



(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)



1-0035034

(51)⁷ C07K 16/06; C07K 1/30; A61K 35/16; (13) B
A61K 39/395

(21) 1-2014-03136

(22) 25/02/2013

(86) PCT/US2013/027681 25/02/2013

(87) WO/2013/126904 29/08/2013

(30) 61/602,488 23/02/2012 US

(45) 27/03/2023 420

(43) 26/01/2015 322A

(73) Takeda Pharmaceutical Company Limited (JP)

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan

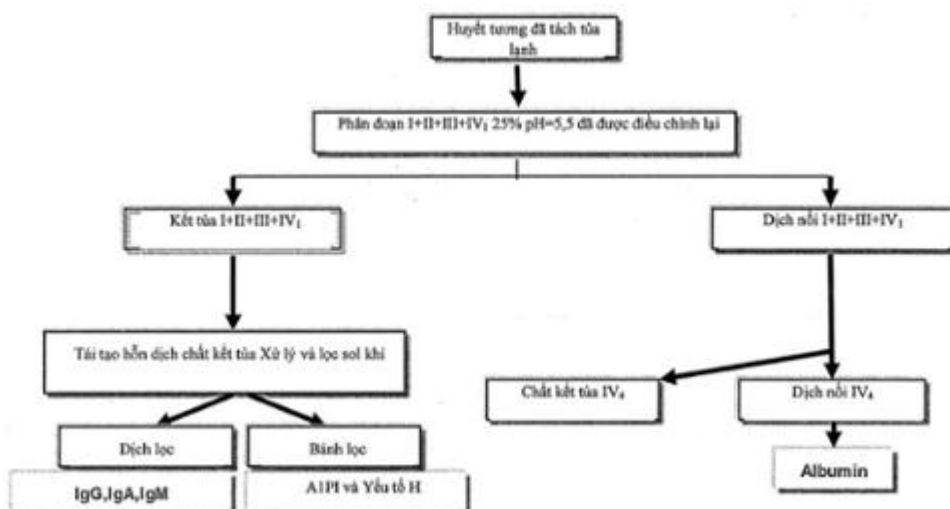
(72) Leopold BRUCKSCHWAIGER (AT); Thomas GUNDINGER (AT); Julia

NUERNBERGER (AT); Wolfgang TESCHNER (DE); Hans-peter SCHWARZ (AT).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM GLOBULIN MIỄN DỊCH ĐƯỢC LÀM GIÀU

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm globulin miễn dịch được làm giàu. Theo một phương án, sáng chế đề xuất quy trình phân đoạn rượu cho phép làm tăng đáng kể hiệu suất protein trong máu tinh chế được từ mẫu huyết tương ban đầu. Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn huyết tương gom được, trong đó phương pháp này bao gồm bước làm kết tủa ban đầu bằng rượu ở nồng độ cao, độ pH thấp. Sáng chế còn đề xuất được phẩm điều trị chứa protein trong máu.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu từ vốn Cohn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các sản phẩm globulin miễn dịch từ huyết tương của người được sử dụng lần đầu tiên vào năm 1952 để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch. Ban đầu, việc dùng globulin miễn dịch isotyp G (IgG) đã được phân lập từ huyết tương theo đường trong cơ hoặc dưới da là các phương pháp được lựa chọn. Tuy nhiên, các phương pháp này không cho phép dùng lượng lớn IgG cần thiết để điều trị hữu hiệu nhiều bệnh khác nhau. Do đó, các sản phẩm IgG có thể được dùng qua đường tĩnh mạch đã được nghiên cứu phát triển. Thông thường, globulin miễn dịch dùng qua đường tĩnh mạch (intravenous immunoglobulin - IVIG) chứa globulin miễn dịch G (IgG) đã gộp lại từ huyết tương của hơn một trăm người cho máu. Các chế phẩm này thường chứa hơn 95% IgG không được cải biến, có chức năng đáp ứng Fc phụ thuộc nguyên vẹn và chỉ chứa lượng rất nhỏ của globulin miễn dịch A (IgA) và globulin miễn dịch M (IgM). Thông thường, các IVIG được lọc vô trùng và quy trình sản xuất bao gồm các bước làm bất hoạt và/hoặc loại bỏ virus. Các sản phẩm IgG đã tinh chế này được sử dụng chủ yếu trong việc điều trị ba loại tình trạng bệnh lý cơ bản: (1) bệnh suy giảm miễn dịch: không có gama globulin máu liên kết nhiễm sắc thể X, giảm gama globulin máu (suy giảm miễn dịch sơ cấp), và tình trạng miễn dịch thỏa hiệp mắc phải (suy giảm miễn dịch thứ cấp), nồng độ kháng thể giảm đặc trưng; (2) các bệnh viêm và tự miễn; và (3) lây nhiễm cấp tính.

Đặc biệt, nhiều người mắc chứng rối loạn thiếu hụt miễn dịch sơ cấp không có kháng thể để kháng lại hiện tượng nhiễm bệnh. Trong các trường hợp nhất định, các thiếu hụt này có thể được bù đắp bằng cách truyền IgG đã được tinh chế, thường là dùng qua đường tĩnh mạch (tức là phương pháp trị liệu IVIG). Một số rối loạn miễn dịch sơ cấp thường được điều trị theo các cách bao gồm bệnh không có gama globulin máu liên kết nhiễm sắc thể X

(XLA), thiếu hụt miễn dịch đa dạng thông thường (CVID), hội chứng Hyper-IgM (HIM), thiếu hụt miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID), và một số thiếu hụt nhóm phụ IgG (Blaese and Winkelstein, *J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases*. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007).

Trong khi phương pháp điều trị bằng IgG có thể kiểm soát rối loạn bệnh lý miễn dịch sơ cấp một cách hiệu quả, thì phương pháp trị liệu này chỉ là phương án thay thế tạm thời cho kháng thể không tạo ra được trong cơ thể, chứ không chữa khỏi bệnh. Theo đó, bệnh nhân phụ thuộc vào liệu trị liệu IgG nhắc lại, thường dùng mỗi tháng một lần trong suốt đời. Phương pháp trị liệu này đòi hỏi nhu cầu lớn trong việc tiếp tục sản xuất các chế phẩm IgG. Tuy nhiên, không giống như các chất sinh học khác đã được tạo ra bằng cách biểu hiện *in vitro* của vật truyền ADN tái tổ hợp, IgG được tạo phân đoạn từ quá trình cho máu và huyết tương của người. Do đó, lượng IgG sẵn có trên thị trường bị hạn chế bởi nguồn cấp máu và huyết tương của người sẵn có.

Một số yếu tố chi phối nhu cầu đối với IgG, bao gồm việc chấp nhận phương pháp điều trị bằng IgG, nhận biết các dấu hiệu bổ sung mà phương pháp trị liệu IgG là hữu hiệu, và gia tăng chẩn đoán và chỉ định dùng IgG cho bệnh nhân. Đáng chú ý là, nhu cầu toàn cầu về IgG là lớn hơn gấp bốn lần trong khoảng thời gian từ năm 1990 đến năm 2009, và vẫn tiếp tục gia tăng hàng năm với tỷ lệ từ 7% đến 10% (Robert P., *Pharmaceutical Policy and Law*, 11 (2009) 359-367). Ví dụ, Cơ quan máu Quốc gia Úc thông báo rằng nhu cầu về IgG ở Úc đã tăng 10,6% trong các năm tài chính 2008-2009 (Báo cáo hàng năm 2008-2009 của Cơ quan máu quốc gia Úc - National Blood Authority Australia Annual Report 2008-2009).

Do nhu cầu toàn cầu ngày càng tăng lên và các thay đổi bất thường trong nguồn cung sản phẩm globulin miễn dịch sẵn có, nên một số quốc gia, bao gồm Úc và Anh, đã áp dụng chương trình quản lý nhu cầu để bảo vệ nguồn cung các sản phẩm này cho các bệnh nhân có nhu cầu cấp thiết nhất trong suốt thời gian bảo quản sản phẩm.

Năm 2007, đã có báo cáo rằng 26,5 triệu lít huyết tương đã được phân đoạn, tạo ra 75,2 tấn IgG, với năng suất tạo ra trung bình là 2,8 gam mỗi lít (Robert P., nêu trên). Báo cáo này cũng đã ước tính được rằng mong muốn năng suất IgG toàn cầu tăng lên khoảng

3,43 gam mỗi lít vào năm 2012. Tuy nhiên, do sự tăng lên liên tục về nhu cầu IgG trên toàn cầu, kế hoạch hàng năm là đạt khoảng từ 7% đến 13% từ nay cho đến năm 2015, nên việc cải thiện tiếp tổng hiệu suất IgG vẫn là cần thiết để đáp ứng nhu cầu toàn cầu.

Nhiều phương pháp điều chế IgG được áp dụng bởi các nhà cung cấp sản phẩm IgG thương mại. Vấn đề chung đối với các phương pháp sản xuất IgG hiện nay là sự hao hụt đáng kể IgG trong quá trình tinh chế, ước tính ít nhất khoảng từ 30% đến 35% tổng hàm lượng IgG của nguyên liệu ban đầu. Một thách thức nữa là cần duy trì chất lượng của quá trình làm bất hoạt virus và loại bỏ tạp chất mà có thể gây phản ứng phụ, đồng thời nâng cao hiệu quả của quy trình để làm tăng sản lượng IgG. Ở mức độ sản xuất IgG hiện nay, có thể sự gia tăng hiệu suất ở mức độ nhỏ trên thực tế có ý nghĩa lớn đáng kể. Ví dụ, đối với sản lượng của năm 2007, mức tăng hiệu lực 2% là thêm 56 miligam trong mỗi lít, sẽ tạo ra thêm 1,5 tấn IgG nữa.

Theo quy trình thứ tư trong các tài liệu hội thảo đã công bố về quy trình điều chế và đặc tính của huyết thanh và protein huyết tương, Cohn và các đồng tác giả (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475) đã lần đầu tiên mô tả phương pháp phân đoạn các protein huyết tương nhờ rượu (phương pháp 6), cho phép phân lập phân đoạn giàu IgG từ huyết tương của người. Một vài năm sau, Oncley và các đồng tác giả (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550) đã mở rộng nghiên cứu trên cơ sở phương pháp Cohn bằng cách công bố phương pháp (phương pháp 9) mà dẫn đến quá trình phân lập chế phẩm IgG tinh khiết hơn.

Mặc dù các phương pháp này là nền tảng của toàn bộ ngành công nghiệp protein máu có nguồn gốc từ huyết tương, các phương pháp này không thể tạo ra các chế phẩm IgG có độ tinh khiết đủ cao để điều trị một số bệnh liên quan tới hệ miễn dịch, bao gồm hội chứng Kawasaki, chứng xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, và chứng suy giảm miễn dịch sơ cấp. Như vậy, các phương pháp khác áp dụng các kỹ thuật khác nhau, như sắc ký trao đổi ion, được phát triển để tạo ra các chế phẩm IgG có độ tinh khiết cao hơn. Hoppe và các đồng tác giả (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34): 1749-1752), Falksveden (patent Thụy Điển số 348942), và Falksveden và Lundblad (*Method of Plasma Protein Fractionation* 1980) là một vài trong số các tác giả đầu tiên áp dụng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion nhằm mục đích này.

Các phương pháp hiện đại khác nhau để tinh chế globulin miễn dịch từ huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa, như làm kết tủa bằng caprylat (Lebing *et al.*, *Vox Sang* 2003 (84):193-201) và làm kết tủa bằng etanol phân đoạn Cohn (I+)II+III (Tanaka *et al.*, *Braz J Med Biol Res* 2000 (33)37-30) được kết hợp với kỹ thuật sắc ký cột. Gần đây nhất, Teschner và các đồng tác giả (*Vox Sang*, 2007 (92):42-55) đã mô tả phương pháp sản xuất sản phẩm IgG 10%, trong đó chất kết tủa lạnh trước tiên được loại ra khỏi huyết tương đã gộp lại và tiếp đó tiến hành phân đoạn nhờ etanol lạnh Cohn-Oncley đã được cải biến, tiếp theo xử lý S/D sản phẩm trung gian, sắc ký trao đổi ion, lọc nano, và tùy ý siêu lọc/lọc thẩm tách.

Mặc dù độ tinh khiết, độ an toàn, và hiệu suất đạt được theo các phương pháp phân lập IgG này, hiệu suất IgG đã thu hồi được từ huyết tương vẫn có thể được cải thiện. Ví dụ, Teschner và các đồng tác giả thông báo rằng phương pháp của họ làm tăng hiệu suất IgG lên 65% (Teschner *et al.*, nêu trên). Như đã được báo cáo trong hội nghị về các sản phẩm huyết tương khác nhau, hiệu suất trung bình để sản xuất IgG ở quy mô lớn, như do Baxter, CSL Behring, Upfront Technology, Cangene, Prometric BioTherapeutics, và Finnish Red Cross cung cấp, nằm trong khoảng từ 61% đến 65% trong vật chứa cuối. Mặc dù tốt hơn các phương pháp đã được áp dụng, nhưng lượng thu hồi IgG này vẫn bị hao hụt ít nhất khoảng một phần ba IgG có mặt trong phân đoạn huyết tương đã gộp lại trong quá trình phân lập.

Do nguồn cung huyết tương sẵn có để sản xuất các sản phẩm có nguồn gốc từ huyết tương bị hạn chế, nên một số protein trong máu có thể được phân lập ra khỏi vốn huyết tương ban đầu thông bằng cách hợp nhất các quá trình phân lập vào một khung. Ví dụ, IgG thường được làm giàu bằng cách tạo ra chất kết tủa phân đoạn Cohn II+III hoặc chất kết tủa Kistler-Nitschmann A, tiếp đó các dịch nổi tương ứng của chúng được sử dụng để sản xuất alpha-1-kháng trypsin (A1PI) và albumin. Tương tự, một số phương pháp sản xuất Yếu tố H từ các sản phẩm phụ tạo ra trong quá trình sản xuất các globulin miễn dịch IgG, bao gồm WO 2008/113589 và WO 2011/011753, đã được bộc lộ.

Như vậy, cần phương pháp cải thiện và hữu hiệu hơn để sản xuất các sản phẩm trị liệu IgG. Hơn nữa, các phương pháp này cần cho phép sản xuất các sản phẩm có nguồn gốc

từ huyết tương khác từ cùng một nguồn huyết tương. Sáng chế đáp ứng được các nhu cầu này và nhu cầu khác bằng cách đề xuất phương pháp phân lập IgG để đạt được hiệu suất cao hơn từ 20% đến 25% so với hiệu suất đạt được hiện nay, cũng như các chế phẩm IgG tạo ra được theo phương pháp này. Theo cách có lợi, các phương pháp theo sáng chế cho phép phân lập đồng thời các protein có nguồn gốc từ huyết tương có tác dụng trị liệu quan trọng khác, bao gồm alpha-1-kháng trypsin (A1PI), yếu tố H, protein ức chế inter-alpha (IaIp), phức hợp Prothrombin, yếu tố VII (FVII), yếu tố VIII (FVIII), kháng thrombin III (ATIII), fibrinogen, butyrylcholinesteraza, và các chất khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, các phương pháp sản xuất IVIG và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) dựa vào nhiều bước làm kết tủa protein để tách riêng globulin miễn dịch IgG và A1PI ra khỏi các thành phần khác tìm thấy được trong huyết tương của người. Ví dụ, nhiều nhà sản xuất áp dụng các dạng biến đổi của phương pháp Cohn-Oncley 6, trong đó bước làm kết tủa bằng rượu ban đầu được áp dụng. Bước làm kết tủa thứ nhất, được gọi là kết tủa phân đoạn I, được thực hiện ở độ pH cao (7,2) và nồng độ ethanol thấp (nằm trong khoảng từ 8% đến 10% thể tích) để làm kết tủa protein như fibrinogen và Yếu tố XIII ra khỏi IgG và A1PI, nằm trong dịch nổi. Tiếp đó, IgG được làm kết tủa ra khỏi dịch nổi phân đoạn I ở phản ứng kết tủa thứ hai, được gọi là chất kết tủa phân đoạn II+III, được thực hiện ở độ pH trung bình (6,8) và nồng độ ethanol cao (nằm trong khoảng từ 20% đến 25%). Khối A1PI nằm trong dịch nổi của phản ứng kết tủa phân đoạn II+III, vì được tách tiếp ra khỏi albumin trong phản ứng kết tủa ban đầu thứ ba, được gọi là quá trình làm kết tủa phân đoạn I-IV-1, được thực hiện ở độ pH thấp (5,2) và nồng độ ethanol vừa phải (18%).

Tuy nhiên, do phương pháp Cohn-Oncley đã nêu trên, cũng như quy trình Kistler-Nitschmann tương đương sử dụng bốn bước làm kết tủa ban đầu để phân đoạn IgG và A1PI, tách riêng từng thành phần riêng rẽ trong chuỗi phản ứng kết tủa phức tạp, nên quá trình phân đoạn này là không hiệu quả. Mức hao hụt đáng kể về hiệu suất IgG và A1PI ở các bước làm kết tủa ban đầu này có thể được xem là có liên quan tới quá trình làm kết tủa một phần ở các phân đoạn không hướng đích cũng như quá trình làm kết tủa không hoàn toàn ở các phân đoạn hướng đích. Ví dụ, các chất đồng kết tủa IgG ở một mức độ nào đó với

fibrinogen và Yếu tố XIII trong chất kết tủa phân đoạn I và một số IgG không kết tủa bằng cách làm kết tủa phân đoạn II+III. Sau khi làm sạch chất kết tủa phân đoạn II+III đã hòa tan, hiệu suất IgG thường nằm trong khoảng từ 75% đến 85% IgG có mặt trong vốn Cohn ban đầu. Do đó, tổng hàm lượng IgG nằm trong khoảng từ 15% đến 25% nguyên liệu ban đầu bị hao hụt sau hai bước phân đoạn này.

Sáng chế cải tiến quy trình thu hồi IgG và A1PI từ huyết tương đã gộp lại bằng cách loại bỏ yêu cầu đối với nhiều bước làm kết tủa ban đầu. Tốt hơn, nếu các phương pháp đã nêu trong bản mô tả dựa vào một bước làm kết tủa ban đầu, bắt giữ toàn bộ các protein thường được làm kết tủa trong các chất kết tủa phân đoạn I, phân đoạn II+III, và phân đoạn IV-1 đã được gom lại. Một bước làm kết tủa này được gọi là “bước làm kết tủa Phân đoạn I+II+III+IV-1”, “quá trình làm kết tủa phân đoạn I-IV-1”, hoặc “bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao”. Theo cách có lợi, thấy rằng IgG và A1PI có thể được chiết một cách hữu hiệu ra khỏi chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 mà không cần áp dụng các bước làm kết tủa protein tiếp theo. Hơn nữa, nhận thấy rằng chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 hầu như chứa toàn bộ IgG và A1PI của huyết tương nguồn, trong khi đó albumin vẫn ở trong dịch nổi. Đồng thời, các ưu điểm này làm tăng đáng kể mức thu hồi toàn phần của các sản phẩm thương mại quan trọng này.

Như được thể hiện trong các ví dụ, việc áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao (kết tủa phân đoạn I-IV-1) làm bước ban đầu trong quá trình tinh chế IgG ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh, cho phép sản xuất chế phẩm IgG loại dùng được trong dược phẩm với hiệu suất đáng ngạc nhiên nằm trong khoảng từ 4,3g đến 4,7g IgG/l huyết tương nguồn. Hiệu suất này tăng lên khoảng từ 20% đến 25% so với quy trình sản xuất đã biết trong tình trạng kỹ thuật, như các chế phẩm này được sử dụng để sản xuất GAMMAGARD LIQUID® (Baxter International; Deerfield, IL) từ cùng một loại huyết tương.

Do đó, trong số các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình phân đoạn huyết tương mới để tách huyết tương hoặc huyết tương đã tách tủa lạnh trong bước ban đầu thành chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 và dịch nổi phân đoạn I-IV-1. Chất kết tủa phân đoạn I-IV-1

hầu như chứa toàn bộ các globulin miễn dịch (ví dụ, IgG, IgA, và IgM) và chất ức chế alpha 1 elastaza (A1PI), trong khi dịch nổi chủ yếu chứa albumin.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu từ vốn Cohn, phương pháp này bao gồm các bước: (a) làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; (b) hòa tan các globulin miễn dịch trong chất kết tủa thứ nhất, để tạo ra hỗn dịch thứ nhất có phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan chứa A1PI; (c) tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; và (d) thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa thứ nhất là bước làm kết tủa bằng rượu.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa bằng rượu bao gồm việc bổ sung etanol vào huyết tương đã tách tủa lạnh đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% etanol (thể tích/thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 6.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, nồng độ cuối của etanol trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng $25 \pm 4\%$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 3\%$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 2\%$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 1\%$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, nồng độ cuối của etanol bằng 25%.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, độ pH ở bước làm kết tủa thứ nhất bằng $5,5 \pm 0,4$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, độ pH này bằng $5,5 \pm 0,3$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, độ pH này bằng $5,5 \pm 0,2$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, độ pH này bằng $5,5 \pm 0,1$. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, độ pH này bằng 5,5.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, độ pH được duy trì trong suốt bước làm kết tủa thứ nhất.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa bằng rượu thứ nhất bao gồm việc bổ sung rượu bằng cách phun.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa bằng rượu thứ nhất bao gồm việc bổ sung rượu tại vị trí liền kề với cánh khuấy vào. Theo phương án khác, rượu được đưa vào dung dịch tại nhiều hơn một vị trí. Theo một phương án, rượu được đưa vào dung dịch tại nhiều lỗ nhỏ. Theo phương án cụ thể, nhiều vị trí bổ sung rượu nằm ở hoặc gần cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác. Theo phương án khác, rượu được đưa vào dung dịch thông qua lỗ khuếch tán gồm nhiều khe mở. Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều khe mở tương ứng trong số nhiều khe mở trên lỗ khuếch tán được đặt tại vị trí hoặc gần với cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -3°C đến -10°C . Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến -9°C .

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch với từ 4 L đến 60 L dung dịch đệm cho mỗi kg chất kết tủa. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch với từ 8 L đến 15 L dung dịch đệm cho mỗi kg chất kết tủa.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, hỗn dịch thứ nhất có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,4. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, hỗn dịch thứ nhất có độ pH nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,1.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, hỗn dịch thứ nhất có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0mS/cm đến 4mS/cm. Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, hỗn dịch thứ nhất có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2mS/cm.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch trong dung dịch đệm bao gồm axetat và/hoặc phosphat.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất bằng cách ly tâm hoặc lọc.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất bao gồm: (i) trộn đều silic đioxit (SiO_2) đã nghiền với hỗn dịch thứ nhất; và (ii) tách riêng SiO_2 ra khỏi hỗn dịch này.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, silic đioxit (SiO_2) đã được nghiền mịn có diện tích bề mặt trung bình nằm trong khoảng từ $350\text{m}^2/\text{g}$ đến $410\text{m}^2/\text{g}$.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, silic đioxit (SiO_2) đã được nghiền mịn được bổ sung vào hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ chất kết tủa thứ nhất cuối nằm trong khoảng từ 15g/kg đến 80g/kg .

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp bao gồm các bước: (a) làm kết tủa các globulin miễn dịch từ huyết tương đã tách tủa lạnh, trong bước tách thứ nhất, với rượu có nồng độ nằm trong khoảng từ 24% đến 26% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,3 và 5,7 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ -6°C và -8°C để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; (b) tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; (c) xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2); (d) tách riêng phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; và (e) thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 90% lượng globulin miễn dịch IgG có mặt trong vốn Cohn đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 95% lượng globulin miễn dịch IgG có mặt trong vốn Cohn đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp còn bao gồm các bước (f) làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, trong bước làm kết tủa thứ hai, để thu được chất kết tủa thứ hai và dịch nổi thứ hai; (g) tạo hỗn dịch kết tủa thứ hai để tạo ra hỗn dịch thứ hai; và (h) thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu khác.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa thứ hai là bước làm kết tủa bằng rượu.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa bằng rượu thứ hai bao gồm việc bổ sung ethanol vào phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất để tạo ra nồng độ ethanol cuối nằm trong khoảng từ 22% đến 28% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa bằng rượu thứ hai bao gồm việc bổ sung rượu vào bằng cách phun.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa bằng rượu thứ hai bao gồm việc bổ sung rượu vào tại vị trí liền kề với cánh khuấy. Theo phương án khác, rượu được đưa vào dung dịch tại nhiều hơn một vị trí. Theo một phương án, rượu được đưa vào dung dịch tại nhiều lỗ nhỏ. Theo phương án cụ thể, nhiều vị trí bổ sung rượu được đặt ở hoặc gần cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác. Theo phương án khác, rượu được đưa vào dung dịch thông qua lỗ khuếch tán bao gồm nhiều khe mở. Theo phương án cụ thể, một hoặc nhiều khe mở tương ứng trong số nhiều khe mở trong lỗ khuếch tán được đặt ở hoặc gần với cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -3°C đến -10°C .

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 90% lượng IgG có mặt trong huyết tương đã tách tủa lạnh đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 95% lượng IgG có mặt trong huyết tương đã tách tủa lạnh đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu sắc ký trao đổi anion.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu bằng sắc ký trao đổi cation.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp này còn bao gồm bước làm bất hoạt hoặc loại bỏ virus.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp này bao gồm bước làm bất hoạt virus nhờ dung môi/chất làm sạch (S/D).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp này bao gồm bước lọc nano.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp này bao gồm bước ủ chế phẩm ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C trong thời gian ít nhất một tuần.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, thành phẩm IgG đã làm giàu bao gồm ít nhất 98% IgG.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, thành phẩm IgG đã làm giàu chứa ít nhất 99% IgG.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp tạo ra ít nhất 4g IgG trong mỗi lít huyết tương đã tách tủa lạnh đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp tạo ra ít nhất 4,25g IgG trong mỗi lít huyết tương đã tách tủa lạnh đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phương pháp tạo ra ít nhất 4,5g IgG trong mỗi lít huyết tương đã tách tủa lạnh đã được sử dụng ở bước (a).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, alpha-1-kháng trypsin (A1PI) được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, fibrinogen được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, yếu tố H được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, protein ức chế Inter-alpha-Trypsin (I α I ρ) được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được xử lý bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO₂).

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, albumin được tinh chế tiếp ra khỏi dịch nổi thứ nhất.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu điều chế được theo phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 63.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu như được bộc lộ ở đây để sử dụng để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh viêm, bệnh tự miễn, hoặc lây nhiễm cấp tính ở cá thể có nhu cầu điều trị.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ phân đoạn huyết tương theo một phương án đã nêu trong bản mô tả.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giới thiệu

Trong số các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp hữu hiệu hơn để phân lập các protein có hoạt tính điều trị ra khỏi huyết tương đã được gộp lại. Các phương pháp đã nêu để phân đoạn huyết tương đã gộp lại đạt được hiệu suất cao hơn đối với nhiều protein trong máu có nguồn gốc từ huyết tương quan trọng trong trị liệu, chứa các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI). Theo khía cạnh đặc biệt quan trọng, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng đáng kể hiệu suất của globulin miễn dịch G (IgG) được tách ra khỏi

huyết tương, so với phương pháp dùng trong tình trạng kỹ thuật để sản xuất chế phẩm IgG điều trị. Theo một phương án, hiệu suất cải thiện này đạt được bằng cách làm kết tủa globulin miễn dịch và AIP1 từ mẫu huyết tương ban đầu (trong bản mô tả này được gọi là “vốn Cohn”) trong điều kiện độ pH thấp, nồng độ rượu cao. Bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao dẫn tới việc bắt giữ khối chế phẩm globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu. So với các quy trình sản xuất globulin miễn dịch trong tình trạng kỹ thuật, các phương pháp theo sáng chế làm giảm đáng kể lượng globulin miễn dịch bị hao hụt trong quá trình phân đoạn huyết tương trước.

Phương pháp theo sáng chế làm giảm số lượng bước làm kết tủa protein cần để phân lập protein ra khỏi huyết tương của người với độ tinh khiết đủ cao để dùng trong điều trị, trong khi đó làm tăng đồng thời hiệu suất thu hồi protein trong máu quan trọng trong điều trị như globulin miễn dịch G (IgG). Đặc biệt, các phương pháp này loại trừ được yêu cầu về bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu cao, nồng độ rượu thấp, thường được gọi là bước làm kết tủa phân đoạn I, đã được áp dụng trong các quy trình sản xuất có nguồn gốc từ các sơ đồ phân đoạn Cohn-Oncley, Kistler-Nitschmann, và Deutsch. Thực vậy, các phương pháp theo sáng chế ứng dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (trong bản mô tả này được gọi là quá trình làm kết tủa phân đoạn I-IV-1) phân chia khối chứa IgG, IgA, IgM, và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) của huyết tương trong chất kết tủa và khối chứa albumin trong dịch nổi. Tiếp đó, IgG được tách ra khỏi IgA, IgM, và A1PI theo nhiều cách khác nhau, từ đó tạo ra chế phẩm IgG có hiệu suất cao. So với phương pháp áp dụng bước làm kết tủa phân đoạn I, việc bắt giữ khối IgG trong bước làm kết tủa phân đoạn I-IV-1 ban đầu làm tăng hiệu suất cuối của quy trình sản xuất lên ít nhất nằm trong khoảng từ 10% đến 25%.

E. J. Cohn lần đầu tiên xây dựng phương pháp phân đoạn huyết tương bằng cách sử dụng etanol, chứ không phải muối, vào năm 1946. Từ đó, phương pháp làm kết tủa bằng etanol đã trở thành lựa chọn cho quy trình sản xuất ở quy mô lớn các sản phẩm có nguồn gốc từ huyết tương, như IgG và A1PI. Thông thường, các quy trình sản xuất này áp dụng một loạt bước phân đoạn etanol, từ đó tạo ra các phân đoạn thô chứa các protein trong máu

có nguồn gốc từ huyết tương khác nhau, được làm giàu tiếp theo nhiều quy trình/kỹ thuật khác nhau tiếp theo.

Quy trình Cohn được phát triển ban đầu để thu albumin có độ tinh khiết tương đối cao (95%) bằng cách làm kết tủa phân đoạn bằng rượu. Tuy nhiên, Oncley và các đồng tác giả, Deutsch và các đồng tác giả, và Kistler và Nitschmann nhanh chóng nhận thấy rằng chất kết tủa protein cụ thể (Phân đoạn II+III) từ phương pháp Cohn số 6 có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để tinh chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu hiệu suất cao. Để thu được độ tinh khiết và độ an toàn cao cần thiết để dùng chế phẩm IgG qua đường tĩnh mạch, một số bước tinh chế và đánh bóng (ví dụ, hấp phụ thông thường hoặc toàn bộ các kỹ thuật sắc ký khác nhau, lọc dòng Cross, v.v.) được bổ sung vào các quy trình sản xuất IgG sau các bước phân đoạn rượu.

Thông thường, các nhà sản xuất IgG dựa vào chất kết tủa phân đoạn II+III theo phương pháp Cohn 6 hoặc chất kết tủa Kistler-Nitschmann A làm nguyên liệu ban đầu để xử lý tiếp. Cả hai phân đoạn được tạo ra theo quy trình hai bước, trong đó: i.) các protein như fibrinogen và Yếu tố XIII được loại bỏ bằng bước làm kết tủa ban đầu (kết tủa phân đoạn I) được thực hiện ở độ pH cao (7,2) với nồng độ etanol thấp (nằm trong khoảng từ 8% đến 10% thể tích); và ii.) IgG được làm kết tủa ra khỏi dịch nổi phân đoạn I ở độ pH = 6,8 bằng 20% đến 25% (thể tích) etanol (Phân đoạn II+III) hoặc ở độ pH = 5,85 bằng 19% (thể tích) etanol (kết tủa A), trong khi đó albumin và phần lớn A1PI vẫn giữ được trong dịch nổi. Tuy nhiên, việc sử dụng chất kết tủa phân đoạn II+III hoặc chất kết tủa A làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất chế phẩm IgG làm giảm mức hao hụt IgG ở một số bước trong quy trình, như đã nêu trên.

Để khắc phục các vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát triển bước tinh chế ban đầu bao gồm bước làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và A1PI để tạo ra nguyên liệu ban đầu hầu như chứa toàn bộ IgG và A1PI của huyết tương nguồn, đồng thời albumin vẫn giữ được trong dịch nổi. Bước phân đoạn này về cơ bản phá vỡ các bước làm kết tủa phân đoạn I, II+III, và IV-1 như được mô tả bởi Oncley và các đồng tác giả (nêu trên) thành một phản ứng kết tủa, trong bản mô tả này được gọi là quá trình làm kết tủa phân đoạn I+II+III+IV-1 (hoặc phân đoạn I-IV-1).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm globulin miễn dịch với hiệu suất cao để dùng theo đường tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong cơ bằng cách sử dụng chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 làm nguyên liệu ban đầu. Theo các phương án khác, phương pháp này còn bao gồm việc tách riêng alpha-1-kháng trypsin (A1PI) thành phân đoạn không hòa tan chứa hỗn dịch đã tạo ra trong quá trình chiết globulin miễn dịch từ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Tiếp đó, phân đoạn không hòa tan đã tách riêng có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất chế phẩm A1PI có nguồn gốc từ huyết tương.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm điều trị chứa protein đã phân lập từ huyết tương đã gộp lại. Theo một số phương án, các phương pháp sản xuất này gồm bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (ví dụ, etanol) làm tăng khả năng thu hồi các protein trong máu khác nhau, so với các phương pháp truyền thống. Theo một số phương án, các phương pháp là hữu ích để sản xuất một hoặc nhiều chế phẩm điều trị chứa globulin miễn dịch (ví dụ, IgG), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, hoặc protein ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) được tách ra từ máu, huyết tương của người hoặc dẫn xuất của chúng.

Định nghĩa

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị bằng IgG" thường dùng để chỉ phương pháp điều trị bằng cách dùng chế phẩm chứa globulin miễn dịch IgG theo đường tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong cơ cho bệnh nhân để điều trị nhiều tình trạng bệnh lý như bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh viêm, và bệnh tự miễn. Các globulin miễn dịch IgG thường được gộp lại và điều chế từ huyết tương. Các kháng thể nguyên vẹn hoặc các đoạn của chúng có thể được sử dụng. Các globulin miễn dịch IgG có thể được điều chế ở nồng độ cao (ví dụ, cao hơn 10%) để dùng qua đường dưới da, hoặc được điều chế để dùng qua đường trong cơ. Đây là đường dùng thông thường đối với các chế phẩm IgG đặc biệt đã được điều chế với nồng độ trung bình cao hơn so với các kháng nguyên đặc hiệu (ví dụ, yếu tố Rho D, độc tố gây ho lâu ngày, độc tố gây bệnh uốn ván, độc tố từ thịt gây ngộ độc, bệnh dại, v. v.).

Thuật ngữ "huyết tương đã tách tủa lạnh" được dùng trong bản mô tả này để chỉ dịch nổi tạo ra được sau khi loại bỏ chất kết tủa lạnh hình thành do huyết tương hoặc huyết tương đã gộp lại rã băng ở các nhiệt độ gần nhiệt độ đóng băng, ví dụ, ở nhiệt độ thấp hơn 10°C,

tốt hơn là ở nhiệt độ không cao hơn 6°C. Theo sáng chế, huyết tương có thể được dùng thay thế cho huyết tương đã thu hồi (tức là, huyết tương đã được tách ra khỏi máu toàn phần *ex vivo*) hoặc huyết tương nguồn (tức là, huyết tương được thu gom bằng cách tách hồng cầu khỏi dịch huyết tương). Bước làm kết tủa lạnh thường được thực hiện, ví dụ, bằng cách rã băng huyết tương đông đã gom trước đó, đã được thử nghiệm về độ an toàn và kiểm tra chất lượng, cho dù huyết tương tươi cũng có thể được sử dụng. Sau khi làm rã băng hoàn toàn huyết tương đông ở nhiệt độ thấp, tiến hành tách riêng các chất kết tủa lạnh dạng rắn ra khỏi dịch lỏng nổi trên bề mặt trong điều kiện lạnh (ví dụ, $\leq 6^{\circ}\text{C}$) bằng cách ly tâm hoặc lọc.

Thuật ngữ, “vốn Cohn” được dùng trong bản mô tả này để chỉ nguyên liệu ban đầu đã dùng để phân đoạn mẫu huyết tương hoặc vốn chứa các mẫu huyết tương. Các vốn Cohn có thể chứa một hoặc nhiều huyết tương toàn phần, huyết tương đã tách tủa lạnh, và huyết tương đã tách tủa lạnh mà được dùng cho bước xử lý trước đó. Theo một số phương án, vốn Cohn là mẫu huyết tương đã tách tủa lạnh mà một hoặc nhiều yếu tố máu đã được loại bỏ ra khỏi mẫu này trong bước xử lý trước đó, ví dụ, bằng cách hấp phụ lên pha rắn (ví dụ, nhôm hydroxit, silic đioxit đã được nghiền mịn, v.v.), hoặc bước sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký ái lực heparin). Các protein trong máu khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hoạt tính vòng ức chế yếu tố tám (FEIBA), phức hợp yếu tố IX, yếu tố VII, phức hợp Prothrombin, và/hoặc kháng thrombin III, có thể được tách ra từ mẫu huyết tương đã tách tủa lạnh trước khi phân đoạn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chế phẩm đã được làm giàu” dùng để chỉ chế phẩm protein được tách ra từ mẫu huyết tương, trong đó độ tinh khiết của protein này cao hơn so với độ tinh khiết của protein trong mẫu huyết tương ban đầu. Theo một phương án, protein trong chế phẩm đã được làm giàu có độ tinh khiết ít nhất bằng 25% lớn hơn so với độ tinh khiết trong mẫu huyết tương ban đầu. Theo các phương án khác, chế phẩm đã được làm giàu có độ tinh khiết ít nhất bằng 50%, 75%, 100%, cao hơn gấp 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, hoặc cao hơn so với mẫu huyết tương ban đầu. Ví dụ, chế phẩm IgG đã được làm giàu, trong đó 70% protein toàn phần là IgG được làm giàu gấp 7 lần so với mẫu huyết tương ban đầu, trong đó 10% protein toàn phần là IgG.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “bổ sung khuếch tán” được dùng để chỉ cách bổ sung một chất vào hệ dịch lỏng theo cách rời khỏi vị trí. Quá trình bổ sung khuếch tán có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách phun hoặc tạo mù dịch lỏng (ví dụ, rượu, chất điều chỉnh độ pH, dung môi, chất làm sạch, hoặc dịch lỏng khác) vào hệ dịch lỏng (ví dụ, huyết tương phân đoạn), đưa dịch lỏng vào hệ này tại nhiều vị trí, đưa dịch lỏng vào hệ này bằng cách sử dụng lỗ khuếch tán, đưa dịch lỏng tại vị trí hoặc gần với cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác, hoặc phân bố chất hóa học có mặt ở tình trạng rắn vào vùng mở rộng của hệ dịch lỏng.

