



(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)



1-0026639

(51)⁷ C07K 1/36; C07K 1/18; C07K 1/30

(13) B

(21) 1-2015-03153

(22) 07/05/2014

(86) PCT/KR2014/004003 07/05/2014

(87) WO 2015/016462 A1 05/02/2015

(30) 10-2013-0092024 02/08/2013 KR

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/01/2016 334A

(73) DAEWOONG CO., LTD. (KR)

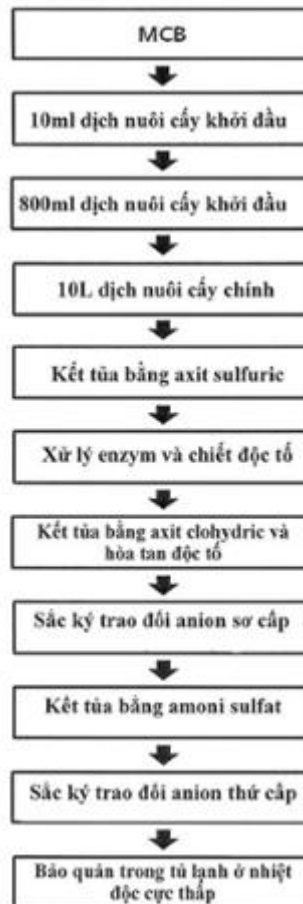
244, Galmachi-ro, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 462-807, Republic of Korea

(72) KIM, Chung Sei (KR); SONG, Kwan Young (KR); MIN, Kyoung Min (KR); AN, Yeong Duk (KR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ĐỘC TỔ BOTULINUM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất độc tố botulinum, và cụ thể hơn đến phương pháp điều chế độc tố botulinum, phương pháp bao gồm các bước: (a) xử lý mẻ nuôi cấy chủng sản xuất độc tố botulinum bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum; (b) bổ sung dung dịch đệm vào độc tố botulinum được kết tủa này, tiếp theo xử lý bằng chất ức chế proteaza và nucleaza, nhờ đó chiết độc tố botulinum; (c) xử lý độc tố botulinum chiết được bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và (d) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất độc tố botulinum, và cụ thể hơn đề cập đến phương pháp điều chế độc tố botulinum, phương pháp bao gồm các bước: (a) xử lý mẻ nuôi cấy chủng sản xuất độc tố botulinum bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum; (b) bổ sung dung dịch đệm vào độc tố botulinum được kết tủa này, tiếp theo xử lý bằng chất ức chế proteaza và nucleaza, nhờ đó chiết độc tố botulinum; (c) xử lý độc tố botulinum chiết được bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và (d) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều chủng *Clostridium* sp. khác nhau tiết các độc tố thần kinh đã được phát hiện kể từ những năm 1890, và việc mô tả đặc tính của các độc tố được tiết ra bởi các chủng này đã được thực hiện trong 70 năm qua (Schant, E. J. *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 56:80, 1992).

Các độc tố thần kinh có nguồn gốc từ các chủng *Clostridium* sp., tức là, độc tố botulinum, được phân thành bảy loại (typ A đến G) tùy thuộc vào đặc tính huyết thanh của chúng. Mỗi độc tố có protein độc tố có kích thước khoảng 150 kDa và tự nhiên chứa phức hợp của vài loại protein không độc. Phức trung bình (300 kDa) gồm có protein độc tố và protein không độc không phải ngưng kết tổ hồng cầu, và phức lớn (450 kDa) và phức rất lớn (900 kDa) gồm có phức trung bình gắn với ngưng kết tổ hồng cầu (Sugiyama, H., *Microbiol. Rev.*, 44: 419, 1980). Các protein ngưng kết tổ hồng cầu không độc này được biết là có chức năng bảo vệ độc tố này khỏi độ pH thấp và các proteaza khác nhau trong ruột.

Độc tố này được tổng hợp dưới dạng polypeptit đơn có khối lượng phân tử khoảng 150 kDa trong các tế bào, và sau đó được phân cắt ở vị trí 1/3 bắt đầu từ đầu tận cùng N

nhờ hoạt động của proteaza nội bào hoặc bằng cách xử lý bằng enzym nhân tạo như trypsin thành hai đơn vị: chuỗi nhẹ (L; khối lượng phân tử: 50 kDa) và chuỗi nặng (H; khối lượng phân tử: 100 kDa). Độc tố được phân cắt này có độc tính tăng mạnh so với polypeptit đơn. Hai đơn vị này được nối với nhau qua cầu nối disulfua và có các chức năng khác nhau. Chuỗi nặng gắn vào thụ thể của tế bào đích (Park. M.K., *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 72:243, 1990) và hoạt động để tương tác với màng sinh học ở độ pH thấp (pH 4) để tạo ra kênh (Mantecuccio, C. *et al.*, *TIBS.*, 18:324, 1993), và chuỗi nhẹ có hoạt tính được lý, và do đó mang lại khả năng thâm vào tế bào nhờ sử dụng chất tẩy hoặc cản trở sự tiết chất dẫn truyền thần kinh khi được đưa vào tế bào bằng cách, ví dụ, biến nạp bằng xung điện (Poulain, B. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:4090, 1988).

Độc tố này ức chế quá trình xuất bào của axetylcholin ở trước xynap cholinergic của điểm nối thần kinh cơ gây suy nhược. Đã thấy rằng việc xử lý bằng lượng rất nhỏ độc tố này thể hiện độc tính, đề xuất rằng độc tố này có hoạt tính enzym bất kỳ (Simpson, L. *et al.*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26:427, 1986).

Theo một báo cáo gần đây, độc tố này có hoạt tính metalopeptidaza, và cơ chất của nó gồm có synaptobrevin, syntaxin, protein liên kết với synaptosom kích thước 25 KDa (SNAP25) hoặc các cơ chất tương tự, là các protein đơn vị của bộ máy phức hợp xuất bào. Mỗi loại độc tố sử dụng một trong ba loại protein nêu trên làm cơ chất của nó, và biết rằng độc tố typ B, D, F và G phân cắt synaptobrevin ở vị trí đặc hiệu, độc tố typ A và E phân cắt SNAP25 ở vị trí đặc hiệu, và typ C phân cắt syntaxin ở vị trí đặc hiệu (Binz, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:9153, 1994).

Cụ thể là, độc tố botulinum typ A được biết là tan được trong dung dịch nước loãng ở pH 4,0 đến 6,8. Được biết rằng protein không độc ổn định được tách ra từ độc tố thần kinh ở độ pH 7 hoặc cao hơn, và kết quả là, làm mất dần độc tính. Cụ thể là, biết rằng độc tính giảm khi pH và nhiệt độ tăng.

Độc tố botulinum gây chết đối với cơ thể người ngay cả với lượng nhỏ và dễ sản xuất với lượng lớn. Do đó, nó là một trong bốn loại vũ khí khủng bố sinh học nguy hiểm

cùng với *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* và virut đậu mùa. Tuy nhiên, đã phát hiện ra rằng, khi độc tố botulinum typ A được tiêm ở liều mà không ảnh hưởng đến toàn bộ cơ thể người, nó có thể làm tê liệt cơ cục bộ ở vị trí tiêm. Dựa trên đặc tính này, độc tố botulinum typ A có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng rộng rãi, bao gồm tác nhân loại bỏ nếp nhăn, tác nhân điều trị liệt nửa người và bại não, v.v.. Do đó, nhu cầu về độc tố botulinum typ A tăng lên, và các nghiên cứu về phương pháp sản xuất độc tố botulinum để đáp ứng nhu cầu này cũng đã được tích cực thực hiện.

Một sản phẩm được bán phổ biến trên thị trường hiện nay là BOTOX[®] (phức độc tố thần kinh tinh chế của độc tố botulinum typ A) được bán trên thị trường bởi hãng Allergan, Inc., Mỹ. Lọ 100-đơn vị BOTOX[®] gồm có 5 ng phức độc tố thần kinh tinh chế của độc tố botulinum typ A, 0,5 mg albumin huyết thanh người và 0,9 mg natri clorua và được hoàn nguyên nhờ sử dụng nước muối vô trùng mà không cần chất bảo quản (tiêm 0,9% natri clorua). Các sản phẩm thương mại khác bao gồm Dysport[®] (phức độc tố botulinum typ A của *Clostridium* và ngưng kết tố hồng cầu, mà có lactoza và albumin huyết thanh người trong dược phẩm chứa độc tố botulinum và được hoàn nguyên nhờ sử dụng 0,9% natri clorua trước khi dùng) mà có bán trên thị trường bởi hãng Ipsen Ltd., UK, MyoBloc[™] (dung dịch tiêm được (pH khoảng 5,6) chứa độc tố botulinum typ B, albumin huyết thanh người, natri succinat và natri clorua) mà có bán trên thị trường bởi hãng Solstice Neurosciences, Inc. Các phương pháp thông thường sử dụng để sản xuất độc tố botulinum bao gồm phương pháp kết tủa bằng axit, phương pháp kết tủa bằng muối, và phương pháp sắc ký.

