng phương pháp theo sáng chế sử dụng các nồng độ NaCl khác nhau trong dung dịch nước, ở 40°C cho các tế bào côn trùng chứa VLP.

Fig. 2: thể hiện hiệu quả của việc dùng phương pháp theo sáng chế sử dụng các muối khác nhau làm muối trong dung dịch nước, cho các tế bào côn trùng chứa VLP.

Fig. 3: thể hiện hiệu quả của việc dùng phương pháp theo sáng chế sử dụng các muối khác nhau làm muối trong dung dịch nước ở nhiệt độ cao, cho các tế bào côn trùng chứa VLP.

Fig. 4: thể hiện sự so sánh giữa các tế bào côn trùng trong môi trường nuôi cấy của chúng (ảnh trái) và các tế bào côn trùng sau khi xử lý bằng phương pháp theo sáng chế (ảnh phải).

Fig. 5: thể hiện ảnh hưởng của việc ủ kéo dài ở nhiệt độ cao đến hiệu giá của baculovirut.

Fig. 6: thể hiện hiệu quả của việc dùng phương pháp theo sáng chế sử dụng NaCl, MgCl₂, CaCl₂ và KCl làm muối kiềm làm muối trong dung dịch nước, cho các tế bào côn trùng chứa VLP.

Fig. 7: thể hiện mối quan hệ giữa lượng VLP thu được sử dụng phương pháp theo sáng chế khi được xác định trên gel và khi được xác định bằng phương pháp ELISA lượng kháng nguyên.

Fig. 8: thể hiện hiệu quả của việc dùng phương pháp theo sáng chế cho hai dòng tế bào côn trùng khác nhau mà biểu hiện VLP *Porcine Parvovirus* có nguồn gốc Baculovirut. Làn 2, 7: thu gom. Làn 3, 8: thu gom, phần tủa tái tạo huyền phù trong PBS. Làn 4, 9: thu gom dịch nổi. Làn 5, 10: thu gom, NaCl 0,3M qua đêm (O/N) ở 40°C, phần tủa. Làn 6, 11: thu gom, NaCl 0,3M O/N ở 40°C, dịch nổi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương pháp được đề xuất trong sáng chế này đặc biệt thích hợp để giải phóng VLP không được tiết của các virus không có vỏ biểu hiện trong hệ vector biểu hiện baculovirut sử dụng các tế bào côn trùng...

Hiện các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng khi các tế bào côn trùng chứa VLP không có vỏ được trộn với muối, sao cho muối trong dung dịch nước thu được bằng cách trộn chứa ít nhất 300mOsmol/L muối trong đó cation được chọn từ nhóm bao gồm các kim loại kiềm và các kim loại kiềm thổ, và trong đó anion được chọn từ nhóm bao gồm Cl⁻, Br⁻ hoặc I⁻, các tế bào giải phóng VLP mà không giải phóng toàn bộ các thành phần của chúng. Phương pháp này đặc biệt thích hợp cho các tế bào côn trùng khi không chứa mầm bệnh phát triển trong huyền phù.

Đây thực sự là hiện tượng rất đáng ngạc nhiên: rõ ràng phương pháp theo sáng chế để lại hầu hết tế bào nguyên vẹn, ví dụ, như có thể được thấy trên Fig. 4. Cơ chế đằng sau sự giải phóng VLP này vẫn chưa rõ ràng.

Do đó, phương án thứ nhất của sáng chế đề cập đến các phương pháp giải phóng các hạt giống như virus (VLP's) được biểu hiện bởi baculovirut của các virus không có

vỏ ra khỏi các tế bào côn trùng, khác biệt ở chỗ phương pháp này không có các bước phân giải hoặc phá vỡ tế bào, và bao gồm bước trộn các tế bào côn trùng với muối, trong đó muối trong dung dịch nước thu được từ bước trộn chứa ít nhất 300mOsmol/l muối trong đó cation được chọn từ nhóm bao gồm các kim loại kiềm và các kim loại kiềm thổ, và trong đó anion được chọn từ nhóm bao gồm Cl^- , Br^- và I^- .

Để đạt được mục đích của phương pháp này, bước trộn các tế bào côn trùng với muối sao cho muối trong dung dịch nước thu được từ bước trộn chứa ít nhất 300mOsmol/l muối, trong đó cation được chọn từ nhóm bao gồm các kim loại kiềm và các kim loại kiềm thổ, và trong đó anion được chọn từ nhóm bao gồm Cl^- , Br^- và I^- được hiểu là bao gồm bước sau: dịch nuôi cấy tế bào (các tế bào côn trùng trong dịch lỏng bao quanh chúng) được trộn với muối trong đó cation được chọn từ nhóm bao gồm các kim loại kiềm và các kim loại kiềm thổ, và trong đó anion được chọn từ nhóm bao gồm Cl^- , Br^- và I^- đến phạm vi mà dung dịch muối thu được sau khi trộn chứa ít nhất 300mOsmol/l muối.

Khi không được đề cập cụ thể, việc trộn có thể được thực hiện theo các cách khác nhau; ví dụ, bằng cách thêm muối ở dạng rắn vào dịch nuôi cấy tế bào hoặc bằng cách trộn muối trong dung dịch nước với dịch nuôi cấy tế bào.

Muối trong dung dịch nước thu được từ bước trộn, như được mô tả trong sáng chế này, ví dụ, có thể chứa ít nhất 150 mM NaCl/L (tạo ra muối trong dung dịch nước có nồng độ mol là ít nhất 300 mOsmol NaCl/L). Nếu dung dịch muối như được mô tả trong sáng chế này được thực hiện trên cơ sở MgCl_2 , muối trong dung dịch nước thu được bằng cách trộn sẽ gồm ít nhất 100 mM MgCl_2/L (tạo ra muối trong dung dịch nước nồng độ mol là ít nhất 300 mOsmol MgCl_2/L).

Các ví dụ sau chỉ dùng để minh họa; nếu 100 ml dịch nuôi cấy tế bào côn trùng chứa các tế bào côn trùng và môi trường nuôi cấy được trộn với 100 ml dung dịch 300 mM NaCl/L , 200 ml thành phẩm của dịch lỏng thu được từ bước này bao gồm 150 mM NaCl/L .

Thể tích cuối cùng của dung dịch muối này đương nhiên là không ảnh hưởng đến các tác dụng có lợi của phương pháp theo sáng chế. Nếu 75 ml dịch nuôi cấy tế bào côn trùng chứa các tế bào côn trùng và môi trường nuôi cấy được trộn với 25 ml dung dịch

1200 mM NaCl/L, 100 ml thành phẩm của dịch lỏng thu được từ bước này bao gồm 300 mM NaCl/L.