Thuật ngữ "phun" được dùng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp phân phối chất lỏng vào hệ thống, ví dụ, ở bước làm kết tủa bằng rượu, như bước làm kết tủa phân đoạn I-IV-1, ở dạng giọt hoặc mù mịn của chất lỏng. Quá trình phun có thể được thực hiện bằng thiết bị điều áp bất kỳ, như vật chứa (ví dụ, chai phun), có đầu phun hoặc vòi và được vận hành bằng tay hoặc tự động để tạo ra dạng mù mịn từ dịch lỏng. Thông thường, quá trình phun được thực hiện trong khi hệ thống nhận chất lỏng được khuấy liên tục hoặc theo cách khác được trộn để đảm bảo quá trình phân bố nhanh và đồng nhất dịch lỏng vào trong hệ thống.

Thuật ngữ "dung môi" được dùng trong bản mô tả này bao hàm chất lỏng bất kỳ có khả năng hòa tan hoặc phân tán một hoặc nhiều chất khác. Dung môi có thể có bản chất vô cơ, như nước, hoặc nó có thể là chất lỏng hữu cơ, như etanol, axeton, metyl axetat, etyl axetat, hexan, ete dầu mỏ, v.v.. Khi được dùng trong thuật ngữ "xử lý bằng chất làm sạch dung môi", dung môi biểu thị dung môi hữu cơ (ví dụ, tri-N-butyl phosphat), là một phần của hỗn hợp làm sạch dung môi đã dùng để làm bất hoạt virus có màng bao lipid trong dung dịch.

Thuật ngữ "chất làm sạch" được dùng trong bản mô tả này thay thế cho thuật ngữ "chất hoạt động bề mặt" hoặc "chất tác động bề mặt". Các chất hoạt động bề mặt thường là các hợp chất hữu cơ có cả tính ưa nước lẫn tính kỵ nước, tức là, chứa cả nhóm kỵ nước ("đuôi") và nhóm ưa nước ("đầu"), giúp cho các chất hoạt động bề mặt hòa tan được trong các dung môi hữu cơ lẫn nước. Chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại nhờ sự có mặt của các nhóm mang điện tích chính thức ở đầu của nó. Chất hoạt động bề mặt không ion

không có các nhóm mang điện tích ở đầu của nó, trong khi đó chất hoạt động bề mặt ion mang điện tích thực ở đầu của nó. Chất hoạt động bề mặt lưỡng tính chứa đầu gồm hai nhóm mang điện tích trái dấu. Một số ví dụ về các chất hoạt động bề mặt thông thường bao gồm: chất hoạt động bề mặt anion (trên cơ sở các anion sulfat, sulfonat hoặc carboxylat): perflooctanoat (PFOA hoặc PFO), perflooctansulfonat (PFOS), natri đodexyl sulfat (SDS), amoni lauryl sulfat, và các muối alkyl sulfat khác, natri laureth sulfat (còn gọi là natri lauryl ete sulfat, hoặc SLES), alkyl benzen sulfonat; chất hoạt động bề mặt cation (trên cơ sở cation amoni bậc bốn): xetyl trimetylamonium bromua (CTAB) a.k.a. hexadexyl trimetyl amoni bromua, và các muối alkyltrimetylamonium khác, xetylpyridini clorua (CPC), amin được polyetoxylat hóa từ mỡ (POEA), benzalkoni clorua (BAC), benzethoni clorua (BZT); các axit béo mạch dài và các muối của chúng: bao gồm caprylat, axit caprylic, heptanoat, axit hexanoic, axit heptanoic, axit nanoic, axit decanoic, và các axit tương tự; ion lưỡng tính (lưỡng tính): đodexyl betain; cocamidopropyl betain; coco ampho glyxinat; không ion: alkyl poly(etylen oxit), alkylphenol poly(etylen oxit), các copolyme của poly(etylen oxit) và poly(propylen oxit) (trên thị trường được biết dưới tên Poloxame hoặc Poloxamin), alkyl polyglucosit, bao gồm octyl glucosit, dexyl maltosit, các rượu béo (ví dụ, rượu xetylic và rượu oleylic), cocamit MEA, cocamit DEA, các polysorbat (Tween 20, Tween 80, v.v.), chất làm sạch Triton, và đodexyl dimetylamin oxit.

"Lượng hoặc liều hữu hiệu điều trị" hoặc "lượng hoặc liều đủ/hữu hiệu" có nghĩa là liều tạo ra tác dụng cần đạt được khi được dùng. Liều chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị, và có thể xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết (xem, ví dụ, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); và Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Các thuật ngữ “kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao” và “kết tủa phân đoạn I-IV-1” được dùng thay thế cho nhau trong bản mô tả này để chỉ bước làm kết tủa các protein từ vốn Cohn ở nồng độ rượu cuối (thường là etanol) nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (thể tích) và độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Nói chung, chất kết tủa phân

đoạn I-IV-1 thu được chứa ít nhất 90% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu, tốt hơn nếu chứa ít nhất 95%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 98%, tốt nhất là chứa ít nhất 99% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, các globulin miễn dịch bao gồm các globulin miễn dịch IgG. Theo phương án ưu tiên khác, alpha-1-kháng trypsin (A1PI) được làm kết tủa đồng thời với các globulin miễn dịch ở bước làm kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Phân đoạn huyết tương

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn các protein có hoạt tính điều trị từ huyết tương đã gộp lại bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu, trong đó phần lớn globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) của huyết tương ban đầu được làm kết tủa và phần lớn albumin của huyết tương ban đầu được giữ lại trong dịch nổi. Bắt đầu từ bước làm kết tủa ban đầu này, nhiều protein trong máu quan trọng trong điều trị có thể được sản xuất với hiệu suất thu hồi cao.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn protein trong máu trong mẫu huyết tương, phương pháp này bao gồm bước làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI từ huyết tương ban đầu trong điều kiện độ pH thấp, nồng độ rượu cao. Bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao này khiến tạo ra kết tủa (trong bản mô tả này gọi là chất kết tủa phân đoạn I-IV-1) và dịch nổi (trong bản mô tả này gọi là dịch nổi phân đoạn I-IV-1).

Dịch nổi phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 70%, tốt hơn nếu ít nhất 80%, tốt nhất là ít nhất 90% lượng albumin của huyết tương ban đầu. Do đó, dịch nổi này có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm chứa albumin.

Chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 90%, tốt hơn nếu ít nhất 95%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 98%, tốt nhất là ít nhất 99% lượng globulin miễn dịch của huyết tương ban đầu. Theo phương án cụ thể, chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 98%, tốt hơn nếu 99% lượng IgG của huyết tương ban đầu. Do đó, chất kết tủa này có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm globulin miễn dịch. Theo một phương án, chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm chứa

IgG. Theo phương án khác nữa, chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm chứa globulin miễn dịch chứa nhiều hơn một loại globulin miễn dịch phụ.

Tương tự, chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 90%, tốt hơn nếu chứa ít nhất 95%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 97%, tốt nhất là chứa ít nhất 98% lượng A1PI của huyết tương ban đầu. Do đó, chất kết tủa này có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm chứa A1PI.

Chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 cũng chứa ít nhất 70%, tốt hơn nếu chứa ít nhất 80%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 90%, tốt nhất là chứa ít nhất 95% lượng yếu tố H của huyết tương ban đầu. Do đó, chất kết tủa này có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm chứa yếu tố H.

Chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 cũng chứa ít nhất 70%, tốt hơn nếu chứa ít nhất 80%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 90%, tốt nhất là chứa ít nhất 95% lượng chất ức chế inter-alpha (IaIp) của huyết tương ban đầu. Do đó, chất kết tủa này có thể được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất được phẩm chứa IaIp.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tách các globulin miễn dịch ra khỏi A1PI tìm thấy trong chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước hòa tan các globulin miễn dịch trong hỗn dịch chứa chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, đồng thời giữ A1PI trong phần không hòa tan của hỗn dịch và tiếp đó, tách riêng các phần hòa tan và phần không hòa tan, ví dụ bằng cách lọc hoặc ly tâm. Theo một phương án, quá trình tách riêng được hỗ trợ bằng cách xử lý hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 với silic đioxit đã được nghiền mịn trước khi tách riêng các phần hòa tan và phần không hòa tan. Không gắn kết với giả thuyết bất kỳ, silic đioxit có thể gắn kết A1PI mà đã được hòa tan đồng thời, với các globulin miễn dịch, từ đó làm tăng lượng A1PI đã phân chia vào phần không hòa tan của hỗn dịch.

Hơn nữa, đã biết rằng Yếu tố H và silic đioxit dạng hạt gắn kết IaIp trong các điều kiện nhất định (*xem*, WO/2011/011753, PCT/US2011/45099, và PCT/US2011/038247; nội dung của chúng được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích). Do

đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tách các globulin miễn dịch ra khỏi A1PI, yếu tố H, và IaIp đã tìm thấy trong chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, phương pháp này bao gồm bước tạo hỗn dịch chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 trong nước hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp đủ để hòa tan các globulin miễn dịch; xử lý hỗn dịch bằng silic đioxit; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch ra khỏi phần không hòa tan, trong đó phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan chứa A1PI, yếu tố H, và IaIp.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phần hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 80% lượng IgG của mẫu huyết tương ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, phần hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 90% lượng IgG của mẫu huyết tương ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phần hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 95% lượng IgG của mẫu huyết tương ban đầu. Theo các phương án khác, phần hòa tan của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc nhiều hơn hàm lượng IgG của mẫu huyết tương ban đầu.

Theo một phương án của các phương pháp nêu trên, phần không hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 70% lượng A1PI của mẫu huyết tương ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, phần không hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 80% lượng A1PI của mẫu huyết tương ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phần không hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 90% lượng A1PI của mẫu huyết tương ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phần không hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 95% lượng A1PI của mẫu huyết tương ban đầu. Theo các phương án khác, phần không hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa ít nhất 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc nhiều hơn hàm lượng A1PI của mẫu huyết tương ban đầu.

Protein từ máu đã phân đoạn bằng cách áp dụng bước làm kết tủa khối ban đầu (ví dụ, kết tủa phân đoạn I-IV-1) có thể được làm giàu tiếp theo các quy trình thích hợp, ví dụ, kết tủa (ví dụ, phân đoạn rượu hoặc phân đoạn polyetylen glycol), phương pháp sắc ký (sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, sắc ký ái lực miễn dịch, v.v.), lọc (siêu lọc/lọc thẩm tách, lọc nano), siêu ly tâm, điều chế bằng xung điện, và các quy trình tương tự.

Điều chế huyết tương đã tách tủa lạnh

Nguyên liệu ban đầu đã được dùng để điều chế chế phẩm IgG cô đặc thường cấu thành từ huyết tương đã được thu hồi (tức là, huyết tương đã được tách ra khỏi máu toàn phần *ex vivo*) hoặc huyết tương nguồn (tức là, huyết tương được thu gom bằng cách tách hồng cầu khỏi dịch huyết tương). Quy trình tinh chế thường bắt đầu bằng việc làm rã băng huyết tương đông đã gộp lại trước đó, đã được thử nghiệm về độ an toàn và kiểm tra chất lượng. Quá trình làm tan thường được thực hiện ở nhiệt độ không lớn hơn 6°C. Sau khi làm tan hoàn toàn huyết tương đông ở nhiệt độ thấp, tiến hành ly tâm ở điều kiện lạnh (ví dụ, $\leq 6^\circ\text{C}$) để tách riêng các chất kết tủa lạnh dạng rắn ra khỏi dịch nổi lỏng. Theo cách khác, bước tách riêng có thể được thực hiện bằng cách lọc không phải bằng cách ly tâm. Dịch lỏng nổi trên bề mặt (cũng được gọi là “huyết tương đã tách tủa lạnh”, sau khi các protein không tan lạnh đã loại bỏ bằng cách ly tâm từ huyết tương tươi đã làm tan) tiếp đó được xử lý ở bước tiếp theo. Các bước bổ sung khác có thể được tiến hành ở thời điểm để phân lập hoạt tính vòng ức chế yếu tố tám (FEIBA), phức hợp yếu tố IX, yếu tố VII, kháng thrombin III, phức hợp Prothrombin, v.v..

Làm kết tủa lần thứ nhất – kết tủa phân đoạn I-IV-1

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn protein trong máu trong mẫu huyết tương, phương pháp này bao gồm bước làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi huyết tương ban đầu trong bước tách thứ nhất trong điều kiện độ pH thấp, nồng độ rượu cao. Bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao này sẽ tạo ra chất kết tủa (chất kết tủa phân đoạn I-IV-1) và dịch nổi (dịch nổi phân đoạn I-IV-1).

Theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện bằng cách phối trộn ethanol với vốn huyết tương ban đầu (vốn Cohn) đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20%

đến 30% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5\pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5\pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5\pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5\pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5\pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng 5,5. Theo các phương án khác, nồng độ etanol cuối và độ pH của bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể từ 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7 và Bảng 8.

Bảng 1. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]								
Độ pH	20 đến 30	21 đến 30	22 đến 30	23 đến 30	24 đến 30	25 đến 30	20 đến 29	21 đến 29
5,0 đến 6,0	Biến thể 1	Biến thể 39	Biến thể 77	Biến thể 115	Biến thể 153	Biến thể 191	Biến thể 229	Biến thể 267
5,1 đến 5,9	Biến thể 2	Biến thể 40	Biến thể 78	Biến thể 116	Biến thể 154	Biến thể 192	Biến thể 230	Biến thể 268
5,2 đến 5,8	Biến thể 3	Biến thể 41	Biến thể 79	Biến thể 117	Biến thể 155	Biến thể 193	Biến thể 231	Biến thể 269

5,3 đến 5,7	Biến thẻ 4	Biến thẻ 42	Biến thẻ 80	Biến thẻ 118	Biến thẻ 156	Biến thẻ 194	Biến thẻ 232	Biến thẻ 270
5,4 đến 5,6	Biến thẻ 5	Biến thẻ 43	Biến thẻ 81	Biến thẻ 119	Biến thẻ 157	Biến thẻ 195	Biến thẻ 233	Biến thẻ 271
5,0±0,2	Biến thẻ 6	Biến thẻ 44	Biến thẻ 82	Biến thẻ 120	Biến thẻ 158	Biến thẻ 196	Biến thẻ 234	Biến thẻ 272
5,1±0,2	Biến thẻ 7	Biến thẻ 45	Biến thẻ 83	Biến thẻ 121	Biến thẻ 159	Biến thẻ 197	Biến thẻ 235	Biến thẻ 273
5,2±0,2	Biến thẻ 8	Biến thẻ 46	Biến thẻ 84	Biến thẻ 122	Biến thẻ 160	Biến thẻ 198	Biến thẻ 236	Biến thẻ 274
5,3±0,2	Biến thẻ 9	Biến thẻ 47	Biến thẻ 85	Biến thẻ 123	Biến thẻ 161	Biến thẻ 199	Biến thẻ 237	Biến thẻ 275
5,4±0,2	Biến thẻ 10	Biến thẻ 48	Biến thẻ 86	Biến thẻ 124	Biến thẻ 162	Biến thẻ 200	Biến thẻ 238	Biến thẻ 276
5,5±0,2	Biến thẻ 11	Biến thẻ 49	Biến thẻ 87	Biến thẻ 125	Biến thẻ 163	Biến thẻ 201	Biến thẻ 239	Biến thẻ 277
5,6±0,2	Biến thẻ 12	Biến thẻ 50	Biến thẻ 88	Biến thẻ 126	Biến thẻ 164	Biến thẻ 202	Biến thẻ 240	Biến thẻ 278
5,7±0,2	Biến thẻ 13	Biến thẻ 51	Biến thẻ 89	Biến thẻ 127	Biến thẻ 165	Biến thẻ 203	Biến thẻ 241	Biến thẻ 279
5,8±0,2	Biến thẻ 14	Biến thẻ 52	Biến thẻ 90	Biến thẻ 128	Biến thẻ 166	Biến thẻ 204	Biến thẻ 242	Biến thẻ 280

5,9±0,2	Biến thẻ 15	Biến thẻ 53	Biến thẻ 91	Biến thẻ 129	Biến thẻ 167	Biến thẻ 205	Biến thẻ 243	Biến thẻ 281
6,0±0,2	Biến thẻ 16	Biến thẻ 54	Biến thẻ 92	Biến thẻ 130	Biến thẻ 168	Biến thẻ 206	Biến thẻ 244	Biến thẻ 282
5,0±0,1	Biến thẻ 17	Biến thẻ 55	Biến thẻ 93	Biến thẻ 131	Biến thẻ 169	Biến thẻ 207	Biến thẻ 245	Biến thẻ 283
5,1±0,1	Biến thẻ 18	Biến thẻ 56	Biến thẻ 94	Biến thẻ 132	Biến thẻ 170	Biến thẻ 208	Biến thẻ 246	Biến thẻ 284
5,2±0,1	Biến thẻ 19	Biến thẻ 57	Biến thẻ 95	Biến thẻ 133	Biến thẻ 171	Biến thẻ 209	Biến thẻ 247	Biến thẻ 285
5,3±0,1	Biến thẻ 20	Biến thẻ 58	Biến thẻ 96	Biến thẻ 134	Biến thẻ 172	Biến thẻ 210	Biến thẻ 248	Biến thẻ 286
5,4±0,1	Biến thẻ 21	Biến thẻ 59	Biến thẻ 97	Biến thẻ 135	Biến thẻ 173	Biến thẻ 211	Biến thẻ 249	Biến thẻ 287
5,5±0,1	Biến thẻ 22	Biến thẻ 60	Biến thẻ 98	Biến thẻ 136	Biến thẻ 174	Biến thẻ 212	Biến thẻ 250	Biến thẻ 288
5,6±0,1	Biến thẻ 23	Biến thẻ 61	Biến thẻ 99	Biến thẻ 137	Biến thẻ 175	Biến thẻ 213	Biến thẻ 251	Biến thẻ 289
5,7±0,1	Biến thẻ 24	Biến thẻ 62	Biến thẻ 100	Biến thẻ 138	Biến thẻ 176	Biến thẻ 214	Biến thẻ 252	Biến thẻ 290
5,8±0,1	Biến thẻ 25	Biến thẻ 63	Biến thẻ 101	Biến thẻ 139	Biến thẻ 177	Biến thẻ 215	Biến thẻ 253	Biến thẻ 291

5,9±0,1	Biến thể 26	Biến thể 64	Biến thể 102	Biến thể 140	Biến thể 178	Biến thể 216	Biến thể 254	Biến thể 292
6,0±0,1	Biến thể 27	Biến thể 65	Biến thể 103	Biến thể 141	Biến thể 179	Biến thể 217	Biến thể 255	Biến thể 293
5	Biến thể 28	Biến thể 66	Biến thể 104	Biến thể 142	Biến thể 180	Biến thể 218	Biến thể 256	Biến thể 294
5,1	Biến thể 29	Biến thể 67	Biến thể 105	Biến thể 143	Biến thể 181	Biến thể 219	Biến thể 257	Biến thể 295
5,2	Biến thể 30	Biến thể 68	Biến thể 106	Biến thể 144	Biến thể 182	Biến thể 220	Biến thể 258	Biến thể 296
5,3	Biến thể 31	Biến thể 69	Biến thể 107	Biến thể 145	Biến thể 183	Biến thể 221	Biến thể 259	Biến thể 297
5,4	Biến thể 32	Biến thể 70	Biến thể 108	Biến thể 146	Biến thể 184	Biến thể 222	Biến thể 260	Biến thể 298
5,5	Biến thể 33	Biến thể 71	Biến thể 109	Biến thể 147	Biến thể 185	Biến thể 223	Biến thể 261	Biến thể 299
5,6	Biến thể 34	Biến thể 72	Biến thể 110	Biến thể 148	Biến thể 186	Biến thể 224	Biến thể 262	Biến thể 300
5,7	Biến thể 35	Biến thể 73	Biến thể 111	Biến thể 149	Biến thể 187	Biến thể 225	Biến thể 263	Biến thể 301
5,8	Biến thể 36	Biến thể 74	Biến thể 112	Biến thể 150	Biến thể 188	Biến thể 226	Biến thể 264	Biến thể 302

5,9	Biến thể 37	Biến thể 75	Biến thể 113	Biến thể 151	Biến thể 189	Biến thể 227	Biến thể 265	Biến thể 303
6	Biến thể 38	Biến thể 76	Biến thể 114	Biến thể 152	Biến thể 190	Biến thể 228	Biến thể 266	Biến thể 304

Bảng 2. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa von
Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]							
Độ pH	22 đến 29	23 đến 29	24 đến 29	25 đến 29	20 đến 28	21 đến - 28	22 đến 28
5,0 đến 6,0	Biến thể 305	Biến thể 343	Biến thể 381	Biến thể 419	Biến thể 457	Biến thể 495	Biến thể 533
5,1 đến 5,9	Biến thể 306	Biến thể 344	Biến thể 382	Biến thể 420	Biến thể 458	Biến thể 496	Biến thể 534
5,2 đến 5,8	Biến thể 307	Biến thể 345	Biến thể 383	Biến thể 421	Biến thể 459	Biến thể 497	Biến thể 535
5,3 đến 5,7	Biến thể 308	Biến thể 346	Biến thể 384	Biến thể 422	Biến thể 460	Biến thể 498	Biến thể 536
5,4 đến 5,6	Biến thể 309	Biến thể 347	Biến thể 385	Biến thể 423	Biến thể 461	Biến thể 499	Biến thể 537
5,0±0,2	Biến thể 310	Biến thể 348	Biến thể 386	Biến thể 424	Biến thể 462	Biến thể 500	Biến thể 538

5,1±0,2	Biến thể 311	Biến thể 349	Biến thể 387	Biến thể 425	Biến thể 463	Biến thể 501	Biến thể 539
5,2±0,2	Biến thể 312	Biến thể 350	Biến thể 388	Biến thể 426	Biến thể 464	Biến thể 502	Biến thể 540
5,3±0,2	Biến thể 313	Biến thể 351	Biến thể 389	Biến thể 427	Biến thể 465	Biến thể 503	Biến thể 541
5,4±0,2	Biến thể 314	Biến thể 352	Biến thể 390	Biến thể 428	Biến thể 466	Biến thể 504	Biến thể 542
5,5±0,2	Biến thể 315	Biến thể 353	Biến thể 391	Biến thể 429	Biến thể 467	Biến thể 505	Biến thể 543
5,6±0,2	Biến thể 316	Biến thể 354	Biến thể 392	Biến thể 430	Biến thể 468	Biến thể 506	Biến thể 544
5,7±0,2	Biến thể 317	Biến thể 355	Biến thể 393	Biến thể 431	Biến thể 469	Biến thể 507	Biến thể 545
5,8±0,2	Biến thể 318	Biến thể 356	Biến thể 394	Biến thể 432	Biến thể 470	Biến thể 508	Biến thể 546
5,9±0,2	Biến thể 319	Biến thể 357	Biến thể 395	Biến thể 433	Biến thể 471	Biến thể 509	Biến thể 547
6,0±0,2	Biến thể 320	Biến thể 358	Biến thể 396	Biến thể 434	Biến thể 472	Biến thể 510	Biến thể 548
5,0±0,1	Biến thể 321	Biến thể 359	Biến thể 397	Biến thể 435	Biến thể 473	Biến thể 511	Biến thể 549

5,1±0,1	Biển thể 322	Biển thể 360	Biển thể 398	Biển thể 436	Biển thể 474	Biển thể 512	Biển thể 550
5,2±0,1	Biển thể 323	Biển thể 361	Biển thể 399	Biển thể 437	Biển thể 475	Biển thể 513	Biển thể 551
5,3±0,1	Biển thể 324	Biển thể 362	Biển thể 400	Biển thể 438	Biển thể 476	Biển thể 514	Biển thể 552
5,4±0,1	Biển thể 325	Biển thể 363	Biển thể 401	Biển thể 439	Biển thể 477	Biển thể 515	Biển thể 553
5,5±0,1	Biển thể 326	Biển thể 364	Biển thể 402	Biển thể 440	Biển thể 478	Biển thể 516	Biển thể 554
5,6±0,1	Biển thể 327	Biển thể 365	Biển thể 403	Biển thể 441	Biển thể 479	Biển thể 517	Biển thể 555
5,7±0,1	Biển thể 328	Biển thể 366	Biển thể 404	Biển thể 442	Biển thể 480	Biển thể 518	Biển thể 556
5,8±0,1	Biển thể 329	Biển thể 367	Biển thể 405	Biển thể 443	Biển thể 481	Biển thể 519	Biển thể 557
5,9±0,1	Biển thể 330	Biển thể 368	Biển thể 406	Biển thể 444	Biển thể 482	Biển thể 520	Biển thể 558
6,0±0,1	Biển thể 331	Biển thể 369	Biển thể 407	Biển thể 445	Biển thể 483	Biển thể 521	Biển thể 559
5	Biển thể 332	Biển thể 370	Biển thể 408	Biển thể 446	Biển thể 484	Biển thể 522	Biển thể 560

5,1	Biển thể 333	Biển thể 371	Biển thể 409	Biển thể 447	Biển thể 485	Biển thể 523	Biển thể 561
5,2	Biển thể 334	Biển thể 372	Biển thể 410	Biển thể 448	Biển thể 486	Biển thể 524	Biển thể 562
5,3	Biển thể 335	Biển thể 373	Biển thể 411	Biển thể 449	Biển thể 487	Biển thể 525	Biển thể 563
5,4	Biển thể 336	Biển thể 374	Biển thể 412	Biển thể 450	Biển thể 488	Biển thể 526	Biển thể 564
5,5	Biển thể 337	Biển thể 375	Biển thể 413	Biển thể 451	Biển thể 489	Biển thể 527	Biển thể 565
5,6	Biển thể 338	Biển thể 376	Biển thể 414	Biển thể 452	Biển thể 490	Biển thể 528	Biển thể 566
5,7	Biển thể 339	Biển thể 377	Biển thể 415	Biển thể 453	Biển thể 491	Biển thể 529	Biển thể 567
5,8	Biển thể 340	Biển thể 378	Biển thể 416	Biển thể 454	Biển thể 492	Biển thể 530	Biển thể 568
5,9	Biển thể 341	Biển thể 379	Biển thể 417	Biển thể 455	Biển thể 493	Biển thể 531	Biển thể 569
6	Biển thể 342	Biển thể 380	Biển thể 418	Biển thể 456	Biển thể 494	Biển thể 532	Biển thể 570

Bảng 3. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn
Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]							
Độ pH	23 đến 28	24 đến 28	25 đến 28	20 đến 27	21 đến 27	22 đến 27	23 đến 27
5,0 đến 6,0	Biến thể 571	Biến thể 609	Biến thể 647	Biến thể 685	Biến thể 723	Biến thể 761	Biến thể 799
5,1 đến 5,9	Biến thể 572	Biến thể 610	Biến thể 648	Biến thể 686	Biến thể 724	Biến thể 762	Biến thể 800
5,2 đến 5,8	Biến thể 573	Biến thể 611	Biến thể 649	Biến thể 687	Biến thể 725	Biến thể 763	Biến thể 801
5,3 đến 5,7	Biến thể 574	Biến thể 612	Biến thể 650	Biến thể 688	Biến thể 726	Biến thể 764	Biến thể 802
5,4 đến 5,6	Biến thể 575	Biến thể 613	Biến thể 651	Biến thể 689	Biến thể 727	Biến thể 765	Biến thể 803
5,0±0,2	Biến thể 576	Biến thể 614	Biến thể 652	Biến thể 690	Biến thể 728	Biến thể 766	Biến thể 804
5,1±0,2	Biến thể 577	Biến thể 615	Biến thể 653	Biến thể 691	Biến thể 729	Biến thể 767	Biến thể 805
5,2±0,2	Biến thể 578	Biến thể 616	Biến thể 654	Biến thể 692	Biến thể 730	Biến thể 768	Biến thể 806
5,3±0,2	Biến thể 579	Biến thể 617	Biến thể 655	Biến thể 693	Biến thể 731	Biến thể 769	Biến thể 807

5,4±0,2	Biến thể 580	Biến thể 618	Biến thể 656	Biến thể 694	Biến thể 732	Biến thể 770	Biến thể 808
5,5±0,2	Biến thể 581	Biến thể 619	Biến thể 657	Biến thể 695	Biến thể 733	Biến thể 771	Biến thể 809
5,6±0,2	Biến thể 582	Biến thể 620	Biến thể 658	Biến thể 696	Biến thể 734	Biến thể 772	Biến thể 810
5,7±0,2	Biến thể 583	Biến thể 621	Biến thể 659	Biến thể 697	Biến thể 735	Biến thể 773	Biến thể 811
5,8±0,2	Biến thể 584	Biến thể 622	Biến thể 660	Biến thể 698	Biến thể 736	Biến thể 774	Biến thể 812
5,9±0,2	Biến thể 585	Biến thể 623	Biến thể 661	Biến thể 699	Biến thể 737	Biến thể 775	Biến thể 813
6,0±0,2	Biến thể 586	Biến thể 624	Biến thể 662	Biến thể 700	Biến thể 738	Biến thể 776	Biến thể 814
5,0±0,1	Biến thể 587	Biến thể 625	Biến thể 663	Biến thể 701	Biến thể 739	Biến thể 777	Biến thể 815
5,1±0,1	Biến thể 588	Biến thể 626	Biến thể 664	Biến thể 702	Biến thể 740	Biến thể 778	Biến thể 816
5,2±0,1	Biến thể 589	Biến thể 627	Biến thể 665	Biến thể 703	Biến thể 741	Biến thể 779	Biến thể 817
5,3±0,1	Biến thể 590	Biến thể 628	Biến thể 666	Biến thể 704	Biến thể 742	Biến thể 780	Biến thể 818

5,4±0,1	Biến thể 591	Biến thể 629	Biến thể 667	Biến thể 705	Biến thể 743	Biến thể 781	Biến thể 819
5,5±0,1	Biến thể 592	Biến thể 630	Biến thể 668	Biến thể 706	Biến thể 744	Biến thể 782	Biến thể 820
5,6±0,1	Biến thể 593	Biến thể 631	Biến thể 669	Biến thể 707	Biến thể 745	Biến thể 783	Biến thể 821
5,7±0,1	Biến thể 594	Biến thể 632	Biến thể 670	Biến thể 708	Biến thể 746	Biến thể 784	Biến thể 822
5,8±0,1	Biến thể 595	Biến thể 633	Biến thể 671	Biến thể 709	Biến thể 747	Biến thể 785	Biến thể 823
5,9±0,1	Biến thể 596	Biến thể 634	Biến thể 672	Biến thể 710	Biến thể 748	Biến thể 786	Biến thể 824
6,0±0,1	Biến thể 597	Biến thể 635	Biến thể 673	Biến thể 711	Biến thể 749	Biến thể 787	Biến thể 825
5	Biến thể 598	Biến thể 636	Biến thể 674	Biến thể 712	Biến thể 750	Biến thể 788	Biến thể 826
5,1	Biến thể 599	Biến thể 637	Biến thể 675	Biến thể 713	Biến thể 751	Biến thể 789	Biến thể 827
5,2	Biến thể 600	Biến thể 638	Biến thể 676	Biến thể 714	Biến thể 752	Biến thể 790	Biến thể 828
5,3	Biến thể 601	Biến thể 639	Biến thể 677	Biến thể 715	Biến thể 753	Biến thể 791	Biến thể 829

5,4	Biến thể 602	Biến thể 640	Biến thể 678	Biến thể 716	Biến thể 754	Biến thể 792	Biến thể 830
5,5	Biến thể 603	Biến thể 641	Biến thể 679	Biến thể 717	Biến thể 755	Biến thể 793	Biến thể 831
5,6	Biến thể 604	Biến thể 642	Biến thể 680	Biến thể 718	Biến thể 756	Biến thể 794	Biến thể 832
5,7	Biến thể 605	Biến thể 643	Biến thể 681	Biến thể 719	Biến thể 757	Biến thể 795	Biến thể 833
5,8	Biến thể 606	Biến thể 644	Biến thể 682	Biến thể 720	Biến thể 758	Biến thể 796	Biến thể 834
5,9	Biến thể 607	Biến thể 645	Biến thể 683	Biến thể 721	Biến thể 759	Biến thể 797	Biến thể 835
6	Biến thể 608	Biến thể 646	Biến thể 684	Biến thể 722	Biến thể 760	Biến thể 798	Biến thể 836

Bảng 4. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]								
Độ pH	24 đến 27	25 đến 27	20 đến 26	21 đến 26	22 đến 26	23 đến 26	24 đến 26	25 đến 26
5,0 đến 6,0	Biến thể 837	Biến thể 875	Biến thể 913	Biến thể 951	Biến thể 989	Biến thể 1027	Biến thể 1065	Biến thể 1103

5,1 đến 5,9	Biến thể 838	Biến thể 876	Biến thể 914	Biến thể 952	Biến thể 990	Biến thể 1028	Biến thể 1066	Biến thể 1104
5,2 đến 5,8	Biến thể 839	Biến thể 877	Biến thể 915	Biến thể 953	Biến thể 991	Biến thể 1029	Biến thể 1067	Biến thể 1105
5,3 đến 5,7	Biến thể 840	Biến thể 878	Biến thể 916	Biến thể 954	Biến thể 992	Biến thể 1030	Biến thể 1068	Biến thể 1106
5,4 đến 5,6	Biến thể 841	Biến thể 879	Biến thể 917	Biến thể 955	Biến thể 993	Biến thể 1031	Biến thể 1069	Biến thể 1107
5,0±0,2	Biến thể 842	Biến thể 880	Biến thể 918	Biến thể 956	Biến thể 994	Biến thể 1032	Biến thể 1070	Biến thể 1108
5,1±0,2	Biến thể 843	Biến thể 881	Biến thể 919	Biến thể 957	Biến thể 995	Biến thể 1033	Biến thể 1071	Biến thể 1109
5,2±0,2	Biến thể 844	Biến thể 882	Biến thể 920	Biến thể 958	Biến thể 996	Biến thể 1034	Biến thể 1072	Biến thể 1110
5,3±0,2	Biến thể 845	Biến thể 883	Biến thể 921	Biến thể 959	Biến thể 997	Biến thể 1035	Biến thể 1073	Biến thể 1111

5,4±0,2	Biến thể 846	Biến thể 884	Biến thể 922	Biến thể 960	Biến thể 998	Biến thể 1036	Biến thể 1074	Biến thể 1112
5,5±0,2	Biến thể 847	Biến thể 885	Biến thể 923	Biến thể 961	Biến thể 999	Biến thể 1037	Biến thể 1075	Biến thể 1113
5,6±0,2	Biến thể 848	Biến thể 886	Biến thể 924	Biến thể 962	Biến thể 1000	Biến thể 1038	Biến thể 1076	Biến thể 1114
5,7±0,2	Biến thể 849	Biến thể 887	Biến thể 925	Biến thể 963	Biến thể 1001	Biến thể 1039	Biến thể 1077	Biến thể 1115
5,8±0,2	Biến thể 850	Biến thể 888	Biến thể 926	Biến thể 964	Biến thể 1002	Biến thể 1040	Biến thể 1078	Biến thể 1116
5,9±0,2	Biến thể 851	Biến thể 889	Biến thể 927	Biến thể 965	Biến thể 1003	Biến thể 1041	Biến thể 1079	Biến thể 1117
6,0±0,2	Biến thể 852	Biến thể 890	Biến thể 928	Biến thể 966	Biến thể 1004	Biến thể 1042	Biến thể 1080	Biến thể 1118
5,0±0,1	Biến thể 853	Biến thể 891	Biến thể 929	Biến thể 967	Biến thể 1005	Biến thể 1043	Biến thể 1081	Biến thể 1119

5,1±0,1	Biến thể 854	Biến thể 892	Biến thể 930	Biến thể 968	Biến thể 1006	Biến thể 1044	Biến thể 1082	Biến thể 1120
5,2±0,1	Biến thể 855	Biến thể 893	Biến thể 931	Biến thể 969	Biến thể 1007	Biến thể 1045	Biến thể 1083	Biến thể 1121
5,3±0,1	Biến thể 856	Biến thể 894	Biến thể 932	Biến thể 970	Biến thể 1008	Biến thể 1046	Biến thể 1084	Biến thể 1122
5,4±0,1	Biến thể 857	Biến thể 895	Biến thể 933	Biến thể 971	Biến thể 1009	Biến thể 1047	Biến thể 1085	Biến thể 1123
5,5±0,1	Biến thể 858	Biến thể 896	Biến thể 934	Biến thể 972	Biến thể 1010	Biến thể 1048	Biến thể 1086	Biến thể 1124
5,6±0,1	Biến thể 859	Biến thể 897	Biến thể 935	Biến thể 973	Biến thể 1011	Biến thể 1049	Biến thể 1087	Biến thể 1125
5,7±0,1	Biến thể 860	Biến thể 898	Biến thể 936	Biến thể 974	Biến thể 1012	Biến thể 1050	Biến thể 1088	Biến thể 1126
5,8±0,1	Biến thể 861	Biến thể 899	Biến thể 937	Biến thể 975	Biến thể 1013	Biến thể 1051	Biến thể 1089	Biến thể 1127