Ví dụ, Công bố đơn đăng ký sáng chế Nhật số 1994-192296 bộc lộ phương pháp sản xuất độc tố botulinum typ A tinh thể bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Clostridium botulinum*, theo sau là kết tủa bằng axit, chiết, bổ sung nucleaza, và kết tinh. Hơn nữa, Patent Mỹ số 5696077 bộc lộ phương pháp sản xuất độc tố botulinum typ B tinh thể bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Clostridium botulinum*, theo sau là kết tủa bằng axit, chiết, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lọc gel, và kết tinh.

Simpson et al. sản xuất độc tố botulinum typ A bằng cách tinh chế độc tố thần kinh botulinum bằng sắc ký dòng trọng lực, theo sau là HPLC, bắt giữ nhờ sử dụng nhựa ái lực, sắc ký rây phân tử, và sắc ký trao đổi ion (anion và cation) bao gồm việc sử dụng hai cột trao đổi ion khác nhau (*Method in Enzymology*, 165:76, 1988), và Wang et al. sử dụng phép tinh chế và sắc ký ion để tinh chế độc tố botulinum typ A (*Dermatol Las Faci Cosm Surg.*, 2002:58, 2002).

Hơn nữa, Patent Mỹ số 6818409 bộc lộ việc sử dụng sự trao đổi ion và cột lactoza để tinh chế độc tố botulinum, và Patent Mỹ số 7452697 bộc lộ độc tố botulinum typ A bằng sắc ký trao đổi ion và sắc ký kỵ nước. Công bố đơn đăng ký sáng chế Hàn Quốc số 2009-0091501 bộc lộ phương pháp tinh chế độc tố botulinum bằng cách kết tủa bằng axit và sắc ký trao đổi anion, và công bố đơn Mỹ số 2013-0156756 bộc lộ phương pháp tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion và sắc ký trao đổi cation.

Tuy nhiên, các phương pháp theo các sáng chế nêu trên có hạn chế ở chỗ việc sử dụng sắc ký trao đổi anion ảnh hưởng bất lợi đến kiểu tách dải trên gel của độc tố botulinum (Patent Mỹ số 7452697) và ở chỗ các phương pháp thông thường này khó áp dụng thương mại, do thời gian tinh chế dài. Ngoài ra, do *Clostridium botulinum* là chủng sản xuất độc tố botulinum là vi khuẩn yếm khí, có vấn đề ở chỗ việc lên men vi khuẩn này cần được thực hiện trong hệ yếm khí, và do đó khó sản xuất độc tố botulinum với lượng lớn. Ngoài ra, có vấn đề ở chỗ thành phần hoạt tính độc tố botulinum tinh chế bằng phương pháp tinh chế nêu trên không được tách và nhận dạng một cách rõ ràng, và do đó chứa tạp chất. Ngoài ra, các phương pháp thông thường để sản xuất độc tố botulinum có vấn đề ở chỗ cần phải thực hiện quá trình lọc hoặc thẩm tách để tinh chế độc tố botulinum có độ tinh khiết cao, đề xuất rằng quy trình tinh chế là phức tạp và khó khăn.

Do đó, các tác giả sáng chế đã có các nỗ lực rất nhiều để giải quyết vấn đề nêu trên xảy ra trong tình trạng kỹ thuật đã biết, và kết quả là, đã phát hiện ra rằng nếu mẽ nuôi cấy chủng sản xuất độc tố botulinum được xử lý bằng axit để tạo ra chất kết tủa độc tố botulinum và kết tủa tạo ra được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion, các bước lọc, thẩm

tách và kết tủa etanol có thể được bỏ qua, và quá trình sản xuất độc tố botulinum là rất dễ, và độc tố botulinum có độ tinh khiết 98% hoặc cao hơn có thể được sản xuất bởi phương pháp sản xuất này, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất độc tố botulinum có độ tinh khiết cao bằng quy trình đơn giản.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất độc tố botulinum, phương pháp bao gồm các bước: (a) xử lý mẻ nuôi cấy chủng sản xuất độc tố botulinum bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum; (b) bổ sung dung dịch đệm vào độc tố botulinum được kết tủa này, tiếp theo xử lý bằng chất ức chế proteaza và nucleaza, nhờ đó chiết độc tố botulinum; (c) xử lý độc tố botulinum chiết được bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và (d) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là sơ đồ thể hiện quy trình sản xuất độc tố botulinum theo sáng chế.

FIG.2 thể hiện các kết quả đo độ tinh khiết của độc tố botulinum sau khi thực hiện tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion sơ cấp.

FIG.3 thể hiện các kết quả đo độ tinh khiết của độc tố botulinum sau khi thực hiện tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion thứ cấp.

FIG.4 thể hiện các kết quả đo sự tăng hoặc giảm in compound muscle action potential amplitude do việc xử lý bằng độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế và BOTOX® (Allergan). N: không tiêm; S: tiêm nước muối; B2: BTX-A-1, hai đơn vị; D2: BTX-A-2, hai đơn vị; B4: BTX-A-1, bốn đơn vị; D4: BTX-A-2, bốn đơn vị; B8: BTX-A-1, tám đơn vị; và D8: BTX-A-2, tám đơn vị.

FIG.5 thể hiện các kết quả đo tốc độ dẫn điện do việc xử lý bằng độc tố botulinum

tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế và BOTOX[®] (Allergan) gây ra. N: không tiêm; S: tiêm nước muối; B2: BTX-A-1, hai đơn vị; D2: BTX-A-2, hai đơn vị; B4: BTX-A-1, bốn đơn vị; D4: BTX-A-2, bốn đơn vị; B8: BTX-A-1, tám đơn vị; và D8: BTX-A-2, tám đơn vị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như được hiểu thông dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan. Nhìn chung, danh pháp được sử dụng ở đây và các phương pháp thử nghiệm là được biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất độc tố botulinum, phương pháp bao gồm các bước: (a) xử lý mẻ nuôi cấy chủng sản xuất độc tố botulinum bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum; (b) bổ sung dung dịch đệm vào độc tố botulinum được kết tủa này, tiếp theo xử lý bằng chất ức chế proteaza và nucleaza, nhờ đó chiết độc tố botulinum; (c) xử lý độc tố botulinum chiết được bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và (d) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion (FIG.1).

Độc tố botulinum thu được tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế có thể được bảo quản bởi các phương pháp khác nhau, bao gồm trữ đông và trữ đông khô.

Phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm, sau bước (d), các bước: (e) xử lý sắc ký trao đổi anion phân đoạn chứa độc tố botulinum bằng amoni sulfat để tạo ra kết tủa, và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và (f) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion.

Theo sáng chế, tốt hơn là chủng sản xuất độc tố botulinum là *Clostridium botulinum*, nhưng không chỉ giới hạn ở đó, và sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là chủng bất kỳ có khả năng sản xuất độc tố botulinum có

thể được sử dụng theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “độc tố botulinum” nghĩa là bao gồm không chỉ độc tố thần kinh được sản xuất bởi chủng *Clostridium botulinum*, mà còn các độc tố botulinum biến tính, tái tổ hợp, lai và khảm. Độc tố botulinum tái tổ hợp có thể có chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng được sản xuất bởi loài không phải *Clostridium* theo cách tái tổ hợp. Ngoài ra, thuật ngữ “độc tố botulinum” như được sử dụng ở đây nghĩa là bao gồm độc tố botulinum typ huyết thanh A, B, C, D, E, F và G, phức độc tố botulinum (ví dụ, các phức 300, 600 và 900 kDa), và độc tố botulinum tinh khiết (ví dụ, phân tử độc tố thần kinh 150 kDa), tất cả đều được sử dụng trong thực hiện sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “độc tố botulinum sản xuất được” nghĩa là độc tố botulinum tinh khiết hoặc phức độc tố botulinum, mà được tách hoặc gần như được tách từ các protein hoặc tạp chất khác có thể đi kèm độc tố botulinum khi độc tố botulinum được thu gom từ quy trình nuôi cấy hoặc lên men. Do đó, độc tố botulinum sản xuất được có độ tinh khiết là ít nhất 90%, tốt hơn là ít nhất 95%, và tốt nhất là ít nhất 98%. Cụ thể là, độc tố botulinum sản xuất được theo sáng chế có thể là protein độc tố botulinum typ A có độ tinh khiết ít nhất 98%.

