



(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)



1-0026687

(51)⁷ C12P 19/04; C12R 1/46; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2015-00945

(22) 06/09/2013

(86) PCT/KR2013/008048 06/09/2013

(87) WO/2014/038879 13/03/2014

(30) 10-2012-0099348 07/09/2012 KR

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/06/2015 327A

(73) SK Bioscience Co., Ltd. (KR)

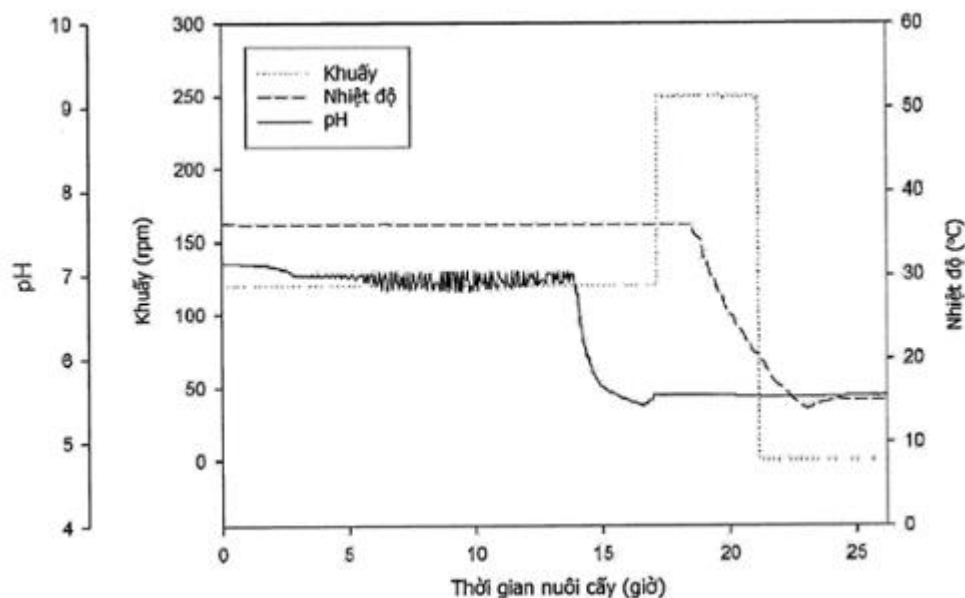
(Sampyeong-dong) 310, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13494, Republic of Korea.

(72) SHIN, Jin-Hwan (KR); PARK, Mahn-Hoon (KR); KIM, Hun (KR); NOH, Myeong-Ju (KR); PARK, Su-Jin (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT POLYSACARIT VỎ CÓ KIỂU HUYẾT THANH PHÉ CẦU KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn. Phương pháp theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy bổ sung tế bào vi khuẩn tạo kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn không điều chỉnh độ pH, nhờ đó loại bỏ quá trình kết tủa protein bằng cách axit hóa bằng chất điều chỉnh độ pH.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới phương pháp sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn, và cụ thể hơn là đến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn bằng cách loại bỏ các tạp chất như protein và axit nucleic từ canh trường nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Pneumococcus (Streptococcus pneumoniae) là vi khuẩn Gram dương thuộc họ Streptococcaceae, nằm trong bộ Lactobacillus, và nó gây ra các bệnh như viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết, viêm tai giữa và viêm màng não ở người. Tế bào có kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn có vỏ là polysacarit bao ngoài mỗi tế bào. Vỏ này gây cản trở cho sự thực bào bằng cách ngăn kháng thể bắt cặp vào tế bào vi khuẩn. Tế bào đã được phân loại thành hơn 90 kiểu huyết thanh dựa vào các đặc điểm miễn dịch, một số kiểu huyết thanh đã được báo cáo là gây bệnh xâm lấn. Tổng cộng 37 kiểu huyết thanh đã được xác định từ *Streptococcus pneumoniae* xâm lấn thu được từ năm 1996 đến 2008, và kiểu huyết thanh chính, 19F > 23F > 19A > 6A > 3 > 9V > 6B thường xuyên theo thứ tự này, chiếm đa số là 53,4%. Polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn đã được sử dụng trong sản xuất vaccin như vaccin polysacarit và vaccin liên hợp polysacarit-protein.

Polysacarit vỏ được sử dụng trong sản xuất vaccin polysacarit và vaccin liên hợp polysacarit-protein được thu từ canh trường nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh tương ứng. Mỗi chủng được nuôi cấy dưới điều kiện nhiệt độ, độ pH và khuấy tối ưu cho đến khi đạt được mật độ tối đa. Để thu được vỏ polysacarit phẩy cầu khuẩn mà không được tiết ra ngoài tế bào chất, thực hiện ly giải tế bào sử dụng chất ly giải như natri deoxycholat (DOC). Khi tế bào được ly giải, một số protein và axit nucleic của chúng được giải phóng, cùng với polysacarit vỏ và chúng phải được loại bỏ bằng quy trình tinh sạch sau nuôi cấy. Để giảm thiểu nguy cơ tác dụng phụ của chất bất kỳ không phải kháng nguyên sau khi được tiêm chủng, có những thông số nghiêm ngặt về hàm lượng protein và axit nucleic. Ví dụ, trong trường hợp của Prevnar 7TM, hàm lượng protein và axit nucleic trong mỗi kiểu huyết thanh đáp ứng các thông số kỹ

thuật lần lượt là từ 2 đến 5% hoặc nhỏ hơn và từ 1 đến 2% hoặc nhỏ hơn theo khối lượng khô.

Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/110352 bộc lộ phương pháp sản xuất polysacarit vỏ bao gồm bước nuôi cấy *Streptococcus pneumonia*, ly giải tế bào, làm kết tủa protein bằng cách axit hóa dịch tan tế bào đến độ pH nhỏ hơn 5,5, ủ không khuấy và ly tâm và/hoặc lọc. Ngoài ra, công bố đơn sáng chế quốc tế WO 2008/118752 bộc lộ phương pháp sản xuất polysacarit vỏ bằng cách thực hiện siêu lọc và lọc tuần hoàn có pha loãng dịch tan tế bào sau đó là quá trình kết tủa protein bằng cách axit hóa. Tuy nhiên, tất cả các phương pháp sản xuất có liên quan này đòi hỏi quá trình kết tủa protein bằng cách axit hóa bằng chất điều chỉnh độ pH, nó làm cho toàn bộ quy trình trở nên phức tạp và cũng gây biến đổi polysacarit vỏ và tạo thành các chất có hại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Các tác giả đã thực hiện nhiều nghiên cứu để cải tiến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn. Ngạc nhiên là, các tác giả phát hiện ra rằng độ pH có thể hạ thấp xuống khoảng thích hợp để làm kết tủa protein, cụ thể, đến giá trị độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn bằng sản phẩm từ việc nuôi cấy (đặc biệt là, axit lactic, v.v.), khi thực hiện nuôi cấy bổ sung dưới cùng điều kiện mà không điều chỉnh độ pH. Thực vậy, các tác giả phát hiện ra rằng quá trình kết tủa protein thông qua axit hóa bằng chất điều chỉnh độ pH có thể được loại bỏ bằng cách thực hiện nuôi cấy bổ sung mà không điều chỉnh độ pH và sau đó thực hiện ly giải tế bào và quá trình kết tủa protein.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp cải tiến để sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn.

