

---

# APPLICATION OF ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE TO THE PURIFIED PROCESS TO ENHANCE THE PURITY OF ANTI-RABIES SERUM

Nguyen Phuong Vu\*, Duong Huu Thai, Lam Thi Hue, Tran The Dinh, Hoang Thi  
Thuy Van, Nguyen Van Duoc, Bui Quang Vuong, Tran Ngoc Nhon, Duong Khanh  
Minh, Pham Thi Lan Anh, Nguyen Thi Lan Phuong

*Institute of Vaccines and Medical Biologicals*

*Received 02 May 2024*

*Accepted 25 June 2024*

**Abstract:** Anti-rabies serum is indicated for cases of bites from suspected rabid animals at level III or cases of exposure to the rabies virus. This study aims to evaluate the purity of purified anti-rabies serum (SAR) products from the Institute of Vaccines and Medical Biologicals (IVAC) after purification by anion exchange chromatography using Fractogel EMD-DEAE gel. Six lots of anti-rabies serum were purified according to the current process until the dialysis stage and then chromatographed on Fractogel EMD-DEAE gel. Products before and after chromatography were evaluated for purity by SDS-PAGE and SE-HPLC. The purity of SAR before and after chromatography and the performance of the process were evaluated based on protein content, neutralizing antibody, and endotoxin content. The products after chromatography only has the presence of proteins with a molecular weight of 100-135 kDa, equivalent to the MW of the F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments, and the ratio of target proteins (F(ab')<sub>2</sub>) accounts for 97%-99%. The chromatography process removed over 45% of impurity proteins and achieved an efficiency of over 78%. Using Fractogel EDM-DEAE gel in the SAR serum purification anion exchange chromatography process has created a serum product with higher purity than currently available.

*Keywords: rabies virus, anti-rabies serum, purification, anion exchange chromatography.*

---

\* Corresponding author:

E-mail address: [phuongvu53cnsh@gmail.com](mailto:phuongvu53cnsh@gmail.com)

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i2.154>

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION VÀO QUY TRÌNH TINH CHẾ ĐỂ TĂNG ĐỘ SẠCH CỦA HUYẾT THANH KHÁNG ĐẠI

Nguyễn Phương Vũ\*, Dương Hữu Thái, Lâm Thị Huế, Trần Thế Định,  
Hoàng Thị Thuý Vân, Nguyễn Văn Được, Bùi Quang Vượng, Trần Ngọc Nhơn,  
Dương Khánh Minh, Phạm Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Lan Phương

Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 02 tháng 05 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 06 năm 2024

**Tóm tắt:** huyết thanh kháng đại được chỉ định cho các trường hợp bị động vật nghi đại căn ở mức độ III hoặc các trường hợp phơi nhiễm với vi rút đại. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá độ sạch của sản phẩm huyết thanh kháng đại tinh chế (SAR) của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC) sau khi được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion sử dụng gel Fractogel EMD-DEAE. Thực hiện trên 6 lô huyết thanh kháng đại được tinh chế theo quy trình hiện tại đến giai đoạn thẩm tích tiếp tục được sắc ký trao đổi anion trên gel Fractogel EMD-DEAE. Sản phẩm trước và sau sắc ký được đánh giá độ tinh sạch bằng SDS-PAGE và SE-HPLC. Hàm lượng protein, hiệu giá kháng thể, hàm lượng endotoxin của SAR trước và sau sắc ký để xác định độ sạch của sản phẩm và hiệu suất của quy trình sắc ký. Sản phẩm sau sắc ký chỉ có sự hiện diện protein có trọng lượng phân tử (TLPT) từ 100-135 KD tương đương với TLPT của mảnh kháng thể F(ab')<sub>2</sub> và tỷ lệ protein mục tiêu (F(ab')<sub>2</sub>) chiếm từ 97% - 99%. Quy trình sắc ký đã loại bỏ được trên 45% lượng protein tạp và đạt hiệu suất trên 78%. Như vậy sử dụng gel Fractogel EDM-DEAE trong quy trình sắc ký trao đổi anion tinh chế huyết thanh SAR đã tạo ra sản phẩm huyết thanh có độ tinh sạch cao hơn so với hiện hành.

*Từ khoá:* vi rút đại, huyết thanh kháng đại, tinh chế, sắc ký trao đổi anion.