Việc hiển thị trên gel hiện tượng không dự đoán trước được này của sáng chế được biểu diễn trên Fig. 1. Như có thể được thấy từ Fig. 1, các làn thể hiện dịch nổi trên bề mặt của tế bào sau khi xử lý bằng phương pháp theo sáng chế chứa các VLP được giải phóng là đặc biệt sạch (xem phần Ví dụ).

Mặc dù như đã nêu trên, chính xác là thể tích cuối cùng của dung dịch muối không ảnh hưởng đến phương pháp này, nhưng thực tế là hữu dụng khi đưa vào bước cô đặc trước khi đưa dịch nuôi cấy tế bào vào bước trộn theo sáng chế. Nguyên nhân chính của bước cô đặc là sự sản sinh VLP cho các mục đích thương mại cần thể tích nuôi cấy tế bào tương đối lớn. Không hiệu quả nếu thu VLP trực tiếp từ các thể tích lớn này; VLP thu được từ thể tích nhỏ không cần phải xử lý nhiều.

Mức cô đặc trong bước này là không có ngưỡng tới hạn. Việc cô đặc dịch nuôi cấy tế bào đến thể tích bằng nửa lượng thể tích dịch nuôi cấy tế bào ban đầu (nghĩa là đến 50% thể tích ban đầu) đã tạo ra thuận lợi đáng kể là dễ dàng thu gom. Việc cô đặc tiếp đến 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% hoặc thậm chí 5% được ưu tiên theo thứ tự ưu tiên này.

Sự cô đặc có thể được thực hiện theo nhiều cách, tất cả các cách này là đã biết trong lĩnh vực này. Một phương pháp được sử dụng thường xuyên là siêu lọc, ví dụ, ở dạng thẩm tách dòng tiếp tuyến.

Phương pháp thường được sử dụng khác là ly tâm tốc độ chậm. Sự ly tâm tốc độ chậm tiếp sau việc loại bỏ một phần hoặc tất cả dịch nuôi cấy tế bào dẫn đến sự cô đặc và cuối cùng dẫn đến sự kết tủa tế bào, nhưng các tế bào này vẫn nguyên vẹn và vẫn được bao quanh bởi lượng nhỏ dịch nuôi cấy. Các phần tủa tế bào này sau đó có thể dễ dàng được trộn với muối trong dung dịch nước để tạo ra muối trong dung dịch nước như được mô tả trong sáng chế.

Vì các lý do về thực hành, phương pháp rất thích hợp là bảo quản đơn giản dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào và để trọng lực kéo tế bào xuống đáy của bình. Sau khoảng 1-18 giờ, phụ thuộc vào thể tích thu được và kích thước bình, cho đến khi hầu hết các tế bào có mặt ở 10% đáy của dịch nuôi cấy tế bào, theo đó 90% dịch nuôi cấy tế bào bên

trên không chứa tế bào có thể được loại bỏ. Phương pháp này tránh được việc ly tâm và/hoặc siêu lọc thể tích lớn dịch nuôi cấy tế bào. Các tế bào chứa VLP ở 10% đáy của dịch nuôi cấy tế bào thu được sau đó có thể được sử dụng ngay trong bước trộn các tế bào côn trùng với muối như được mô tả trong sáng chế.

Do đó, dạng được ưu tiên của phương án này đề cập đến phương pháp theo sáng chế, khác biệt ở chỗ bước trộn các tế bào côn trùng với muối được thực hiện trước bởi bước cô đặc, trong đó các tế bào côn trùng được cô đặc.

Về mặt lý thuyết, cation được chọn từ nhóm bao gồm các kim loại kiềm và các kim loại kiềm thổ có thể được sử dụng cho phương pháp theo sáng chế. Tuy nhiên, có sự ưu tiên cho cation được chọn từ nhóm bao gồm Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} và K^+ , vì chúng rẻ và chấp nhận được để sử dụng làm thuốc.

Do đó, một dạng ưu tiên khác của phương án này theo sáng chế đề cập đến phương pháp theo sáng chế, khác biệt ở chỗ cation được chọn từ nhóm bao gồm Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} và K^+ .

Anion được ưu tiên là Cl^- , vì các muối chứa anion Cl^- rẻ và chúng được chấp nhận ở mức độ cao để sử dụng cho thuốc.

Do đó, một dạng ưu tiên hơn nữa của phương án này đề cập đến phương pháp theo sáng chế, khác biệt ở chỗ muối được chọn từ nhóm bao gồm NaCl , KCl , CaCl_2 và MgCl_2 .

Dịch nuôi cấy tế bào chứa các tế bào côn trùng mang VLP, ngoài ra chứa nhiều thành phần cần thiết để nuôi cấy tế bào. Nó cũng chứa chất thải của tế bào. Các sản phẩm này là các sản phẩm phụ không mong muốn mà có thể làm hỏng sản phẩm vắc xin thành phẩm chứa VLP.

Do đó, các thành phần này tốt hơn là được tách ra khỏi các tế bào côn trùng chứa VLP trước khi áp dụng phương pháp theo sáng chế cho các tế bào. Điều này có thể dễ dàng được thực hiện bằng cách kết tủa tế bào, loại bỏ phần dịch nổi và tái tạo huyền phù các tế bào trong dung dịch muối như được mô tả trong sáng chế. Nếu được thực hiện một cách cẩn thận, hầu hết các dịch nổi có thể được loại bỏ. Trong trường hợp đó, muối trong dung dịch nước được tạo ra bằng cách trộn các tế bào và muối về cơ bản bao gồm muối như được mô tả trong sáng chế, và nước. Về cơ bản ở đây nghĩa là muối

trong dung dịch nước được tạo ra từ hỗn hợp chứa ít hơn 10% dịch nuôi cấy tế bào. Tốt hơn là, dung dịch nước thu được từ hỗn hợp gồm ít hơn 8%, ít hơn 6%, ít hơn 4% hoặc thậm chí ít hơn 2% dịch nuôi cấy tế bào.

Do đó, dạng ưu tiên của phương án này đề cập tới các phương pháp theo sáng chế, khác biệt ở chỗ muối trong dung dịch nước được tạo ra từ hỗn hợp chủ yếu gồm muối như được mô tả trong sáng chế, và nước.

Nói chung, phương pháp theo sáng chế thích hợp cho VLP không có vỏ, không được tiết mà được biểu hiện trong BEVS.

Do đó, phương pháp này thích hợp cho VLP có nguồn gốc BEVS thuộc họ Parvoviridae và Circoviridae; các họ virus có một vài thành viên mà hiện các VLP được tạo ra từ đó, trên cơ sở thương mại.

Do đó, một dạng ưu tiên khác của phương án này theo sáng chế đề cập đến phương pháp theo sáng chế, khác biệt ở chỗ virus không có vỏ là thành viên của họ Parvoviridae hoặc Circoviridae.