Giải pháp kỹ thuật

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn bao gồm các bước sau:

(a) nuôi cấy tế bào vi khuẩn sinh ra kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn, trong khi duy trì độ pH của canh trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,4;

(b) kết thúc nuôi cấy ở bước (a) ở thời điểm giữa lúc độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi và lúc độ hấp thụ bắt đầu giảm;

(c) thực hiện nuôi cấy bổ sung canh trường nuôi cấy thu được từ bước (b) mà không điều chỉnh độ pH cho đến khi độ pH của canh trường nuôi cấy đạt độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn;

(d) bổ sung chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để làm ly giải tế bào, làm kết tủa protein và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào để thu được dịch tan tế bào đã làm trong; và

(e) tách và tinh sạch polysaccharit vỏ từ dịch tan thu được từ bước (d).

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn có thể là 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F hoặc 33F.

Nuôi cấy ở bước (a) có thể được thực hiện ở nhiệt độ 34-38°C có khuấy ở tốc độ 50-150rpm.

Theo một phương án của sáng chế, bước (b) có thể được thực hiện bằng cách kết thúc nuôi cấy ở bước (a) trong 1 đến 3 giờ từ thời điểm khi độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi.

Việc nuôi cấy bổ sung ở bước (c) có thể được thực hiện ở nhiệt độ 34-38°C có khuấy ở tốc độ 50-150rpm không điều chỉnh độ pH.

Chất ly giải được sử dụng trong bước (d) có thể là natri deoxycholat. Theo một phương án khác của sáng chế, bước (d) có thể được thực hiện bằng cách thêm chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để ly giải tế bào, sau đó ủ dịch tan tế bào thu được ở nhiệt độ 10-20°C trong 3-24 giờ không khuấy để kết tủa protein và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm.

Vẫn theo một phương án khác của sáng chế, việc tách và tinh sạch ở bước (e) có thể bao gồm các bước sau:

(i) lọc dịch tan thu được từ bước (d) sử dụng màng lọc sâu;

(ii) cô đặc dịch lọc thu được từ bước (i), sau đó là siêu lọc và ly tâm;

(iii) cho dịch nổi thu được từ bước (ii) phản ứng với a chất hoạt động bề mặt dạng cation và sau đó ly tâm dung dịch thu được để thu được viên hoặc dịch nổi chứa polysacarit vỏ;

(iv) cho polysacarit vỏ thu được từ bước (iii) phản ứng với natri iodua, sau đó ly tâm thu được dịch nổi;

(v) thêm cacbon hoạt tính vào dung dịch thu được từ bước (iv), sau đó lọc; và

(vi) cô đặc dịch lọc thu được từ bước (v), sau đó siêu lọc và ly tâm thu được polysacarit vỏ.

Theo phương án ở trên, việc cô đặc ở bước (ii) có thể được thực hiện sử dụng màng 100kDa và việc cô đặc ở bước (vi) có thể được thực hiện sử dụng màng 30kDa. Ngoài ra, chất hoạt động bề mặt dạng cation được sử dụng trong bước (iii) có thể là xetyltrimetylamonium bromua, và xetyltrimetylamonium bromua có thể được sử dụng ở nồng độ từ 0,5 đến 3,0%. Ngoài ra, cacbon hoạt tính được sử dụng trong bước (v) có thể được sử dụng ở nồng độ từ 1 đến 5%(khối lượng/thể tích).

Tác dụng có lợi

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, chất điều chỉnh độ pH để kết tủa protein không được sử dụng. Thật vậy, sáng chế chứng minh rằng khi nuôi cấy bổ sung tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn được thực hiện dưới cùng điều kiện không điều chỉnh độ pH, độ pH có thể được hạ thấp đến khoảng thích hợp để làm kết tủa protein, cụ thể, đến độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn bằng sản phẩm thu được từ việc nuôi cấy (đặc biệt là, axit lactic, v.v.). Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế không cần sử dụng chất điều chỉnh độ pH để làm kết tủa protein, nhờ đó giảm thiểu việc biến đổi polysacarit vỏ và chất gây hại bất kỳ và đơn giản hóa quy trình sản xuất. Polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn thu được từ phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng thuận lợi để sản xuất vaccin polysacarit và vaccin liên hợp polysacarit-protein.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 thể hiện sự thay đổi độ pH trong canh trường nuôi cấy và các điều kiện để nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn 3;

FIG. 2 thể hiện sự thay đổi độ pH trong canh trường nuôi cấy và các điều kiện để nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 6B;

FIG. 3 thể hiện sự thay đổi độ pH trong canh trường nuôi cấy và các điều kiện để nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 7F;

FIG. 4 thể hiện sự thay đổi độ pH trong canh trường nuôi cấy và các điều kiện để nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 14;

FIG. 5 thể hiện sự thay đổi độ pH trong canh trường nuôi cấy và các điều kiện để nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 19A; và

FIG. 6 thể hiện sự thay đổi độ pH trong canh trường nuôi cấy và các điều kiện để nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 23F.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn bao gồm các bước sau:

(a) nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn, trong khi duy trì độ pH của canh trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,4;

(b) kết thúc nuôi cấy ở bước (a) ở thời điểm giữa lúc độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi và lúc độ hấp thụ bắt đầu giảm;

(c) thực hiện nuôi cấy bổ sung canh trường nuôi cấy thu được từ bước (b) mà không điều chỉnh độ pH cho đến khi độ pH của canh trường nuôi cấy đạt đến độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn;

(d) bổ sung chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để làm ly giải tế bào, làm kết tủa protein, và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào để thu được dịch tan tế bào đã làm trong; và

(e) tách và tinh sạch polysacarit vỏ từ dịch tan thu được từ bước (d).

Trong bước (a) của phương pháp sản xuất theo sáng chế, kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn có thể là kiểu bất kỳ của kiểu huyết thanh được sử dụng trong sản xuất vaccin phé cầu khuẩn; ví dụ, kiểu huyết thanh có thể bao gồm kiểu huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, và 33F, nhưng không chỉ giới

hạn ở đó. Tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn là đã biết trong lĩnh vực và tế bào vi khuẩn đã biết bất kỳ có thể được sử dụng mà không có giới hạn bất kỳ (ví dụ, xem WO 2006/110381). Việc nuôi cấy ở bước (a) của phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được thực hiện trong môi trường cơ bản như môi trường đậu nành, trong khi duy trì độ pH của canh trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,4, tốt hơn là từ 7,2 đến 8,2 bằng cách sử dụng, ví dụ, natri hydroxit. Việc nuôi cấy có thể được thực hiện dưới các điều kiện nuôi cấy đã biết bất kỳ, ví dụ, ở nhiệt độ 34-38°C có khuấy ở tốc độ 50-150rpm. Điều kiện độ pH thích hợp để nuôi cấy giống và nuôi cấy duy trì để sản xuất kiểu huyết thanh đặc trưng của *Streptococcus pneumoniae* được đưa ra trong bảng 1 dưới đây.

[Bảng 1]

Điều kiện độ pH cho mỗi kiểu huyết thanh

Kiểu huyết thanh	Điều kiện nuôi cấy giống	Điều kiện nuôi cấy chính
1	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
2	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
3	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
4	pH 7,6±0,6	pH 7,6±0,6
5	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
6A	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
6B	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
7F	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
9N	pH 7,6±0,6	pH 7,6±0,6
9V	pH 7,6±0,6	pH 7,6±0,6
14	pH 7,6±0,6	pH 7,6±0,6
18C	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
19A	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2

19F	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
22F	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
23F	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2
33F	pH 7,2±0,2	pH 7,2±0,2

Phương pháp sản xuất theo sáng chế không cần sử dụng chất điều chỉnh độ pH để làm kết tủa protein. Thật vậy, các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng độ pH có thể hạ thấp đến khoảng thích hợp để làm kết tủa protein, cụ thể, đến độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn bằng sản phẩm thu được từ việc nuôi cấy (đặc biệt là, axit lactic, v.v.), khi thực hiện nuôi cấy bổ sung dưới cùng điều kiện không có sự điều chỉnh độ pH. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế bao gồm bước thực hiện nuôi cấy bổ sung không điều chỉnh độ pH sau khi nuôi cấy tế bào vi khuẩn tạo ra kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn, tốt hơn nếu, ở thời điểm khi tế bào vi khuẩn đạt mức phát triển tối đa và sau đó thực hiện ly giải tế bào và quá trình làm kết tủa protein. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế không cần sử dụng chất điều chỉnh độ pH để làm kết tủa protein, nhờ đó giảm thiểu việc biến đổi polysaccharit vỏ và chất gây hại bất kỳ và đơn giản hóa quy trình sản xuất.