## 1. Đặt vấn đề

Bệnh đại do vi rút đại gây nên là một bệnh viêm não tủy cấp tính với tỷ lệ tử vong gần như là 100% nếu như không sử dụng các liệu pháp dự phòng bằng tiêm vắc xin và huyết thanh kháng đại thích hợp (PEP) [1]. Ở Việt Nam bệnh đại vẫn là vấn đề y tế công cộng đáng quan ngại. Theo Cục Y tế dự phòng, trong vòng 3 năm trở lại đây, số người

chết vì bệnh đại trong khoảng từ 70-150 trường hợp mỗi năm, cùng với đó số người phải điều trị dự phòng bằng huyết thanh/vắc xin đại do bị động vật nghi đại căn hoặc do tiếp xúc với nguồn truyền bệnh đại tăng cao đáng kể [2].

Huyết thanh kháng đại tinh chế (SAR) được sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) có nguồn gốc từ ngựa được

tin chế bằng phương pháp kết tủa phân đoạn với amonisulfat và xử lý bằng pepsin (phương pháp Pope cải tiến) để thu sản phẩm chứa các mảnh kháng thể F(ab')<sub>2</sub> đặc hiệu. Phương pháp sản xuất này cho phép sản xuất huyết thanh kháng đại tinh chế ở quy mô lớn với chi phí vừa phải và độ sạch phù hợp với tiêu chuẩn hiện hành. Để tăng cường độ sạch của SAR góp phần làm giảm nguy cơ phản ứng phụ có thể xảy ra khi sử dụng protein dị loài, một quy trình sắc ký trao đổi ion đã được bổ sung vào quy trình tinh chế hiện hành [3]. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá độ sạch của sản phẩm huyết thanh kháng đại sau khi được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion sử dụng gel Fractogel EMD-DEAE của hãng Millipore, đồng thời đánh giá hiệu suất của quy trình tinh chế sắc ký ở quy mô thử nghiệm.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Huyết thanh kháng đại (SAR)

### 2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 10 năm 2019 đến tháng 12 năm 2023
- Địa điểm nghiên cứu: Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế

### 2.3. Vật liệu, hóa chất

#### 2.3.1. Thiết bị-dụng cụ:

- Máy ly tâm lạnh 2-8°C (Sanyo)

- Hệ thống lọc tiếp tuyến (TFF) (Satorius), màng lọc kích thước 30Kda
- Hệ thống máy sắc ký AKTA PILOT 400 (GE Healthcare)
- Hệ thống máy sắc ký lỏng cao áp HPLC và cột MabPac™ SEC-1 (Thermo)
- Hệ thống điện di SDS-PAGE (Thermo)
- Cột XK 50/30, BPG 100/500, BPG 140/500 (GE Healthcare).
- Gel Fractogel EMD-DEAE (Millipore)

#### 2.3.2. Động vật thí nghiệm

- Chuột nhắt trắng, giống ICR, 3-4 tuần tuổi (11-14g/ con) từ trại chăn nuôi Suối Dầu

#### 2.3.3. Hóa chất – sinh phẩm

- Amoni sulfate (Trung Quốc), Pepsin (Mecrk)
- Natri Hydroxyde (Merck), acid Clohydric (Mecrk), Acid Tricloroacetic (Mecrk)
- Acrylamide gel (Sigma)
- Bovine Serum Albumine –BSA (Sigma)
- Dung dịch đệm CH<sub>3</sub>COONa 20mM + NaCl 50mM, CH<sub>3</sub>COONa 20mM + NaCl 0,5M
- Dung dịch NaCl 0,85%,

