



(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)



1-0031556

(51)⁸ C07K 1/30; C07K 14/59

(13) B

(21) 1-2018-00295

(22) 24/06/2016

(86) PCT/EP2016/064668 24/06/2016

(87) WO2016/207353 29/12/2016

(30) 15174029.7 26/06/2015 EP

(45) 25/04/2022 409

(43) 26/03/2018 360A

(73) FERRING B.V. (AN)

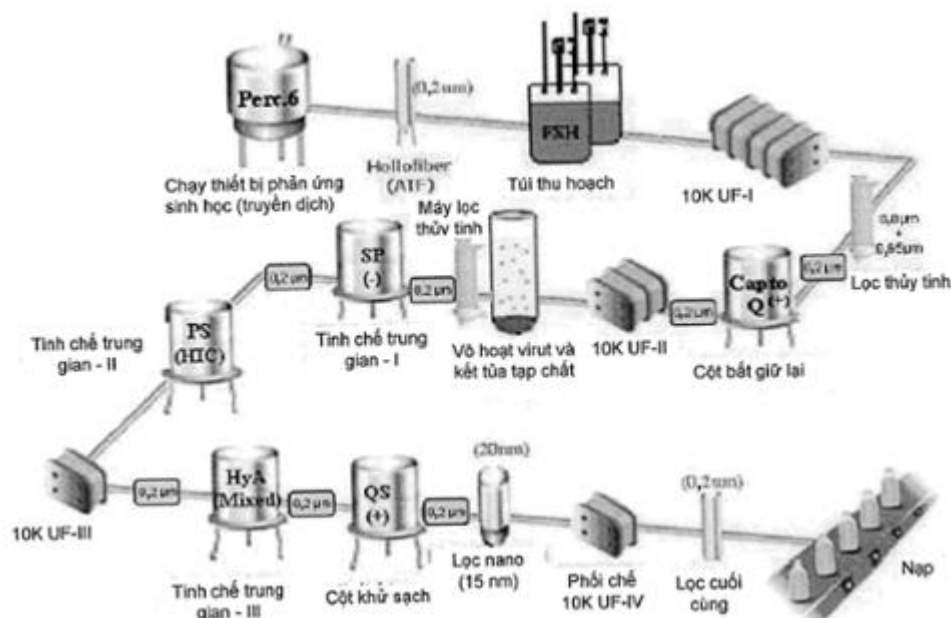
Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, Netherlands

(72) AHARONOV, Jenny (IL); EREZ, Elinor (IL); HAROSH, Eli (IL).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP TINH CHẾ GLYCOPROTEIN VÀ PHƯƠNG PHÁP VÔ HOẠT VIRUT

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế và/hoặc khử hoạt tính virut đối với protein (ví dụ, glycoprotein) bao gồm bước xử lý protein (ví dụ, glycoprotein) với kết hợp của axit caprylic và etanol. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các protein (ví dụ, glycoprotein) mà đã được tinh chế và/hoặc vô hoạt virut bằng phương pháp này, và được phẩm chứa các protein này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế protein (hoặc các sản phẩm protein) và/hoặc các phương pháp khử hoạt tính virus đối với protein (hoặc các sản phẩm protein). Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế glycoprotein (hoặc các sản phẩm glycoprotein) và/hoặc các phương pháp khử hoạt tính virus đối với glycoprotein (hoặc các sản phẩm glycoprotein). Các protein/glycoprotein có thể là, ví dụ, các glycoprotein tái tổ hợp như FSH, hCG hoặc LH, được sản xuất trong các tế bào chủ. Các protein/glycoprotein có thể thu được từ nước tiểu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều glycoprotein được sử dụng trong điều trị bệnh. Ví dụ, các gonadotropin là nhóm các glycoprotein mà được sử dụng trong điều trị bệnh vô sinh. Các gonadotropin là nhóm các hormon glycoprotein dạng heterodime mà điều hòa chức năng tuyến sinh dục ở nam và nữ. Chúng gồm hormon kích thích tạo nang trứng (follicle stimulating hormone - FSH), hormon lutein hóa (luteinising hormone - LH) và gonadotropin màng đệm (chorionic gonadotrophin - CG).

FSH và hCG được chiết ra từ nước tiểu của phụ nữ mang thai và sau mãn kinh đã được sử dụng trong nhiều năm để điều trị chứng vô sinh. Quy trình sản xuất FSH và hCG được chiết ra từ nước tiểu bao gồm việc thu gom và xử lý một lượng lớn nước tiểu.

Các dạng khác với các sản phẩm thu được từ nước tiểu là các dạng tái tổ hợp của FSH và hCG đã có trên thị trường. Các sản phẩm được phê chuẩn hiện nay (Gonal-F, Ovitrelle của Merck Serono; Puregon của MSD) được sản xuất (biểu hiện) trên các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO).

Người nộp đơn sáng chế này đã phát triển FSH tái tổ hợp và hCG tái tổ hợp, cả hai dạng này đều được biểu hiện trên dòng tế bào PER.C6®. Sản phẩm FSH thu được từ dòng tế bào PER.C6®, và các phương pháp sản xuất sản phẩm này được bộc lộ trong các đơn quốc tế số PCT/GB2009/000978 (số công bố WO2009/127826A), và PCT/EP2012/065507 (số công bố WO2013/020996). Sản phẩm này (FE999049) đã hoàn thành thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III ở châu Âu. Sản phẩm hCG tái tổ hợp thu

được từ dòng tế bào PER.C6®, và phương pháp sản xuất sản phẩm này được bộc lộ trong đơn quốc tế số PCT/GB2010/001854 (số công bố WO2011/042688).

Người nộp đơn sáng chế này đã phát triển các kỹ thuật mà có thể được sử dụng để tinh chế, ví dụ, FSH tái tổ hợp và hCG tái tổ hợp được sản xuất trong các dòng tế bào động vật có vú (ví dụ, FSH tái tổ hợp được bộc lộ trong WO2009/127826A và WO2013/020996, và hCG tái tổ hợp được bộc lộ trong WO2011/042688).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)], phương pháp này bao gồm bước xử lý protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)] với kết hợp của axit caprylic và ethanol.

Theo khía cạnh thêm nữa, sáng chế đề xuất phương pháp vô hoạt virus đối với protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)], phương pháp này bao gồm bước xử lý protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)] với kết hợp của axit caprylic và ethanol.

Theo khía cạnh thêm nữa, sáng chế đề xuất protein mà đã được tinh chế hoặc vô hoạt virus bằng phương pháp được mô tả trên đây. Protein này có thể là protein tái tổ hợp hoặc protein thu được từ nước tiểu. Protein này có thể là glycoprotein.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm [ví dụ, để (sử dụng trong) điều trị chứng vô sinh] chứa protein (ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, FSH tái tổ hợp, hCG tái tổ hợp) mà đã được tinh chế và/hoặc được vô hoạt virus bằng phương pháp nêu trên.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả dưới đây có tham khảo tới các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 thể hiện sơ đồ quy trình tinh chế FSH tái tổ hợp (khử hoạt tính virus) theo một phương án của sáng chế;

Fig.2 thể hiện bản mẫu gel theo đánh giá định tính sự loại bỏ các tạp chất đối với các mẫu FSH được xử lý UF2-AD (Ultrafiltration after dialysis: siêu lọc sau thẩm tách) khác nhau chạy trên PAGE giảm 12% (PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis: phương pháp điện di gel polyacrylamit), trong đó vạch 1 là các chất đánh dấu khối lượng phân tử thấp (LMW - low molecular weight), vạch 2 là dung dịch đệm mẫu, vạch 3 là UF2-AD, vạch 4 là UF2-AD + 10 mM CA, pH 5,5, vạch 5 là UF2-AD + 10 mM CA, 30% Etanol, pH 5,5, vạch 6 là dung dịch đệm mẫu, vạch 7 là các chất có khoảng khối lượng phân tử thấp, vạch 8 là UF2-AD, vạch 9 là UF2-AD + 20 mM CA, pH 5,5 và vạch 10 là UF2-AD + 20 mM CA, 30% Etanol pH 5,5 (xem ví dụ 3); và

Fig.3 thể hiện bản mẫu gel theo đánh giá định tính sự loại bỏ các tạp chất đối với các mẫu hCG được xử lý khác nhau chạy trên PAGE giảm 12% (PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis: phương pháp điện di gel polyacrylamit), trong đó vạch 1 là các chất đánh dấu khối lượng phân tử thấp (LMW - low molecular weight), vạch 2 là sản phẩm thu hoạch-AD chứa hCG, vạch 3 là NR-Not Relevant (không liên quan), vạch 4 là dịch nổi của [Sản phẩm thu hoạch-AD + 15mM C.A pH 5,0], và vạch 5 là dịch nổi của [Sản phẩm thu hoạch-AD + 20mM C.A + 10% Etanol pH 5,0], xem ví dụ 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)], phương pháp này bao gồm bước xử lý protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)] với kết hợp của axit caprylic và etanol.

Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý dung dịch chứa protein [ví dụ, trong nước, dung dịch đệm hoặc môi trường khác (ví dụ, dung dịch đệm; amoni axetat 100 mM, 30-50 mM NaCl, pH bằng 9-9,5)] với kết hợp của axit caprylic và etanol. Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý dung dịch chứa protein (ví dụ, glycoprotein) trong dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm amoni axetat) ở độ pH bằng 6,5 đến 12, ví dụ, độ pH bằng 7,5 đến 10, ví dụ, độ pH bằng 9 đến 9,5.

Bước xử lý glycoprotein với kết hợp của axit caprylic và etanol có thể diễn ra ở độ pH axit, ví dụ ở độ pH bằng từ 2 đến 6,5, ví dụ độ pH bằng 3 đến 6,5, ví dụ ở độ pH bằng 4 đến 6 (ví dụ độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$) tốt hơn là ở độ pH bằng 4,5 đến 5,5]. Việc sử dụng điều kiện axit này (ví dụ, độ pH bằng 4 đến 6) là do hoạt tính của axit caprylic. Axit caprylic có thể vô hoạt các virus có vỏ bọc bằng cách phá vỡ màng virus; việc này thực hiện được bằng dạng không điện tích của axit caprylic, dạng này có thể xuyên thấm qua màng kỵ nước của virus. Axit caprylic không có điện tích ở độ pH gần với độ pKa của nó (pH bằng 4,9). Ở mức Δ pH bằng 1 đơn vị ($\sim$ pH bằng 5,9), 100% phân tử axit caprylic có điện tích âm và do đó làm cho việc vô hoạt virus kém hiệu lực hơn.

Protein có thể là protein tái tổ hợp hoặc protein thu được từ nước tiểu. Protein có thể là glycoprotein. Protein/glycoprotein có thể là gonadotropin, ví dụ FSH, hCG hoặc LH. Glycoprotein có thể là glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp, ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp. Tốt hơn nếu protein/glycoprotein là glycoprotein tái tổ hợp (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp, ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp) được sản xuất trong tế bào (dòng tế bào) bằng phương pháp bao gồm nuôi cấy tế bào (dòng tế bào) trong môi trường thích hợp và thu hoạch glycoprotein tái tổ hợp từ tế bào (dòng tế bào) này và/hoặc môi trường này (ví dụ, thu hoạch protein tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào). Tế bào (dòng tế bào) có thể là tế bào (dòng tế bào) động vật có vú, ví dụ tế bào (dòng tế bào) CHO, tế bào (dòng tế bào) PER.C6®, tế bào (dòng tế bào) HEK293, tế bào (dòng tế bào) HT1080, tế bào (dòng tế bào) COS, tế bào (dòng tế bào) NOS, tế bào (dòng tế bào) SP20, v.v.. Tốt hơn nếu tế bào (dòng tế bào) này là tế bào (dòng tế bào) PER.C6®.

Các glycoprotein (các gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.), thu được từ nước tiểu hoặc là dạng tái tổ hợp, thường ở dạng dung dịch/hỗn dịch trong môi trường. Glycoprotein có thể ở dưới dạng isoform duy nhất hoặc dưới dạng hỗn hợp các isoform, như được biết rõ trong lĩnh vực này. Ở đây, các thuật ngữ protein, glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v. bao gồm dung dịch hoặc hỗn dịch chứa protein, glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.. Ở đây, các thuật ngữ protein, glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v. bao gồm dung dịch hoặc hỗn dịch chứa protein, glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v., trong đó protein, glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v. ở dưới dạng isoform duy nhất hoặc dưới dạng hỗn

hợp của các isoform. Do đó, thuật ngữ FSH bao gồm dung dịch hoặc hỗn dịch chứa FSH (ví dụ, trong đó FSH ở dưới dạng isoform duy nhất hoặc dưới dạng hỗn hợp các isoform).

Ở đây, cụm từ “xử lý protein, (glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.) với kết hợp của axit caprylic và etanol” có nghĩa là áp dụng cả axit caprylic và etanol cho protein (glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.) sao cho protein (glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.) được tiếp xúc đồng thời với cả axit caprylic và etanol. Do đó, cụm từ này bao gồm các kỹ thuật trong đó axit caprylic và etanol được bổ sung, dưới dạng hỗn hợp, hoặc dưới dạng hai chất phản ứng tách riêng, vào dung dịch protein (glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.), do đó dung dịch này trở thành hỗn hợp của axit caprylic, etanol và protein (glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.); cụm từ này còn bao gồm các kỹ thuật khác trong đó cả axit caprylic và etanol đều đồng thời tác dụng lên protein (glycoprotein, gonadotropin, FSH, hCG, LH v.v.).

Người nộp đơn đã bất ngờ phát hiện ra rằng việc xử lý dung dịch chứa protein/glycoprotein tái tổ hợp (ví dụ, FSH tái tổ hợp, hCG tái tổ hợp) với etanol và axit caprylic, ví dụ kết hợp của 20 mM axit caprylic/30% etanol, ở độ pH axit, có thể dẫn đến sự biến tính một số virus (gây ra sự vô hoạt chúng) và/hoặc sự kết tủa của các virus và protein tế bào chủ khác (các tạp chất). Sau đó dung dịch có thể được ly tâm hoặc lọc (để loại bỏ các virus và/hoặc protein tế bào chủ kết tủa, ví dụ, bằng cách sử dụng máy lọc sâu như máy lọc thủy tinh), nhờ đó dịch nổi chứa glycoprotein được tinh chế (ví dụ, FSH tái tổ hợp, hCG tái tổ hợp) cho quy trình xử lý và sử dụng tiếp theo. Người nộp đơn đã phát hiện ra rằng việc xử lý dung dịch chứa glycoprotein tái tổ hợp (ví dụ, FSH tái tổ hợp, hCG tái tổ hợp) bằng etanol và axit caprylic có thể (i) vô hoạt virus có vỏ bọc; và/hoặc (ii) làm sạch virus không có vỏ bọc bằng cách kết tủa (virus kết tủa sau đó có thể được loại bỏ bằng bước ly tâm hoặc lọc tiếp theo, ví dụ, bằng máy lọc sợi thủy tinh); và/hoặc (iii) loại bỏ các protein liên quan đến tế bào chủ bằng cách kết tủa (các protein liên quan đến tế bào chủ được kết tủa sau đó có thể được loại bỏ bằng bước ly tâm hoặc lọc tiếp theo, ví dụ, bằng máy lọc sợi thủy tinh). Quy trình xử lý và lọc tương đối đơn giản này giúp loại bỏ tạp chất một cách đáng kể (64% đến 79% số tạp chất liên quan đến tế bào chủ được loại bỏ trong quy trình này), với tổn hao glycoprotein sản phẩm tối thiểu (tức là, có hiệu suất cao).