Phương pháp sản xuất theo sáng chế, do đó, bao gồm bước kết thúc nuôi cấy ở bước (a) ở thời điểm giữa lúc độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi và lúc độ hấp thụ bắt đầu giảm [nghĩa là, bước (b)]; và bước thực hiện nuôi cấy bổ sung canh trường nuôi cấy thu được từ bước (b) mà không điều chỉnh độ pH cho đến khi độ pH của canh trường nuôi cấy đạt đến độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn [nghĩa là, bước (c)].

Khi thực hiện nuôi cấy theo bước (a) của phương pháp sản xuất theo sáng chế, sự sinh sôi của tế bào vi khuẩn và độ hấp thụ [ví dụ, độ hấp thụ ở 590nm (OD₅₉₀)] của canh trường nuôi cấy tăng dần để đạt đến trạng thái ổn định (sự phát triển tối đa) và sau đó duy trì không đổi (khoảng 7-24 giờ sau khi bắt đầu nuôi cấy). Sau đó, độ hấp thụ giảm trong 1 đến 3 giờ. Do đó, theo một phương án của sáng chế, bước (b) có thể được thực hiện bằng cách kết thúc việc nuôi cấy ở bước (a) trong 1 đến 3 giờ từ thời điểm khi độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi. Việc nuôi cấy bổ ở bước (c) có thể được thực hiện mà không điều chỉnh độ pH dưới cùng điều kiện như trong bước (a), tức là, ở nhiệt độ 34-38°C có khuấy ở tốc độ 50-150rpm. Khi việc nuôi cấy bổ sung này được thực hiện, độ pH của canh trường nuôi cấy giảm một cách

tự nhiên đến 5,5 hoặc thấp hơn, nhờ vậy mang lại độ pH thích hợp cần để kết tủa protein.

Phương pháp sản xuất theo sáng chế bao gồm bước bổ sung chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để làm ly giải tế bào, làm kết tủa protein, và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào để thu dịch tan tế bào đã làm trong [nghĩa là, bước (d)].

Việc ly giải tế bào có thể được thực hiện theo phương pháp đã biết, ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong WO 2006/110381, WO 2008/118752, v.v.. Ví dụ, việc ly giải tế bào có thể được thực hiện sử dụng natri deoxycholat làm chất ly giải. Natri deoxycholat có thể được sử dụng ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,10 đến 0,15% (nồng độ sau khi thêm natri deoxycholat), nhưng không chỉ giới hạn ở nồng độ này. Khi tế bào được ly giải, polysacarit vỏ của kiểu huyết thanh phế cầu khuẩn được giải phóng ra ngoài tế bào chất. Hơn nữa, việc làm kết tủa protein có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, ủ ở nhiệt độ 10-20°C, và việc loại bỏ protein đã kết tủa và mảnh vụn tế bào có thể được thực hiện phương pháp thông thường (ví dụ, ly tâm). Theo một phương án của sáng chế, bước (d) có thể được thực hiện bằng cách bổ sung chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để làm ly giải tế bào, làm kết tủa protein bằng cách ủ dịch tan thu được ở nhiệt độ 10-20°C trong 3-24 giờ không khuấy, và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm.

Phương pháp sản xuất theo sáng chế bao gồm bước tách và tinh sạch polysacarit vỏ từ dịch tan bằng cách loại bỏ các tạp chất (ví dụ, protein, và axit nucleic chứa trong tế bào) ra khỏi dịch tan thu được từ bước (d) [nghĩa là, bước (e)]. Việc tách và tinh sạch polysacarit vỏ có thể được thực hiện theo phương pháp tinh sạch đã biết bất kỳ, ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong WO 2006/110381 và WO 2008/118752. Theo một phương án, việc tách và tinh sạch ở bước (e) có thể bao gồm các bước sau:

- (i) lọc dịch tan thu được từ bước (d) sử dụng màng lọc sâu;
- (ii) cô đặc dịch lọc thu được từ bước (i), sau đó siêu lọc và ly tâm;
- (iii) cho dịch nổi thu được từ bước (ii) phản ứng với chất hoạt động bề mặt dạng cation, và sau đó ly tâm dung dịch thu được để thu được viên hoặc dịch nổi chứa polysacarit vỏ;

(iv) cho polysacarit vò thu được từ bước (iii) phản ứng với natri iodua, sau đó ly tâm thu được dịch nổi;

(v) thêm cacbon hoạt tính vào dịch nổi thu được từ bước (iv), sau đó lọc; và

(vi) cô đặc dịch lọc thu được từ bước (v), sau đó siêu lọc và ly tâm thu được polysacarit vò.

Theo phương án ở trên, dịch tan còn lại ngay cả sau khi ly tâm để loại bỏ protein đã kết tủa và mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách lọc sử dụng màng lọc sâu.

Ngoài ra, protein và axit nucleic có thể được loại bỏ bằng cách lặp lại việc cô đặc/siêu lọc hai lần. Theo một phương án, việc cô đặc ở bước (ii) có thể được thực hiện sử dụng màng 100kDa, và việc cô đặc ở bước (vi) có thể được thực hiện sử dụng màng 30kDa. Trong quy trình này, siêu lọc cũng có thể được đề cập đến là 'lọc tuần hoàn có pha loãng'.

Hơn nữa, chất hoạt động bề mặt dạng cation được sử dụng trong bước (iii) có thể là xetyltrimetylamoni bromua. Xetyltrimetylamoni bromua (Xetrimonium Bromua, Hexadexyl-trimetylamoni bromua (HB)) có thể được sử dụng ở nồng độ từ 0,5 đến 3% (nồng độ sau khi thêm xetyltrimetylamoni bromua). Chất hoạt động bề mặt dạng cation được sử dụng như HB có thể được kết tủa và loại bỏ bằng cách sử dụng natri iodua. Khi việc ly tâm được thực hiện trong bước (iii), polysacarit vò có thể có mặt trong các viên (ví dụ, kiểu huyết thanh 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9N, 9V, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, v.v.) hoặc dịch nổi (ví dụ, kiểu huyết thanh 7F, 14, 33F, v.v.). Polysacarit vò thu được ở dạng viên có thể được hòa tan trong dung môi thích hợp (ví dụ, dung dịch nước natri clorua, v.v.), và sau đó được sử dụng trong bước tiếp theo (nghĩa là, phản ứng với natri iodua). Polysacarit vò có trong dịch nổi có thể được sử dụng trong bước tiếp theo (nghĩa là, phản ứng với natri iodua) mà không phải tách bỏ sung.

Ngoài ra, cacbon hoạt tính trong bước (v) tốt hơn là có thể được sử dụng ở nồng độ từ 1 đến 5 % (khối lượng/thể tích).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ sau được mô tả ở đây nên được xem theo ý nghĩa mô tả và không có mục đích làm giới hạn sáng chế.