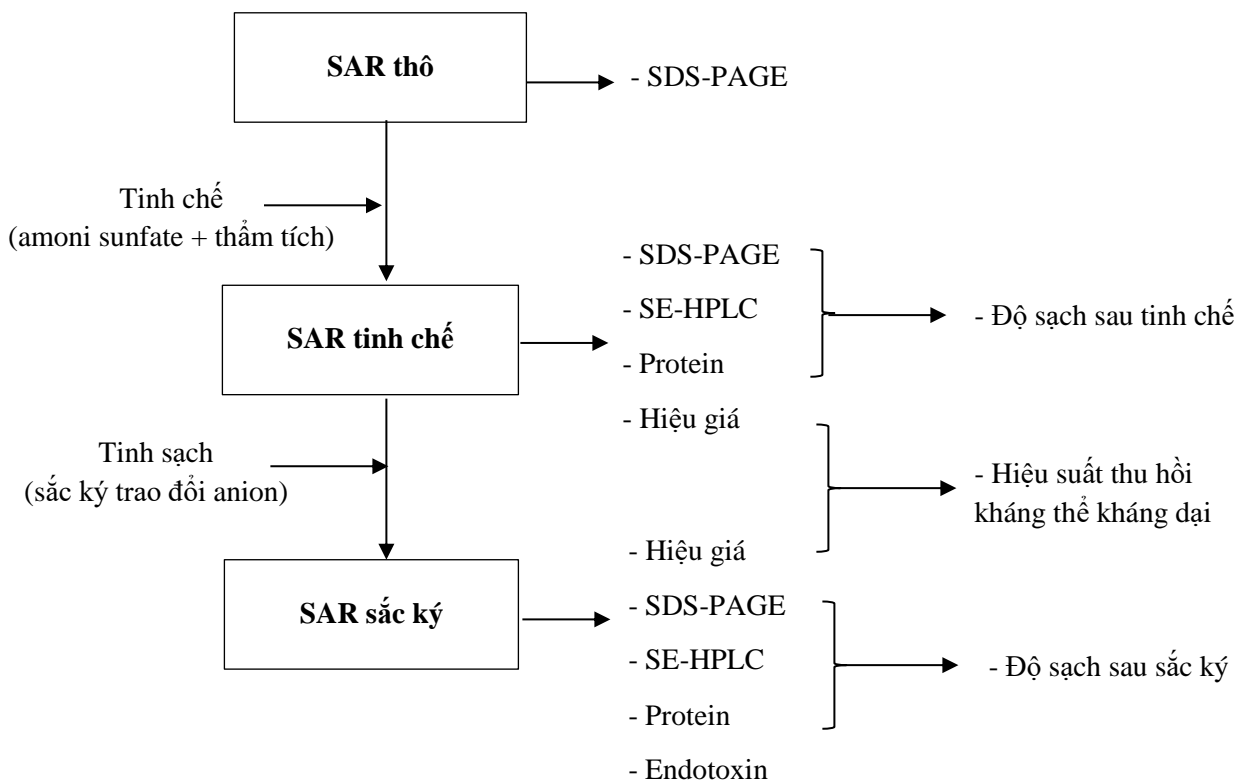
- The 2<sup>nd</sup> WHO International standard for Antirabies Immunglobulin (NIBSC)
- Thuốc thử Folin (Merck), thuốc nhuộm Brommothymol Blue 0,25% (Merck).
- Limulus Amebocyte Lysate (CapeCod), Endotoxin chuẩn (CapeCod)

**2.4. Thiết kế nghiên cứu**

06 lô huyết tương ngựa miễn dịch kháng dại (SAR thô) được tinh chế theo quy trình Pope cải tiến bao gồm các giai đoạn tiêu hóa với pepsin, tủa phân đoạn bằng amoni sulfate và thẩm tích để thu được 6 lô SAR tinh chế (03 lô quy mô nhỏ tương đương 1 lít/lô

và 3 lô quy mô trung bình tương đương 10 lít/lô). SAR tinh chế tiếp tục được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion qua hệ thống AKTA-PILOT sử dụng gel Fractogel® EDM-DEAE.

Sản phẩm SAR tinh chế trước và sau sắc ký sẽ được đánh giá các chỉ tiêu về mức độ tinh sạch thông qua phân tích trên SDS-PAGE và SE-HPLC. Độ sạch của sản phẩm sau sắc ký được đánh giá thông qua hàm lượng protein tổng số được loại bỏ sau sắc ký. Hiệu suất quy trình sắc ký được tính toán dựa trên hiệu giá kháng thể kháng dại trung hòa được thu hồi sau sắc ký. Sơ đồ quy trình nghiên cứu được thể hiện ở hình 1.



**Hình 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu**

## 2.5. Phương pháp nghiên cứu

### 2.5.1. Tinh chế huyết thanh kháng đại bằng kỹ thuật sắc ký trao đổi anion

*Giai đoạn tinh chế:* Huyết tương ngựa miễn dịch cao độ được tiêu hóa với pepsin, nồng độ 0,7% (w/v), sau đó được tủa phân đoạn với amonisulfate 14% và 16 %. Sản phẩm sau đó được thẩm tích qua hệ thống TFF để loại bỏ muối  $(SO_4)^{2-}$  và cô đặc để tạo sản phẩm huyết thanh tinh chế cô đặc (SAR tinh chế) [4].

*Giai đoạn sắc ký:* Sản phẩm SAR tinh chế sau thẩm tích được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion trên hệ thống AKTA-PILOT sử dụng gel Fractogel EMD-DEAE và phương pháp thu mẫu Flow-through. Tùy thuộc lượng mẫu cần tinh sạch sử dụng các cột XK 50/30 (quy mô nhỏ), BPG 100/500 hoặc BPG 140/500 (quy mô trung bình trở lên) với thể tích gel nhồi cột tương ứng 1 lít hay 3 lít. Cột được cân bằng với dung dịch đệm 20mM  $CH_3COONa$  + 50 mM NaCl. Mẫu được chạy trên hệ thống ở độ bám mẫu 100 mg/ml, tốc độ dòng 200 cm/h, độ dẫn điện trong khoảng 7 – 8 mS/cm và pH mẫu là 5,7. Thu mẫu khi xuất hiện peak mẫu với tín hiệu UV từ 100 mAU đến 2000 mAU ở bước sóng 280nm [5], [6].

