



(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)



1-0027245

(51)⁷ C12M 1/00; C12N 5/00; C12M 1/12;
A61L 2/00

(13) B

(21) 1-2015-00149

(22) 13/06/2013

(86) PCT/US2013/045663 13/06/2013

(87) WO/2013/192009 27/12/2013

(30) 61/662,814 21/06/2012 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/08/2015 329A

(73) 1. Baxalta Incorporated (US)

1200 Lakeside Drive, Bannockburn, IL 60015, United States of America

2. Baxalta GmbH (CH)

Thurgauerstrasse 130, CH-8152 Glattpark, Opfikon, Switzerland

(72) MUNDT, Wolfgang (AT); MITTERER, Artur (AT); REITER, Manfred (AT);

HASSLACHER, Meinhard (AT); GRILLBERGER, Leopold (AT); KREIL, Thomas (AT).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP LOẠI BỎ TẠP NHIỄM VIRUT RA KHỎI CHẾ PHẨM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virut ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào. Phương pháp này bao gồm bước đưa chế phẩm vào lọc trong thời gian ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virut có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến thiết bị lọc virut để lọc trong thời gian ít nhất là khoảng 24 giờ, trong đó thiết bị lọc virut này có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm, để loại bỏ tạp nhiễm virut ra khỏi chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, phương pháp lọc theo sáng chế được hoạt động ở dung tích ít nhất là khoảng 2000 L/m². Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào thu được theo phương pháp của sáng chế để nuôi cấy tế bào; sản xuất dược phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm cũng như trong thực phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào. Phương pháp này bao gồm bước đưa chế phẩm nêu trên vào lọc trong thời gian ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

An toàn về mặt virus học liên quan chủ yếu đến ngành công nghiệp dược phẩm sinh học. Bất chấp những nỗ lực nhằm giảm thiểu những rủi ro, các sự cố liên quan đến việc tạp nhiễm virus quy mô lớn đã làm tăng mối quan tâm đối với ngành công nghiệp này. Có nhiều vụ việc lớn bao gồm, ví dụ, vụ phát hiện tạp nhiễm Vesivirus 2117 năm 2009 của Genzyme trong nuôi cấy tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary: CHO) mà điều này đã làm Cerezyme® và Fabrazyme® tạm ngừng sản xuất và vụ tạp nhiễm circovirus 1 của lợn vào năm 2010 của Merck đối với vắc xin Rotarix®. Một khả năng là nguồn tạp nhiễm này là ở giai đoạn nuôi cấy tế bào. Ngoài mất mát về mặt kinh tế đối với các công ty sản xuất (một báo cáo đưa ra ước tính các công ty này đã mất khoảng trên một trăm triệu trên mỗi nồi phản ứng sinh học 10000 L bị tạp nhiễm cộng với tiền phạt từ các đại lý), mà các sự cố này còn đặt bệnh nhân vào vòng nguy hiểm đồng thời chặn đứng việc tiếp cận đối với sản phẩm dược phẩm sinh học (Liu et al., Biotechnol. Prog. 2000, 16, 425-434). Kết quả là, cần nâng cao giám sát và cần kỹ thuật mới nhằm phát hiện, ngăn ngừa và khắc phục hậu quả do tạp nhiễm virus gây ra.

Nói chung, tạp nhiễm virus có thể được phân ra thành lây nhiễm virus ngược hoặc lây nhiễm virus xuôi. Lây nhiễm xuôi có thể kiểm soát được bằng cách sử dụng hệ kín, tuy nhiên, lây nhiễm ngược đặc biệt khó kiểm soát và phát hiện kể cả bằng nhiều xét nghiệm. Tạp nhiễm virus cũng có thể bắt đầu từ việc sử dụng vật liệu có nguồn gốc từ động vật để sản xuất dược phẩm sinh học. Khi dòng tế bào

sản xuất không bị tạp nhiễm virus ngoại lai và quá trình sản xuất không sử dụng vật liệu có nguồn gốc từ động vật thì tạp nhiễm virus vẫn có thể xảy ra theo đường môi trường nuôi cấy tế bào. Ví dụ, môi trường tổng hợp có thể được bổ sung các yếu tố sinh trưởng tái tổ hợp mà yếu tố này được tạo ra trong hệ thống nuôi cấy có bổ sung huyết thanh, mặc dù môi trường không chứa protein này cũng có thể chứa dịch thủy phân protein được lọc. Tuy nhiên, sự tạp nhiễm virus cũng có thể xuất hiện trong môi trường hoàn toàn xác định được về mặt hóa học do lượng lớn môi trường nuôi cấy này lại được đóng trong các vật chứa chưa được tiệt trùng. Các thiết bị lọc cấp khử trùng truyền thống không được thiết kế hoặc không có khả năng loại bỏ tạp nhiễm virus một cách an toàn, do đó cần sử dụng các cách khác để đảm bảo tính an toàn về mặt virus học.

Việc phát hiện virus tự sinh tại một hoặc nhiều điểm kiểm soát trong quá trình sản xuất là tiêu chuẩn thực hành. Tuy nhiên, việc chỉ nhằm phát hiện sự tạp nhiễm virus là một cách xác định không tương xứng trong việc ngăn ngừa sự tạp nhiễm virus của sản phẩm được sinh học, đặc biệt là khi tạp nhiễm virus có mặt ở mức không phát hiện được, không xác định hoặc thấy rõ ràng tác nhân virus. Những tác nhân virus như vậy có thể không phát hiện được ngay cả bằng vi mảng ADN được thiết kế tối ưu đại diện cho một tập hợp lớn các loại virus đã được giải trình tự. Một thách thức đó là mức tạp nhiễm của virus mà có thể lây nhiễm được môi trường nuôi cấy tế bào là ở mức thấp và độ nhạy của phương pháp phân tích phát hiện bị hạn chế.

Chuẩn độ tạp nhiễm virus cao có thể không biểu thị ở dạng mà làm thay đổi các thông số nuôi cấy tế bào, ví dụ, mật độ nuôi cấy, chuẩn độ protein, ngoài phạm vi bình thường. Theo cách khác, phương pháp phân tích tạp nhiễm cần có tính đặc hiệu cao và cần các điều kiện khác nhau đối với từng loại virus. Khi bị tạp nhiễm virus, thiết bị, dung dịch và sản phẩm đều có thể bị hỏng, kéo theo mất hàng triệu đô la để thiết lập lại mẻ nuôi cấy, xử lý nước thải, mất doanh thu, và khử trùng. Việc sàng lọc virus một cách triệt để đối với vật liệu thô là rất khó do tính không đồng nhất và thể tích lớn của mẫu trong quy trình sản xuất dược phẩm sinh học.

Kỹ thuật loại bỏ virus có thể được phân thành hai nhóm: bất hoạt và lọc. Phương pháp bất hoạt nhằm loại bỏ hoàn toàn tính lây nhiễm virus, ngược lại phương pháp lọc nhằm giảm tải nhiễm virus một cách cơ học. Các phương pháp bất hoạt thường là bằng cách chiếu tia cực tím (ultraviolet: UV), tia gama, gia nhiệt, tăng hoặc giảm độ pH, hoặc cho tiếp xúc với dung môi/chất tẩy rửa. Trong trường hợp chiếu tia UV có thể loại bỏ một cách hiệu quả và hoàn toàn hoạt tính virus, nhưng lại có thể không thực hiện được trên quy mô lớn hoặc không thích hợp trong việc điều chế môi trường. Hấp khử trùng có khả năng áp dụng được đối với dung dịch bền nhiệt nhưng lại có thể làm biến đổi môi trường nhạy cảm với nhiệt. Một phương pháp khác đã biết đó là xử lý nhiệt không khắc nghiệt đó là xử lý ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn (high-temperature, short-time: HTST) nhưng lại cần đến thiết bị đắt tiền, tự động hóa và cần biện pháp hợp lý để giữ được đặc tính của môi trường. Việc cho tiếp xúc với độ pH thấp hoặc cao là không hiệu quả theo phổ tải nhiễm virus tiềm tàng và có thể tác động bất lợi đến chất lượng hoặc nồng độ mol của môi trường. Tương tự, việc cho tiếp xúc với dung môi/chất tẩy rửa cũng không phải là giải pháp phổ cập và chỉ có hiệu quả đối với virus có vỏ lipid. Như vậy, phương pháp lý tưởng là cần phải cân bằng được giữa chi phí đầu tư và hiệu quả loại bỏ virus trong vật liệu thô và phải là giải pháp phổ cập, không ảnh hưởng đến tốc độ phát triển hoặc sản lượng.

Phương pháp lọc giữ lại virus đưa ra một sự cân bằng thích hợp. Phương pháp này không gây ra sự thay đổi về mặt hóa học của thành phần môi trường và thích hợp để sử dụng đối với môi trường/dịch cấp miễn cảm với nhiệt. Hơn nữa, phương pháp lọc giữ lại virus là một giải pháp phổ cập khi hoạt động dựa trên nguyên tắc loại bỏ theo kích thước. Tuy nhiên, màng lọc giữ lại virus đắt (khoảng từ 2000 đến 5000 EUR trên m^2). Do đặc tính của lưu lượng riêng khi lọc thể tích môi trường lớn đã tạo ra phương pháp có tính kinh tế khi cấp vào nồi phản ứng sinh học quy mô lớn với lượng lớn thích hợp, theo chi phí diện tích màng cần thiết. Ví dụ, khi lọc virus này được kết nối hàng loạt để lọc môi trường ở cấp khử trùng, thì lọc virus tốt hơn nếu được thực hiện trong ngày làm việc, nghĩa là, tối đa là khoảng từ 2 đến 10 giờ sau khi điều chế môi trường với lượng lớn nhằm ngăn ngừa sự lây nhiễm

môi trường. Do đó, cần diện tích màng lọc lớn để đáp ứng được yêu cầu với khoảng thời gian hữu hạn, mà điều này làm tăng chi phí.

Bất ngờ là, các tác giả đã phát hiện ra rằng các nhược điểm của phương pháp lọc virus đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể khắc phục được bằng cách lọc chế phẩm tương ứng, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm. Nếu thể tích yêu cầu của chế phẩm tương ứng cần được lọc trong khoảng thời gian kéo dài hơn, ví dụ, trong ít nhất là 24 giờ, thì dung tích của thiết bị lọc virus tăng rất cao. Bất ngờ là, các tác giả sáng chế đã phát hiện thêm rằng có sự giảm chuẩn độ virus tổng thể đáng kể trong một thời gian dài. Điều này đặc biệt có lợi trong việc loại bỏ virus lây nhiễm ngược trong hệ thống nuôi cấy tế bào.

Do đó, phương pháp theo sáng chế tăng cường hiệu quả kinh tế của phương pháp lọc virus bằng cách tăng lượng vật liệu đưa vào và dung tích, một cách tương ứng. Phương pháp theo sáng chế hoạt động ở dung tích ít nhất là 2000 L/m², do đó giúp sử dụng tối đa thiết bị lọc virus năng suất cao, giảm một cách hiệu quả chi phí liên quan, và có khả năng tạo ra dung dịch ở quy mô lớn và dễ dàng kết nối được với quy trình sản xuất đang có.

Tác động lớn của phương pháp theo sáng chế và sử dụng sáng tạo thiết bị lọc khử trùng tương ứng trong quy trình sản xuất vô trùng, cụ thể là quy trình mà ở đó chế phẩm được khử trùng, ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào và dung dịch đậm, được sử dụng, có thể được hiểu rõ bằng ví dụ dưới đây. Ước tính rằng một mét vuông màng lọc virus có giá trung bình khoảng 3000 EUR và môi trường nuôi cấy tế bào được sử dụng có giá khoảng 10 EUR trên mỗi lít môi trường, khi đó chi phí cho 1000L môi trường được lọc virus là 13 EUR trên mỗi lít môi trường, điều này làm tăng chi phí hàng hóa đối với chế phẩm môi trường khoảng 30%. Nếu có thể lọc được 2000L bằng màng lọc virus thì khi đó chi phí giảm xuống còn 11,50 EUR. Khi tăng dung tích cao hơn, ví dụ, lên 5000 L sẽ làm giảm chi phí xuống còn dưới 0,6 EUR trên mỗi lít môi trường, điều này khiến cho chi phí gia tăng để tạo ra môi

trường được lọc virus giảm đáng kể. Kết quả là, chi phí cao do sử dụng thiết bị lọc virus, đặc biệt là loại bỏ sự lây nhiễm ngược của tạp nhiễm virus hoặc virus tiềm tàng, làm giảm đáng kể bằng cách tăng dung tích của phương pháp lọc virus theo sáng chế.

Sáng chế đã xác định được vấn đề của thiết bị lọc virus đó là chi phí cao và năng suất thấp, một cách tương ứng. Dung tích của thiết bị lọc virus có thể tăng được bằng cách tiến hành lọc virus trong ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm. Bất ngờ là, các tác giả đã phát hiện ra rằng dung tích của thiết bị lọc virus đất tiền được sử dụng có thể được khai thác tốt hơn dẫn đến tăng dung tích từ 2 đến 100 lần trong khi vẫn giữ được tính ổn định của thiết bị lọc. Mặc dù chỉ cần dung tích từ 2 đến 3 lần là đã có tác động lớn đến quy trình sản xuất và chi phí sản xuất liên quan, nhưng với phương pháp theo sáng chế có thể tăng dung tích lên tới 100 lần hoặc thậm chí cao hơn. Điều này dẫn đến cơ hội lớn giúp loại bỏ virus với chi phí hiệu quả ngay cả với thiết bị lọc virus đất tiền mà hiện đang được sử dụng để cải thiện nhiều hơn độ an toàn về mặt virus học trong quy trình nuôi cấy tế bào, cụ thể là trong việc loại bỏ virus lây nhiễm ngược trong quy trình nuôi cấy tế bào, sản xuất dược phẩm, chế phẩm chẩn đoán, và/hoặc mỹ phẩm và thực phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các vấn đề nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất đến phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào. Phương pháp này bao gồm bước đưa chế phẩm nêu trên vào lọc trong thời gian ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm được sử dụng để lọc ít nhất là khoảng 24 giờ nhằm loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào thu được theo phương pháp bất kỳ của sáng chế để nuôi cấy tế bào; sản xuất được phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm cũng như trong thực phẩm.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được hoạt động ở dung tích ít nhất là khoảng 2000 L/m², tốt hơn nếu ít nhất là khoảng 3000 L/m², tốt nhất nếu ít nhất là khoảng 5000 L/m². Ngoài ra, chế phẩm này được đưa vào lọc và quy trình lọc này được thực hiện, một cách tương ứng, trong ít nhất là khoảng 24 giờ hoặc trong thời gian ít nhất là từ 48 giờ đến 7 tháng hoặc từ 72 giờ đến 3 tháng. Quy trình lọc này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 60°C, hoặc khoảng từ 10 đến 40°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 15 đến 37°C.

Theo các phương án của sáng chế, quy trình lọc được thực hiện ở áp suất nằm trong khoảng từ 100 mbar đến 4000 mbar, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 200 mbar đến 3500 mbar, tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 1000 mbar đến 3000 mbar.

Theo tất cả các phương án của sáng chế, thiết bị lọc virus được sử dụng này thu được ít nhất một trị số giảm 1Log₁₀ (Log₁₀ reduction value: LRV) đối với sự tập nhiễm virus.