Các ví dụ về vacxin họ Parvoviridae và Circoviridae quan trọng để sử dụng trong thuốc thú y trên cơ sở virus không có vỏ có thể được áp dụng thành công dưới dạng VLP được tạo ra trong hệ thống tế bào côn trùng gốc baculovirus là Porcine Parvovirus (PPV) và Porcine Circovirus loại 2 (PCV2).

Do đó, dạng ưu tiên hơn của phương án này theo sáng chế đề cập đến phương pháp theo sáng chế, khác biệt ở chỗ virus không có vỏ là Porcine Parvovirus (PPV) hoặc Porcine Circovirus loại 2 (PCV2).

Việc tạo ra VLP trong BEVS về mặt lý thuyết còn dẫn tới sự tạo ra baculovirus. Baculovirus này là sản phẩm phụ không mong muốn của VLP và do đó, chúng phải được loại bỏ hoặc ít nhất được bất hoạt.

Hiện tại, thậm chí đáng ngạc nhiên hơn khi thấy rằng nếu muối trong dung dịch nước được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng 30-55°C, tốt hơn là nằm trong khoảng 35-50°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 40-45°C, lượng baculovirus còn sống giảm đáng kể. Hơn hết, lượng kháng nguyên được giải phóng cũng tăng lên đáng kể khi nhiệt độ được tăng lên.

Sự giảm đi này là rất có lợi, vì lượng virus bị bất hoạt sau khi áp dụng phương pháp theo sáng chế là tương đối thấp, và do đó phải sử dụng lượng hóa chất gây bất hoạt thấp hơn.

Chỉ đơn thuần là ví dụ; khi muối trong dung dịch nước được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng 30-40°C, thì có thể dễ dàng thu được sự giảm hiệu giá virus từ 1000 tới 10000 lần.

Khoảng thời gian mà nhiệt độ nhất định phải được áp dụng phụ thuộc vào nhiệt độ được chọn: ở nhiệt độ khoảng 40°C, thu được hiệu giá virus giảm đi 10 lần sau 1 giờ, trong khi ở nhiệt độ khoảng 35°C, thu được hiệu giá virus giảm sau 5-6 giờ. Nói chung, dù thế nào thì việc giữ muối trong dung dịch nước được tạo ra từ hỗn hợp ở nhiệt độ nhất định trong 18-24 giờ là thích hợp.

Hai mẫu thí nghiệm của các tế bào côn trùng được dùng rất phổ biến để biểu hiện VLP là các tế bào SF9 hoặc SF21. Phương pháp được mô tả trong sáng chế này có thể được áp dụng rất thành công với cả hai loại tế bào này.

Do đó, dạng ưu tiên khác của phương án này theo sáng chế đề cập đến phương pháp theo sáng chế trong đó các tế bào côn trùng là các tế bào SF9 hoặc SF21.

Phương pháp được mô tả thường là một phần của các phương pháp được áp dụng thông thường để tinh chế baculovirus biểu hiện các hạt giống virus (VLP) của virus không có vỏ, bao gồm một số bước trong các bước sau: a) gây nhiễm các tế bào côn trùng với baculovirus tái tổ hợp mã hóa protein VLP, b) nuôi cấy các tế bào côn trùng, c) giải phóng VLP ra khỏi các tế bào côn trùng và d) phân lập VLP.

Bước c), là bước giải phóng VLP sẽ có nhiều lợi ích từ phương pháp theo sáng chế.

Do đó, lại một phương án khác theo sáng chế đề cập đến các phương pháp để tinh chế các hạt giống virus (VLP) biểu hiện baculovirus của virus không có vỏ, trong đó phương pháp bao gồm các bước:

- a) gây nhiễm các tế bào côn trùng với baculovirus tái tổ hợp mã hóa protein VLP
- b) nuôi cấy các tế bào côn trùng
- c) giải phóng VLP ra khỏi các tế bào côn trùng

d) phân lập VLP

khác biệt ở chỗ phương pháp này không có các bước phân giải hoặc phá hủy tế bào, và bước c gồm phương pháp theo sáng chế để giải phóng VLP.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất PCV2 VLP.

Trong ví dụ này, PCV2 VLP có nguồn gốc BEVS được sử dụng. Cấu trúc của baculovirus tái tổ hợp này trước đây được mô tả chi tiết trong Patent Mỹ số US/2001/0064765. Virus này còn gọi là virus BacPCV-2-ORF-2.

Để thu được lượng tối đa sản phẩm biểu hiện, các thử nghiệm thí điểm được tiến hành để tối ưu hóa các điều kiện để thu được PCV-2 ORF-2 VLP tái tổ hợp. Tất cả các thử nghiệm được tiến hành sử dụng các tế bào *Spodoptera frugiperda* 21 (Sf21) trong dịch nuôi cấy huyền phù ở 28°C. Virus BacPCV-2-ORF-2 ở lần cấy chuyển thứ 4 từ giống Master được sử dụng để gây nhiễm. Để sự sản xuất được tối ưu hóa, mật độ tế bào tại thời điểm gây nhiễm là $1,4 \times 10^6$ tế bào/ml, bội số gây nhiễm (MOI) là 0,01 và nuôi cấy tiếp tục trong 6 ngày sau gây nhiễm. Đặt tên hỗn hợp thu được là sản phẩm thu được biểu hiện.

Các mẫu dịch nuôi cấy tế bào trước và sau ly tâm với tốc độ chậm được đem điện di gel SDS-polyacrylamit biến tính theo phương pháp của Laemmli (Laemmli, U. K. (1970). Nature 227, 680-685). Gel gradien 4-12% sử dụng được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue. Tất cả các gel trong các ví dụ đều là gel SDS-polyacrylamit biến tính theo Laemmli.

Ví dụ 2: Giải phóng VLP ra khỏi các tế bào còn trùng.

Các tế bào được thu gom theo ví dụ 1. Trên Fig. 1, làn có tên là “thu gom” thể hiện lượng protein của phần thu gom dịch nuôi cấy tế bào. Làn này thể hiện tất cả các protein có trong dịch nuôi cấy và các tế bào, bao gồm protein của tế bào, protein của baculovirus và protein liên quan tới VLP.

Sau khi ly tâm phần thu gom ở tốc độ 1336 vòng/phút (200g), 90% dịch nổi không chứa tế bào được thay bằng lượng thể tích tương tự của muối trong dung dịch nước, sao cho hàm lượng cuối cùng sau khi trộn là 0,15, 0,20, 0,25 và 0,30 mM NaCl.

Các hỗn hợp này được giữ trong 18 giờ ở 40°C và sau đó các tế bào còn lại được làm lắng xuống bằng ly tâm ở tốc độ 5175 vòng/phút (3000g). Dịch nổi được đem đi điện di gel.

