



(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)



1-0032524

(51)⁷ C08B 37/00; A61K 39/095

(13) B

(21) 1-2016-03584

(22) 24/02/2015

(86) PCT/IB2015/051371 24/02/2015

(87) WO 2015/128798 03/09/2015

(30) 527/DEL/2014 25/02/2014 IN

(45) 25/07/2022 412

(43) 26/12/2016 345A

(73) MSD WELLCOME TRUST HILLEMANN LABORATORIES PVT. LTD. (IN)
D-15, Ground Floor, Jangpura Extension, New Delhi 110014, India

(72) GILL, Davinder (US); CHHIKARA, Manoj Kumar (IN); SHARMA, Sandeep (IN);
HANIF, Sarmad (IN); JOSHI, Neeraj (IN).

(74) Công ty TNHH dịch vụ sở hữu trí tuệ DREWMARKS (DREWMARKS CO., LTD.)

(54) QUY TRÌNH TÍNH CHẾ POLYSACARIT MEN C

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tính chế polysacarit vi khuẩn. Quy trình này rất hiệu quả và có thể mở rộng quy mô để loại bỏ các tạp chất ra khỏi polysacarit của *Neisseria meningitidis* nhóm huyết thanh C (Men-C) mà có thể được sử dụng nguyên trạng hoặc ở dạng được tạo dẫn xuất hoặc liên kết với các phân tử khác, để bào chế vacxin, cụ thể hơn là vacxin liên hợp chống nhiễm *N. meningitidis*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình tinh chế nhanh polysacarit của *Neisseria meningitidis*. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến quy trình điều chế polysacarit của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh týp C (MenC) có thể được sử dụng nguyên trạng, hoặc được tạo dẫn xuất hoặc kết hợp với các nhóm huyết thanh khác để tạo ra vaccin chống lại *N. meningitidis*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Polysacarit, đặc biệt là polysacarit kháng nguyên, đã được sử dụng trong bào chế vaccin. Vaccin đơn giá, hai giá và đa giá chứa một, hai hoặc nhiều polysacarit và các thể liên hợp của chúng bán trên thị trường dùng để ngăn ngừa một số bệnh hoặc tình trạng nhiễm khuẩn nhất định do các vi sinh vật khác nhau gây ra như *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* và *N. meningitidis* và chúng được chứng minh là có tác dụng ngăn ngừa các bệnh tương ứng ở mức đáng kể. Số liệu khảo sát thu thập được trong nhiều năm sau khi giới thiệu vaccin Prevenar đã cho thấy rõ ràng rằng bệnh phế cầu xâm lấn ở trẻ vị thành niên ở Mỹ đã giảm xuống mức mong đợi. Mặc dù cũng có một vài nghiên cứu khác nhau được tiến hành đối với các polysacarit này và thể liên hợp của chúng nhưng vẫn luôn cần tăng hiệu suất cũng như chất lượng (độ tinh khiết) của polysacarit trong công nghiệp như đã được chứng minh bằng nghiên cứu đang thực hiện.

Bệnh viêm màng não được xem là mối đe dọa toàn cầu và gánh nặng từ căn bệnh này vẫn luôn là mối ưu tiên đối với vấn đề sức khỏe cộng đồng. Định nghĩa lâm sàng về bệnh viêm màng não là chứng viêm màng não (màng của não). Nếu không được điều trị, bệnh có thể gây ra hậu quả nghiêm trọng. Tổng cộng mười ba nhóm huyết thanh của *N. meningitidis* đã được nhận biết, và trong số mười ba nhóm này, có sáu nhóm huyết thanh (A, B, C, W135, X và Y) là nguyên nhân chính gây nhiễm khuẩn trên toàn cầu. *N. meningitidis* có một loạt các biểu hiện lâm sàng, bắt đầu từ cổ họng đau nhẹ thoáng qua đến viêm màng não gây tử vong hoặc nhiễm trùng máu do viêm màng não cầu khuẩn. Viêm màng não và nhiễm trùng máu là các biểu hiện phổ biến nhất của bệnh.

Bằng chứng thu được thông qua nhiều kết quả nghiên cứu đã xác định khía cạnh tạo miễn dịch của vaccin liên hợp polysacarit. Ngoài ra, có các bài báo nghiên cứu cũng như các sáng chế mô tả việc sản xuất và tinh chế polysacarit nang của Men C nhưng không tài liệu nào trong số đó xác định được quy trình tinh chế có điểm thời gian giảm cực mạnh mà lại thiết thực, có thể mở rộng quy mô, và lặp lại được.