Bất ngờ là, các tác giả đã phát hiện ra rằng dung tích của thiết bị lọc virus có thể tăng rất cao khi hoạt động quy trình lọc trong ít nhất là khoảng 24 giờ. Thông thường, chế phẩm để nuôi cấy tế bào ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào về lượng lớn hoặc dung dịch đậm được lọc theo mẻ trong khoảng từ 2 đến 10 giờ sau khi điều chế một lượng lớn chế phẩm tránh tập nhiễm chế phẩm bằng sự phát triển của vi khuẩn hoặc virus. Điều này cho thấy rằng, trong thực tiễn, dung tích cực đại của thiết bị lọc virus được sử dụng hầu như không được khai thác triệt để trong quá trình lọc để lọc chế phẩm tương ứng trong khoảng thời gian từ 2 đến 10 giờ. Do đó, đã sử dụng diện tích màng lớn hơn quá mức cần thiết. Ngược lại, các tác giả đã phát hiện ra rằng, do sử dụng phương pháp theo sáng chế, dung tích của thiết bị lọc virus đất tiền được sử dụng có thể được khai thác tốt hơn dẫn đến tăng từ 2 đến 100 lần trong khi vẫn giữ được tính ổn định của thiết bị lọc. Mặc dù chỉ cần tăng dung

tích từ 2 đến 3 lần đã có tác động lớn đến quy trình sản xuất và chi phí sản xuất liên quan, nhưng phương pháp theo sáng chế có thể đạt được dung tích tăng lên tới 100 lần hoặc thậm chí cao hơn. Điều này đã mở ra cơ hội lớn giúp loại bỏ virus với chi phí hiệu quả ngay cả với thiết bị lọc virus đắt tiền hiện đang được sử dụng nhằm cải thiện hơn độ an toàn virus trong quy trình nuôi cấy tế bào, cụ thể là trong việc loại bỏ virus lây nhiễm ngược trong quy trình nuôi cấy tế bào, sản xuất dược phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm và thực phẩm.

Các phương án ưu tiên cụ thể theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng với phần mô tả chi tiết và các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mô tả chi tiết về sáng chế được thực hiện dựa trên các phương án được nêu làm ví dụ cụ thể được minh họa trong các hình vẽ kèm theo. Các hình vẽ này là một phần của bản mô tả. Tuy nhiên, cũng lưu ý rằng các hình vẽ kèm theo này chỉ nhằm giải thích các phương án được đưa ra làm ví dụ của sáng chế và do đó không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

FIG.1 là hình vẽ thể hiện động lực học của quy trình lọc virus được thực hiện bằng cách áp dụng quy trình lọc virus kiểm soát dòng chảy (Fig.1C) bằng cách sử dụng các thiết bị lọc khác nhau kết hợp với môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung 3 lô dịch thủy phân đậu nành khác nhau (Kerry HyPep1510 #1, DOMO SE50 MAF UF #1 và #2).

Thiết bị lọc và điều kiện thử nghiệm được áp dụng (xem thêm từ Ví dụ 1 đến Ví dụ 4):

Thiết bị lọc A: Sartorius Virosart CPV, 180 cm²; ở nhiệt độ 30°C với lưu lượng khoảng 30 L/(m² x giờ).

Thiết bị lọc B: Millipore Viresolve NFP 3,1 cm²; ở nhiệt độ 30°C với lưu lượng khoảng từ 40 đến 60 L/(m² x giờ). Quy trình lọc có thể thực hiện được tối đa lên tới 9 ngày hoặc cho đến khi áp suất vượt quá 2000 mbar. Fig.1A thể hiện dung tích theo thể tích được lọc trên diện tích bề mặt màng lọc theo thời gian, nằm

trong khoảng thấp nhất là từ 4000 L/ m² đến 12000 L/ m². Áp suất cao nhất tại cuối quy trình lọc nằm trong khoảng từ 600 mbar đến 2400 mbar tùy theo loại thiết bị lọc (Fig.1B). Nói chung, có sự khác biệt khá nhỏ đối với dịch thủy phân đậu nành về dung tích và áp suất cao nhất.

FIG.2 là hình vẽ thể hiện động lực lọc virus được thực hiện bằng cách áp dụng quy trình lọc virus kiểm soát dòng chảy (Fig.2C) bằng cách sử dụng các thiết bị lọc khác nhau và môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung 3 lô dịch thủy phân đậu nành khác nhau (Kerry HyPep 1510 #1, DOMO SE50 MAF UF #1 và #2).

Thiết bị lọc và các điều kiện thử nghiệm được áp dụng (xem thêm từ Ví dụ 1 đến Ví dụ 4):

Thiết bị lọc A: Sartorius Virosart CPV, 180 cm²; ở nhiệt độ 30°C với lưu lượng khoảng 30 L / (m² x giờ).

Thiết bị lọc D: Asahi BioEX 10 cm²; ở nhiệt độ môi trường (khoảng 22°C) với lưu lượng khoảng 20 L / (m² x giờ). Ngược lại, đối với các thử nghiệm được mô tả trên Fig.1, quy trình lọc được thực hiện trong khoảng thời gian kéo dài hơn lên tới 81 ngày hoặc cho đến khi đạt tới áp suất 2000 mbar. Fig.2A thể hiện dung tích theo thể tích được lọc trên diện tích bề mặt màng lọc theo thời gian, nằm trong khoảng thấp nhất từ 16000 L / m² (đối với thiết bị lọc A bằng DOMO SE50 MAF #2) đến 35000 L/ m² (đối với thiết bị lọc D với cả ba lô dịch thủy phân đậu nành khác nhau). Áp suất cao nhất tại thời điểm cuối của quy trình lọc nằm trong khoảng từ 1200 mbar đến 2000 mbar tùy theo loại thiết bị lọc (Fig.2B). Nói chung, có sự khác biệt khá nhỏ đối với dịch thủy phân đậu nành về dung tích và áp suất cao nhất.

FIG.3 là đồ thị thể hiện mối tương quan giữa dòng chảy ra và áp suất khác nhau quan sát được ở nhiệt độ khoảng 22°C bằng cách sử dụng thiết bị lọc A (Sartorius Virosart CPV 180 cm²) và môi trường chứa dịch thủy phân đậu nành DOMO SE50 MAF UF, Lot #2 (xem Ví dụ 5). Cần một sự thay đổi áp suất tối thiểu khoảng 100 mbar để phát hiện được sự thay đổi về lưu lượng riêng tối thiểu,

mà tiếp đó tăng một cách dần dần với tỷ lệ tương quan tuyến tính giữa lưu lượng riêng và chênh lệch áp suất.

FIG. 4 là hình vẽ thể hiện sự khác biệt giữa quy trình lọc kiểm soát lưu lượng và quy trình lọc kiểm soát áp suất bằng cách sử dụng thiết bị lọc A (Sartorius CPV, 180 cm²) và môi trường có dịch thủy phân đậu nành Kerry HyPep 1510 #2 (xem các ví dụ từ Ví dụ 1 đến Ví dụ 4). Quy trình lọc được thực hiện trong 19 ngày và đạt dung tích nằm trong khoảng từ 6000 đến 7000 L/m². Áp suất cuối của quy trình lọc kiểm soát dòng chảy tương ứng với áp suất của quy trình lọc kiểm soát áp suất (xem Fig.4B), và lưu lượng riêng cuối cùng của quy trình lọc kiểm soát áp suất tương ứng với lưu lượng của quy trình lọc virus kiểm soát lưu lượng (xem Fig. 4C). Điều này chứng tỏ rằng cả hai phương pháp lọc virus có kiểm soát đều có thể thu được dung tích tương đương.

FIG.5 là hình vẽ thể hiện kết quả của thử nghiệm trong nồi phản ứng sinh học 10 L bằng cách sử dụng môi trường lọc virus so với môi trường không được lọc virus được mô tả trong Ví dụ 6. Môi trường nuôi cấy tế bào được lọc theo mẻ bằng thiết bị lọc A trước khi bắt đầu thử nghiệm. Các thử nghiệm này được thực hiện song song bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào được bổ sung 3 dịch thủy phân đậu nành khác nhau (Kerry HyPep 1510, Lot#1; DOMO SE50 MAF UF, Lot#1 và DOMO SE50 MAF UF, Lot#2). Dữ liệu được tính theo ba tuần cuối sau 4 tuần nuôi cấy tế bào liên tục. Không có sự khác biệt giữa môi trường được lọc tương ứng (Soy 1 NF, Soy 3 NF và Soy 2 NF) so với các môi trường đối chứng mà không được lọc virus của chúng (Soy 1, Soy 3 và Soy 2) mà có thể phát hiện được đối với năng suất riêng (Fig.5A), năng suất thể tích (Fig.5B) và tốc độ sinh trưởng riêng (Fig.5C).

FIG.6 là hình vẽ thể hiện kết quả của thử nghiệm trong nồi phản ứng sinh học 120 L bằng cách sử dụng môi trường được lọc virus so với môi trường không được lọc virus trong Ví dụ 7. Môi trường nuôi cấy tế bào được lọc virus trực tiếp trên đường cấp môi trường của nồi phản ứng sinh học bằng cách sử dụng thiết bị lọc E (Sartorius Virosart CPV, 2000 cm²) và thiết bị lọc F (Millipore Viresolve NFP 850

cm²) trong khoảng 58 ngày theo chế độ lọc liên tục. Khoảng thời gian và dung tích của môi trường cấp được lọc virus được thể hiện trên Fig.6A. Dữ liệu được tính theo khoảng thời gian bằng cách sử dụng các thiết bị lọc khác nhau. Không có sự khác biệt giữa môi trường được lọc virus tương ứng so với môi trường đối chứng không được lọc virus và có thể phát hiện được tốc độ sinh trưởng riêng (Fig.6B) và năng suất thể tích (Fig.6C).

FIG.7 là hình vẽ thể hiện sự thay đổi chuẩn độ lây nhiễm MMV [TCID₅₀/mL] phát hiện được trong mẫu dịch lọc liên tục được lấy ra trong quá trình lọc môi trường gây nhiễm MMV chứa dịch thủy phân đậu nành DOMO SE50 MAF#5 UF bằng thiết bị lọc G (ASAHI Planova 15N) (xem Ví dụ 8). Quan sát thấy có một mức virus thấp lọt qua trong vòng từ 2 đến 3 ngày. Tuy nhiên, việc loại bỏ virus này được xem là có hiệu quả.

FIG.8 là hình vẽ thể hiện sự thay đổi chuẩn độ lây nhiễm MMV [TCID₅₀/mL] phát hiện được trong mẫu dịch lọc liên tục được lấy ra trong quá trình lọc môi trường gây nhiễm MMV chứa dịch thủy phân đậu nành (lần chạy #1 bằng dịch thủy phân đậu nành DMV SE50 MAF UF #5; lần chạy #2 bằng dịch thủy phân đậu nành DMV SE50 MAF UF #4) với thiết bị lọc D (Asahi BioEX) (xem Ví dụ 9). Không thấy có virus lọt qua và việc loại bỏ virus này được xem là có hiệu quả và triệt để.

FIG.9 là hình vẽ thể hiện sự thay đổi chuẩn độ lây nhiễm MMV [TCID₅₀/mL] phát hiện được trong mẫu dịch lọc liên tục được lấy ra trong quá trình lọc môi trường gây nhiễm MMV như được mô tả trong Ví dụ 10. Không thấy có virus lọt qua đối với các lần chạy #1 và #2 (thiết bị lọc D), kết quả là việc loại bỏ virus này ra khỏi môi trường chứa dịch thủy phân đậu nành được xem là có hiệu quả và triệt để. Có một mức virus thấp lọt qua đối với các lần chạy #3 và #4 (thiết bị lọc I) và lần chạy #5 và #6 (thiết bị lọc G) kết quả là việc loại bỏ virus ra khỏi môi trường chứa dịch thủy phân đậu nành là có hiệu quả nhưng chưa triệt để. Quan sát thấy có mức virus lọt qua đáng kể đối với các lần chạy #7 (thiết bị lọc B) và lần chạy #8 (thiết bị lọc H) kết quả hệ số loại bỏ virus được giảm xuống đến giới hạn có nghĩa.

Tuy nhiên chỉ sử dụng các thiết bị lọc có trị số giảm tổng thể ít nhất trong một thử nghiệm lớn hơn khoảng 1 log TCID₅₀/mL.

Bảng 1: Kết hợp thiết bị lọc virus và dịch thủy phân đậu nành trong thử nghiệm gây nhiễm

Thử nghiệm #	Thiết bị lọc	Lô dịch thủy phân đậu nành	Trị số giảm tổng thể [log ₁₀ (TCID ₅₀ / mL)]
1	D	7	>5,1
2	D	6	>4,6
3	I	3	4,5
4	I	5	>5,4
5	G	7	4,4
6	G	7	4,1
7	B	6	1,5
8	H	3	1,2

FIG.10 là hình vẽ thể hiện động lực học của quy trình lọc virus được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 11. Áp suất được duy trì trong khoảng từ 0,8 đến 1,2 bar (trung bình 1,1 bar) ngoại trừ áp suất nội tại và ngưng dòng chảy, trường hợp xấu nhất của tình trạng vận hành. Lưu lượng ban đầu đạt được khoảng 38 L/(m² x giờ), và giảm từ từ cho đến khi kết thúc thử nghiệm, tuy nhiên, có thể duy trì được lưu lượng thấp nhất 4 L/(m² x giờ). Toàn bộ quá trình kể cả ngắt áp lực là 30 ngày. Có khoảng 6500 L/m² được lọc qua thiết bị lọc.

FIG.11 là hình vẽ thể hiện sự thay đổi chuẩn độ lây nhiễm MMV [log₁₀(TCID₅₀/mL)] phát hiện được trong mẫu dịch lọc liên tục được lấy ra trong quá trình lọc môi trường gây nhiễm MMV được mô tả trong Ví dụ 11. Không thấy có virus lọt qua trong 20 phân đoạn bất kỳ được phân tích. Tải lượng virus nằm trong khoảng < 0,9 [log₁₀(TCID₅₀)] đến < 2,8 [log₁₀(TCID₅₀)] tùy theo thể tích phân đoạn. Tổng tải lượng virus trong dịch lọc là < 3,0 [log₁₀(TCID₅₀)] mà - khi trừ đi tải lượng virus ban đầu của vật liệu gây nhiễm (nghĩa là 8,5 [log₁₀(TCID₅₀)] -

đây là kết quả theo yếu tố giảm virus tổng thể $>5,5 \log_{10}$. Kết quả này được xem là có hiệu quả và triệt để.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào. Phương pháp này bao gồm bước đưa chế phẩm nêu trên vào lọc trong ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm sử dụng để lọc trong ít nhất là 24 giờ nhằm loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào thu được theo phương pháp bất kỳ theo sáng chế để làm môi trường nuôi cấy tế bào; sản xuất dược phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm cũng như trong thực phẩm.

Theo tất cả các phương pháp án của sáng chế, chế phẩm được đưa vào lọc virus, quy trình lọc virus hoặc thiết bị lọc virus được tiến hành ít nhất là khoảng 24 giờ, khoảng 48 giờ, khoảng 72 giờ, khoảng 4 ngày, khoảng 5 ngày, khoảng 6 ngày, khoảng 7 ngày, khoảng 1 tuần, khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, khoảng 1 tháng, khoảng 2 tháng, khoảng 3 tháng, khoảng 4 tháng, khoảng 5 tháng, khoảng 6 tháng hoặc khoảng 7 tháng. Ngoài ra, theo một phương án, chế phẩm được đưa vào lọc virus hoặc quy trình lọc virus được thực hiện trong thời gian từ 1 tuần đến 3 tuần, khoảng từ 2 tuần đến 3 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần, khoảng từ 2 tuần đến 4 tuần, khoảng từ 1 tuần đến 7 tháng, khoảng từ 1 tháng đến 5 tháng, khoảng từ 2 tháng đến 5 tháng, khoảng từ 2 tháng đến 4 tháng, khoảng từ 2 tháng đến 3 tháng hoặc ít nhất khoảng từ 24 giờ đến 7 tháng hoặc khoảng từ 48 giờ đến 5 tháng hoặc khoảng từ 72 giờ đến 3 tháng. Hơn nữa, theo một phương án, chế phẩm được đưa vào lọc virus hoặc quy trình lọc virus này được thực hiện lâu hơn khoảng

từ 48 giờ đến 7 tháng, tốt hơn nếu khoảng từ một tuần đến 5 tháng hoặc khoảng từ 3 tuần đến 3 tháng hoặc khoảng từ 2 tháng đến 3 tháng.

Phương pháp theo sáng chế có thể được hoạt động ở dung tích ít nhất là khoảng 2000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 3000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 4000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 5000 L/m², ít nhất là khoảng 7500 L/m², ít nhất là khoảng 10000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 20000 L/m². Theo khía cạnh này, “dung tích” dùng để chỉ thể tích của dung dịch có thể được lọc qua diện tích xác định của màng thiết bị lọc virus trước khi dòng dịch lọc này bị giảm đi hoặc lực cản tăng đến mức không mong muốn do tắc màng của thiết bị lọc.