Việc nuôi cấy chủng *Clostridium botulinum* để sản xuất độc tố botulinum có thể được thực hiện nhờ sử dụng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này và môi trường thông thường có thể được sử dụng để nuôi cấy.

Theo ví dụ không giới hạn, môi trường để nuôi cấy chủng *Clostridium botulinum* có thể bao gồm chất thủy phân casein, cao nấm men, glucoza và các chất tương tự, và việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ 25 đến 40°C trong thời gian 90-180 giờ, và tốt hơn là 100-150 giờ.

Sự kết tủa axit ở bước (a) có thể được thực hiện bằng cách bổ sung axit, tốt hơn là axit sulfuric hoặc axit clohydric, vào mẻ nuôi cấy chủng này, sao cho mẻ nuôi cấy này đạt pH 3,0-4,5, tốt hơn là 3,3-4,0, và tốt nhất là 3,4-3,6, như đo được bởi bộ cảm biến pH.

Sự kết tủa axit ở bước (a) được dựa trên nguyên tắc trong đó việc bổ sung axit vào

mẻ nuôi cấy chứa nhiều loại protein làm giảm pH của mẻ nuôi cấy này trong khi tiêu diệt vi khuẩn sinh botulinum còn lại sau khi nuôi cấy sao cho các protein này đạt điểm đẳng điện để làm kết tủa. Nó bao gồm việc kết tinh theo nghĩa rộng, và phương pháp kết tủa là phương pháp tách thô vật chất mong muốn trong trạng thái hòa trộn, không giống như kết tinh tập trung vào việc tinh chế chất mong muốn với độ tinh khiết cao. Trong phương pháp kết tủa, tạp chất có cấu trúc tương tự như chất mong muốn cũng được kết tủa. Trong đó, độ pH được điều chỉnh đến khoảng 3,0-4,5. Tốc độ thu hồi độc tố botulinum tăng khi độ pH giảm. Nếu độ pH là 3,0 hoặc thấp hơn, nó sẽ ảnh hưởng đến chính độc tố botulinum, và nếu độ pH là 4,5 hoặc cao hơn, tốc độ thu hồi độc tố botulinum sẽ giảm. Vì các lý do này, tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng xác định nêu trên.

Cụ thể là, tốt nhất là độ pH là 3,4-3,6, vì tốc độ thu hồi độc tố botulinum là cao nhất ở khoảng pH này. Khi độ pH của môi trường nuôi cấy chủng botulinum đạt khoảng thích hợp sau khi bổ sung axit, axit này được bổ sung vào mẻ nuôi cấy này cho đến khi không xảy ra sự thay đổi độ pH, và sau đó mẻ nuôi cấy được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15-30 giờ, theo sau là loại bỏ phần dịch nổi.

Bước (b) chiết độc tố botulinum bao gồm bước hòa tan độc tố thu được từ bước (a) trong dung dịch đệm phosphat, tốt hơn là dung dịch đệm natri phosphat, và loại bỏ chất kết tủa này. Ở đây, tốt hơn là độ pH của dung dịch đệm phosphat nằm trong khoảng 4,0 đến 7,0. pH thu được có thể được điều chỉnh đến 4,5-6,5, tốt hơn là 5,0-6,0, bằng cách bổ sung bazơ, tốt hơn là natri hydroxit, và việc chiết độc tố này có thể được thực hiện trong khoảng pH xác định ở trên.

Ngoài ra, nucleaza mà được sử dụng trong bước (b) có thể là DNaza và RNaza, và tốt hơn là chất ức chế proteaza mà được sử dụng trong bước (b) là benzamidin HCl, nhưng không chỉ giới hạn ở đó, và vật liệu bất kỳ có khả năng ức chế hoạt tính proteaza, được biết trong lĩnh vực này, có thể được sử dụng theo sáng chế. Bằng cách xử lý bằng nucleaza trong bước (b) chiết độc tố botulinum, tạp chất như ADN và ARN chứa trong chất kết tủa tạo ra bởi axit trong bước (a) có thể phân hủy. Nếu bước xử lý bằng enzym

được tiến hành trong thời gian 1,5 giờ hoặc ngắn hơn, sự phân hủy ADN và ARN có thể không đủ. Vì lý do này, bước xử lý bằng enzym được tiến hành trong thời gian 1,5-7 giờ, tốt hơn là 3-6 giờ, và tốt hơn là DNaza và RNaza được bổ sung vào ở nồng độ 0,05-1,0 g/L, tốt hơn là 0,1-0,5 g/L.

Vì phần chiết thu được bằng phép xử lý enzym chứa độc tố botulinum và protein có độ phân cực tương tự với độ phân cực của độc tố botulinum, bước kết tủa protein này bằng axit clohydric cần được thực hiện. Cụ thể là, tốt hơn là bước (c) kết tủa bằng axit clohydric được thực hiện bằng ly tâm phần chiết được xử lý enzym, điều chỉnh độ pH của phần nổi đến pH 2,5 đến 4,5, tốt hơn là 3,0 đến 4,0, bằng cách bổ sung axit clohydric (HCl), và sau đó kết tủa protein trong phần nổi bằng axit clohydric trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Cụ thể là, tốt hơn là độ pH trong bước kết tủa bằng axit clohydric được điều chỉnh đến 3,3-3,8 nhằm duy trì hoạt tính và tốc độ thu hồi độc tố này ở mức cao. Nếu bước kết tủa bằng axit clohydric được tiến hành trong khoảng pH nêu trên, độ chuẩn của độc tố botulinum sẽ cao khoảng 90% hoặc hơn, và sự đông tụ protein sẽ giảm đáng kể. Tiếp theo, chất kết tủa này bằng axit clohydric có thể được hòa tan trong dung dịch đệm, và bước tiếp theo có thể được thực hiện.

Bước (d) là bước quan trọng nhất được thực hiện bằng phép sắc ký nhờ sử dụng nhựa trao đổi anion sau khi hoàn thành bước kết tủa bằng axit clohydric nhằm loại bỏ phần lớn tạp chất không phải độc tố botulinum typ A. Nhựa trao đổi anion mà được sử dụng trong bước (d) có thể là nhựa được thể bằng nhóm diethylaminoethyl (DEAE) hoặc amoni bậc bốn (Q), nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Ví dụ, nhựa trao đổi anion có thể là DEAE-Sephadex như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,696,077, công bố đơn quốc tế số WO96/05222 và Patent Mỹ số 5,846,929. Tốt hơn là, nó là loại bất kỳ trong số các loại nhựa trao đổi anion có nhóm amoni bậc bốn có tính bazơ mạnh hoặc nhóm diethylaminoethyl (DEAE) có tính bazơ yếu.

Ví dụ về nhóm trao đổi anion có tính bazơ mạnh mà có thể được sử dụng theo sáng chế có thể bao gồm Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose High Performance,

Resource Q, Source 15Q, Source 30Q, Mono Q, Mini Q, Capto Q, Capto Q ImpRes, Q HyperCel, Q Cermic HyperD F, Nuvia Q, UNOsphere Q, Macro-Prep High Q, Macro-Prep 25 Q, Fractogel EMD TMAE(S), Fractogel EMD TMAE Hicap (M), Fractogel EMD TMAE (M), Eshmono Q, Toyopearl QAE-550C, Toyopearl SuperQ-650C, Toyopearl GigaCap Q-650M, Toyopearl Q-600C AR, Toyopearl SuperQ-650M, Toyopearl SuperQ-650S, TSKgel SuperQ-5PW (30), TSKgel SuperQ-5PW (20), hoặc TSKgel SuperQ-5PW, nhưng không chỉ giới hạn ở đó và các loại nhựa trao đổi anion được biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Dung dịch đệm cột mà được sử dụng trong bước (d) có thể là dung dịch đệm natri phosphat hoặc dung dịch đệm xitrat. Tốt hơn là sử dụng dung dịch đệm natri phosphat. Nồng độ của dung dịch đệm cột được điều chỉnh đến 30-70 mM, tốt hơn là khoảng 40-60 mM. Độ pH của cột được điều chỉnh đến 3,5-7,5, và tốc độ dòng của mobile phase được điều chỉnh đến 0,5-5,0 mL/phút, tốt hơn là 1,0-3,0 mL/phút. Hơn nữa, độ dẫn điện của dung dịch đệm được điều chỉnh đến 3-30 mS/cm, và mẫu được bơm sau khi hoàn thành việc cân bằng cột. Độc tố này được rửa giải dưới dạng chảy qua, và phần lớn tạp chất được hấp thụ. Cụ thể là, trong bước (d) tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion, độc tố botulinum typ A không được hấp thụ lên nhựa trao đổi anion, và phần lớn tạp chất được loại bỏ bằng cách hấp thụ.