Như có thể được nhìn thấy trên Fig. 1, ở các làn có tên là “Dịch nổi”, dịch nổi chứa protein PCV2 VLP tinh sạch thực tế (và lượng rất nhỏ các protein không phải VLP).

Ví dụ 3: So sánh các muối kiềm và dung dịch đệm phosphat.

Trong thử nghiệm này, dịch nuôi cấy tế bào được thu gom, các tế bào kết tủa ở tốc độ 1336 vòng/phút (200g), 90% dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được tạo tái huyền phù trong thể tích tương tự của PB (dung dịch đệm phosphat 250 mM, độ pH=7,4, PB + NaCl 0,5M, H₂O (= WFI = nước-đề-tiêm) và NaCl 0,5M trong dung dịch nước như được mô tả trong sáng chế.

Tiến hành ủ ở 40°C, qua đêm. Sau đó, các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 5175 vòng/phút (3000g). Từ Fig. 2 có thể thấy rằng chỉ riêng WFI không giải phóng VLP, trong khi PB+NaCl, NaCl trong dung dịch nước và PB giải phóng VLP. Từ làn WFI + NaCl (= nước-đề-tiêm + NaCl, = NaCl trong dung dịch nước) cho thấy lượng lớn nhất của VLP tinh khiết, và lượng nhiều thấp nhất là các protein không phải là VLP.

Khối lượng kháng nguyên (được biểu hiện theo đơn vị kháng nguyên cho mỗi ml - AU/ml) của tất cả các mẫu được xác định bằng ELISA so với mẫu chuẩn của khối lượng kháng nguyên đã biết. Tiếp đó, tỷ lệ thu hồi (theo %) của tất cả các mẫu thử nghiệm được tính toán so với tỷ lệ thu hồi của mẫu thu được. Một phương pháp thay thế, cường độ của băng protein đặc hiệu PCV2 trên gel được tính toán so với cường độ của băng protein đặc hiệu PCV2 của mẫu thu được.

Ví dụ 4: So sánh các muối kiềm và dung dịch đệm phosphat ở nhiệt độ tăng cao.

Trong ví dụ này, dịch nuôi cấy tế bào được thu gom, các tế bào được tạo kết tủa ở tốc độ 1336 vòng/phút (200g), 90% dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được tái tạo huyền phù ở thể tích tương đương của PB (phosphat 250 mM, độ pH=7,4, PB + NaCl 0,5M, PBS 0,01M (8g NaCl/L, 0,2g KCl/L, 1,44g Na₂HPO₄/L, 0,2g KH₂PO₄/L, pH 7,1) và NaCl 0,5M trong dung dịch nước như được mô tả trong sáng chế.

Tiến hành pha loãng vài lần, để so sánh hiệu quả mức độ pha loãng của dịch nuôi cấy tế bào. Trong một thử nghiệm, các tế bào trong 30 ml dịch nuôi cấy tế bào thu được được cô đặc 10 lần và sau đó được trộn với muối trong dung dịch nước tới thể tích cuối cùng là 50 ml. Trong thử nghiệm thứ hai, các tế bào trong 30 ml dịch nuôi cấy tế bào thu được được cô đặc 10 lần và sau đó được trộn với muối trong dung dịch nước tới thể tích cuối cùng là 25 ml. Trong thử nghiệm thứ ba, các tế bào trong 30 ml dịch nuôi cấy tế bào thu được được cô đặc 10 lần và sau đó được trộn với muối trong dung dịch nước tới thể tích cuối cùng là 10ml.

Tiến hành ủ ở 40°C, qua đêm. Sau đó, các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 5175 vòng/phút (3000g). Từ gel trên Fig. 3 có thể thấy rằng tất cả PB, PB+NaCl, PBS và NaCl trong dung dịch nước (WFI + NaCl) đều giải phóng VLP. Ở làn WFI + NaCl (= nước-đề-tiêm + NaCl, = NaCl trong dung dịch nước) cho thấy lượng lớn nhất của VLP tinh khiết, và lượng nhiều thấp nhất của protein không liên quan VLP. Hiệu quả tương tự được thấy ở tất cả ba nồng độ.

Ngoài ra, thử nghiệm với WFI + NaCl cũng được thực hiện ở 45°C. Như có thể thấy ở làn “WFI + NaCl, 45°C”, việc ủ ở nhiệt độ này đem lại kết quả có thể so sánh với xử lý WFI + NaCl ở 40°C: protein VLP với lượng thấp có thể so sánh của tạp chất protein.

Ví dụ 5: Sự biểu hiện của các tế bào trong muối trong môi trường nước.

Trong thử nghiệm này, hình ảnh dưới kính hiển vi là của các tế bào côn trùng trong dịch nuôi cấy tế bào và các tế bào được xử lý theo phương pháp của sáng chế. Các tế bào được giữ làm dịch nuôi cấy tế bào không xử lý hoặc được đưa tới phương pháp theo sáng chế, trong trường hợp này trộn với muối trong dung dịch nước sao cho muối trong dung dịch nước tạo ra từ hỗn hợp chứa 0,3M NaCl/L.

Fig. 4 thể hiện các kết quả: hình bên trái thể hiện các tế bào côn trùng không được xử lý, trong khi hình bên phải thể hiện các tế bào côn trùng trong muối trong dung dịch nước chứa 0,3M NaCl/L sau khi trộn. Như có thể thấy ngay, các tế bào trong hình bên phải thực tế là còn nguyên vẹn, và chúng thậm chí nhỏ hơn một chút về kích thước so với các tế bào trong hình bên trái, vì sự có mặt của chúng trong môi trường tăng thẩm thấu của muối trong dung dịch nước chứa 0,3 mM NaCl/L.

Ví dụ 6: Ảnh hưởng của nhiệt độ ủ đến hiệu giá của baculovirus.

Trong ví dụ này, 30 ml tế bào được thu gom bằng cách ly tâm tốc độ chậm, 90% dịch nuôi cấy không có tế bào được loại bỏ và sau đó phần tủa tế bào còn lại được tái tạo huyền phù trong 25 ml muối trong dung dịch nước tới nồng độ cuối cùng là 0,5M NaCl/L.

Do đó, huyền phù thu được được ủ trong 1, 2, 4, 6 hoặc 18 giờ (qua đêm) tới nhiệt độ 35°C, 37°C, và 40°C. Sau đó, các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 3000g. Như có thể thấy trên Fig. 5, hiệu giá baculovirus giảm khoảng 100 lần có thể thu được qua đêm ở 35°C. Ở 40°C, thu được hiệu giá baculovirus giảm 100 lần sau 1-2 giờ, trong khi thu được hiệu giá baculovirus giảm 1000 lần sau 6-18 giờ.

Ví dụ 7: So sánh các nồng độ khác nhau của một số kim loại kiềm.