Được dự định theo sáng chế là bao hàm các phương án có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các hướng tiếp cận đã biết khác trong lĩnh vực kỹ thuật này để giảm thiểu tạp nhiễm virus, ví dụ, sàng lọc, sàng lọc từ nguồn, phát hiện, bắt hoạt virus, bắt giữ bằng cách hấp thụ, v.v.. Phương pháp theo sáng chế hướng đến việc loại bỏ tác nhân virus không mong muốn thông qua chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong giai đoạn đầu của quy trình sản xuất và đưa ra một cơ chế làm giảm virus tạp nhiễm. Các ưu điểm của sáng chế là dễ dàng thực hiện được với lượng lớn, làm giảm diện tích của màng lọc cần thiết theo thể tích đã cho của chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, giúp làm giảm chi phí phát sinh kéo theo. Cụ thể, phương pháp lọc virus của chế phẩm theo sáng chế dễ dàng kết nối được với quy trình sản xuất liên tục, ví dụ, quy trình nuôi cấy tế bào liên tục như là truyền dịch hoặc bổ sung liên tục dưỡng chất như là hệ thống nuôi phản ứng sinh học.

Thuật ngữ “nhiệt độ” được sử dụng theo sáng chế dùng để chỉ nhiệt độ của chế phẩm được lọc theo sáng chế, ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào hoặc dung dịch đậm, tại thời điểm chảy qua thiết bị lọc virus. Theo một phương án của sáng chế, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 2°C đến 60°C. Theo một phương án, giới hạn dưới của khoảng nhiệt độ này là khoảng 2°C, khoảng 4°C, khoảng 8°C, khoảng 10°C, khoảng 15°C, khoảng 20°C, khoảng 22°C, khoảng 25°C, khoảng

30°C, khoảng 37°C hoặc khoảng 40°C. Giới hạn trên của khoảng nhiệt độ theo sáng chế là khoảng 10°C, khoảng 20°C, khoảng 22°C, khoảng 25°C, khoảng 30°C, khoảng 37°C, khoảng 40°C, khoảng 50°C hoặc khoảng 60°C. Theo một phương án, nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 4°C đến 45°C, hoặc ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 40°C, hoặc nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C, hoặc nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C. Tương tự, theo một phương án, nhiệt độ này là nhiệt độ môi trường, mà nhiệt độ này nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C. Tất nhiên, phương án cũng được ưu tiên nếu chế phẩm này được đưa vào lọc mà không cần gia nhiệt hoặc làm nguội thêm. Do đó, theo một phương án khác, nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 30°C được sử dụng tùy theo nhiệt độ của vị trí tương ứng mà tại đó quy trình lọc được tiến hành. Theo một phương án khác, nhiệt độ được sử dụng nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C, ví dụ, bằng cách gia nhiệt sơ bộ chế phẩm dạng lỏng trước khi lọc. Dịch lọc thu được từ quy trình lọc này có thể được cấp liên tục vào nồi phản ứng sinh học.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp lọc được tiến hành ở áp suất nằm trong khoảng từ khoảng 100 mbar đến 4000 mbar, hoặc nằm trong khoảng từ 200 mbar đến 3500 mbar. Theo một phương án, quy trình lọc virus này được tiến hành ở mức áp suất, trong đó giới hạn dưới là khoảng 100 mbar, khoảng 200 mbar, khoảng 500 mbar, khoảng 1000 mbar, khoảng 1200 mbar, khoảng 1500 mbar, khoảng 2000 mbar, khoảng 2500 mbar hoặc khoảng 2800 mbar. Giới hạn trên là khoảng 1200 mbar, khoảng 1500 mbar, khoảng 2000 mbar, khoảng 2500 mbar, khoảng 2800 mbar hoặc khoảng 3000 mbar. Theo một phương án, quy trình lọc được tiến hành ở áp suất nằm trong khoảng từ 1000 đến 4000 mbar, khoảng từ 1500 đến 3500 mbar, khoảng từ 1700 mbar đến 3300 mbar hoặc khoảng từ 1000 mbar đến 2000 mbar.

Theo các phương án khác của sáng chế, có thể điều chỉnh áp suất và nhiệt độ để điều chỉnh dung tích và lưu lượng riêng. Những cải tiến khác về dung tích và khoảng thời gian sử dụng của thiết bị lọc virus có thể thu được bằng cách điều chỉnh các thông số xử lý khác, như áp suất và nhiệt độ lọc. Ví dụ, đã thấy rằng theo

một số phương án, tốt hơn nếu đưa chế phẩm vào lọc ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 40°C ở áp suất nằm trong khoảng từ 1000 mbar đến 2000 mbar.

Các thử nghiệm lọc sơ bộ đã chứng minh được rằng ảnh hưởng của chế phẩm được lọc đến lưu lượng riêng. Đã thu được lưu lượng tăng khoảng từ 50 đến 100% khi tăng nhiệt độ lọc của chế phẩm theo sáng chế có nhiệt độ bảo quản bằng khoảng từ 4°C đến nhiệt độ khoảng từ 18°C đến 37°C. Tuy nhiên, trong tất cả các phương án nằm trong phạm vi này, việc sử dụng quy trình lọc ít nhất là khoảng 24 giờ cho thấy hiệu quả về dung tích của thiết bị lọc virus đất tiền được sử dụng có thể được khai thác tốt hơn dẫn đến tăng từ 2 đến 100 lần dung tích trong khi vẫn duy trì được tính ổn định của thiết bị lọc.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, phương pháp này bao gồm bước đưa chế phẩm nêu trên vào lọc trong khoảng thời gian ít nhất là khoảng từ 10 ngày đến 2 tháng qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm ở áp suất nằm trong khoảng từ 1000 mbar đến 2000 mbar và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 40°C có dung tích ít nhất là 2000 L/m². Tất nhiên, tất cả các thông số khác cũng có thể được kết hợp với phương án này. Ngoài ra, theo một phương án được ưu tiên khác, phương pháp theo sáng chế được tiến hành theo chế độ lọc liên tục, trong đó chế phẩm được ưu tiên là môi trường nuôi cấy tế bào, ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào chứa dịch thủy phân đậu nành hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chứa thành phần có nguồn gốc từ động vật, trong đó dịch lọc được cấp một cách liên tục vào nồi phản ứng sinh học, cụ thể là bể phản ứng bổ sung liên tục chất dinh dưỡng. Theo một phương án khác, phương án này có thể còn được tiến hành bằng cách sử dụng ít nhất hai thiết bị lọc virus được bố trí nối tiếp hoặc song song.

Dự tính rằng, quy trình lọc virus được mô tả theo sáng chế có thể được sử dụng để làm giảm sự tạp nhiễm virus từ chế phẩm bất kỳ là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, nghĩa là môi trường và dung dịch đệm thích hợp đối với sự phát triển của tế bào động vật, tốt hơn nếu đó

là tế bào động vật có vú, trong môi trường nuôi cấy tế bào *in vitro*. Thông thường, môi trường nuôi cấy chứa dung dịch đệm, muối, nguồn năng lượng, axit amin, vitamin và các thành phần vi lượng cần thiết khác.

Thuật ngữ “chế phẩm” cũng bao gồm thành phần bất kỳ có thể là một phần có thể có trong môi trường nuôi cấy tế bào trong phạm vi của sáng chế và có khả năng hỗ trợ sự phát triển của tế bào thích hợp trong môi trường nuôi cấy. Chế phẩm nêu trên bao gồm, ví dụ, dung dịch đệm hoặc dung dịch chứa ít nhất một loại protein hoặc axit amin; dung dịch chứa ít nhất một loại vitamin; dung dịch chứa ít nhất một loại muối hữu cơ hoặc vô cơ; hoặc dung dịch chứa ít nhất một nguồn hydrat cacbon hoặc đường.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, “trị số giảm Log” (Log reduction value: LRV) là trị số đo hiệu suất của màng trong việc giữ lại các hạt như vi khuẩn hoặc virus, được định nghĩa như loga (cơ số 10) của tỷ lệ giữa lượng hạt trong dòng cấp và lượng hạt trong dịch thấm qua màng của thiết bị lọc virus. Trị số LRV là đặc trưng đối với loại hạt xác định. Theo một phương án của sáng chế, thiết bị lọc virus thu được trị số giảm 1 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 2 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 3 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 4 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 5 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 6 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 7 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất là trị số giảm 8 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, tốt hơn nếu ít nhất là trị số giảm 4 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus. Tất nhiên, sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan, đó là trị số giảm Log_{10} (LRV) bất kỳ đối với virus hoặc tạp nhiễm virus tiềm tàng của chế phẩm được lọc là có lợi để tăng tính an toàn của quy trình sản xuất. Do đó, tốt hơn nếu thông số này có thể được kết hợp với các thông số khác được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

“Dòng” được sử dụng trong bản mô tả có thể sử dụng thay thế cho “lưu lượng riêng” hoặc “lưu lượng” là số đo được sử dụng cho màng đặc trưng, dùng để chỉ

tốc độ của dòng dịch lọc (tính theo thể tích hoặc trọng lượng của dung dịch được thấm qua màng lọc virus trên diện tích thiết bị lọc theo thời gian, ví dụ, $L / (m^2 \times \text{giờ})$). Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “riêng” nghĩa là trong khoảng thời gian xác định, tuy nhiên, chỉ khi “lưu lượng” được sử dụng, cũng theo đơn vị của thông số này, hiển nhiên là “lưu lượng riêng” là có nghĩa. Tương tự, ký hiệu viết tắt của lượng “thể tích” cho đơn vị “lít” là “l” hoặc “L” cũng được sử dụng thay thế cho nhau. Lưu lượng riêng trong phương pháp theo sáng chế có thể thay đổi trong một khoảng hoặc về cơ bản vẫn được giữ cố định trong suốt khoảng thời gian của quy trình lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc virus đã cho. Theo một phương án của sáng chế, lưu lượng riêng có thể thay đổi trong khoảng từ $5 L / (m^2 \times \text{giờ})$ đến $500 L / (m^2 \times \text{giờ})$ trong thời gian ít nhất là từ 24 giờ đến 7 tháng. Giới hạn dưới đối với dòng này có thể là khoảng $5 L / (m^2 \times \text{giờ})$ hoặc khoảng $10 L / (m^2 \times \text{giờ})$. Giới hạn trên có thể là khoảng $25 L / (m^2 \times \text{giờ})$, khoảng $75 L / (m^2 \times \text{giờ})$, khoảng $100 L / (m^2 \times \text{giờ})$, khoảng $200 L / (m^2 \times \text{giờ})$, khoảng $250 L / (m^2 \times \text{giờ})$, khoảng $300 L / (m^2 \times \text{giờ})$ hoặc khoảng $500 L / (m^2 \times \text{giờ})$. Dòng này có thể còn nằm trong khoảng từ $5 L / (m^2 \times \text{giờ})$ đến $100 L / (m^2 \times \text{giờ})$, khoảng từ $10 L / (m^2 \times \text{giờ})$ đến $100 L / (m^2 \times \text{giờ})$ hoặc khoảng từ $10 L / (m^2 \times \text{giờ})$ đến $25 L / (m^2 \times \text{giờ})$.

“Lọc theo mẻ” theo cách khác còn được biết đến dưới dạng “lọc theo dạng mẻ” hoặc lọc được thực hiện theo chế độ mẻ, dùng để chỉ quy trình trong đó tổng lượng hoặc thể tích cụ thể của chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, được lọc qua thiết bị lọc virus theo mẻ theo dung tích của thiết bị lọc virus và trong đó quy trình lọc này được hoàn thiện trước khi dịch lọc được sử dụng trực tiếp hoặc cấp vào quy trình mà tại đó dịch lọc được sử dụng hoặc được tiêu thụ.

Thuật ngữ “lọc liên tục” hoặc “lọc trực tuyến” hoặc “lọc trực tiếp” dùng để chỉ quy trình lọc, trong đó tổng thể tích hoặc lượng cụ thể của chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, được lọc qua thiết bị lọc virus một cách liên tục phụ thuộc vào dung tích của thiết bị lọc virus và trong đó quy trình lọc này vẫn được tiếp tục ngay khi dịch lọc

này được sử dụng trực tiếp hoặc cấp vào quy trình mà tại đó dịch lọc được sử dụng hoặc tiêu thụ.

Tất cả các phương án theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình lọc theo mẻ hoặc lọc liên tục. Có thể dễ dàng thu được hiệu quả có lợi của sáng chế bằng cách đưa chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, vào lọc trong ít nhất là 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm nhằm loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm đã nêu.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm, được thực hiện dưới dạng quy trình lọc liên tục. Chế độ hoạt động này là có lợi ở chỗ dịch lọc của chế phẩm được tạo ra có thể được cấp liên tục và trực tiếp vào quy trình có sử dụng hoặc tiêu thụ dịch lọc này. Theo một phương án ưu tiên khác, chế phẩm được lọc virus, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, có thể cấp trực tiếp và liên tục vào nồi phản ứng sinh học, tốt hơn nếu được cấp liên tục vào nồi phản ứng sinh học quy mô lớn dùng để nuôi cấy tế bào, ví dụ, quy trình bổ sung liên tục chất dinh dưỡng, quy trình truyền dịch liên tục hoặc quy trình cấp theo mẻ. Phương án này được thực hiện, theo một phương án, với áp suất nằm trong khoảng từ 1000 mbar đến 2000 mbar và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 40°C, trong đó dung tích ít nhất là 2000 L/m² hoặc ít nhất là 5000 L/m². Ngoài ra, tốt hơn nữa là quy trình lọc virus ra khỏi chế phẩm này được thực hiện trong ít nhất là khoảng 24 giờ hoặc khoảng từ 48 giờ đến 7 tháng, tốt hơn nữa nếu ít nhất là từ một tuần đến 5 tháng và tốt nhất là từ một đến 3 tuần hoặc khoảng từ 3 tuần đến 3 tháng và thậm chí tốt nhất nếu ít nhất là từ 2 đến 3 tháng. Tất nhiên, các thông số khác cũng có thể được kết hợp cùng phương án này. Ngoài ra, tốt hơn nếu chế phẩm được lọc này là môi trường nuôi cấy tế bào và chế độ lọc là chế độ lọc liên tục.

Tất nhiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan sẽ hiểu rằng, chế phẩm được lọc virus thu được từ phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp của sáng chế có thể được dùng hoặc cấp trực tiếp vào quy trình sản xuất khác liên quan đến nuôi cấy tế bào; sản xuất được phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm cũng như thực phẩm. Tất nhiên, trong các phương án này, quy trình lọc liên tục chế phẩm được ưu tiên.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào thu được theo phương pháp bất kỳ theo sáng chế sử dụng để nuôi cấy tế bào; sản xuất được phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm cũng như thực phẩm.

Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy tế bào được lọc là vô trùng, hoặc theo cách khác, được xử lý sơ bộ. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy tế bào chứa protein hoặc huyết thanh động vật hoặc các thành phần có nguồn gốc từ động vật, hoặc không chứa protein động vật, không chứa huyết thanh hoặc thành phần không có nguồn gốc từ động vật, hoặc hoặc dạng kết hợp bất kỳ của các đặc tính nêu trên. Theo các phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào này chứa dịch thủy phân đậu nành có nguồn gốc từ các loài thực vật, vi khuẩn và có nồng độ khác nhau, cụ thể là dịch thủy phân đậu nành. Theo phương án được ưu tiên, môi trường nuôi cấy tế bào là môi trường không chứa protein động vật với nồng độ khác nhau của ít nhất một dịch thủy phân đậu nành. Tuy nhiên, cần nhấn mạnh rằng, phương pháp theo sáng chế đặc biệt thích hợp để lọc virus ra khỏi chế phẩm chứa thành phần protein hoặc huyết thanh hoặc các thành phần khác có nguồn gốc từ động vật nhằm cải thiện tính an toàn về mặt virus học của các chế phẩm này, đặc biệt là khi được sử dụng trong quy trình nuôi cấy tế bào, được phẩm, chế phẩm chẩn đoán và/hoặc mỹ phẩm cũng như trong thực phẩm.