Môi trường đậu nành được sử dụng trong các ví dụ sau có thành phần như được nêu trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Thành phần môi trường	Hàm lượng trong mỗi lít (g)
Pepton đậu nành (Soytone™, BD 243620)	28
Natri clorua	3,5
Kali phosphat	0,7

Ví dụ 1. Sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn 3, 6B, và 19A

Chuẩn bị ngân hàng tế bào

Các nguồn giống tương ứng tạo kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn 3, 6B, và 19A được thu từ American Type Culture Collection, ATCC. Các chủng được sử dụng trong nuôi cấy giống và nuôi cấy chính được nêu ở bảng 3 sau.

[Table 3]

Kiểu huyết thanh	ATCC No.
3	6303
6B	6326
19A	10357

Các nguồn giống được nuôi cấy trong nhiều thế hệ (thế hệ F1, F2, và F3). Hai thế hệ bổ sung của nguồn giống đã được tạo ra. Thế hệ bổ sung thứ nhất được nuôi cấy từ lọ F3, và thế hệ tiếp theo được nuôi cấy từ lọ của thế hệ bổ sung thứ nhất. Lọ giống được bảo quản đông lạnh ($<-70^{\circ}\text{C}$) có glyxerol tổng hợp làm chất bảo quản lạnh. Để chuẩn bị ngân hàng tế bào, tất cả các giống cấy được phát triển trong môi trường đậu nành. Trước khi làm đông lạnh, tế bào được cô đặc bằng cách ly tâm, loại bỏ môi

trường đã sử dụng và tạo huyền phù lại các viên tế bào trong môi trường mới chứa chất bảo quản lạnh (ví dụ, glyxerol tổng hợp).

Nuôi cấy và thu hồi

Các giống cấy từ ngân hàng tế bào được chuẩn bị được sử dụng để cấy vào chai giống chứa môi trường đậu nành để nuôi cấy. Sau khi đạt được độ hấp thụ đích, chai giống được sử dụng để cấy vào thiết bị lên men chứa môi trường đậu nành. Việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ 34-38°C và tốc độ quay 120rpm trong khi duy trì độ pH ở khoảng 7,2 hoặc cao hơn sử dụng NaOH 3N. Thực hiện lấy mẫu mỗi 2-3 giờ để đo độ hấp thụ. Khi độ hấp thụ bắt đầu tăng mạnh, thực hiện lấy mẫu mỗi 0,5-1 giờ và đo độ hấp thụ. Kết thúc việc nuôi cấy trong khoảng 1 giờ sau khi độ hấp thụ đạt được giá trị nhất định và duy trì không đổi. Sau khi kết thúc nuôi cấy, thực hiện nuôi cấy bổ sung không điều chỉnh độ pH ở cùng điều kiện nhiệt độ và rpm cho đến khi đạt 5,5 hoặc thấp hơn. Sau khi kết thúc nuôi cấy bổ sung, thêm natri deoxycholat ở nồng độ 0,12% để ly giải tế bào. Dịch tan thu được theo cách đó được làm lạnh xuống 10-15°C, và sau đó ủ ở cùng nhiệt độ trong khoảng 3 giờ không khuấy để kết tủa protein. Sau đó, dịch tan thu được được ly tâm để loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào.

Tinh sạch

Dung dịch thu được bằng ly tâm được lọc sử dụng thiết bị lọc sâu để loại bỏ protein và mảnh vụn tế bào chưa được làm lắng trong khi ly tâm. Dịch lọc thu được được cô đặc sử dụng màng 100kDa, và sau đó dung dịch cô đặc thu được được đem đi siêu lọc sử dụng dung dịch đệm natri phosphat 25mM (độ pH 7,2). Thực hiện siêu lọc cho đến khi độ dẫn của chất thẩm tích đạt đến khoảng 3-4mS/cm, và áp suất xuyên màng (TMP) được thiết lập ở 0,5-1,5 bar hoặc nhỏ hơn. Loại bỏ tạp chất ra khỏi dung dịch thu được, và xetrimonium bromua (Hexadexyl-trimetylamoni bromua (HB)) được thêm vào dung dịch ở nồng độ khoảng 1,0% khối lượng/thể tích, sau đó khuấy trong khoảng 1 giờ. Sau đó, thực hiện ly tâm để làm kết tủa polysacarit. Viên thu được theo cách đó được hòa tan trong khoảng dung dịch nước natri clorua 0,25M và natri iodua (NaI) được thêm vào đó ở nồng độ khoảng 0,5% khối lượng/thể tích. Ly tâm dung dịch này để thu hồi dịch nổi, và cacbon hoạt tính được thêm từ từ vào dung dịch thu được ở nồng độ khoảng 2,0% khối lượng/thể tích trong khi khuấy, sau đó khuấy trong khoảng 1 giờ và lọc. Cô đặc dịch lọc thu được sử dụng màng 30kDa, và sau đó dung dịch cô đặc được đem đi siêu lọc sử dụng khoảng 10 lần thể tích của nước cất ba lần. Thực hiện siêu lọc cho đến khi độ dẫn của chất thẩm tích đạt khoảng 10µs/cm, và áp suất

xuyên màng (TMP) được thiết lập ở 0,5-1,5 bar hoặc nhỏ hơn. Lọc vô trùng dung dịch cô đặc thu được và bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn.

Tổng hàm lượng protein, tổng hàm lượng axit nucleic, tổng hàm lượng polysacarit, và hiệu suất tinh sạch được đánh giá trong mỗi bước tinh sạch được đưa ra trong các bảng từ 4 đến 6 dưới đây.

Bảng 4

Hàm lượng protein, hàm lượng axit nucleic, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 3

	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tỷ lệ hàm lượng của protein với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng axit nucleic (mg)	Tỷ lệ hàm lượng axit nucleic so với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng polysacarit (mg)	Hiệu suất tinh sạch (%)
Lọc sâu	581320,00	354,46	27354,00	16,68	164000,00	100,00
Cô đặc /siêu lọc 100KDa	6829,00	5,57	601,60	0,49	122600,00	74,76
CTAB/NaI	7322,00	7,44	204,00	0,21	98400,00	60,00
Cacbon hoạt tính	412,00	0,45	58,80	0,06	91600,00	55,85
Cô đặc /siêu lọc 30KDa	352,50	0,44	28,20	0,04	80400,00	49,30

Bảng 5

Hàm lượng protein, hàm lượng axit nucleic, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 6B

	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tỷ lệ hàm lượng của protein với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng axit nucleic (mg)	Tỷ lệ hàm lượng axit nucleic so với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng polysacarit (mg)	Hiệu suất tinh sạch (%)
--	-----------------------------	---	----------------------------------	---	---------------------------------	-------------------------

Lọc sâu	137280,00	65,37	4872,40	2,32	210000,00	100,00
Cô đặc /siêu lọc 100KDa	8986,00	4,59	576,26	0,29	195800,00	93,24
CTAB/NaI	7030,00	4,30	352,06	0,22	163600,00	77,90
Cacbon hoạt tính	1376,00	0,93	76,96	0,05	148400,00	70,67
Cô đặc /siêu lọc 30KDa	843,00	0,70	43,23	0,04	120000,00	67,57

Bảng 6

Hàm lượng protein, hàm lượng axit nucleic, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 19A

	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tỷ lệ hàm lượng của protein với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng axit nucleic (mg)	Tỷ lệ hàm lượng axit nucleic so với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng polysacarit (mg)	Hiệu suất tinh sạch (%)
Lọc sâu	1735640,00	2479,49	5053,30	7,22	70000,00	100,00
Cô đặc /siêu lọc 100KDa	10288,00	16,87	252,56	0,41	61000,00	87,14
CTAB/NaI	5528,00	10,31	593,54	1,11	53600,00	76,57
Cacbon hoạt tính	12,00	0,03	0,39	ND*	42400,00	60,57
Cô đặc /siêu lọc 30KDa	8,00	0,02	0,06	ND*	44650,00	60,86

ND*: không được phát hiện

Các kết quả của bảng 4 đến 6 cho thấy polysacarit vỏ thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế đáp ứng tiêu chuẩn về hàm lượng protein dư mà không cần sử dụng quy trình axit hóa tách rời bất kỳ khác và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ cũng lần lượt là 49% hoặc cao hơn (polysacarit vỏ kiểu huyết thanh 3), 65% hoặc cao hơn (polysacarit vỏ kiểu huyết thanh 6B), và 60% hoặc cao hơn (polysacarit vỏ kiểu huyết

thanh 19A). Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất hiệu quả polysacarit vỏ bằng quy trình được đơn giản hóa.