Theo sáng chế, tốt hơn là phép sắc ký trao đổi anion trong bước (d) được thực hiện ở pH 3,5-7,5, tốt hơn là 4,5-7,0, và độ dẫn điện là 3-30 mS/cm, tốt hơn là 5-20 mS/cm.

Để loại bỏ hoàn toàn tạp chất còn lại sau sắc ký trao đổi anion của bước (d), phương pháp sản xuất độc tố botulinum theo sáng chế có thể, nếu cần, còn bao gồm các bước: (e) xử lý phép sắc ký trao đổi anion phân đoạn chứa độc tố botulinum bằng amoni sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ để tạo ra kết tủa, và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và (f) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion thứ cấp.

Trong bước (e), phép sắc ký trao đổi anion phân đoạn chứa độc tố botulinum được xử lý bằng amoni sulfat để tạo ra kết tủa, và kết tủa tạo ra được hòa tan trong dung dịch

đệm. Bước kết tủa bằng amoni sulfat tương đương với quá trình xử lý bằng muối trong đó muối (amoni sulfat, v.v.) mà hòa tan dễ dàng trong nước được bổ sung vào hỗn hợp protein để làm tăng cường độ ion nhờ đó tạo ra kết tủa protein. Nếu các protein kết tủa mong muốn chủ yếu là do sự bão hòa bằng 30% (khối lượng/thể tích) amoni sulfat, protein mong muốn này có thể được kết tủa bằng cách kết tủa protein không phải protein mong muốn ở nồng độ bão hòa amoni sulfat là 30% (khối lượng/thể tích) hoặc thấp hơn, và sau đó bổ sung amoni sulfat vào nồng độ bão hòa 30% (khối lượng/thể tích) và có thể được thu nhận bằng cách ly tâm. Công đoạn xử lý bằng muối thường được sử dụng dưới dạng phương tiện ban đầu. Dung dịch amoni sulfat mà được sử dụng trong bước (e) có thể có nồng độ amoni sulfat là 10-50% (khối lượng/thể tích), tốt hơn là 20-40% (khối lượng/thể tích).

Tiếp theo, trong bước (f), độc tố botulinum có thể được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion. Việc tinh chế độc tố botulinum có độ tinh khiết cao theo sáng chế phần lớn được thực hiện bằng sắc ký trao đổi anion (sắc ký trao đổi anion sơ cấp) ở bước (d), và sắc ký trao đổi anion (sắc ký trao đổi anion thứ cấp) trong bước (f) được thực hiện nhằm loại bỏ tạp chất còn lại và có thể được thực hiện theo cách giống như phép sắc ký trao đổi anion ở bước (d).

Phần đoạn thu được chứa chứa protein botulinum typ A, thu được bằng phương pháp tinh chế nêu trên, có thể được vô trùng và lọc để tạo ra chất lỏng thô. Chất lỏng thô được tạo ra này có thể được đông lạnh và bảo quản đến khi sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế. Độ tinh khiết của độc tố botulinum tinh chế bằng HPLC được phân tích, và kết quả là, có thể thấy rằng độ tinh khiết của độc tố botulinum sau khi sắc ký trao đổi anion sơ cấp là 98,38% (FIG.2), cao hơn độ tinh khiết (khoảng 95%) của BOTOX[®] có bán trên thị trường bởi hãng Allergan Inc., đề xuất rằng hầu hết tạp chất được loại bỏ trong bước sắc ký trao đổi anion sơ cấp. Ngoài ra, nó cũng cho thấy rằng độ tinh khiết của độc tố botulinum sau khi sắc ký trao đổi anion thứ cấp là 98,99% (FIG.3).

Hơn nữa, phương pháp sản xuất độc tố botulinum theo sáng chế có thuận lợi ở chỗ các bước lọc, thẩm tách và kết tủa etanol có thể được bỏ qua, và do đó quá trình sản xuất độc tố botulinum dễ dàng và đơn giản. Cụ thể là, phương pháp theo sáng chế có thuận lợi ở chỗ các bước lọc và kết tủa trong phương pháp sản xuất BOTOX® của hãng Allergan Inc. (US Patent Publication No. 2012-0156756; Non-APF method) có thể được bỏ qua, và do đó có thể giảm số lượng các bước tinh chế (từ năm bước còn ba bước) để làm giảm thời gian sản xuất chất lỏng thô chứa độc tố botulinum (từ 4 tuần còn 2 tuần).

Theo một ví dụ khác của sáng chế, thử nghiệm để so sánh với độ an toàn của BOTOX® (Allergan, Inc.) được thực hiện nhằm khẳng định độ an toàn của protein độc tố botulinum typ A (DWP450) tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế. Kết quả là, nó cho thấy rằng độc tố botulinum (DWP450) tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế thể hiện trị số NOAEL là 60 U/kg đối với phụ nữ, đề xuất rằng nó an toàn hơn gấp hai lần so với BOTOX® (Allergan, Inc.) thể hiện trị số NOAEL là 30 U/kg. Độ an toàn gấp hai lần của độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế được cho là do độc tố botulinum theo sáng chế có độ tinh khiết cao, và do đó làm tăng khả năng tác dụng ở vùng khu trú sao cho sự lưu thông trong cơ thể của độc tố botulinum, mà có thể dẫn đến các tác dụng phụ, được làm giảm.

Độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế được sử dụng làm thành phần hoạt tính trong dược phẩm. Độc tố botulinum có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn thần kinh cơ đặc trưng bởi các cơ xương hoạt động quá mức. Ngoài ra, nó có thể được sử dụng cho các tình trạng bệnh lý khác nhau, bao gồm đau đầu, đau đầu thông, đau căng đầu, đau đầu xoang, đau đầu do bệnh lý cột sống, rối loạn mồ hôi, chứng tăng tiết mồ hôi nách, tăng tiết mồ hôi bàn tay, tăng tiết mồ hôi bàn chân, hội chứng Frey, vết nhăn sọc nóng ở da, nếp nhăn ở mắt, vết nhăn ở hai đầu lông mày, vết chân chim, nếp nhăn quanh miệng, nếp nhăn hai bên mũi, rối loạn da, co thắt tâm vị, lác mắt, nứt kẽ hậu môn mạn tính, bệnh co quắp mi mắt, đau cơ xương, bệnh đau nhức toàn thân, viêm tụy, nhịp tim nhanh, phì đại tuyến tiền liệt, viêm tiền liệt tuyến, bệnh bí tiểu, bệnh són tiểu,

bàng quang hoạt động quá độ, co giật nửa mặt, bệnh run, bệnh động kinh, rối loạn dạ dày ruột, đái tháo đường, chứng tăng tiết nước bọt, bệnh rối loạn chức năng phối hợp các cơ co thắt bàng quang, liệt cứng sau đột quy, làm lành vết thương, bại não ở trẻ vị thành niên, co thắt cơ trơn, tái tái hẹp, rối loạn trương lực cơ khu trú, chứng động kinh, rối loạn trương lực cơ cổ, rối loạn tuyến giáp, chứng tăng canxi huyết, rối loạn ám ảnh cưỡng bức, chứng đau khớp, hội chứng Raynaud, vết rạn da, dính phúc mạc, co thắt mạch, sổ mũi, co cứng cơ, tổn thương cơ, rối loạn tiếng nói, cơ cứng tay vì viết nhiều và hội chứng ống cổ tay.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “dược phẩm” nghĩa là dạng bào chế chứa độc tố botulinum làm thành phần hoạt tính, và dạng bào chế này có thể chứa ít nhất ít nhất một thành phần bổ sung (tá dược) trong dược phẩm này ngoài thành phần hoạt tính là độc tố thần kinh botulinum. Thành phần bổ sung này có thể được chọn từ nhóm bao gồm albumin, albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh người tái tổ hợp, gelatin, sucroza, trehaloza, tinh bột hydroxyetyl, collagen, lactoza, sucroza natri clorua, polysacarit, caprylat, polyvinylpyrrolidon và natri, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Ngoài ra, phương pháp bào chế dược phẩm chứa độc tố botulinum làm thành phần hoạt tính bao gồm bước kết hợp độc tố botulinum với thành phần bổ sung (tá dược), và bước kết hợp này có thể được chọn từ nhóm quy trình bao gồm làm khô bằng cách đông lạnh, làm khô lạnh và làm khô bằng chân không.