“Môi trường nuôi cấy tế bào” được định nghĩa, theo sáng chế, là môi trường thích hợp đối với sự sinh trưởng của tế bào và tốt hơn nếu là tế bào động vật, tốt hơn nữa nếu là tế bào của động vật có vú, trong nuôi cấy tế bào *in vitro*. Môi trường bất kỳ có khả năng trợ giúp cho sự phát triển của tế bào thích hợp trong

nuôi cấy tế bào đều có thể được sử dụng. Môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể dựa trên môi trường cơ bản như DMEM, Ham's F12, Medium 199, McCoy hoặc RPMI đã được biết đối với những người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan. Môi trường cơ bản có thể chứa nhiều thành phần bao gồm axit amin, vitamin, các muối vô cơ và hữu cơ và các nguồn hydrat cacbon khác, mỗi thành phần này có mặt với lượng đủ để giúp nuôi dưỡng tế bào mà nói chung là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan. Môi trường này có thể chứa các chất bổ trợ, là các chất đệm như natri bicacbonat, chất chống oxy hóa, chất ổn định để trung hòa áp lực cơ học, hoặc chất ức chế proteaza. Nếu cần, có thể bổ sung chất hoạt động bề mặt không ion như hỗn hợp của polyetylen glycol và polypropylen glycol (ví dụ, Pluronic F68.RTM., SERVA) làm chất khử bọt.

Theo sáng chế, "môi trường chứa protein động vật" là môi trường nuôi cấy tế bào mà chứa protein bất kỳ thu được từ người hoặc động vật.

Theo sáng chế, "môi trường không chứa protein" là môi trường nuôi cấy tế bào không chứa protein bất kỳ thu được từ người hoặc động vật.

Thuật ngữ "môi trường nuôi cấy tế bào không chứa protein động vật" theo sáng chế dùng để chỉ môi trường không chứa protein và/hoặc thành phần protein từ tế bào có nhân điển hình của sinh vật đa bào không phải thực vật. Protein điển hình được loại bỏ là những protein được tìm thấy trong huyết thanh và chất có nguồn gốc từ huyết thanh, như albumin, transferin, insulin và các yếu tố sinh trưởng khác. Môi trường nuôi cấy tế bào không chứa protein động vật cũng không chứa sản phẩm tinh khiết bất kỳ có nguồn gốc từ động vật và sản phẩm thu được từ động vật tái tổ hợp cũng như các phân phân cắt protein và dịch chiết của nó hoặc dịch chiết lipid hoặc các thành phần dạng tinh khiết của nó. Protein động vật và thành phần protein là khác so với protein không có nguồn gốc từ động vật, các oligopeptit và peptit nhỏ thu được từ thực vật (thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 10 đến 30 axit amin), như đậu tương, và các sinh vật có nhân điển hình bậc thấp như nấm men có thể thuộc môi trường nuôi cấy tế bào không chứa protein động vật theo sáng chế.

Thuật ngữ "dịch thủy phân" bao gồm dạng phân cắt bất kỳ của vật liệu nguồn có nguồn gốc từ động vật hoặc thực vật hoặc dịch chiết thu được từ nấm men hoặc vi khuẩn. Trong môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế "dịch thủy phân đậu nành" có thể là dịch thủy phân đậu nành có độ tinh khiết cao, dịch thủy phân đậu nành tinh khiết hoặc dịch thủy phân đậu nành thô.

Thuật ngữ "có chứa huyết thanh" được dùng cho môi trường bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào chứa huyết thanh.

Thuật ngữ "không chứa huyết thanh" được dùng cho môi trường bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào bất kỳ mà không chứa huyết thanh. Do "không chứa huyết thanh", nên được hiểu rằng môi trường này, tốt hơn nếu chứa ít hơn 0,1% huyết thanh và tốt hơn nếu chứa ít hơn 0,01% huyết thanh. Thuật ngữ "huyết thanh" dùng để chỉ phần dịch của máu thu được sau khi loại bỏ khỏi tơ huyết và tế bào máu.

Theo một số phương án, dịch lọc hoặc dòng dịch lọc thu được từ quy trình lọc được cấp vào môi trường nuôi cấy tế bào quy mô lớn và nội phản ứng sinh học, một cách tương ứng. Môi trường nuôi cấy tế bào "quy mô lớn" được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ môi trường nuôi cấy tế bào ở quy mô ít nhất là khoảng 100 L, ít nhất là khoảng 200 L, ít nhất là khoảng 300 L, ít nhất là khoảng 400 L, ít nhất là khoảng 500 L, ít nhất là khoảng 1000 L, ít nhất là khoảng 1500 L, ít nhất là khoảng 2000 L, ít nhất là khoảng 2500 L, ít nhất là khoảng 3000 L, ít nhất là khoảng 4000 L, ít nhất là khoảng 5000 L, ít nhất là khoảng 7500 L, ít nhất là khoảng 10000 L hoặc ít nhất là khoảng 20000 L. Theo một phương án được ưu tiên, dòng dịch lọc thu được trong phương pháp bất kỳ theo sáng chế được cấp vào nội phản ứng sinh học được sử dụng trong quy trình bổ sung liên tục chất dinh dưỡng, quy trình truyền dịch hoặc quy trình cấp theo mẻ, tốt hơn nếu bằng cách lọc liên tục.

Môi trường nuôi cấy tế bào theo sáng chế có thể là môi trường nuôi cấy tế bào bất kỳ tùy vào loại và bản chất của tế bào nuôi cấy và pha sinh trưởng của tế

bào nuôi cấy, ví dụ, tế bào dính bám hoặc không dính bám; tế bào sinh trưởng hoặc tế bào bất giữ sinh trưởng.

Thuật ngữ “vô trùng” được sử dụng theo sáng chế dùng để chỉ chất mà không chứa hoặc về cơ bản không chứa tạp nhiễm virus và/hoặc vi khuẩn. Theo khía cạnh này, “tạp nhiễm” dùng để chỉ vật liệu chứa thành phần khác với thành phần mong muốn trong chế phẩm, là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào. Theo ngữ cảnh “lọc vô trùng”, thuật ngữ lọc vô trùng nhằm mô tả về chức năng mà chế phẩm được lọc qua thiết bị lọc vô trùng để loại bỏ các chất tạp nhiễm vi khuẩn và/hoặc mycoplasma.

Thuật ngữ “quy trình lọc virus” được sử dụng trong bản mô tả thay thế cho thuật ngữ “quy trình lọc nano” và dùng để chỉ quy trình lọc có sử dụng thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả xác định. Nói chung, các thiết bị lọc như vậy được dùng để loại bỏ virus.

Tạp nhiễm virus được dự định loại bỏ bằng cách lọc theo tất cả các phương pháp của sáng chế có thể là virus bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan hoặc sẽ được phát hiện trong tương lai. Định nghĩa này cũng bao gồm cả các tạp nhiễm virus tiềm tàng được loại bỏ bằng cách lọc và cũng bao gồm nhiều hơn một loại virus được loại bỏ bằng các phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, tạp nhiễm virus hoặc tạp nhiễm virus tiềm tàng có thể là một thành viên của họ virus *Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Arteriviridae*, *RetParvoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae*, *Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae* hoặc *Reoviridae*. Cụ thể hơn, tạp nhiễm virus này có thể là nhóm bất kỳ bao gồm parvoviridae gây bệnh trên chó (canine parvoviridae: CPV), virus minute lây nhiễm trên chuột nhắt (minute virus of mice: MVM), virus Cache Valley, virus Bunyamwera, virus viêm não Northway, virus cúm A/B, virus Junin, virus Parainfluenza 1/2/3, virus Simian 5, virus gây bệnh quai bị, virus hợp bào hô hấp ở bò, virus Sendai, virus gây bệnh Newcastle, virus gây viêm phổi trên chuột nhắt,

virut gây viêm miệng bọt, virut gây bệnh dại, virut gây viêm đường hô hấp ở bò, virut gây bệnh viêm gan ở chuột, virut gây sốt vàng da, virut West Nile, virut sốt Dengue, virut gây viêm não Tick borne, virut viêm não St. Louis, Vesivirut 2117, virut viêm não và cơ tim, virut Cocksackie B-3, virut viêm não ở chuột nhắt Theiler, virut gây bệnh chân tay miệng, enterovirut ở bò, enterovirut ở lợn, virut Semliki Forest, virut Sindbis, virut Rubella, virut gây bệnh viêm não Nhật Bản, virut gây bệnh viêm não ngựa phương đông, virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, virut Foamy, Reovirut 1/2/3, reovirut gây bệnh cho chim, Rotavirut, circovirut 1 ở lợn 1, Adenovirut, virut Pseudorabies, gamaherpes 68 ở chuột, virut gây bệnh mụn nước Herpes 1, virut Frog 3, virut minute ở chuột (minute virus of mice-cutter: MVMc), virut gây bệnh ở thần lằn Úc (bluetongue virus: BTV), virut gây bệnh xuất huyết Epizootic (Epizootic haemorrhagic disease virus: EHDV), virut gây tiêu chảy ở bò (bovine viral diarrhea virus: BVDV), parvovirus ở lợn (porcine parvovirus: PPV), virut gây bệnh viêm não và cơ tim (encephalomyocarditis virus (EMCV), Reovirut 3, và virut gây bệnh máu trắng cho chuột (murine leukemia virus: MuLV), Hepatitis A, polio, hoặc Parvoviridae B19.

Thuật ngữ “thiết bị lọc virut” được sử dụng thay thế cho thuật ngữ “thiết bị lọc giữ lại virut”, “thiết bị lọc virut” và “thiết bị lọc nano” và nói chung dùng để chỉ thiết bị lọc, khác biệt ở chỗ, được tạo ra thích hợp để giữ lại virut có cỡ lỗ hiệu quả đảm bảo thực hiện được chức năng đó. Các đặc trưng này bao gồm, bằng cách ví dụ, màng có các đặc tính như hình thái, hình dạng lỗ, mật độ lỗ, và độ đồng nhất, cỡ lỗ hiệu quả, độ dày của màng, v.v.. Màng lọc virut hữu ích theo sáng chế bao gồm các màng hoạt động bằng sự loại trừ theo kích thước và điện tích, có khả năng kết hợp với việc giữ hấp thụ. Các cơ chế loại trừ kích thước và giữ hấp thụ có thể không cần thêm màng khác và thiết bị lọc có thể sử dụng hiệu quả với một hoặc nhiều cơ chế như vậy.

Thiết bị lọc được xác định theo sáng chế và được sử dụng theo một phương án của sáng chế khác biệt ở chỗ có màng với cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm. Theo một phương án của sáng chế, giới hạn dưới của cỡ lỗ hiệu quả là khoảng 5 nm, khoảng 10 nm, khoảng 15 nm, khoảng 20 nm, khoảng 25 nm, khoảng 30 nm,

khoảng 35 nm, khoảng 50 nm hoặc khoảng 60 nm. Theo phương án nêu trên của sáng chế, giới hạn trên của cỡ lỗ hiệu quả là khoảng 10 nm, khoảng 15 nm, khoảng 20 nm, khoảng 25 nm, khoảng 35 nm, khoảng 50 nm, khoảng 60 nm hoặc khoảng 75 nm. Theo một số phương án nêu của sáng chế, thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến 75 nm hoặc từ khoảng 10 đến 75 nm hoặc từ khoảng 15 đến 75 nm hoặc từ khoảng 20 đến 75 nm hoặc từ khoảng 15 đến 50 nm hoặc từ khoảng 15 đến 35 nm.

Cỡ lỗ hiệu quả, theo sáng chế, là một đặc tính của màng lọc và dùng để chỉ cỡ của hạt được giữ lại một cách hiệu quả bằng màng đó, lưu ý rằng mức hiệu quả này được mô tả bằng yếu tố giảm loga của hạt có cỡ đó.

Thiết bị lọc virus được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể là thiết bị lọc bất kỳ có kết cấu đủ để chịu được dung tích ít nhất là khoảng 2000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 3000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 4000 L/m² hoặc ít nhất là khoảng 5000 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 7500 L/m², hoặc ít nhất là khoảng 10000 L/m², ít nhất là khoảng 20000 L/m², hoặc có thể hoạt động được trong khoảng thời gian từ 24 giờ đến 7 tháng hoặc tốt hơn nếu ít nhất là khoảng 48 giờ, khoảng 72 giờ, khoảng 4 ngày, khoảng 5 ngày, khoảng 6 ngày, khoảng 7 ngày, khoảng 1 tuần, khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, khoảng 1 tháng, khoảng 2 tháng, khoảng 3 tháng, khoảng 4 tháng, khoảng 5 tháng, khoảng 6 tháng hoặc khoảng 7 tháng.

Tất nhiên, nếu sử dụng nhiều hơn một thiết bị lọc trong phương pháp theo sáng chế thì có thể sử dụng nhiều loại thiết bị lọc virus khác nhau và được kết hợp trong quy trình lọc, tốt hơn nếu lọc song song hoặc nối tiếp.

Thiết bị lọc virus được nêu làm ví dụ bao gồm màng lọc nhiều lớp hoặc một lớp và được làm bằng vật liệu như polyvinyliden florua (PVDF), xenluloza, xenluloza được cải tiến, ví dụ, sợi xenluloza rỗng được tái tạo từ cupramoni hoặc polyetesulfonic. Màng của thiết bị lọc virus có thể là màng trung tính, tích điện âm hoặc dương. Màng lọc này có thể là màng ion, nghĩa là, chúng có thể chứa các nhóm cation hoặc anion, nhưng ưu tiên nếu là màng trung tính tùy theo điều kiện

về độ pH. Màng lọc virus này có thể được chọn từ nhóm gồm các màng ưa nước và kỵ nước. Theo một phương án ưu tiên, màng của thiết bị lọc virus được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế được làm từ polyvinyliden florua (PVDF) hoặc polyetesulfon.

Các nhà sản xuất thiết bị lọc được nêu làm ví dụ có khả năng loại bỏ được virus gồm, nhưng không loại trừ, Asahi/Planova, PALL, Millipore, Sartorius, Gambro và Amersham/AG Technology. Các thiết bị lọc thích hợp để sử dụng theo sáng chế gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thiết bị lọc Asahi's Planova 15 N (Asahi Kasei Corporation, Planova Division), thiết bị lọc Planova 20 N (Asahi Kasei Corporation, Planova Division), thiết bị lọc Planova 35 N (Asahi Kasei Corporation, Planova Division), và thiết bị lọc BioEX (Asahi Kasei Corporation, Planova Division).

Tất nhiên, mong muốn rằng thiết bị lọc được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể hấp khử trùng được và/hoặc được hấp khử trùng và/hoặc được vô trùng theo cách khác trước khi sử dụng. Tuy nhiên, các khả năng khác mà đảm bảo được độ vô trùng của thiết bị lọc virus đều thích hợp để thực hiện. Hơn nữa, cũng mong muốn rằng có thể kiểm tra được tính ổn định của thiết bị lọc trước khi sử dụng và/hoặc sau khi sử dụng. Theo một phương án ưu tiên, trong phương pháp theo sáng chế, thiết bị lọc được hấp khử trùng và kiểm tra độ ổn định được sử dụng có màng polyvinyliden florua (PVDF) hoặc polyetesulfon.

“Dịch lọc”, được sử dụng trong bản mô tả thay thế cho thuật ngữ “thấm qua” dùng để chỉ dung dịch đi qua thiết bị lọc hoặc màng lọc cũng như dung dịch mà chảy qua thiết bị lọc hoặc màng lọc.

“Giữ lại”, được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ thành phần trong dung dịch được giữ lại và không đi qua thiết bị lọc hoặc màng lọc cũng như không chảy qua thiết bị lọc hoặc màng lọc.

Thiết bị lọc virus hữu ích theo sáng chế bao gồm ít nhất một màng lọc virus chia đường cấp thành hai phần trước và sau lọc. Thiết bị lọc thường gồm các công cụ để kiểm soát áp suất và dòng chảy, như các bơm và van, và các dụng cụ đo áp

suất và dòng chảy và dụng cụ đo mật độ. Thiết bị này cũng có thể gồm một số thành phần màng lọc kết hợp khác nhau, được bố trí song song hoặc nối tiếp hoặc kết hợp cả hai.