Ví dụ 2. Sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn 7F và 14

Chuẩn bị ngân hàng tế bào

Các nguồn giống tương ứng tạo kiểu huyết thanh phẩy cầu khuẩn 7F và 14 được thu từ American Type Culture Collection, ATCC. Các chủng được sử dụng trong nuôi cấy giống và nuôi cấy chính được nêu trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Kiểu huyết thanh	ATCC No.
7F	10351
14	6314

Các nguồn giống được nuôi cấy trong nhiều thế hệ (thế hệ F1, F2, và F3). Hai thế hệ bổ sung nguồn giống đã được tạo ra. Thế hệ bổ sung thứ nhất được nuôi cấy từ lọ F3, và thế hệ tiếp theo được nuôi cấy từ lọ của thế hệ bổ sung thứ nhất. Lọ giống được bảo quản đông lạnh ($<-70^{\circ}\text{C}$) có glyxerol tổng hợp làm chất bảo quản lạnh. Để chuẩn bị ngân hàng tế bào, tất cả các giống cấy được phát triển trong môi trường đậu nành. Trước khi làm đông lạnh, tế bào được cô đặc bằng cách ly tâm, loại bỏ môi trường đã sử dụng và tạo huyền phù lại cho các viên tế bào trong môi trường mới chứa chất bảo quản lạnh (ví dụ, glyxerol tổng hợp).

Nuôi cấy và thu hồi

Các giống cấy từ ngân hàng tế bào được chuẩn bị được sử dụng để cấy vào chai giống chứa môi trường đậu nành để nuôi cấy. Sau khi đạt được độ hấp thụ đích, chai giống được sử dụng để cấy vào thiết bị lên men chứa môi trường đậu nành. Việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ $34-38^{\circ}\text{C}$ và tốc độ quay 120rpm trong khi duy trì độ pH ở khoảng 7,2 hoặc cao hơn sử dụng NaOH 3N. Thực hiện lấy mẫu mỗi 2-3 giờ để đo độ hấp thụ. Khi độ hấp thụ bắt đầu tăng mạnh, thực hiện lấy mẫu mỗi 0,5-1 giờ và đo độ hấp thụ. Kết thúc việc nuôi cấy trong khoảng 1 giờ sau khi độ hấp thụ đạt được giá trị nhất định và duy trì không đổi. Sau khi kết thúc nuôi cấy, thực hiện nuôi cấy bổ sung không điều chỉnh độ pH ở cùng điều kiện nhiệt độ và rpm cho đến khi đạt 5,5

hoặc thấp hơn. Sau khi kết thúc nuôi cấy bỏ sung, thêm natri deoxycholat ở nồng độ 0,12% để ly giải tế bào. Dịch tan thu được theo cách đó được làm lạnh xuống 10-15°C, và sau đó ủ ở cùng nhiệt độ trong khoảng 3 giờ không khuấy để kết tủa protein. Sau đó, dịch tan thu được được ly tâm để loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào.

Tinh sạch

Dung dịch thu được do ly tâm được lọc sử dụng thiết bị lọc sâu để loại bỏ protein và mảnh vụn tế bào chưa được làm lắng trong khi ly tâm. Cô đặc dịch lọc thu được sử dụng màng 100kDa, và sau đó dung dịch cô đặc thu được được đem đi siêu lọc sử dụng dung dịch đệm natri phosphat 25mM (độ pH 7,2). Thực hiện siêu lọc cho đến khi độ dẫn của chất thẩm tích đạt khoảng 3-4mS/cm và áp suất xuyên màng (TMP) được thiết lập ở 0,5-1,5 bar hoặc nhỏ hơn. Loại bỏ tạp chất ra khỏi dung dịch thu được, và xetrimonium bromua (Hexadexyl-trimetylamoni bromua (HB)) được thêm vào ở nồng độ khoảng 1,0% khối lượng/thể tích sau đó khuấy trong khoảng 1 giờ và ly tâm để thu hồi dịch nổi. Sau đó, natri iodua (NaI) được thêm vào dịch nổi ở nồng độ khoảng 0,5% khối lượng/thể tích. Ly tâm dung dịch thu được để thu hồi dịch nổi, và cacbon hoạt tính được thêm từ từ vào dung dịch thu được ở nồng độ khoảng 2,0% khối lượng/thể tích trong khi khuấy, sau đó khuấy trong khoảng 1 giờ và lọc. Cô đặc dịch lọc thu được sử dụng màng 30kDa, và sau đó dung dịch cô đặc được đem đi siêu lọc sử dụng khoảng 10 lần thể tích nước cất ba lần. Thực hiện siêu lọc cho đến khi độ dẫn của chất thẩm tích đạt khoảng 10µS/cm và áp suất xuyên màng (TMP) được thiết lập ở 0,5-1,5 bar hoặc nhỏ hơn. Lọc vô trùng dung dịch cô đặc thu được và bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn.

Tổng hàm lượng protein, tổng hàm lượng axit nucleic, tổng hàm lượng polysacarit, và hiệu suất tinh sạch được đánh giá trong mỗi bước tinh sạch được đưa ra trong bảng 8 đến 9 sau đây.

Bảng 8

Hàm lượng protein, hàm lượng axit nucleic, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 7F

	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tỷ lệ hàm lượng của protein với polysacarit	Tổng hàm lượng axit nucleic (mg)	Tỷ lệ hàm lượng axit nucleic so với	Tổng hàm lượng polysacarit (mg)	Hiệu suất tinh sạch (%)
--	-----------------------------	---	----------------------------------	-------------------------------------	---------------------------------	-------------------------

		(%)		polysacarit (%)		
Lọc sâu	1861130,00	1604,42	4325,00	3,73	116000,00	100,00
Cô đặc /siêu lọc 100KDa	21352,00	21,39	546,80	0,55	99800,00	86,03
CTAB/NaI	5962,00	6,47	565,70	0,61	92200,00	79,48
Cacbon hoạt tính	428,00	0,50	269,67	0,32	85200,00	73,45
Cô đặc /siêu lọc 300KDa	259,00	0,42	21,30	0,03	61300,00	60,26

Bảng 9

Hàm lượng protein, hàm lượng axit nucleic, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 14

	Tổng hàm lượng protein (mg)	Tỷ lệ hàm lượng của protein với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng axit nucleic (mg)	Tỷ lệ hàm lượng axit nucleic so với polysacarit (%)	Tổng hàm lượng polysacarit (mg)	Hiệu suất tinh sạch (%)
Lọc sâu	138480,00	121,47	6609,40	5,80	114000,00	100,00
Cô đặc /siêu lọc 100KDa	10624,00	12,92	1369,61	1,67	82200,00	72,11
CTAB/NaI	3706,00	4,10	491,22	0,54	90400,00	79,30
Cacbon hoạt tính	656,00	0,99	274,56	0,42	66000,00	57,89

Cô đặc /siêu lọc 30KDa	209,00	0,41	68,09	0,13	50490,00	55,87
------------------------------	--------	------	-------	------	----------	-------

Các kết quả của bảng 8 và 9 thể hiện rằng polysacarit vỏ thu được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế đáp ứng các tiêu chuẩn về hàm lượng protein dư mà không cần thêm quy trình axit hóa tách rời bất kỳ, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ cũng lần lượt là 60% hoặc cao hơn (polysacarit vỏ kiểu huyết thanh 7F) và 55% hoặc cao hơn (polysacarit vỏ kiểu huyết thanh 14). Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất hiệu quả polysacarit vỏ bằng quy trình được đơn giản hóa.