### 2.5.2. Các phương pháp đánh giá huyết thanh tinh chế

### Phương pháp điện di SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate (SDS) làm protein chuyển đổi cấu trúc về bậc 1 và tạo điện tích âm tỷ lệ thuận theo khối lượng (mass-to-charge ratio) và dưới tác dụng của dòng điện protein di chuyển và được phân tách theo trọng lượng phân tử của nó. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tiêu chuẩn đánh giá: Các sản phẩm SAR tinh chế chỉ có sự hiện diện duy nhất của band protein mục tiêu là mảnh  $F(ab')_2$  có trọng lượng phân tử từ 100-135Kda trên SDS-PAGE.

### Phương pháp SE-HPLC (size exclusion chromatography) [7]

Dùng hệ thống SE-HPLC với cột sắc ký MAbPac SEC-1 (150mm x 2,1mm x 5 $\mu$ m). Pha động là dung dịch kali phosphat 0,05 M và natri clorua 0,3 M trong nước cất, pH 6,8, tốc độ dòng 0,5 ml/phút. Sau quá trình chạy sắc ký, protein trong huyết thanh tinh chế được phân tách tự động thành các peak trên phổ đồ.

Tiêu chuẩn đánh giá: Peak protein mục tiêu trên phổ đồ của sản phẩm SAR trước và sau sắc ký chiếm tỷ lệ tương ứng  $\geq 90\%$  và  $\geq 95\%$

### Phương pháp xác định hiệu giá huyết thanh kháng đại [8]

Kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh có khả năng trung hòa vi rút dại làm mất khả năng gây bệnh của vi rút. Các độ pha khác nhau của huyết thanh chuẩn và huyết thanh thử cùng được trung hòa với 1 liều vi rút dại cố định (chủng CVS có 150 LD<sub>50</sub>-300LD<sub>50</sub>). Sau khi thời gian ủ trung hòa hỗn hợp được tiêm vào não chuột nhắt (0,03ml/con). Chuột

*Phương pháp xác định hiệu suất tinh chế*

Hiệu suất tinh chế được xác định căn cứ vào lượng kháng thể kháng dại thu hồi, được tính toán dựa theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất kháng thể thu hồi} = \frac{\text{Hiệu giá kháng thể của mẫu sau sắc ký}}{\text{Hiệu giá kháng thể của mẫu trước sắc ký}} \times 100\%$$

Trong đó: Hiệu giá kháng thể trước và sau sắc ký = (thể tích mẫu trước và sau sắc ký) X (hiệu giá kháng thể có trong 1 ml mẫu tương ứng).

*Phương pháp Lowry xác định hàm lượng protein tổng số [8]*

Phương pháp được thực hiện dựa trên nguyên tắc so màu. Protein trong môi trường kiềm kết hợp với ion Cu<sup>+2</sup> tạo phức màu xanh protein-Cu<sup>+2</sup>. Đồng thời xảy ra phản ứng khử với phosphomolybdic acid, phosphotungstic acid trong thuốc thử folin tạo thành màu xanh bởi phức protein-Cu<sup>+2</sup> và các acid amin vòng thơm, đo quang ở bước sóng 750 nm. Các bước thực hiện theo Dược điển Việt Nam V, 2018, phụ lục 15-34 [8].

*Phương pháp đánh giá độ sạch của sản phẩm dựa trên hàm lượng protein tổng số*

Độ tinh sạch của sản phẩm được xác định dựa theo:

- (1) Tỷ số giữa hiệu giá kháng thể và hàm lượng protein tổng số tính trên 1ml. Tỷ số này càng cao thì độ sạch càng tốt
- (2) Tỷ lệ protein thu hồi và tỷ lệ protein loại bỏ sau khi sắc ký

$$\text{Tỷ lệ protein thu hồi} = \frac{\text{Tổng lượng protein của mẫu sau sắc ký}}{\text{Tổng lượng protein mẫu trước sắc ký}} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó: Tổng lượng protein trước và sau sắc ký = (thể tích mẫu trước và sau sắc ký) X (hàm lượng protein có trong 1 ml mẫu tương ứng).

$$\text{Tỷ lệ protein loại bỏ} = 100\% - \text{tỷ lệ protein thu hồi} \quad (2).$$