Việc sản xuất ra Men C đã tinh chế là yêu cầu trước tiên để liên hợp hiệu quả với protein mang và phát triển nó làm vaccin liên hợp. Chi phí nuôi cấy và tinh chế Men C thường là cao và mất nhiều thời gian thực hiện do quy trình này gồm một loạt các bước sản xuất và tinh chế. Việc cải tiến một hoặc nhiều bước sản xuất polysacarit sẽ mang lại sự thay đổi đáng kể trong toàn bộ quy trình sản xuất vaccin liên hợp và theo đó giúp quy trình này sinh lợi ở mức vừa phải.

Tuy nhiên, mặc dù một vài nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện đối với các polysacarit này, nhưng vẫn luôn cần phải cải thiện hiệu suất cũng như chất lượng/độ tinh khiết của polysacarit để tạo ra vaccin có chất lượng cao.

Có một số sáng chế mô tả quy trình tinh chế Men-C polysacarit. Tình trạng kỹ thuật hiện có được mô tả trong Patent Mỹ số 7491517B2 về quy trình kết tủa polysacarit Men-C với CTAB được phát hiện ra là gồm cả công đoạn ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngoài ra thì công đoạn loại bỏ chất gây ô nhiễm cũng cần sử dụng enzym Proteinaza K đắt tiền. Ngoài những vấn đề này, quy trình này cũng cần đến công đoạn lọc gel để tinh chế polysacarit Men-C. Toàn bộ quy trình này tốn rất nhiều thời gian để tinh chế và chi phí cho quy trình này cũng lớn do sử dụng các enzym.

Ngoài ra, đơn số WO 2011/148382 A1 cũng mô tả phương pháp điều chế polysacarit nang tinh khiết bằng cách sử dụng nhôm phosphat với rượu để tinh chế polysacarit nang *Haemophilus influenzae* b, *N. meningitidis* như các nhóm huyết thanh A, C, Y, W- 135 và polysacarit nang tương tự khác được sản xuất từ cả vi sinh vật gram dương và gram âm. Tình trạng kỹ thuật được công bố này bộc lộ khoảng thời gian để tinh chế polysacarit là từ 16 đến 20 giờ.

Một Patent khác số EP 0658118B1 mô tả phương pháp khử axetyl hóa O của polysacarit viêm màng não cầu khuẩn nhóm C (GCMP) với thời gian trung bình khoảng 16 giờ. Quy trình này cũng cần rất nhiều thời gian để tinh chế.

Hiện nay, các phương pháp khác nhau dùng để sản xuất và tinh chế polysacarit MenC mất tương đối nhiều thời gian cho việc nuôi cấy và tinh chế và cũng cần phải sử dụng các enzym đắt tiền. Mặc dù các loại quy trình này tạo ra polysacarit tinh khiết nhưng chúng cũng đồng thời làm tăng chi phí sản xuất khi mở rộng quy mô.

Hơn nữa, các tình trạng kỹ thuật được bộc lộ ở trên đưa ra các phương pháp có hiệu quả hơn ở nhiệt độ thấp nên cần kiểm soát môi trường vì thế làm tăng thêm chi phí nghiên cứu và sản xuất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó mục đích chính của sáng chế là đề xuất quy trình tinh chế polysacarit Men C.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất quy trình tinh chế polysacarit Men C nhanh trong khi loại bỏ các tạp chất trong thời gian rất ngắn bằng một phương pháp có thể mở rộng quy mô thương mại, đơn giản, hiệu quả và cải tiến.

Một mục tiêu khác nữa của sáng chế là tạo ra polysacarit chất lượng cao phù hợp với các thông số kỹ thuật có liên quan của WHO.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến quy trình tinh chế polysacarit Men C. Quy trình này mô tả phương pháp mới, nhanh, sinh lợi, và có thể mở rộng quy mô, trong đó polysacarit Men C được tinh chế với thời gian giảm đáng kể.

Quy trình theo sáng chế bao gồm bước lựa chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính miễn dịch, chuẩn bị môi trường nhân giống chủng có hoạt tính miễn dịch này và cấy chủng vi khuẩn được chọn trong môi trường nuôi cấy gốc glyxerol và ủ nó ở nhiệt độ định trước trong khoảng thời gian tối ưu với số vòng quay mỗi phút (vòng/phút) định trước. Chủng vi khuẩn đã chọn được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tối ưu hóa trong thiết bị lên men và quy trình này tiếp diễn bằng cách ly tâm sản phẩm thu hoạch đã lên men để lọc dịch lên men (FB) chứa mảnh vụn tế bào sau đó cô đặc FB bằng công đoạn siêu lọc bằng cách sử dụng màng lọc dòng ngang theo phân tử lượng.