Thử nghiệm này so sánh sự giải phóng VLP bởi các muối khác nhau. Các tế bào thu được như được mô tả ở trên, 90% thể tích dịch nuôi cấy tế bào không có tế bào được loại bỏ. Sau đó, các muối trong dung dịch nước khác nhau được bổ sung theo đó thể tích muối trong dung dịch nước luôn bằng với thể tích thu được được cô đặc để đạt được nồng độ cuối cùng của các tế bào là 5 lần. Thử nghiệm được tiến hành với các nồng độ khác nhau của NaCl, KCl, MgCl₂ và CaCl₂. Sau đó, các tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 5175 vòng/phút (3000g). Nồng độ sau khi trộn được thể hiện ở bảng 1 dưới đây.

		Tỷ lệ thu hồi từ Gel	AM (AU/ml)
2	A074, thu gom ngày 7	100	25183
3	NaCl 0,3M (nồng độ đậm đặc gấp 5 lần)*	204	111364
4	150 mM NaCl	182	76266
5	300 mM NaCl	191	80806
6	100 mM MgCl ₂	198	83782
7	200 mM MgCl ₂	191	59528
8	100 mM CaCl ₂	157	60327
9	200 mM CaCl ₂	75	60659
10	150 mM KCl	162	61900
11	300 mM KCl	179	86528

* mẫu này lấy từ cùng mẫu thu được nhưng được xử lý bằng NaCl 0,3M vào ngày khác các mẫu còn lại

Bảng 1

Các kết quả được thể hiện ở Fig. 6. Làn 2 thể hiện protein có trong mẫu thu gom (sau bước pha loãng các mẫu 5 lần (ngoại trừ: Làn 12: mẫu thu gom không pha loãng). Tỷ lệ thu hồi của mẫu thu gom trên gel (bảng 1) được thể hiện trong bảng là 100, sự thu hồi tương đối được xác định trên gel được thể hiện trên cột thứ hai bên phải của bảng 1. Sự thu hồi khối lượng kháng nguyên được thể hiện trên cột bên phải của bảng 1. Theo cả gel trong Fig. 6 và bảng, tất cả các phương pháp xử lý có tỷ lệ thu hồi cao hơn sản phẩm ở làn 2 (mẫu thu được), và tất cả các phương pháp xử lý đem lại sản phẩm VLP sạch. (Giá trị tỷ lệ thu hồi tương đối thấp ở làn 9 được xem là sản phẩm nhân tạo, vì việc xác định khối lượng kháng nguyên của sản phẩm được thử nghiệm ở làn 9 thể hiện tỷ lệ thu hồi cao như mong đợi). Fig. 7 thể hiện rằng có mối tương quan chặt chẽ giữa tỷ lệ thu hồi VLP được xác định trên gel và tỷ lệ thu hồi VLP được xác định bởi sự xác định khối lượng kháng nguyên trên cơ sở thử nghiệm ELISA tiêu chuẩn.

Ví dụ 8: Áp dụng phương pháp này cho các tế bào SF9 và SF21 tạo ra *Porcine Parvovirus*.

Thử nghiệm này nhằm mục đích thể hiện rằng phương pháp này thích hợp đối với VLP không gây tiết không có vỏ khác. Trong thử nghiệm này, VLP có nguồn gốc BEVS của *Parvoviridae* được chọn: *Porcine Parvovirus* PPV. Ngoài ra, trong thử nghiệm này sử dụng hai loại tế bào côn trùng thường dùng khác nhau: các tế bào SF9 và các tế bào SF21.

Các tế bào SF9 và SF21 được gây nhiễm với *Porcine Parvovirus* VLP biểu hiện baculovirus tái tổ hợp. (“thu gom”, Fig. 8, các làn 2 và 7). Sau đó, các tế bào được kết tủa ở 200g, 90% dịch nổi được loại bỏ (Fig. 8, các làn 4 và 9) và các tế bào được tái tạo huyền phù trong thể tích PBS cân bằng (Fig. 8, các làn 3 và 8) hoặc NaCl 0,3M trong dung dịch nước. Sau khi ủ các mẫu đã xử lý bằng NaCl qua đêm ở 40°C, các mẫu được ly tâm ở tốc độ 5175 vòng/phút (3000g), dịch nổi được thu gom (Fig. 8, các làn 6 và 11) và phần tủa được tái tạo huyền phù trong thể tích PBS cân bằng (Fig. 8, các làn 5 và 10).

Fig. 8 thể hiện kết quả của phương pháp này, khi được áp dụng cho PPV-VLP được tạo ra trong các tế bào SF9 và SF21. Làn 2: thu gom; làn 3: thu gom, phần tủa tái tạo huyền phù trong PBS, làn 4: thu gom dịch nổi; làn 5: thu gom, NaCl 0,3M qua đêm ở 40°C, viên; làn 6: thu gom, NaCl 0,3M qua đêm ở 40°C, dịch nổi; làn 7: thu gom; làn 8 thu gom, phần tủa tái tạo huyền phù trong PBS, làn 9: thu gom dịch nổi; làn 10: thu gom, NaCl 0,3M qua đêm ở 40°C, phần tủa; làn 11: thu gom, NaCl 0,3M qua đêm ở 40°C, dịch nổi.

Từ làn 5 khi so sánh với làn 3, việc xử lý theo phương pháp của sáng chế thực tế giải phóng tất cả VLP ra khỏi các tế bào côn trùng: các tế bào được kết tủa sau khi xử lý, như được thể hiện ở làn 5 không hoặc hầu như không có VLP. Từ làn 4 khi so sánh với làn 3 có thể thấy rằng trái ngược với những gì được thấy với PCV2 VLP, các tế bào côn trùng tạo ra CPV VLP đã giải phóng một phần VLP trong dịch nổi. Lý do của việc này chưa được biết đến. Tuy nhiên, phương pháp theo sáng chế có thể rất thích hợp để áp dụng cho CPV VLP, vì không áp dụng phương pháp theo sáng chế, thì lượng CPV VLP rất lớn còn lại bị mắc trong các tế bào sau thu gom.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp giải phóng các hạt giống như virus (Virus-like Particle: VLP) được biểu hiện bởi baculovirus của các virus không có vỏ ra khỏi các tế bào côn trùng, phương pháp này khác biệt ở chỗ không bao gồm các bước phân giải hoặc phá vỡ tế bào, và bao gồm bước trộn các tế bào côn trùng với muối, trong đó muối trong dung dịch nước thu được từ bước trộn chứa ít nhất 300mOsmol/l muối trong đó cation được chọn từ nhóm bao gồm các kim loại kiềm và các kim loại kiềm thổ, và trong đó anion được chọn từ nhóm bao gồm Cl^- , Br^- và I^- .
2. Phương pháp theo điểm 1, phương pháp này khác biệt ở chỗ bước cô đặc mà trong bước này các tế bào côn trùng được cô đặc được thực hiện trước bước trộn các tế bào côn trùng với muối.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, phương pháp này khác biệt ở chỗ cation được chọn từ nhóm bao gồm Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} và K^+ .
4. Phương pháp theo điểm 3, phương pháp này khác biệt ở chỗ muối được chọn từ nhóm bao gồm NaCl , KCl , CaCl_2 và MgCl_2 .
5. Phương pháp theo điểm 1, phương pháp này khác biệt ở chỗ muối trong dung dịch nước thu được từ bước trộn gồm muối theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và nước.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, phương pháp này khác biệt ở chỗ virus không có vỏ thuộc họ Parvoviridae hoặc Circoviridae.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, phương pháp này khác biệt ở chỗ muối trong dung dịch nước được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35 đến 50°C.
8. Phương pháp theo điểm 7, phương pháp này khác biệt ở chỗ muối trong dung dịch nước được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 45°C.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, phương pháp này khác biệt ở chỗ các tế bào côn trùng là các tế bào SF9 hoặc SF21.
10. Phương pháp tinh chế các hạt giống như virus (VLP) được biểu hiện bởi baculovirus của các virus không có vỏ, phương pháp này bao gồm các bước:
 - a) cho các tế bào côn trùng nhiễm baculovirus tái tổ hợp mã hóa các protein VLP