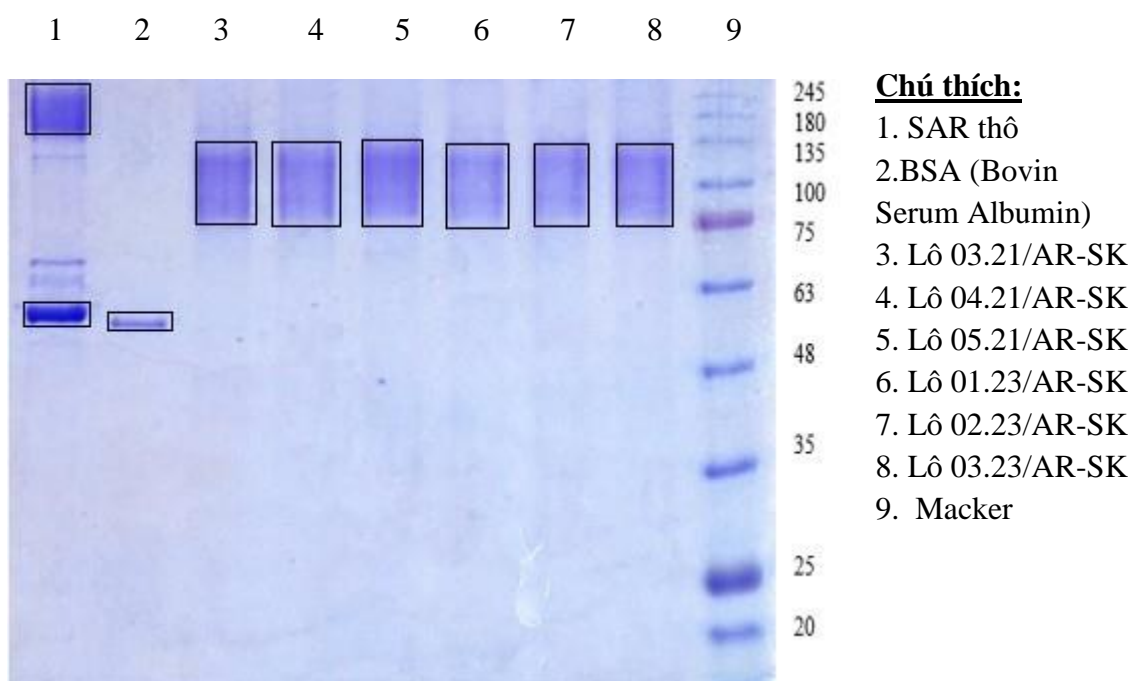
### Phương pháp xác định hàm lượng endotoxin

Thực hiện theo phương pháp Gel-Clot bao gồm trộn thuốc thử LAL với mẫu thử trên các giếng của phiến chuẩn độ. Sau thời gian ủ và nhuộm màu bằng thuốc nhuộm Brommothymol Blue 0,25% nếu có nội độc tố trong mẫu thử sẽ xảy ra phản ứng đông tụ của LAL có thể quan sát được sau khi nghiêng phiến. Các bước chuẩn độ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 3. Kết quả