Sau đó phần dịch nổi trên bề mặt đã cô đặc và siêu lọc hoặc FB đã xử lý được khử axetyl hóa với sự có mặt của dung dịch kiềm ở nồng độ cao ở nhiệt độ cao. Polysacarit

thô được khử axetyl hóa được cho qua phản ứng trao đổi dung dịch đệm thông qua phương pháp lọc dòng tiếp tuyến (Tangential Flow Filtration - TFF). Polysacarit thô đã khử axetyl hóa và thẩm lọc được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) sau đó thẩm lọc và cô đặc để thu được polysacarit được tinh chế cuối cùng. Đặc biệt là phương pháp theo sáng chế bao gồm bước xử lý dịch chiết đã cô đặc và/hoặc các tế bào vi khuẩn đã được phân lập bằng dung dịch bazơ. Ngoài công đoạn chiết CPS thì công đoạn chiết bazơ cũng gây ra phản ứng khử axetyl hóa của các nhóm N-axetyl. Mức độ khử axetyl hóa có thể được thay đổi bằng cách điều chỉnh các điều kiện phản ứng. CPS đã chiết sau đó được tách khỏi các thành phần tế bào để thu được CPS, tốt hơn là bằng phương pháp tách sắc ký.

Quy trình này có nhiều ưu điểm so với tình trạng kỹ thuật, như cung cấp một phương pháp điều chế polysacarit Men C nhanh và mới. Quy trình này sinh lợi do nó làm giảm tổng số các bước và chỉ cần một bước sàng lọc sắc ký duy nhất. Một ưu điểm nữa là quy trình này có khả năng mở rộng toàn bộ quy mô.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả lưu đồ để tinh chế và thu hồi MenC-PS.

Fig.2 mô tả sắc ký đồ HPLC của MenC-PS

Fig.3 mô tả phổ NMR của MenC-PS.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế bộc lộ hai bước đã được tối ưu hóa để có thể tinh chế polysacarit MenC (MenC-PS) trong thời gian ngắn hơn như được thể hiện trên Fig.1.

Chủng polysacarit vi khuẩn được cấy trong thiết bị lên men chứa các thành phần môi trường thích hợp cần cho sự phát triển của vi khuẩn. Sau khi đạt được mật độ quang tối đa, khoảng từ 8 đến 10 thể hiện sự phát triển đáng kể của vi khuẩn, quá trình này được cho kết thúc bằng cách bổ sung formaldehyt với nồng độ tiên quyết và thu được FB tạo thành. Sau đó FB này được ly tâm ở tốc độ cao để lọc FB chứa mảnh vụn tế bào sau đó thẩm lọc và cô đặc bằng cách sử dụng màng lọc dòng ngang theo phân tử lượng.

FB đã được thẩm lọc và cô đặc có polysacarit thô được xử lý bằng NaOH ở nhiệt độ cao lên đến 80°C chẳng hạn để khử axetyl hóa. Công đoạn thẩm lọc và cô đặc

polysacarit thô được thực hiện bằng màng polyete sulfon (PES), với nước milliQ (MQW), sau đó bằng dung dịch đệm Tris HCl có độ pH=7,4 $\pm$ 0,1. Sau khi thẩm lọc, polysacarit thô này được cô đặc và lọc bằng bộ lọc 0,22 μ m.

Polysacarit thô đã khử axetyl hóa được tinh chế thêm bằng kỹ thuật sắc ký tương tác kỵ nước (HIC).

Phương pháp tách hai hoặc nhiều thành phần của hỗn hợp dựa trên các chênh lệch về độ phân cực là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, khi sử dụng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, các hợp chất có tính kỵ nước tương đối lớn hơn được giữ lại lâu hơn trên cột so với các hợp chất ưa nước hơn. Ngược lại, khi sử dụng phương pháp sắc ký tương tác ưa nước thì các hợp chất ưa nước sẽ được giữ lại lâu hơn trên cột so với các hợp chất ưa nước hơn. Sử dụng cả hai phương pháp này cho phép loại bỏ các tạp chất mà vừa phân cực ít hơn vừa phân cực nhiều hơn so với hợp chất đang nói đến.