- b) nuôi cấy các tế bào còn trùng
- c) giải phóng VLP ra khỏi các tế bào còn trùng
- d) phân lập VLP

phương pháp này khác biệt ở chỗ không bao gồm các bước phân giải hoặc phá vỡ tế bào, và bước c bao gồm phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 để giải phóng VLP.

Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sự giải phóng VLP

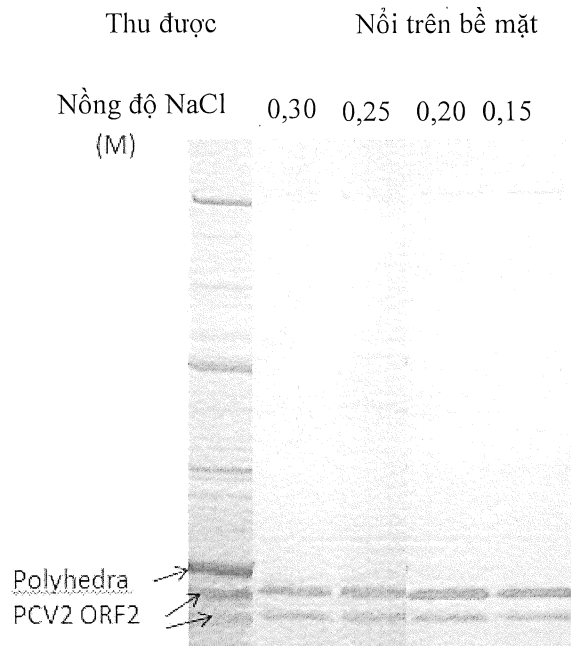


FIG. 1

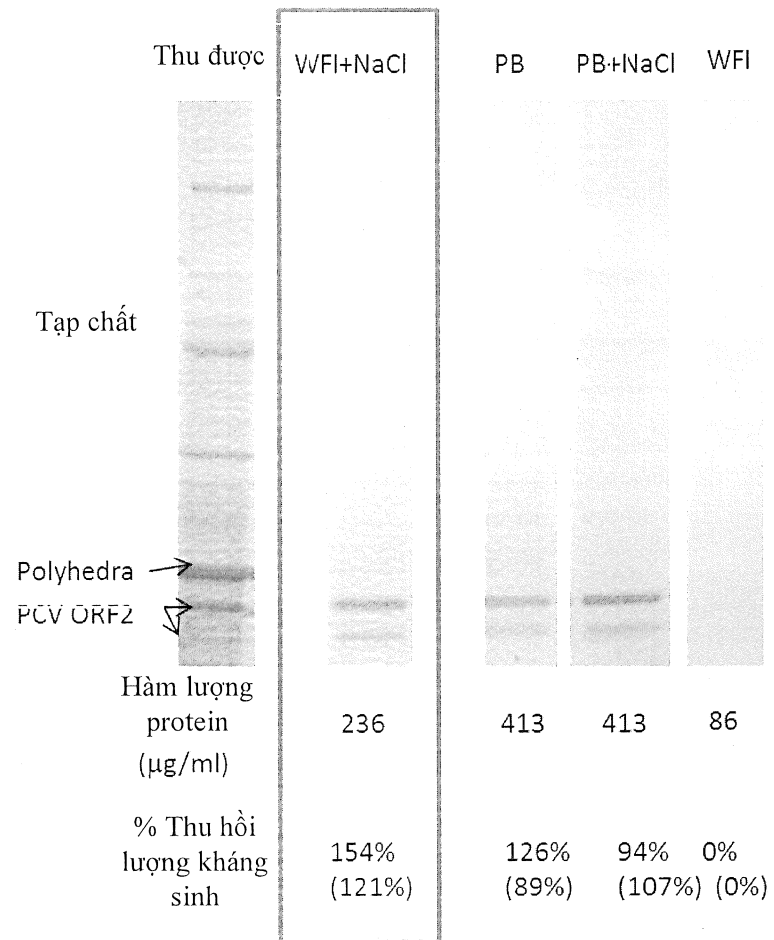


FIG. 2

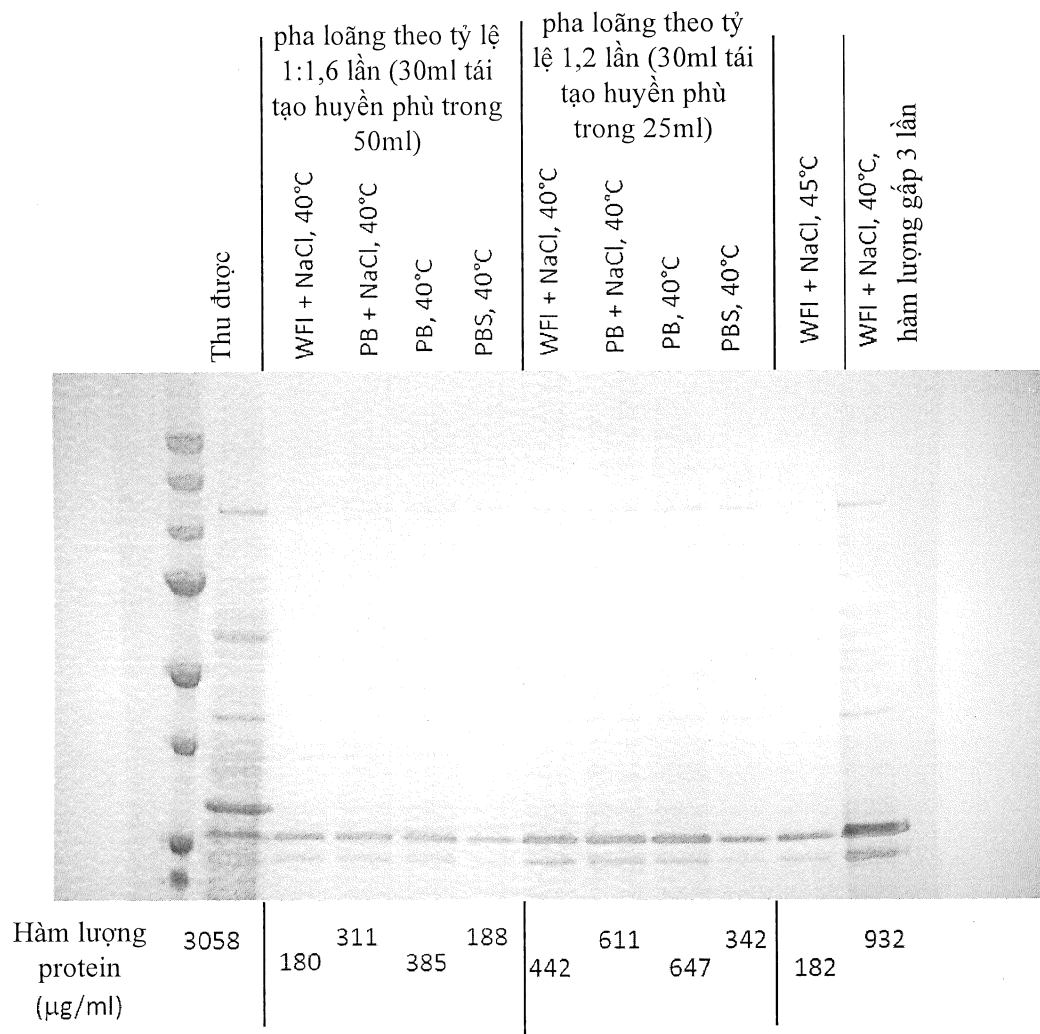
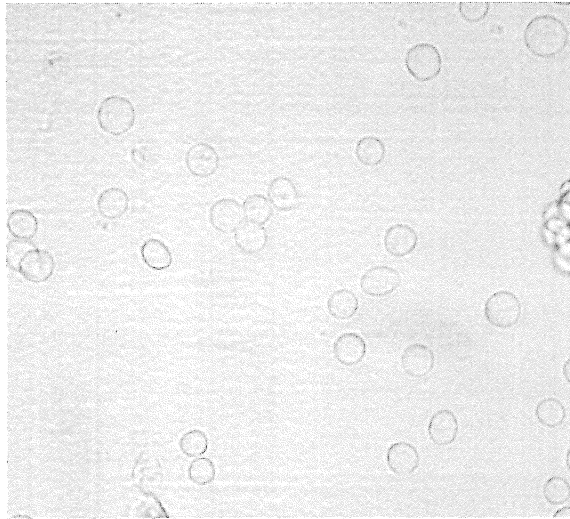