Việc sử dụng axit caprylic và etanol (ví dụ, trong quy trình tinh chế/vô hoạt virus đối với FSH tái tổ hợp và/hoặc hCG tái tổ hợp) còn có các thuận lợi khác. Thứ nhất là, kết hợp của axit caprylic và etanol có thể rút ngắn quy trình tinh chế do một bước duy nhất có thể có tác dụng kép: vô hoạt virus và kết tủa virus, cũng như kết tủa các protein tế bào chủ. Thứ hai là, như nêu trên, axit caprylic có hoạt tính nhất đối với sự vô hoạt virus ở độ pH ~4,9, nhưng độ pH thấp này có thể phá hủy về mặt lý thuyết sản phẩm FSH tái tổ hợp (bằng sự phân ly phân tử, v.v.). Theo phương trình Henderson-Hasselbalch, ở độ pH bằng 5,5, khoảng 20% CA (axit caprylic) không có điện tích, điều này tạo ra sự cân bằng tốt giữa sự vô hoạt virus và sự giảm nguy cơ phá hủy FSH tái tổ hợp; việc bổ sung EtOH (ví dụ, 30% EtOH) bù vào sự tổn thất hoạt tính axit caprylic trong các điều kiện này, các điều kiện này ít có hại đối với protein. Cuối cùng là, sự kết hợp axit caprylic/EtOH cho phép sử dụng nồng độ EtOH thấp hơn (ví dụ, 30%), đây là yếu tố cực kỳ quan trọng trong quy trình sản xuất do vấn đề an toàn.

Nồng độ axit caprylic có thể là từ 10 mM đến 30 mM, ví dụ từ 18 mM đến 25 mM, ví dụ từ 19 mM đến 23 mM, ví dụ 20 mM. EtOH có thể có nồng độ từ 20% đến 50%, ví dụ từ 25% đến 50%, ví dụ từ 30% đến 50%, ví dụ 30%. Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý glycoprotein với etanol nồng độ 30% đến 50% và axit caprylic nồng độ 18 mM đến 25 mM, ví dụ axit caprylic 20 mM và etanol 30%.

Phương pháp này có thể bao gồm xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian ủ từ 1 phút đến 6 giờ ở nhiệt độ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ cùng với việc khuấy (ví dụ, để vô hoạt virus, với sự kết tủa được quan sát), ví dụ xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian ủ từ 0,5 đến 1 giờ ở nhiệt độ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ với việc khuấy (ví dụ, để vô hoạt virus, với sự kết tủa được quan sát). Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C trong thời gian ủ từ 1 phút đến 32 giờ, mà không khuấy (bước này có thể tiếp tục/cho phép kết tủa các protein tế bào chủ (host cell proteins - HCP) và các virus không có vỏ bọc), ví dụ xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C trong thời gian ủ từ 14 đến 16 giờ, mà không khuấy (bước này có thể tiếp tục/cho phép kết tủa HCP và các virus không có vỏ bọc). Theo ví dụ được ưu tiên, phương pháp này bao gồm bước xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian ủ 0,5 đến 1 giờ ở nhiệt độ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ với việc khuấy, sau đó giảm xuống

nhiệt độ 4°C đến 8°C và ủ tiếp trong thời gian 16 ± 2 giờ, ví dụ 14 đến 16 giờ, mà không khuấy.

Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian 1 giờ ± 10 phút ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$ và nhiệt độ là $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Phương pháp này có thể bao gồm bước tiếp theo ly tâm hoặc lọc (dung dịch) protein (glycoprotein) sau khi xử lý với axit caprylic và etanol (ví dụ, qua máy lọc sâu, ví dụ, máy lọc sợi thủy tinh).

Phương pháp này có thể bao gồm bước tiếp theo cô (dung dịch) protein (glycoprotein) đến nồng độ mong muốn (của protein/glycoprotein) và/hoặc các bước tinh chế/phôi chế (ví dụ, tiếp theo) khác.

Theo khía cạnh thêm nữa, sáng chế đề xuất phương pháp vô hoạt virus trong protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)], phương pháp này bao gồm bước xử lý protein [ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, gonadotropin (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp), FSH, hCG hoặc LH (ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp)] với kết hợp của axit caprylic và etanol.

Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý dung dịch chứa glycoprotein [ví dụ, trong nước, dung dịch đệm hoặc môi trường khác (ví dụ, dung dịch đệm; 100 mM amoni axetat, 30-50 mM NaCl, pH bằng 9-9,5)] với kết hợp của axit caprylic và etanol. Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý dung dịch chứa protein (ví dụ, glycoprotein) trong dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm amoni axetat) ở độ pH bằng 6,5 đến 12, ví dụ, độ pH bằng 7,5 đến 10, ví dụ, độ pH bằng 9 đến 9,5.

Bước xử lý glycoprotein với kết hợp của axit caprylic và etanol có thể diễn ra ở độ pH axit, ví dụ ở độ pH bằng từ 2 đến 6,5, ví dụ độ pH bằng 3 đến 6,5, ví dụ ở độ pH bằng 4 đến 6 (ví dụ độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$), tốt hơn là ở độ pH bằng 4,5 đến 5,5]. Việc sử dụng điều kiện axit này (ví dụ, độ pH bằng 4 đến 6) là do hoạt tính của axit caprylic. Axit caprylic có thể vô hoạt các virus có vỏ bọc bằng cách phá vỡ màng virus; việc này thực hiện được bằng dạng không điện tích của axit caprylic, dạng này có thể xuyên thấm qua màng kỵ nước của virus. Axit caprylic không có điện tích ở độ pH gần với độ pKa

của nó (pH bằng 4,9). Ở mức Δ pH bằng 1 đơn vị tăng lên (~pH bằng 5,9), 100% phân tử axit caprylic có điện tích âm và do đó làm cho việc vô hoạt virus kém hiệu lực hơn.

Nồng độ axit caprylic có thể là từ 10 mM đến 30 mM, ví dụ từ 18 mM đến 25 mM, ví dụ từ 19 mM đến 23 mM, ví dụ 20 mM. EtOH có thể có nồng độ từ 20% đến 50%, ví dụ từ 25% đến 50%, ví dụ từ 30% đến 50%, ví dụ 30%. Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý glycoprotein với etanol nồng độ 30% đến 50% và axit caprylic nồng độ 18 mM đến 25 mM, ví dụ axit caprylic 20 mM và etanol 30%.

Phương pháp này có thể bao gồm xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian từ 1 phút đến 6 giờ ở nhiệt độ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ cùng với việc khuấy, ví dụ xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian từ 0,5 đến 1 giờ ở nhiệt độ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ cùng với việc khuấy. Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C trong thời gian từ 1 phút đến 32 giờ, mà không khuấy, ví dụ xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C trong thời gian từ 14 đến 16 giờ, mà không khuấy. Theo ví dụ được ưu tiên, phương pháp này bao gồm bước xử lý glycoprotein với etanol và axit caprylic trong thời gian từ 0,5 đến 1 giờ ở nhiệt độ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ cùng với việc khuấy, sau đó giảm xuống nhiệt độ 4°C đến 8°C và ủ tiếp trong thời gian 14 đến 16 giờ, mà không khuấy.

Phương pháp này có thể bao gồm bước xử lý protein (glycoprotein) với etanol và axit caprylic trong thời gian 1 giờ ± 10 phút ở độ pH bằng $5,5\pm 0,1$ và nhiệt độ là $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Phương pháp này có thể bao gồm bước tiếp theo ly tâm hoặc lọc (dung dịch) protein (glycoprotein) sau khi xử lý với axit caprylic và etanol (ví dụ, qua máy lọc sợi thủy tinh).

Phương pháp này có thể bao gồm bước tiếp theo cô (dung dịch) protein (glycoprotein) đến nồng độ mong muốn (của protein/glycoprotein) và/hoặc các bước tinh chế/phối chế (ví dụ, tiếp theo) khác.