5,9±0,1	Biến thể 862	Biến thể 900	Biến thể 938	Biến thể 976	Biến thể 1014	Biến thể 1052	Biến thể 1090	Biến thể 1128
6,0±0,1	Biến thể 863	Biến thể 901	Biến thể 939	Biến thể 977	Biến thể 1015	Biến thể 1053	Biến thể 1091	Biến thể 1129
5	Biến thể 864	Biến thể 902	Biến thể 940	Biến thể 978	Biến thể 1016	Biến thể 1054	Biến thể 1092	Biến thể 1130
5,1	Biến thể 865	Biến thể 903	Biến thể 941	Biến thể 979	Biến thể 1017	Biến thể 1055	Biến thể 1093	Biến thể 1131
5,2	Biến thể 866	Biến thể 904	Biến thể 942	Biến thể 980	Biến thể 1018	Biến thể 1056	Biến thể 1094	Biến thể 1132
5,3	Biến thể 867	Biến thể 905	Biến thể 943	Biến thể 981	Biến thể 1019	Biến thể 1057	Biến thể 1095	Biến thể 1133
5,4	Biến thể 868	Biến thể 906	Biến thể 944	Biến thể 982	Biến thể 1020	Biến thể 1058	Biến thể 1096	Biến thể 1134
5,5	Biến thể 869	Biến thể 907	Biến thể 945	Biến thể 983	Biến thể 1021	Biến thể 1059	Biến thể 1097	Biến thể 1135

5,6	Biến thể 870	Biến thể 908	Biến thể 946	Biến thể 984	Biến thể 1022	Biến thể 1060	Biến thể 1098	Biến thể 1136
5,7	Biến thể 871	Biến thể 909	Biến thể 947	Biến thể 985	Biến thể 1023	Biến thể 1061	Biến thể 1099	Biến thể 1137
5,8	Biến thể 872	Biến thể 910	Biến thể 948	Biến thể 986	Biến thể 1024	Biến thể 1062	Biến thể 1100	Biến thể 1138
5,9	Biến thể 873	Biến thể 911	Biến thể 949	Biến thể 987	Biến thể 1025	Biến thể 1063	Biến thể 1101	Biến thể 1139
6	Biến thể 874	Biến thể 912	Biến thể 950	Biến thể 988	Biến thể 1026	Biến thể 1064	Biến thể 1102	Biến thể 1140

Bảng 5. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]								
Độ pH	20 đến 25	21 đến 25	22 đến 25	23 đến 25	24 đến 25	20±1	21±1	22±1
5,0 đến 6,0	Biến thể 1141	Biến thể 1179	Biến thể 1217	Biến thể 1255	Biến thể 1293	Biến thể 1331	Biến thể 1369	Biến thể 1407

5,1 đến 5,9	Biến thể 1142	Biến thể 1180	Biến thể 1218	Biến thể 1256	Biến thể 1294	Biến thể 1332	Biến thể 1370	Biến thể 1408
5,2 đến 5,8	Biến thể 1143	Biến thể 1181	Biến thể 1219	Biến thể 1257	Biến thể 1295	Biến thể 1333	Biến thể 1371	Biến thể 1409
5,3 đến 5,7	Biến thể 1144	Biến thể 1182	Biến thể 1220	Biến thể 1258	Biến thể 1296	Biến thể 1334	Biến thể 1372	Biến thể 1410
5,4 đến 5,6	Biến thể 1145	Biến thể 1183	Biến thể 1221	Biến thể 1259	Biến thể 1297	Biến thể 1335	Biến thể 1373	Biến thể 1411
5,0±0,2	Biến thể 1146	Biến thể 1184	Biến thể 1222	Biến thể 1260	Biến thể 1298	Biến thể 1336	Biến thể 1374	Biến thể 1412
5,1±0,2	Biến thể 1147	Biến thể 1185	Biến thể 1223	Biến thể 1261	Biến thể 1299	Biến thể 1337	Biến thể 1375	Biến thể 1413
5,2±0,2	Biến thể 1148	Biến thể 1186	Biến thể 1224	Biến thể 1262	Biến thể 1300	Biến thể 1338	Biến thể 1376	Biến thể 1414
5,3±0,2	Biến thể 1149	Biến thể 1187	Biến thể 1225	Biến thể 1263	Biến thể 1301	Biến thể 1339	Biến thể 1377	Biến thể 1415

5,4±0,2	Biến thể 1150	Biến thể 1188	Biến thể 1226	Biến thể 1264	Biến thể 1302	Biến thể 1340	Biến thể 1378	Biến thể 1416
5,5±0,2	Biến thể 1151	Biến thể 1189	Biến thể 1227	Biến thể 1265	Biến thể 1303	Biến thể 1341	Biến thể 1379	Biến thể 1417
5,6±0,2	Biến thể 1152	Biến thể 1190	Biến thể 1228	Biến thể 1266	Biến thể 1304	Biến thể 1342	Biến thể 1380	Biến thể 1418
5,7±0,2	Biến thể 1153	Biến thể 1191	Biến thể 1229	Biến thể 1267	Biến thể 1305	Biến thể 1343	Biến thể 1381	Biến thể 1419
5,8±0,2	Biến thể 1154	Biến thể 1192	Biến thể 1230	Biến thể 1268	Biến thể 1306	Biến thể 1344	Biến thể 1382	Biến thể 1420
5,9±0,2	Biến thể 1155	Biến thể 1193	Biến thể 1231	Biến thể 1269	Biến thể 1307	Biến thể 1345	Biến thể 1383	Biến thể 1421
6,0±0,2	Biến thể 1156	Biến thể 1194	Biến thể 1232	Biến thể 1270	Biến thể 1308	Biến thể 1346	Biến thể 1384	Biến thể 1422
5,0±0,1	Biến thể 1157	Biến thể 1195	Biến thể 1233	Biến thể 1271	Biến thể 1309	Biến thể 1347	Biến thể 1385	Biến thể 1423

5,1±0,1	Biến thể 1158	Biến thể 1196	Biến thể 1234	Biến thể 1272	Biến thể 1310	Biến thể 1348	Biến thể 1386	Biến thể 1424
5,2±0,1	Biến thể 1159	Biến thể 1197	Biến thể 1235	Biến thể 1273	Biến thể 1311	Biến thể 1349	Biến thể 1387	Biến thể 1425
5,3±0,1	Biến thể 1160	Biến thể 1198	Biến thể 1236	Biến thể 1274	Biến thể 1312	Biến thể 1350	Biến thể 1388	Biến thể 1426
5,4±0,1	Biến thể 1161	Biến thể 1199	Biến thể 1237	Biến thể 1275	Biến thể 1313	Biến thể 1351	Biến thể 1389	Biến thể 1427
5,5±0,1	Biến thể 1162	Biến thể 1200	Biến thể 1238	Biến thể 1276	Biến thể 1314	Biến thể 1352	Biến thể 1390	Biến thể 1428
5,6±0,1	Biến thể 1163	Biến thể 1201	Biến thể 1239	Biến thể 1277	Biến thể 1315	Biến thể 1353	Biến thể 1391	Biến thể 1429
5,7±0,1	Biến thể 1164	Biến thể 1202	Biến thể 1240	Biến thể 1278	Biến thể 1316	Biến thể 1354	Biến thể 1392	Biến thể 1430
5,8±0,1	Biến thể 1165	Biến thể 1203	Biến thể 1241	Biến thể 1279	Biến thể 1317	Biến thể 1355	Biến thể 1393	Biến thể 1431

5,9±0,1	Biến thể 1166	Biến thể 1204	Biến thể 1242	Biến thể 1280	Biến thể 1318	Biến thể 1356	Biến thể 1394	Biến thể 1432
6,0±0,1	Biến thể 1167	Biến thể 1205	Biến thể 1243	Biến thể 1281	Biến thể 1319	Biến thể 1357	Biến thể 1395	Biến thể 1433
5	Biến thể 1168	Biến thể 1206	Biến thể 1244	Biến thể 1282	Biến thể 1320	Biến thể 1358	Biến thể 1396	Biến thể 1434
5,1	Biến thể 1169	Biến thể 1207	Biến thể 1245	Biến thể 1283	Biến thể 1321	Biến thể 1359	Biến thể 1397	Biến thể 1435
5,2	Biến thể 1170	Biến thể 1208	Biến thể 1246	Biến thể 1284	Biến thể 1322	Biến thể 1360	Biến thể 1398	Biến thể 1436
5,3	Biến thể 1171	Biến thể 1209	Biến thể 1247	Biến thể 1285	Biến thể 1323	Biến thể 1361	Biến thể 1399	Biến thể 1437
5,4	Biến thể 1172	Biến thể 1210	Biến thể 1248	Biến thể 1286	Biến thể 1324	Biến thể 1362	Biến thể 1400	Biến thể 1438
5,5	Biến thể 1173	Biến thể 1211	Biến thể 1249	Biến thể 1287	Biến thể 1325	Biến thể 1363	Biến thể 1401	Biến thể 1439

5,6	Biến thể 1174	Biến thể 1212	Biến thể 1250	Biến thể 1288	Biến thể 1326	Biến thể 1364	Biến thể 1402	Biến thể 1440
5,7	Biến thể 1175	Biến thể 1213	Biến thể 1251	Biến thể 1289	Biến thể 1327	Biến thể 1365	Biến thể 1403	Biến thể 1441
5,8	Biến thể 1176	Biến thể 1214	Biến thể 1252	Biến thể 1290	Biến thể 1328	Biến thể 1366	Biến thể 1404	Biến thể 1442
5,9	Biến thể 1177	Biến thể 1215	Biến thể 1253	Biến thể 1291	Biến thể 1329	Biến thể 1367	Biến thể 1405	Biến thể 1443
6	Biến thể 1178	Biến thể 1216	Biến thể 1254	Biến thể 1292	Biến thể 1330	Biến thể 1368	Biến thể 1406	Biến thể 1444

Bảng 6. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn
Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao của vốn Cohn

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]								
Độ pH	23±1	24±1	25±1	26±1	27±1	28±1	29±1	30±1
5,0 đến 6,0	Biến thể 1445	Biến thể 1483	Biến thể 1521	Biến thể 1559	Biến thể 1597	Biến thể 1635	Biến thể 1673	Biến thể 1711

5,1 đến 5,9	Biển thẻ 1446	Biển thẻ 1484	Biển thẻ 1522	Biển thẻ 1560	Biển thẻ 1598	Biển thẻ 1636	Biển thẻ 1674	Biển thẻ 1712
5,2 đến 5,8	Biển thẻ 1447	Biển thẻ 1485	Biển thẻ 1523	Biển thẻ 1561	Biển thẻ 1599	Biển thẻ 1637	Biển thẻ 1675	Biển thẻ 1713
5,3 đến 5,7	Biển thẻ 1448	Biển thẻ 1486	Biển thẻ 1524	Biển thẻ 1562	Biển thẻ 1600	Biển thẻ 1638	Biển thẻ 1676	Biển thẻ 1714
5,4 đến 5,6	Biển thẻ 1449	Biển thẻ 1487	Biển thẻ 1525	Biển thẻ 1563	Biển thẻ 1601	Biển thẻ 1639	Biển thẻ 1677	Biển thẻ 1715
5,0±0,2	Biển thẻ 1450	Biển thẻ 1488	Biển thẻ 1526	Biển thẻ 1564	Biển thẻ 1602	Biển thẻ 1640	Biển thẻ 1678	Biển thẻ 1716
5,1±0,2	Biển thẻ 1451	Biển thẻ 1489	Biển thẻ 1527	Biển thẻ 1565	Biển thẻ 1603	Biển thẻ 1641	Biển thẻ 1679	Biển thẻ 1717
5,2±0,2	Biển thẻ 1452	Biển thẻ 1490	Biển thẻ 1528	Biển thẻ 1566	Biển thẻ 1604	Biển thẻ 1642	Biển thẻ 1680	Biển thẻ 1718
5,3±0,2	Biển thẻ 1453	Biển thẻ 1491	Biển thẻ 1529	Biển thẻ 1567	Biển thẻ 1605	Biển thẻ 1643	Biển thẻ 1681	Biển thẻ 1719

5,4±0,2	Biển thẻ 1454	Biển thẻ 1492	Biển thẻ 1530	Biển thẻ 1568	Biển thẻ 1606	Biển thẻ 1644	Biển thẻ 1682	Biển thẻ 1720
5,5±0,2	Biển thẻ 1455	Biển thẻ 1493	Biển thẻ 1531	Biển thẻ 1569	Biển thẻ 1607	Biển thẻ 1645	Biển thẻ 1683	Biển thẻ 1721
5,6±0,2	Biển thẻ 1456	Biển thẻ 1494	Biển thẻ 1532	Biển thẻ 1570	Biển thẻ 1608	Biển thẻ 1646	Biển thẻ 1684	Biển thẻ 1722
5,7±0,2	Biển thẻ 1457	Biển thẻ 1495	Biển thẻ 1533	Biển thẻ 1571	Biển thẻ 1609	Biển thẻ 1647	Biển thẻ 1685	Biển thẻ 1723
5,8±0,2	Biển thẻ 1458	Biển thẻ 1496	Biển thẻ 1534	Biển thẻ 1572	Biển thẻ 1610	Biển thẻ 1648	Biển thẻ 1686	Biển thẻ 1724
5,9±0,2	Biển thẻ 1459	Biển thẻ 1497	Biển thẻ 1535	Biển thẻ 1573	Biển thẻ 1611	Biển thẻ 1649	Biển thẻ 1687	Biển thẻ 1725
6,0±0,2	Biển thẻ 1460	Biển thẻ 1498	Biển thẻ 1536	Biển thẻ 1574	Biển thẻ 1612	Biển thẻ 1650	Biển thẻ 1688	Biển thẻ 1726
5,0±0,1	Biển thẻ 1461	Biển thẻ 1499	Biển thẻ 1537	Biển thẻ 1575	Biển thẻ 1613	Biển thẻ 1651	Biển thẻ 1689	Biển thẻ 1727

5,1±0,1	Biển thể 1462	Biển thể 1500	Biển thể 1538	Biển thể 1576	Biển thể 1614	Biển thể 1652	Biển thể 1690	Biển thể 1728
5,2±0,1	Biển thể 1463	Biển thể 1501	Biển thể 1539	Biển thể 1577	Biển thể 1615	Biển thể 1653	Biển thể 1691	Biển thể 1729
5,3±0,1	Biển thể 1464	Biển thể 1502	Biển thể 1540	Biển thể 1578	Biển thể 1616	Biển thể 1654	Biển thể 1692	Biển thể 1730
5,4±0,1	Biển thể 1465	Biển thể 1503	Biển thể 1541	Biển thể 1579	Biển thể 1617	Biển thể 1655	Biển thể 1693	Biển thể 1731
5,5±0,1	Biển thể 1466	Biển thể 1504	Biển thể 1542	Biển thể 1580	Biển thể 1618	Biển thể 1656	Biển thể 1694	Biển thể 1732
5,6±0,1	Biển thể 1467	Biển thể 1505	Biển thể 1543	Biển thể 1581	Biển thể 1619	Biển thể 1657	Biển thể 1695	Biển thể 1733
5,7±0,1	Biển thể 1468	Biển thể 1506	Biển thể 1544	Biển thể 1582	Biển thể 1620	Biển thể 1658	Biển thể 1696	Biển thể 1734
5,8±0,1	Biển thể 1469	Biển thể 1507	Biển thể 1545	Biển thể 1583	Biển thể 1621	Biển thể 1659	Biển thể 1697	Biển thể 1735

5,9±0,1	Biển thể 1470	Biển thể 1508	Biển thể 1546	Biển thể 1584	Biển thể 1622	Biển thể 1660	Biển thể 1698	Biển thể 1736
6,0±0,1	Biển thể 1471	Biển thể 1509	Biển thể 1547	Biển thể 1585	Biển thể 1623	Biển thể 1661	Biển thể 1699	Biển thể 1737
5	Biển thể 1472	Biển thể 1510	Biển thể 1548	Biển thể 1586	Biển thể 1624	Biển thể 1662	Biển thể 1700	Biển thể 1738
5,1	Biển thể 1473	Biển thể 1511	Biển thể 1549	Biển thể 1587	Biển thể 1625	Biển thể 1663	Biển thể 1701	Biển thể 1739
5,2	Biển thể 1474	Biển thể 1512	Biển thể 1550	Biển thể 1588	Biển thể 1626	Biển thể 1664	Biển thể 1702	Biển thể 1740
5,3	Biển thể 1475	Biển thể 1513	Biển thể 1551	Biển thể 1589	Biển thể 1627	Biển thể 1665	Biển thể 1703	Biển thể 1741
5,4	Biển thể 1476	Biển thể 1514	Biển thể 1552	Biển thể 1590	Biển thể 1628	Biển thể 1666	Biển thể 1704	Biển thể 1742
5,5	Biển thể 1477	Biển thể 1515	Biển thể 1553	Biển thể 1591	Biển thể 1629	Biển thể 1667	Biển thể 1705	Biển thể 1743

5,6	Biến thể 1478	Biến thể 1516	Biến thể 1554	Biến thể 1592	Biến thể 1630	Biến thể 1668	Biến thể 1706	Biến thể 1744
5,7	Biến thể 1479	Biến thể 1517	Biến thể 1555	Biến thể 1593	Biến thể 1631	Biến thể 1669	Biến thể 1707	Biến thể 1745
5,8	Biến thể 1480	Biến thể 1518	Biến thể 1556	Biến thể 1594	Biến thể 1632	Biến thể 1670	Biến thể 1708	Biến thể 1746
5,9	Biến thể 1481	Biến thể 1519	Biến thể 1557	Biến thể 1595	Biến thể 1633	Biến thể 1671	Biến thể 1709	Biến thể 1747
6	Biến thể 1482	Biến thể 1520	Biến thể 1558	Biến thể 1596	Biến thể 1634	Biến thể 1672	Biến thể 1710	Biến thể 1748

Bảng 7. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn
Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]								
Độ pH	20	21	22	23	24	25	26	27
5,0 đến 6,0	Biến thể 1749	Biến thể 1787	Biến thể 1825	Biến thể 1863	Biến thể 1901	Biến thể 1939	Biến thể 1977	Biến thể 2015

5,1 đến 5,9	Biển thẻ 1750	Biển thẻ 1788	Biển thẻ 1826	Biển thẻ 1864	Biển thẻ 1902	Biển thẻ 1940	Biển thẻ 1978	Biển thẻ 2016
5,2 đến 5,8	Biển thẻ 1751	Biển thẻ 1789	Biển thẻ 1827	Biển thẻ 1865	Biển thẻ 1903	Biển thẻ 1941	Biển thẻ 1979	Biển thẻ 2017
5,3 đến 5,7	Biển thẻ 1752	Biển thẻ 1790	Biển thẻ 1828	Biển thẻ 1866	Biển thẻ 1904	Biển thẻ 1942	Biển thẻ 1980	Biển thẻ 2018
5,4 đến 5,6	Biển thẻ 1753	Biển thẻ 1791	Biển thẻ 1829	Biển thẻ 1867	Biển thẻ 1905	Biển thẻ 1943	Biển thẻ 1981	Biển thẻ 2019
5,0±0,2	Biển thẻ 1754	Biển thẻ 1792	Biển thẻ 1830	Biển thẻ 1868	Biển thẻ 1906	Biển thẻ 1944	Biển thẻ 1982	Biển thẻ 2020
5,1±0,2	Biển thẻ 1755	Biển thẻ 1793	Biển thẻ 1831	Biển thẻ 1869	Biển thẻ 1907	Biển thẻ 1945	Biển thẻ 1983	Biển thẻ 2021
5,2±0,2	Biển thẻ 1756	Biển thẻ 1794	Biển thẻ 1832	Biển thẻ 1870	Biển thẻ 1908	Biển thẻ 1946	Biển thẻ 1984	Biển thẻ 2022
5,3±0,2	Biển thẻ 1757	Biển thẻ 1795	Biển thẻ 1833	Biển thẻ 1871	Biển thẻ 1909	Biển thẻ 1947	Biển thẻ 1985	Biển thẻ 2023

5,4±0,2	Biển thẻ 1758	Biển thẻ 1796	Biển thẻ 1834	Biển thẻ 1872	Biển thẻ 1910	Biển thẻ 1948	Biển thẻ 1986	Biển thẻ 2024
5,5±0,2	Biển thẻ 1759	Biển thẻ 1797	Biển thẻ 1835	Biển thẻ 1873	Biển thẻ 1911	Biển thẻ 1949	Biển thẻ 1987	Biển thẻ 2025
5,6±0,2	Biển thẻ 1760	Biển thẻ 1798	Biển thẻ 1836	Biển thẻ 1874	Biển thẻ 1912	Biển thẻ 1950	Biển thẻ 1988	Biển thẻ 2026
5,7±0,2	Biển thẻ 1761	Biển thẻ 1799	Biển thẻ 1837	Biển thẻ 1875	Biển thẻ 1913	Biển thẻ 1951	Biển thẻ 1989	Biển thẻ 2027
5,8±0,2	Biển thẻ 1762	Biển thẻ 1800	Biển thẻ 1838	Biển thẻ 1876	Biển thẻ 1914	Biển thẻ 1952	Biển thẻ 1990	Biển thẻ 2028
5,9±0,2	Biển thẻ 1763	Biển thẻ 1801	Biển thẻ 1839	Biển thẻ 1877	Biển thẻ 1915	Biển thẻ 1953	Biển thẻ 1991	Biển thẻ 2029
6,0±0,2	Biển thẻ 1764	Biển thẻ 1802	Biển thẻ 1840	Biển thẻ 1878	Biển thẻ 1916	Biển thẻ 1954	Biển thẻ 1992	Biển thẻ 2030
5,0±0,1	Biển thẻ 1765	Biển thẻ 1803	Biển thẻ 1841	Biển thẻ 1879	Biển thẻ 1917	Biển thẻ 1955	Biển thẻ 1993	Biển thẻ 2031

5,1±0,1	Biển thẻ 1766	Biển thẻ 1804	Biển thẻ 1842	Biển thẻ 1880	Biển thẻ 1918	Biển thẻ 1956	Biển thẻ 1994	Biển thẻ 2032
5,2±0,1	Biển thẻ 1767	Biển thẻ 1805	Biển thẻ 1843	Biển thẻ 1881	Biển thẻ 1919	Biển thẻ 1957	Biển thẻ 1995	Biển thẻ 2033
5,3±0,1	Biển thẻ 1768	Biển thẻ 1806	Biển thẻ 1844	Biển thẻ 1882	Biển thẻ 1920	Biển thẻ 1958	Biển thẻ 1996	Biển thẻ 2034
5,4±0,1	Biển thẻ 1769	Biển thẻ 1807	Biển thẻ 1845	Biển thẻ 1883	Biển thẻ 1921	Biển thẻ 1959	Biển thẻ 1997	Biển thẻ 2035
5,5±0,1	Biển thẻ 1770	Biển thẻ 1808	Biển thẻ 1846	Biển thẻ 1884	Biển thẻ 1922	Biển thẻ 1960	Biển thẻ 1998	Biển thẻ 2036
5,6±0,1	Biển thẻ 1771	Biển thẻ 1809	Biển thẻ 1847	Biển thẻ 1885	Biển thẻ 1923	Biển thẻ 1961	Biển thẻ 1999	Biển thẻ 2037
5,7±0,1	Biển thẻ 1772	Biển thẻ 1810	Biển thẻ 1848	Biển thẻ 1886	Biển thẻ 1924	Biển thẻ 1962	Biển thẻ 2000	Biển thẻ 2038
5,8±0,1	Biển thẻ 1773	Biển thẻ 1811	Biển thẻ 1849	Biển thẻ 1887	Biển thẻ 1925	Biển thẻ 1963	Biển thẻ 2001	Biển thẻ 2039

5,9±0,1	Biển thẻ 1774	Biển thẻ 1812	Biển thẻ 1850	Biển thẻ 1888	Biển thẻ 1926	Biển thẻ 1964	Biển thẻ 2002	Biển thẻ 2040
6,0±0,1	Biển thẻ 1775	Biển thẻ 1813	Biển thẻ 1851	Biển thẻ 1889	Biển thẻ 1927	Biển thẻ 1965	Biển thẻ 2003	Biển thẻ 2041
5	Biển thẻ 1776	Biển thẻ 1814	Biển thẻ 1852	Biển thẻ 1890	Biển thẻ 1928	Biển thẻ 1966	Biển thẻ 2004	Biển thẻ 2042
5,1	Biển thẻ 1777	Biển thẻ 1815	Biển thẻ 1853	Biển thẻ 1891	Biển thẻ 1929	Biển thẻ 1967	Biển thẻ 2005	Biển thẻ 2043
5,2	Biển thẻ 1778	Biển thẻ 1816	Biển thẻ 1854	Biển thẻ 1892	Biển thẻ 1930	Biển thẻ 1968	Biển thẻ 2006	Biển thẻ 2044
5,3	Biển thẻ 1779	Biển thẻ 1817	Biển thẻ 1855	Biển thẻ 1893	Biển thẻ 1931	Biển thẻ 1969	Biển thẻ 2007	Biển thẻ 2045
5,4	Biển thẻ 1780	Biển thẻ 1818	Biển thẻ 1856	Biển thẻ 1894	Biển thẻ 1932	Biển thẻ 1970	Biển thẻ 2008	Biển thẻ 2046
5,5	Biển thẻ 1781	Biển thẻ 1819	Biển thẻ 1857	Biển thẻ 1895	Biển thẻ 1933	Biển thẻ 1971	Biển thẻ 2009	Biển thẻ 2047

5,6	Biến thể 1782	Biến thể 1820	Biến thể 1858	Biến thể 1896	Biến thể 1934	Biến thể 1972	Biến thể 2010	Biến thể 2048
5,7	Biến thể 1783	Biến thể 1821	Biến thể 1859	Biến thể 1897	Biến thể 1935	Biến thể 1973	Biến thể 2011	Biến thể 2049
5,8	Biến thể 1784	Biến thể 1822	Biến thể 1860	Biến thể 1898	Biến thể 1936	Biến thể 1974	Biến thể 2012	Biến thể 2050
5,9	Biến thể 1785	Biến thể 1823	Biến thể 1861	Biến thể 1899	Biến thể 1937	Biến thể 1975	Biến thể 2013	Biến thể 2051
6	Biến thể 1786	Biến thể 1824	Biến thể 1862	Biến thể 1900	Biến thể 1938	Biến thể 1976	Biến thể 2014	Biến thể 2052

Bảng 8. Kết hợp độ pH và nồng độ etanol cuối hữu ích đối với việc làm kết tủa vốn
Cohn ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Nồng độ etanol cuối [% (thể tích)]			
Độ pH	28	29	30
5,0 đến 6,0	Biến thể 2053	Biến thể 2091	Biến thể 2129
5,1 đến 5,9	Biến thể 2054	Biến thể 2092	Biến thể 2130
5,2 đến 5,8	Biến thể 2055	Biến thể 2093	Biến thể 2131

5,3 đến 5,7	Biển thể 2056	Biển thể 2094	Biển thể 2132
5,4 đến 5,6	Biển thể 2057	Biển thể 2095	Biển thể 2133
5,0±0,2	Biển thể 2058	Biển thể 2096	Biển thể 2134
5,1±0,2	Biển thể 2059	Biển thể 2097	Biển thể 2135
5,2±0,2	Biển thể 2060	Biển thể 2098	Biển thể 2136
5,3±0,2	Biển thể 2061	Biển thể 2099	Biển thể 2137
5,4±0,2	Biển thể 2062	Biển thể 2100	Biển thể 2138
5,5±0,2	Biển thể 2063	Biển thể 2101	Biển thể 2139
5,6±0,2	Biển thể 2064	Biển thể 2102	Biển thể 2140
5,7±0,2	Biển thể 2065	Biển thể 2103	Biển thể 2141
5,8±0,2	Biển thể 2066	Biển thể 2104	Biển thể 2142
5,9±0,2	Biển thể 2067	Biển thể 2105	Biển thể 2143
6,0±0,2	Biển thể 2068	Biển thể 2106	Biển thể 2144
5,0±0,1	Biển thể 2069	Biển thể 2107	Biển thể 2145
5,1±0,1	Biển thể 2070	Biển thể 2108	Biển thể 2146
5,2±0,1	Biển thể 2071	Biển thể 2109	Biển thể 2147
5,3±0,1	Biển thể 2072	Biển thể 2110	Biển thể 2148
5,4±0,1	Biển thể 2073	Biển thể 2111	Biển thể 2149
5,5±0,1	Biển thể 2074	Biển thể 2112	Biển thể 2150

5,6±0,1	Biến thể 2075	Biến thể 2113	Biến thể 2151
5,7±0,1	Biến thể 2076	Biến thể 2114	Biến thể 2152
5,8±0,1	Biến thể 2077	Biến thể 2115	Biến thể 2153
5,9±0,1	Biến thể 2078	Biến thể 2116	Biến thể 2154
6,0±0,1	Biến thể 2079	Biến thể 2117	Biến thể 2155
5	Biến thể 2080	Biến thể 2118	Biến thể 2156
5,1	Biến thể 2081	Biến thể 2119	Biến thể 2157
5,2	Biến thể 2082	Biến thể 2120	Biến thể 2158
5,3	Biến thể 2083	Biến thể 2121	Biến thể 2159
5,4	Biến thể 2084	Biến thể 2122	Biến thể 2160
5,5	Biến thể 2085	Biến thể 2123	Biến thể 2161
5,6	Biến thể 2086	Biến thể 2124	Biến thể 2162
5,7	Biến thể 2087	Biến thể 2125	Biến thể 2163
5,8	Biến thể 2088	Biến thể 2126	Biến thể 2164
5,9	Biến thể 2089	Biến thể 2127	Biến thể 2165
6	Biến thể 2090	Biến thể 2128	Biến thể 2166

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn protein trong máu trong mẫu huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa globulin miễn dịch và A1PI ở bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để

tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; trong đó dịch nổi thứ nhất chứa ít nhất 75% lượng albumin của vốn Cohn. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích).

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 90% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 95% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 99% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc nhiều hơn hàm lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án cụ thể hơn, hàm lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu dùng để chỉ hàm lượng IgG, IgA, và IgM của vốn Cohn ban đầu. Theo một phương án đặc biệt, hàm lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu dùng để chỉ hàm lượng IgG của vốn Cohn ban đầu.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 80% lượng alpha-1-kháng trypsin (A1PI) của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 90% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 95% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu hoặc nhiều hơn được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 70% lượng yếu tố H của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 80% lượng yếu tố H của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 90% lượng yếu tố H của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 95% lượng yếu tố H của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng

kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% lượng yếu tố H của vốn Cohn ban đầu hoặc nhiều hơn được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 70% lượng chất ức chế inter-alpha (IaIp) của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 80% lượng IaIp của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 90% lượng IaIp của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 95% lượng IaIp của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% lượng IaIp của vốn Cohn ban đầu hoặc nhiều hơn được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn protein của máu trong vốn Cohn, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa các globulin miễn dịch, A1PI, yếu tố H, và IaIp trong bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; trong đó kết tủa thứ nhất chứa i.) ít nhất 95%, tốt hơn nếu ít nhất 97%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 99% lượng IgG của vốn Cohn ban đầu, ii.) ít nhất 90%, tốt hơn nếu chứa ít nhất 95%, tốt nhất là chứa ít nhất 97% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu, iii.) ít nhất 80%, tốt hơn nếu chứa ít nhất 90%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 95% lượng yếu tố H của vốn Cohn ban đầu, và iv.) ít nhất 80%, tốt hơn nếu ít nhất 90%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 95% lượng IaIp của vốn Cohn ban đầu, và tiếp theo trong đó dịch nổi thứ nhất chứa ít nhất 70%, tốt hơn nếu chứa ít nhất 80%, tốt hơn nữa là chứa ít nhất 90% lượng albumin của vốn Cohn. Theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện bằng cách phối trộn ethanol với vốn huyết tương ban đầu (vốn Cohn) để thu được nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 22% đến 28% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng

từ 5,0 đến 6,0. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng 5,5. Theo các phương án khác, nồng độ etanol cuối và giá trị pH của bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7 và Bảng 8.

Điều chế chế phẩm globulin miễn dịch

Nói chung, các chế phẩm globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được điều chế từ nguyên liệu huyết tương ban đầu thích hợp bất kỳ, ví dụ, huyết tương đã thu hồi hoặc huyết tương nguồn. Trong ví dụ cụ thể, máu hoặc huyết tương được thu gom từ thể cho khỏe mạnh. Thông thường, máu được thu gom từ nhiều loài động vật tương tự như đối tượng được dùng chế phẩm globulin miễn dịch (thường được gọi là các globulin miễn dịch “tương đồng”). Huyết tương đã thu hồi hoặc huyết tương nguồn có thể hoặc không thể được làm kết tủa lạnh để tạo ra huyết tương đã tách tủa lạnh. Hơn nữa, huyết tương hoặc huyết tương đã tách tủa lạnh cũng có thể được xử lý để loại bỏ một hoặc nhiều yếu tố máu bằng cách hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, hoặc phương pháp sắc ký khác. Các globulin miễn dịch tiếp đó được làm kết tủa ra khỏi huyết tương hoặc huyết tương đã tách tủa lạnh nguyên liệu ban đầu, được gọi là “vốn Cohn,” trong điều kiện độ pH thấp, nồng độ rượu cao để tạo ra chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Các globulin miễn dịch có thể được làm giàu tiếp từ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 theo quy trình thích hợp, ví dụ, làm kết tủa (phân đoạn bằng rượu hoặc phân đoạn bằng polyetylen glycol), phương pháp sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, sắc ký ái

lực miễn dịch, v.v.), lọc (Siêu lọc/lọc thẩm tách, lọc nano), siêu ly tâm, điều chế bằng xung điện, và các quy trình tương tự. (xem, ví dụ, Cohn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Oncley *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Barundern *et al.*, *Vox Sang.* 7:157-74 (1962); Koblet *et al.*, *Vox Sang.* 13:93-102 (1967); các patent Mỹ số 5,122,373 và 5,177,194; PCT/US2010/036470; và PCT/US2011/038247; nội dung của chúng được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích).

Xử lý ngược

Trong số các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân đoạn protein có mặt trong huyết tương đã gộp lại bằng cách thực hiện bước làm kết tủa ban đầu mà làm kết tủa phần lớn globulin miễn dịch và hàm lượng alpha-1-kháng trypsin của huyết tương ban đầu. Để làm tăng tiếp độ tinh khiết của các protein huyết tương riêng rẽ (ví dụ, IgG, A1PI, yếu tố H, IaIp, v.v.) thấy trong chất kết tủa và dịch nổi của bước làm kết tủa ban đầu, các chế phẩm này có thể được làm giàu tiếp bằng cách phân đoạn (ví dụ, bằng cách làm kết tủa bằng rượu, làm kết tủa bằng PEG, làm kết tủa bằng muối, v.v.), sắc ký, lọc, hoặc phương pháp khác. Mặc dù việc áp dụng các kỹ thuật khác nhau này để làm giàu protein có nguồn gốc từ huyết tương có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ, theo phương án cụ thể, chất kết tủa và/hoặc dịch nổi thứ nhất được phân đoạn thứ nhất (ví dụ, bằng cách làm kết tủa bằng etanol) và tiếp đó làm giàu bằng cách áp dụng kỹ thuật sắc ký và/hoặc lọc. Theo sáng chế, phản ứng kết tủa ban đầu và phân đoạn tiếp theo được gọi kết hợp là các bước “xử lý ngược”, trong khi đó các bước sắc ký và lọc được gọi kết hợp là các bước “xử lý thuận”.

Làm kết tủa globulin miễn dịch khối

Theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra phương pháp phân đoạn cải thiện huyết tương của người để tinh chế protein có hoạt tính điều trị hữu ích trong máu như các globulin miễn dịch, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), yếu tố H, protein ức chế inter-alpha (IaIp), albumin, fibrinogen, v.v.. Phương pháp này hợp nhất bước tinh chế ban đầu trong đó phần lớn globulin miễn dịch, A1PI, yếu tố H, IaIp, và fibrinogen của vốn Cohn ban đầu (tức là, máu, huyết tương, và/hoặc huyết tương chưa được xử lý) được làm kết tủa và phần lớn hàm lượng albumin của vốn Cohn ban đầu vẫn giữ được trong dịch nổi. Theo cách có lợi, các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp tách riêng các globulin miễn dịch ra

khỏi A1PI, yếu tố H, và IaIp bằng cách chiết các globulin miễn dịch, chứ không phải các protein khác, ra khỏi chất kết tủa ban đầu. Cụ thể, các tác giả sáng chế nhận thấy rằng việc xử lý hỗn dịch chứa chất kết tủa ban đầu bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2) sẽ cải thiện được khả năng lưu giữ A1PI, yếu tố H, và IaIp trong phân đoạn không hòa tan. Không nhằm bị ràng buộc bởi lý thuyết, các tác giả sáng chế tin rằng trong các điều kiện nhất định, A1PI, yếu tố H, và IaIp, mà có thể ban đầu được chiết từ chất kết tủa, gắn kết với silic đioxit đã được nghiền mịn, tiếp theo được loại bỏ cùng với phần không hòa tan của hỗn dịch. Việc tách riêng dịch nổi thu được (tức là, phân đoạn hòa tan của hỗn dịch) tạo dung dịch đã được làm giàu chứa phần lớn thành phần globulin miễn dịch của phân đoạn Cohn ban đầu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu từ vốn Cohn, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; và thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Nói chung, các phương pháp làm kết tủa bất kỳ để làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kết tủa bằng rượu (ví dụ, sử dụng etanol hoặc metanol), kết tủa bằng cách sử dụng polyme hòa tan trong nước (ví dụ, PEG hoặc dextran), và kết tủa bằng muối (ví dụ, sử dụng amoni phosphat, amoni sulfat, natri xitrat, v.v.). Theo một phương án ưu tiên, bước làm kết tủa là làm kết tủa bằng rượu, tốt hơn là làm kết tủa bằng etanol. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện bằng cách phối trộn etanol với vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự

theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng 5,5. Theo các phương án khác, nồng độ etanol cuối và độ pH của bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7 và Bảng 8. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Phương pháp theo sáng chế tạo ra hiệu suất thu hồi globulin miễn dịch trong thành phẩm đã được làm giàu cao hơn đáng kể do làm kết tủa phần lớn lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu trong phản ứng kết tủa ban đầu, so với các quy trình tinh chế đã biết mà dựa vào các bước làm kết tủa ở nồng độ rượu thấp ban đầu (tức là, kết tủa phân đoạn I).

Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 90% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 95% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 99% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu hoặc nhiều hơn được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án đặc biệt, hàm lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu là lượng IgG của vốn Cohn ban đầu.

Như được thể hiện trong các ví dụ trong bản mô tả, việc áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (tức là, kết tủa phân đoạn I-IV-1) làm kết tủa ít nhất 99% lượng IgG của vốn Cohn ban đầu. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa thành phần IgG với lượng nằm trong khoảng từ 99% đến 100% IgG ra khỏi vốn Cohn trong bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn

đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi IgG từ chất kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH dùng ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7 và Bảng 8. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích).

Như được chứng minh bằng dữ liệu thể hiện trong Bảng 15 và Bảng 31, lớn hơn 97% thành phần alpha-1-kháng trypsin (A1PI) của vốn Cohn cũng được làm kết tủa bằng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% thành phần IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; và thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% thành phần IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Hơn nữa, nhận thấy rằng thành phần albumin lớn hơn 90% của vốn Cohn không được làm kết tủa bằng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (Bảng 33),

và từ đó có thể được thu hồi từ dịch nổi. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; và thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, trong đó từ 80% đến 100% albumin vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Chiết và tách riêng các globulin miễn dịch

So với chất kết tủa phân đoạn Cohn II+III hoặc chất kết tủa Kistler-Nitschmann A, chất kết tủa ban đầu thu được theo phương pháp theo sáng chế chứa protein không phải globulin miễn dịch ở nồng độ cao, kể cả A1PI và fibrinogen. Ví dụ, như được thể hiện trong Bảng 30, gần như 100% fibrinogen của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa đồng thời với các globulin miễn dịch trong phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao. Điều này là đối lập với sơ đồ tinh chế Cohn-Oncley và Kistler-Nitschmann, trong đó khối fibrinogen được loại bỏ ở bước làm kết tủa ban đầu ở nồng độ rượu thấp (kết tủa phân đoạn I). Tương tự như được thể hiện trong Bảng 15 và Bảng 31, alpha-1-kháng trypsin (A1PI) với hàm lượng lớn hơn 97% của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa đồng thời với các globulin miễn dịch trong phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao. Trái

lại, khối A1PI không được làm kết tủa đồng thời với các globulin miễn dịch trong sơ đồ tinh chế Cohn-Oncley và Kistler-Nitschmann. Mặt khác, A1PI được tìm thấy trong dịch nổi phân đoạn II+III hoặc Dịch nổi A.

Do đó, để tạo ra được phẩm chứa globulin miễn dịch, các chất tạp nhiễm như A1PI và fibrinogen có mặt trong chất kết tủa ban đầu cần được loại ra khỏi chế phẩm globulin miễn dịch. Điều này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách phân đoạn tiếp kết tủa thứ nhất (ví dụ, bằng cách làm kết tủa biệt hóa bằng cách sử dụng rượu, polyme ưa nước không ion, hoặc bổ sung muối), phương pháp sắc ký, hoặc phương pháp lọc.

Theo một phương án, kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch trong nước dùng để tiêm (water for injection - WFI) hoặc dung dịch đệm có cường độ ion thấp thích hợp để chiết các globulin miễn dịch ra khỏi chất kết tủa. Theo một số phương án, sau đó hỗn dịch được xử lý bằng silic đioxit (SiO_2) đã được nghiền mịn, và phân hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch được tách ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch chứa khối A1PI và fibrinogen.

Các dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa thứ nhất thường có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 và 5,5. Theo một số phương án, dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 và 5,0, theo các phương án khác, dung dịch chiết có độ pH bằng khoảng 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, hoặc 5,5. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,7 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,8 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,9 \pm 0,1$. Nói chung, các yêu cầu về độ pH này có thể được đáp ứng bằng cách sử dụng dung dịch đệm được chọn từ, ví dụ, axetat, xitrat, monobazơ phosphat, dibazơ phosphat, hỗn hợp của chúng, và các chất tương tự. Nồng độ dung dịch đệm thích hợp thường nằm trong khoảng từ 5mM đến 100mM, hoặc nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM, hoặc bằng 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM, hoặc 100mM.

Tốt hơn, nếu dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2,0mS/cm. Ví dụ, theo một số phương án, độ dẫn điện của dung dịch đệm chiết bằng

0,5±0,1mS/cm, hoặc 0,6±0,1mS/cm, 0,7±0,1mS/cm, 0,8±0,1mS/cm, 0,9±0,1mS/cm, 1,0±0,1mS/cm, 1,1±0,1mS/cm, 1,2±0,1mS/cm, 1,3±0,1mS/cm, 1,4±0,1mS/cm, 1,5±0,1mS/cm, 1,6±0,1mS/cm, 1,7±0,1mS/cm, 1,8±0,1mS/cm, 1,9±0,1mS/cm, hoặc 2,0±0,1mS/cm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách tạo ra dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện thích hợp. Theo một phương án cụ thể, dung dịch đệm chiết chứa 5mM monobazơ natri phosphat và 5mM axetat ở độ pH bằng $4,8 \pm 0,2$ và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm đến 0,9mS/cm.

Theo một phương án, silic đioxit đã được nghiền mịn được phối trộn với hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 trước khi lọc. Theo một phương án, bước xử lý trước này bao gồm việc bổ sung các hạt silic đioxit nghiền mịn (ví dụ, silic đioxit sinh nhiệt; Aerosil®) tiếp theo là giai đoạn ủ trong thời gian từ 40 đến 80 phút trong quá trình hỗn dịch được trộn liên tục. Theo một số phương án, giai đoạn ủ nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút, hoặc bằng khoảng 30 phút, 35 phút, 40 phút, 45 phút, 50 phút, 55 phút, 60 phút, 65 phút, 70 phút, 75 phút, 80 phút, 85 phút, 90 phút, hoặc lâu hơn. Nói chung, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C, hoặc nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện ở nhiệt độ bằng khoảng 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, hoặc 10°C. Theo phương án cụ thể, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 10°C. Theo một phương án ưu tiên, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 10°C.

Theo một phương án, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 và 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo phương án khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 và 80g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một số phương án, silic đioxit sinh nhiệt có thể được bổ sung vào ở nồng độ bằng khoảng 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc bằng khoảng 25g/kg, 30g/kg, 35g/kg, 40g/kg, 45g/kg, 50g/kg, 55g/kg, 60g/kg, 65g/kg, 70g/kg, 75g/kg, 80g/kg, 85g/kg, 90g/kg, 95g/kg, hoặc 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một phương án đặc biệt, silic đioxit sinh nhiệt (ví dụ, Aerosil 380 hoặc dạng tương đương) được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ cuối 40 ± 20 g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo phương án cụ thể

khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ cuối $40 \pm 10 \text{g/kg}$ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Tiến hành tại chỗ phối trộn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian kéo dài ít nhất từ 50 phút đến 70 phút.

Theo một số phương án, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm globulin miễn dịch ở nồng độ nằm trong khoảng từ $0,01 \text{g/g}$ protein toàn phần đến 10g/g protein toàn phần. Theo phương án khác, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm globulin miễn dịch ở nồng độ nằm trong khoảng từ $0,01 \text{g/g}$ protein toàn phần đến 5g/g protein toàn phần. Theo phương án khác, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm globulin miễn dịch ở nồng độ nằm trong khoảng từ $0,02 \text{g/g}$ protein toàn phần đến 4g/g protein toàn phần. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào ở nồng độ cuối ít nhất $0,1 \text{g}$ trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất $0,2 \text{g}$ trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất $0,25 \text{g}$ trong mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 1g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 2g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất $2,5 \text{g}$ trong mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác nữa, silic đioxit đã được nghiền mịn được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất $0,01 \text{g/g}$ protein toàn phần hoặc ít nhất $0,02 \text{g}$, $0,03 \text{g}$, $0,04 \text{g}$, $0,05 \text{g}$, $0,06 \text{g}$, $0,07 \text{g}$, $0,08 \text{g}$, $0,09 \text{g}$, $0,1 \text{g}$, $0,2 \text{g}$, $0,3 \text{g}$, $0,4 \text{g}$, $0,5 \text{g}$, $0,6 \text{g}$, $0,7 \text{g}$, $0,8 \text{g}$, $0,9 \text{g}$, $1,0 \text{g}$, $1,5 \text{g}$, $2,0 \text{g}$, $2,5 \text{g}$, $3,0 \text{g}$, $3,5 \text{g}$, $4,0 \text{g}$, $4,5 \text{g}$, $5,0 \text{g}$, $5,5 \text{g}$, $6,0 \text{g}$, $6,5 \text{g}$, $7,0 \text{g}$, $7,5 \text{g}$, $8,0 \text{g}$, $8,5 \text{g}$, $9,0 \text{g}$, $9,5 \text{g}$, $10,0 \text{g}$, hoặc nhiều hơn trong mỗi gam protein toàn phần.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan

của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Hơn nữa, nhận thấy rằng lớn hơn 90% lượng albumin của vốn Cohn không được làm kết tủa bằng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (Bảng 33), và từ đó có thể thu hồi được từ dịch nổi. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, và còn chứa albumin với hàm lượng nằm trong khoảng từ 80% đến 100% của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG có mặt trong phần hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được

làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Phân đoạn

Theo một phương án, các globulin miễn dịch thu hồi từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất (hỗn dịch nhão I-IV-1) được làm giàu tiếp bằng cách phân đoạn. Nói chung, phương pháp phân đoạn bất kỳ (ví dụ, làm kết tủa bằng rượu hoặc polyme, làm kết tủa bằng muối, v.v.) có thể được áp dụng. Theo một phương án ưu tiên, các globulin miễn dịch được làm giàu tiếp bằng cách phân đoạn phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất bằng cách làm kết tủa bằng etanol. Theo một phương án, các globulin miễn dịch được làm giàu bằng cách bổ sung etanol vào phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối và độ pH thích hợp để làm kết tủa các globulin miễn dịch, đồng thời ít nhất một chất tạp nhiễm không được làm kết tủa. Theo phương án khác, các globulin miễn dịch được làm giàu bằng cách bổ sung etanol vào phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối và độ pH thích hợp để làm kết tủa ít nhất một chất tạp nhiễm, đồng thời các globulin miễn dịch không được làm kết tủa.

Quá trình phân đoạn bổ sung nguyên liệu đã thu hồi từ bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao là tùy ý. Theo một số phương án, chế phẩm globulin miễn dịch thu hồi từ bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao có thể được làm giàu tiếp bằng cách sử dụng một hoặc nhiều bước xử lý thuận khác nhau đã nêu trong bản mô tả. Theo các phương án khác, chế phẩm thu hồi từ bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao có thể được xử lý tiếp thông qua việc sử dụng một hoặc nhiều bước

làm kết tủa bổ sung. Theo một số phương án, bước làm kết tủa globulin miễn dịch bổ sung có thể được áp dụng để cô đặc chế phẩm globulin miễn dịch, điều chế globulin miễn dịch để bảo quản, và/hoặc điều chế chế phẩm globulin miễn dịch để vận chuyển.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu từ vốn Cohn, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ chất kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, IgG đã thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI đã được loại ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án minh họa, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện bằng cách phối trộn etanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ hai (ví dụ, dịch lọc hoặc dịch nổi của hỗn dịch tạo ra sau khi lọc hoặc ly tâm) ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 22% đến 28% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 và 7,5. Theo một phương án, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự theo một phương án, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH

bằng $7,0 \pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng 7,0. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện bằng cách sử dụng nồng độ etanol cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$.

Theo một phương án ưu tiên, hỗn dịch thứ nhất hoặc phân đoạn hòa tan của chúng, được xử lý bằng chất làm sạch trước khi tiến hành bước làm kết tủa thứ hai. Theo một phương án, hỗn dịch thứ nhất hoặc phân đoạn hòa tan của chúng còn được xử lý tiếp bằng xitrat trước khi tiến hành bước làm kết tủa thứ hai. Theo phương án cụ thể, polysorbat-80 được bổ sung vào hỗn dịch thứ nhất hoặc phân đoạn hòa tan của chúng và chế phẩm được ủ trong ít nhất 30 phút. Theo phương án cụ thể khác, natri xitrat dihydrat được bổ sung tiếp vào hỗn dịch thứ nhất hoặc phân đoạn hòa tan của chúng và chế phẩm được ủ trong thêm ít nhất 30 phút. Theo một phương án, polysorbat-80 được bổ sung vào ở nồng độ cuối bằng khoảng 0,2% (khối lượng/thể tích). Theo một phương án, natri xitrat dihydrat tiếp đó được trộn vào dung dịch ở nồng độ cuối bằng khoảng 8g/l. Theo phương án cụ thể, quy trình ủ được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C đồng thời khuấy liên tục.

Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG ra khỏi vốn Cohn huyết tương trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ chất kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG đã thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án cụ thể, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG ra khỏi vốn Cohn huyết tương trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối bằng khoảng $25\pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0\pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng

6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án cụ thể, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phần đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn ethanol với hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án khác, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các

globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi được từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, albumin có mặt trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án ưu tiên, từ 90% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án khác, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25\pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0\pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, albumin có mặt trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê

trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án ưu tiên, từ 90% và 100% lượng albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến

100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn ethanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai chứa ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch,

trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG có mặt trong phần hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ

phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn ethanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG có mặt trong phần hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án, các globulin miễn dịch được thu hồi từ kết tủa thứ hai bằng cách tạo hỗn dịch chất kết tủa với dung dịch đệm chiết lạnh. Ví dụ, chất kết tủa thứ hai được tạo hỗn dịch với tỷ lệ: 1 phần kết tủa với 2 đến 15 phần nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án ưu tiên, kết tủa thứ hai được tạo hỗn dịch với tỷ lệ: 1 phần kết tủa với 4 đến 5 phần, tốt hơn là 3,5 phần, WFI. Theo một phương án, bước tạo hỗn dịch được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 8°C . Theo một phương án, độ pH cuối của dung dịch được điều chỉnh đến khoảng từ 4,5 đến 5,6, tốt hơn là đến $5,2 \pm 0,2$. Theo một phương án, việc điều chỉnh độ pH này được thực hiện bằng axit axetic. Theo một phương án, độ dẫn điện của hỗn dịch được tăng lên tới

khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm để làm tăng khả năng hoà tan của các globulin miễn dịch. Theo một phương án, độ dẫn điện được tăng lên bằng cách bổ sung natri clorua vào.

Các dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa thứ hai bao gồm WFI và dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp tức là có độ dẫn điện thấp hơn 10mS/cm. Theo các phương án khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp nhỏ hơn khoảng 9mS/cm, 8mS/cm, 7mS/cm, 6mS/cm, 5mS/cm, 4mS/cm, 3mS/cm, 2mS/cm, hoặc 1mS/cm. Theo một phương án ưu tiên, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp hơn 6mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp hơn 4mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp hơn 2mS/cm.

Theo một phương án, phân hòa tan của hỗn dịch, chứa các globulin miễn dịch, được tách ra khỏi phần không hòa tan. Theo một phương án, quy trình này được thực hiện bằng cách lọc hỗn dịch bằng thiết bị lọc sâu có kích thước lỗ xốp không đáng kể nằm trong khoảng từ 0,1µm đến 0,4µm. Theo một phương án, kích thước lỗ xốp không đáng kể của thiết bị lọc sâu bằng 0,2µm (ví dụ, máy lọc Cuno VR06 hoặc thiết bị tương đương). Theo một phương án, thiết bị lọc được rửa bằng WFI hoặc dung dịch đệm thích hợp sau khi lọc để thu hồi globulin miễn dịch bổ sung và nước sau khi rửa được bổ sung vào dịch lọc. Theo một phương án ưu tiên, bước sau rửa thiết bị lọc được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm. Theo phương án khác, hỗn dịch thứ hai được ly tâm để thu hồi phần hòa tan.

Xử lý thuận

Các phân đoạn globulin miễn dịch thu được sau khi phân đoạn bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu mà làm kết tủa các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI), chứ không làm kết tủa albumin, có thể được làm giàu tiếp theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), sắc ký hydroxyapatit (HAP), sắc ký ái lực Protein A, sắc ký ái lực miễn dịch, sắc ký ngoại cỡ, v.v.); lọc (ví dụ, siêu lọc và/hoặc lọc thẩm tách); và một hoặc nhiều bước khử virus (ví dụ, lọc nano, xử lý dung môi và làm sạch, chiếu tia UV, xử lý nhiệt, ủ ở độ pH thấp, v.v.).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu từ vốn Cohn bao gồm bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao và ít nhất một bước xử lý thuận (ví dụ, sắc ký). Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước làm kết tủa thứ hai trước ít nhất một bước xử lý thuận (ví dụ, bước làm kết tủa PptG). Quá trình làm kết tủa thứ hai là tùy ý, do hỗn dịch của quá trình làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao có thể được sử dụng trực tiếp để tinh chế xuôi dòng.

Theo một phương án, các globulin miễn dịch có mặt trong chế phẩm có nguồn gốc từ huyết tương đã điều chế bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao được làm giàu tiếp bằng cách thực hiện ít nhất một bước sắc ký. Theo một phương án, bước sắc ký được chọn từ sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), sắc ký hydroxyapatit (HAP), sắc ký ái lực protein, sắc ký ái lực miễn dịch, và sắc ký ngoại cỡ. Theo phương án cụ thể, các globulin miễn dịch được làm giàu bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi anion. Theo phương án khác, các globulin miễn dịch được làm giàu tiếp bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi cation. Theo phương án cụ thể, các globulin miễn dịch được làm giàu tiếp bằng cách thực hiện cả sắc ký trao đổi cation lẫn sắc ký trao đổi anion.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn ở bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, gắn kết các globulin miễn dịch với nhựa trao đổi cation; rửa giải các globulin miễn dịch ra khỏi quá trình trao đổi cation để tạo ra dịch rửa giải trao đổi cation; tiếp xúc dịch rửa giải trao đổi cation với nhựa trao đổi anion; và thu hồi các globulin miễn dịch không gắn kết với nhựa này, từ đó tạo ra chế phẩm

globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ bước sắc ký trao đổi anion được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án khác, từ 80% và 100%, tốt hơn là từ 90% và 100%, albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm ít nhất một bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp còn bao gồm ít nhất hai bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên nữa, phương pháp còn bao gồm ít nhất ba bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa các globulin miễn dịch từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm các globulin miễn dịch và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; thu hồi các globulin miễn dịch từ kết tủa thứ hai; gắn kết các globulin miễn dịch với nhựa trao đổi cation; rửa giải các globulin miễn dịch từ quá trình

trao đổi cation để tạo ra dịch rửa giải trao đổi cation; cho dịch rửa giải trao đổi cation tiếp xúc với nhựa trao đổi anion; và thu hồi các globulin miễn dịch không gắn kết với nhựa, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ bước sắc ký trao đổi anion được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án khác, từ 80% và 100%, tốt hơn là từ 90% và 100%, albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm ít nhất một bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp còn bao gồm ít nhất hai bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phương pháp còn bao gồm ít nhất ba bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao; tách riêng các globulin miễn dịch và A1PI đã kết tủa; làm giàu chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi cation; và làm giàu tiếp chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi anion. Theo một phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7 và Bảng 8. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm ít nhất một bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp còn bao gồm ít nhất hai bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phương pháp còn bao gồm ít nhất ba bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao; tách riêng các globulin miễn dịch và A1PI đã kết tủa; làm kết tủa các globulin miễn dịch đã tách trong bước làm kết tủa thứ hai; làm giàu chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi cation; và làm giàu tiếp chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi anion. Theo một phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm ít nhất một bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp còn bao gồm ít nhất hai bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, phương pháp còn bao gồm ít nhất ba bước khử/làm bất hoạt virus. Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao; tách riêng các globulin miễn dịch và A1PI đã kết tủa; làm kết tủa các globulin miễn dịch đã tách trong bước làm kết tủa thứ hai; xử lý chế phẩm globulin miễn dịch bằng dung môi và chất làm sạch để làm bất hoạt virus; làm giàu chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi cation; làm giàu tiếp chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi anion; và lọc nano chế phẩm globulin miễn dịch để loại bỏ virus. Theo một phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7 và Bảng 8.

Theo một phương án, phương pháp còn bao gồm bước cô chế phẩm globulin miễn dịch bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách để thu được nồng độ protein cuối nằm trong khoảng từ 5g/l đến 25g/l. Theo phương án cụ thể, nồng độ cuối của chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu bằng $5 \pm 1\%$ (khối lượng/thể tích). Theo phương án cụ thể khác, nồng độ

cuối của chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu bằng $10 \pm 1\%$ (khối lượng/thể tích). Theo phương án cụ thể khác, nồng độ cuối của chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu bằng $15 \pm 1\%$ (khối lượng/thể tích). Theo phương án cụ thể khác, nồng độ cuối của chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu bằng $20 \pm 2\%$ (khối lượng/thể tích). Theo phương án cụ thể khác, nồng độ cuối của chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu bằng $25 \pm 2\%$ (khối lượng/thể tích). Theo một phương án, chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu là chế phẩm IgG.

Quy trình minh họa cách làm giàu IgG từ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1

Chiết chất kết tủa phân đoạn I-IV-1

Để hòa tan thành phần IgG của chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, dung dịch đệm chiết lạnh được sử dụng để tạo hỗn dịch lại chất phân đoạn II+III với tỷ lệ thông thường là 1 phần kết tủa với 15 phần dung dịch đệm chiết. Các tỷ lệ thích hợp khác để tạo lại hỗn dịch có thể được sử dụng, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1:8 đến 1:30, hoặc nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:20, hoặc nằm trong khoảng từ 1:12 đến 1:18, hoặc nằm trong khoảng từ 1:13 đến 1:17, hoặc nằm trong khoảng từ 1:14 đến 1:16. Theo một số phương án, tỷ lệ tạo lại hỗn dịch có thể bằng 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, hoặc cao hơn.

Các dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa thứ nhất thường có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5. Theo một số phương án, dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0, theo các phương án khác, dung dịch chiết có độ pH bằng khoảng 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, hoặc 5,5. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,7 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,8 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,9 \pm 0,1$. Nói chung, các yêu cầu về độ pH này có thể đáp ứng được bằng cách sử dụng các dung dịch đệm được chọn từ, ví dụ, axetat, xitrat, monobazơ phosphat, dibazơ phosphat, hỗn hợp của chúng, và các dung dịch tương tự. Nồng độ dung dịch đệm thích hợp thường nằm trong khoảng từ 5mM đến 100mM, hoặc nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM, hoặc bằng 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM,

50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM, hoặc 100mM.

Tốt hơn, nếu dung dịch đậm chiết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2,0mS/cm. Ví dụ, theo một số phương án, độ dẫn điện của dung dịch đậm chiết bằng $0,5 \pm 0,1$ mS/cm, hoặc bằng khoảng $0,6 \pm 0,1$ mS/cm, $0,7 \pm 0,1$ mS/cm, $0,8 \pm 0,1$ mS/cm, $0,9 \pm 0,1$ mS/cm, $1,0 \pm 0,1$ mS/cm, $1,1 \pm 0,1$ mS/cm, $1,2 \pm 0,1$ mS/cm, $1,3 \pm 0,1$ mS/cm, $1,4 \pm 0,1$ mS/cm, $1,5 \pm 0,1$ mS/cm, $1,6 \pm 0,1$ mS/cm, $1,7 \pm 0,1$ mS/cm, $1,8 \pm 0,1$ mS/cm, $1,9 \pm 0,1$ mS/cm, hoặc $2,0 \pm 0,1$ mS/cm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách tạo ra các dung dịch đậm chiết có độ dẫn điện thích hợp.

Theo phương án minh họa, chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 được chiết với hỗn dịch để tạo ra tỷ lệ đậm bằng 1:15 bằng cách sử dụng dung dịch đậm chiết chứa 5mM monobazo natri phosphat và 5mM axetat, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến $4,8 \pm 0,2$ bằng axit axetic. Theo một phương án, độ pH của dung dịch được duy trì ở độ pH bằng $4,8 \pm 0,3$ trong quá trình chiết. Theo phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được duy trì ở độ pH bằng $4,8 \pm 0,2$ trong quá trình chiết.

Nói chung, quy trình chiết được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C, hoặc nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Theo một số phương án, quy trình chiết có thể được thực hiện ở $0 \pm 1^\circ\text{C}$, $1 \pm 1^\circ\text{C}$, $2 \pm 1^\circ\text{C}$, $3 \pm 1^\circ\text{C}$, $4 \pm 1^\circ\text{C}$, $5 \pm 1^\circ\text{C}$, $6 \pm 1^\circ\text{C}$, $7 \pm 1^\circ\text{C}$, $8 \pm 1^\circ\text{C}$, $9 \pm 1^\circ\text{C}$, hoặc $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Theo phương án cụ thể, chiết được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 10°C. Thông thường, quy trình chiết được thực hiện trong thời gian nằm trong khoảng từ 60 phút đến 300 phút, hoặc trong thời gian nằm trong khoảng từ 120 phút đến 240 phút, hoặc trong thời gian nằm trong khoảng từ 150 phút đến 210 phút, đồng thời hỗn dịch được khuấy liên tục. Theo một số phương án, quy trình chiết được thực hiện trong khoảng 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 phút, hoặc lâu hơn. Theo một phương án ưu tiên, quy trình chiết được thực hiện trong ít nhất 160 phút bằng cách khuấy liên tục.

Xử lý bằng silic đioxit (SiO_2)

So với quá trình tinh chế Cohn-Oncley và Kistler-Nitschmann, các chất kết tủa chứa globulin miễn dịch ban đầu đã tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế chứa nồng độ tương đối cao protein không phải globulin miễn dịch, bao gồm A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp. Đã biết rằng Yếu tố H và IaIp có thể được gắn kết bởi và sau đó rửa giải silic đioxit đã được nghiền mịn (*xem*, WO 2011/011753 và PCT/US2011/045099, nội dung của chúng được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích). Nhận thấy rằng có lợi nếu sự có mặt của bước xử lý SiO_2 sau khi chiết chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 và trước khi lọc hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 sẽ hỗ trợ cho việc tách riêng A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp khỏi bánh lọc không tan tạo ra trong quá trình lọc hỗn dịch phân đoạn I-IV-1.

Do đó, theo một phương án, silic đioxit đã được nghiền mịn được phối trộn với hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 trước khi lọc. Theo một phương án, bước xử lý trước này bao gồm việc bổ sung các hạt silic đioxit nghiền mịn (*ví dụ*, silic đioxit sinh nhiệt; Aerosil®), tiếp đó ủ trong thời gian từ 40 phút đến 80 phút trong khi đó hỗn dịch được trộn liên tục. Theo một số phương án, giai đoạn ủ nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút, hoặc bằng khoảng 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, hoặc lâu hơn. Nói chung, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C , hoặc nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C . Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 0°C , 1°C , 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C , 8°C , 9°C , hoặc 10°C . Theo phương án cụ thể, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 10°C . Theo một phương án ưu tiên, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 5°C đến 10°C .

Theo một số phương án, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một số phương án, silic đioxit sinh nhiệt có thể được bổ sung vào ở nồng độ bằng khoảng 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc bằng khoảng 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một phương án đặc biệt, silic đioxit sinh nhiệt (*ví dụ*, Aerosil 380 hoặc chất tương tự) được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ cuối của chất kết tủa phân

đoạn I-IV-1 bằng 40 ± 10 g/kg. Tiến hành trộn cố định ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian ít nhất từ 50 phút đến 70 phút.

Theo một số phương án, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm IgG ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 g/g protein toàn phần đến 10 g/g protein toàn phần. Theo phương án khác, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm IgG ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01 g/g protein toàn phần đến 5 g/g protein toàn phần. Theo phương án khác, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm IgG ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,02 g/g protein toàn phần đến 4 g/g protein toàn phần. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào ở nồng độ cuối ít nhất 0,1 g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 0,2 g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 0,25 g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 1 g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 2 g trong mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 2,5 g trong mỗi gam protein toàn phần. Vẫn theo các phương án cụ thể khác, silic đioxit đã được nghiền mịn được bổ sung vào ở nồng độ ít nhất 0,01 g/g protein toàn phần hoặc ít nhất 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g, hoặc nhiều hơn trên gam protein toàn phần.

Lọc hỗn dịch phân đoạn I-IV-1

Để tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 chứa các globulin miễn dịch ra khỏi phần không hòa tan chứa fibrinogen, A1PI, yếu tố H, và IaIp, hỗn dịch được lọc, tùy ý sử dụng thiết bị lọc sâu. Thiết bị lọc sâu có thể được dùng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm, thiết bị lọc sâu bằng kim loại, thủy tinh, gốm, vô cơ (như diatomit), và các thiết bị tương tự. Ví dụ về các thiết bị lọc thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở Cuno 50SA, Cuno 90SA, và thiết bị lọc Cuno VR06s (3M). Theo cách khác, bước tách riêng có thể được thực hiện bằng cách ly tâm chứ không phải lọc.

Theo một số phương án, chất trợ lọc, ví dụ Celpure C300 (Advanced Minerals) hoặc Hyflo-Super-Cel (World Minerals), được bổ sung vào hỗn dịch sau khi xử lý silic đioxit để thuận tiện cho việc lọc sâu. Chất trợ lọc được bổ sung vào ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 1,0kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc nằm trong khoảng từ 0,2kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 0,8kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc nằm trong khoảng từ 0,3kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 0,7kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo các phương án khác, chất trợ lọc có thể được bổ sung vào ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 0,7kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc nằm trong khoảng từ 0,2kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 0,6kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc nằm trong khoảng từ 0,3kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 0,05 kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một số phương án, chất trợ lọc được bổ sung vào ở nồng độ cuối bằng khoảng 0,01kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc bằng khoảng 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, hoặc 1,0kg/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Để hạn chế tối đa mức hao hụt globulin miễn dịch trong khi lọc, bánh lọc tạo ra cần được rửa bằng ít nhất một thể tích trống, tốt hơn nếu ít nhất hai thể tích trống, tốt hơn nữa là ít nhất ba thể tích trống, của hỗn dịch đậm hoặc dung dịch đậm tương tự của chúng, mà không hòa tan protein không phải globulin miễn dịch có mặt trong bánh lọc. Theo một phương án, thiết bị lọc và bánh lọc được rửa sau đó bằng ít nhất 3,0 thể tích trống của dung dịch đậm. Theo phương án khác, thiết bị lọc và bánh lọc được rửa sau đó bằng ít nhất 3,6 thể tích trống của dung dịch đậm. Theo phương án khác, thiết bị lọc và bánh lọc được rửa sau đó bằng ít nhất 50% thể tích hỗn dịch được lọc, bằng cách sử dụng dung dịch đậm thích hợp. Theo phương án khác, thiết bị lọc và bánh lọc được rửa sau đó bằng ít nhất 75% thể tích hỗn dịch được lọc, sử dụng dung dịch đậm thích hợp. Theo phương án khác, thiết bị lọc và bánh lọc được rửa sau đó bằng ít nhất 100% thể tích hỗn dịch được lọc, sử dụng dung dịch đậm thích hợp. Thông thường, không quá 200% thể tích hỗn dịch được lọc cần dùng để rửa thiết bị lọc và bánh lọc.

Theo phương án cụ thể, dung dịch đậm rửa là dung dịch đậm hòa tan chứa axit axetic bằng với lượng nằm trong khoảng từ 90ml đến 150ml trên 1000l. Theo một phương án, độ

pH của dung dịch đệm chiết sau khi rửa nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,3. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm sau khi rửa đệm nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,2. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm sau khi rửa đệm nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,1. Theo phương án khác nữa, độ pH của dung dịch đệm sau khi rửa đệm nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,0.

Xử lý bằng chất làm sạch

Để loại bỏ các chất tạp nhiễm khác ra khỏi dịch lọc phân đoạn I-IV-1, mẫu được xử lý tiếp bằng chất làm sạch. Phương pháp xử lý bằng chất làm sạch của các phân đoạn có nguồn gốc từ huyết tương là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói chung, phương pháp xử lý bằng chất làm sạch không ion tiêu chuẩn bất kỳ có thể được sử dụng kết hợp với phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, quy trình minh họa về việc xử lý bằng chất làm sạch được đưa ra dưới đây.

Polysorbat-80 được bổ sung vào dịch lọc phân đoạn I-IV-1 ở nồng độ cuối bằng khoảng 0,2% (khối lượng/thể tích) đồng thời khuấy và mẫu được ủ trong ít nhất 30 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Natri xitrat đihydrat tiếp đó được trộn vào dung dịch ở nồng độ cuối bằng khoảng 8g/l và mẫu được ủ trong thời gian 30 phút nữa, đồng thời khuấy liên tục ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C.

Theo một số phương án, các chất làm sạch không ion thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng. Ví dụ về các chất làm sạch không ion thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Octylglucosit, Digitonin, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (tức là, polysorbat-20), Tween-80 (tức là, polysorbat-80), alkyl poly(etylen oxit), chất làm sạch Brij, alkylphenol poly(etylen oxit), poloxame, octyl glucosit, dexyl maltosit, và các chất tương tự.

Theo một phương án, việc cải thiện quy trình thu được bằng cách bổ sung chất phản ứng làm sạch (ví dụ, polysorbat-80 và natri xitrat khan) bằng cách bổ sung khuếch tán. Việc bổ sung khuếch tán các chất phản ứng này sẽ giảm thiểu được sự thay đổi bất thường cục bộ củnồng độ rượu và độ pH so với khi bổ sung vào tại một điểm. Theo một phương án, quá trình bổ sung khuếch tán bao gồm phun, chứ không phải bổ sung bằng cách cho chảy.

Theo phương án khác, quá trình bổ sung khuếch tán bao gồm bổ sung chất phản ứng vào từ nhiều lỗ. Theo một phương án, quá trình bổ sung khuếch tán bao gồm bổ sung chất phản ứng vào từ các lỗ khuếch tán. Theo một số phương án, ít nhất một lỗ đã dùng để đưa chất phản ứng vào hệ thống được đặt ở hoặc gần cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác. Theo các phương án khác, chất phản ứng làm sạch có thể được bổ sung dưới dạng các chất rắn vào dịch lọc phân đoạn II+III cải biến đồng thời mẫu cần được trộn để đảm bảo quá trình phân bố nhanh chất phụ gia. Theo một số phương án, tốt hơn nếu bổ sung chất phản ứng mới bằng cách rắc các chất rắn lên diện tích bề mặt đã loại bỏ chứa dịch lọc sao cho không làm xuất hiện nồng độ cục bộ quá mức, như trong quá trình bổ sung bằng cách cho chảy qua.

Làm kết tủa lần thứ hai – Kết tủa G

Để loại bỏ các tạp chất rắn, quá trình làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5 bằng cách sử dụng rượu 25%. Tóm lại, dịch chiết phân đoạn I-IV-1 được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 6,9 đến 7,1, tốt nhất là bằng 7,0 với dung dịch điều chỉnh độ pH thích hợp (ví dụ, natri hydroxit hoặc axit axetic). Rượu lạnh sau đó được bổ sung vào dung dịch đến nồng độ cuối bằng khoảng 25% (thể tích) và hỗn hợp này được ủ đồng thời khuấy trộn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -6°C đến -10°C trong ít nhất 1 giờ để tạo ra chất kết tủa thứ hai (tức là, kết tủa G). Theo một phương án, hỗn hợp được ủ trong thời gian ít nhất 2 giờ, hoặc ít nhất 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 7 giờ, 8 giờ, 9 giờ, 10 giờ, 11 giờ, 12 giờ, 13 giờ, 14 giờ, 15 giờ, 16 giờ, 17 giờ, 18 giờ, 19 giờ, 20 giờ, 21 giờ, 22 giờ, 23 giờ, 24 giờ, hoặc lâu hơn. Theo một phương án ưu tiên, hỗn hợp được ủ trong thời gian ít nhất 2 giờ. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, hỗn hợp được ủ trong thời gian ít nhất 4 giờ. Theo phương án ưu tiên hơn nữa, hỗn hợp được ủ trong thời gian ít nhất 8 giờ.