Dòng lọc biến động tùy theo áp suất. Nói chung, ở điều kiện hoạt động bình thường, áp suất càng cao thì dòng chảy càng mạnh. Dòng chảy cũng biến động theo nhiệt độ. Khi tăng nhiệt độ hoạt động cũng làm tăng dòng chảy. Tuy nhiên, áp suất càng cao, nhiệt độ càng cao thì càng tăng khả năng đứt gãy màng. Đối với màng vô cơ, có khoảng nhiệt độ và độ pH cao hơn có thể được ưu tiên sử dụng so với màng polyme.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan hiển nhiên hiểu rằng thay vì sử dụng thiết bị lọc virus theo sáng chế thì có thể sử dụng thiết bị lọc có trọng lượng phân tử giới hạn nhỏ hơn khoảng 5000 Dalton hoặc nhỏ hơn khoảng 1000 Dalton để loại bỏ cả virus. Trong ngữ cảnh này, “màng lọc có trọng lượng phân tử giới hạn” (molecular weight cut-off: MWCO) là màng đặc trưng cho thiết bị lọc chỉ rõ trọng lượng phân tử trung bình của chất tan, tuy nhiên cả virus hoặc hạt đều không thấm qua màng của thiết bị lọc này.

Trị số pH trong quy trình lọc virus theo sáng chế có thể được thiết đặt trong khoảng bất kỳ cần thiết để giữ được tính ổn định và chức năng của chế phẩm được lọc, tốt hơn nếu là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc dung dịch đậm. Ví dụ, trị số pH có thể được thiết đặt trong khoảng từ 1 đến 10, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2 đến 8 hoặc nằm trong khoảng từ 3 đến 7, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 6,8 đến 8 hoặc tốt nhất nếu nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,45 (trị số pH sinh lý).

Cũng được dự định rằng phương pháp theo sáng chế có thể được tích hợp vào hệ thống phía dưới thiết bị lọc mức vô trùng để loại bỏ tạp nhiễm vi khuẩn và nhờ đó tạo ra dòng cấp vô trùng của chế phẩm mà có thể là “chế phẩm khởi đầu”, nghĩa là chế phẩm được sử dụng trong phương pháp bất kỳ theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế có thể thực hiện được bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều thiết bị lọc được bố trí nối tiếp. Điều này có lợi giúp làm tăng khả năng loại bỏ virus và đảm bảo an toàn trong trường hợp thiết bị lọc virus bị hỏng hoặc bị

thùng. Theo một phương án khác, quy trình lọc được thực hiện bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều thiết bị lọc virus được bố trí song song, nhờ đó cho phép thay thế thiết bị lọc mà không cần làm gián đoạn quy trình liên tục và tránh được những biến cố không lường trước được, ví dụ, do bị tắc.

Theo các phương án khác, quy trình lọc được thực hiện được bằng cách sử dụng ít nhất hai thiết bị lọc được bố trí song song trong hệ ống có đầu nổi chữ Y, trong đó mỗi thiết bị lọc được nối thông chất lưu với một nhánh của đầu nổi chữ Y và nguồn cấp chế phẩm. Theo một số phương án, đầu nổi chữ Y có một đầu nổi. Theo các phương án khác, quy trình lọc được thực hiện bằng cách sử dụng một bộ gồm nhiều thiết bị lọc được bố trí vừa nối tiếp, vừa song song. Đặc biệt hữu dụng trong ngữ cảnh của sáng chế khi có sự sắp xếp, trong đó ít nhất thiết bị lọc thứ hai được bố trí song song gắn với thiết bị lọc được bố trí song song hoặc thiết bị lọc được bố trí nối tiếp để có khả năng thay thế một trong số các thiết bị lọc đó mà không cần dừng quy trình lọc với lý do bảo dưỡng.

Theo một số phương án, thiết bị lọc được kiểm tra tính ổn định trước khi sử dụng. Việc kiểm tra tính ổn định này có thể được thực hiện theo dạng kiểm tra trên cơ sở khuếch tán không khí-nước, trong đó không khí được đưa trực tiếp vào thiết bị lọc và tiếp đó thiết bị lọc này được nhúng vào trong nước vô trùng và được kiểm tra các bọt khí, các bọt khí này sẽ chỉ ra những lỗ thủng trong thiết bị lọc.

Theo một phương án, thiết bị lọc virus hoặc màng lọc virus có thể được xử lý sơ bộ trước khi tiến hành lọc virus, ví dụ, bằng cách rửa bằng tác nhân rửa, cụ thể là bằng tác nhân rửa axit, tác nhân rửa kiềm và/hoặc etanol.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp lọc dòng tiếp tuyến cũng có thể thực hiện được trong phương pháp theo sáng chế. Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “lọc dòng tiếp tuyến” được sử dụng trong bản mô tả thay cho thuật ngữ “lọc kiểu dòng ngang”. Trong mô hình lọc dòng tiếp tuyến, phần dung dịch chảy phía trên của thiết bị lọc được hướng về cơ bản song song hoặc tiếp tuyến hoặc chảy qua bề mặt của thiết bị lọc. Việc dịch chuyển của dịch lọc thấm qua được hỗ trợ bằng cách hạn chế dòng chảy của thành phần giữ lại so với dòng cấp,

dẫn đến áp suất ngược cho hệ thống và cho phép di chuyển dịch lọc thẩm qua màng lọc. Việc cuốn một cách liên tục theo dòng chảy tạp nhiễm trên bề mặt màng lọc có tác dụng giảm đến mức tối thiểu khả năng gây tắc trong sản phẩm được lọc. Thiết bị lọc virus thích hợp khi thu được ít nhất một trị số giảm 1 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 2 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 3 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 4 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 5 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 6 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 7 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 8 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, tốt hơn nếu ít nhất một trị số giảm 4 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus. Tất cả các trị số giảm loga có thể áp dụng cho cỡ lỗ hiệu quả của thiết bị lọc virus bất kỳ lớn nhất là 75 nm. Theo một phương án của sáng chế, giới hạn dưới của cỡ lỗ hiệu quả của thiết bị lọc virus là khoảng 5 nm, khoảng 10 nm, khoảng 15 nm, khoảng 20 nm, khoảng 25 nm, khoảng 30 nm, khoảng 35 nm, khoảng 50 nm hoặc khoảng 60 nm. Trong phương án nêu trên theo sáng chế, giới hạn trên của cỡ lỗ hiệu quả của thiết bị lọc virus là khoảng 10 nm, khoảng 15 nm, khoảng 20 nm, khoảng 25 nm, khoảng 35 nm, khoảng 50 nm, khoảng 60 nm hoặc khoảng 75 nm. Theo một số phương án của sáng chế, thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả nằm trong khoảng từ 5 đến 75 nm hoặc nằm trong khoảng từ 10 đến 75 nm hoặc nằm trong khoảng từ 15 đến 75 nm hoặc nằm trong khoảng từ 20 đến 75 nm hoặc nằm trong khoảng từ 15 đến 50 nm hoặc nằm trong khoảng từ 15 đến 35 nm.

Theo một số phương án của sáng chế, phương pháp lọc kiểu dòng tiêu chuẩn được sử dụng. “Phương pháp lọc kiểu dòng tiêu chuẩn”, được sử dụng trong bản mô tả thay thế cho các thuật ngữ “đầu mút”, “một chiều” và “lọc dòng trực tiếp” dùng để chỉ quy trình lọc bằng thiết bị lọc virus, trong đó dòng chất lỏng thường được tiếp xúc vuông góc với bề mặt thiết bị lọc, tùy theo cấu trúc của mô đun thiết bị lọc, dòng chất lưu cũng có thể được tiếp xúc tiếp tuyến với màng của thiết bị lọc, tuy nhiên, ngược lại với lọc kiểu dòng ngang, phương pháp này không tuần hoàn dòng chảy, điều này có nghĩa là lưu lượng riêng trước và sau thiết bị lọc là

như nhau. Thiết bị lọc virus bất kỳ thích hợp để thu được ít nhất một trị số giảm 1 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 2 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 3 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 4 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 5 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 6 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 7 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, hoặc ít nhất một trị số giảm 8 Log_{10} đối với tạp nhiễm virus, tốt hơn nếu thu được ít nhất một trị số giảm 4 Log_{10} (LRV) đối với tạp nhiễm virus. Các yếu tố giảm loga khác có thể được áp dụng với cỡ lỗ hiệu quả của thiết bị lọc virus bất kỳ lớn nhất là 75 nm. Theo một phương án của sáng chế, giới hạn dưới của cỡ lỗ hiệu quả của thiết bị lọc virus là khoảng 5 nm, khoảng 10 nm, khoảng 15 nm, khoảng 20 nm, khoảng 25 nm, khoảng 30 nm, khoảng 35 nm, khoảng 50 nm hoặc khoảng 60 nm. Theo phương án nêu trên của sáng chế, giới hạn trên của cỡ lỗ hiệu quả của thiết bị lọc virus là khoảng 10 nm, khoảng 15 nm, khoảng 20 nm, khoảng 25 nm, khoảng 35 nm, khoảng 50 nm, khoảng 60 nm hoặc khoảng 75 nm. Theo một số phương án của sáng chế, thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả nằm trong khoảng từ 5 đến 75 nm hoặc từ 10 đến 75 nm hoặc từ 15 đến 75 nm hoặc từ 20 đến 75 nm hoặc từ 15 đến 50 nm hoặc từ 15 đến 35 nm.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan nhận thấy rằng, tất cả các phương án theo sáng chế có thể thực hiện được với sự trợ giúp của hệ thống có sẵn bất kỳ hữu ích về mặt kỹ thuật cho mục đích của sáng chế, ví dụ, bơm nhu động tốc độ cố định hoặc tốc độ biến đổi, bơm ly tâm, v.v. Thùng áp lực bất kỳ hoặc thùng chứa khác có thể được sử dụng để tạo ra dòng chảy qua thiết bị lọc virus với áp suất không đổi hoặc biến đổi trong quy trình lọc.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan nhận thấy rằng việc lựa chọn loại và chế độ của thiết bị lọc (lọc đầu mút hoặc lọc dòng tiếp tuyến) phụ thuộc vào các yếu tố như hợp phần, hàm lượng protein, phân bố trọng lượng phân tử, lượng nhiễm tạp/hạt hoặc các tính chất vật lý hoặc sinh hóa khác trong dòng cấp được xử lý, các yêu cầu và giới hạn xử lý (áp suất cho phép, thời gian xử lý, thể tích được lọc) hoặc đặc tính của tạp nhiễm virus tiềm tàng, ví dụ, cỡ virus.

Ngoài ra cũng cần xem xét các nghiên cứu loại bỏ virus và phương pháp kiểm tra tính ổn định trực tiếp hiện có. Chế độ lọc đầu mút có thể thường được dùng cho dòng cấp có độ tinh khiết cao để thu được dòng xử lý hợp lý, trong khi, theo một số phương án lọc dòng tiếp tuyến có thể được dùng với dòng cấp chứa lượng tạp chất dạng hạt cao. Theo một số phương án được ưu tiên, phương pháp lọc kiểu dòng chảy tiêu chuẩn được ưu tiên kết hợp với chế độ lọc liên tục bằng cách sử dụng ít nhất một thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm. Tất nhiên, phương án này cũng có thể được kết hợp với các thông số khác theo sáng chế.

Tất nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả, như vậy là sẽ có rất nhiều phương án. Cần hiểu rằng các thuật ngữ chuyên ngành được sử dụng trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể của sáng chế và không nhằm mục đích hạn chế phạm vi của sáng chế, do phạm vi của sáng chế chỉ bị giới hạn bởi các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Khi đưa ra một khoảng trị số, nên được hiểu rằng mỗi trị số xen giữa, đến một phần mười của đơn vị giới hạn, trừ khi có quy định khác, giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng đó kể cả các trị số được nêu hoặc xen giữa, đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Giới hạn trên và dưới của các khoảng nhỏ hơn này có thể độc lập được bao gồm trong các khoảng nhỏ hơn và cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, tùy vào các giới hạn được loại trừ cụ thể trong khoảng đã nêu. Khi khoảng đã nêu bao gồm một hoặc cả hai trị số giới hạn, thì các khoảng loại trừ, hoặc là một, hoặc là cả hai giới hạn cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây đều mang nghĩa thông thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan của sáng chế. Tuy nhiên, mặc dù phương pháp và vật liệu bất kỳ khác hoặc phương pháp hoặc vật liệu tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây đều có thể được sử dụng trong thực tiễn hoặc thử nghiệm theo sáng chế, nên các phương pháp và vật liệu minh họa đại diện được mô tả ở đây chỉ nhằm minh họa cho sáng chế.

Tất cả các tài liệu công bố và sáng chế được viện dẫn trong bản mô tả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, nếu mỗi tài liệu công bố hoặc sáng chế được chỉ ra một cách cụ thể và rõ ràng được đưa vào bằng cách viện dẫn để bộc lộ và mô tả phương pháp và/hoặc vật liệu liên quan đến các công bố được viện dẫn đó. Việc viện dẫn đến tài liệu công bố bất kỳ được bộc lộ trước ngày nộp đơn không nên hiểu đó là một sự thừa nhận rằng sáng chế này không được nộp trước ngày công bố của các sáng chế trước đó. Hơn nữa, ngày công bố được đề cập có thể là khác với ngày công bố thực tế và có thể cần được xác định một cách độc lập.

Cần lưu ý rằng, theo sáng chế, trong các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm, các dạng số ít như “một” bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được chỉ rõ trong ngữ cảnh khác. Cũng cần lưu ý thêm rằng, các điểm yêu cầu bảo hộ có thể được phác thảo để loại trừ các yếu tố tùy ý bất kỳ. Như vậy, tuyên bố này nhằm làm cơ sở tiền đề cho việc sử dụng các thuật ngữ dành riêng như "riêng", "chỉ" và các thuật ngữ tương tự cùng với việc liệt kê các yếu tố được yêu cầu bảo hộ, hoặc sử dụng một giới hạn "tiêu cực".

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan, khi đọc bản mô tả, sẽ thấy rằng mỗi phương án riêng được mô tả và minh họa ở đây có thành phần và dấu hiệu riêng biệt mà có thể dễ dàng tách ra khỏi hoặc được kết hợp với các dấu hiệu khác của các phương án bất kỳ khác mà không tách rời khỏi phạm vi của sáng chế. Các phương pháp được trích dẫn bất kỳ có thể được thực hiện theo thứ tự được mô tả hoặc theo thứ tự khác một cách thích hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ được đề xuất dưới đây nhằm minh họa sáng chế. Các ví dụ này không nhằm giới hạn sáng chế ở các ứng dụng cụ thể hoặc lý thuyết thực hiện bất kỳ.

Ví dụ 1: Lọc virus quy mô thu nhỏ bằng thiết bị lọc virus và môi trường nuôi cấy tế bào

Màng lọc virus từ các nhà sản xuất khác nhau (xem bảng 2) được đánh giá động lực học trong thiết bị lọc có cỡ khác nhau đối với môi trường nuôi cấy tế bào chứa nồng độ dịch thủy phân đậu nành là 4 g/L từ các lô và nhà cung cấp khác nhau (xem bảng 3). Hợp phần của môi trường nuôi cấy tế bào và chế phẩm được mô tả trong ví dụ 2. Các thử nghiệm lọc được thực hiện hoặc là bằng cách kiểm soát áp suất bằng thùng áp lực (Fig.3, Fig.4, Fig.5 và các thí nghiệm gây nhiễm trên Fig.7, Fig.8 và Fig.9), hoặc bằng cách kiểm soát lưu lượng, ví dụ, bằng bơm nhu động (Fig.1, Fig.2, Fig.3 và Fig.6). Các thiết bị khác được sử dụng để kiểm soát áp suất và nhiệt độ của các thử nghiệm được mô tả trong bảng 4.