Protein có thể là protein tái tổ hợp hoặc protein thu được từ nước tiểu. Protein có thể là glycoprotein. Protein/glycoprotein có thể là gonadotropin, ví dụ FSH, hCG hoặc LH. Protein/glycoprotein có thể là glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp, ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp. Tốt hơn nếu protein/glycoprotein là

glycoprotein tái tổ hợp (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp, ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp) được sản xuất trong tế bào (dòng tế bào) bằng phương pháp bao gồm nuôi cấy tế bào (dòng tế bào) trong môi trường thích hợp và thu hoạch glycoprotein tái tổ hợp từ tế bào (dòng tế bào) này và/hoặc môi trường này (ví dụ, thu hoạch protein tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào). Tế bào (dòng tế bào) có thể là tế bào (dòng tế bào) động vật có vú, ví dụ tế bào (dòng tế bào) CHO, tế bào (dòng tế bào) PER.C6®, tế bào (dòng tế bào) HEK293, tế bào (dòng tế bào) HT1080, tế bào (dòng tế bào) COS, tế bào (dòng tế bào) NOS, tế bào (dòng tế bào) SP20, v.v.. Tốt hơn nếu tế bào (dòng tế bào) này là tế bào (dòng tế bào) PER.C6®.

Theo khía cạnh thêm nữa, sáng chế đề xuất protein mà đã được tinh chế hoặc vô hoạt virus bằng phương pháp được mô tả trên đây. Protein có thể là protein tái tổ hợp hoặc protein thu được từ nước tiểu. Protein có thể là glycoprotein. Glycoprotein có thể là glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp, ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp. Tốt hơn nếu glycoprotein là glycoprotein tái tổ hợp (ví dụ, gonadotropin tái tổ hợp, ví dụ, FSH, hCG hoặc LH tái tổ hợp) được sản xuất trong tế bào (dòng tế bào) bằng phương pháp bao gồm nuôi cấy tế bào (dòng tế bào) trong môi trường thích hợp và thu hoạch glycoprotein tái tổ hợp từ tế bào (dòng tế bào) này và/hoặc môi trường này (ví dụ, thu hoạch protein tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào). Tế bào (dòng tế bào) có thể là tế bào (dòng tế bào) động vật có vú, ví dụ tế bào (dòng tế bào) CHO, tế bào (dòng tế bào) PER.C6®, tế bào (dòng tế bào) HEK293, tế bào (dòng tế bào) HT1080, tế bào (dòng tế bào) COS, tế bào (dòng tế bào) NOS, tế bào (dòng tế bào) SP20, v.v.. Tốt hơn nếu tế bào (dòng tế bào) này là tế bào (dòng tế bào) PER.C6®.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm [ví dụ, để (sử dụng trong) điều trị chứng vô sinh] chứa protein (ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, FSH tái tổ hợp, hCG tái tổ hợp) mà đã được tinh chế và/hoặc được vô hoạt virus bằng phương pháp nêu trên.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị (ví dụ, chứng vô sinh) bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị dùng được phẩm chứa protein (ví dụ, glycoprotein, ví dụ, glycoprotein tái tổ hợp, ví dụ, FSH tái tổ hợp, hCG tái tổ hợp) mà đã được tinh chế và/hoặc được vô hoạt virus bằng phương pháp nêu trên.

Việc điều trị chứng vô sinh có thể bao gồm các công nghệ hỗ trợ sinh sản (assisted reproductive technologies - ART), gây rụng trứng hoặc bơm tinh trùng vào buồng tử cung (ovulation induction or intrauterine insemination - IUI). Dược phẩm này có thể được sử dụng, ví dụ, trong các chỉ định y học mà trong đó các dạng bào chế FSH, LH, hCG đã biết được sử dụng.

Sản phẩm hoặc chế phẩm có thể được phối chế thành các chế phẩm đã được biết rõ để dùng theo đường bất kỳ, ví dụ, qua đường miệng, qua trực tràng, ngoài đường tiêu hóa, qua da (ví dụ, công nghệ miếng dán), trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong bề, trong âm đạo, trong màng bụng, tại chỗ (bột, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ giọt) hoặc dưới dạng thuốc phun vào miệng hoặc mũi. Chế phẩm điển hình chứa chất mang dược dụng, như dung dịch nước, tá dược không độc, gồm muối và các chất bảo quản, các chất đệm và các chất tương tự, như được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company, 1975), ở các trang 1405 đến 1412 và 1461 – 87, và The national formulary XIV fourteenth edition (American Pharmaceutical Association, 1975), v.v..

Ví dụ về các chất mang, chất pha loãng, dung môi hoặc chất dẫn dùng cho dược phẩm chứa nước hoặc không chứa nước thích hợp bao gồm nước, etanol, các rượu đa chức (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol và các rượu tương tự), carboxymetylxenluloza và các hỗn hợp thích hợp của chúng, các dầu thực vật (như dầu oliu), các este hữu cơ tiêm được như etyl oleat. Các chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa các chất phụ gia như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất bảo quản, các chất làm ướt, các chất nhũ hóa, các chất hoạt động bề mặt và các chất làm phân tán. Các chất kháng khuẩn và các chất kháng nấm có thể được đưa vào để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật và gồm, ví dụ, m-cresol, rượu benzylic, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và các chất tương tự. Nếu chất bảo quản được chứa thì rượu benzyl, phenol và/hoặc m-cresol là được ưu tiên; tuy nhiên, chất bảo quản không chỉ giới hạn ở các chất được ví dụ này. Hơn nữa, cũng có thể mong muốn chứa thêm các chất đẳng trương như đường, natri clorua và các chất tương tự. Sản phẩm hoặc chế phẩm này có thể còn chứa muối chứa cation kim loại kiềm được dụng được chọn từ nhóm gồm các muối Na^+ - hoặc K^+ -, hoặc kết hợp của chúng. Tốt hơn là, muối này là muối Na^+ , ví dụ NaCl hoặc Na_2SO_4 .

Tốt hơn là, sản phẩm hoặc chế phẩm này chứa glycoprotein và một hoặc nhiều

chất trong số Polysorbate 20, L-methionin, phenol, dinatri sulphat và chất đệm natri phosphat, sucroza và các chất đệm xitrat.

Các chế phẩm tiêm được có thể được khử trùng, ví dụ, bằng cách lọc qua bộ lọc giữ vi khuẩn lại, hoặc bằng cách kết hợp các chất khử trùng ở dạng chế phẩm rắn vô trùng mà có thể hòa tan được hoặc phân tán được trong nước vô trùng hoặc môi trường tiêm vô trùng khác ngay trước khi sử dụng. Các chế phẩm tiêm được có thể được cung cấp trong đồ chứa thích hợp bất kỳ, ví dụ, lọ, ống tiêm đã nạp trước, hộp thuốc tiêm, và các dạng tương tự.

Chế phẩm có thể được phối chế để sử dụng một lần hoặc sử dụng nhiều lần (đa liều). Nếu sản phẩm hoặc chế phẩm được phối chế để sử dụng nhiều lần thì tốt hơn là có chứa chất bảo quản. Nếu chất bảo quản được chứa thì rượu benzyl, phenol và/hoặc m-cresol là được ưu tiên; tuy nhiên, chất bảo quản không chỉ giới hạn ở các chất được ví dụ này. Sản phẩm hoặc chế phẩm được phối chế để sử dụng một lần hoặc nhiều lần này có thể còn chứa muối chứa cation kim loại kiềm được chọn từ nhóm gồm các muối Na^+ - hoặc K^+ -, hoặc kết hợp của chúng. Tốt hơn là, muối này là muối Na^+ , ví dụ NaCl hoặc Na_2SO_4 .

Sản phẩm hoặc chế phẩm có thể được chứa trong đồ chứa như lọ, hộp được nạp trước (ví dụ, để dùng một lần hoặc dùng đa liều) hoặc trong dụng cụ tiêm như “bút”, để dùng đa liều.