Ví dụ 3. Sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 23F

Chuẩn bị ngân hàng tế bào

Nguồn giống sinh kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn 23F thu được từ American Type Culture Collection [ATTC, số 6323]. Các nguồn giống được nuôi cấy trong nhiều thế hệ (thế hệ F1, F2, và F3). Hai thế hệ bổ sung của nguồn giống đã được tạo ra. Thế hệ bổ sung thứ nhất được nuôi cấy từ lọ F3, và thế hệ tiếp theo được nuôi cấy từ lọ của thế hệ bổ sung thứ nhất. Lọ giống được bảo quản đông lạnh ($<-70^{\circ}\text{C}$) có glycerol tổng hợp làm chất bảo quản lạnh. Để chuẩn bị ngân hàng tế bào, tất cả các giống cấy được phát triển trong môi trường đậu nành. Trước khi làm đông lạnh, tế bào được cô đặc bằng cách ly tâm, loại bỏ môi trường đã sử dụng và tạo huyền phù lại các viên tế bào trong môi trường mới chứa chất bảo quản lạnh (ví dụ, glycerol tổng hợp).

Nuôi cấy và thu hồi

Các giống cấy từ ngân hàng tế bào được chuẩn bị được sử dụng để cấy vào chai giống chứa môi trường đậu nành để nuôi cấy. Sau khi đạt được độ hấp thụ đích, chai hạt giống được sử dụng để cấy vào thiết bị lên men chứa môi trường đậu nành. Việc nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ $34-38^{\circ}\text{C}$ và tốc độ quay 120rpm trong khi duy trì độ pH ở khoảng 7,2 hoặc cao hơn sử dụng NaOH 3N. Thực hiện lấy mẫu mỗi 2-3 giờ để đo độ hấp thụ. Khi độ hấp thụ bắt đầu tăng mạnh, thực hiện lấy mẫu mỗi 0,5-1 giờ và đo độ hấp thụ. Kết thúc việc nuôi cấy trong khoảng 1 giờ sau khi độ hấp thụ đạt được giá trị nhất định và duy trì không đổi. Sau khi kết thúc nuôi cấy, thực hiện nuôi cấy bổ sung không điều chỉnh độ pH ở cùng điều kiện nhiệt độ và rpm cho đến khi đạt 5,5 hoặc thấp hơn. Sau khi kết thúc nuôi cấy bổ sung, thêm natri deoxycholat ở nồng

độ 0,12% để ly giải tế bào. Dịch tan thu được theo cách đó được làm lạnh xuống 10-15°C, và sau đó ủ ở cùng nhiệt độ trong khoảng 3 giờ không khuấy để kết tủa protein. Sau đó, dịch tan thu được được ly tâm để loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào.

Tinh sạch

Dung dịch thu được bằng ly tâm được lọc sử dụng thiết bị lọc sâu để loại bỏ protein và mảnh vụn tế bào chưa được làm lắng trong khi ly tâm. Cô đặc dịch lọc thu được sử dụng màng 100kDa, và sau đó dung dịch cô đặc thu được được đem đi siêu lọc sử dụng dung dịch đệm natri phosphat 25mM (độ pH 7,2). Thực hiện siêu lọc cho đến khi độ dẫn của chất thẩm tích đạt khoảng 3-4mS/cm và áp suất xuyên màng (TMP) được thiết lập ở 0,5-1,5 bar hoặc nhỏ hơn. Loại bỏ tạp chất ra khỏi dung dịch thu được, và xetrimonium bromua (Hexadexyl-trimethylamoni bromua (HB)) được thêm vào ở nồng độ khoảng 2,5% khối lượng/thể tích, sau đó khuấy trong khoảng 1 giờ và ly tâm để kết tủa polysacarit. Viên thu được từ đó được hòa tan trong dung dịch nước natri clorua khoảng 0,25M, và thêm natri iodua (NaI) vào ở nồng độ khoảng 0,5% khối lượng/thể tích. Ly tâm dung dịch thu được để thu hồi dịch nổi, và cacbon hoạt tính được thêm từ từ vào dung dịch thu được ở nồng độ khoảng 2,0% khối lượng/thể tích trong khi khuấy, sau đó khuấy trong khoảng 1 giờ và lọc. Cô đặc dịch lọc thu được sử dụng màng 30kDa, và sau đó dung dịch cô đặc được đem đi siêu lọc sử dụng khoảng 10 lần thể tích nước cất ba lần. Thực hiện siêu lọc cho đến khi độ dẫn của chất thẩm tích đạt khoảng 10µS/cm và áp suất xuyên màng (TMP) được thiết lập ở 0,5-1,5 bar hoặc nhỏ hơn. Lọc vô trùng dung dịch cô đặc thu được và bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn.

Tổng hàm lượng protein, tổng hàm lượng axit nucleic, tổng hàm lượng polysacarit, và hiệu suất tinh sạch được đánh giá trong mỗi bước tinh sạch được nêu trong bảng 10 sau đây.

Bảng 10

Hàm lượng protein, hàm lượng axit nucleic, và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 23F

	Tổng hàm lượng protein	Tỷ lệ hàm lượng của protein với polysacarit	Tổng hàm lượng axit nucleic	Tỷ lệ hàm lượng axit nucleic so với	Tổng hàm lượng polysacarit	Hiệu suất tinh sạch
--	------------------------	---	-----------------------------	-------------------------------------	----------------------------	---------------------

	(mg)	(%)	(mg)	polysacarit (%)	(mg)	(%)
Lọc sâu	1667780,00	1437,74	5740,00	4,95	116000,00	100,00
Cô đặc/siêu lọc 100KDa	17798,00	17,28	442,90	0,43	103000,00	88,79
CTAB/NaI	7678,00	9,23	299,00	0,36	83200,00	71,72
Cacbon hoạt tính	ND*	ND*	137,20	0,18	77600,00	66,90
Cô đặc/siêu lọc 30KDa	ND*	ND*	5,605	0,01	55860,00	64,53

ND*: Không được phát hiện

Kết quả nêu trong bảng 10 cho thấy rằng polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh 23F thu được từ phương pháp sản xuất theo sáng chế đáp ứng các tiêu chuẩn về hàm lượng protein dư không cần sử dụng quy trình axit hóa bổ sung và tỷ lệ thu hồi polysacarit vỏ cũng là 60% hoặc cao hơn. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất hiệu quả polysacarit vỏ bằng quy trình được đơn giản hóa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất polysacarit vỏ có kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn, trong đó phương pháp bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy tế bào vi khuẩn sản xuất kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn trong khi duy trì độ pH của canh trường nuôi cấy nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,4;

(b) kết thúc nuôi cấy ở bước (a) ở thời điểm giữa lúc độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi và lúc độ hấp thụ bắt đầu giảm;

(c) thực hiện nuôi cấy bổ sung canh trường nuôi cấy ở bước (b) mà không điều chỉnh độ pH cho đến khi độ pH của canh trường nuôi cấy đạt đến độ pH bằng 5,5 hoặc thấp hơn;

(d) bổ sung chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để làm ly giải tế bào, làm kết tủa protein, và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào để thu được dịch tan tế bào đã làm trong; và