Theo một số phương án, tỷ lệ phần trăm IgG cao có thể được làm kết tủa ra khỏi dịch chiết I-IV-1 bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch trong và/hoặc sau khi bổ sung rượu vào phản ứng kết tủa. Tương tự do sự thay đổi bất thường của độ pH trong dung dịch trong quá trình làm kết tủa, nên độ pH của hỗn hợp phản ứng có thể được kiểm soát và/hoặc

điều chỉnh thông qua toàn bộ quá trình ủ. Theo phương án khác, việc cải thiện hiệu suất IgG thu được bằng cách bổ sung rượu kết tủa và/hoặc dung dịch đã dùng để điều chỉnh độ pH của hỗn hợp bằng cách bổ sung khuếch tán rượu hoặc chất điều chỉnh độ pH. Quá trình bổ sung khuếch tán các chất phản ứng này sẽ giảm tối thiểu sự thay đổi bất thường cục bộ của nồng độ rượu và độ pH so với khi bổ sung vào tại một điểm. Theo một phương án, quá trình bổ sung khuếch tán bao gồm phun, chứ không phải bổ sung bằng cách cho chảy vào. Theo phương án khác, quá trình bổ sung khuếch tán bao gồm bổ sung chất phản ứng vào từ nhiều lỗ. Theo một phương án, quá trình bổ sung khuếch tán bao gồm bổ sung chất phản ứng vào từ các lỗ khuếch tán. Theo một số phương án, ít nhất một lỗ đã dùng để đưa chất phản ứng vào hệ thống được đặt ở hoặc gần cánh khuấy hoặc bộ phận phân tán khác.

Tạo hỗn dịch và lọc chất kết tủa G (Ppt G)

Để hòa tan thành phần IgG của chất kết tủa G, dung dịch đậm chiết lạnh được sử dụng để tạo lại hỗn dịch PptG. Tóm lại, chất kết tủa G được hoà tan với tỷ lệ 1 phần kết tủa với 2 đến 5 phần nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đậm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án ưu tiên, chất kết tủa G được hoà tan với tỷ lệ 1 phần kết tủa với 1 đến 15 phần, tốt hơn là 3,5 phần, WFI. Bước tạo hỗn dịch tùy ý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 8°C để thu được giá trị $AU_{280-320}$ nằm trong khoảng từ 40 đến 95. Độ pH cuối của dung dịch, được khuấy trong thời gian ít nhất 2 giờ, tiếp đó được điều chỉnh đến giá trị nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,6, tốt hơn nếu đến $5,2 \pm 0,2$. Theo một phương án, việc điều chỉnh độ pH này được thực hiện bằng axit axetic. Để làm tăng khả năng hoà tan IgG, độ dẫn điện của hỗn dịch được tăng lên tới giá trị nằm trong khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm. Theo một phương án, độ dẫn điện được tăng lên bằng cách bổ sung natri clorua.

Các dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa G bao gồm WFI và dung dịch đậm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án, dung dịch đậm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 10mS/cm. Theo các phương án khác, dung dịch đậm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 9mS/cm, 8mS/cm, 7mS/cm, 6mS/cm, 5mS/cm, 4mS/cm, 3mS/cm, 2mS/cm, hoặc 1mS/cm. Theo một phương án ưu tiên, dung dịch đậm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 6mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đậm có độ dẫn

diện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 4mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 2mS/cm.

Sau đó, dung dịch PptG đã được tạo hỗn dịch được lọc bằng thiết bị lọc sâu thích hợp có kích thước lỗ xốp không đáng kể nằm trong khoảng từ 0,1µm đến 0,4µm để loại bỏ các hạt không hòa tan bất kỳ. Theo một phương án, kích thước lỗ xốp không đáng kể của thiết bị lọc sâu bằng khoảng 0,2µm (ví dụ, máy lọc Cuno VR06 hoặc các thiết bị tương tự). Theo phương án khác, dung dịch PptG đã được tạo hỗn dịch được ly tâm để thu hồi dịch nổi sạch. Thiết bị lọc được rửa bằng WFI hoặc dung dịch đệm thích hợp sau khi lọc để thu hồi tiếp IgG và nước sau khi rửa được bổ sung vào dịch lọc. Theo một phương án ưu tiên, nước sau khi rửa của thiết bị lọc được dùng bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm.

Xử lý bằng dung môi và chất làm sạch (S/D)

Để làm bất hoạt các chất tạp nhiễm chứa virus khác nhau có mặt trong các sản phẩm có nguồn gốc từ huyết tương, dịch lọc sạch PptG được xử lý tiếp bằng chất làm sạch dung môi (S/D). Phương pháp xử lý bằng chất làm sạch các phân đoạn có nguồn gốc từ huyết tương đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, Pelletier JP *et al.*, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(1):205-42). Nói chung, phương pháp xử lý S/D tiêu chuẩn bất kỳ có thể được áp dụng kết hợp với phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, quy trình minh họa để xử lý S/D được đưa ra dưới đây.

Triton X-100, Tween-20, và tri(n-butyl)phosphat (TNBP) được bổ sung vào dịch lọc sạch PptG ở các nồng độ cuối lần lượt bằng khoảng 1,0%, 0,3%, và 0,3%. Tiếp đó, hỗn hợp này được khuấy trộn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18°C đến 25°C trong thời gian ít nhất một giờ.

Theo một phương án, các chất phản ứng S/D (ví dụ, Triton X-100, Tween-20, và TNBP) được bổ sung vào bằng cách bổ sung khuếch tán. Theo phương án cụ thể, các chất phản ứng S/D được bổ sung vào bằng cách phun chứ không bằng cách cho chảy qua. Theo phương án khác, chất phản ứng làm sạch được bổ sung dưới dạng chất rắn vào dịch lọc sạch PptG, cần được trộn để đảm bảo sự phân bố nhanh các thành phần S/D. Theo một số

phương án, tốt hơn nếu bổ sung chất phản ứng mới vào bằng cách rắc các chất rắn lên diện tích bề mặt đã loại bỏ của dịch lọc sao cho không làm xuất hiện nồng độ cục bộ quá mức, như trong bổ sung vào bằng cách cho chảy qua.

Sắc ký trao đổi ion

Để tinh chế và cô tiếp IgG, sắc ký trao đổi cation và/hoặc sắc ký trao đổi anion có thể được áp dụng. Phương pháp tinh chế và cô IgG bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi ion đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, Patent Mỹ số 5,886,154 mô tả phương pháp trong đó chất kết tủa phân đoạn II+III được chiết ở độ pH thấp (nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,5), tiếp đó kết tủa IgG bằng cách sử dụng axit caprylic, và cuối cùng bổ sung hai bước sắc ký trao đổi anion. Patent Mỹ số 6,069,236 mô tả sơ đồ tinh chế sắc ký IgG, hoàn toàn không dựa vào kết tủa rượu. Công bố đơn quốc tế số WO 2005/073252 mô tả phương pháp tinh chế IgG bao gồm bước chiết chất kết tủa phân đoạn II+III, xử lý bằng axit caprylic, xử lý bằng PEG, và một bước sắc ký trao đổi anion. Patent Mỹ số 7,186,410 mô tả phương pháp tinh chế IgG bao gồm bước chiết chất kết tủa phân đoạn I+II+III hoặc phân đoạn II, tiếp đó một bước trao đổi anion được thực hiện ở độ pH kiềm. Patent Mỹ số 7,553,938 mô tả phương pháp bao gồm bước chiết chất kết tủa phân đoạn I+II+III hoặc chất kết tủa phân đoạn II+III, xử lý bằng caprylat, và một hoặc hai bước sắc ký trao đổi anion. Patent Mỹ số 6,093,324 mô tả phương pháp tinh chế bao gồm việc sử dụng nhựa trao đổi anion vi lỗ hoạt động ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6. Patent Mỹ số 6,835,379 mô tả phương pháp tinh chế dựa trên sắc ký trao đổi cation khi không có mặt quá trình phân đoạn rượu. Phần bộc lộ của các Công bố đơn nêu trên được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích.

Theo một phương án, dịch lọc PptG đã xử lý bằng S/D có thể được tiến hành sắc ký trao đổi cation và sắc ký trao đổi anion. Ví dụ, theo một phương án, dịch lọc PptG đã được xử lý bằng S/D được tiếp xúc với nhựa trao đổi cation trong các điều kiện thích hợp để gắn kết IgG với nhựa. Tiếp đó, các chất phản ứng S/D có thể được rửa ra khỏi IgG đã hấp phụ, sau đó được rửa giải nhựa bằng dung dịch đệm rửa giải thích hợp. Theo cách này, bước sắc ký trao đổi cation có thể được sử dụng để loại bỏ các chất phản ứng S/D ra khỏi chế phẩm, cô dung dịch chứa IgG, và/hoặc loại bỏ các tạp chất ra khỏi chế phẩm.

Theo một phương án, IgG được rửa giải ra khỏi nhựa trao đổi cation bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,0. Theo một số phương án, dung dịch đệm rửa giải pH có độ pH nằm trong khoảng từ 8,2 đến 8,8, hoặc nằm trong khoảng từ 8,4 đến 8,6, hoặc độ pH bằng khoảng 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, hoặc 9,0. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm rửa giải bằng khoảng $8,5 \pm 0,1$.

Tương tự, phương pháp sắc ký trao đổi anion có thể được sử dụng để làm giảm các tạp chất trong chế phẩm IgG. Theo một phương án, sắc ký trao đổi anion được thực hiện trong các điều kiện dung dịch trong đó một hoặc nhiều tạp chất gắn kết với nhựa trao đổi anion nhưng không gắn kết với IgG. Theo phương án cụ thể, sắc ký trao đổi anion được thực hiện ở điều kiện có tính axit nhẹ, *tức là*, ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, ở độ bền ion thấp thích hợp để gắn kết các chất tạp nhiễm nhưng IgG không gắn kết với nhựa trao đổi anion.

Theo phương án cụ thể, dịch rửa giải ra khỏi cột trao đổi cation có thể được điều chỉnh đến độ pH thấp hơn, ví dụ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, và được pha loãng bằng dung dịch đệm thích hợp sao cho độ dẫn điện của dung dịch được giảm xuống. Theo một số phương án, độ pH của dịch rửa giải trao đổi cation có thể được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,7 đến 6,7, hoặc nằm trong khoảng từ 5,9 đến 6,5, hoặc độ pH bằng khoảng 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, hoặc 6,7. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dịch rửa giải được điều chỉnh đến giá trị bằng khoảng $6,4 \pm 0,1$. Tiếp đó, dịch rửa giải được đưa lên cột trao đổi anion, gắn kết một số chất tạp nhiễm đã tìm thấy trong chế phẩm này. Dòng chảy qua cột đi qua, chứa phân đoạn IgG, được thu gom trong quá trình mang và rửa cột. Theo một số phương án, các bước sắc ký trao đổi ion theo sáng chế có thể được thực hiện theo kiểu cột, kiểu mẻ, hoặc kết hợp hai kiểu này. Theo một phương án, dung dịch dùng để điều chỉnh độ pH của chế phẩm IgG trước khi tiến hành sắc ký trao đổi anion được bổ sung vào bằng cách bổ sung khuếch tán. Theo phương án cụ thể, dung dịch được bổ sung vào bằng cách phun, chứ không bổ sung vào bằng cách cho chảy qua.

Lọc nano

Để làm giảm khả năng mang virus của chế phẩm IgG theo sáng chế, chế phẩm này có thể được lọc nano bằng cách sử dụng thiết bị lọc nano thích hợp. Theo một số phương án, thiết bị lọc nano có cỡ lỗ xốp trung bình nằm trong khoảng từ 15nm đến 200nm. Ví dụ về các thiết bị lọc nano thích hợp nhằm mục đích này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, và 75N (Planova). Theo phương án cụ thể, thiết bị lọc nano có thể có cỡ lỗ xốp trung bình nằm trong khoảng từ 15nm đến 72nm, hoặc nằm trong khoảng từ 19nm đến 35nm, hoặc bằng khoảng 15nm, 19nm, 35nm, hoặc 72nm. Theo một phương án ưu tiên, thiết bị lọc nano có cỡ lỗ xốp trung bình bằng khoảng 35nm, như thiết bị lọc Asahi PLANOVA 35N hoặc thiết bị tương đương. Theo phương án cụ thể, chế phẩm IgG thu hồi từ bước trao đổi anion được lọc nano bằng cách sử dụng thiết bị lọc nano có cỡ lỗ xốp nằm trong khoảng từ 30nm đến 40nm, tốt hơn là bằng 35 ± 2 nm. Theo phương án ưu tiên khác, thiết bị lọc nano có cỡ lỗ xốp trung bình bằng khoảng 19nm hoặc 20nm, như thiết bị lọc Asahi PLANOVA 20N (19 ± 2 nm) hoặc các thiết bị tương đương. Theo phương án cụ thể, chế phẩm IgG thu hồi từ bước trao đổi anion được lọc nano bằng cách sử dụng thiết bị lọc nano có cỡ lỗ xốp nằm trong khoảng từ 15nm đến 25nm, tốt hơn là bằng 19 ± 2 nm.

Siêu lọc/Lọc thẩm tách (UF/DF)

Quá trình siêu lọc/lọc thẩm tách có thể được thực hiện để cô đặc chế phẩm IgG ở bước bất kỳ trong quy trình tinh chế. Theo một phương án, dịch lọc nano được cô đặc bằng cách UF/DF. Theo một phương án, dịch lọc nano có thể được cô đặc bằng cách siêu lọc để thu được nồng độ protein nằm trong khoảng từ 2% đến 10% (khối lượng/thể tích). Theo một số phương án, quá trình siêu lọc được thực hiện trong cat-xét với tấm chắn kênh mở và màng siêu lọc có ngưỡng khối lượng phân tử (NMWCO) không đáng kể khoảng thấp hơn 100kDa hoặc thấp hơn 90kDa, 80kDa, 70kDa, 60kDa, 50kDa, 40kDa, 30kDa, hoặc thấp hơn. Theo một phương án ưu tiên, màng siêu lọc có NMWCO không quá 50kDa.

Theo một phương án, màng kênh mở được sử dụng có đầu rửa phía sau được thiết kế đặc biệt và chế phẩm nằm gần đầu cuối của quy trình sản xuất để giúp cho chế phẩm IgG thu được có nồng độ protein cao gấp khoảng hai lần (200mg/ml) so với các IVIG đã

biết (ví dụ, GAMMAGARD® LIQUID, 10% IgG) mà không ảnh hưởng tới hiệu suất và độ ổn định trong bảo quản. Đối với hầu hết màng siêu lọc có sẵn trên thị trường, nồng độ IgG 200mg/ml không thể đạt được mà không bị hao hụt lượng lớn protein. Các màng này bị đóng vào sớm và do đó quá trình rửa sau thích hợp khó có thể thực hiện được. Do đó, cấu hình của màng kênh mở được sử dụng. Ngay cả khi có các màng kênh mở, quy trình rửa sau đó được thiết kế đặc biệt được dùng để thu được nồng độ mong muốn mà không làm hao hụt protein đáng kể (mức hao hụt nhỏ hơn 2%). Đáng ngạc nhiên là trên thực tế nồng độ protein cao hơn 200mg/ml không làm giảm khả năng bất hoạt virus của bước bảo quản ở độ pH thấp.

Sau khi hoàn thành bước siêu lọc, dịch cô có thể được cô đặc tiếp bằng cách lọc thẩm tách nhờ dung dịch thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch hoặc dùng qua đường trong cơ. Theo một số phương án, dịch lọc thẩm tách có thể bao gồm chất ổn định và/hoặc đệm. Theo một phương án ưu tiên, chất ổn định và đệm là glyxin ở nồng độ thích hợp, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,20M đến 0,30M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,22M đến 0,28M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,24M đến 0,26M, hoặc ở nồng độ 0,20±0,01M, 0,21±0,01M, 0,22±0,01M, 0,23±0,01M, 0,24±0,01M, 0,25±0,01M, 0,26±0,01M, 0,27±0,01M, 0,28±0,01M, 0,29±0,01M, hoặc 0,3±0,01M. Theo một phương án ưu tiên, dung dịch lọc thẩm tách chứa 0,25±0,01M glyxin.

Thông thường, thể tích trao đổi tối thiểu để lọc thẩm tách ít nhất gấp khoảng 3 lần thể tích nồng độ ban đầu hoặc ít nhất gấp khoảng 4, 5, 6, 7, 8, 9 lần, hoặc gấp nhiều lần thể tích nồng độ ban đầu. Dung dịch IgG có thể được cô đặc để thu được nồng độ protein cuối nằm trong khoảng từ 5% đến 25% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 18% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 16% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 8% đến 14% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 9% đến 12%, hoặc để thu được nồng độ cuối bằng khoảng 5%, hoặc 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% hoặc cao hơn. Theo một phương án, nồng độ protein cuối đạt ít nhất bằng 23% mà không cần bổ sung nước sau khi rửa phân đoạn vào dung dịch đã cô. Theo phương án khác, nồng độ protein cuối đạt ít nhất bằng khoảng 24% mà không cần bổ sung nước sau khi rửa phân

đoạn vào dung dịch đã cô. Theo phương án khác, nồng độ protein cuối đạt ít nhất bằng khoảng 24% mà không cần bổ sung nước sau khi rửa phân đoạn vào dung dịch đã cô. Theo một phương án, độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,1 sau khi lọc thẩm tách.

Theo phương án minh họa, độ pH của chế phẩm IgG được điều chỉnh đến khoảng 4,5 trước khi siêu lọc. Dung dịch được cô đặc đến nồng độ protein $5 \pm 2\%$ khối lượng/thể tích thông qua siêu lọc. Màng UF có ngưỡng khối lượng phân tử (NMWCO) không đáng kể bằng 50,000 Dalton hoặc nhỏ hơn (ví dụ, màng sufon Millipore Pellicon Polyete). Dịch cô tiếp đó được lọc tuần hoàn đối với mười lượng thể tích dung dịch glyxin 0,25M, độ pH bằng $4,5 \pm 0,2$. Trong quá trình siêu lọc thẩm tách, dung dịch được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Sau khi lọc thẩm tách, dung dịch được cô đặc đến nồng độ protein ít nhất bằng 11% (khối lượng/thể tích).

Chế phẩm

Trong quá trình hoàn thành bước lọc thẩm tách, protein nồng độ dung dịch được điều chỉnh bằng dung dịch đệm lọc thẩm tách để thu được nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 5% đến 20% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 18% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 16% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 8% đến 14% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 9% đến 12%, hoặc để thu được nồng độ cuối bằng khoảng 5%, hoặc 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, hoặc 25%. Theo một phương án, nồng độ protein cuối của dung dịch nằm trong khoảng từ 9% đến 11%, tốt hơn nữa là bằng khoảng 10%.

Dung dịch dạng khối đã tạo ra còn được khử trùng bằng lọc qua màng lọc có cỡ lỗ xốp hấp phụ không quá khoảng 0,22 micron, ví dụ, bằng khoảng 0,2 micron. Tiếp đó, dung dịch được phân tán vô trùng vào các vật chứa cuối để gắn kín thích hợp, kèm theo các mẫu dùng để thử nghiệm.

Theo một phương án, chế phẩm IgG còn được điều chỉnh đến nồng độ $10,2 \pm 0,2\%$ (khối lượng/thể tích) bằng dung dịch đệm lọc thẩm tách. Theo phương án khác, chế phẩm

IgG được điều chỉnh đến nồng độ $15 \pm 1\%$ (khối lượng/thể tích). Theo phương án khác, chế phẩm IgG được điều chỉnh đến nồng độ $20 \pm 1\%$ (khối lượng/thể tích). Theo phương án khác, chế phẩm IgG được điều chỉnh đến nồng độ $25 \pm 1\%$ (khối lượng/thể tích). độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,4 đến 4,9 nếu cần. Cuối cùng, dung dịch được lọc vô trùng và được ủ trong ba tuần ở nhiệt độ hoặc khoảng nhiệt độ 30°C .

Globulin miễn dịch G (IgG)

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch G (IgG) đã làm giàu từ vốn Cohn, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời IgG và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; và thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất chứa IgG, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Nói chung, các phương pháp làm kết tủa bất kỳ để làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI có thể được áp dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kết tủa bằng rượu (ví dụ, sử dụng ethanol hoặc metanol), kết tủa bằng cách sử dụng polyme hòa tan trong nước (ví dụ, PEG hoặc dextran), và làm kết tủa bằng muối (ví dụ, sử dụng amoni phosphat, amoni sulfat, natri xitrat, v.v.). Theo một phương án ưu tiên, bước làm kết tủa này là kết tủa bằng rượu, tốt hơn là kết tủa bằng ethanol.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch G (IgG) đã được làm giàu bằng cách làm kết tủa IgG ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa IgG ra khỏi huyết tương đã được tách tủa lạnh trong bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào huyết tương đã tách tủa lạnh để thu được nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi IgG ra khỏi chất kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa IgG ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh ở bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào huyết tương đã tách tủa lạnh để thu được nồng độ cuối và độ pH được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp.

Theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện bằng cách phối trộn etanol với vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 và 6,0. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng 5,5. Theo các phương án khác, nồng độ etanol cuối và độ pH bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Phương pháp theo sáng chế tạo ra hiệu suất cao hơn đáng kể về mức độ thu hồi IgG trong thành phẩm làm giàu do quá trình làm kết tủa phần lớn hàm lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn ban đầu trong phản ứng kết tủa ban đầu, so với quy trình trong tình trạng kỹ thuật tinh chế tiến hành dựa vào bước làm kết tủa ban đầu ở nồng độ rượu thấp (*tức là*, kết tủa phân đoạn I).

Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 90% lượng IgG của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương

án ưu tiên, ít nhất 95% lượng IgG của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 99% lượng IgG của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% IgG của vốn Cohn ban đầu hoặc nhiều hơn được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu.

Như được thể hiện trong các ví dụ trong bản mô tả, việc áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (*tức là*, kết tủa phân đoạn I-IV-1) làm kết tủa ít nhất 99% lượng IgG của vốn Cohn ban đầu. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; và thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối

và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; và thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Để tạo ra chế phẩm IgG loại dùng được trong dược phẩm, các chất tạp nhiễm như A1PI và fibrinogen có mặt trong chất kết tủa ban đầu cần được loại ra khỏi chế phẩm globulin miễn dịch. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách phân đoạn tiếp chất kết tủa thứ nhất (ví dụ, bằng cách làm kết tủa phân biệt nhờ sử dụng rượu, polyme ưa nước không ion, hoặc bổ sung muối), phương pháp sắc ký, hoặc phương pháp lọc.

Theo một phương án, chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch trong nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có cường độ ion thấp thích hợp để chiết IgG ra khỏi chất kết tủa, hỗn dịch tiếp đó được xử lý bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2), và phân

hòa tan của hỗn dịch chứa IgG được tách ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch chứa khối A1PI và fibrinogen.

Các dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa thứ nhất thường có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 và 5,5. Theo một số phương án, dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 và 5,0, theo các phương án khác, dung dịch chiết có độ pH bằng khoảng 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, hoặc 5,5. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,7 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,8 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,9 \pm 0,1$. Nói chung, các yêu cầu về độ pH này có thể đáp ứng được bằng cách sử dụng dung dịch đệm được chọn từ, ví dụ, axetat, xitrat, monobazơ phosphat, dibazơ phosphat, hỗn hợp của chúng, và các dung dịch tương tự. Nồng độ dung dịch đệm thích hợp thường nằm trong khoảng từ 5 mM đến 100mM, hoặc nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM, hoặc 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM, hoặc 100mM.

Tốt hơn nếu dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2,0mS/cm. Ví dụ, theo một số phương án, độ dẫn điện của dung dịch đệm chiết bằng $0,5 \pm 0,1$ mS/cm, hoặc $0,6 \pm 0,1$ mS/cm, $0,7 \pm 0,1$ mS/cm, $0,8 \pm 0,1$ mS/cm, $0,9 \pm 0,1$ mS/cm, $1,0 \pm 0,1$ mS/cm, $1,1 \pm 0,1$ mS/cm, $1,2 \pm 0,1$ mS/cm, $1,3 \pm 0,1$ mS/cm, $1,4 \pm 0,1$ mS/cm, $1,5 \pm 0,1$ mS/cm, $1,6 \pm 0,1$ mS/cm, $1,7 \pm 0,1$ mS/cm, $1,8 \pm 0,1$ mS/cm, $1,9 \pm 0,1$ mS/cm, hoặc $2,0 \pm 0,1$ mS/cm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết cách tạo ra các dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện thích hợp. Theo một phương án cụ thể, dung dịch đệm chiết chứa 5mM monobazơ natri phosphat và 5mM axetat ở độ pH bằng $4,8 \pm 0,2$ và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm, đến 0,9mS/cm.

Theo một phương án, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào trước khi tách riêng (ví dụ, lọc hoặc ly tâm) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 và 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo phương án khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 và 80g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một số phương án, silic đioxit sinh nhiệt có thể được bổ sung vào ở nồng độ bằng khoảng 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc bằng

khoảng 25g/kg, 30g/kg, 35g/kg, 40g/kg, 45g/kg, 50g/kg, 55g/kg, 60g/kg, 65g/kg, 70g/kg, 75g/kg, 80g/kg, 85g/kg, 90g/kg, 95g/kg, hoặc 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một phương án đặc biệt, silic đioxit sinh nhiệt (ví dụ, Aerosil 380 hoặc chất tương tự) được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 cuối bằng 40 ± 20 g/kg. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 cuối 40 ± 10 g/kg. Tiến hành trộn cố định 2°C đến 8°C trong thời gian kéo dài ít nhất từ 50 phút đến 70 phút.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa IgG và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ cuối 40 ± 10 g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn

đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa IgG và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, và tiếp theo trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG có mặt trong phần hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ cuối $40 \pm 10 \text{g/kg}$ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Theo một phương án, IgG thu hồi từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp bằng cách phân đoạn. Nói chung, phương pháp phân đoạn bất kỳ (ví dụ, rượu hoặc polyme kết tủa, làm kết tủa bằng muối, v.v.) có thể được sử dụng. Theo một phương án ưu tiên, IgG được làm giàu tiếp bằng cách phân đoạn phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất bằng cách làm kết tủa bằng etanol. Theo một phương án, IgG được làm giàu bằng cách bổ sung etanol vào phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối và độ pH thích hợp để làm kết tủa IgG, đồng thời ít nhất một chất tạp nhiễm không được làm kết tủa. Theo phương án khác, IgG được làm giàu bằng cách bổ sung etanol vào phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất

ở nồng độ cuối và độ pH thích hợp để làm kết tủa ít nhất một chất tạp nhiễm, trong khi đó IgG không được làm kết tủa.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu từ vốn Cohn, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời IgG và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; làm kết tủa IgG ra khỏi hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Theo phương án minh họa, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện bằng cách phối trộn etanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ hai (ví dụ, dịch lọc hoặc dịch nổi của hỗn dịch tạo ra sau khi lọc hoặc ly tâm) ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 22% đến 28% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 và 7,5. Theo một phương án, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự theo một phương án, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng 7,0. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện bằng cách sử dụng etanol ở nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$.

Theo phương án cụ thể, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG ra khỏi vốn Cohn huyết tương trong bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Theo phương án cụ thể, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG ra khỏi vốn Cohn huyết tương trong bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol

vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất.

Theo phương án cụ thể, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25\pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0\pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25\pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% lượng IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất.

Theo phương án khác, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, albumin có mặt trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% lượng IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án ưu tiên, từ 90% và 100% lượng albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất.

Theo phương án khác, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 99% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; loại bỏ A1PI ra khỏi hỗn dịch; thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn ethanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo

một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo một phương án, A1PI được tách ra khỏi hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, albumin có mặt trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một phương án ưu tiên, từ 90% và 100% lượng albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa IgG và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ cuối $40 \pm 10\text{g/kg}$ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa IgG và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, thu hồi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; làm kết tủa IgG ra khỏi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ cuối $40 \pm 10 \text{ g/kg}$ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan

của hỗn dịch chứa IgG và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp; làm kết tủa IgG ra khỏi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai, để tạo ra chất kết tủa thứ hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ cuối $40 \pm 10 \text{g/kg}$ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% IgG và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa IgG và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp; làm kết tủa IgG ra khỏi phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất trong bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phối trộn etanol với phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ $25 \pm 3\%$ (thể tích) ở độ pH bằng $7,0 \pm 0,3$, để tạo ra chất kết tủa thứ

hai bao gồm IgG và dịch nổi thứ hai bao gồm ít nhất một chất tạp nhiễm; và thu hồi IgG ra khỏi kết tủa thứ hai, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, IgG thu hồi từ kết tủa thứ hai được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% IgG của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ cuối $40 \pm 10\text{g/kg}$ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1.

Theo một phương án, IgG được thu hồi từ kết tủa thứ hai bằng cách tạo hỗn dịch chất kết tủa với dung dịch đậm chiết lạnh. Ví dụ, kết tủa thứ hai được tạo hỗn dịch với tỷ lệ 1 phần kết tủa đến 2-5 phần Nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đậm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án ưu tiên, kết tủa thứ hai được tạo hỗn dịch với tỷ lệ 1 phần kết tủa đến 4-5 phần, tốt hơn nếu 3,5 phần, WFI. Theo một phương án, bước tạo hỗn dịch được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C và 8°C . Theo một phương án, độ pH cuối của dung dịch được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,6, tốt hơn nếu điều chỉnh tới $5,2 \pm 0,2$. Theo một phương án, việc điều chỉnh độ pH này được thực hiện với axit axetic. Theo một phương án, độ dẫn điện của hỗn dịch được tăng đến khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm để làm tăng khả năng hoà tan IgG. Theo một phương án, độ dẫn điện được tăng lên bằng cách bổ sung natri clorua.

Các dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa thứ hai bao gồm WFI và dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 10mS/cm. Theo các phương án khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 9mS/cm, 8mS/cm, 7mS/cm, 6mS/cm, 5mS/cm, 4mS/cm, 3mS/cm, 2mS/cm, hoặc 1mS/cm. Theo một phương án ưu tiên, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 6mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 4mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 2mS/cm.

Theo một phương án, phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, chứa IgG, được tách ra khỏi phần không hòa tan. Theo một phương án, quy trình này được thực hiện bằng cách lọc hỗn dịch bằng thiết bị lọc sâu có kích thước lỗ xốp không đáng kể nằm trong khoảng từ 0,1µm đến 0,4µm. Theo một phương án, kích thước lỗ xốp không đáng kể của thiết bị lọc sâu bằng 0,2µm (ví dụ, thiết bị lọc Cuno VR06 hoặc thiết bị tương tự). Theo một phương án, thiết bị lọc được rửa bằng WFI hoặc dung dịch đệm thích hợp sau khi lọc để thu hồi IgG bổ sung và nước sau khi rửa được bổ sung vào dịch lọc. Theo một phương án ưu tiên, bước rửa sau thiết bị lọc được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm. Theo phương án khác, hỗn dịch thứ hai được ly tâm để thu hồi phần hòa tan.

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp điều chế chế phẩm IgG đã được làm giàu còn bao gồm bước tinh chế ít nhất một yếu tố máu khác từ cùng một vốn Cohn. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm tinh chế ít nhất hai protein khác trong máu từ cùng một vốn Cohn. Theo phương án khác, phương pháp còn bao gồm bước tinh chế ít nhất ba protein khác trong máu từ cùng một vốn Cohn. Theo các phương án khác, phương pháp còn bao gồm tinh chế ít nhất bốn, năm, sáu, hoặc nhiều protein khác trong máu từ cùng một vốn Cohn. Ví dụ về protein trong máu có thể được tinh chế đồng thời từ cùng một vốn Cohn như IgG bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), yếu tố H, protein ức chế inter-alpha (IaIp), phức hợp Prothrombin, yếu tố VII (FVII), yếu tố VIII (FVIII), kháng thrombin III (ATIII), fibrinogen, butyrylcholinesteraza, và các protein khác.

Theo một phương án, alpha-1-kháng trypsin (A1PI) được tinh chế tiếp ra khỏi cùng một vốn Cohn như IgG. Theo phương án cụ thể, A1PI được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo phương án khác, fibrinogen được tinh chế tiếp ra khỏi cùng một vốn Cohn như IgG. Theo phương án cụ thể, fibrinogen được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất. Theo phương án cụ thể khác, cả A1PI lẫn fibrinogen được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo phương án khác, yếu tố H được tinh chế tiếp ra khỏi cùng một vốn Cohn như IgG. Theo phương án cụ thể, yếu tố H được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất. Theo phương án cụ thể khác, cả A1PI lẫn Yếu tố H được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo phương án khác, protein ức chế inter-alpha (IaIp) được tinh chế tiếp ra khỏi cùng một vốn Cohn như IgG. Theo phương án cụ thể, IaIp được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất. Theo phương án cụ thể khác, cả A1PI lẫn IaIp được tinh chế từ phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.

Theo phương án khác, albumin được tinh chế tiếp ra khỏi cùng một vốn Cohn như IgG. Theo phương án cụ thể, albumin được tinh chế từ dịch nổi thứ nhất đã tạo ra. Theo phương án cụ thể, albumin được tinh chế từ dịch nổi thứ nhất thu được, trong khi đó ít nhất một yếu tố máu khác được tinh chế từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất thu được.

Theo một phương án, các globulin miễn dịch thu hồi từ bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao được làm giàu tiếp theo quy trình phân đoạn xuôi dòng Kistler-Nitschmann hoặc Deutsch *et al.*. Ví dụ, chế phẩm globulin miễn dịch đã thu hồi có thể được dùng ở bước tương tự như quy trình làm kết tủa Kistler-Nitschmann B hoặc β -globulin của Deutsch và các đồng tác giả. Các điều kiện đã dùng trong các bước này tạo ra kết tủa α - và β -globulin, trong khi đó globulin miễn dịch G vẫn còn trong dịch nổi.

Do đó, theo một khía cạnh sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm globulin miễn dịch G (IgG) đã làm giàu bao gồm các bước (i) kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn trong quá trình làm kết tủa ở độ pH

ban đầu thấp, nồng độ rượu cao; (ii) thu hồi các globulin miễn dịch từ chất kết tủa; (iii) làm kết tủa ít nhất một protein globulin không phải gamma ra khỏi chế phẩm globulin miễn dịch thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất; và (iv) thu hồi dịch nổi từ bước làm kết tủa thứ hai. Theo một số phương án, phương pháp này có thể còn bao gồm bước làm kết tủa bổ sung (ví dụ, kết tủa chất kết tủa G), bước trao đổi anion và/hoặc cation, một hoặc nhiều bước siêu lọc/lọc thẩm tách, và một hoặc nhiều bước khử hoặc bất hoạt virus (ví dụ, xử lý S/D, lọc nano, ủ ở độ pH thấp, v.v.).

Điều chế chế phẩm Alpha-1-kháng trypsin (A1PI)

Các phương pháp hiện đại để sản xuất protein trong máu từ huyết tương được cho có nguồn gốc từ công trình trong những năm khoảng từ năm 1940 đến năm 1950. Do công trình này chủ yếu hướng tới quá trình tinh chế các globulin miễn dịch albumin và gamma (IgG) nên sơ đồ phân đoạn đã phát triển không được tối ưu hóa để thu hồi các protein khác trong máu, có tầm quan trọng trong điều trị ngày càng lớn. Ví dụ, việc áp dụng cách làm kết tủa ở độ pH ban đầu cao, nồng độ rượu thấp của huyết tương (ví dụ, kết tủa phân đoạn I) làm hao hụt một phần Yếu tố H, Ia₁p, và một số globulin miễn dịch trong chất kết tủa phân đoạn I. Hơn nữa, việc tách riêng các globulin miễn dịch và A1PI được thực hiện bằng các bước làm kết tủa tiếp theo (ví dụ, kết tủa phân đoạn II+III hoặc Kết tủa A) không được hoàn thành, với hao hụt các globulin miễn dịch trong dịch nổi do kết tủa không hoàn toàn và hao hụt A1PI trong chất kết tủa do kết tủa một phần. Do đó, cần có các phương pháp phân đoạn hiện nay tạo ra hiệu suất cao hơn đối với nhiều protein trong máu.

Sáng chế đề xuất phương pháp đáp ứng được các yêu cầu này bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu phân đoạn các globulin miễn dịch, A1PI, và protein khác trong máu trong chất kết tủa ban đầu và albumin trong dịch nổi ban đầu. Theo một phương án ưu tiên, quá trình làm kết tủa này được thực hiện trong điều kiện độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi huyết tương đã gộp lại sử dụng bước đầu tiên kết tủa khỏi globulin miễn dịch và thành phần A1PI của vốn Cohn. Theo phương án cụ thể, bước ban đầu này là bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao. Như được thể hiện trong các ví dụ nêu trong

bản mô tả, hơn 95% A1PI của vốn Cohnban đầu được làm kết tủa trong các điều kiện này. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tách riêng A1PI và các globulin miễn dịch một cách hữu hiệu trong quá trình làm kết tủa ban đầu này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm alpha-1-kháng trypsin (A1PI) đã làm giàu từ vốn Cohn, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; hòa tan các globulin miễn dịch có mặt trong kết tủa thứ nhất, để tạo ra hỗn dịch thứ nhất có phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan chứa A1PI; tách riêng các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; và thu hồi A1PI từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Nói chung, các phương pháp làm kết tủa bất kỳ để làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm kết tủa bằng rượu (ví dụ, sử dụng etanol hoặc metanol), làm kết tủa bằng cách sử dụng polyme hòa tan trong nước (ví dụ, PEG hoặc dextran), và làm kết tủa bằng muối (ví dụ, sử dụng amoni phosphat, amoni sulfat, natri xitrat, v.v.). Theo một phương án ưu tiên, quy trình làm kết tủa là làm kết tủa bằng rượu, tốt hơn là làm kết tủa bằng etanol.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm A1PI đã được làm giàu bằng cách làm kết tủa A1PI ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao. Theo phương án cụ thể, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa A1PI ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào huyết tương đã tách tủa lạnh để thu được nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi A1PI từ chất kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, A1PI thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp.