Lọ có thể được đóng gói trong gói dạng phòng hoặc các phương tiện khác để duy trì sự vô trùng. Sản phẩm có thể tùy ý chứa các hướng dẫn để sử dụng các chế phẩm FSH (và, ví dụ, hCG nếu có). Độ pH và nồng độ chính xác của các thành phần khác nhau của dược phẩm được điều chỉnh theo thực tiễn thông thường trong lĩnh vực này. Xem GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7th ed. Theo phương án được ưu tiên, các chế phẩm theo sáng chế được cung cấp dưới dạng các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa. Các phương pháp chung để bào chế các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa đã được biết đến trong lĩnh vực này và được mô tả trong REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, supra, ở các trang 780-820. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được cung cấp dưới dạng chế phẩm lỏng hoặc dưới dạng chất rắn mà sẽ được trộn với môi trường vô trùng tiêm được ngay trước khi dùng. Theo một phương án được đặc

biệt ưu tiên, các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa được cung cấp dưới dạng đơn vị liều lượng dễ dễ dùng và làm đồng đều liều lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Fig.1 thể hiện tổng quan về toàn bộ quy trình tinh chế FSH tái tổ hợp. Như có thể thấy từ Fig.1, FSH tái tổ hợp được biểu hiện trong dòng tế bào PER.C6® được xử lý bằng phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2013/020996 và WO2009/127826A sử dụng thiết bị phản ứng sinh học.

Thiết bị phản ứng sinh học được gieo cấy và sự sinh trưởng tế bào được thúc đẩy bằng các phương pháp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ, và chạy thiết bị phản ứng sinh học này theo phương thức truyền dịch để sản xuất và thu hoạch liên tục FSH tái tổ hợp, sử dụng hệ thống Holo fibre (ATF4) có bán từ Repligen. Việc gieo cấy ít nhất 1×10^6 tế bào/mL trong tổng thể tích là 4 ± 1 lít diễn ra trong môi trường 6GRO. Việc sản xuất diễn ra trong môi trường ProPer-1, và sản phẩm thu hoạch từ thiết bị phản ứng sinh học được thu gom vào các túi polyetylen. Do đó, trong ví dụ này, protein (glycoprotein) là glycoprotein tái tổ hợp (FSH tái tổ hợp) được sản xuất trong dòng tế bào PER.C6® bằng phương pháp bao gồm nuôi cấy dòng tế bào này trong môi trường thích hợp (môi trường ProPer-1) và thu hoạch glycoprotein tái tổ hợp từ môi trường này (bằng cách thu hoạch protein tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào).

Sản phẩm thu hoạch từ thiết bị phản ứng sinh học được gộp lại và đem qua bước siêu lọc/lọc thẩm tách 10 kDa (UF1), bước này làm giảm nồng độ của sản phẩm thu hoạch, điều chỉnh điều kiện của sản phẩm thu hoạch (độ pH và độ dẫn điện) cho quy trình sắc ký Capto-Q, và loại bỏ các chất màu và các thành phần khối lượng phân tử thấp của môi trường nuôi cấy. Phần còn lại được lọc qua máy lọc sợi thủy tinh cỡ $0,8 + 0,65 \mu\text{m}$ để làm trong dung dịch xử lý (xem Fig.1), và sau đó được lọc qua cỡ lọc $0,2 \mu\text{m}$ để kiểm soát tải trọng sinh học. Sau đó quy trình sắc ký trao đổi anion Capto-Q được sử dụng, bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, để giữ lại FSH tái tổ hợp, và loại bỏ ADN, nội độc tố, protein tế bào chủ và các tạp chất liên quan đến quy trình. Việc lọc $0,2 \mu\text{m}$ tiếp được thực hiện để kiểm soát tải trọng sinh học.

Nước giải hấp Capto-Q đã lọc được đem siêu lọc/lọc thẩm tách 10 kDa tiếp (UF2) nhằm khử muối và giảm thể tích trước khi tinh chế/vô hoạt virus, bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Bước CA/EtOH

Phần còn lại sau bước UF2 là dung dịch chứa FSH tái tổ hợp trong dung dịch đệm (100 mM amoni axetat, 30 mM NaCl, pH bằng 9,3 đến 9,7). Độ pH của dung dịch protein đầu tiên được giảm từ độ pH bằng 9,3 đến 9,7 xuống độ pH bằng $6,3 \pm 0,3$ ở $23 \pm 2^\circ\text{C}$ cùng với việc khuấy, sau đó xử lý bằng kết hợp của 20 mM axit caprylic/30% etanol (CA/EtOH) sau đó điều chỉnh tiếp độ pH xuống 4,5 đến 5,6 (độ pH được điều chỉnh bằng HCl 1M). Sau bước xử lý này, dung dịch protein được ủ trong 0,5 đến 1 giờ ở $23 \pm 2^\circ\text{C}$ cùng với việc khuấy (trong thời gian này, sự vô hoạt virus diễn ra và thấy có các kết tủa trắng giống như bông). Sau khi kết thúc quá trình ủ 0,5 đến 1 giờ này, nhiệt độ của dung dịch protein được giảm xuống đến 4°C đến 8°C , và dung dịch được ủ trong 14 đến 18 giờ nữa, ví dụ, từ 14 đến 16 giờ, mà không khuấy (điều này cho phép tiếp tục kết tủa HCP và các virus không có vỏ bọc khác). Bước xử lý CA/ETOH có ba tác dụng: (i) vô hoạt virus có vỏ bọc; (ii) làm sạch virus không có vỏ bọc bằng cách kết tủa sau đó là bước làm trong để loại bỏ kết tủa; và (iii) loại bỏ protein liên quan đến tế bào chủ bằng cách kết tủa.

Các tạp chất kết tủa (virus không có vỏ bọc và protein liên quan đến tế bào chủ) được loại bỏ bằng bước lọc qua máy lọc sợi thủy tinh cỡ lọc $0,8 + 0,65$ micromet, bước lọc này còn làm trong dung dịch FSH tái tổ hợp.

Việc lọc $0,2 \mu\text{m}$ tiếp được thực hiện để kiểm soát tải trọng sinh học.

Sau đó dung dịch này được sắc ký trao đổi cation Sulfopropyl- Sepharose (SP-FF) bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để loại bỏ axit caprylic, etanol và các protein tế bào chủ khác. Việc lọc $0,2 \mu\text{m}$ tiếp được thực hiện để kiểm soát tải trọng sinh học, sau đó là bước tinh chế bổ sung sử dụng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước Phenyl-Sepharose (PS-FF) để loại bỏ các phân đơn vị FSH tái tổ hợp tự do và các protein tế bào chủ.

Nước giải hấp PS được đem thực hiện bước siêu lọc/lọc thẩm tách 10 kDa lần thứ 3 (UF3) để loại bỏ muối và điều chỉnh điều kiện của dung dịch cho bước tiếp theo.

Việc lọc 0,2 μm tiếp được thực hiện để kiểm soát tải trọng sinh học, trước khi thực hiện sắc ký hấp thụ hydroxyapatit (HyA), để loại bỏ các phân đơn vị FSH phân ly và các heterodime kiểm tính, sau đó thực hiện tiếp việc lọc 0,2 μm để kiểm soát tải trọng sinh học.

“Bước khử sạch” sắc ký trao đổi anion Q-sepharose (QS-FF) được thực hiện theo phương thức gắn kết/rửa giải để loại bỏ các protein tế bào chủ, ADN, nội độc tố và các virus tiềm năng. Sau đó thực hiện tiếp việc lọc 0,2 μm kiểm soát tải trọng sinh học, trước khi gộp các MP QS và thực hiện lọc ở kích cỡ nano để loại bỏ các virus tiềm năng. Dịch nổi được đem thực hiện bước siêu lọc/lọc thẩm tách 10 kDa lần thứ tư (UF4) để cô FSH tái tổ hợp đến 0,5 đến 1,1 mg/ml, sau đó là bổ sung polysorbat 20 vào để nồng độ cuối cùng là 0,005 mg/ml. Đây là các bước thẩm tách và điều chỉnh dung dịch đệm, và các bước này đã được biết rõ trong lĩnh vực này. FSH tái tổ hợp được đem thực hiện bước lọc 0,2 μm cuối cùng trước khi phân chia vào các bao gói chính và bảo quản ở -20°C cho đến khi vận chuyển.