Do đó, dược phẩm là dạng bào chế mà thích hợp để sử dụng trong chẩn đoán, chữa bệnh hoặc mỹ phẩm (ví dụ, bằng cách tiêm qua cơ hoặc dưới da hoặc bằng cách chèn mẫu cấy phóng thích chậm hoặc mô cấy) cho đối tượng, như người bệnh. Dược phẩm có thể là: ở tình trạng khô lạnh hoặc khô trong chân không, dung dịch tạo ra sau khi hoàn nguyên dược phẩm khô lạnh hoặc khô trong chân không bằng nước muối hoặc nước, hoặc; dưới dạng dung dịch không cần hoàn nguyên. Thành phần hoạt tính có thể là một trong các độc tố botulinum typ huyết thanh A, B, C₁, D, E, F hoặc G hoặc độc tố botulinum, tất cả chúng có thể được sản xuất một cách tự nhiên bởi vi khuẩn *Clostridial*.

Như đã nêu trên, dược phẩm có thể là lỏng hoặc rắn, ví dụ được làm khô trong chân không. Các phương pháp ví dụ để bào chế dược phẩm có thành phần hoạt tính là độc tố botulinum được bộc lộ trong Công bố patent Mỹ số 2003-0118598 công bố vào ngày 5 tháng 11 năm 2002.

Theo một ví dụ khác của sáng chế, nhằm khẳng định tác dụng của protein độc tố botulinum typ A (DWP450) tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế, biên độ điện thế hoạt động cơ toàn phần (compound muscle action potential-CMAP) và tốc độ dẫn điện (tC) được đo. Theo thử nghiệm này, hai protein độc tố botulinum typ A khác nhau, BTX-A-1 (BOTOX[®], Allergan Inc., California, USA) và BTX-A-2 (DWP450) được sản xuất bởi Ví dụ 2 theo sáng chế, được sử dụng trong bốn nhóm riêng biệt. Trong nhóm 1, 0,08 mL của natri clorua (NaCl) được sử dụng cho một cơ TA, và một cơ khác không được điều trị. Ở nhóm 2, 0,02 mL của BTX-A-1 (hai đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA, và 0,02 mL của BTX-A-2 (hai đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA khác. Ở nhóm 3, 0,04 mL của BTX-A-1 (bốn đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA, và 0,04 mL của BTX-A-2 (bốn đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA khác. Ở nhóm 4, 0,08 mL của BTX-A-1 (tám đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA, và 0,08 mL của BTX-A-2 (tám đơn vị) được sử dụng cho một cơ khác.

Một đơn vị độc tố botulinum được xác định dưới dạng LD₅₀ khi tiêm trong màng bụng vào chuột Webster Thụy Sĩ cái nặng khoảng 18-20 gam mỗi con. Một đơn vị độc tố botulinum là lượng độc tố botulinum mà tiêu diệt 50% nhóm chuột Webster Thụy Sĩ cái.

Biên độ điện thế hoạt động cơ toàn phần (compound muscle action potential-CMAP) do việc sử dụng BTX-A-1 và BTX-A-2 gây ra được đo, và kết quả là, ở tốc độ kích thích chậm là 2Hz, các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 cho thấy tác dụng gây liệt lên cơ TA (dY) 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần sau khi dùng (FIG.4A), và ở tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz, các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 cho thấy tác dụng gây liệt lên cơ TA (dY) 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần sau khi dùng (FIG.4B). Không có khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) giữa BTX-A-1 và

BTX-A-2 ở tốc độ kích thích chậm là 2Hz và ở tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz, và tác dụng gây liệt lên cơ TA (dY) ở các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 có liên quan đến liều độc tố botulinum được dùng.

Tốc độ dẫn điện (tC) do việc dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 gây ra được đo, và kết quả là, nó cho thấy rằng các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 không gây ra sự trì hoãn ở tốc độ dẫn điện ở tốc độ kích thích chậm là 2 Hz và tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz (FIG.5).

Cụ thể là, độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế có tác dụng tương tự với tác dụng của BOTOX® bán trên thị trường (Allergan, Inc.) và an toàn hơn hai lần, vì nó có độ tinh khiết cao hơn dẫn đến sự giảm đặc tính lưu thông trong cơ thể của độc tố botulinum. Do đó, nó có thể được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau, bao gồm điều trị các rối loạn thần kinh cơ, loại bỏ nếp nhăn, và điều trị chứng liệt nửa người và bại não.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu các ví dụ. Sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Nuôi cấy chủng *Clostridium botulinum*

1-1: Chế phẩm môi trường sử dụng trong nuôi cấy

Môi trường có thành phần chứa 2% chất thủy phân casein, 1% cao nấm men, 1% glucoza và 0,5% thioglycolat được sử dụng cho nuôi cấy khởi đầu và nuôi cấy chính chủng *Clostridium botulinum* để sản xuất độc tố botulinum.

1-2 : Nuôi cấy khởi đầu chủng *Clostridium botulinum*

20 μ l *Clostridium botulinum* (Số đăng ký 4-029-CBB-IS-001 tại Trung tâm kiểm

soát và phòng bệnh Hàn Quốc) được cho vào ống nghiệm nuôi cấy chứa 10 ml môi trường vô trùng có thành phần được mô tả trong Ví dụ 1-1 và được đưa vào nuôi cấy khởi đầu sơ cấp (nuôi cấy tĩnh) ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 22-30 giờ trong điều kiện yếm khí. Khi sự sinh trưởng của chủng trong nuôi cấy khởi đầu sơ cấp được xác nhận, 8 ml môi trường nuôi cấy khởi đầu sơ cấp được cho vào chai nuôi cấy 1 l chứa 800 ml môi trường vô trùng có cùng thành phần môi trường và được đưa vào nuôi cấy khởi đầu thứ cấp (nuôi cấy tĩnh) nhiệt độ 35°C trong thời gian 8-15 giờ trong điều kiện yếm khí.

1-3: Nuôi cấy chính chủng *Clostridium botulinum*

Để sản xuất độc tố botulinum bằng cách nuôi cấy chủng *Clostridium botulinum*, việc nuôi cấy chính chủng này được thực hiện. Cụ thể là, 9,3 l môi trường có thành phần được mô tả trong Ví dụ 1-1 được điều chế và đặt vào máy ủ 10l, theo sau là vô trùng môi trường. Nito được cấp vào để tạo điều kiện yếm khí, và việc nuôi cấy của chủng được thực hiện ở nhiệt độ 35°C và tốc độ khuấy 50 vòng/phút.

Chủng trong chai nuôi cấy 1 l được đưa vào nuôi cấy khởi đầu thứ cấp ở Ví dụ 1-2 được bơm vào máy ủ 10l qua đường bơm nối với cổng bơm của máy ủ 10l. Chủng *Clostridium botulinum* trong máy ủ 10l được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 35°C và 50 vòng/phút và điều kiện nuôi cấy được thiết lập này được duy trì, kiểm tra và ghi lại. Khi chủng được nuôi cấy trong 100 giờ hoặc hơn, việc nuôi cấy chính được hoàn thành.

Ví dụ 2: Sản xuất độc tố botulinum

2-1: Bước kết tủa bằng axit sulfuric

Bước kết tủa bằng axit sulfuric là quy trình tách protein trong đó axit sulfuric được bổ sung vào mẻ nuôi cấy chứa nhiều loại protein để làm giảm độ pH của mẻ nuôi cấy này trong khi tiêu diệt vi khuẩn sinh botulinum còn lại sau khi nuôi cấy sao cho các protein này đạt điểm đẳng điện để làm kết tủa. Việc nuôi cấy chính được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 1-3 và sau khi hoàn thành việc nuôi cấy chính, dung dịch axit sulfuric 5N

được bổ sung vào mẻ nuôi cấy bằng bơm tự động để đạt được pH 3,4-3,6 như đo được bởi bộ cảm biến pH của máy ủ 10ℓ, và sau đó mẻ nuôi cấy này được chuyển vào bình chứa 20ℓ (AS ONE, Cat. No AS5,372,06) qua đường thu gom của máy ủ, và bình chứa 20ℓ chứa chất kết tủa axit sulfuric được chuyển vào tủ cấy an toàn sinh học (biological safety cabinet - BSC). Sau đó, thực hiện việc kết tủa bằng axit sulfuric trong BSC này.