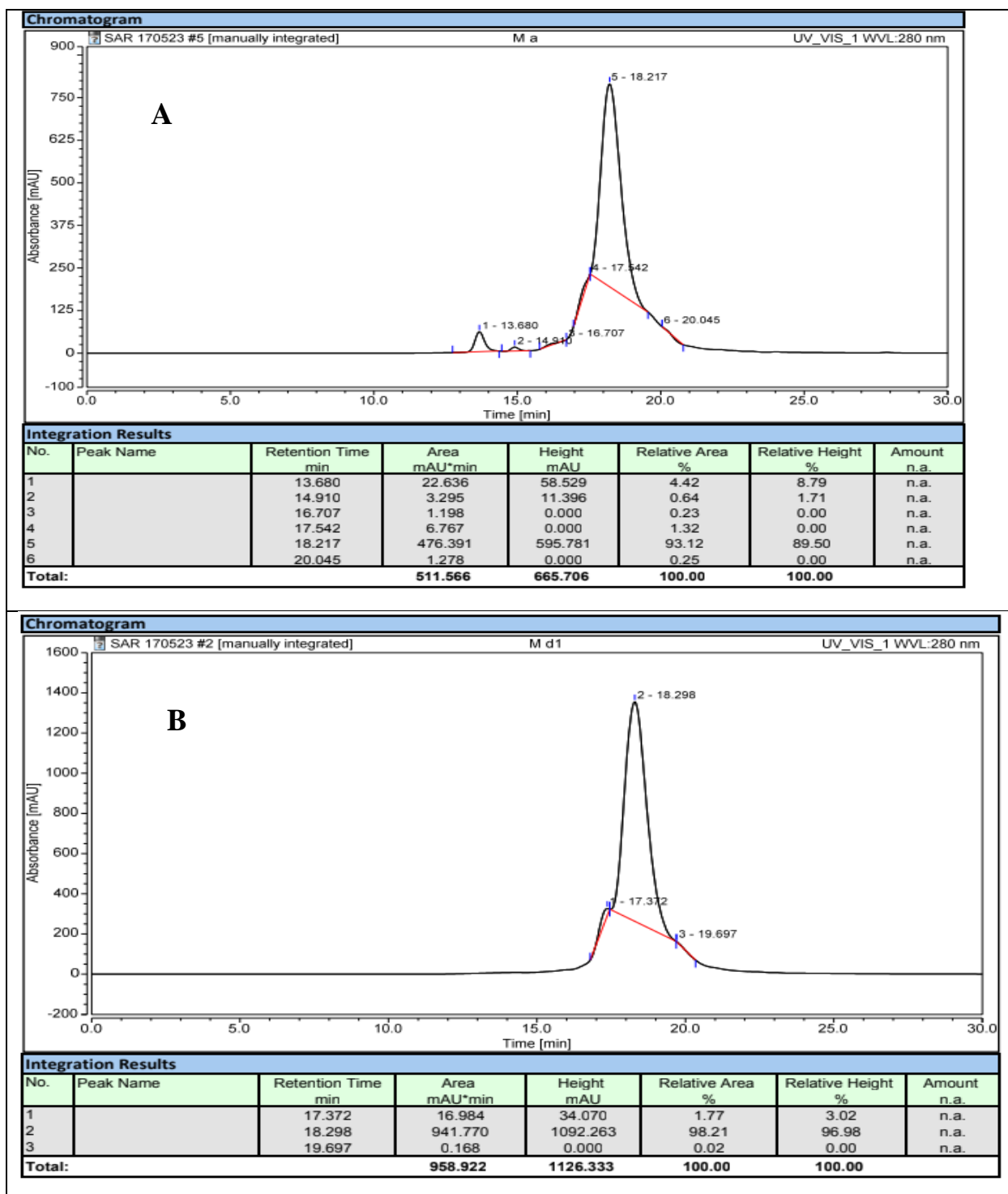
#### 3.1. Độ sạch của sản phẩm sau tinh sạch bằng sắc ký

Kết quả phân tích trên SDS-PAGE cho thấy sản phẩm sau sắc ký có trọng lượng phân tử đồng nhất nằm trong khoảng từ 100 - 135 Kda và đều không có band đại diện cho protein có trọng lượng phân tử thấp của albumin (Hình 2).



**Hình 2. Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE của huyết thanh SAR sau sắc ký**

Phân tích phổ đồ SE-HPLC cho biết mức độ tinh sạch của sản phẩm dựa trên thời gian lưu protein trên hạt gel và diện tích các peak (tính theo tỷ lệ phần trăm) được phân tách trong mẫu sau khi qua cột MAbPac SEC-1:



**Hình 3. Phổ đồ trên SE-HPLC của sản phẩm trước sắc ký (A) và sau sắc ký (B) của lô 01.23/AR-SK**

(A) Phổ đồ trước sắc ký có 6 peak với thời gian lưu 13,660 phút; 14,910 phút; 16,707 phút; 17,642 phút; 18,217 phút và 20,045 phút tương ứng với diện tích các peak lần lượt là: 4,42%; 0,64%, 0,23%; 1,32%; 93,12% và 0,25%.



(B) Phổ đồ sau sắc ký được phân tách thành 3 peak với thời gian lưu 17,375 phút; 18,298 phút và 19,697phút, tương ứng với diện tích các peak lần lượt là: 1,17%; 98,21% và 0,02%.

Trên phổ đồ SE-HPLC của lô 01.23/AR-SK trước sắc ký có 5 peak với diện tích peak protein mục tiêu chiếm tỷ lệ 93,12%. Sau sắc ký phổ đồ SE-HPLC chỉ ra có 3 peak trong đó diện tích peak protein mục tiêu chiếm 98,21%. Các phân tích tương tự đối với phổ đồ sản phẩm trước sau sắc ký của

các lô 03.21/AR-SK; 04.21/AR-SK; 05.21/AR-SK; 02.23/AR-SK và 03.23/AR-SK cho biết tỷ lệ protein tinh sạch của sản phẩm trước sắc ký trung bình đạt 93,11%. Đối với sản phẩm sau sắc ký, tỷ lệ protein tinh sạch tăng lên đạt từ 97,56% đến 99,12%, trung bình 98,23% (bảng 1).