Bảng 2: Danh sách các thiết bị lọc virus

Mã thiết bị lọc nội địa trên các hình vẽ/trong các ví dụ	Nhà sản xuất/tên sản phẩm/cỡ thiết bị
Thiết bị lọc A	Sartorius Virosart CPV 180 cm ²
Thiết bị lọc B	Millipore Viresolve NFP 3,1 cm ²
Thiết bị lọc C	Pall Ultipor VF grade DV20 700 cm ²
Thiết bị lọc D	Asahi BioEX 10 cm ²
Thiết bị lọc E	Sartorius Virosart CPV 2000 cm ²
Thiết bị lọc F	Millipore Viresolve NFP 850 cm ²
Thiết bị lọc G	Asahi 15 N 10 cm ²
Thiết bị lọc H	Pall Ultipor VF grade DV20 9,6 cm ²
Thiết bị lọc I	Sartorius Virosart CPV 5 cm ²

Bảng 3: Danh sách các dịch thủy phân đậu nành

Mã dịch thủy phân đậu nành nội địa trên các hình vẽ/trong các ví dụ	Nhà sản xuất/tên sản phẩm/số lô nội địa
Dịch thủy phân đậu nành 1	Kerry HyPep 1510 #1
Dịch thủy phân đậu nành 2	DOMO SE50 MAF UF #1
Dịch thủy phân đậu nành 3	DOMO SE50 MAF UF #2

Mã dịch thủy phân đậu nành nội địa trên các hình vẽ/trong các ví dụ	Nhà sản xuất/tên sản phẩm/số lô nội địa
Dịch thủy phân đậu nành 4	DOMO SE50 MAF UF #3
Dịch thủy phân đậu nành 5	Kerry HyPep 1510 #2
Dịch thủy phân đậu nành 6	DOMO SE50 MAF UF #4
Dịch thủy phân đậu nành 7	DOMO SE50 MAF UF #5

Bảng 4: Danh sách thiết bị

WM Marprene cỡ lỗ mm x thành mm 3,2 x 1,6 và 1,6 x 1,6 (Watson Marlow)
Bơm nhu động Watson Marlow 101U/R (Watson Marlow)
Thùng áp lực Sartorius Model 17532 (Sartorius-Stedim)
Thiết bị điều áp: Pascal Ci CL1010 (Labom) và KrosFlo ACPM-499-03N (Spectrum Labs)
Cân Sartorius FBG64EDE-SOCE (Sartorius Stedim)
Bình ổn nhiệt Haake DC10 (Thermo Scientific)
Cảm biến nhiệt CEM IR-68 Flexible InfraRed Thermometer

Ví dụ 2: Chuẩn bị môi trường nuôi cấy tế bào

Mô tả chung về hợp phần của môi trường nuôi cấy tế bào được cung cấp trong bảng 5 dưới đây với hợp phần của các loại dịch thủy phân đậu nành khác nhau được liệt kê trong bảng 3 ở trên. Các mẻ khác nhau của môi trường nuôi cấy tế bào được lọc vô trùng bằng thiết bị lọc cấp vô trùng, ví dụ, hộp thiết bị lọc màng Pall Fluorodyne® II DJL Membrane Filter Cartridge 0,1 μ trước các quy trình lọc virus khác nhau được mô tả trong các ví dụ. Các thành phần môi trường được mô tả ở đây được sử dụng cho tất cả các thử nghiệm được mô tả và thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.11.

Bảng 5: Thành phần của môi trường

Thành phần	Nồng độ [g / kg]
DMEM/HAMS F12	11,76
Etanolamin	0,00153
Lutrol F68	0,25
Dịch thủy phân đậu nành	4,0
Thành phần vi lượng - dung dịch gốc	Tối đa 4 µg/L
L-Glutamin	0,6
NaHCO ₃	2,0
Nước tinh khiết	Đủ 1kg

Ví dụ 3: Chuẩn bị thiết bị lọc

Thiết bị lọc virus được chuẩn bị theo các hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất thiết bị lọc virus. Trừ khi các thiết bị lọc được vận chuyển và lắp đặt trong điều kiện vô trùng, các thiết bị lọc được hấp khử trùng ở nhiệt độ >121°C trong thời gian 20 phút.

Ví dụ 4: Kiểm tra tính ổn định

Sau khi sử dụng, thiết bị lọc có cỡ thích hợp (các thiết bị lọc A, C, E và F trong bảng 2) được rửa theo các khuyến cáo của nhà sản xuất tương ứng. Tiến hành thử nghiệm dòng ngược (Forward Flow Test: FFT) bằng Palltronic Flowstar XC (Pall, US) theo các thông số của nhà sản xuất. Tất cả các thử nghiệm về tính ổn định đều được thực hiện sau thử nghiệm lọc được mô tả ở đây đều phù hợp với các giới hạn cụ thể.

Ví dụ 5: Môi trường theo tỷ lệ giữa sự thay đổi áp suất và dòng chảy

Để đánh giá mối tương quan giữa việc thay đổi áp suất và lưu lượng theo thể tích, môi trường nuôi cấy tế bào được đưa vào lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc virus được hấp khử trùng ở nhiệt độ môi trường. Môi trường được đổ vào thùng áp lực và thiết bị lọc virus được gắn với thùng áp lực, mà tiếp đó được điều áp ở các

mức khác nhau. Lưu lượng riêng và áp suất thay đổi được xác định bằng cân, thiết bị điều áp và được ghi lại theo thời gian (Fig.3).

Ví dụ 6: Mô hình hệ thống lên men thu nhỏ 10L

Tiến hành so sánh môi trường nuôi cấy tế bào được hoặc không được lọc bằng cách sử dụng hệ thống lên men tế bào CHO biểu hiện protein tái tổ hợp (Fig.6). Tiến hành thử nghiệm với nghiên cứu liên quan đến tốc độ sinh trưởng và năng suất. Môi trường nuôi cấy tế bào được mô tả trong ví dụ 2 được chuẩn bị. Một phần của thử nghiệm chỉ được tiến hành chỉ bằng môi trường được lọc vô trùng, trong khi các phần khác được tiến hành bằng cùng môi trường và lọc virus bổ sung bằng cách sử dụng thiết bị lọc Sartorius Virosart CPV 180 cm². Quy trình lọc được thực hiện trong khoảng nhiệt độ từ 2 đến 8°C. Thử nghiệm lên men được thực hiện trong nồi phản ứng sinh học có bộ phận 10L có khuấy loại Rushton, có độ pH, pO₂ và nhiệt độ được kiểm soát trực tiếp. Thiết lập điểm và khoảng thông số lên men như sau:

độ pH: 7,05 (6,8-7,3)

T: 37,0°C (35-39°C)

DO: 20% (không khí bão hòa) (10-60%)

Tế bào được nuôi cấy theo chế độ mẻ bằng môi trường nuôi cấy bổ sung liên tục chất dinh dưỡng bằng cách sử dụng môi trường được lọc virus hoặc không được lọc virus. Dữ liệu từ chế độ bổ sung liên tục chất dinh dưỡng (tốc độ sinh trưởng và năng suất) thu được trong 4 tuần nuôi cấy tế bào liên tục.

Tổng số tế bào được xác định bằng phép đo CASY. Trong môi trường bổ sung liên tục chất dinh dưỡng, tốc độ sinh trưởng riêng (μ) được tính theo công thức:

$$\mu = D + \ln (X_{t1}/X_{t0}) / (t_1 - t_0)$$

trong đó D là tỷ lệ pha loãng được tính theo tỷ lệ cấp môi trường trên ngày và thể tích làm việc [1/d]. Tốc độ sinh trưởng được tính theo tổng số tế bào đồng nhất từ kết quả CASY.

Đối với phân tích hóa sinh, huyền phù đồng nhất được ly tâm với tốc độ 400 x g bằng thiết bị Heraeus Multifuge 1 S-R trong 10 phút và chia thành từng phần 1,0 mL trong ống Eppendorf và bảo quản ở nhiệt độ $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Dịch nổi không chứa tế bào được phân tích hoạt tính của protein biểu hiện tái tổ hợp bằng phân tích màu theo phương pháp chuẩn.

Năng suất thể tích P trong thử nghiệm này được tính theo công thức:

$$P [U / (L \times d)] = \text{hoạt tính [mU/mL]} * \text{tỷ lệ pha loãng [d}^{-1}]$$

Năng suất đặc trưng tế bào qP được tính theo công thức:

$$qP [mU / (10^6 \text{ tế bào} \times d)] = P [U / (L \times d)] / \text{số đếm tế bào [10}^6 \text{ tế bào/mL]}$$

Ví dụ 7: Mô hình hệ thống lên men thu nhỏ 120L

Kỹ thuật lọc virus liên tục được thực hiện với thể tích làm việc của môi trường 120L trước khi được bổ sung protein tái tổ hợp được biểu hiện trong hệ thống lên men tế bào CHO để kiểm tra hiệu quả đối với tốc độ sinh trưởng và năng suất (Fig.6A, Fig.6B và Fig.6C). Nghiên cứu này so sánh các quy trình sản xuất với ba sự thay đổi khi xử lý cùng một loại môi trường nuôi cấy tế bào: a) môi trường chuẩn; b) môi trường chuẩn được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc virus Virosart CPV; và c) môi trường chuẩn được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc virus Millipore Viresolve NFP.

Trong quy trình sản xuất liên tục, hai thiết bị lọc virus khác nhau (Virosart CPV Midicap cỡ 2000 cm² và Millipore Viresolve NFP cỡ 850 cm²) được sử dụng thay thế với khoảng thời gian khác nhau. Thiết bị lọc Sartorius CPV được sử dụng trong các ngày nuôi cấy K00-K14, K23-K30 và K39-K63 và thiết bị lọc Millipore NFP được sử dụng trong các ngày nuôi cấy K14-K23 và K30-K39.

Thiết đặt điểm và khoảng thông số lên men như sau:

độ pH: 7,05 (6,8-7,3)

T: 37,0°C (35-39°C)

DO: 20% (không khí bão hòa) (10-60%)

Lấy mẫu và phân tích

Tổng số tế bào được xác định bằng thiết bị đếm tế bào và hệ thống phân tích CASY®. Đối với phân tích hóa sinh, huyền phù đồng nhất được ly tâm với tốc độ 400 x g bằng thiết bị Heraeus Multifuge 1 S-R (Thermo Scientific, USA) trong 10 phút. Dịch nổi không chứa tế bào được phân tích hoạt tính của protein biểu hiện tái tổ hợp bằng phân tích màu.

Trong môi trường nuôi cấy bổ sung liên tục chất dinh dưỡng, tốc độ sinh trưởng riêng (μ) được tính theo công thức:

$$\mu = D + \ln (X_{t1}/X_{t0}) / (t_1 - t_0)$$

trong đó, D là tỷ lệ pha loãng tính theo tỷ lệ cấp môi trường trên ngày và thể tích làm việc [1/d]. Tốc độ sinh trưởng được tính theo tổng số tế bào đồng nhất từ kết quả CASY.

Dung tích P trong thử nghiệm này được tính theo công thức:

$$P [U / (L * d)] = \text{Hoạt tính [mU/mL]} * \text{tỷ lệ pha loãng [d-1]}$$

Năng suất riêng tế bào qP được tính theo công thức:

$$qP [mU / (10^6 \text{ tế bào} \times d)] = P [U / (L * d)] / \text{tổng số tế bào [} 10^6 \text{ tế bào/mL]}$$

Ví dụ 8: Lọc virus bằng thiết bị lọc virus ASAHI Planova 15N

Dịch thủy phân đậu nành chứa môi trường (DOMO SE50 MAF #5) được gây nhiễm MMV và được đưa vào trong thùng có gắn nguồn cấp khí nitơ áp lực. Vật liệu gây nhiễm MMV được đưa qua thiết bị lọc 10 cm² ASAHI Planova 15N được gắn trực tiếp tại đầu mút với áp suất không đổi 1100 mbar (trị số đặt). Trị số nhỏ nhất và lớn nhất của các thông số sau đây được xác định và ghi lại một cách liên tục: áp suất cấp; dịch cấp, dịch lọc, nhiệt độ môi trường và trọng lượng dịch lọc (những thay đổi về các thông số này được sử dụng để tính lưu lượng của dịch lọc). Lấy mẫu hàng ngày lên tới 7 ngày và phân tích chuẩn độ virus MMV (Fig.7).

Ví dụ 9: Lọc virus bằng thiết bị lọc virus ASAHI Planova BioEX

Dịch thủy phân đậu nành chứa môi trường (lần chạy #1 với dịch thủy phân đậu nành DMV SE50 MAF UF #5); lần chạy #2 với dịch thủy phân đậu nành SDMV SE50 MAF UF #4) được gây nhiễm MMV và được chuyển vào thùng có

gắn nguồn cấp khí nitơ áp lực. Vật liệu đã được gây nhiễm MMV được cho qua thiết bị lọc 10 cm² ASAHI Planova BioEX được gắn trực tiếp tại đầu mút với áp suất không đổi 2000 mbar (trị số đặt). Trị số nhỏ nhất và lớn nhất của các thông số sau đây được xác định và được ghi lại một cách liên tục: Áp suất cấp; dịch cấp, dịch lọc và nhiệt độ môi trường và trọng lượng dịch lọc (những thay đổi về các thông số này được sử dụng để tính lưu lượng của dịch lọc). Lấy mẫu trong 5 ngày và phân tích chuẩn độ virus MMV (Fig.8).

Ví dụ 10: Tổng hợp kết quả lọc virus

Môi trường nuôi cấy tế bào chứa các dịch thủy phân đậu nành được gây nhiễm MMV và đưa vào thùng được gắn nguồn cấp khí nitơ áp lực. Các thiết bị lọc virus khác nhau được sử dụng kết hợp với các dịch thủy phân đậu nành khác nhau được liệt kê trong bảng 6:

Bảng 6: Kết hợp thiết bị lọc virus và dịch thủy phân đậu nành được sử dụng trong thử nghiệm gây nhiễm

Thử nghiệm #	Thiết bị lọc	Lô dịch thủy phân đậu nành	Thời gian chạy [ngày]
1	D	7	5
2	D	6	5
3	I	3	19
4	I	5	17
5	G	7	7
6	G	7	6
7	B	6	14
8	H	3	11

Kỹ thuật lọc được thiết lập theo chế độ đầu cuối với áp suất không đổi là 2 bar (trị số đặt) đối với tất cả các lần chạy ngoại trừ lần chạy thử nghiệm #5 và 6, hai lần này được thực hiện với áp suất không đổi là 1,1 bar (trị số đặt). Trị số nhỏ nhất và lớn nhất của các thông số sau đây được xác định và được ghi lại một cách liên tục: áp suất cấp; dịch cấp, dịch lọc và nhiệt độ môi trường và trọng lượng dịch

lọc (những thay đổi về các thông số này được sử dụng để tính lưu lượng của dịch lọc). Lấy mẫu trong thời gian chạy thử nghiệm và phân tích chuẩn độ virus MMV. Các trị số giảm loga tổng cộng được tính theo sự thay đổi của tổng lượng lây nhiễm virus trong dịch lọc và tổng lượng lây nhiễm virus trước khi lọc (Fig.9).

Ví dụ 11: Lọc trong khoảng thời gian dài với sự gây nhiễm virus MMV

Môi trường nuôi cấy tế bào được mô tả trong ví dụ 2 được gây nhiễm MMV đến chuẩn độ 5,0 [$\log_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL})$] và được đưa vào lọc trong thời gian 30 ngày bằng thiết bị lọc virus cỡ lỗ 20 nm (Sartorius Visrosart CPV 5 cm^2). Quy trình lọc được thực hiện với các thiết đặt so với ví dụ 9 và ví dụ 10, nhưng giữ áp suất không đổi là 1,1 bar (khoảng xác định: từ 0,8 bar đến 1,2 bar) và với áp suất ổn định và ngưng dòng chảy để thử thách thiết bị lọc virus. Lưu lượng trong quá trình thử nghiệm được ghi lại và duy trì trên 4 L/($\text{m}^2 \times \text{giờ}$) (Fig.10).

20 mẫu dịch lọc được lấy ra (lên tới 5 lần mỗi tuần) và chuẩn độ virus MMV và tải lượng được xác định. Không thấy có virus lọt qua trong cả 20 phân đoạn được phân tích. Tải lượng virus nằm trong khoảng từ $< 0,9 [\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$ đến $< 2,8 [\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$ tùy theo thể tích phân đoạn. Tổng tải lượng virus trong dịch lọc là $< 3,0 [\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$ mà - khi trừ đi tải lượng virus ban đầu của vật liệu gây nhiễm (nghĩa là, $8,5 [\log_{10}(\text{TCID}_{50})]$) - kết quả là yếu tố giảm virus tổng thể $> 5,5 \log_{10}$. Thử nghiệm này được xem là hiệu quả và triệt để (Fig.11).