2-2: Xử lý enzym và chiết độc tố

Sau khi loại bỏ phần nổi ra khỏi kết tủa axit sulfuric, 700 ml dung dịch đệm natri phosphat 1M (pH 5,3) được bổ sung vào chất kết tủa này. Sau đó, dung dịch này được điều chỉnh đến pH 5,0-6,0 bằng cách bổ sung dung dịch natri hydroxit 5N (NaOH). Để loại bỏ ADN và ARN ra khỏi chất kết tủa này, 60 ml dung dịch benzamidin HCl 0,4M, 1 g DNaza và 1 g RNaza được bổ sung vào và phản ứng với dung dịch này trong khoảng 5 giờ để chiết độc tố botulinum.

2-3: Kết tủa bằng axit clohydric và hòa tan độc tố

Mẻ nuôi cấy chứa phần chiết độc tố được ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở 12000 x g trong thời gian 15 phút để tách nó thành các viên tròn và dịch nổi, và dịch nổi tách được được chuyển vào chai 10ℓ mới (AS ONE, Cat. No AS5,372,04), và sau đó được điều chỉnh đến pH 3,4-3,6 bằng cách bổ sung dung dịch axit clohydric 1N (HCl) và đưa vào kết tủa bằng axit clohydric trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C. Chất kết tủa bằng axit clohydric được ly tâm ở nhiệt độ 4°C ở 12000 x g trong thời gian 15 phút, và loại bỏ dịch nổi, sau đó bổ sung 50 ml dung dịch đệm natri phosphat (pH 6,5) vào phần vón độc tố này để hòa tan độc tố.

2-4: Sắc ký trao đổi anion sơ cấp

Sau khi hoàn thành quá trình kết tủa, nhằm loại bỏ phần lớn tạp chất không phải độc tố botulinum typ A, phép sắc ký được thực hiện nhờ sử dụng nhựa trao đổi ion. Cụ thể là, nhựa trao đổi anion (Toyopearl SuperQ-650M, Tosoh Bioscience, P/N 17228)

được nạp vào cột, sau đó mẫu kết tủa trong các Ví dụ 2-3 được bơm vào cột này, và độc tố này được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải natri phosphat 50mM. Trong bước tinh chế sơ bộ, protein độc tố botulinum typ A không được hấp thụ lên nhựa trao đổi anion, và phần lớn tạp chất được loại bỏ bằng cách hấp thụ. Để tinh chế độc tố botulinum có độ tinh khiết cao, mẫu được giữ ở pH 4,5-7,0 và độ dẫn điện là 5-20 mS/cm.

2-5: Kết tủa bằng amoni sulfat

Các phân đoạn chứa protein độc tố botulinum typ A được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion được thu nhận, và amoni sulfat được bổ sung vào đó ở nồng độ 20-40% (khối lượng/thể tích) để làm kết tủa protein độc tố botulinum typ A trở lại. Protein độc tố botulinum typ A kết tủa này được hòa tan lại trong dung dịch natri phosphat 50mM (pH 6,5).

2-6: Sắc ký trao đổi anion thứ cấp

Sau khi hoàn thành quá trình kết tủa bằng amoni sulfat, nhằm loại bỏ tạp chất nhỏ không phải độc tố botulinum typ A, phép sắc ký nhờ sử dụng nhựa trao đổi ion được thực hiện một lần nữa. Cụ thể là, nhựa trao đổi anion (Toyopearl SuperQ-650M, Tosoh Bioscience, P/N 17228) được nạp vào cột, sau đó chất kết tủa bằng amoni sulfat được hòa tan trong Ví dụ 2-5 được bơm vào cột, và độc tố này được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải natri phosphat 50mM. Vào lúc này, protein độc tố botulinum typ A không được hấp thụ, và tạp chất nhỏ được loại bỏ bằng cách hấp thụ.

Việc tinh chế độc tố botulinum có độ tinh khiết cao phần lớn được hoàn thành trong bước sắc ký trao đổi anion sơ cấp, và bước tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion thứ cấp được thực hiện nhằm loại bỏ tạp chất còn lại. Để tinh chế độc tố botulinum có độ tinh khiết cao, chất kết tủa bằng amoni sulfat được giữ ở pH 4,5-7,0 và độ dẫn điện là 5-20 mS/cm.

2-7: Điều chế chất lỏng thô

Các phân đoạn chứa protein độc tố botulinum typ A tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion trong Ví dụ 2-6 được thu nhận, vô trùng và lọc qua bộ lọc 0,2 μ m để tạo ra chất lỏng thô. Chất lỏng thô được tạo ra này được bảo quản dưới -70°C. Protein độc tố botulinum typ A tạo ra được gọi là “DWP450”.

Ví dụ 3: Phân tích độ tinh khiết của độc tố botulinum tinh chế

HPLC (e2695, Waters) được thực hiện bằng sắc ký rây phân tử (size exclusion chromatography- SEC). Pha động được sử dụng là dung dịch đệm natri phosphat 100 mM (pH 6,5), và cột TSKgel G4000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, P/N 08542) được nối với cột bảo vệ (Tosoh Bioscience, P/N 08543) đối với P/N 08542, và 20 μ g protein độc tố botulinum typ A được nạp lên cột và cho chảy ở tốc độ 1 mL/phút trong 30 phút. Kết quả là, nó cho thấy rằng độ tinh khiết của độc tố botulinum sau khi sắc ký trao đổi anion sơ cấp là 98,38% (FIG.2) và độ tinh khiết của độc tố botulinum sau khi sắc ký trao đổi anion thứ cấp là 98,99% (FIG.3).

Ví dụ 4: Đánh giá độ an toàn của độc tố botulinum tinh chế

Nhằm khẳng định độ an toàn của protein độc tố botulinum typ A (DWP450) tinh chế trong Ví dụ 2, thử nghiệm để so sánh với độ an toàn của BOTOX[®] (Allergan, Inc.) được thực hiện.

Chia chuột đực SD (Sprague-Dawley) màu trắng thành năm nhóm sau, mỗi nhóm bao gồm 10 chuột đực và 10 chuột cái: một nhóm được dùng 30 U/kg chất thử nghiệm (DWP450); một nhóm được dùng 60 U/kg chất thử nghiệm; một nhóm được dùng 30 U/kg chất so sánh (BOTOX[®] được bán bởi Allergan, Inc.); một nhóm được dùng 60 U/kg chất so sánh; và nhóm đối chứng (nước muối). Mỗi chất thử nghiệm, chất so sánh và nước muối được sử dụng qua cơ tổng cộng năm lần, mỗi tuần một lần trong 5 tuần.

Trong các nhóm được cho dùng 60 U/kg chất thử nghiệm và 60 U/kg chất so sánh (BOTOX[®]), năm chuột cái và năm chuột đực được bổ sung thêm vào, và thử nghiệm so

sánh độc tính được thực hiện trong khoảng thời gian thu hồi là 12 tuần để đánh giá tính thuận nghịch của độc tính (Bảng 1).

Bảng 1: Đánh giá độ an toàn của độc tố botulinum tinh chế

Thử nghiệm	Loài	Liều (Đơn vị/kg)	NOAEL/MLD (Đơn vị/kg)	
			DWP450	Allergan
So sánh độc tính	Chuột SD	0, 30, 60	Độc: <30 Cái: 60	Độc: <30 Cái: 30

Kết quả là, nó cho thấy rằng độc tố botulinum (DWP450) tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế cho thấy trị số NOAEL là 60 U/kg đối với chuột cái, đề xuất rằng nó an toàn hơn gấp hai lần so với BOTOX® (Allergan, Inc.) thể hiện trị số NOAEL 30 U/kg. Độ an toàn gấp hai lần của độc tố botulinum theo sáng chế được cho là do độc tố botulinum theo sáng chế có độ tinh khiết cao, và do đó làm tăng khả năng tác động ở vị trí khu trú sao cho sự lưu thông trong cơ thể của độc tố botulinum, mà có thể dẫn đến các tác dụng phụ, được giảm xuống.