FIG. 3

Các tế bào côn trùng không qua xử lý



Các tế bào côn trùng với 0,3M NaCl trong WFI

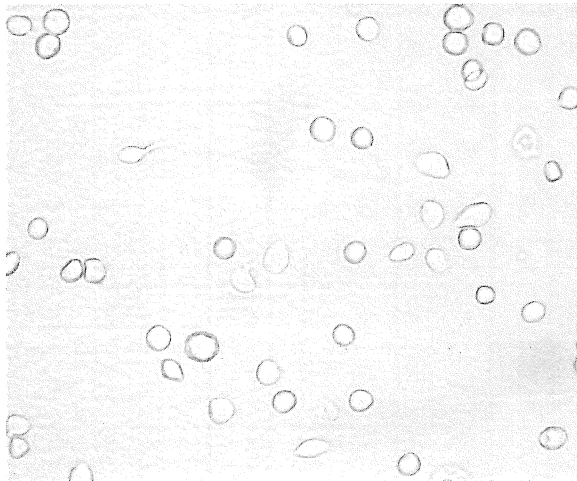


FIG. 4

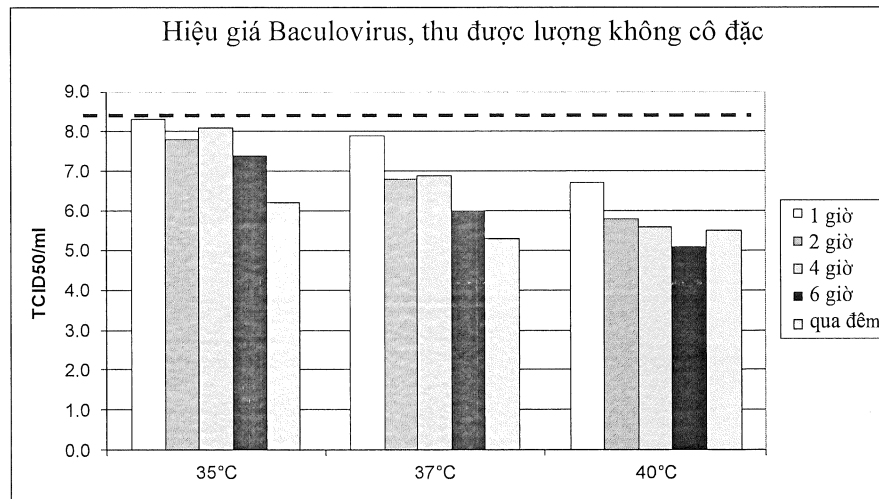