**Bảng 1. Kết quả đánh giá độ sạch của sản phẩm trước và sau sắc ký**

TT	Lô	Độ sạch (IU/mg Protein)		Tỷ lệ protein tinh sạch trên phổ đồ (%)		Tỷ lệ protein thu hồi (%)	Tỷ lệ protein loại bỏ (%)
		Trước sắc ký	Sau sắc ký	Trước sắc ký	Sau sắc ký		
1	03.21/AR-SK	4,34	7,84	95,06	99,12	51,41	48,58
2	04.21/AR-SK	5,21	8,32	96,44	97,56	53,14	46,86
3	05.21/AR-SK	6,24	10,34	96,44	98,97	47,04	52,95
4	01.23/AR-SK	7,37	10,67	93,12	98,21	67,5	32,5
5	02.23/AR-SK	4,28	5,82	90,18	97,90	67,9	32,1
6	03.23/AR-SK	4,22	8,26	87,47	97,62	41,96	58,04
	<b>Trung bình</b>	<b>5,29</b>	<b>8,54</b>	<b>93,11</b>	<b>98,23</b>	<b>54,83</b>	<b>45,17</b>

Đánh giá tỷ lệ giữa hiệu giá kháng thể và protein cho thấy sản phẩm trước sắc ký trung bình 1 mg protein chỉ có 5,29 đơn vị kháng thể (IU), nhưng sau sắc ký tỷ lệ này đã tăng lên với 8,54 IU/mg protein. Tỷ lệ protein thu hồi sau sắc ký chiếm tỷ lệ trung bình

54,83% so với tổng lượng protein của sản phẩm ban đầu. Như vậy sau sắc ký tỷ lệ protein đã bị loại bỏ trung bình là 45,17%.

### 3.2. Đánh giá chất lượng và hiệu suất tinh chế của huyết thanh kháng đại sử dụng kỹ thuật sắc ký trên các quy mô thử nghiệm

**Bảng 2. Một số chỉ tiêu chất lượng chính của huyết thanh kháng đại sau sắc ký và hiệu suất của quy trình sắc ký trên 2 quy mô thử nghiệm**

Qui mô	Lô	Thể tích thu mẫu (Lít)	Hiệu giá (IU/ml)	Protein TS (mg/ml)	Endotoxin (EU/ml)	Hiệu suất (%)
Nhỏ (1-1,5 lít)	03.21/AR-SK	1,20	395,48	50,47	0,50	<b>92,95</b>
	04.21/AR-SK	1,35	386,47	46,44	1,00	<b>84,87</b>
	05.21/AR-SK	1,45	395,48	38,23	0,50	<b>78,05</b>
Trung bình (10 - 12 lít)	01.23/AR-SK	10,00	590,20	55,31	2,50	<b>80,00</b>
	02.23/AR-SK	10,00	395,50	67,89	2,50	<b>79,22</b>
	03.23/AR-SK	10,00	509,50	61,64	2,50	<b>82,12</b>

Các lô huyết thanh kháng đại tinh chế sau sắc ký có hiệu giá đạt từ 386 IU/ml – 590 IU/ml, hàm lượng protein đạt từ 38,23 mg/ml đến 67,89 mg/ml. Cả 2 chỉ tiêu hiệu giá và protein tổng số đều đạt yêu cầu so với tiêu chuẩn chất lượng cơ sở cho huyết thanh kháng đại tinh chế (tiêu chuẩn hiệu giá  $\geq 200$  IU/ml; protein tổng số  $\leq 150$  mg/ml). Sau sắc ký tất cả các lô huyết thanh tinh chế sau sắc ký đều có hàm lượng endotoxin thấp đạt từ 0,5-2,5 EU/ml.

Hiệu suất quy trình sắc ký được đánh giá bằng tỷ lệ phần trăm kháng thể đặc hiệu thu hồi sau quá trình sắc ký so với trước sắc ký. Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi kháng thể đạt từ 78,05% đến 92,95%, trung bình 82,86%.