CPS đã chiết có trong chất phản ứng chiết bazơ có thể được tách khỏi các tạp chất tạo thành từ các thành phần trong tế bào bằng phương pháp sắc ký. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các phương pháp tách sắc ký là sắc ký trao đổi ion (cation hoặc anion), sắc ký tương tác ưa nước, sắc ký tương tác kỵ nước hoặc sắc ký thẩm thấu gel. Phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) trên phenyl sepharosa được ưu tiên hơn vì sẽ loại bỏ hầu hết chất gây ô nhiễm hoạt hóa uv và có phân tử lượng cao khỏi chất chiết bazơ. Polysacarit nang sẽ được rửa giải ngay từ đầu, trong khi protein và axit nucleic kỵ nước hơn sẽ được giữ lại. Phương pháp được ưu tiên theo sáng chế là phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước.

Ngoài ra, bước cô đặc và thẩm lọc polysacarit được thực hiện để tạo thuận lợi cho việc loại bỏ protein và các tạp chất khác, và sau đó mẫu polysacarit được rửa bằng MQW.

Do đó, công đoạn lọc vô trùng được thực hiện để thu được polysacarit Men C tinh chế được thể hiện trên Fig.2 và Fig.3.

Việc chứng minh các quy trình được sử dụng ở trên có thể được hiểu rõ hơn trong Bảng 1, bảng này thể hiện rõ rằng các thông số kỹ thuật của polysacarit đã tinh chế phù hợp với tiêu chuẩn của WHO.

Bảng 1: Thông số kỹ thuật của polysacarit Men-C đã tinh chế theo thông số kỹ thuật của WHO được thể hiện dưới đây

Thử nghiệm	MenC-PS	Thông số kỹ thuật của WHO
Hàm lượng polysacarit	4mg/ml	Giá trị thực tế
Hàm lượng axit sialic	100%	Axit sialic đối với hàm lượng MenC không nhỏ hơn 80% trọng lượng khô
Nội độc tố	<0,06 EU/ μ g	Nhỏ hơn 100EU/ μ g
% Protein	0,14 %	Không nhiều hơn 1%
% Axit nucleic	0,42 %	Không nhiều hơn 1%
Phân tử lượng trung bình tương đối	351kd	Giá trị thực tế từ HPLC
Đặc trưng	Dương tính	Phản ứng ngưng kết dương tính với huyết thanh đặc hiệu; Phổ $^1\text{H-NMR}$ được xác định

Có thể nhận thấy rằng thời gian cần để tinh chế Polysacarit Men C ngắn hơn đáng kể so với thời gian được bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật trong khi đó dấu hiệu của sàng chế là phương pháp chuẩn của quy trình tinh chế mới, nhanh và có thể mở rộng quy mô mà có thể được hoàn thành trong thời gian 6 ± 1 giờ và PS được sản xuất theo cách này phù hợp với tiêu chuẩn đã định của WHO.

Quy trình phân tích:

Polysacarit thu được từ các bước khác nhau được theo dõi và phân tích liên tục về độ tinh khiết và hiệu suất của chúng. Có nhiều quy trình phân tích khác nhau được báo cáo nhưng các quy trình ưu tiên là như được tổng hợp dưới đây:

Axit sialic tổng số của MenC-PS được xác định bằng phương pháp so màu. Thử nghiệm này dựa trên phản ứng giữa axit sialic và resorxinol ở nhiệt độ 100°C với sự có mặt của axit clohydric và ion đồng (II) trong thời gian 30 phút; phản ứng này dẫn đến sự tạo thành phức hợp xanh tím có độ hấp thụ mạnh ở bước sóng 564nm. Nồng độ axit sialic tổng được xác định từ đường cong hiệu chỉnh thu được bằng cách sử dụng một

loạt các tiêu chuẩn của axit sialic [(Svennerholm, 1957)]. Lipopolysaccharit (LPS) được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Endosafe®-PTS™ đơn giản và gọn nhẹ. Tạp chất protein được xác định bằng phương pháp của Lowry [(Lowry *et al.*, 1951)] bằng cách sử dụng albumin huyết thanh bò làm tiêu chuẩn và độ hấp thu được lấy ở bước sóng 750nm. Axit nucleic (NA) được đánh giá ở bước sóng 260nm và lượng này được tính khi giả sử độ hấp thu của $1,0A = 50\mu\text{g/mL}$ [(Frasch, 1990)].