FIG. 5

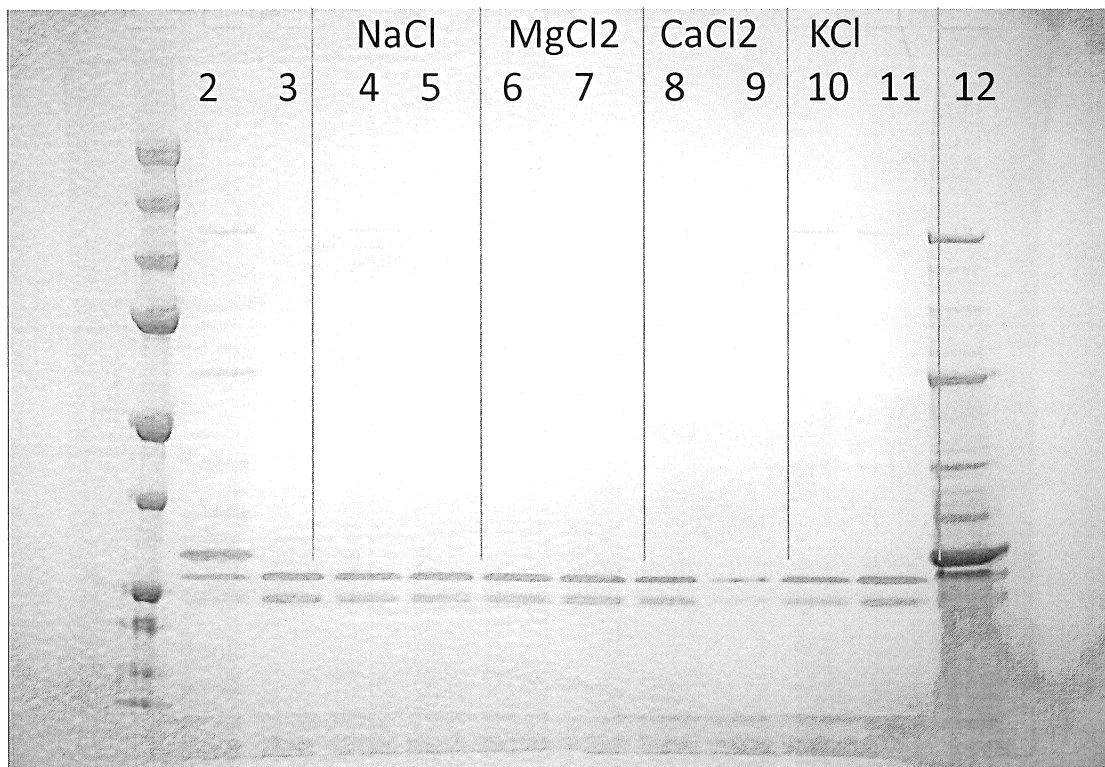


FIG. 6

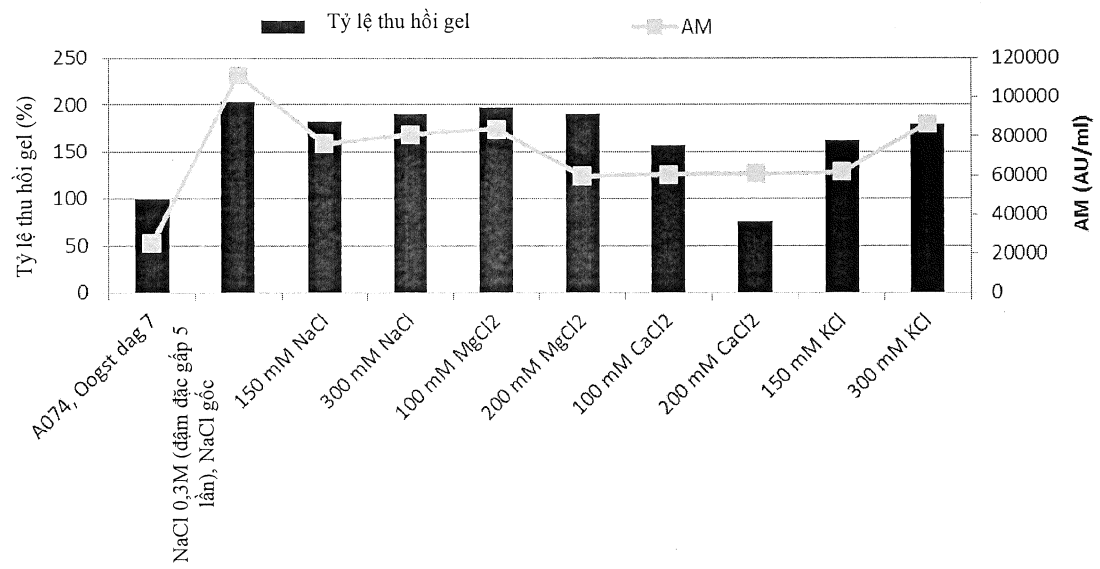


FIG. 7

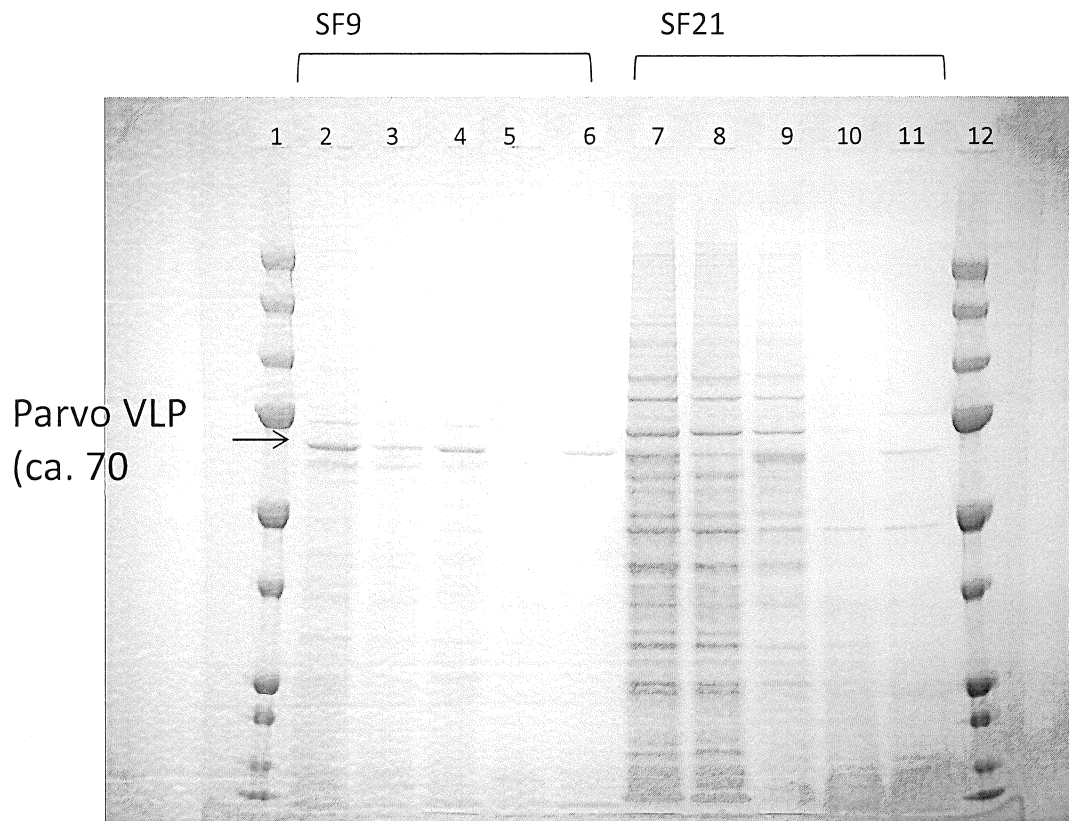


FIG. 8