Người nộp đơn đã phát hiện ra rằng việc xử lý bằng axit caprylic/etanol có thể giảm một cách rõ rệt các tạp chất liên quan đến tế bào chủ. Theo các lần thực hiện sản xuất khác nhau (số liệu không được thể hiện) 64 đến 79% các tạp chất liên quan đến tế bào chủ được loại bỏ nhờ bước CA/EtOH (và bước lọc sợi thủy tinh sau đó) được mô tả trên đây, trong khi đạt được hiệu suất thu hồi FSH cao khoảng 90 đến 95%. Đây là mức giảm đáng kể lượng tạp chất liên quan đến tế bào chủ mà thu được bằng quy trình đơn giản, với mức tổn hao protein sản phẩm (glycoprotein sản phẩm) là tối thiểu.

Hiệu quả làm sạch virus rõ rệt của bước này được tổng kết trong bảng 1, bảng này thể hiện kết quả tổng kết các $\log_{10}$ của hệ số giảm, mà nằm trong vùng từ $\geq 4,25$ đến $\geq 5,41$. Logarit của hệ số giảm (log-reduction factor - LRF) $\geq 4 \log_{10}$ (ví dụ, đến $8 \log_{10}$ hoặc lớn hơn) thường được xem như là cao, mạnh mẽ và hiệu quả.

Bảng 1: Tổng kết các $\log_{10}$ của hệ số giảm (rFSH)

Bước xử lý	Thử nghiệm số	Các virus có vỏ bọc		Các virus không có vỏ bọc
		MuLV	PRV	EMCV ⁽¹⁾

Xử lý axit caprylic / etanol (nồng độ protein 2 mg/mL)	K1/B28/12 K1/B28/13 ⁽¹⁾	$\geq 4,88$ / $\geq 5,12$	$\geq 5,29$ / $\geq 5,41$	$\geq 4,42$ / $\geq 4,47$
Xử lý axit caprylic / etanol (nồng độ protein 6 mg/mL)	K1/B28/12 K1/B28/13 ⁽¹⁾	$\geq 4,94$ / $\geq 4,58$	$\geq 5,11$ / $\geq 5,29$	$\geq 4,25$ / $\geq 4,36$

⁽¹⁾ Thử nghiệm đối với EMCV gồm bước lọc sợi thủy tinh sau xử lý

Ví dụ nêu trên đề cập đến rFSH, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng quy trình [ví dụ, bước CA/EtOH (và lọc sợi thủy tinh sau đó)] nêu trên có thể dễ dàng áp dụng để tinh chế/vô hoạt virus đối với các protein khác (ví dụ, các glycoprotein), ví dụ rhCG [ví dụ, rhCG được sản xuất trong dòng tế bào PER.C6® bằng phương pháp nêu trong đơn quốc tế số PCT/GB2010/001854 (số công bố WO2011/042688)].

Ví dụ 2

Trong ví dụ khác về phương pháp theo sáng chế này, sáng chế đề xuất quy trình tinh chế/vô hoạt virus đối với hCG. Phương pháp tương tự với phương pháp trong ví dụ 1 trên đây (trừ bước sắc ký trao đổi cation Sulfopropyl- Sepharosa (SP-FF)) được sử dụng để tinh chế/vô hoạt virus đối với rhCG được sản xuất trong dòng tế bào PER.C6 bằng phương pháp nêu trong đơn quốc tế số PCT/GB2010/001854 (số công bố WO2011/042688). Người nộp đơn đã phát hiện ra rằng sự vô hoạt hóa học bằng axit caprylic và etanol ở độ pH axit, tức là sử dụng bước CA/EtOH nêu trong ví dụ 1, đã loại bỏ khoảng 65% số tạp chất không phải hCG (bằng sự kết tủa), trong khi đạt được hiệu suất thu hồi hCG cao khoảng 90%.

Hiệu quả làm sạch virus tuyệt vời của bước CA/EtOH trong ví dụ này được tổng kết trên bảng 2. Sự vô hoạt virus đối với MuLV là hữu hiệu như được xác định bằng mức LRF cao đạt được, trong khoảng $\geq 5,31$ đến $\geq 5,48$. Các mức LRF trong khoảng giữa $\geq 2,03$ và $\geq 2,74$ đạt được đối với việc xử lý CA/EtOH và loại bỏ kết tủa.

Bảng 2: Tổng kết các log₁₀ của hệ số giảm (rhCG)

Bước xử lý	Thử nghiệm số	Logarit của hệ số giảm (LRF)	
		Virus có vỏ bọc (MuLV)	Virus không có vỏ bọc (PPV)

Xử lý axit caprylic / etanol (nồng độ protein 2 mg/mL)	KOP1-B01-15	$\geq 5,43 / \geq 5,31$	$\geq 2,03 / \geq 2,21$
Xử lý axit caprylic / etanol (nồng độ protein 6 mg/mL)	KOP1-B01-15	$\geq 5,31 / \geq 5,48$	$\geq 2,68 / \geq 2,74$

Ví dụ 3: Đánh giá điều kiện kết tủa đối với việc loại bỏ tạp chất trong dung dịch chứa rFSH

Mô tả thử nghiệm:

Sản phẩm trung gian UF2-AD (Siêu lọc sau khi thẩm tách - Ultrafiltration after dialysis) thu được sử dụng quy trình tinh chế rFSH theo ví dụ 1 (cho đến bước CA/EtOH) chứa 100 mM Amoni Axetat + 30 mM NaCl, độ pH bằng 9,50±0,20, 11,00±0,50 mS/cm. Sản phẩm này được phân chia thành cách phân ước và mỗi phân ước được điều chỉnh điều kiện kết tủa khác nhau để loại bỏ các tạp chất (rFSH là hòa tan trong dung dịch). Các điều kiện kết tủa được thử nghiệm là như sau:

1. UF2-AD không có xử lý (đối chứng)
2. UF2-AD + 10 mM axit caprylic (caprylic acid - CA), pH bằng 5,5
3. UF2-AD + 10 mM CA, 30% etanol, pH bằng 5,5
4. UF2-AD + 20 mM CA, pH bằng 5,5
5. UF2-AD + 20 mM CA, 30% etanol, pH bằng 5,5

Tất cả các mẫu đã được xử lý được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng cùng với việc khuấy sau đó ủ thêm 30 phút mà không khuấy. Thực hiện ủ tiếp ở 2 đến 8°C trong thời gian 16 đến 20 giờ. Các chất kết tủa được tạo ra được loại bỏ bằng cách ly tâm trong khi dịch nổi được thu gom.

Các thông số đặc trưng của quy trình kết tủa:

Thu hồi rFSH

Nồng độ rFSH trong tất cả các mẫu được xác định bằng phương pháp FSH ELISA và hiệu suất của mỗi mẫu sau xử lý được tính và được thể hiện trên bảng 3.

Như thấy được trên bảng 3, 96%, 106%, 106% và 98% rFSH trong các dung dịch xử lý UF2-AD được thu hồi sau khi kết tủa lần lượt với 10 mM CA, 10 mM CA+30% etanol, 20 mM CA và 20 mM CA+ 30% etanol. Điều này chỉ ra rằng rFSH không kết tủa và luôn hòa tan trong dung dịch.

Loại bỏ các tạp chất

Mức hấp thụ ở 280 nm trong UF2-AD không được xử lý và trong mỗi dịch nổi trong số các dịch nổi của các UF2-AD được xử lý được đo và mức loại bỏ tạp chất được tính, và được thể hiện trên bảng 3. 33,9%, 64,9%, 65,9% và 68,8% của tổng mức tạp chất A_{280} trong UF2-AD lần lượt được loại bỏ sau khi kết tủa bằng 10 mM CA, 10 mM CA + 30% etanol, 20mM CA và 20 mM CA + 30% etanol.