Kích thước phân tử trung bình tương đối (Mw) của HibPRP được xác định bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Alliance, Waters). Các cột được sử dụng là PWXL-4000 và PWXL-5000 theo dãy (Tosoh Bioscience). Ngoài ra, pululan với lượng nằm trong khoảng từ 5kD đến 800kD (Shodex) được sử dụng làm tiêu chuẩn cho MenC-PS. Quy trình HPLC được thực hiện bằng cách sử dụng natri nitrat 0,1M với thời gian chạy là 30 phút ở tốc độ dòng chảy bằng 1ml/phút. Đặc trưng của MenC-PS được xác nhận bằng quang phổ $^1\text{H-NMR}$. NMR tạo ra phổ của hạt nhân nhạy từ tính (ví dụ, ^1H).

MenC-PS được nhận biết về mặt huyết thanh bằng cách kết hợp với kháng huyết thanh đối chứng kháng từng polysaccharit. Do các thông số kỹ thuật của WHO [WHO, 2004] để xác định độ tinh khiết và mô tả đặc điểm polysaccharit là dựa trên trọng lượng khô, nên MenC-PS trước hết được làm khô lạnh và sau đó được thử nghiệm. Hàm lượng ẩm do đó được trừ đi để thu được trọng lượng khô chính xác. Hàm lượng ẩm của bánh đã làm khô lạnh được xác định bằng máy phân tích nhiệt trọng (TGA) từ Perkin Elmer. Các kết quả phân tích đối với MenC-PS được nêu trong Bảng 1 và dựa theo và như được định rõ bởi WHO.

Polysaccharit Men C nêu trên có thể được sử dụng để bào chế vaccin liên hợp polysaccharit-protein.

Các khía cạnh khác nhau của sáng chế được mô tả chi tiết ở trên sẽ được minh họa bằng các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sàng chế

Ví dụ 1

Tinh chế polysacarit bằng cách sử dụng chất tẩy anion với dung dịch đệm tris và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC):

FB đã được thẩm lọc và cô đặc có polysacarit thô được xử lý bằng chất tẩy anion, như, natri deoxycholat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,3% đến 0,6% (trọng lượng/thể tích) và được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C trong thời gian 1 giờ. Sau đó nó được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C sau đó thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô bằng màng poly ete sulfon (PES) 0,1m², với nước milliQ (MQW) với lượng từ 6 đến 8 thể tích.

Sau đó tiến hành khử axetyl hóa trên polysacarit thô bằng natri hydroxit (NaOH) 0,5M ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 10 giờ. Sau đó nó được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C sau đó thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô đồng thời với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích và dung dịch đệm Tris HCL 20mM bằng cách sử dụng màng PES 0,1m². Sau đó polysacarit được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), như, dòng nhanh Phenyl sepharosa 6. Cuối cùng, công đoạn thẩm lọc và cô đặc polysacarit đã tinh chế được thực hiện bằng màng PES 0,1m², với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích. Theo đó, công đoạn lọc vô trùng được thực hiện bằng bộ lọc 0,22µm và polysacarit đã tinh chế cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tổng thời gian cần để tinh chế polysacarit gồm cả sắc ký HIC sử dụng quy trình nêu trên là từ 16 đến 18 giờ.

Ví dụ 2:

Tinh chế polysacarit bằng cách sử dụng chất tẩy anion với dung dịch đệm HEPES (axit 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic) và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC):

FB đã được thẩm lọc và cô đặc có polysacarit thô được xử lý bằng chất tẩy anion, ví dụ, natri deoxycholat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,3% đến 0,6% (trọng lượng/thể tích) và được ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 60°C trong thời gian 1 giờ.

Sau đó nó được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C sau đó thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô bằng màng poly ete sulfon (PES) 0,1m², với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích.

Sau đó công đoạn khử axetyl hóa được thực hiện trên polysacarit thô bằng natri hydroxit (NaOH) 0,5M ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 10 giờ. Sau đó nó được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C sau đó thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô đồng thời với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích và HEPES 20mM chứa dung dịch đệm NaCl 3M bằng cách sử dụng màng PES 0,1m². Sau đó polysacarit này được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), như, dòng nhanh phenyl sepharosa 6. Công đoạn thẩm lọc và cô đặc của polysacarit đã tinh chế được thực hiện với màng PES 0,1m², với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích. Do đó, công đoạn lọc vô trùng được thực hiện bằng bộ lọc 0,22µm và polysacarit đã được tinh chế cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tổng thời gian cần để tinh chế polysacarit gồm cả sắc ký HIC sử dụng quy trình trên là từ 16 đến 18 giờ.