(e) tách và tinh sạch polysacarit vỏ từ dịch tan thu được từ bước (d).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kiểu huyết thanh phé cầu khuẩn là 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F hoặc 33F.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc nuôi cấy ở bước (a) được thực hiện ở nhiệt độ từ 34 đến 38°C có khuấy ở tốc độ 50 đến 150rpm.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước (b) được thực hiện bằng cách kết thúc việc nuôi cấy ở bước (a) trong 1 đến 3 giờ từ thời điểm khi độ hấp thụ của canh trường nuôi cấy duy trì không đổi.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc nuôi cấy bổ sung bước (c) được thực hiện ở nhiệt độ từ 34 đến 38°C có khuấy ở tốc độ 50 đến 150rpm không điều chỉnh độ pH.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất ly giải được sử dụng trong bước (d) là natri deoxycholat.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước (d) được thực hiện bằng cách thêm chất ly giải vào canh trường nuôi cấy thu được từ bước (c) để làm ly giải tế bào, sau khi ủ dịch

tan tế bào thu được ở nhiệt độ từ 10 đến 20°C trong 3 đến 24 giờ không khuấy để làm kết tủa protein, và loại bỏ protein kết tủa và mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc tách và tinh sạch của bước (e) bao gồm các bước:

(i) lọc dịch tan thu được từ bước (d) sử dụng thiết bị lọc sâu;

(ii) cô đặc dịch lọc thu được từ bước (i), sau đó siêu lọc và ly tâm;

(iii) cho dịch nổi thu được từ bước (ii) phản ứng với chất hoạt động bề mặt dạng cation, và sau đó ly tâm dung dịch thu được để thu viên hoặc dịch nổi chứa polysacarit vỏ;

(iv) cho polysacarit vỏ thu được từ bước (iii) phản ứng với natri iodua, sau đó ly tâm thu được dịch nổi;

(v) thêm cacbon hoạt tính vào dung dịch thu được từ bước (iv), sau đó lọc; và

(vi) cô đặc dịch lọc thu được từ bước (v), sau đó siêu lọc và ly tâm thu được polysacarit vỏ.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó việc cô đặc ở bước (ii) được thực hiện sử dụng màng 100kDa.

10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó việc cô đặc ở bước (vi) được thực hiện sử dụng màng 30kDa.

11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chất hoạt động bề mặt dạng cation được sử dụng trong bước (iii) là xetyltrimetylamoni bromua.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó xetyltrimetylamoni bromua được sử dụng ở nồng độ từ 0,5 đến 3,0%.

13. Phương pháp theo điểm 8, trong đó cacbon hoạt tính được sử dụng trong bước (v) được sử dụng ở nồng độ từ 1 đến 5% (khối lượng/thể tích).