Theo một phương án, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước tách thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối và pH được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi A1PI từ chất kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Theo một phương án, A1PI thu hồi được từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp.

Theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện bằng cách phối trộn etanol với vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 22% đến 28% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 2\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 1\%$ (thể tích). Theo phương án khác, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Tương tự theo một phương án, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,5$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,4$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,3$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$. Theo phương án khác, bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng 5,5. Theo các phương án khác, nồng độ etanol cuối và giá trị pH của bước làm kết tủa thứ nhất được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Phương pháp theo sáng chế tạo ra hiệu suất thu hồi A1PI cao hơn đáng kể trong thành phẩm làm giàu do làm kết tủa phần lớn thành phần A1PI của vốn Cohn ban đầu trong phản ứng kết tủa ban đầu, so với quy trình tinh chế đã biết dựa vào các bước làm kết tủa ở nồng độ rượu thấp ban đầu (*tức là*, kết tủa phân đoạn I).

Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, ít nhất 80% lượng alpha-1-kháng trypsin (A1PI) của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban

đầu. Theo một phương án ưu tiên, ít nhất 90% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một phương án ưu tiên hơn nữa, ít nhất 95% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo phương án ưu tiên nhất, ít nhất 97% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu. Theo một số phương án, ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc nhiều hơn hàm lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu được làm kết tủa trong phản ứng kết tủa ban đầu.

Như được thể hiện trong các ví dụ nêu trong bản mô tả, việc áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao (*tức là*, kết tủa phân đoạn I-IV-1) làm kết tủa ít nhất 95% lượng A1PI của vốn Cohn ban đầu. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm A1PI đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất; và thu hồi A1PI từ chất kết tủa thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, A1PI thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm A1PI đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; hòa tan các globulin miễn dịch có mặt trong kết tủa thứ nhất, để tạo ra hỗn dịch thứ nhất có phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan chứa A1PI; tách riêng các phần hòa

tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; và thu hồi A1PI từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Theo một phương án, các globulin miễn dịch thu hồi từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi phần đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm A1PI đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; hòa tan các globulin miễn dịch có mặt trong kết tủa thứ nhất, để tạo ra hỗn dịch thứ nhất có phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan chứa A1PI; tách riêng phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất; và thu hồi A1PI từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, các globulin miễn dịch thu hồi từ phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin đã tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% globulin miễn dịch của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH ở bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7.

Theo một phương án, kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch trong nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có cường độ ion thấp thích hợp để chiết các globulin miễn dịch from chất kết tủa, hỗn dịch tiếp đó được xử lý bằng silic đioxit (SiO_2) đã được nghiền mịn, và phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch được tách ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch chứa lượng khối A1PI.

Các dung dịch thích hợp để chiết các globulin miễn dịch từ chất kết tủa thứ nhất thường có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 và 5,5. Theo một số phương án, dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0, theo các phương án khác, dung dịch chiết có độ pH bằng khoảng 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, hoặc 5,5. Theo một phương án ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,7 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,8 \pm 0,1$. Theo phương án ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng $4,9 \pm 0,1$. Nói chung, các yêu cầu về độ pH này có thể được đáp ứng bằng cách sử dụng dung dịch đệm được chọn từ, ví dụ, axetat, xitrat, monobazơ phosphat, đibazơ phosphat, hỗn hợp của chúng, và các dung dịch tương tự. Nồng độ dung dịch đệm thích hợp thường nằm trong khoảng từ 5mM đến 100mM, hoặc nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM, hoặc bằng 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM, hoặc 100mM.

Tốt hơn nếu dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2,0mS/cm. Ví dụ, theo một số phương án, độ dẫn điện của dung dịch đệm chiết bằng $0,5 \pm 0,1$ mS/cm, hoặc $0,6 \pm 0,1$ mS/cm, $0,7 \pm 0,1$ mS/cm, $0,8 \pm 0,1$ mS/cm, $0,9 \pm 0,1$ mS/cm, $1,0 \pm 0,1$ mS/cm, $1,1 \pm 0,1$ mS/cm, $1,2 \pm 0,1$ mS/cm, $1,3 \pm 0,1$ mS/cm, $1,4 \pm 0,1$ mS/cm, $1,5 \pm 0,1$ mS/cm, $1,6 \pm 0,1$ mS/cm, $1,7 \pm 0,1$ mS/cm, $1,8 \pm 0,1$ mS/cm, $1,9 \pm 0,1$ mS/cm, hoặc $2,0 \pm 0,1$ mS/cm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách tạo ra các dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện thích hợp. Theo một phương án cụ thể, dung dịch đệm chiết chứa 5mM monobazơ natri phosphat và 5mM axetat ở độ pH bằng $4,8 \pm 0,2$ và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm đến 0,9mS/cm.

Theo một phương án, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung trước khi tách riêng (ví dụ, lọc hoặc ly tâm) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến

100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo phương án khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đến 80g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một số phương án, silic đioxit sinh nhiệt có thể được bổ sung vào ở nồng độ khoảng 20g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1, hoặc khoảng 25g/kg, 30g/kg, 35g/kg, 40g/kg, 45g/kg, 50g/kg, 55g/kg, 60g/kg, 65g/kg, 70g/kg, 75g/kg, 80g/kg, 85g/kg, 90g/kg, 95g/kg, hoặc 100g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo một phương án đặc biệt, silic đioxit sinh nhiệt (ví dụ, Aerosil 380 hoặc chất tương tự) được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ cuối 40 ± 20 g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Theo phương án cụ thể khác, silic đioxit sinh nhiệt được bổ sung vào hỗn dịch phân đoạn I-IV-1 để thu được nồng độ cuối 40 ± 10 g/kg chất kết tủa phân đoạn I-IV-1. Tiến hành trộn cố định 2°C đến 8°C trong thời gian ít nhất 50 phút đến 70 phút.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm A1PI đã được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI; và thu hồi A1PI từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, từ đó tạo ra chế phẩm A1PI đã được làm giàu. Theo một phương án, ethanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, các globulin miễn dịch thu hồi từ chất kết tủa thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI được loại ra khỏi hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo một số phương án, nồng độ ethanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% lượng globulin miễn dịch của vốn Cohn được làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất. Theo phương án cụ thể, phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách

riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 cuối bằng $40 \pm 10 \text{g/kg}$.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm A1PI đã được làm giàu, phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa từ 95% đến 100% globulin miễn dịch và A1PI ra khỏi vốn Cohn trong bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch chứa các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch chứa A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp, và tiếp theo trong đó từ 80% đến 100% albumin của vốn Cohn có mặt trong dịch nổi thứ nhất. Theo một phương án, etanol được phối trộn với vốn Cohn đến nồng độ cuối bằng $25 \pm 3\%$ (thể tích). Theo một phương án, các globulin miễn dịch có mặt trong phần hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, A1PI có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, fibrinogen có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, yếu tố H có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác, IaIp có mặt trong phần không hòa tan của hỗn dịch được làm giàu tiếp. Theo phương án khác nữa, albumin được tìm thấy trong dịch nổi thứ nhất được làm giàu tiếp. Theo một phương án ưu tiên, từ 99% đến 100% globulin miễn dịch của vốn Cohn được làm kết tủa trong bước làm kết tủa thứ nhất. Theo một số phương án, nồng độ etanol cuối và độ pH đã dùng trong bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao được chọn từ các biến thể 1 đến 2166, như được liệt kê trong Bảng 1, Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, và Bảng 7. Theo phương án cụ thể, các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách riêng bằng cách lọc. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào đến nồng độ chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 cuối bằng $40 \pm 10 \text{g/kg}$.

Theo một phương án, phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất, chứa IgG, được tách ra khỏi phần không hòa tan, chứa A1PI bằng cách lọc hỗn dịch bởi thiết bị lọc sâu có kích

thước lỗ xốp không đáng kể nằm trong khoảng từ $0,1\mu\text{m}$ đến $0,4\mu\text{m}$. Theo một phương án, kích thước lỗ xốp không đáng kể của thiết bị lọc sâu bằng $0,2\mu\text{m}$ (ví dụ, thiết bị lọc Cuno VR06 hoặc thiết bị tương tự). Theo một phương án, thiết bị lọc được rửa bằng WFI hoặc dung dịch đệm thích hợp sau khi lọc để thu hồi IgG khác và nước sau khi rửa được bổ sung vào dịch lọc. Theo phương án khác, hỗn dịch thứ nhất được ly tâm để tách riêng phần hòa tan và phần không hòa tan.

Theo một phương án, A1PI được thu hồi từ phần không hòa tan đã tách riêng bằng cách tạo hỗn dịch phần không hòa tan trong dung dịch đệm chiết A1PI. Ví dụ, theo một phương án, phần không hòa tan đã tách riêng được tạo hỗn dịch theo tỷ lệ 1 phần nguyên liệu không tan với 2 đến 15 phần nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp, để tạo ra hỗn dịch thứ hai. Theo phương án khác, phần không hòa tan đã tách riêng được tạo hỗn dịch theo tỷ lệ 1 phần nguyên liệu không tan với 2 đến 10 phần Nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp. Theo phương án khác, phần không hòa tan đã tách riêng được tạo hỗn dịch theo tỷ lệ 1 phần nguyên liệu không tan với 3 đến 7 phần nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp. Theo các phương án khác, phần không hòa tan đã tách riêng được tạo hỗn dịch theo tỷ lệ 1 phần nguyên liệu không tan với 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 phần nước dùng để tiêm (WFI) hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp, hoặc nhiều hơn. Theo một phương án, chiết được khuấy trong thời gian ít nhất 2 giờ. Theo phương án khác, chiết được khuấy trong thời gian ít nhất 4 giờ. Theo phương án khác, chiết được khuấy trong thời gian ít nhất 8 giờ. Theo phương án khác, chiết được khuấy trong thời gian từ 6 giờ đến 12 giờ. Theo một phương án, chiết được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10°C đến 25°C . Theo phương án khác, chiết được thực hiện ở $17\pm 5^{\circ}\text{C}$. Theo phương án khác, chiết được thực hiện ở $17\pm 4^{\circ}\text{C}$. Theo phương án khác, chiết được thực hiện ở $17\pm 3^{\circ}\text{C}$. Theo phương án khác, chiết được thực hiện ở $17\pm 2^{\circ}\text{C}$. Theo phương án khác, chiết được thực hiện ở $17\pm 1^{\circ}\text{C}$. Theo một phương án, phần hòa tan chứa A1PI được tách ra khỏi phần không hòa tan bằng cách lọc, ví dụ, thiết bị lọc sâu. Theo phương án khác, phần hòa tan chứa A1PI được tách ra khỏi phần không hòa tan bằng cách ly tâm.

Các dung dịch thích hợp để chiết A1PI chứa WFI và dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp. Theo một phương án, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 10 mS/cm. Theo các phương án khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 9 mS/cm, 8 mS/cm, 7 mS/cm, 6 mS/cm, 5 mS/cm, 4 mS/cm, 3 mS/cm, 2 mS/cm, hoặc 1 mS/cm. Theo một phương án ưu tiên, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 6 mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 4 mS/cm. Theo phương án ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ dẫn điện thấp hơn 2 mS/cm. Theo một phương án, the WFI hoặc dung dịch đệm có độ dẫn điện thấp có độ pH nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,5. Theo phương án cụ thể, độ pH của dung dịch đệm chiết A1PI bằng $8,8 \pm 0,5$. Theo phương án cụ thể, độ pH của dung dịch đệm chiết A1PI bằng $8,8 \pm 0,4$. Theo phương án cụ thể, độ pH của dung dịch đệm chiết A1PI bằng $8,8 \pm 0,3$. Theo phương án cụ thể, độ pH của dung dịch đệm chiết A1PI bằng $8,8 \pm 0,2$. Theo phương án cụ thể, độ pH của dung dịch đệm chiết A1PI bằng $8,8 \pm 0,1$. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch đệm chiết A1PI bằng $8,0 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$, $8,2 \pm 0,2$, $8,3 \pm 0,2$, $8,4 \pm 0,2$, $8,5 \pm 0,2$, $8,6 \pm 0,2$, $8,7 \pm 0,2$, $8,8 \pm 0,2$, $8,9 \pm 0,2$, $9,0 \pm 0,2$, $9,1 \pm 0,2$, $9,2 \pm 0,2$, $9,3 \pm 0,2$, $9,4 \pm 0,2$, hoặc $9,5 \pm 0,2$.

Theo một phương án, phần không hòa tan đã tách riêng của hỗn dịch thứ nhất được tạo hỗn dịch trong WFI hoặc dung dịch đệm có cường độ ion thấp là không thích hợp để chiết A1PI để tạo ra hỗn dịch trung gian, trước khi chiết sử dụng dung dịch đệm A1PI. Theo phương án này, phương pháp bao gồm bước tạo hỗn dịch phần không hòa tan trong WFI hoặc dung dịch đệm có cường độ ion thấp ở độ pH không lớn hơn 7,0; tách riêng các phần hòa tan và phần không hòa tan của hỗn dịch trung gian; và thu hồi A1PI trong phần không hòa tan của hỗn dịch trung gian. Theo một phương án, hỗn dịch trung gian được tạo ra bằng cách tạo hỗn dịch nguyên liệu không tan theo tỷ lệ 1 phần nguyên liệu không tan với 2 đến 15 phần WFI hoặc dung dịch đệm. Theo một phương án, WFI hoặc dung dịch đệm có cường độ ion thấp có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5. Theo phương án khác, dung dịch đệm có cường độ ion thấp có độ pH bằng $5,5 \pm 0,4$. Theo phương án khác, dung dịch đệm có cường độ ion thấp có độ pH bằng $5,5 \pm 0,3$. Theo phương án khác, dung dịch đệm có cường độ ion thấp có độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$. Theo phương án khác, dung dịch đệm có cường độ ion thấp có độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$. Theo các phương án khác, dung dịch đệm có cường độ

ion thấp có độ pH bằng $4,5 \pm 0,2$, $4,6 \pm 0,2$, $4,7 \pm 0,2$, $4,8 \pm 0,2$, $4,9 \pm 0,2$, $5,0 \pm 0,2$, $5,1 \pm 0,2$, $5,2 \pm 0,2$, $5,3 \pm 0,2$, $5,4 \pm 0,2$, $5,5 \pm 0,2$, $5,6 \pm 0,2$, $5,7 \pm 0,2$, $5,8 \pm 0,2$, $5,9 \pm 0,2$, $6,0 \pm 0,2$, $6,1 \pm 0,2$, $6,2 \pm 0,2$, $6,3 \pm 0,2$, $6,4 \pm 0,2$, hoặc $6,5 \pm 0,2$. Theo một phương án, phần hòa tan đã tách ra khỏi phần không hòa tan chứa A1PI bằng cách lọc, ví dụ, thiết bị lọc sâu. Theo phương án khác, phần hòa tan được tách ra khỏi phần không hòa tan chứa A1PI bằng cách ly tâm.

Theo một phương án, A1PI đã chiết từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi anion, sắc ký trao đổi cation, sắc ký tương tác kỵ nước (HIC), sắc ký hydroxyapatit (HAP), sắc ký ái lực Protein, sắc ký ái lực miễn dịch, sắc ký ngoại cỡ, v.v.); lọc (ví dụ, siêu lọc và/hoặc lọc thẩm tách); và một hoặc nhiều bước khử virus (ví dụ, lọc nano, xử lý bằng dung môi và chất làm sạch, chiếu tia UV, xử lý nhiệt, ủ ở độ pH thấp, v.v.).

Theo một phương án, A1PI đã chiết từ phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được làm giàu tiếp bằng cách phân đoạn. Nói chung, phương pháp phân đoạn bất kỳ (ví dụ, làm kết tủa bằng rượu hoặc polyme, làm kết tủa bằng muối, v.v.) có thể được áp dụng. Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm được làm giàu tiếp bằng cách làm kết tủa A1PI ra khỏi dung dịch đã được chiết sạch bằng cách sử dụng cation hóa trị hai, tốt hơn là kẽm. Theo một phương án, kẽm clorua được bổ sung vào dung dịch đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1mM đến 15mM. Theo phương án cụ thể, kẽm clorua được bổ sung vào dung dịch đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1mM đến 4mM. Theo một phương án cụ thể hơn, kẽm clorua được bổ sung vào dung dịch đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 2,0mM đến 3,0mM.

Theo một số phương án, A1PI được làm giàu tiếp theo phương pháp tinh chế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, chúng được mô tả trong WO 1995/35306, WO 1998/00154, và các patent Mỹ số 5,981,715; 7,807,435; và 7,879,800, nội dung của các tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích.

Dược phẩm

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa các protein có nguồn gốc từ huyết tương được bào chế theo phương pháp bất kỳ đã nêu trong bản mô tả. Theo một số phương án, các chế phẩm này được bào chế để dùng cho dược phẩm (tức là, dược phẩm).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm protein có nguồn gốc từ huyết tương được điều chế theo phương pháp bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; hòa tan các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất để tạo rphần tan của hỗn dịch bao gồm các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch bao gồm A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và IaIp; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch. Theo một số phương án, chế phẩm chứa protein có nguồn gốc từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, protein của hệ thống bổ sung, và protein ức chế inter-alpha-trypsin (IaI).

Nói chung, các phương pháp làm kết tủa bất kỳ để làm kết tủa các globulin miễn dịch và A1PI có thể được áp dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, làm kết tủa bằng rượu (ví dụ, sử dụng etanol hoặc metanol), làm kết tủa bằng cách sử dụng polyme hòa tan trong nước (ví dụ, PEG hoặc dextran), và làm kết tủa bằng muối (ví dụ, sử dụng amoni phosphat, amoni sulfat, natri xitrat, v.v.). Theo một phương án ưu tiên, quy trình làm kết tủa là làm kết tủa bằng rượu, tốt hơn là làm kết tủa bằng etanol.

Theo một phương án, chế phẩm được bào chế để dùng trong dược phẩm. Theo phương án cụ thể, dược phẩm được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm được bào chế để dùng qua đường trong cơ. Theo phương án khác, chế phẩm được bào chế để dùng qua đường dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm được bào chế để dùng cho mắt.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế được bào chế bằng cách tạo ra chế phẩm protein có nguồn gốc từ huyết tương đã phân lập bằng cách áp dụng phương pháp

theo sáng chế. Nói chung, dược phẩm đã bào chế được dùng ít nhất một, tốt hơn là ít nhất hai, tốt nhất là ít nhất ba bước làm bất hoạt hoặc loại bỏ virus. Các ví dụ không giới hạn về các bước làm bất hoạt hoặc loại bỏ virus có thể được dùng theo phương pháp theo sáng chế bao gồm, xử lý bằng dung môi làm sạch (Horowitz et al., *Blood Coagul fibrinogenolysis* 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 và Kreil et al., *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, cả hai tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích), lọc nano (Hamamoto et al., *Vox Sang* 1989 (56)230-236 và Yuasa et al., *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, cả hai tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mọi mục đích), và được ủ ở độ pH thấp ở nhiệt độ cao (Kempf et al., *Transfusion* 1991 (31)423-427 và Louie et al., *Biologicals* 1994 (22):13-19). Theo một số phương án, chế phẩm chứa protein có nguồn gốc từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, protein của hệ thống bổ sung, và protein ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều dung dịch đệm hoặc chất ổn định pH thích hợp để dùng trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, và/hoặc để dùng trong mắt. Các ví dụ không giới hạn về dung dịch đệm thích hợp để bào chế chế phẩm protein có nguồn gốc từ huyết tương nêu trong bản mô tả bao gồm glyxin, xitrat, phosphat, axetat, glutamat, tartrat, benzoat, lactat, histidin hoặc các axit amin khác, gluconat, malat, suxinat, format, propionat, cacbonat, hoặc dạng kết hợp bất kỳ được điều chỉnh đến giá trị thích hợp. Nói chung, dung dịch đệm là đủ để duy trì độ pH thích hợp của dược phẩm trong thời gian dài. Theo một phương án ưu tiên, dung dịch đệm là glyxin. Theo một số phương án, chế phẩm chứa protein có nguồn gốc từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, protein của hệ thống bổ sung, và protein ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể tùy ý còn chứa chất điều chỉnh nồng độ osmol/lít của dược phẩm này. Các ví dụ không giới hạn về chất điều chỉnh osmol/lít bao gồm mannitol, sorbitol, glyxerol, sucroza, glucoza, dextroza, levuloza, fructoza, lactoza, polyetylen glycol, phosphat, natri clorua, kali clorua, canxi clorua, canxi gluconoglucoheptonat, dimetyl sulfon, và các chất tương tự.

Thông thường, dược phẩm theo sáng chế có nồng độ osmol/lít ngang bằng nồng độ osmol/lít sinh lý, nằm trong khoảng từ 285mOsmol/kg đến 295mOsmol/kg (Lacy et al., *Drug Information Handbook – Lexi-Comp* 1999:1254. Theo một số phương án, nồng độ osmol/lít của dược phẩm nằm trong khoảng từ 200mOsmol/kg đến 350mOsmol/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 240mOsmol/kg đến 300mOsmol/kg. Theo các phương án cụ thể, nồng độ osmol/lít của dược phẩm bằng khoảng 200mOsmol/kg, hoặc 210mOsmol/kg, 220mOsmol/kg, 230mOsmol/kg, 240mOsmol/kg, 245mOsmol/kg, 250mOsmol/kg, 255mOsmol/kg, 260mOsmol/kg, 265mOsmol/kg, 270mOsmol/kg, 275mOsmol/kg, 280mOsmol/kg, 285mOsmol/kg, 290mOsmol/kg, 295mOsmol/kg, 300mOsmol/kg, 310mOsmol/kg, 320mOsmol/kg, 330mOsmol/kg, 340mOsmol/kg, 340mOsmol/kg, hoặc 350mOsmol/kg.

Dược phẩm có nguồn gốc từ huyết tương theo sáng chế thường là ổn định ở dạng lỏng trong thời gian dài. Theo một số phương án, dược phẩm là ổn định trong ít nhất khoảng 3 tháng ở nhiệt độ trong phòng, hoặc ít nhất khoảng 4 tháng, 5 tháng, 6 tháng, 7 tháng, 8 tháng, 9 tháng, 10 tháng, 11 tháng, 12 tháng, 13 tháng, 14 tháng, 15 tháng, 16 tháng, 17 tháng, 18 tháng, 19 tháng, 20 tháng, 21 tháng, 22 tháng, 23 tháng, hoặc 24 tháng ở nhiệt độ trong phòng. Dược phẩm thường ổn định trong 6 tháng hoặc ít nhất khoảng 18 tháng trong các điều kiện lạnh (thường nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C), hoặc trong ít nhất khoảng 21 tháng, 24 tháng, 27 tháng, 30 tháng, 33 tháng, 36 tháng, 39 tháng, 42 tháng, hoặc 45 tháng trong các điều kiện lạnh.

Phương pháp điều trị

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất liệu hữu hiệu điều trị của protein có nguồn gốc từ huyết tương đã được điều chế theo phương pháp theo sáng chế để sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan tới thiếu hụt hoặc rối loạn chức năng protein trong máu ở đối tượng cần được điều trị. Theo một số phương án, chế phẩm chứa protein có nguồn gốc từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, protein của hệ bổ sung, và protein ức chế inter-alpha-trypsin (IαI).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm protein có nguồn gốc từ huyết tương đã điều chế theo phương pháp theo sáng chế để sản xuất thuốc sử dụng trong điều trị tình trạng bệnh lý liên quan tới thiếu hụt hoặc khiếm khuyết protein trong máu. Theo một số phương án, protein có nguồn gốc từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, protein hệ bổ sung, và protein ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một phương án, chế phẩm protein có nguồn gốc từ huyết tương được điều chế theo phương pháp này bao gồm các bước: làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn, trong bước làm kết tủa thứ nhất, để tạo ra chất kết tủa thứ nhất và dịch nổi thứ nhất; tạo hỗn dịch kết tủa thứ nhất để tạo ra hỗn dịch thứ nhất; hòa tan các globulin miễn dịch từ hỗn dịch thứ nhất để tạo phần tan của hỗn dịch bao gồm các globulin miễn dịch và phần không hòa tan của hỗn dịch bao gồm A1PI, fibrinogen, yếu tố H, và I α P; và tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch từ phần không hòa tan của hỗn dịch. Theo một số phương án, chế phẩm chứa protein có nguồn gốc từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, yếu tố H, protein của hệ thống bổ sung, và protein ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – NG2 C91

Chế phẩm globulin miễn dịch G (IgG) được sản xuất trên quy mô thương mại bằng cách phân đoạn huyết tương thông qua dãy phản ứng kết tủa. Theo phương pháp thông thường, các tạp chất được làm kết tủa ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh chứa globulin miễn dịch trong bước làm kết tủa bằng rượu thứ nhất. Tiếp đó, các globulin miễn dịch IgG được làm kết tủa ra khỏi dịch nổi thu được và được làm giàu tiếp. Để làm tăng hiệu suất IgG thu hồi từ huyết tương của người trong quá trình phân đoạn rượu, độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0 và nồng độ etanol nằm trong khoảng từ 20% đến 25% được thử nghiệm trong phản ứng kết tủa IgG.

Tóm lại, dịch nổi phân đoạn I, chất trung gian dùng trong quy trình sản xuất thương mại globulin miễn dịch G (IgG) có nguồn gốc từ huyết tương, alpha-1-kháng trypsin (A1PI), và các sản phẩm albumin, được tạo ra bằng cách phối trộn etanol ở nồng độ cuối 8% (thể tích) vào huyết tương đã tách tủa lạnh ở độ pH bằng $7,2 \pm 0,2$, ủ hỗn hợp ở 0°C , và tách riêng chất kết tủa đã tạo ra (Phân đoạn I) ra khỏi dịch nổi (Phân đoạn I dịch nổi). Dịch nổi phân đoạn I thu được tiếp đó được chia thành các mẫu 600g. độ pH của từng mẫu được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7,0 và etanol được phối trộn đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 25%, như được thể hiện trong Bảng 9.

Như được thể hiện trong Bảng 9, các điều kiện tương tự như các điều kiện đã sử dụng để điều chế kết tủa phân đoạn Cohn II+III kết tủa truyền thống (25% etanol; độ pH 6,8) và kết tủa phân đoạn II+III cải biến đã sử dụng trong quy trình sản xuất GAMMAGARD LIQUID® (Baxter International; Deerfield, IL) làm hao hụt 2,9% và 6,7% IgG toàn phần trong dịch nổi, do quy trình làm kết tủa không hoàn toàn. Tuy nhiên, nhận thấy rằng bằng cách làm giảm độ pH của phản ứng xuống 6,0 hoặc thấp hơn và sử dụng nồng độ etanol cuối ít nhất bằng 22,5%, mức hao hụt IgG được giảm xuống một cách đáng kể. Ví dụ, sử dụng 22,5% rượu ở độ pH bằng 5,5 làm cho mức hao hụt chỉ bằng 0,4% IgG toàn phần trong dịch nổi. Tương tự, sử dụng 25% rượu ở độ pH 6,0 hoặc 5,5 làm cho mức hao hụt chỉ bằng 0,5% và 0,1% IgG toàn phần trong dịch nổi. Như được thể hiện trong Bảng 10, kết quả này tương đương với mức tăng hơn 300mg IgG/l huyết tương và 125mg IgG/l huyết tương trong chất kết tủa so với chất kết tủa phân đoạn II+III truyền thống và cải biến, tương ứng.

Bảng 9. Hiệu suất protein trong dịch nổi kết tủa, được thể hiện bằng hàm lượng protein của nguyên liệu ban đầu (dịch nổi phân đoạn I) tính theo tỷ lệ phần trăm

EtOH (%)	pH	Protein biuret	IgG ELISA	IgA ELISA	IgM ELISA	Fibrinogen ELISA	Transferrin ELISA	a1-kháng trypsin ELISA	Albumin neph
20	5,5	60,8	1,1	3,5	0,2	0,2	73,9	6,1	93,1

20	6	68,0	2,9	12,8	0,5	0,2	94,3	38,9	92,4
20	6,5	70,0	4,1	20,6	1,0	0,7	100,2	63,2	97,4
20	7	73,0	6,7	45,8	1,9	4,6	98,4	76,9	96,5
22,5	5,5	56,7	0,4	1,2	0,1	0,2	47,5	1,1	90,6
22,5	6	64,6	1,1	4,8	0,4	0,4	78,2	21,7	98,0
22,5	6,5	68,0	1,8	9,0	0,6	0,4	85,9	27,3	96,6
22,5	7	70,3	3,0	19,4	1,2	0,9	97,3	27,1	96,5
25	5,5	45,6	0,1	0,6	0,0	0,2	8,6	0,8	76,8
25	6	60,2	0,5	1,4	0,3	0,3	59,2	7,6	92,9
25	6,5	66,9	2,2	5,7	1,6	1,7	86,0	18,3	95,6
25	7	67,8	2,9	8,5	2,3	1,7	95,1	18,9	96,5

Bảng 10. Hiệu suất protein trong dịch nổi kết tủa, được thể hiện bằng g/l huyết tương.

EtOH (%)	pH	Protein biuret	IgG ELISA	IgA ELISA	IgM ELISA	Fibrinogen ELISA	Transferin ELISA	α 1- kháng trypsin ELISA	Albumin neph
20	5,5	26,457	0,061	0,045	0,001	0,000	1,327	0,071	29,402
20	6	29,603	0,157	0,162	0,002	0,001	1,692	0,459	29,174
20	6,5	30,445	0,223	0,261	0,004	0,002	1,799	0,745	30,737

20	7	31,792	0,368	0,579	0,008	0,012	1,765	0,907	30,460
22,5	5,5	24,673	0,021	0,015	0,000	0,000	0,852	0,013	28,591
22,5	6	28,095	0,062	0,061	0,002	0,001	1,403	0,255	30,946
22,5	6,5	29,577	0,097	0,114	0,002	0,001	1,542	0,322	30,488
22,5	7	30,609	0,165	0,246	0,005	0,001	1,747	0,320	30,455
25	5,5	19,833	0,004	0,007	0,000	0,000	0,155	0,009	24,263
25	6	26,212	0,025	0,018	0,001	0,001	1,062	0,089	29,325
25	6,5	29,097	0,119	0,072	0,006	0,004	1,795	0,215	30,198
25	7	29,512	0,157	0,107	0,009	0,004	1,706	0,223	30,458

Ví dụ 2 – NG2 C96

Việc so sánh thử nghiệm của sơ đồ tinh chế IgG thực hiện cùng với và không cùng với việc làm kết tủa bằng etanol 8% ban đầu được thực hiện để xác định xem mức tăng tiếp về khả năng thu hồi IgG có thể thu được bằng cách làm kết tủa ở độ pH thấp (5,5), nồng độ etanol cao (25%) hay không, như đã được phác thảo trong Ví dụ 1.

Tóm lại, 100kg huyết tương đã tách tủa lạnh được xử lý với (NG2C96/1) hoặc không có (NG2C96/2), bước làm kết tủa ban đầu (Phân đoạn I) được thực hiện bằng cách sử dụng etanol ở nồng độ cuối 8% (thể tích) độ pH 7,4 và 0°C. Độ pH của huyết tương đã tách tủa lạnh (NG2C96/1) hoặc dịch nổi phân đoạn I (NG2C96/2) được điều chỉnh đến pH 5,5±0,1 và etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng 25% (thể tích). Hỗn hợp tiếp đó được ủ ở -5±2°C trong thời gian 5 giờ để cho phép kết tủa protein. Các chất kết tủa thu được (kết tủa (I)+II+III) và dịch nổi (dịch nổi (I)+II+III) được tách bằng cách ly tâm. Do phạm vi của phản ứng kết tủa, cần có hai lần ly tâm đối với mỗi phản ứng. Các chất kết tủa thu được từ mỗi lần ly tâm được xử lý riêng rẽ.

Các chất kết tủa được tạo hỗn dịch trong dung dịch đệm chứa 5mM mononatri phosphat, 5mM natri axetat, và 600mg/l axit axetic bằng với tỷ lệ 1 phần kết tủa trên 15 phần đệm, độ pH được điều chỉnh đến $4,8 \pm 0,2$, và được khuấy để chiết protein trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến 8°C . Sau khi ủ chiết, 40g silic đioxit sinh nhiệt (SiO_2)/kg chất kết tủa (I)+II+III được phối trộn vào hỗn hợp phản ứng và được khuấy trong thời gian 50 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến 8°C . 400g chất trợ lọc Cellpure/kg chất kết tủa (I)+II+III tiếp theo được phối trộn và các hỗn hợp phản ứng được lọc thông qua màng Cuno 50SA để loại bỏ nguyên liệu không tan, để tạo ra dịch lọc (I)+II+III và bánh lọc. Bánh lọc được rửa bằng dung dịch đệm chứa 5mM mononatri phosphat, 5mM natri axetat, và 150mg/l axit axetic bằng, dịch lọc của hỗn hợp trên được bổ sung dịch lọc (I)+II+III.

Polysorbat 80 được bổ sung vào dịch lọc để thu được nồng độ cuối 0,2% (khối lượng/khối lượng) và các dung dịch được ủ trong thời gian 30 phút. Natri xitrat đihydrat tiếp đó được bổ sung vào các dung dịch đến nồng độ cuối 0,8% (khối lượng/khối lượng) và dung dịch được ủ trong thời gian 30 phút nữa. Sau khi ủ lần thứ hai, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 7,0 bằng cách sử dụng natri hydroxit và etanol được phối trộn đến nồng độ cuối bằng 25%. Nhiệt độ được hạ đến khoảng từ 0°C đến -10°C để làm kết tủa. Chất kết tủa (PptG) và dịch nổi (dịch nổi PptG) được tách bằng cách ly tâm.

Các thành phần globulin miễn dịch IgG, IgA, và IgM của mỗi bước phụ trong các phản ứng tinh chế được xác định. Như được thể hiện trong .

Bảng 11, việc loại bỏ bước làm kết tủa phân đoạn I ban đầu làm tăng hiệu suất IgG lên một cách đáng kể trong thành phẩm (so sánh PptG đã hòa tan NG2C96/2 (không có quá trình làm kết tủa phân đoạn I) với NG2C96/1 (có quá trình làm kết tủa phân đoạn I)).

Tương tự, các thành phần IgA (Bảng 12) và IgM (Bảng 13

Bảng 13) của phân đoạn PptG đã hòa tan được tạo ra mà không cần bước làm kết tủa phân đoạn I ban đầu.

Đáng chú ý, bước làm kết tủa phân đoạn I được sử dụng một phần để loại bỏ fibrinogen ra khỏi chế phẩm chứa globulin miễn dịch. Mặc dù hàm lượng fibrinogen cuối

của phân đoạn PptG đã hòa tan đã tạo ra mà không cần bước làm kết tủa phân đoạn I ban đầu lớn hơn khoảng 6 lần so với hàm lượng của phân đoạn PptG đã tạo ra mà vẫn có bước làm kết tủa phân đoạn I ban đầu, nhưng sơ đồ phân đoạn đã loại bỏ hơn 99% lượng fibrinogen có mặt trong huyết tương đã tách tủa lạnh nguyên liệu ban đầu (Bảng 14).

Bảng 11. Hàm lượng IgG, tính theo g/l huyết tương khô đầu, của các phân đoạn khác nhau đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao có hoặc không có bước làm kết tủa phân đoạn I ở nồng độ etanol 8% ban đầu.

	IgG			
	g/l Huyết tương			
	NG2C96/1	NG2C96/1 B	NG2C96/2	NG2C96/2 B
	Kết tủa II+III		Kết tủa I+II+III	
Huyết tương	5,36		5,36	
Dịch nổi I	5,32		-	
Dịch nổi hòa tan Ppt I	0,11		-	
Dịch nổi (I)+II+III	0,004		0,007	
Hỗn dịch (I)+II+III	4,37	4,72	5,07	4,40
Dịch lọc (I)+II+III	4,55	5,33	5,36	4,77
Dịch nổi hòa tan bánh lọc	0,10	0,18	0,08	0,10
Dịch nổi PptG	0,08	0,06	0,09	0,05
PptG được hòa tan	4,03	-	5,03	-

Bảng 12. Hàm lượng IgA, tính theo g/l huyết tương khô đầu, của các phân đoạn khác nhau đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao có hoặc không có bước làm kết tủa phân đoạn I ở nồng độ etanol 8% ban đầu.

	IgA			
	g/l Huyết tương			
	NG2C96/1	NG2C96/1 B	NG2C96/2	NG2C96/2 B
	Kết tủa II+III		Kết tủa I+II+III	
Huyết tương	1,20		1,20	
Dịch nổi I	1,14		-	
Dịch nổi hòa tan Ppt I	-		-	
Dịch nổi (I)+II+III	0,001		0,002	
Hỗn dịch (I)+II+III	0,92	1,37	1,08	1,21
Dịch lọc (I)+II+III	0,80	1,02	1,01	0,96
Dịch nổi hòa tan bánh lọc	-	-	-	-
Dịch nổi PptG	-	-	-	-
PptG được hòa tan	0,66	-	0,79	-

Bảng 13. Hàm lượng IgM, tính theo g/l huyết tương khối đầu, của các phân đoạn khác nhau đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao có hoặc không có bước làm kết tủa phân đoạn I ở nồng độ etanol 8% ban đầu.