Ví dụ 3:

Tinh chế polysacarit bằng cách sử dụng natri hydroxit với dung dịch đệm HEPES (axit (4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonic) và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) :

FB đã được thẩm lọc và cô đặc có polysacarit thô được khử axetyl hóa bằng NaOH 0,8M trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 80°C. Sau đó nó được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C sau đó thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô đồng thời với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích và HEPES 20mM chứa dung dịch đệm NaCl 3M bằng cách sử dụng màng PES 0,1m². Sau đó polysacarit này được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), như, dòng nhanh phenyl sepharosa 6. Công đoạn thẩm lọc và cô đặc polysacarit đã tinh chế được thực hiện với màng PES 0,1m², có MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích. Do đó, công đoạn lọc vô trùng được thực hiện bằng bộ lọc 0,22µm và polysacarit đã tinh chế cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tổng thời gian cần để tinh chế polysacarit gồm cả sắc ký HIC sử dụng quy trình trên là từ 10 đến 12 giờ. Hơn nữa polysacarit này chỉ được tinh chế một phần bằng quy trình được đề cập ở trên. Quy trình này có thể cần nhiều bước hơn một chút để tinh chế hoàn toàn polysacarit và có thể không phải là quy trình có chi phí hiệu quả.

Ví dụ 4:

Tinh chế polysacarit bằng cách sử dụng natri hydroxit với dung dịch đệm Tris và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC):

FB đã được thẩm lọc và cô đặc có polysacarit thô được khử axetyl hóa bằng NaOH 0,8M trong thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 80°C. Sau đó nó được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C sau đó công đoạn thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô được thực hiện đồng thời với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích và dung dịch đệm Tris HCL 20mM bằng cách sử dụng màng PES 0,1m². Sau đó polysacarit này được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), như, dòng nhanh phenyl sepharoza 6. Công đoạn thẩm lọc và cô đặc polysacarit đã tinh chế được thực hiện bằng màng PES 0,1m², với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích. Do đó, công đoạn lọc vô trùng được thực hiện bằng bộ lọc 0,22μm và polysacarit đã tinh chế cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tổng thời gian cần để tinh chế polysacarit gồm cả sắc ký HIC sử dụng quy trình trên là từ 10 đến 12 giờ. Hơn nữa polysacarit này chỉ được tinh chế một phần bằng quy trình được đề cập ở trên. Quy trình này có thể cần nhiều bước hơn một chút để tinh chế hoàn toàn polysacarit và có thể không phải là quy trình có chi phí hiệu quả.

Ví dụ 5:

Tinh chế polysacarit bằng cách sử dụng natri hydroxit với dung dịch đệm Tris và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC):

FB đã được thẩm lọc và cô đặc có polysacarit thô được khử axetyl hóa bằng NaOH 1M trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 75±5°C. Sau đó polysacarit đã được khử axetyl hóa được làm mát đến nhiệt độ dưới 40°C. Sau khi làm mát, công đoạn thẩm lọc và cô đặc polysacarit thô đã được khử axetyl hóa được thực hiện thông qua màng PES 100KDa (0,1m²) với MQW với lượng từ 20 đến 25 thể tích, sau đó với dung dịch đệm Tris HCl 20mM (độ pH=7,4 ± 0,1) với lượng từ 8 đến 10 thể tích. Do đó công đoạn lọc vô trùng được thực hiện bằng màng PES 0,22μm (0,1m²).

Polysacarit đã được khử axetyl hóa và thẩm lọc được tinh chế thêm bằng phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) thông qua cột XK-16 đóng gói bằng dòng nhanh Phenyl sepharoza 6 (FF) bằng cách sử dụng hệ thống sắc ký. Cột này được làm cân bằng