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích để hiểu rõ sáng chế, tuy nhiên người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan, dựa trên các hướng dẫn của sáng chế, sẽ dễ dàng nhận ra rằng có thể tạo ra những thay đổi và cải biến mà không vượt ra khỏi phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp loại bỏ tạp nhiễm virus ra khỏi chế phẩm, chế phẩm này là môi trường nuôi cấy tế bào hoặc ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm bước:

a) đưa chế phẩm nêu trên vào lọc trong thời gian ít nhất là khoảng 24 giờ qua thiết bị lọc virus có cỡ lỗ hiệu quả lớn nhất là 75 nm, trong đó thiết bị lọc virus tương tự được sử dụng trong ít nhất là 24 giờ và quy trình lọc này được hoạt động ở dung tích ít nhất là khoảng 2000 L/m².

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong thời gian ít nhất là từ 48 giờ đến 7 tháng.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước:

b) cấp dịch lọc vào môi trường nuôi cấy tế bào hoặc vào ít nhất một thành phần trong môi trường nuôi cấy tế bào.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quy trình lọc là quy trình lọc liên tục.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quy trình lọc được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 60°C.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thiết bị lọc virus thu được ít nhất một trị số giảm 1 Log₁₀ (Log₁₀ reduction value: LRV) đối với tạp nhiễm virus.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quy trình lọc được thực hiện bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều thiết bị lọc được bố trí nối tiếp, song song hoặc kết hợp cả hai.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó quy trình lọc được thực hiện bằng cách sử dụng hai thiết bị lọc được bố trí song song trong hệ ống có đầu nối chữ Y và trong đó mỗi thiết bị lọc này được nối thông chất lưu với một nhánh của đầu nối chữ Y và nguồn cấp chế phẩm.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quy trình lọc được thực hiện ở áp suất nằm trong khoảng từ 100 mbar đến 4000 mbar.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thiết bị lọc virus có thể hấp khử trùng được.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào có chứa dịch thủy phân đậu nành.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quy trình lọc được hoạt động ở dung tích ít nhất là 5000 L/m².
13. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong thời gian ít nhất là từ 72 giờ đến 3 tháng.
14. Phương pháp theo điểm 5, trong đó quy trình lọc được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 37°C.
15. Phương pháp theo điểm 9, trong đó quy trình lọc được thực hiện ở áp suất nằm trong khoảng từ 1000 mbar đến 3000 mbar.
16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong thời gian ít nhất là từ 48 giờ đến 7 tháng.
17. Phương pháp theo điểm 4, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong thời gian ít nhất là từ 48 giờ đến 7 tháng.
18. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong thời gian ít nhất là từ 48 giờ đến 7 tháng.
19. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chế phẩm được đưa vào lọc trong thời gian ít nhất là từ 48 giờ đến 7 tháng.

FIG. 1A

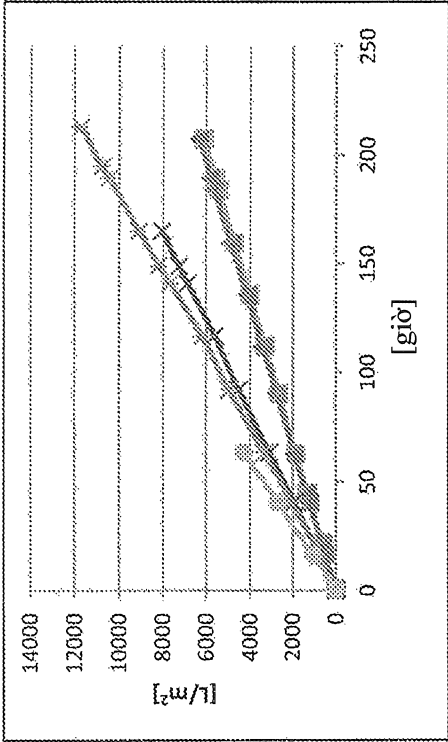


FIG. 1B

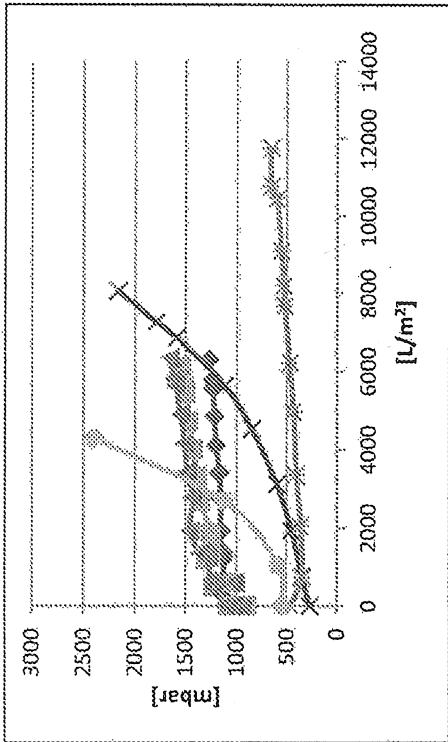
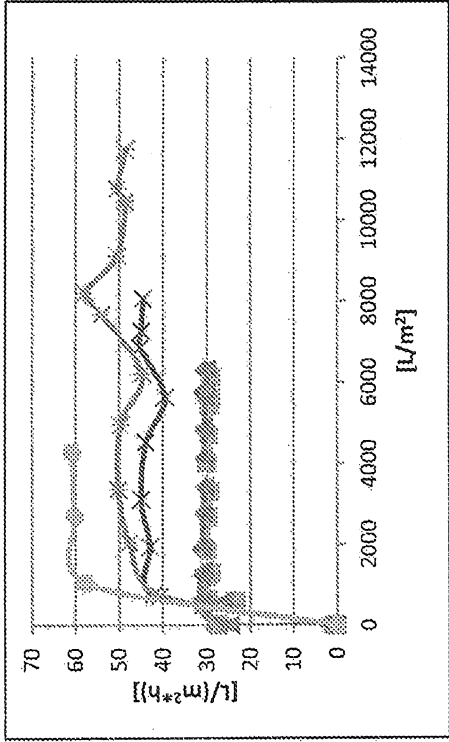


FIG. 1C



- Thiết bị lọc A Dịch thủy phân đậu nành 1
- Thiết bị lọc A Dịch thủy phân đậu nành 2
- Thiết bị lọc A Dịch thủy phân đậu nành 3
- Thiết bị lọc B Dịch thủy phân đậu nành 1
- Thiết bị lọc B Dịch thủy phân đậu nành 2
- Thiết bị lọc B Dịch thủy phân đậu nành 3

FIG. 2A

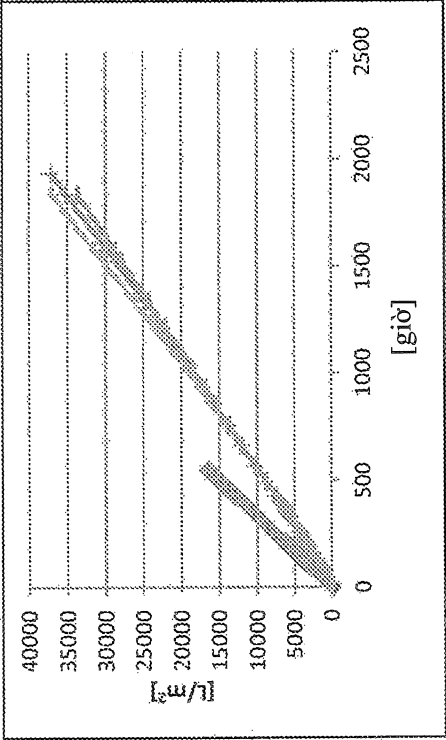


FIG. 2B

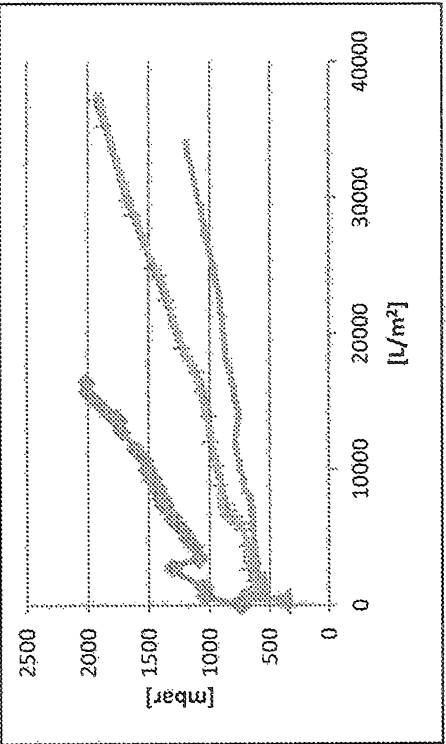
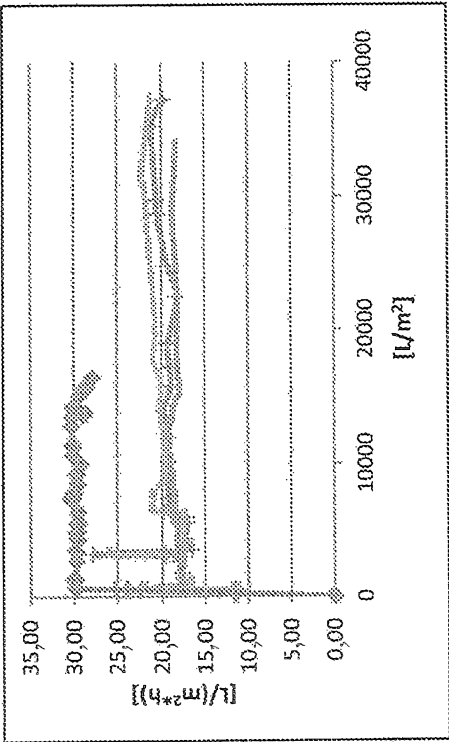
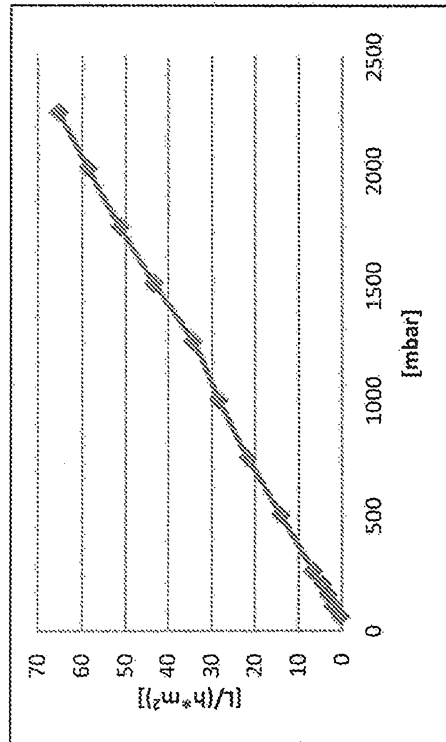


FIG. 2C



- Thiết bị lọc D Pepton 1
- Thiết bị lọc D Pepton 2
- Thiết bị lọc D Pepton 3
- Thiết bị lọc A Pepton 3

FIG. 3



Thiết bị lọc A Dịch thủy phân đậu nành 3

FIG. 4A

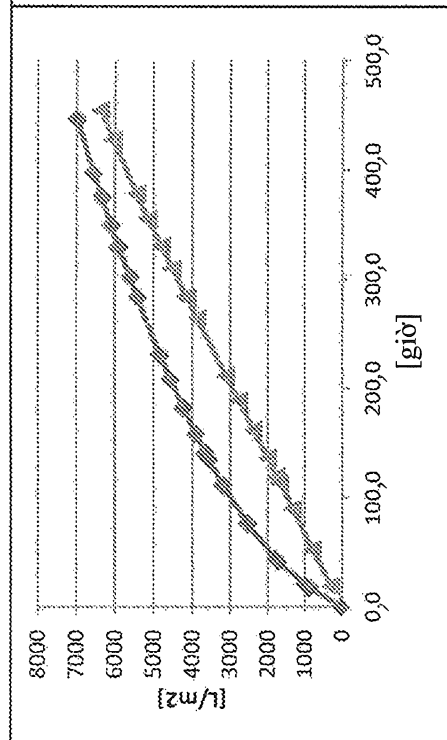


FIG. 4B

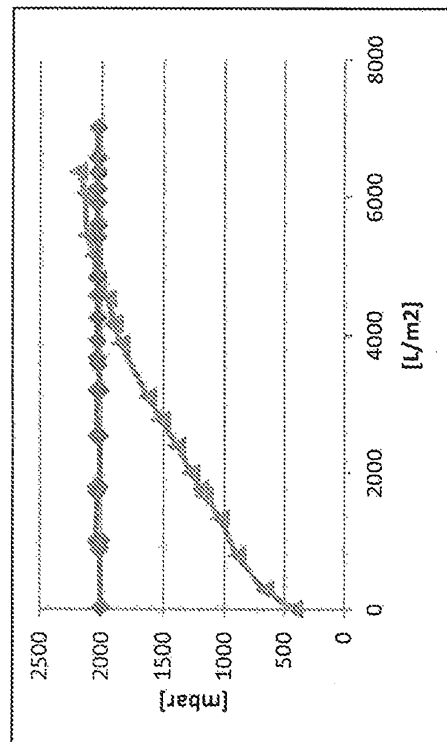
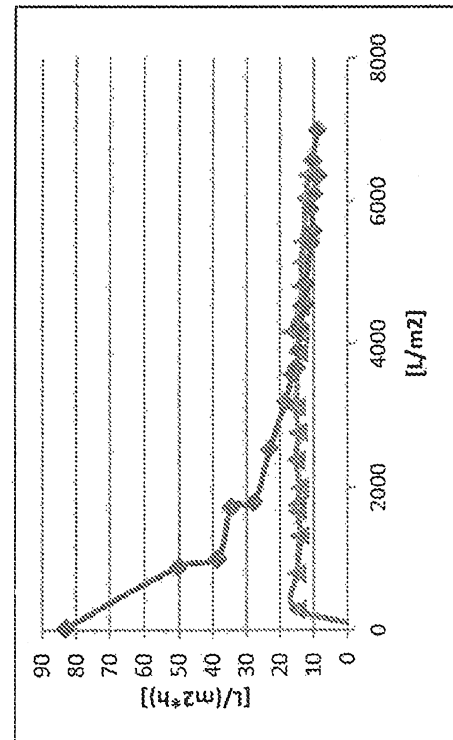


FIG. 4C



Thiết bị lọc A Dịch thủy phân đậu nành 5
được kiểm soát áp suất

Thiết bị lọc A Dịch thủy phân đậu nành 5
được kiểm soát lưu lượng

FIG. 5A

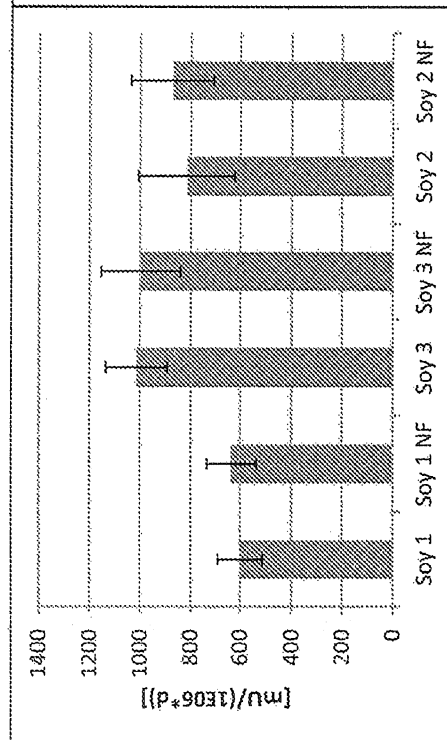


FIG. 5B

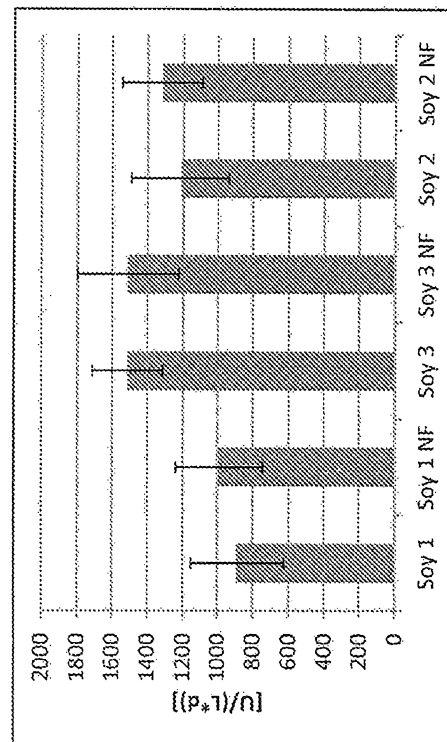


FIG. 5C

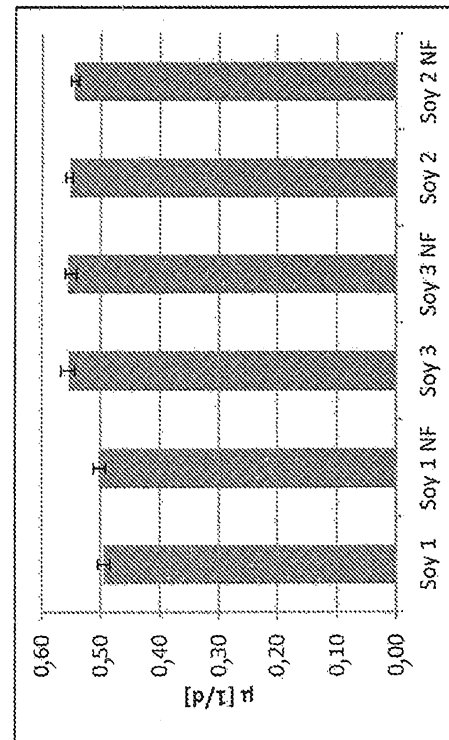


FIG. 6A

	Thời gian sử dụng	Thể tích virut được lọc	Dung tích	Thiết bị lọc
	(ngày)	tổng [L]	[L/m ²]	Loại
Int 1	7	457	2284	E
Int 2	9	605	7117	F
Int 3	7	443	2213	E
Int 4	9	636	7482	F
Int 5	24	1492	7459	E