#### 4. Bàn luận

Huyết thanh kháng đại SAR chứa các mảnh  $F(ab')_2$  đặc hiệu kháng đại của Immunglobulin ngựa nên sản phẩm có độ

tinh sạch càng cao thì nguy cơ phản ứng phụ do sử dụng protein dị loài càng giảm. Việc bổ sung thêm quy trình sắc ký trong quá trình tinh chế huyết thanh cho phép tiếp tục loại bỏ các protein không đặc hiệu và các chất tồn dư khác có thể chưa được loại hết bởi quá trình tinh chế phân đoạn với amonisufat. Trong nghiên cứu này, bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi anion theo kiểu dòng chảy (flow-through) lượng protein tổng số đã được loại bỏ chiếm 45% so với tinh chế bằng phương pháp Pope cải tiến đồng thời hiệu suất quy trình sắc ký đạt từ 78,05 đến 92,95%, trung bình là 82,86%. Ngoài ra kết quả phân tích trên SE-HPLC sản phẩm sau sắc ký cho thấy đã loại bỏ được một số peak protein tạp xuất hiện trước hoặc sau peak protein mục tiêu làm cho tỷ lệ diện tích peak protein mục tiêu cao hơn so với trước sắc ký ở tất cả các lô thử nghiệm (hình 3 và bảng 2). Điều này chứng tỏ lượng protein bị loại bỏ chiếm đa số là các

protein không đặc hiệu ở tất cả các lô huyết thanh kháng dại tinh chế được bổ sung thêm giai đoạn tinh sạch bằng sắc ký.

Gel Fractogel EDM DEAE (ligand Diethylaminoethyl cellulose) của hãng Millipore được lựa chọn do có giá thành thấp, dễ bảo quản nên có thể sử dụng với lớn cho các lô sản xuất quy mô thương mại. Đây là loại gel anion yếu phù hợp cho cả hai phương pháp sắc ký Binding-Elute và Flow-through. Mẫu trước sắc ký là huyết thanh đã được tinh chế bằng phương pháp Pope cải tiến (đến giai đoạn thẩm tích) nên có độ sạch tinh sạch khá cao (diện tích peak mẫu trung bình 93,11%) nên nghiên cứu chọn phương pháp sắc ký Flow-through, tức là protein mục tiêu tức là mảnh kháng thể  $F(ab')_2$  sẽ đi qua cột sắc ký trong khi đó tạp chất sẽ bám lại trên gel trong quá trình bám mẫu để rút ngắn thời gian sắc ký và giảm thể tích dung dịch đệm. Ngoài ra, pH mẫu được chọn là 5,7 thấp hơn điểm đẳng điện pI của kháng thể  $F(ab')_2$  (pI=5,85 – 7,75) để mẫu mang điện tích dương (cùng dấu điện tích dương của nhóm chức (ligand) trên bề mặt gel sắc ký) làm mẫu không bám vào gel mà đi ra khỏi cột. Các yếu tố này góp phần tối ưu giữa hiệu suất quy trình tinh chế và độ sạch của sản phẩm thu được sau sắc ký.

Những kết quả ban đầu của nghiên cứu là cơ sở để phát triển quy trình tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion cho huyết thanh

kháng dại tinh chế ở quy mô thương mại và định hình sản phẩm SAR tinh chế trong tương lai có tiêu chuẩn chất lượng cao trong đó ưu tiên độ sạch đạt  $\geq 8$  IU/mg protein, tỷ lệ kháng thể  $F(ab')_2 \geq 97\%$  và hàm lượng endotoxin  $\leq 2,5$  EU/ml.

## 5. Kết luận

Quy trình sắc ký trao đổi anion tinh chế huyết thanh kháng dại đã tạo ra sản phẩm huyết thanh có độ tinh sạch cao hơn so với huyết thanh SAR hiện nay.

Gel Fractogel EDM DEAE cho thấy phù hợp khi sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi anion – flowthrough trong tinh chế huyết thanh kháng dại để đạt độ sạch và hiệu suất thu hồi kháng thể cao.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Newsroom, 2021, Rabies, *World Health Organization*. (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>)
- [2] Hanoi, 2020, Rabies: Collaborate and Vaccinate to End rabies, *World Health Organization*. (<https://www.who.int/vietnam/news/detail/27-09-2020-rabies-collaborate-and-vaccinate-to-end-rabies>).
- [3] P.V. Shelke, Dr. Punit R. Rachh, 2019, Equine Rabies Immunoglobulin: A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*; 9(4-s):730-735.

[4] Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế, 2023, Quy trình tinh chế huyết thanh kháng đại (tài liệu lưu hành nội bộ).

[5] Dennis Jenke, 2011, Application of Ion chromatography in Pharmaceutical and Drug analysis, *Journal of chromatographic Science* 49 (7), pp. 524-539.

[6] GE Healthcare Life Sciences, 2000, *Size Exclusion Chromatography Principles and Method*, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden.

[7] CMC Biotech Working Group (2009), Product Development and Resalisation Case study A-Mab.

[8] Bộ Y tế, 2018, "*Dược điển Việt Nam V*", Nhà xuất bản Y học, Tập 2.