bằng dung dịch đệm Tris HCl 20mM ở độ pH=7,4 $\pm$ 0,1 chứa amoni sulphat 20%. Nguyên liệu này được nạp vào ở tốc độ 60cm/giờ và dòng chảy qua chứa polysacarit đã tinh chế được gom lại. Cuối cùng, cột được tái tạo bằng dung dịch đệm Tris HCl 20mM ở độ pH=7,4 $\pm$ 0 và được bảo quản trong etanol 20% để sử dụng sau đó. Công đoạn thẩm lọc và cô đặc polysacarit đã tinh chế được thực hiện bằng màng PES 100KDa (0,1m²), với MQW với lượng từ 6 đến 8 thể tích và công đoạn lọc vô trùng được thực hiện bằng bộ lọc 0,22 μ m và polysacarit đã tinh chế cuối cùng được bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Tổng thời gian cần để tinh chế polysacarit là 6 $\pm$ 1 giờ và PS đáp ứng các thông số kỹ thuật của WHO.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tinh chế polysacarit Men C, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - (a) ly tâm sản phẩm thu hoạch đã lên men để lọc dịch lên men;
 - (b) cô đặc phần dịch nổi trên bề mặt đã lên men bằng phương pháp siêu lọc;
 - (c) khử axetyl hóa và ủ phần dịch nổi trên bề mặt đã cô đặc nêu trên ở bước (b) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70°C đến 80°C;
 - (d) thu gom phần dịch nổi trên bề mặt ở bước (c) và đưa vào thẩm lọc và cô đặc;
 - (e) tinh chế phần dịch nổi trên bề mặt đã thẩm lọc ở bước (d) bằng phương pháp sắc ký;
 - (f) thẩm lọc và cô đặc để thu được polysacarit đã tinh chế; và
 - (g) lọc vô trùng polysacarit đã tinh chế nêu trên,

trong đó quy trình tinh chế nêu trên được hoàn thành trong thời gian là 6 ± 1 giờ, và trong đó quy trình tinh chế nêu trên được hoàn thành mà không cần sử dụng chất tẩy.
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước ly tâm sản phẩm thu hoạch đã lên men nêu trên được thực hiện ở tốc độ nằm trong khoảng từ 4500 x g đến 5000 x g.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước khử axetyl hóa nêu trên được thực hiện với dung dịch NaOH ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 1,5M.
4. Quy trình theo điểm 1, trong đó công đoạn ủ trong bước khử axetyl hóa được tiến hành với tổng thời gian ủ nằm trong khoảng từ 1 giờ 30 phút đến 2 giờ 30 phút.
5. Quy trình theo điểm 1, trong đó công đoạn thẩm lọc trong bước thu gom sau bước khử axetyl hóa được thực hiện từ 20 đến 25 lần với nước Milli-Q sau đó từ 8 đến 10 lần với dung dịch đệm Tris HCl 25mM.
6. Quy trình theo điểm 1, trong đó phương pháp sắc ký được sử dụng trong bước tinh chế nêu trên là phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) dòng nhanh Phenyl sepharoza 6.

7. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước thẩm lọc và cô đặc để thu được polysacarit đã tinh chế được thực hiện bằng màng PES 100KDa ($0,1\text{m}^2$), với nước Milli-Q với lượng từ 6 đến 8 thể tích.