FIG. 1

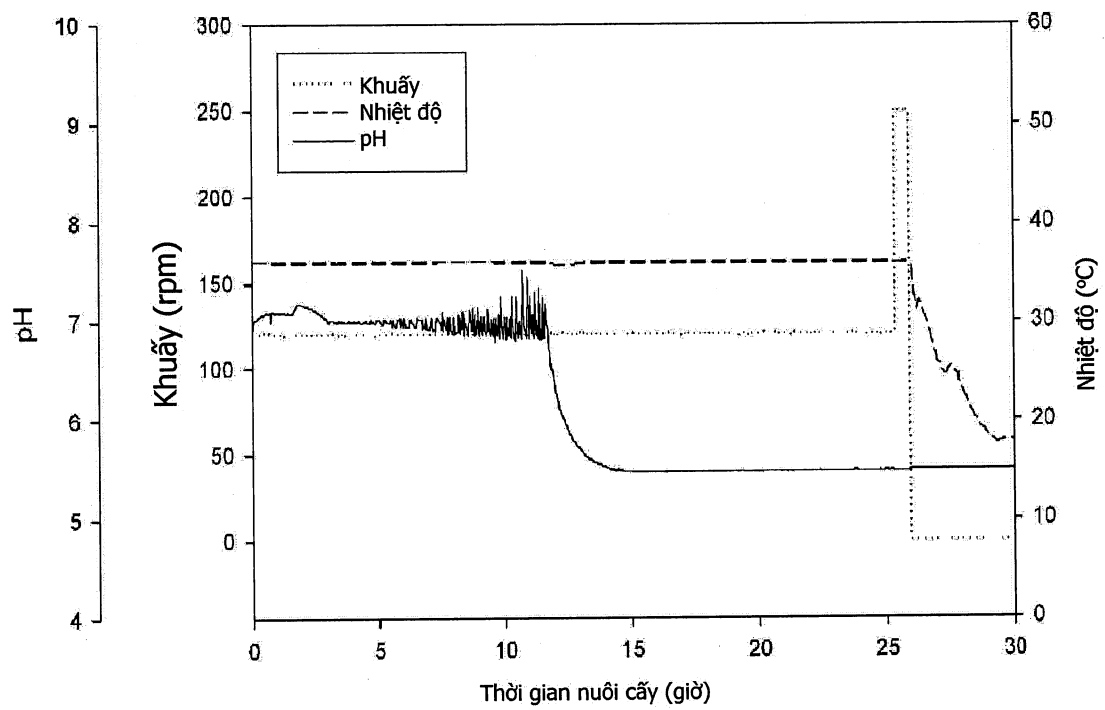


FIG. 2

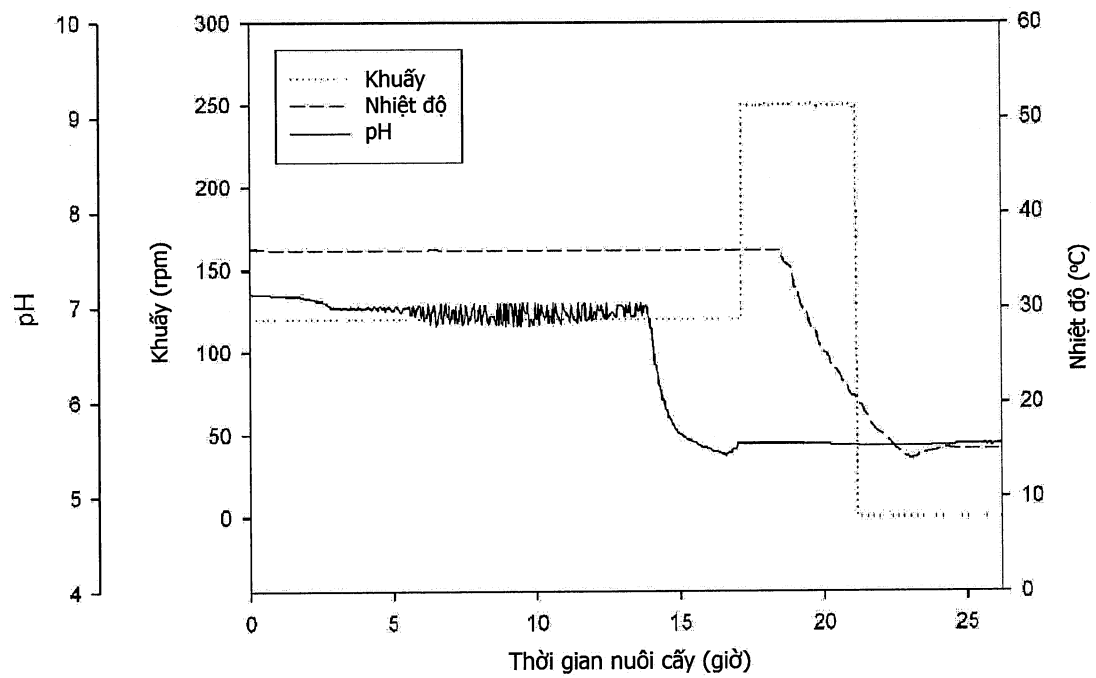


FIG. 3

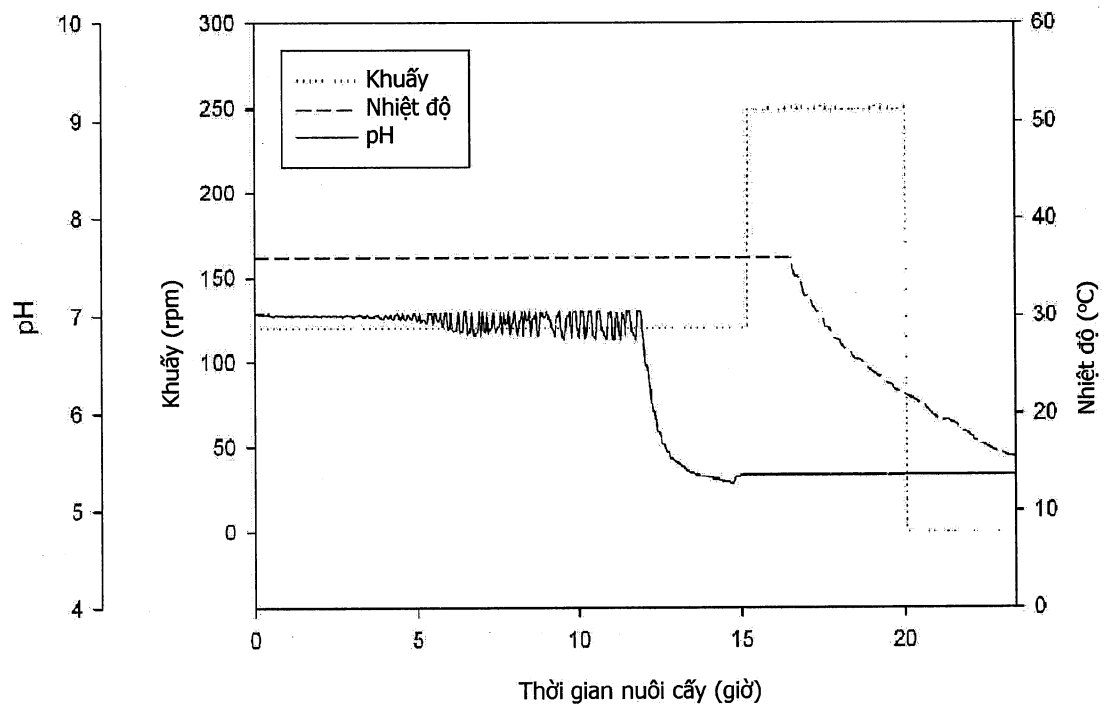


FIG. 4

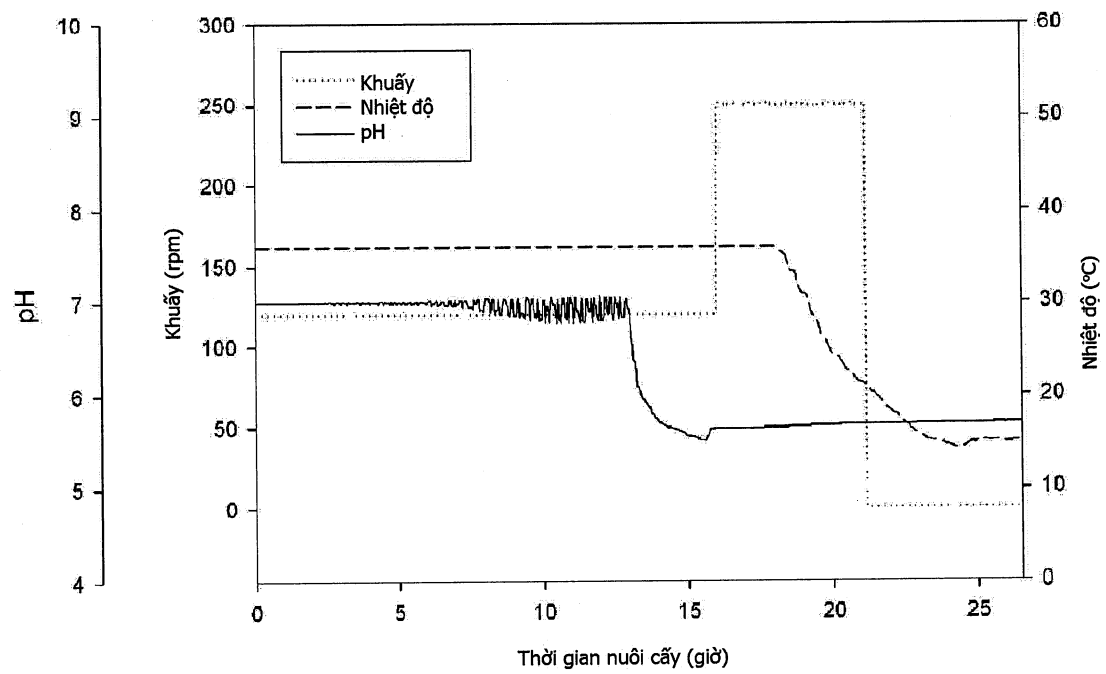


FIG. 5

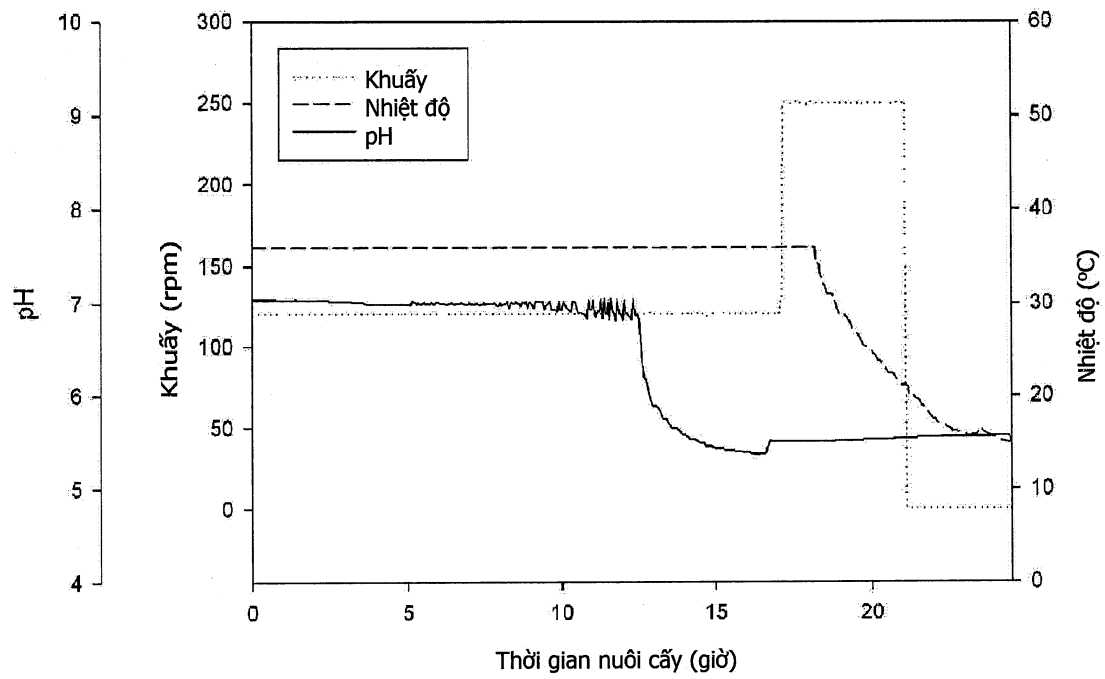


FIG. 6