FIG. 6B

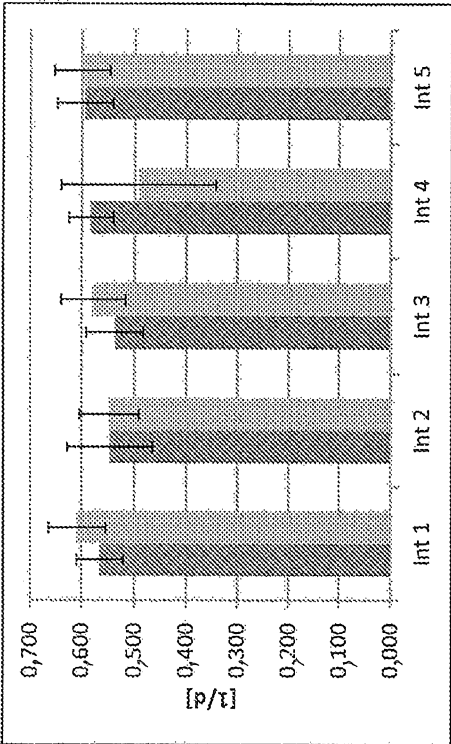
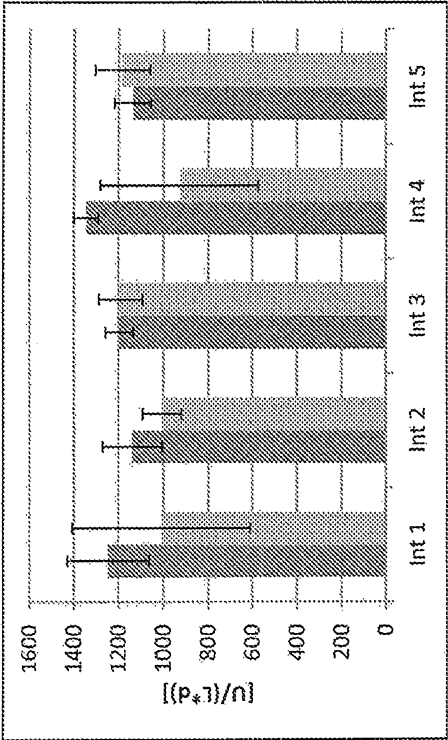


FIG. 6C



Môi trường được lọc nano
Đối chứng

FIG. 7

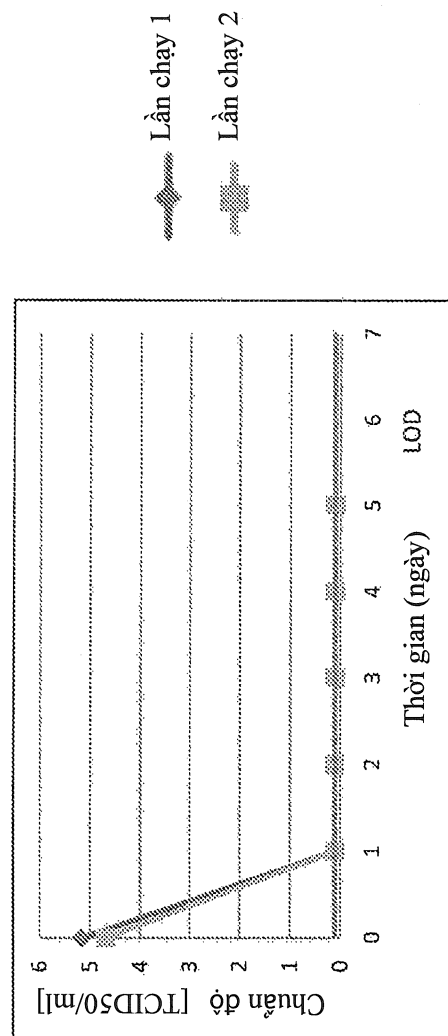


FIG. 8

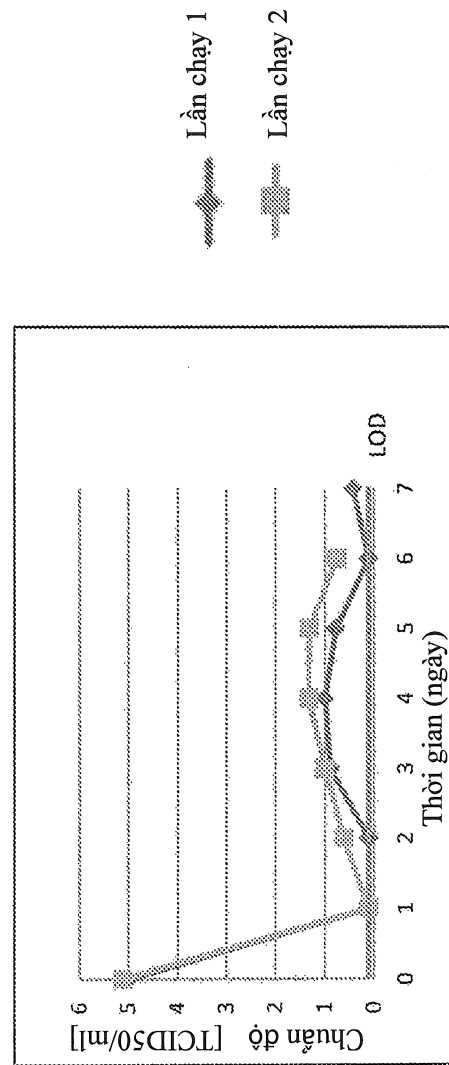


FIG. 9

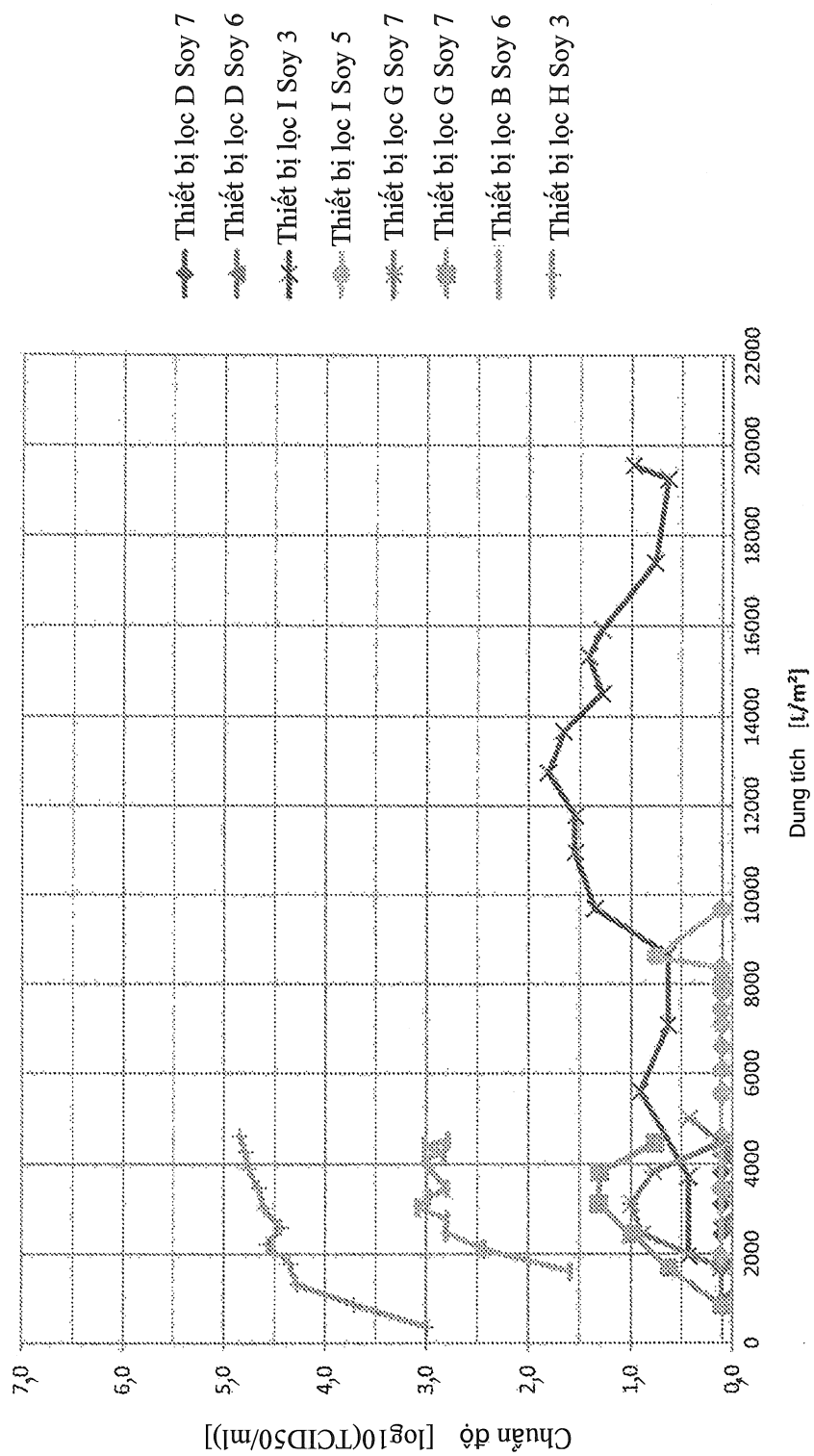


FIG. 10

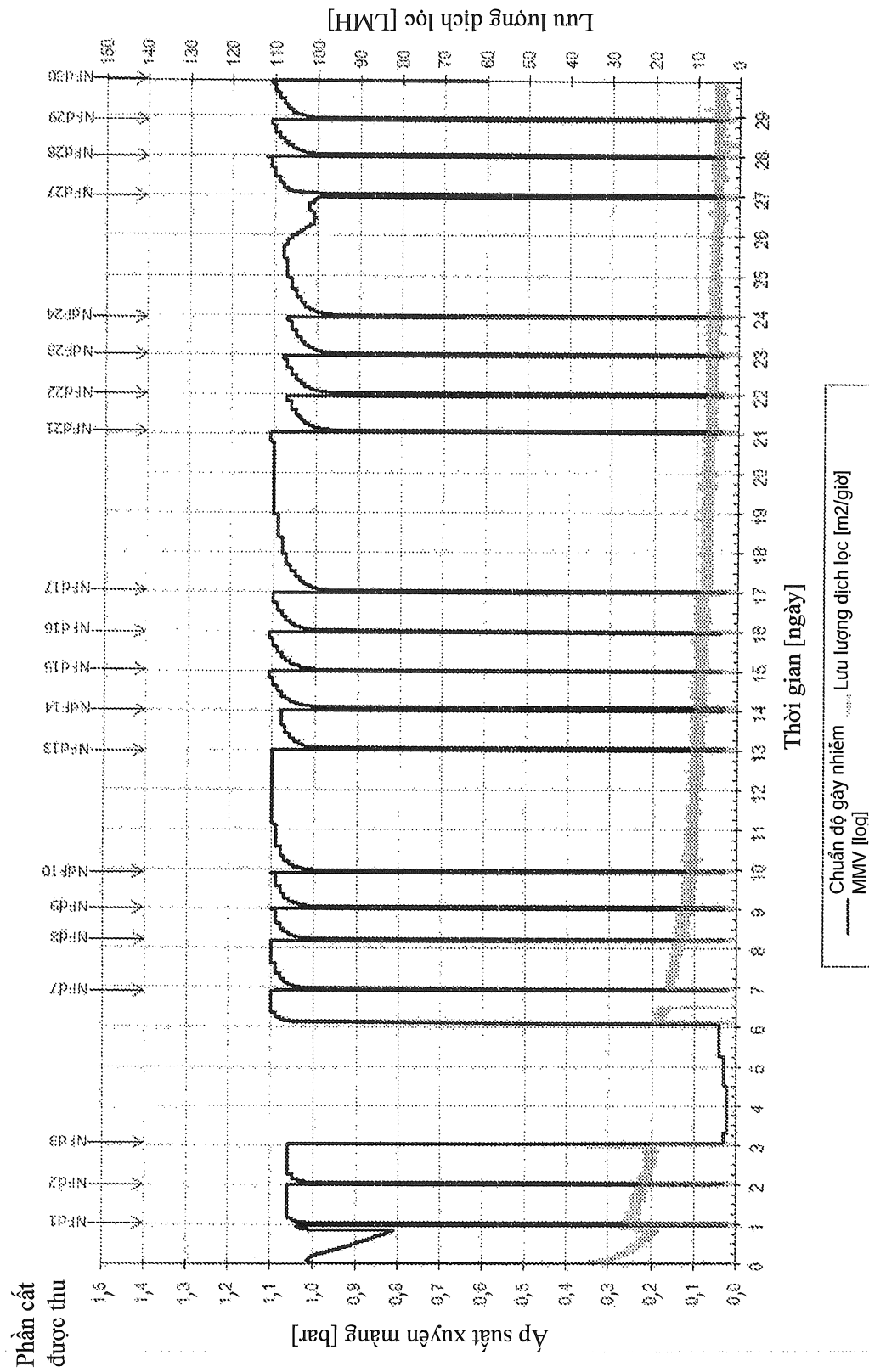


FIG. 11

Vật liệu được gây nhiễm	Thể tích cấp [mL]	Chuẩn độ MMV [log ₁₀ (TCID ₅₀ /mL)]	Tải lượng MMV [log ₁₀ (TCID ₅₀)]
NF ngày 1	3,270	5,0	8,5
NF ngày 2	287	< -0,8	< 1,7
NF ngày 3	272	< -0,8	< 1,6
NF ngày 7	246	< -0,8	< 1,6
NF ngày 8	330	< -0,3	< 2,8
NF ngày 9	216	< -0,8	< 1,5
NF ngày 10	118	< -0,8	< 1,3
NF ngày 13	121	< -0,8	< 1,3
NF ngày 14	368	< -0,8	< 1,8
NF ngày 15	106	< -0,8	< 1,2
NF ngày 16	98	< -0,8	< 1,2
NF ngày 17	99	< -0,8	< 1,2
NF ngày 21	96	< -0,8	< 1,2
NF ngày 22	354	< -0,8	< 1,7
NF ngày 23	69	< -0,8	< 1,0
NF ngày 24	74	< -0,8	< 1,1
NF ngày 27	67	< -0,8	< 1,0
NF ngày 28	194	< -0,8	< 1,5
NF ngày 29	57	< -0,8	< 1,0
NF ngày 30	49	< -0,8	< 0,9
NF ngày 30	52	< -0,8	< 0,9
Tổng thể tích được lọc	3,270		< 3,0
L/m ²	6,540		
RF			> 5,5 log ₁₀