UF2-AD không được xử lý và các dịch nổi của các UF2-AD được xử lý theo cách khác nhau được chạy trên PAGE giảm 12% (PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis: phương pháp điện di gel polyacrylamit) để đánh giá định tính sự loại bỏ các tạp chất. Bản mẫu gel được thể hiện trên Fig.2. Dịch nổi thu được sau khi kết tủa bằng 10 mM CA + 30% etanol (vạch 5) và 20 mM CA + 30% etanol độ pH bằng 5,5 (vạch 10) là tinh khiết hơn đáng kể so với dịch nổi thu được sau khi kết tủa lần lượt bằng 10 mM CA độ pH bằng 5,5 (vạch 4) và 20 mM CA (vạch 9). Điều này thể hiện tác dụng hiệp đồng của việc bổ sung etanol vào axit caprylic trong bước kết tủa.

Kết luận thử nghiệm:

1. Sự kết tủa của UF2-AD bằng etanol và axit caprylic dẫn đến sản phẩm tinh khiết hơn so với sản phẩm thu được bằng cách chỉ sử dụng axit caprylic.
2. Kết hợp của etanol và axit caprylic không làm kết tủa rFSH mà nó vẫn hòa tan trong dung dịch, điều này có nghĩa là đây là bước tinh chế và vô hoạt virus hiệu suất cao.

Bảng 3. Kết quả thu được từ các điều kiện kết tủa khác nhau đối với việc loại bỏ tạp chất trong dung dịch rFSH trung gian

Dịch nổi của	Mức hấp thụ ở 280 nm	rFSH (bằng ELISA)
--------------	----------------------	-------------------

	A ₂₈₀	A ₂₈₀ tổng cộng	Mức loại bỏ (%)	µg/ml	µg tổng cộng	Hiệu suất thu hồi (%)
1. UF2-AD	3,265	32,650	-----	677	6.770	-----
2. UF2-AD + 10 mM CA, pH bằng 5,5	2,066	21,571	33,9	207,1	6.487	96
3. UF2-AD + 10 mM CA, 30% etanol, pH bằng 5,5	0,760	11,457	64,9	158,6	7.173	106
4. UF2-AD + 20 mM CA, pH bằng 5,5	1,060	11,122	65,9	227,80	7.170	106
5. UF2-AD + 20 mM CA, 30% etanol pH bằng 5,5	0,678	10,197	68,8	146,5	6.610	98

Ví dụ 4: Đánh giá các điều kiện kết tủa đối với việc loại bỏ tạp chất trong sản phẩm thu hoạch chứa hCG

Mô tả thử nghiệm:

Sản phẩm thu hoạch chứa hCG được cô khoảng 40 lần và được thẩm tách bằng 100 mM glyxin, 50 mM NaCl độ pH bằng 9,0, 6 mS/cm dung dịch đệm bằng hệ siêu lọc (UF) 10kDa. Khi kết thúc quá trình siêu lọc, dung dịch protein được thu hồi, vật liệu sản phẩm thu hoạch-AD (thu hoạch sau thẩm tách), được phân chia thành các phân ước và mỗi phân ước được điều chỉnh điều kiện kết tủa khác nhau để loại bỏ tạp chất (trong khi hCG vẫn hòa tan trong dung dịch). Các điều kiện kết tủa được thử nghiệm là như sau (bảng 4):

1. Sản phẩm thu hoạch-AD không có xử lý làm đối chứng;
2. Sản phẩm thu hoạch-AD + 15mM CA, pH bằng 5,0
3. Sản phẩm thu hoạch-AD + 20mM CA, pH bằng 5,0
4. Sản phẩm thu hoạch-AD + 20mM CA+ 10% etanol, pH bằng 5,0.

Tất cả các mẫu được xử lý được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng cùng với việc khuấy. Các chất kết tủa được tạo ra được loại bỏ bằng cách ly tâm trong khi dịch nổi được thu gom.

Các thông số đặc trưng của quy trình kết tủa:

Thu hồi hCG

Nồng độ hCG trong sản phẩm thu hoạch không xử lý và trong mỗi dịch nổi của sản phẩm thu hoạch AD đã được xử lý được xác định và mức thu hồi được tính như được nêu chi tiết trong bảng 4.

Loại bỏ các tạp chất

Mức hấp thụ ở 280 nm (A_{280}) trong sản phẩm thu hoạch không xử lý và trong mỗi dịch nổi của sản phẩm thu hoạch AD đã được xử lý được xác định và mức loại bỏ tạp chất được tính như được nêu chi tiết trong bảng 4.

Sản phẩm thu hoạch không được xử lý và các dịch nổi của các Sản phẩm thu hoạch AD được xử lý theo cách khác nhau được chạy trên PAGE giảm 12% (điện di gel polyacrylamit) để đánh giá định tính sự loại bỏ các tạp chất. Bản mẫu gel được thể hiện trên Fig.3.

Bàn luận:

1. Mức thu hồi hCG - 91%, 86% và 83% hCG trong sản phẩm thu hoạch-AD được thu hồi sau khi lần lượt kết tủa với 15mM CA, 20mM CA và 20mM CA+10% etanol.
2. Mức loại bỏ tạp chất theo A_{280} – 56,6%, 55,8% và 63,0% trên tổng mức A_{280} trong sản phẩm thu hoạch-AD được loại bỏ sau khi kết tủa lần lượt với 15mM CA, 20mM CA và 20mM CA+10% etanol.
3. Sự loại bỏ tạp chất bằng gel – dịch nổi thu được sau khi kết tủa bằng 20mM CA + 10% etanol, độ pH bằng 5,0 (vạch 5) là tinh khiết hơn đáng kể so với dịch nổi thu được sau khi kết tủa bằng 15mM CA, độ pH bằng 5,0 (vạch 4).

Kết luận:

1. Sự kết tủa của sản phẩm thu hoạch chứa hCG được bổ sung etanol và axit caprylic dẫn đến thu được sản phẩm tinh khiết hơn so với sản phẩm thu được mà chỉ sử dụng axit caprylic.

Bảng 4. Kết quả thu được từ các điều kiện kết tủa khác nhau đối với việc loại bỏ tạp chất trong sản phẩm thu hoạch chứa hCG

Dịch nổi của	Mức hấp thụ ở 280 nm			rFSH (bằng ELISA)		
	A ₂₈₀	A ₂₈₀ tổng cộng	Mức loại bỏ (%)	µg/ml	µg tổng cộng	Hiệu suất thu hồi (%)
1. Sản phẩm thu hoạch AD	4,295	107,375	-----	757,14	18.929	-----
2. Sản phẩm thu hoạch AD + 15 mM CA, pH bằng 5,0	1,738	46,578	56,6 %	639,72	17.144	91%
3. Sản phẩm thu hoạch AD + 20 mM CA, pH bằng 5,0	1,792	47,488	55,8 %	612,24	16.224	86%
4. Sản phẩm thu hoạch AD + 20 mM CA, 10% etanol, pH bằng 5,0	1,369	39,701	63,0 %	543,8	15.770	83%

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tinh chế glycoprotein, phương pháp này bao gồm bước xử lý glycoprotein với kết hợp của axit caprylic và etanol.
2. Phương pháp vô hoạt virus đối với glycoprotein, phương pháp này bao gồm bước xử lý glycoprotein với kết hợp của axit caprylic và etanol.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, bao gồm bước xử lý dung dịch chứa glycoprotein (ví dụ, trong dung dịch đậm) với kết hợp của axit caprylic và etanol.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó glycoprotein là FSH, hCG hoặc LH.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó glycoprotein là glycoprotein tái tổ hợp.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó glycoprotein là glycoprotein tái tổ hợp được sản xuất trong tế bào bằng phương pháp bao gồm nuôi cấy tế bào trong môi trường thích hợp và thu hoạch glycoprotein tái tổ hợp từ tế bào này và/hoặc môi trường này.
7. Phương pháp theo điểm 7, trong đó tế bào là tế bào động vật có vú.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó bước xử lý glycoprotein với kết hợp của axit caprylic và etanol diễn ra ở độ pH bằng từ 2 đến 6,5, ví dụ ở độ pH bằng từ 3 đến 6,5, ví dụ ở độ pH bằng từ 4 đến 6, ví dụ ở độ pH bằng từ 4,5 đến 5,5.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó nồng độ axit caprylic là từ 10 mM đến 30 mM và/hoặc nồng độ etanol là từ 20% đến 50%.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) xử lý glycoprotein với etanol và axit caprylic trong thời gian ủ từ 1 phút đến 6 giờ ở nhiệt độ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ đồng thời khuấy trộn;