Ví dụ 5: Khảo sát tác dụng của độc tố botulinum tinh chế

Để khảo sát tác dụng của protein độc tố botulinum typ A (DWP450) tinh chế trong Ví dụ 2, biên độ điện thế hoạt động cơ toàn phần (compound muscle action potential-CMAP) và tốc độ dẫn điện (tC) được đo.

Cụ thể là, 24 chuột SD (Sprague-Dawley) trắng được chia ngẫu nhiên thành bốn nhóm, mỗi nhóm gồm sáu con chuột. Hai protein độc tố botulinum typ A khác nhau, BTX-A-1 (BOTOX®, Allergan Inc., California, USA) và BTX-A-2 (DWP450) tinh chế trong Ví dụ 2, được sử dụng. Hai chế phẩm có đặc tính gần như giống nhau như được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây, và độc tố botulinum pha loãng nước muối 0,9% được sử dụng trong tất cả các quy trình. Các con chuột được gây tê bằng cách tiêm trong màng bụng 10 mg/kg ketamin hydroclorua, và sau đó được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 vào cơ chày trước (tibialis anterior - TA) của chuột.

Bảng 2: So sánh đặc tính giữa BTX-A-1 và BTX-A-2

	BTX-A-1(Allergan)	BTX-A-2
Chủng Clostridium botulinum	Kiểu đại	Kiểu đại
Typ huyết thanh	Độc tố botulinum typ A	Độc tố botulinum typ A
Khối lượng phân tử phức (kDa)	900	900
Đóng gói (đơn vị/lọ)	100	100
Tá dược – chất ổn định	Albumin huyết thanh người	Albumin huyết thanh người
Tá dược – chất đẳng trương	natri clorua	natri clorua
Dạng	Khô trong chân không	Khô lạnh
Điều kiện bảo quản (°C)	2 - 8	2 - 8
Thời gian bảo quản (tháng)	36	36 ()
pH	$6,0 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5$

Ở nhóm 1, 0,08 mL natri clorua (NaCl) được sử dụng cho một cơ TA, và một cơ TA khác không được điều trị. Ở nhóm 2, 0,02 mL BTX-A-1 (hai đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA, và 0,02 mL BTX-A-2 (hai đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA khác. Ở nhóm 3, 0,04 mL BTX-A-1 (bốn đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA, và 0,04 mL BTX-A-2 (bốn đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA khác. Ở nhóm 4, 0,08 mL BTX-A-1 (tám đơn vị) được sử dụng cho một cơ TA, và 0,08 mL BTX-A-2 (tám đơn vị) được sử dụng cho một cơ khác.

Mức độ trễ của CMAP và tốc độ dẫn điện được đo nhờ sử dụng CyberAmp380 và Digidata1320 (Axon Instruments. Inc, USA). Các điện cực được sử dụng được gắn vào da nhờ sử dụng kẹp. Điện cực âm được gắn vào cơ khoeo, và điện cực dương được gắn vào khoảng trống sau mu và đốt chuyển lớn hơn của xương đùi. Điện cực ghi được gắn vào cơ bụng của cơ cẳng chân trước, và điện cực ghi tham khảo được gắn vào gót chân sau bên trái và lòng bàn chân.

Kích thích điện 1-5 mA được áp dụng ở tốc độ kích thích chậm là 2 Hz và tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz. Tác dụng gây liệt lên cơ TA được xác định bằng cách đo biên

độ đỉnh-đỉnh của CMAPs (dY), và độ trễ ở tốc độ dẫn điện được xác định bằng cách đo khoảng cách thời gian giữa điểm kích thích và điểm đỉnh âm.

Phân tích bằng kích thích điện được thực hiện trước khi dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 và 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần sau khi dùng, và CMAPs và tốc độ dẫn điện do việc dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 được phân tích bởi ANOVA nhờ sử dụng SAS (phiên bản 9,2, SAS Institute Inc., Mỹ).

Kết quả là, quan sát thấy rằng, ở tốc độ kích thích chậm là 2 Hz, các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 cho thấy tác dụng gây liệt lên cơ TA (dY) 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần sau khi dùng (FIG.4A), và ở tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz, các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 cho thấy tác dụng gây liệt lên cơ TA (dY) 3 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần sau khi dùng (FIG.4B).

Không có khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) giữa BTX-A-1 và BTX-A-2 ở tốc độ kích thích chậm là 2Hz và ở tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz, và tác dụng gây liệt lên cơ TA (dY) ở các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 là có liên quan đến liều lượng độc tố botulinum được sử dụng.

Tốc độ dẫn điện (tC) do việc dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 gây ra được đo, và kết quả là, nó cho thấy rằng các nhóm được cho dùng BTX-A-1 và BTX-A-2 không gây ra sự trì hoãn tốc độ dẫn điện ở tốc độ kích thích chậm là 2 Hz và tốc độ kích thích nhanh là 20 Hz.

Cụ thể là, đã phát hiện rằng độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo sáng chế thể hiện hiệu quả tương tự với hiệu quả của BOTOX[®] có bán trên thị trường (Allergan, Inc.).

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Việc sử dụng phương pháp sản xuất độc tố botulinum theo sáng chế giúp có thể sản xuất độc tố botulinum có độ tinh khiết cao bằng quy trình đơn giản, đề xuất rằng phương pháp này rất kinh tế và hiệu quả. Độc tố botulinum tạo ra bởi phương pháp theo

sáng chế có độ tinh khiết cao so với các độc tố botulinum được sản xuất bởi các phương pháp thông thường, và do đó làm tăng khả năng tác dụng ở khu vực khu trú. Do đó, sự lưu thông trong cơ thể của độc tố botulinum, mà có thể dẫn đến các tác dụng phụ, được làm giảm để làm tăng độ an toàn. Do đó, độc tố botulinum theo sáng chế có thể được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau, bao gồm điều trị chứng các rối loạn thần kinh cơ, loại bỏ nếp nhăn, và điều trị chứng liệt nửa người và bại não.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết liên quan đến các dấu hiệu cụ thể, sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là phần mô tả này chỉ là đối với phương án ưu tiên và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi thực tế của sáng chế sẽ được xác định bởi yêu cầu bảo hộ đi kèm và dạng tương đương của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất độc tố botulinum, phương pháp bao gồm các bước:
 - (a) xử lý mẻ nuôi cấy chủng sản xuất độc tố botulinum bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum;
 - (b) bổ sung dung dịch đệm vào độc tố botulinum được kết tủa này, tiếp theo xử lý bằng chất ức chế proteaza và nucleaza, nhờ đó chiết được độc tố botulinum;
 - (c) xử lý độc tố botulinum chiết được bằng axit để làm kết tủa độc tố botulinum và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và
 - (d) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion, trong đó việc kết tủa bằng axit trong bước (c) được thực hiện bằng cách bổ sung axit sulfuric hoặc axit clohydric vào độc tố botulinum chiết được, sao cho độc tố botulinum chiết được đạt độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chủng sản xuất độc tố botulinum là *Clostridium botulinum*.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độc tố botulinum tinh chế là protein độc tố botulinum typ A có độ tinh khiết ít nhất là 98%.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc kết tủa bằng axit ở bước (a) được thực hiện bằng cách bổ sung axit sulfuric hoặc axit clohydric vào mẻ nuôi cấy chủng này, sao cho mẻ nuôi cấy này đạt độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 4,5.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất ức chế proteaza trong bước (b) là benzamidin HCl.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nucleaza trong bước (b) là DNaza và RNaza.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc chiết độc tố botulinum trong bước (b) được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm trong bước (c) là dung dịch đệm natri phosphat.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phép sắc ký trao đổi anion trong bước (d) được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 7,5, và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 3 đến 30 mS/cm.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm, sau bước (d), các bước:

(e) xử lý phân đoạn từ phép sắc ký trao đổi anion chứa độc tố botulinum bằng amoni sulfat để tạo ra kết tủa, và hòa tan chất kết tủa này trong dung dịch đệm; và

(f) tinh chế độc tố botulinum bằng sắc ký trao đổi anion.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó amoni sulfat trong bước (e) được bổ sung ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 50% (trọng lượng/thể tích).

12. Phương pháp theo điểm 10, trong đó dung dịch đệm trong bước (e) là dung dịch đệm natri phosphat.

13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó phép sắc ký trao đổi anion trong bước (e) được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 7,5, và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 3 đến 30 mS/cm.