	IgM			
	g/l Huyết tương			
	NG2C96/1	NG2C96/1 B	NG2C96/2	NG2C96/2 B
	Kết tủa II+III		Kết tủa I+II+III	
Huyết tương	0,41		0,41	
Dịch nổi I	0,39		-	
Dịch nổi hòa tan Ppt I	-		-	
Dịch nổi (I)+II+III	0,0001		0,0004	
Hỗn dịch (I)+II+III	0,38	0,45	0,40	0,41

Dịch lọc (I)+II+III	0,22	0,24	0,29	0,28
Dịch nổi hòa tan bánh lọc	-	-	-	-
Dịch nổi PptG	-	-	-	-
PptG được hòa tan	0,19	-	0,29	-

Bảng 14. Hàm lượng fibrinogen, tính theo g/l huyết tương khô đầu, của các phân đoạn khác nhau đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao có hoặc không có bước làm kết tủa phân đoạn I ở nồng độ etanol 8% ban đầu.

	Fibrinogen g/l Huyết tương			
	NG2C96/1	NG2C96/1 B	NG2C96/2	NG2C96/2 B
	Kết tủa II+III		Kết tủa I+II+III	
Huyết tương	1,45		1,45	
Dịch nổi I	0,28		-	
Dịch nổi hòa tan Ppt I	-		-	
Dịch nổi (I)+II+III	0,0001		0,0004	
Hỗn dịch (I)+II+III	0,25	0,34	1,27	1,34
Dịch lọc (I)+II+III	0,002	0,005	0,017	0,018
Dịch nổi hòa tan bánh lọc	-	-	-	-
Dịch nổi PptG	-	-	-	-
PptG được hòa tan	0,0021	-	0,013	-

Ví dụ 3 – NG2 C99

Để tiến hành tiếp việc làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao trong các bước phân đoạn rượu Cohn-Oncley và Kistler-Nitschmann xuôi dòng truyền thống (*tức là*, phân đoạn Cohn I và II; phân đoạn Cohn I và II+III; hoặc Kistler Nitschmann 8-10% etanol, kết

tủa A, và kết tủa B), các chất kết tủa NG2C96/2 và NG2C96/2B PptG được gộp lại và được làm giàu tiếp đối với các globulin miễn dịch IgG.

Tóm lại, các chất kết tủa NG2C96/2 và NG2C96/2B PptG đã gộp lại được tạo hỗn dịch trong nước dùng để tiêm (WFI) được điều chỉnh đến độ pH bằng $4,75 \pm 0,75$ bằng axit axetic và độ dẫn điện bằng $4,5 \pm 1,5 \text{ mS/cm}$ bằng natri clorua. Chất trợ lọc được bổ sung vào và hỗn dịch được lọc qua màng Cuno VR06 để tạo ra dịch lọc PptG sạch (VR06). Tiếp đó, dịch lọc sạch được xử lý bằng các dung môi và chất làm sạch (xử lý S/D) theo các quy trình tiêu chuẩn.

Dịch lọc đã xử lý S/D được đưa lên cột CM sepharoza đã được tạo cân bằng bởi dung dịch đệm chứa 10mM natri axetat (độ pH 5,0) và dòng chảy qua (CM D/N) được thu gom. Cột tiếp đó được rửa bằng dung dịch đệm chứa 10mM natri axetat (độ pH 5,5) và nước rửa (CM W) được thu gom. Các globulin miễn dịch được rửa giải cột bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải chứa 55mM mononatri phosphat và 10mM TRIS (độ pH 8,5). Dịch rửa giải được thu gom trong ba phân đoạn: phân đoạn 1 (CM E-VL) chứa phần thứ nhất của dịch rửa giải có OD₂₈₀ thấp hơn 100mAU; phân đoạn 2 (CM E) chứa đỉnh của dịch rửa giải có OD₂₈₀ cao hơn 100mAU nằm trên gờ đầu của đỉnh rửa giải và OD₂₈₀ cao hơn 400mAU nằm trên gờ sau của đỉnh rửa giải; và phân đoạn 3 (CM E-NL) chứa một phần dịch rửa giải nằm trên bờ sau của đỉnh này có OD₂₈₀ thấp hơn 400mAU.

Giá trị pH và độ dẫn điện của dịch rửa giải phân đoạn 2 được điều chỉnh trong khoảng từ 6,4mS/cm đến 2,3mS/cm bằng cách sử dụng axit axetic bằng và nước dùng để tiêm (WFI), tương ứng. Dịch rửa giải phân đoạn 2 tiếp đó được đưa lên nhựa trao đổi anion dòng nhanh ANX Sepharoza đã được tạo cân bằng bởi dung dịch đệm chứa 15mM mononatri phosphat (độ pH 6,4) ở nồng độ mang 100mg protein/ml nhựa. Dòng trao đổi anion, chứa phần lớn IgG được thu gom (ANX D/N). Protein gắn kết với nhựa trao đổi anion được rửa giải cột bằng cách sử dụng dung dịch chứa 2M natri clorua (ANX 2M NaCl).

Glyxin được bổ sung vào dòng trao đổi anion qua phân đoạn và mẫu được siêu lọc và lọc tuần hoàn (UF/DF) bằng cách sử dụng Pellicon® 2 Mini (Millipore) kháng lại dung dịch chứa 0,25M glyxin (độ pH 5,2) cho tới khi thu được nồng độ protein 5%. Dung dịch globulin miễn dịch được cô đặc tiếp để thu được nồng độ protein cuối bằng 10% và độ pH

được điều chỉnh đến 4,5 (cô đặc tuần hoàn). 10% dung dịch globulin miễn dịch tiếp đó được lọc vô trùng bằng cách sử dụng Millipak 20 (Millipore) để tạo ra thành phẩm globulin miễn dịch (vật chứa cuối).

Profin hóa sinh đối với mỗi bước phụ của quá trình tinh chế phản ứng được xác định (Bảng 15 và Bảng 16). Như được thể hiện trong dữ liệu, thành phẩm chỉ chứa nồng độ thấp protein không là IgG, thuộc các thông số chấp nhận được để dùng trong dược phẩm.

Bảng 15. Đặc tính hóa sinh của các phân đoạn khác nhau đã được tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao mà không cần bước làm kết tủa phân đoạn I ở nồng độ etanol 8% ban đầu.

	Protein		IgG	IgA	IgM	α 1 kháng trypsin
	g/l vốn Cohn		g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn
	Biuret	UV				
Vốn Cohn	47,38		5,36	1,20	0,41	1,01
dịch nổi I+II+III	19,79		< 0,0073	0,002	0,0004	0,004
Hỗn dịch I+II+III	25,83		4,62	1,17	0,41	0,33
Dịch lọc I+II+III	18,24		4,97	0,98	0,28	
dịch nổi hòa tan bánh lọc	4,52		0,09			0,61
dịch nổi PptG	11,00		0,06			
PptG hòa tan	7,46		5,46	1,01	0,32	0,01
VR 06	7,47		5,20	0,95	0,31	
VR 06 đã pha loãng	7,23		5,20	0,99	0,31	
CMD/N	0,66		<0,04 / 0,026			

CM W	0,11	0,09	<0,13 / 0,0066			
CM E-VL	0,001	0,00 1	<0,0031 / <0,00001			
CM E	6,16	5,38	4,85	0,60	0,042	
CM E-NL	0,08	0,04	0,011 / 0,014			
CM 2M NaCl	0,19	0,11	0,05 / 0,04	0,014	0,02	
CM E đã pha loãng		5,33	4,61			
ANX D/N		4,45	4,52	0,0014	0,00007	
ANX 2M NaCl	1,34		0,40 / 0,28	0,59	0,044	
cô đặc tuần hoàn		4,16	2,55			
nước sau rửa 1		0,59				
nước sau rửa 2		0,05				
nước sau rửa 3		0,01				
cô đặc tuần hoàn đã pha loãng		3,81				
vật chứa cuối		3,86	3,94	0,0012	0,00004	

Bảng 16. Đặc tính hóa sinh khác của các phân đoạn khác nhau đã được tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao mà không có bước làm kết tủa phân đoạn I ở nồng độ ethanol 8% ban đầu.

$\alpha 2$ Macroglobulin	Fibrinogen	Transferin	Albumin	Thành phần bổ sung C3
g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn	g/l vốn Cohn

Vốn Cohn		1,45	2,17		0,80
dịch nổi I+II+III		0,0004	2,44		< 0,001
Hỗn dịch I+II+III		1,32	1,99	6,40	0,55
Dịch lọc I+II+III		0,02	1,95	6,82	0,05
Dịch nổi hòa tan bánh lọc					
Dịch nổi PptG					
PptG hòa tan	0,46	0,02	0,02		0,04
VR 06		0,01	0,02		0,03
VR 06 đã pha loãng					
CM D/N	0,17				
CM W					
CM E-VL					
CM E	0,22	0,011	0,024		0,020
CM E-NL					
CM 2M NaCl					
CM E đã pha loãng					
ANX D/N	<0,00002	<0,00006	0,003		<0,0000 4
ANX 2M NaCl					
Cô đặc tuần hoàn					
Nước sau rửa 1					
Nước sau rửa 2					
Nước sau rửa 3					
Cô đặc tuần hoàn đã pha loãng					
Vật chứa cuối	0,000001	0,00001	0,0028		0,00003

Ví dụ 4 – NG2 C100

Để đánh giá việc áp dụng quá trình làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao mà không dùng bước làm kết tủa ở nồng độ rượu thấp ban đầu để loại bỏ fibrinogen, 200kg huyết tương đã tách tủa lạnh được phân đoạn và làm giàu như đã mô tả đối với mẫu NG2C96/2 ở các Ví dụ 2 đến 3, với cặp biến đổi theo quy trình. Đầu tiên, bước làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao (kết tủa I-IV1) được thực hiện sử dụng 25% etanol ở độ pH bằng 5,1, chứ không phải 5,5. Thứ hai, kết tủa I-IV1 đã tạo hỗn dịch được xử lý bằng 33 g silic đioxit sinh nhiệt (SiO₂)/kg chất kết tủa I-IV1, chứ không phải 40g SiO₂/kg chất kết tủa. Thứ ba, dịch rửa giải trao đổi cation CM được đưa lên nhựa trao đổi anion ANX ở nồng độ 150mg protein/ml nhựa ANX, chứ không phải 100mg/ml nhựa ANX. Cuối cùng, dòng trao đổi anion đã lọc Cuno VR06 được cho qua PLANOVA® 35N (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.; Tokyo, Japan) để tiến hành bước lọc nano trước khi siêu lọc/lọc thẩm tách.

Hàm lượng IgG của mỗi bước của quá trình tinh chế được xác định và các kết quả được thể hiện ở Bảng 17. So với hiệu suất IgG trung bình đối với quy trình sản xuất GAMMAGARD LIQUID® (3,7 g IgG/l huyết tương nguồn), phương pháp tinh chế đã dùng trong ví dụ này tạo ra hiệu suất cao hơn đáng kể bằng 4,4g IgG/l huyết tương nguồn. Kết quả này chứng tỏ rằng hiệu suất IgG hầu như tăng 20%. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG được thông báo trong Bảng 10. Như được thể hiện trong bảng này, thành phẩm IgG có độ tinh khiết lớn hơn 99% và hàm lượng IgG monome/đime lớn hơn 99,8%. Vật chứa cuối chỉ chứa các vết tạp chất, nồng độ của chúng nằm trong tiêu chuẩn điều chỉnh.

Bảng 17. Hàm lượng IgG của các phân đoạn đã được tạo ra trong quá trình làm giàu từ huyết tương đã tách tủa lạnh bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao.

		IgG				
		mg/ ml	g	%	độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
	Vốn Cohn	5,52	1113,94	100,00	11,43	5,52

Kết tủa I-IV-1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH					
	I-IV1 sau khi bổ sung EtOH					
	dịch nổi I-IV1	< 0,00121	< 0,029	< 0,026	< 0,013	< 0,0014
	dịch nổi I-IV1 nhờ ly tâm 1	< 0,00121	< 0,029	< 0,026	< 0,013	< 0,0014
	dịch nổi I-IV1 nhờ ly tâm 2	< 0,00121	< 0,029	< 0,026	< 0,013	< 0,0014
	kết tủa I-IV1					
Dịch lọc chiết I- IV1	kết tủa I-IV1 đã dùng					
	hỗn dịch I-IV1	2,69	975,30	87,55	13,43	4,83
	Dịch lọc CUNO	1,69	1186,24	106,49	21,41	5,88
bánh lọc	REZ 1	0,09	18,23	1,64	1,78	0,090
	REZ 2	0,02	2,31	0,21	1,04	0,011
kết tủa PptG	Kết tủa PptG					
	Dịch nổi PptG	0,02	14,02	1,26	0,35	0,069
	PptG đã dùng					
chiết, làm sạch PptG	hỗn dịch PptG	47,4	1152,39	103,45	69,55	5,71
	VR06 (PptG)	22,8	1074,82	96,49	66,31	5,33
	VR06 đã pha loãng	13,80	1126,98	101,17	80,00	5,58
SD và CM sepharo za ff	SD					
	Load CM					
	D/N	0,140	18,38	1,65	7,93	0,091
	D/N	0,228	29,84	2,68	12,88	0,15
	W	0,005	1,96	0,18	16,45	0,010

	W	< 0,068	< 27,91	< 2,51	< 234,48	< 0,14
	E-VL	< 0,0712	< 0,59	< 0,05	< 334,63	< 0,00
	E	23,2	1026,43	92,14	86,02	5,09
	E-NL	0,661	4,55	0,41	89,26	0,023
	2M NaCl	0,114	5,82	0,52	43,92	0,029
	2M NaCl	0,139	7,08	0,64	53,46	0,035
ANX	E đã pha loãng	9,005	1113,29	99,94	92,64	5,52
SEPH	ANX mang					
4FF	D/N	6,35	903,11	81,07	94,49	4,48
cận		3	78,99	7,09	26,31	0,39
dưới	2M NaCl					
VR06	VR06 (ANX)	6,185	972,42	87,30	101,23	4,82
Asahi	Dịch lọc ASAHI	5,27	907,55	81,47	94,95	4,50
	Cô pha loãng	102,5	910,38	81,73	100,89	4,51
	nước sau rửa 1	8,255	51,70	4,64	102,78	0,26
	nước sau rửa 2					
	nước sau rửa 3					
UF/DF	Cô pha loãng (cuối cùng)	96,1	871,30	78,22	96,56	4,32
FC	vật chứa cuối (được tính toán)	100	888,18	79,73		4,40

Bảng 18. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG đã được làm giàu từ 200l huyết tương đã tách tủa lạnh bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao.

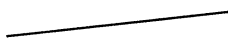
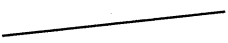
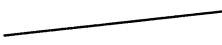
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Protein toàn phần - Kjeldahl	mg/ml	109,8
Protein toàn phần - Kjeldahl	mg/ml	108,5213
Độ tinh khiết (CAE)	Albumin %	0
	α/β globulin %	0
	γ -globulin %	100
	protein biến tính %	0
Phân bố kích cỡ phân tử	Monome [%]	93,2085
	đime [%]	6,6806
	Polyme [%]	0,0828
	Các mảnh [%]	0,0281
IgG đục	mg/ml	100
IgA (ELISA)	mg/ml	0,03
IgM (ELISA)	mg/dl	0
IgE (ELISA)	IU/ml	66,2
Albumin (ELISA)	mg/ml	0,00184
Fibrinogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	<0,17
Plasminogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	0,26

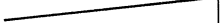
C3 bổ sung	mg/dl	<19,4
------------	-------	-------

Thử nghiệm	Phân nhóm	Kết quả (mg/ml)
------------	-----------	-----------------

phân bố nhóm phụ IgG	IgG1	54,7158
	IgG2	29,22
	IgG3	7,2029
	IgG4	2,3634

Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
------------	--------	---------

IgG Fc chức năng (FACS)		108±15
IgG Fc HemaggL chức năng	%	103
Nhận diện protein		Dương tính
Hoạt tính phân giải amido (PL-1)	nmol/ml	87,3
Hoạt tính kháng bổ sung	%	42
PKA	% lô quy chiếu 3	1,59
PKA	IU/ml	1,2
NAPPT	mg	0,773
Yếu tố Xla	mU/ml	24,9
	pM	771,6
Cảm quan		thỏa mãn

ph		5,643
Silicon	µg/l	664
Nhôm	µg/l	<25
Glyxin	M	0,074
Nồng độ osmol/kg	mosmol/kg	90
Pyrogen	EU/US	Bảo hòa/ Bảo hòa
Tỷ trọng	g/cm ³	1,0301
Các chất phản ứng SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	0,50
Polysorbat 80	ppm	<26
Tri(n-butyl)phosphat	ppm	<0,2

Thử nghiệm

Đơn vị

Kết quả

Các kháng thể		
Bệnh bạch hầu	IU/ml	8,0
Bệnh bạch hầu	IU/ml	9
Bệnh sởi	IU/ml	39,63
Kháng nguyên HBs (ELISA)		âm tính
HBs (ELISA)	mIU/ml	5775
Viêm tủy xám	Quotient gg 176	0,90

HAV (ELISA)	IU/ml	13,8
Parvo B19 (ELISA)	IU/ml	426
Bệnh cúm Haemophilus Influenzae	Chuẩn độ	1:6400
Các kháng thể kháng D		thỏa mãn
Hemagglutinin kháng A & kháng B	Kháng A	16
	Kháng B	8

Ví dụ 5 – P02910NG2

Để so sánh khả năng đi qua của dịch rửa giải trao đổi cation CM qua cột trao đổi anion ANX ở các nồng độ nạp 100g protein/ml nhựa ANX và 150 g protein/ml nhựa ANX, 200l huyết tương đã được tách tủa lạnh được phân đoạn bằng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25%) và được xử lý để tạo ra kết tủa PptG như được mô tả đối với mẫu NG2C96/2 ở các Ví dụ 2 đến 3. Nồng độ IgG, IgA, và IgM của phân đoạn ngược dòng đã tạo ra được xác định và được thông báo lần lượt ở Bảng 19, Bảng 20 và Bảng 21.

Chất kết tủa PptG thu được được chia thành hai mẫu 1,8kg, được làm giàu trong vật chứa cuối như được mô tả đối với mẫu NG2C96/2 ở các Ví dụ 2 đến 3, ngoại trừ một mẫu đã đi qua nhựa ANX trao đổi anion với nồng độ nạp 100mg protein/ml nhựa ANX (P03010NG2) và mẫu khác đã đi qua nhựa trao đổi anion ANX ở nồng độ nạp 150mg protein/ml nhựa ANX (P03110NG2).

[0001] Lượng IgG của mỗi bước làm giàu xuôi dòng của quá trình tinh chế được xác định và các kết quả được thể hiện trong Bảng 22 và

Bảng 23. So với hiệu suất IgG trung bình đối với quy trình sản xuất GAMMAGARD LIQUID® (3,7g IgG/lhuyết tương nguồn), phương pháp tinh chế áp dụng trong ví dụ này có hiệu suất cao hơn đáng kể bằng 4,3g IgG/lhuyết tương nguồn. Kết quả này chứng tỏ rằng hiệu suất IgG tăng 16%. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG được thông báo trong Bảng

16 và Bảng 17. Như được thể hiện trong các bảng này, thành phẩm IgG có độ tinh khiết lớn hơn 99% và thành phần IgG monome/dimer lớn hơn 99,8%. Vật chứa cuối chỉ chứa các vết tạp chất, nồng độ của chúng nằm trong các tiêu chuẩn cho phép.

Bảng 19. Lượng IgG của phân đoạn ngược dòng đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol).

		Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg	Phép đo độ đục IPC / ELISA của IgG				
				mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
	Vốn Cohn	204,60	204,60	5,26	1076,20	100,00	10,72	5,26
kết tủa I-IV-1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	206,46	206,81					
	I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	266,56	267,14					
	Dịch nổi I-IV1	247,80	248,64	0,00517	1,29	0,12	0,03	0,01
	kết tủa I-IV1	17,10	17,16					
chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	11,21	17,16					
	Hỗn dịch I-IV1	180,21	275,80	4,09	1128,02	104,82	23,15	5,51

	Dịch lọc CUNO	340,70	522,00	2,11	1101,42	102,34	34,72	5,38
Kết tủa	Kết tủa PptG	2,59	3,96					
PptG	Dịch nổi PptG	442,20	677,32	0,0235	15,92	1,48	0,93	0,08
ELISA								

Bảng 20. Lượng IgA của phân đoạn ngược dòng đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol).

		Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg	IgA ELISA				
				mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
	Vốn Cohn	204,60	204,60	1,18	241,43	100,00	2,41	1,18
kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	206,46	206,81					
	I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	266,56	267,14					
	Dịch nổi I-IV1	247,80	248,64	0,00251	0,62	0,26	0,01	0,0031
	Kết tủa I-IV1	17,10	17,16					
	Kết tủa I-IV1 đã dùng	11,21	17,16					

chiết lọc I- IV1	Hỗn dịch I-IV1	180,21	275,80	0,861	237,46	98,36	4,87	1,16
	Dịch lọc CUNO	340,70	522,00	0,365	190,53	78,92	6,01	0,93
Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,59	3,96					
	Dịch nổi PptG	442,20	677,32					

Bảng 21. Hàm lượng IgM của phân đoạn ngược dòng đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol).

		Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg	IgM ELISA				
				mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
Vốn Cohn		204,60	204,60	0,451	92,27	100,00	0,92	0,45
Kết tủa I- IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	206,46	206,81					
	I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	266,56	267,14					
	Dịch nổi I- IV1	247,80	248,64	0,00021	0,052	0,0566	<0,0011	<0,00026

	Kết tủa I-IV1	17,10	17,16					
Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	11,21	17,16					
	Hỗn dịch I-IV1	180,21	275,80	0,353	97,36	105,51	2,00	0,48
	Dịch lọc CUNO	340,70	522,00	0,110	57,42	62,23	1,81	0,28
Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,59	3,96					
	Dịch nổi PptG	442,20	677,32					

Bảng 22. Lượng IgG của các phân đoạn xuôi dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol), và nồng độ mang trao đổi anion ANX bằng 100mg/ml nhựa ANX (P03010NG2).

		IgG							Hiệu suất theo bước %	
Mẫu		Khối lượng (kg)	Khối lượng chuẩn (kg)	Protein (g)	mg/ml	g	Hiệu suất (%)	Độ tinh khiết (%)		g/l Huyết tương
Tạo hỗn dịch và lọc PptG										
Hỗn dịch PptG	10/2	8,36	8,36	644,59	55,7	465,47	100	72,2	4,99	

Dịch lọc PptG	10/6	15,91	16,24	669,20	30	487,34	104,70	72,8	5,22	
Dịch lọc PptG đã xác nhận	10/7	32,50	33,43	658,56	13,7	458,05	98,41	69,6	4,91	100,00
CM Sepharoza										
D A	12/12	38,00	53,88	48,9	0,0937	5,048	1,085	10,325	0,054	1,10
W B	12/12	127,60	180,91	0,54	<0,0712					0,00
VL C	12/12	2,41	3,41	0,04	<0,0712					0,00
Dịch rửa giải D	12/12	13,40	19,00	580,49	23,8	452,17	97,14	77,9	4,85	98,72
NL E	12/12	1,18	1,67	2,18	0,642	1,073	0,23	49,1	0,012	0,23
2M NaCl F	12/12	15,01	21,28	9,69	0,163	3,47	0,75	35,8	0,037	0,76
Tổng số							99,20		4,95	100,81
Dịch rửa giải đã pha loãng	12/13	4,3377	37,49	599,85	10,7	401,16	86,18	66,9	4,30	100,00
ANX- Sepharoza										
D/N	13/6 A	7,83	53,94	419,63	8,27	446,05	95,83	106,3	4,78	111,19
2M NaCl	13/6 B	2,34	16,12	144,67	2,38	38,37	8,24	26,5	0,41	9,56
Tổng số							10,407		5,19	120,76
UF / DF										

Cô UF/DF	15/14 A	0,42	2,91	412,48	134	390,39	83,87	94,6	4,18	87,52
Nước sau rửa 1	15/14 B	0,20	1,39	13,63	10,4	14,41	3,10	105,7	0,15	3,23
Tổng số										100% UF/DF
Khối	16/1	0,53	3,97	415,03	101	400,71	86,09	96,55	4,30	102,64
EB	19/1	0,53	3,97	415,03	102	404,68	86,94	97,51	4,34	103,66

Bảng 23. Lượng IgG của các phân đoạn xuôi dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol), và nồng độ mang trao đổi anion ANX 150mg/ml nhựa ANX (P03110NG2).

		IgG								Hiệu suất theo bước %
Mẫu		Khối lượng (kg)	Khối lượng đã điều chỉnh (kg)	Protein (g)	mg/ml	g	Hiệu suất (%)	Độ tinh khiết (%)	g/l Huyết tương	
Tạo hỗn dịch và lọc PptG										
Hỗn dịch PptG	10/2	8,36	8,36	644,59	56,7	465,47	100	72,2	4,99	
Dịch lọc PptG	10/6	15,91	16,24	669,20	30	487,34	104,70	72,8	5,22	

Dịch lọc PptG đã xác nhận	10/7	32,50	33,43	658,56	13,7	458,05	98,41	69,6	4,91	100,00
CM Sepharoza										
D A	12/12	38,00	53,88	48,9	0,0037	5,05	1,08	10,3	0,054	1,10
W B	12/12	127,60	180,91	0,54	<0,0712					0,00
VL C	12/12	2,41	3,41	0,04	<0,0712					0,00
Dịch rửa giải	12/12	13,40	19,00	580,49	23,5	452,17	97,14	77,9	4,88	95,72
NL	12/12 E	1,18	1,67	2,18	0,642	1,07	0,23	49,1	0,01	0,23
2M NaCl	12/12 F	15,01	21,28	9,69	0,163	3,47	0,75	35,8	0,04	0,76
Tổng số							99,20		4,95	100,81
Dịch rửa giải đã pha loãng	12/13	4,3377	37,49	599,85	10,9	408,65	87,79	68,1	4,38	100,00
ANX-Sepharoza										
D/N	13/6 A	11,18	51,03	416,92	8,79	448,56	96,37	107,6	4,81	109,76
2M NaCl	13/6 B	2,37	10,83	144,25	3,11	33,68	7,24	23,3	0,36	8,24

Tổng số							103,60		5,17	118,01
UF / DF										
Cô UF/DF	15/14A	0,57	2,61	425,26	150	391,90	84,19	92,2	4,20	87,37
Nước sau rửa 1	15/14B	0,55	2,51	13,46	5,87	14,76	3,17	109,7	0,16	3,29
Tổng số										100% UF/DF
Khối	16/1	0,84	4,07	445,39	97	394,91	84,84	88,67	4,23	100,77
EB	19/1	0,84	4,07	445,39	99,1	403,45	85,68	90,59	4,32	102,95

Bảng 24. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG làm giàu ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol), và nồng độ mang trao đổi anion ANX của 100mg/ml nhựa ANX (P03010NG2).

Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Protein toàn phần - Kjeldahl	mg/ml	109,9996
Độ tinh khiết (CAE)	Albumin %	0
	α/β globulin %	0
	γ -globulin %	100
	cenat. Protein %	0

Phân bố kích cỡ phân tử	Monome [%]	94,8683
	đime [%]	4,9579
	Polyme [%]	0,0698
	Đoạn[%]	0,104
IgG đục	g/l	91,3
IgA (ELISA)	mg/ml	0,05
IgM (ELISA)	mg/dl	0
Fibrinogen (ELISA)	µg/ml	<0,17
Plasminogen (ELISA)	µg/ml	0,26
C3 bổ sung	mg/dl	<19,4
Thử nghiệm	Phân nhóm	Kết quả [mg/ml]
Phân bố phân nhóm IgG	IgG1 (mg/ml)	47,897
	IgG2 (mg/ml)	25,8157
	IgG3 (mg/ml)	6,2317
	IgG4 (mg/ml)	2,0201
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Hemaggl.chức năng của IgGi Fc	%	109

Hoạt tính phân giải amido (PL-1)	nmol/ml phút	< 10
Hoạt tính kháng bổ sung	%	38
PKA	% lô quy chiếu 3	1,399
	IU/ml	1
		1,486
		0,957
		< 4
NAPTT	mg	> 10
Cảm quan		Đáp ứng
pH		4,84
Yếu tố XIa	mIU/ml	< 0,04
SN13a	mU/ml	< 0,375
Nồng độ osmol/kg	mosmol/kg	266
Tỷ trọng	g/cm ³	1,0346
Thử nghiệm tạo trombin		122,66
Bổ sung yếu tố I	μg/ml	69,1
Profil hoạt tính phân giải amido	S-2288	< 5

	S-2266	< 5
	S-2222	< 5
	S-2251	< 5
	S-2302	< 5
Các chất phản ứng SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	<0,1
Polysorbat 80	ppm	<26
Tri(n-butyl)phosphat	ppm	0,1178
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Các kháng thể		
Kháng D Các kháng thể		Đáp ứng
Hemagglutinin Kháng A&Kháng B	Kháng A	16
	Kháng B	4

Bảng 25. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG làm giàu ra khỏi huyết tương đã được tách tủa lạnh bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol), và nồng độ mang trao đổi anion ANX bằng 150mg/ml nhựa ANX (P03110NG2).

Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
------------	--------	---------

Protein toàn phần - Kjeldahl	mg/ml	108,3393
Độ tinh khiết (CAE)	Albumin %	0
	α/β globulin %	0
	γ -globulin %	100
	protein biến tính %	0
Phân bố kích cỡ phân tử	Monome [%]	94,9047
	đime [%]	4,9122
	Polyme [%]	0,0762
	Đoạn [%]	0,1068
IgG đục	g/l	95,7
IgA (ELISA)	mg/ml	0,08
IgM (ELISA)	mg/dl	0
Fibrinogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	0,33
Plasminogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	0,27
C3 bổ sung	mg/dl	<19,4
Thử nghiệm	Phân nhóm	Kết quả [mg/ml]
Phân bố phân nhóm IgG	IgG1 (mg/ml)	54,0113

	IgG2 (mg/ml)	28,6462
	IgG3 (mg/ml)	6,0688
	IgG4 (mg/ml)	2,3599
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Hemaggl. chức năng của IgG Fc	%	91
Hoạt tính phân giải amido (PL-1)	nmol/ml phút	< 10
Hoạt tính kháng bổ sung	%	36
PKA	% lô quy chiếu 3	2,261
	IU/ml	1,8
		1,864
		0,763
		< 4
NAPTT	mg	> 10
Cảm quan		Đáp ứng
pH		4,853
Yếu tố XIa	mU/ml	< 0,04
SN13a	mU/ml	31,3

Nồng độ osmol/kg	mosmol/kg	266
Thử nghiệm tạo trombin		109,81
Tỷ trọng	g/cm ³	1,0344
Bổ sung yếu tố I	μg/ml	147
Hoạt tính phân giải amido profil	S-2288	< 5
	S-2266	< 5
	S-2222	< 5
	S-2251	< 5
	S-2302	< 5
Các chất phản ứng SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	<0,1
Polysorbat 80	ppm	<26
Tri(n-butyl)phosphat	ppm	0,1414
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Các kháng thể		
Kháng D Các kháng thể		Đáp ứng
Hemagglutinin Kháng A & Kháng B	Kháng A	16

	Kháng B	4
--	---------	---

Ví dụ 6 – NG2C107B

Khả năng chiết alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi phần không hòa tan của chất kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao đã dùng trong sản xuất globulin miễn dịch IgG được khảo sát. Một cách vắn tắt, trước tiên hai mẫu 500kg bánh lọc không hòa tan tạo ra trong quá trình lọc chất kết tủa phân đoạn I-IV-1 đã chiết (#1 và #3) được tạo hỗn dịch trong 2,8 phần nước (khối lượng/khối lượng) ở $7\pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ pH của các mẫu được điều chỉnh đến $5,5\pm 0,1$. Các hỗn dịch được lọc thông qua màng CUNO 10CP, để tạo ra các dịch lọc (1. dịch lọc) và bánh lọc thứ hai. Tiếp đó, bánh lọc thứ hai được tạo hỗn dịch trong 5 phần nước (khối lượng), nhiệt độ của hỗn dịch được điều chỉnh đến $17\pm 2^{\circ}\text{C}$, độ pH của các mẫu được điều chỉnh đến $8,8\pm 0,2$, và tiếp đó mẫu được khuấy trong thời gian 8 giờ đồng thời duy trì được nhiệt độ và độ pH để chiết A1PI ra khỏi nguyên liệu không tan.

Sau khi ủ, 10 mmol Tris và 150 mmol natri clorua trên kg hỗn dịch được bổ sung vào các mẫu và độ pH được điều chỉnh đến $8,0\pm 0,1$. 176g PEG 3350 cho mỗi kg hỗn dịch được bổ sung vào các mẫu, được ủ ở $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 1 giờ. Tiếp đó, các hỗn dịch được lọc để loại bỏ nguyên liệu không tan ra khỏi dịch nổi (2 dịch lọc) chứa A1PI đã chiết.

A1PI thô tiếp đó được tạo kết tủa ra khỏi dịch lọc thứ hai bằng cách bổ sung 0,35g kẽm clorua/kg dịch lọc (2,5mM ZnCl₂; mẫu #1) hoặc 0,54g/kg kẽm clorua/kg dịch lọc (4,0mM ZnCl₂; mẫu #3), điều chỉnh độ pH đến $7,5\pm 0,2$, và ủ các mẫu ở $7\pm 2^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 3 giờ. Chất kết tủa kẽm clorua được thu hồi bằng cách ly tâm (ZnCl₂ đậm đặc). A1PI được chiết ra khỏi chất kết tủa kẽm clorua bằng 50mM natri EDTA (Zn-EDTA-conz).

Hàm lượng và hoạt tính A1PI (a1A) được xác định đối với mỗi bước trong quy trình làm giàu và có mặt trong Bảng 26. Khoảng 400mg huyết tương nguồn A1PI/l hoạt tính được thu hồi ở bước chiết EDTA. Đáng chú ý là khi A1PI được chiết ở $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ pH bằng khoảng 9,2, thì khoảng 600mg huyết tương nguồn A1PI/L hoạt tính được thu hồi.

Bảng 26. Hàm lượng alpha-1-kháng trypsin của các phân đoạn xuôi dòng đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng phản ứng kết tủa ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25% etanol), và kết tủa kẽm.

			a1A ELISA					a1A-Hoạt tính OC			
		Khối lượng (g)	Khối lượng đã điều chỉnh (g)	(mg/ml)	mg	mg/l huyết tương	Độ tinh khiết (%) của Biuret)	(mg/ml)	mg	mg/l huyết tương	% Hoạt tính so với ELISA
1	Bánh lọc	500,50									
	Tạo hỗn dịch dạng bánh	1900,40	1900,40								
	Hỗn dịch bánh cô đặc	32,71	1209,85	0,0964	117	32,32	7,69	0,02	24	6,71	20,7
	1. Dịch lọc	3291,90	3380,85	<0,0175	<59	<16,40	<5,32	0,01	34	9,37	57,1
	Chiết và pH	3956,90	4063,82								
	Chiết và pH cent	42,61	3385,99	0,636	2153	596,84	10,09	0,43	1456	403,52	67,6
	2. Dịch lọc	7357,80	7653,33	0,295	2258	625,73	15,96	0,2	1531	424,22	67,8
	ZnCl ₂ cent	7487,40	7841,42								
	ZnCl ₂ cent trừ nồng độ	7305,73	7651,16	0,00646	49	13,70	1,13				
	Nồng độ Zn-EDTA	1150,58	1204,98	1,83	2205	611,15	23,41	1,13	1362	377,37	61,7
3	Bánh lọc	506,5									

Tạo hỗn dịch dạng bánh	1926,30	1926,30								
Hỗn dịch bánh cô đặc	32,50	1224,18	0,102	125	34,20	7,92	0,02	24	6,71	19,6
1. Dịch lọc	3448,10	3539,99	<0,0175	<62	<16,97	<5,40	0,01	35	9,69	57,1
Chiết và pH	4175,90	4287,18								
Chiết và pH cent	43,03	3611,54	0,589	2127	582,57	9,33	0,42	1517	415,41	71,3
2. Dịch lọc	7860,20	8167,45	0,314	2565	702,35	17,97	0,15	1225	335,52	47,8
ZnCl ₂ cent	8112,00	8483,06								
ZnCl ₂ cent trừ nồng độ	7913,50	8275,48	0,00319	26	7,23	0,59				
Nồng độ Zn-EDTA	1485,86	1553,83	1,38	2144	587,25	22,87	0,86	1336	365,96	62,3

Ví dụ 7 – P03410NG2A và B

Tác động của độ pH đến mức thu hồi IgG từ quá trình làm kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao của huyết tương đã tách tủa lạnh được nghiên cứu. Một cách vắn tắt, 100l huyết tương đã tách tủa lạnh được xử lý để loại bỏ Yếu tố IX, yếu tố VII, và kháng thrombin III (ATIII) bằng cách hấp phụ, được phân đoạn bằng cách làm kết tủa nhờ sử dụng 25% etanol ở độ pH bằng 5,4 (Mẫu A; P03410NG2A) hoặc 5,6 (Mẫu B; P03410NG2B). Các mẫu tiếp đó được xử lý để tạo ra Kết tủa G (Kết tủa PptG) và dịch nổi (Dịch nổi PptG) như được mô tả trong Ví dụ 2, chỉ khác 50g SiO₂/kg chất kết tủa I-IV-1, mà không phải là 40g/kg chất kết tủa, được phối trộn với hỗn dịch kết tủa I-IV-1.

Hàm lượng IgG, IgA, và IgM của các phân đoạn đã tạo ra được xác định và được báo cáo lần lượt trong Bảng 27, Bảng 28 và Bảng 29. Đáng chú ý, khoảng 90% lượng IgG của huyết tương nguồn được thu hồi trong dịch lọc phân đoạn I-IV-1 CUNO khi bước làm kết tủa ban đầu diễn ra ở độ pH bằng 5,4 (93,8%) hoặc độ pH bằng 5,6 (88,8%). Tương tự, hầu như toàn bộ hàm lượng IgA và IgM của huyết tương nguồn được thu hồi trong quá trình tạo hỗn dịch phân đoạn I-IV-1.