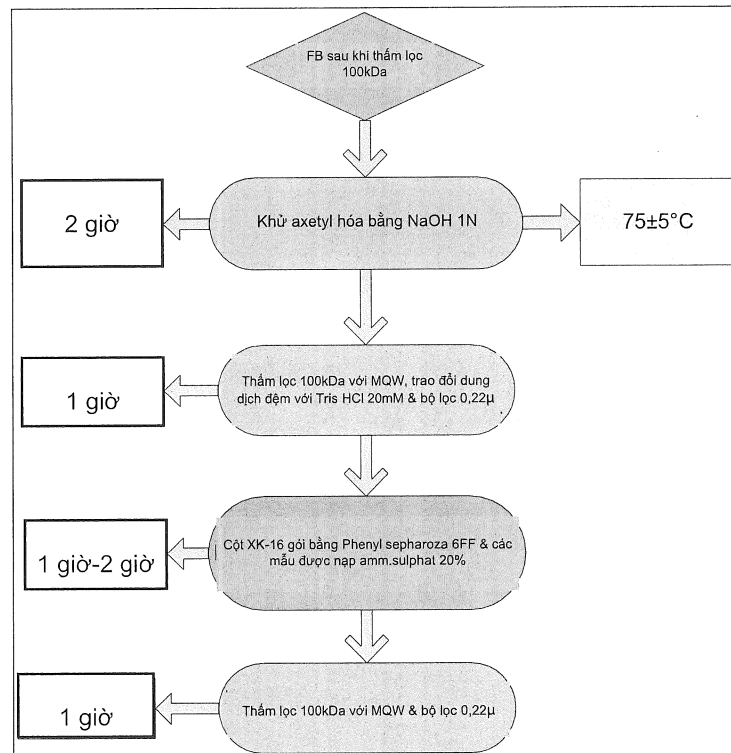
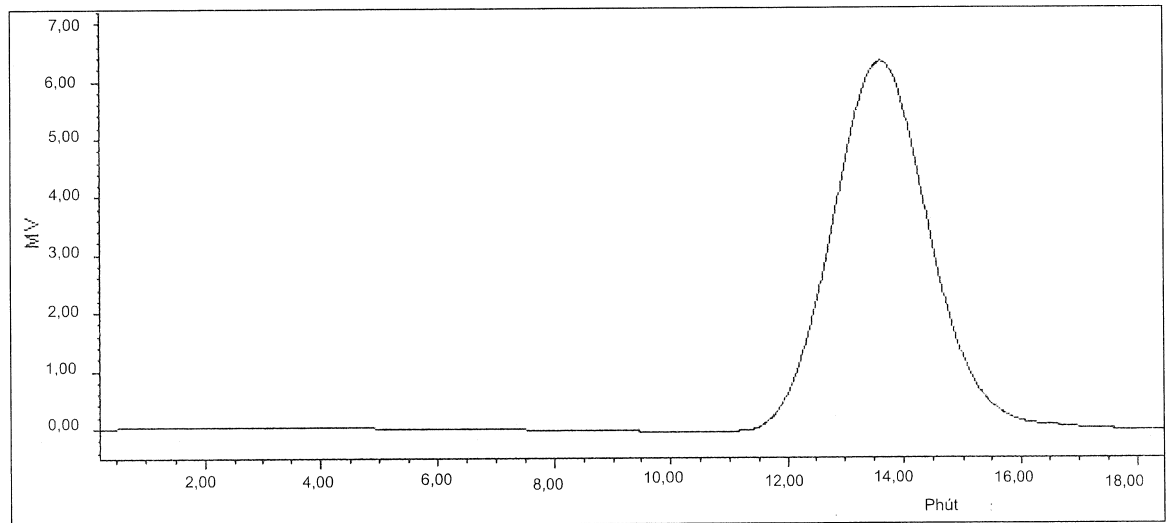


Fig.1

**Fig.2**

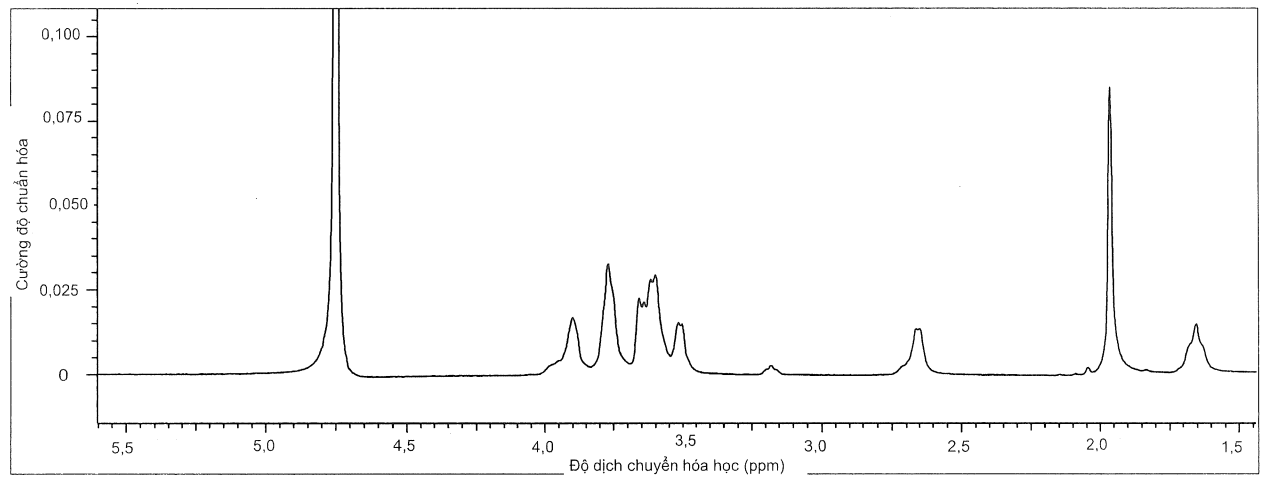


Fig.3