FIG.1

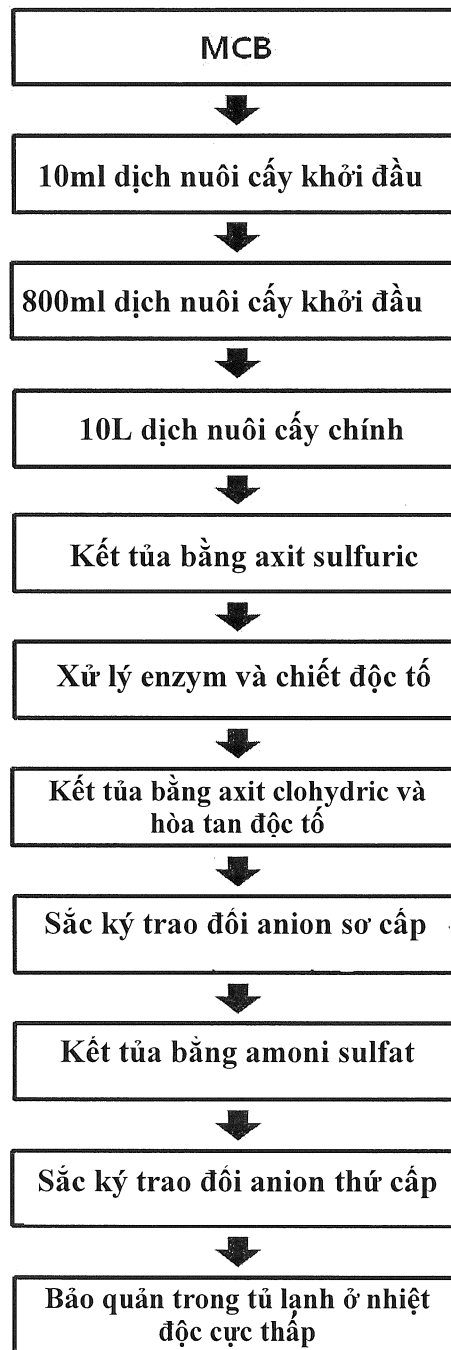
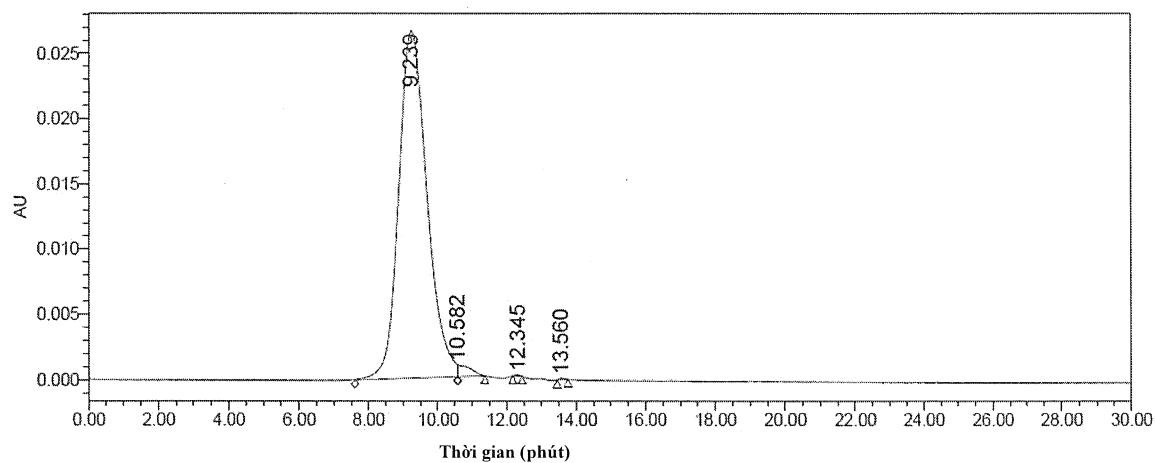
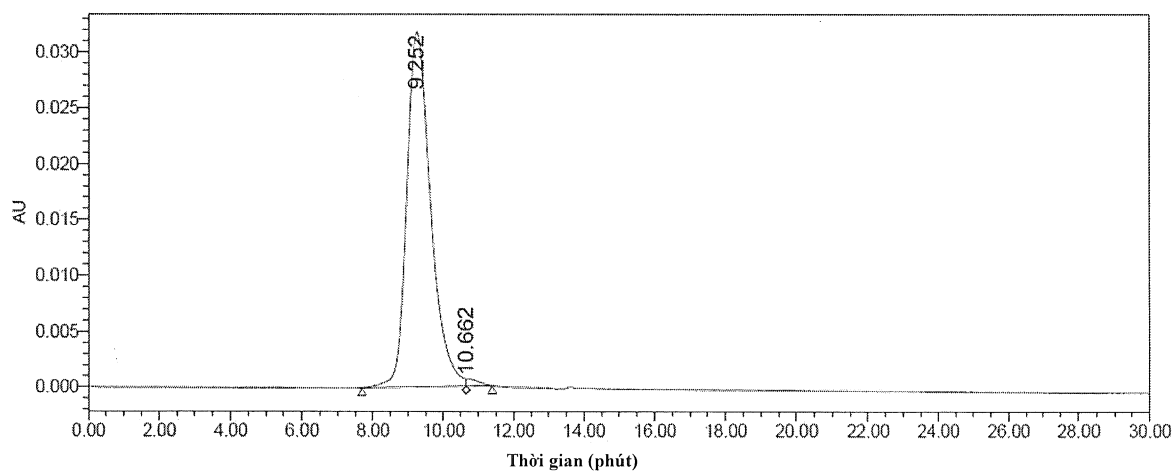


FIG.2



	Thời gian lưu (phút)	Diện tích ($\mu\text{V}\cdot\text{giây}$)	% Diện tích
1	9.239	1506378	98.38
2	10.582	23129	1.51
3	12.345	744	0.05
4	13.560	938	0.06

FIG.3



	Thời gian lưu (phút)	Diện tích ($\mu\text{V}\cdot\text{giây}$)	% Diện tích
1	9.252	1489506	98.99
2	10.662	15157	1.01

FIG.4

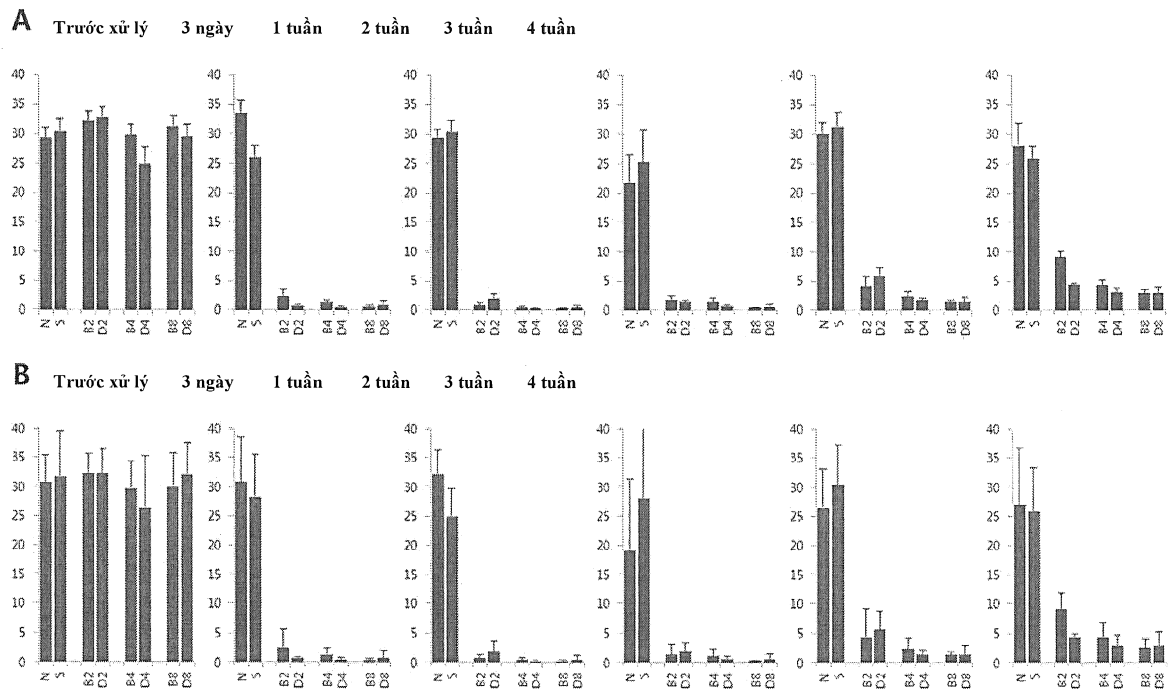


FIG.5