(b) xử lý glycoprotein với etanol và axit caprylic ở nhiệt độ từ 4°C đến 8°C trong thời gian ủ từ 1 phút đến 32 giờ, không khuấy trộn;

(c) xử lý glycoprotein với etanol và axit caprylic trong thời gian ủ từ 0,5 giờ đến 1 giờ ở nhiệt độ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ đồng thời khuấy trộn, sau đó giảm xuống nhiệt độ từ 4°C đến 8°C và ủ trong thời gian từ 14 giờ đến 18 giờ, không khuấy trộn; hoặc

(d) xử lý glycoprotein với etanol và axit caprylic trong thời gian 1 giờ $\pm$ 10 phút ở độ pH bằng $5,5\pm 0,1$ và nhiệt độ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước lọc glycoprotein sau khi xử lý bằng axit caprylic và etanol.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó glycoprotein được lọc bằng cách sử dụng máy lọc sợi thủy tinh.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cô glycoprotein đến nồng độ mong muốn và/hoặc bao gồm các bước phối chế tiếp.

Fig.1

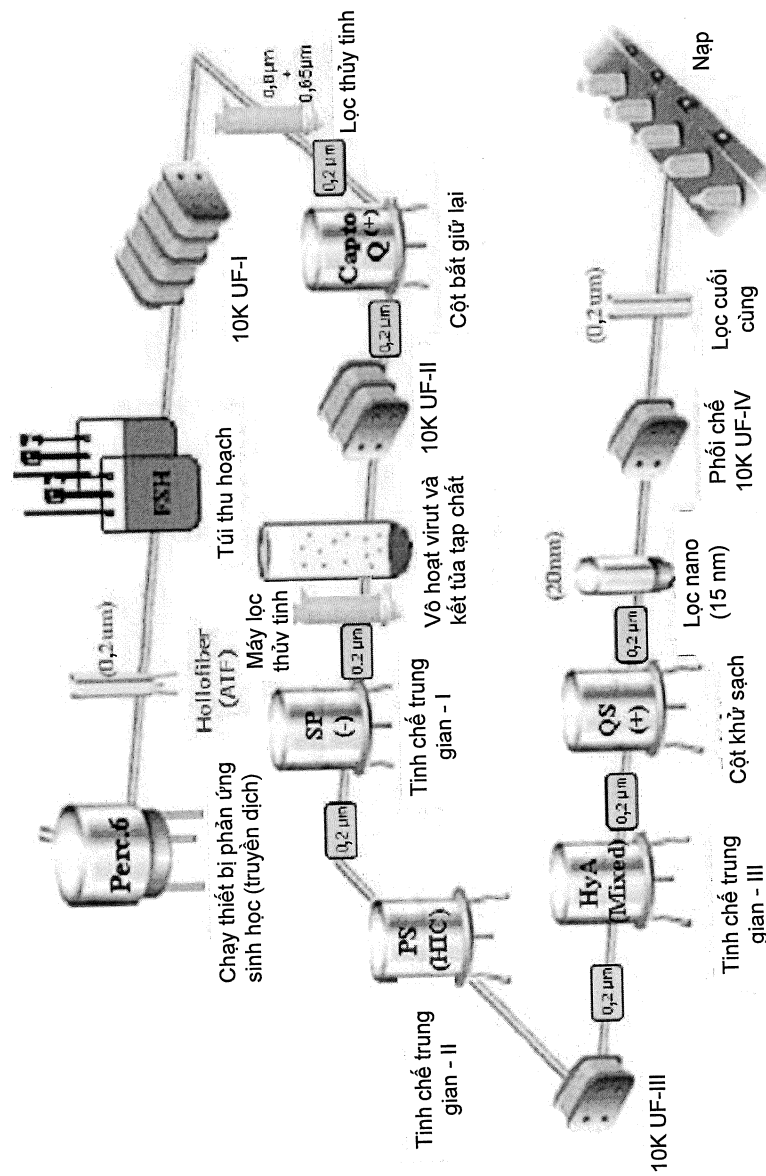


Fig.2

Tên mẫu
1. Khối lượng phân tử ở khoảng thấp
2. Dung dịch đệm mẫu
3. UF2-AD
4. UF2-AD + 10 mM CA, pH bằng 5,5
5. UF2-AD + 10 mM CA, 30% etanol, pH bằng 5,5
6. Dung dịch đệm mẫu
7. Khối lượng phân tử ở khoảng thấp
8. UF2-AD
9. UF2-AD + 20 mM CA, pH bằng 5,5
10. UF2-AD + 20 mM CA , 30% etanol, pH bằng 5,5

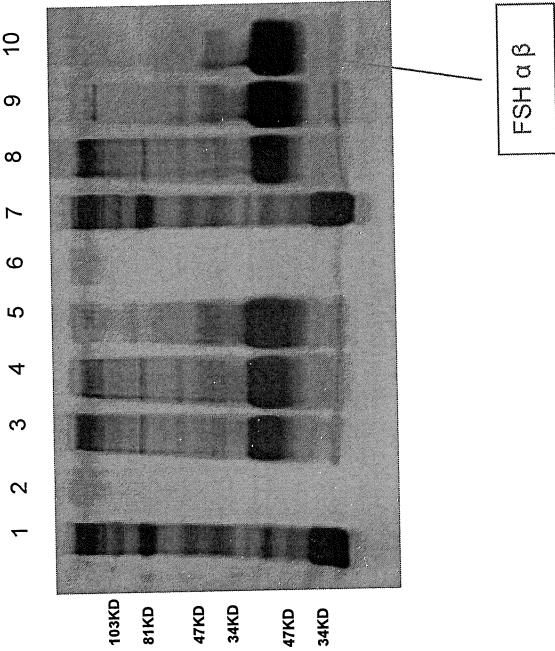
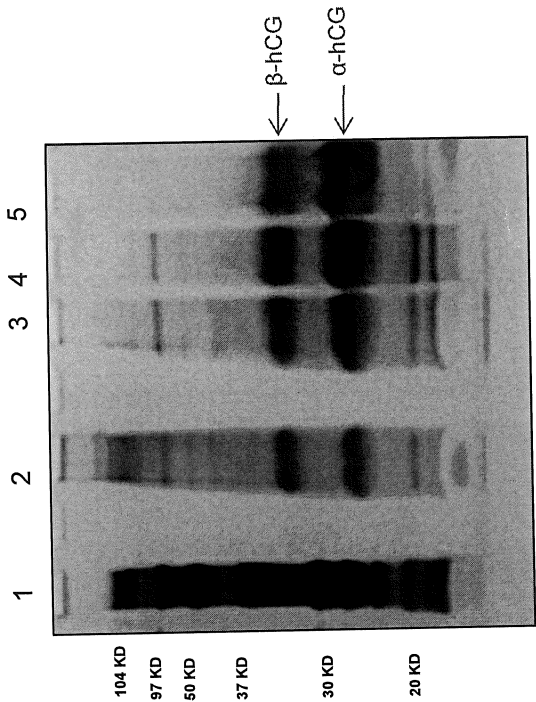


Fig.3



Tên mẫu
1. Chất đánh dấu khối lượng phân tử thấp
2. Sản phẩm thu hoạch-AD chứa hCG
3. Không liên quan
4. Sản phẩm thu hoạch-AD + 15mM C.A, độ pH bằng 5,0
5. Sản phẩm thu hoạch-AD + 20mM C.A + 10% etanol, độ pH bằng 5,0