Bảng 27. Lượng IgG của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					Phép đo độ đục IPC / ELISA của IgG				
								Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
A		Vốn Cohn	101,20	101,20	6,01	608,21	100,00	12,65	6,01
		Vốn Cohn	101,82	101,20	5,96	603,15	100,00	12,55	5,96
	Kết tủa I-IV-1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,82	102,28					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,62	132,21					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	0,00427	0,53	0,09	0,02	0,01
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I-IV-1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	4,47	515,52	84,76	24,20	5,09

		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	2,53	570,39	93,78	40,77	5,64
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81	0,0276	8,08	1,33	1,29	0,08

B		Vốn Cohn	100,80	100,80	6,01	605,81	100,00	12,65	6,01
	Kết tủa I-IV-1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,0113	1,40	0,23	0,05	0,01
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV-1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	3,80	400,74	66,15	19,67	3,98
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	2,64	538,19	88,84	46,74	5,34
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60	0,0200	5,29	0,87	1,25	0,05
	ELISA								
	IgG neph PPD/PS								

Bảng 28. Lượng IgA của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					IgA ELISA				
								Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
A		Vốn Cohn	101,20	101,20	1,1187	113,21	100,00	2,36	1,12
	Kết tủa I-IV-1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	0,0027	0,34	0,06	0,01	0,003
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I-IV-1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	1,03	118,79	19,53	5,58	1,17
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,41	93,09	15,31	6,65	0,92
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81					

B		Vốn Cohn	100,80	100,80	1,1187	112,76	100,00	2,36	1,12
	Kết tủa I-IV-1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					

		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,0073	0,90	0,15	0,03	0,009
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV-1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	1,03	108,62	17,93	5,33	1,08
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,47	95,00	15,68	8,25	0,94
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60					

Bảng 29. Lượng IgM của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					IgM ELISA				
					mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
			Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg					
A		Vốn Cohn	101,20	101,20	0,4381	44,34	100,00	0,92	0,44
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	0,00014	0,02	0,00	0,00	0,0002
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					

	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	0,4042	46,62	7,66	2,19	0,46
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,1506	33,95	5,58	2,43	0,34
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81					

B		Vốn Cohn	100,80	100,80	0,4381	44,16	100,00	0,92	0,44
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,00029	0,04	0,01	0,00	0,0004
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	0,4323	45,59	7,53	2,24	0,45
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,1360	27,73	4,58	2,41	0,28
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60					

Để mô tả đặc điểm khác của sơ đồ tạo phân đoạn, hàm lượng của fibrinogen (Bảng 30), A1PI (Bảng 31), Alpha-2-Macroglobulin (Bảng 32), albumin (Bảng 33), Transferin (Bảng 34), và C3 (Bảng 35) được xác định đối với các phân đoạn ngược dòng khác nhau.

Bảng 30. Lượng fibrinogen của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

Hồng độ tụ cao (25 %).									
A					Fibrinogen ELISA				
			Khối lượng tính toán được kg	Khối lượng tính toán được kg	mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
		Vốn Cohn	101,20	101,20	1,698	171,84	100,00	3,57	1,70
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	<0,0001	0,01	0,00	0,00	0,00
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	1,14	131,01	21,54	6,15	1,29
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,03	6,52	1,07	0,47	0,06
Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44						
	Dịch nổi PptG	288,20	292,81						
B		Vốn Cohn	100,80	100,80	1,698	171,16	100,00	3,57	1,70
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					

		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,00087	0,11	0,02	0,00	0,00
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	1,58	166,52	27,49	8,17	1,65
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,02	4,65	0,77	0,40	0,05
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60					

Bảng 31. Lượng alpha-1-kháng trypsin của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp ($A = 5,4$; $B = 5,6$), nồng độ rượu cao (25%).

A					Alpha 1 kháng trypsin ELISA				
					mg/ml	g	%	Độ	g/l
			Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg				tinh khiết (%)	
		Vốn Cohn	101,20	101,20	1,15	116,38	100,00	2,42	1,15
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					

		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	0,0097	1,21	0,20	0,05	0,01
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	0,257	29,64	4,87	1,39	0,29
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,0502	11,32	1,86	0,81	0,11
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81	0,0267	7,82	1,29	1,25	0,08
		Vốn Cohn	100,80	100,80	1,15	115,92	100,00	2,42	1,15
B	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,0221	2,74	0,45	0,10	0,03
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	0,365	38,49	6,35	1,89	0,38
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,0597	12,17	2,01	1,06	0,12
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60	0,0300	7,94	1,31	1,88	0,08

Bảng 32. Lượng Alpha-2-Macroglobulin của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					Alpha 2 macroglobulin ELISA				
								Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
A		Vốn Cohn	101,20	101,20	1,08	109,30	100,00	2,27	1,08
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	0,0004 1	0,05	0,01	0,002	0,001
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	0,945	108,99	17,92	5,12	1,08
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,533	120,17	19,76	8,59	1,19
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81	0,158	46,26	7,61	7,38	0,46
		Vốn Cohn	100,80	100,80	1,08	108,86	100,00	2,27	1,08
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					

B		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,00105	0,13	0,02	0,005	0,001
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	1,06	111,78	18,45	5,49	1,11
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,559	113,96	18,81	9,90	1,13
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60	0,142	37,57	6,20	8,88	0,37

Bảng 33. Lượng albumin của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					Albumin ELISA				
					khối lượng tính toán được kg	khối lượng mg/ml	g	%	độ tinh khiết (%)
		Vốn Cohn	101,20	101,20	25,1	2540,12	100,00	52,84	25,10
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					

A		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I- IV1	123,40	124,23	18,5	2298,33	377,88	92,24	22,71
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I- IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I- IV1	113,87	115,33	2,33	268,72	44,18	12,61	2,66
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	1,19	268,29	44,11	19,18	2,65
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81	0,866	253,57	41,69	40,43	2,51
		Vốn Cohn	100,80	100,80	25,1	2530,08	100,00	52,84	25,10
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I- IV1	123,40	123,81	19,9	2463,72	406,68	91,43	24,44
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					

B	Chiết lọc I- IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I- IV1	104,49	105,46	1,57	165,57	27,33	8,13	1,64
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,693	141,28	23,32	12,27	1,40
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60	0,543	143,68	23,72	33,96	1,43

Bảng 34. Hàm lượng Transferin của phân đoạn ngược dòng đã tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					Transferin ELISA				
		Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg		mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
	Vốn Cohn	101,20	101,20		1,95	197,34	100,00	4,11	1,95
A	Kết tủa I- IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	0,343	42,61	7,01	1,71	0,42

	Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
	Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	1,38	159,16	26,17	7,47	1,57
	Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,655	147,67	24,28	10,56	1,46
Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
	Dịch nổi PptG	288,20	292,81	0,541	158,41	26,05	25,26	1,57

B		Vốn Cohn	100,80	100,80	1,95	196,56	100,00	4,11	1,95
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	0,825	102,14	16,86	3,79	1,01
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	1,13	119,17	19,67	5,85	1,18
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,527	107,44	17,73	9,33	1,07
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60	0,383	101,34	16,73	23,95	1,01

Bảng 35. Lượng thành phần bổ sung 3 (C3) bổ sung của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH thấp (A = 5,4; B = 5,6), nồng độ rượu cao (25%).

					C3 ELISA				
		Khối lượng kg	Khối lượng tính toán được kg		mg/ml	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/l huyết tương
A		Vốn Cohn	101,20	101,20	0,0648	6,56	100,00	0,14	0,06
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,71	132,30					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	124,23	<0,00006	<0,007	<0,001	<0,0003	<0,0001
		Kết tủa I-IV1	7,11	7,16					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	7,07	7,16					
		Hỗn dịch I-IV1	113,87	115,33	0,673	77,62	12,76	3,64	0,77
		Dịch lọc CUNO	222,10	225,45	0,0476	10,73	1,76	0,77	0,11
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,40	2,44					
		Dịch nổi PptG	288,20	292,81					
		Vốn Cohn	100,80	100,80	0,0648	6,53	100,00	0,14	0,06
	Kết tủa I-IV1	I-IV1 trước khi bổ sung EtOH	101,43	101,53					

B		I-IV1 sau khi bổ sung EtOH	131,43	131,56					
		Dịch nổi I-IV1	123,40	123,81	<0,00006	<0,007	<0,001	<0,0003	<0,0001
		Kết tủa I-IV1	6,52	6,55					
	Chiết lọc I-IV1	Kết tủa I-IV1 đã dùng	6,49	6,55					
		Hỗn dịch I-IV1	104,49	105,46	0,570	60,11	9,92	2,95	0,60
		Dịch lọc CUNO	201,60	203,86	0,0487	9,93	1,64	0,86	0,10
	Kết tủa PptG	Kết tủa PptG	2,19	2,21					
		Dịch nổi PptG	261,40	264,60					

Ví dụ 8 – P03510NG2 và P03610NG2

Tác động của việc cho dịch rửa giải trao đổi cation CM đi qua cột trao đổi anion ANX ở các nồng độ nạp 100g protein/ml nhựa ANX và 150g protein/ml nhựa ANX trong quá trình xử lý thuận của chất kết tủa PptG tạo ra bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao được nghiên cứu tiếp. Một cách vắn tắt, 2kg chất kết tủa P03410NG2A PptG được xử lý như được mô tả trong Ví dụ 4, với mẫu thứ nhất (P03510NG2) được đưa lên nhựa ANX trao đổi anion ở nồng độ 157mg protein/ml nhựa ANX và mẫu thứ hai (P03610NG2) được đưa lên nhựa ANX trao đổi anion ở nồng độ 106mg protein/ml nhựa ANX.

Lượng IgG của mỗi bước ngược dòng của quá trình tinh chế được xác định và các kết quả được thể hiện trong Bảng 22 và Bảng 23. So với hiệu suất IgG trung bình đối với quy trình sản xuất GAMMAGARD LIQUID® (3,7g IgG/lhuyết tương nguồn), phương pháp tinh chế đã dùng theo ví dụ này có hiệu suất cao hơn đáng kể bằng 4,72g IgG và 4,67g IgG trong mỗi lít huyết tương nguồn. Kết quả này chứng tỏ hiệu suất IgG tăng hơn 25%. Đặc tính hóa sinh của các thành phẩm IgG được thông báo trong Bảng 38 và Bảng 39. Như được thể hiện trong các bảng này, các thành phẩm IgG có độ tinh khiết lớn hơn 99% và hàm

lượng IgG monome/đime lớn hơn 99,8%. Vật chứa cuối chỉ chứa các vết tạp chất, nồng độ của chúng nằm trong các tiêu chuẩn cho phép.

Bảng 36. Lượng IgG của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25%) và nồng độ mang trao đổi anion 157mg/ml nhựa ANX (P03510NG2).

		IgG								
Mẫu		Khối lượng (kg)	Khối lượng chuẩn (kg)	Protein (g)	mg/ml	g	Hiệu suất (%)	Độ tinh khiết (%)	g/l Huyết tương	Hiệu suất theo bước %
Tạo hỗn dịch và lọc PptG										
PptG Hỗn dịch	10/2	9,63	9,63	683,69	46,4	446,62	100	65,3	5,37	
Dịch lọc PptG	10/6	18,80	19,15	646,26	25	482,54	108,04	74,7	5,81	
Dịch lọc PptG đã xác nhận	10/7	31,46	32,24	643,35	14,8	477,17	106,84	74,2	5,74	100,00
CM Sepharosa										
D	12/12 A	36,40	47,57	73,2	0,188	8,942	2,002	12,212	0,108	1,87
W	12/12 B	109,60	143,22	3,72	<0,0712					0,00
VL	12/12 C	2,41	3,15	0,00	<0,0712					0,00

Dịch rửa giải	12/12 D	13,40	17,51	532,56	23,1	404,49	90,57	76,0	4,87	84,77
NL	12/12 E	1,41	1,84	2,36	0,544	0,999	0,22	42,3	0,012	0,21
2M NaCl	12/12 F	14,81	19,35	10,44	0,196	3,79	0,85	36,3	0,046	0,79
Tổng số							93,64		5,03	87,65
Dịch rửa giải đã pha loãng	12/13	4,3377	34,55	535,67	11,6	400,83	89,75	74,8	4,82	100,00
ANX-Sepharoza										
D/N	13/6 A	15,60	41,90	373,70	9,73	407,64	91,27	109,1	4,91	101,70
2M NaCl	13/6 B	3,76	10,10	120,56	3,32	33,54	7,51	27,8	0,40	8,37
Tổng số							98,78		5,31	110,07
Dịch lọc VR06	14/2	17,15	46,30	373,66						
Dịch lọc Asahi 35nm	14/5	18,82	50,84	371,10	8,19	416,35	93,22	112,2	5,01	103,87
UF / DF										
Cô UF/DF	15/14 A	1,02	2,74	391,05	133	364,39	81,59	93,2	4,39	89,39
Nước sau rửa 1	15/14 B	0,74	2,00	6,94	3,53	7,08	1,58	102,0	0,09	1,74

Tổng số										100% UF/DF
Khối	16/1	1,38	3,85	375,89	96,5	371,96	83,28	98,95	4,48	102,08
EB	19/1	1,21	3,81	378,80	103	392,60	87,90	103,64	4,72	107,74

Bảng 37. Lượng IgG của phân đoạn ngược dòng tạo ra trong quá trình phân đoạn huyết tương bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25%) và nồng độ mang trao đổi anion 106mg/ml nhựa ANX (P03610NG2).

		IgG								
Mẫu		Khối lượng (kg)	Khối lượng đã điều chỉnh (kg)	Protein (g)	mg/ml	g	Hiệu suất (%)	Độ tinh khiết(%)	g/l Huyết tương	Hiệu suất theo bước %
Tạo hỗn dịch và lọc PptG										
PptG Hỗn dịch	10/2	9,63	9,63	683,69	46,4	446,62	100	65,3	5,37	
Dịch lọc PptG	10/6	18,80	19,15	646,26	25	482,54	108,04	74,7	5,81	
Dịch lọc PptG verd.	10/7	31,46	32,24	643,35	14,8	477,17	106,84	74,2	5,74	100,00

CM Sepharoza										
D	12/12 A	36,40	47,57	73,2	0,188	8,942	2,002	12,212	0,108	1,87
W	12/12 B	109,60	143,22	3,72	<0,0712					0,00
VL	12/12 C	2,41	3,15	0,00	<0,0712					0,00
Dịch rửa giải	12/12 D	13,40	17,51	532,56	23,1	404,49	90,57	76,0	4,87	84,77
NL	12/12 E	1,41	1,84	2,36	0,544	0,999	0,22	42,3	0,012	0,21
2M NaCl	12/12 F	14,81	19,35	10,44	0,196	3,79	0,85	36,3	0,046	0,79
Tổng số							93,64		5,03	87,65
Dịch rửa giải đã pha loãng	12/13	4,3377	34,55	535,67	11,6	400,83	89,75	74,8	4,82	100,00
ANX- Sepharoza										
D/N	13/6 A	11,80	46,90	384,12	8,46	396,78	88,84	103,3	4,77	98,99
2M NaCl	13/6 B	3,72	14,79	123,43	2,23	32,98	7,38	26,7	0,40	8,23

Tổng số							96,23		5,17	107,22
Dịch lọc VR06	14/2	12,88	51,53	381,83						
Dịch lọc Asahi 35nm	14/5	14,10	56,47	378,34	6,93	391,33	87,62	103,4	4,71	97,63
UF/DF										
Cô UF/DF	15/14A	0,69	2,77	385,58	125	346,49	77,58	89,9	4,17	87,33
Nước sau rửa 1	15/14B	0,78	3,12	9,96	3,4	10,62	2,38	106,6	0,13	2,68
Tổng số										100% UF/DF
Khối	16/1	0,89	3,73	376,90	93,8	350,10	78,39	92,89	4,21	101,04
EB	19/1	0,89	3,73	376,90	104	388,17	86,91	102,99	4,67	112,03

Bảng 38. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG làm giàu ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh bằng cách sử dụng kết tủa ban đầu ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25%) bước và nồng độ mang trao đổi anion 157mg/ml nhựa ANX (P03510NG2).

Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Protein toàn phần - Kjeldahl	mg/ml	100,5061
Độ tinh khiết (CAE)	Albumin %	0

	α/β globulin %	0
	γ -globulin %	100
	protein biến tính %	0
Phân bố kích cỡ phân tử	Monome [%]	93,1042
	đime [%]	6,7664
	Polyme [%]	0,0499
	Đoạn [%]	0,0795
IgG đục	g/l	92,4
IgA (ELISA)	mg/ml	0,07
IgM (ELISA)	mg/dl	< 0,95
Fibrinogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	< 0,17
Plasminogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	0,32
C3 bổ sung	mg/dl	< 19,4
Thử nghiệm	Phân nhóm	Kết quả [mg/ml]
Phân bố phân nhóm IgG	IgG1 (mg/ml)	54,4779
	IgG2 (mg/ml)	33,6428
	IgG3 (mg/ml)	6,3377
	IgG4 (mg/ml)	1,9745

Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Hemaggl. chức năng của IgG Fc	%	84
Hoạt tính phân giải amido (PL-1)	nmol/ml phút	14,8
		1,37
Hoạt tính kháng bổ sung	%	35
PKA	% lô quy chiếu 3	0,741
	IU/ml	0,6
		1,700
		2,036
		< 4
NAPTT	mg	> 10
Cảm quan		Đáp ứng
pH		4,7
Yếu tố XIa	mIU/ml	0,15
SN13a	mU/ml	21,9
Thử nghiệm tạo trombin		142,23
Nồng độ osmol/kg	mosmol/kg	259
Tỷ trọng	g/cm ³	1,0326
Bổ sung yếu tố I	μg/ml	107

Hoạt tính phân giải amido profil	S-2288	26,9
	S-2266	18,8
	S-2222	< 5
	S-2251	< 5
	S-2302	55,2
Các chất phản ứng SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	< 0,1
Polysorbat 80	ppm	< 26
Tri(n-butyl)phosphat	ppm	< 0,2
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Các kháng thể		
Kháng D Các kháng thể		Đáp ứng
Hemagglutinin Kháng A&Kháng B	Kháng A	8
	Kháng B	8

Bảng 39. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG làm giàu ra khỏi huyết tương đã tách tủa lạnh bằng cách áp dụng bước làm kết tủa ban đầu ở độ pH ban đầu thấp (5,4), nồng độ rượu cao (25%) và nồng độ mang trao đổi anion 106mg/ml nhựa ANX (P03610NG2).

Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Protein toàn phần - Kjeldahl	mg/ml	103,5231

Độ tinh khiết (CAE)	Albumin %	0
	α/β globulin %	0
	γ -globulin %	100
	protein biến tính %	0
Phân bố kích cỡ phân tử	Monome [%]	92,9679
	đime [%]	6,9018
	Polyme [%]	0,0526
	Đoạn [%]	0,0778
IgG đục	g/l	95
IgA (ELISA)	mg/ml	0,07
IgM (ELISA)	mg/dl	< 0,95
Fibrinogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	0,20
Plasminogen (ELISA)	$\mu\text{g/ml}$	0,29
C3 bổ sung	mg/dl	< 19,4
Thử nghiệm	Phân nhóm	Kết quả [mg/ml]
Phân bố phân nhóm IgG	IgG1 (mg/ml)	59,3788
	IgG2 (mg/ml)	34,8724
	IgG3 (mg/ml)	6,7758

	IgG4 (mg/ml)	2,1446
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
IgG Fc chức năng Hemaggl.	%	101
Hoạt tính phân giải amido (PL-1)	nmol/ml phút	< 10
		0,951
Hoạt tính kháng bổ sung	%	39
PKA	% lô quy chiếu 3	< 1
	IU/ml	0
		< 4
NAPTT	mg	> 10
Cảm quan		Đáp ứng
pH		4,7
Yếu tố XIa	mIU/ml	0,06
SN13a	mU/ml	14,9
Thử nghiệm tạo trombin		123,96
Nồng độ osmol/kg	mosmol/kg	260
Tỷ trọng	g/cm ³	1,0333
Bổ sung yếu tố I	μg/ml	80,0
Hoạt tính phân giải amido profil	S-2288	20,3

	S-2266	17,2
	S-2222	< 5
	S-2251	< 5
	S-2302	38,9
Các chất phản ứng SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	< 0,1
Polysorbat 80	ppm	< 26
Tri(n-butyl)phosphat	ppm	< 0,2
Thử nghiệm	Đơn vị	Kết quả
Các kháng thể		
Kháng D Các kháng thể		Đáp ứng
Hemagglutinin Kháng A& Kháng B	Kháng A	16
	Kháng B	8

Ví dụ 9 – Đặc tính bổ sung của các sản phẩm phân đoạn

Hiệu suất và độ tinh khiết của globulin miễn dịch G thu được bằng cách áp dụng phương pháp tinh chế bao gồm bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao được so sánh với hiệu suất và độ tinh khiết của globulin miễn dịch G thu được bằng cách sử dụng các chất trung gian kết tủa Cohn I và kết tủa II+III truyền thống.

Hiệu suất và độ tinh khiết ba quá trình tinh chế IgG ở phạm vi rộng ứng dụng quá trình làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao - lô 3010, như được mô tả trong

Ví dụ 5 (“P03010NG2”); lô 3610 như được mô tả trong Ví dụ 8 (“P03610NG2”); và lô thứ ba 1111, được điều chế tương tự đối với các lô 3010 đến 3610, được so sánh với hiệu suất trung bình đối với GAMMAGARD LIQUID (10% Globulin miễn dịch để tiêm truyền (Human), Baxter International) đã điều chế ở một nhà máy sản xuất năm 2010. Quy trình tinh chế GAMMAGARD LIQUID được thực hiện tương tự như các quy trình đã dùng để điều chế các lô 3010, 3610, và 1111, chỉ khác quy trình GAMMAGARD LIQUID đã thực hiện thông qua các chất trung gian phân đoạn Cohn I và phân đoạn Cohn II+III, mà không phải là quy trình làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao. Đặc điểm của các sản phẩm kết tủa G tạo ra trong quá trình điều chế các lô thử nghiệm và đã được lấy trị số trung bình đối với GAMMAGARD LIQUID được thể hiện trong Bảng 27.

Bảng 27. Đặc tính hóa sinh của kết tủa trung gian G (Ppt G) tạo ra trong quá trình điều chế các lô thử nghiệm IgG 3010, 3610, và 1111, tiến hành thông qua bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao, và đã được lấy trị số trung bình đối với quá trình điều chế GAMMAGARD LIQUID ở một nhà máy sản xuất năm 2010, tiến hành thông qua các bước làm kết tủa phân đoạn Cohn I và II+III.

Số lô		3010	3610	1111	GAMMAGARD LIQUID
IgG trong vốn Cohn	g/l huyết tương (PPD/PS-thử nghiệm)	5,26	6,01	6,91	5,82 (trung bình)
Mô tả đặc điểm của chất kết tủa G					
IgG	g/l huyết tương (PPD/PS-thử nghiệm)	4,99	5,81	6,14	82,9 (trung bình)
IgG	% của vốn Cohn	94,9	96,6	88,9	82,9
C3	% protein	0,4	1,8	1,5	0,1 - 0,6 (trị số trung bình = 0,2)

Fibrinogen	% protein	0,12	0,68	1,02	0,01 – 1,0 (trị số trung bình = 0,13)
------------	-----------	------	------	------	---------------------------------------

Như được thể hiện trong Bảng 27, việc áp dụng bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao làm tăng đáng kể mức thu hồi IgG ở bước trung gian của chất kết tủa G so với phương pháp tinh chế GAMMAGARD LIQUID tiến hành thông qua các bước làm kết tủa phân đoạn Cohn I và II+III (mức thu hồi IgG nằm trong khoảng từ 88,9% đến 96,6% đối với bước làm kết tủa ban đầu ở nồng độ rượu cao, độ pH thấp so với 82,9% đối với các bước làm kết tủa phân đoạn Cohn I và II+III).

Các chất trung gian là chất kết tủa G của IgG tạo ra trong các lô thử nghiệm 3010, 3610, và 1111 có độ tinh khiết thấp hơn không đáng kể so với chất trung gian là chất kết tủa G trung bình của GAMMAGARD LIQUID, như được chứng tỏ bởi nồng độ cao hơn của thành phần bổ sung 3 (C3) và fibrinogen, mặc dù hàm lượng fibrinogen của các chất trung gian này vẫn nằm trong khoảng giá trị đã nêu đối với quy trình sản xuất GAMMAGARD LIQUID. Tuy nhiên, khi các lô thử nghiệm được xử lý tiếp như được mô tả trên đây, thì thành phẩm IgG sẽ đáp ứng được toàn bộ các đặc tính sản xuất đã được thử nghiệm, như thể hiện trong Bảng 41.

Bảng 41. Đặc tính hóa sinh của thành phẩm IgG của người đã được gom lại đối với các lô thử nghiệm 3010, 3610, và 1111, tiến hành thông qua bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao.

Số lô	Lô	3010	3610	1111
Protein	g/l huyết tương	4,45	4,54	4,82
IgA	%	0,05	0,07	0,04
IgM	mg/dl	<1,6	<1,6	<1,6
Fibrinogen	µg/ml	<0,17	0,2	<0,17

C3	mg/ml	<0,194	<0,194	<0,194
Chức Fc	%	109	101	78
HP-SEC	% monome và đime	99,8	99,4	99,8
CAE	% g-globulin	100	100	100
ACA	%	38	39	46
PKA	IU/ml	1	0	1
PL-1	nmol/ml phút (QC)	<10	<10	<10
NAPTT	mg	>10	>10	>10
TGA	% huyết tương đối chứng khỏe mạnh so với 5%	123	124	112
F-XIa đặc hiệu	mU/ml	<0,04	0,06	<0,2

Ví dụ 10 – Mô tả đặc điểm của chế phẩm Albumin

Để xác nhận tiếp rằng các quy trình sản xuất globulin miễn dịch G mới theo sáng chế (ví dụ, các quy trình được tiến hành thông qua bước làm kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao) có thể hỗ trợ cho quá trình sản xuất các sản phẩm phụ protein huyết tương, albumin được tinh chế từ dịch nổi ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao.

Phương pháp tinh chế albumin ra khỏi các dịch nổi phân đoạn Cohn IV-1 và IV-4 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, các dịch nổi phân đoạn Cohn IV-1 và IV-4 được tạo ra trong quá trình tiến hành thông qua các bước làm kết tủa bằng rượu trung gian, như kết tủa phân đoạn Cohn I và phân đoạn Cohn II+III. Trong Ví dụ theo sáng chế, albumin được điều chế theo các phương pháp tiêu chuẩn, chỉ khác là dịch nổi từ bước làm

kết tủa ở độ pH ban đầu thấp, nồng độ rượu cao được dùng trong dịch nổi phân đoạn IV-1. Như được thể hiện trong Bảng 42, việc tinh chế từ dịch nổi ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao tạo ra hiệu suất albumin cao (18,92g/l huyết tương), đáp ứng được toàn bộ các yêu cầu kiểm soát chất lượng đã được thử nghiệm.

Bảng 42. Đặc tính hóa sinh của chế phẩm albumin điều chế được từ dịch nổi kết tủa ở độ pH thấp, nồng độ rượu cao ở quy mô lớn, như được mô tả trên đây.

Thử nghiệm	Đơn vị	Vật chứa cuối AUF00111NG2
Hiệu suất protein	g/l huyết tương	18,92
Albumin (CAE)	(%)	97,3
	(%) sau 2 tuần ở 30°C	97,8
HPLC	(% monome)	98,1
Xitrat	μmol/ml	<0,05
PKA	IE/ml	<4
Kiểm tra bằng mắt	Các lọ nhỏ bị từ chối (ví dụ, do xuất hiện hạt)	Không có

Cần hiểu rằng các ví dụ và các phương án đã mô tả theo sáng chế chỉ nhằm mục đích minh họa và các cải biến và biến đổi khác nhau của chúng sẽ được đề xuất bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và nằm trong phạm vi của đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Toàn bộ các công bố đơn, patent, và đơn cấp bằng độc quyền sáng chế nêu trong bản mô tả được đưa toàn bộ vào đây nhằm mọi mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm globulin miễn dịch được làm giàu, phương pháp này bao gồm các bước:
 - (a) làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và alpha-1-kháng trypsin (A1PI) ra khỏi vốn Cohn ở bước làm kết tủa rượu thứ nhất bằng cách bổ sung etanol vào vốn Cohn đến nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% (thể tích) ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0, tạo ra chất kết tủa thứ nhất bao gồm A1PI kết tủa và các globulin miễn dịch kết tủa và dịch nổi thứ nhất, trong đó chất kết tủa thứ nhất chứa ít nhất 85% lượng A1PI của vốn Cohn;
 - (b) tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất;
 - (c) hòa tan các globulin miễn dịch trong chất kết tủa thứ nhất được tách ra, tạo ra huyền phù thứ nhất có phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch đã hòa tan và phần không hòa tan chứa A1PI không hòa tan; và
 - (d) tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch được làm giàu; và trong đó vốn Cohn không được tiếp xúc với etanol trước bước (a).
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 4\%$.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 3\%$.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 2\%$.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ cuối của etanol bằng $25 \pm 1\%$.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó nồng độ cuối của etanol bằng 25%.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó độ pH bằng $5,5 \pm 0,4$.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó độ pH bằng $5,5 \pm 0,3$.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$.
10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó độ pH bằng $5,5 \pm 0,1$.

11. Phương pháp theo điểm 7, trong đó độ pH bằng 5,5.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó độ pH được duy trì trong bước làm kết tủa rượu thứ nhất.
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó bước làm kết tủa rượu thứ nhất bao gồm việc bổ sung rượu vào bằng cách bổ sung khuếch tán.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó việc bổ sung khuếch tán là phun.
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó bước làm kết tủa rượu thứ nhất bao gồm việc bổ sung rượu vào tại vị trí liền kề với cánh khuấy.
16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó bước làm kết tủa rượu thứ nhất được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -3°C đến -10°C .
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó bước làm kết tủa rượu thứ nhất được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến -9°C .
18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch với dung dịch đậm với lượng nằm trong khoảng từ 4 L đến 60L cho mỗi kg chất kết tủa.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch với chất đậm với lượng nằm trong khoảng từ 8 L đến 15 L cho mỗi kg chất kết tủa.
20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn dịch thứ nhất có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,4.
21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn dịch thứ nhất có độ pH nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,1.
22. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn dịch thứ nhất có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0 mS/cm đến 4 mS/cm.
23. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hỗn dịch thứ nhất có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5 mS/cm đến 2 mS/cm.

24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất kết tủa thứ nhất được tạo hỗn dịch trong chất đệm chứa axetat và/hoặc phosphat.
25. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được tách ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất bằng cách ly tâm hoặc lọc.
26. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước tách riêng phần hòa tan của hỗn dịch thứ nhất ra khỏi phần không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất bao gồm việc:
- trộn đều silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2) với hỗn dịch thứ nhất tạo ra hỗn dịch đã được xử lý; và
- tách SiO_2 ra khỏi hỗn dịch đã được xử lý.
27. Phương pháp theo điểm 26, trong đó silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2) có diện tích bề mặt trung bình nằm trong khoảng $350 \text{ m}^2/\text{g}$ đến $410 \text{ m}^2/\text{g}$.
28. Phương pháp theo điểm 26, trong đó silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2) được bổ sung vào hỗn dịch thứ nhất ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 15 g/kg chất kết tủa thứ nhất đến 80 g/kg chất kết tủa thứ nhất.
29. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
- (a) làm kết tủa đồng thời các globulin miễn dịch và A1PI từ vốn Cohn trong bước kết tủa thứ nhất bằng cách bổ sung ethanol vào vốn Cohn đến nồng độ ethanol cuối cùng nằm trong khoảng từ 24% đến 26% rượu ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,3 đến 5,7 nhiệt độ nằm trong khoảng từ -6°C đến -8°C , tạo ra chất kết tủa thứ nhất bao gồm A1PI kết tủa và các globulin miễn dịch kết tủa và dịch nổi thứ nhất;
- (b) tách riêng chất kết tủa thứ nhất ra khỏi dịch nổi thứ nhất;
- (c) hòa tan các globulin miễn dịch trong chất kết tủa thứ nhất được tách ra, tạo ra hỗn dịch thứ nhất có phần hòa tan chứa các globulin miễn dịch đã hòa tan và phần không hòa tan chứa A1PI không hòa tan,
- (d) xử lý hỗn dịch thứ nhất bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2), tạo ra hỗn dịch đã được xử lý;

(e) tách phân đoạn hòa tan của huyền phù đã được xử lý ra khỏi phân đoạn không hòa tan của huyền phù đã được xử lý và SiO_2 , tạo ra chế phẩm globulin miễn dịch được làm giàu.

30. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 90% lượng globulin miễn dịch của ít nhất một lớp globulin miễn dịch có mặt trong vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 95% lượng globulin miễn dịch của ít nhất một lớp globulin miễn dịch có mặt trong vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).

32. Phương pháp theo điểm 30, trong đó lớp globulin miễn dịch là IgG.

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

(f) làm kết tủa các globulin miễn dịch từ chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu trong bước kết tủa thứ hai, tạo ra chất kết tủa thứ hai và dịch nổi thứ hai;

(g) tạo huyền phù chất kết tủa thứ hai để tạo thành hỗn dịch thứ hai có phần hòa tan bao gồm các globulin miễn dịch và phần không hòa tan; và

(h) thu hồi phân đoạn hòa tan của hỗn dịch thứ hai, tạo ra chế phẩm globulin được làm giàu thêm.

34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó bước kết tủa thứ hai là bước kết tủa rượu.

35. Phương pháp theo điểm 34, trong đó bước kết tủa rượu bao gồm bước bổ sung etanol vào chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu đến nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 22% đến 28% etanol ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

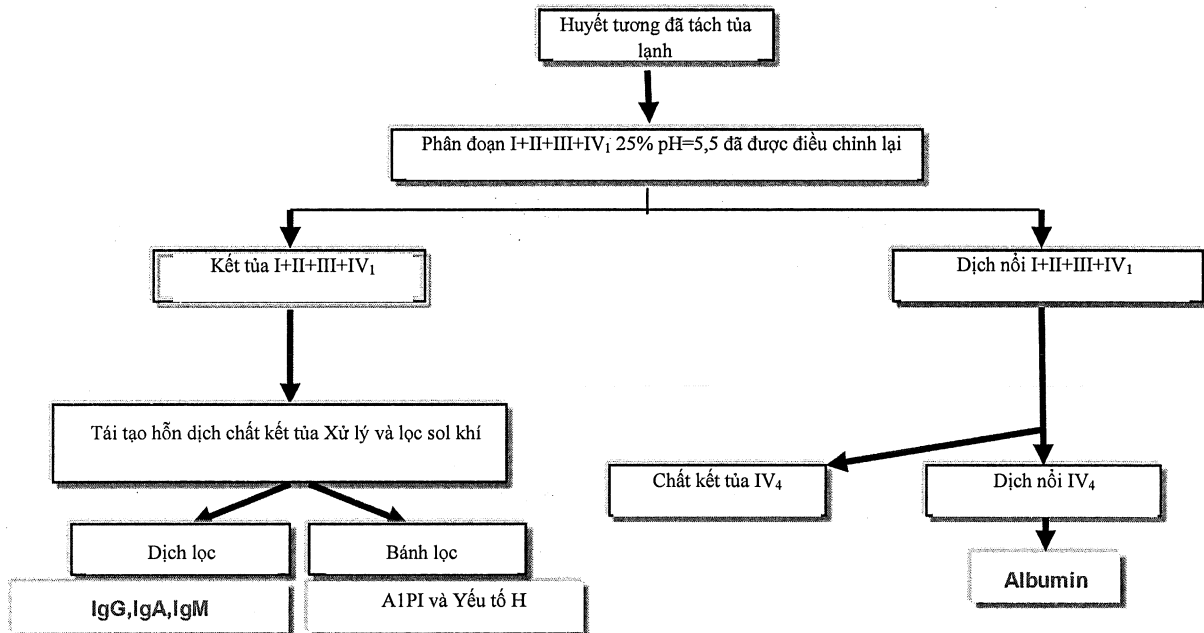
36. Phương pháp theo điểm 34, trong đó bước kết tủa thứ hai bao gồm việc bổ sung rượu vào bằng cách bổ sung khuếch tán.

37. Phương pháp theo điểm 36, trong đó việc bổ sung khuếch tán là phun.

38. Phương pháp theo điểm 34, trong đó bước kết tủa thứ hai bao gồm việc bổ sung rượu vào tại vị trí liền kề với cánh khuấy.

39. Phương pháp theo điểm 34, trong đó bước kết tủa thứ hai được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -3°C đến -10°C .
40. Phương pháp theo điểm 33, trong đó chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 90% lượng globulin G miễn dịch có mặt trong vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).
41. Phương pháp theo điểm 40, trong đó chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu chứa ít nhất 95% lượng globulin G miễn dịch có mặt trong vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).
42. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu sắc ký trao đổi cation.
43. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu sắc ký trao đổi anion.
44. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm bất hoạt và/hoặc loại bỏ virus.
45. Phương pháp theo điểm 44, trong đó phương pháp này bao gồm bước làm bất hoạt virus bằng dung môi/chất làm sạch (S/D).
46. Phương pháp theo điểm 44, trong đó phương pháp này bao gồm bước lọc nano.
47. Phương pháp theo điểm 44, trong đó phương pháp này bao gồm bước ủ chế phẩm ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0 và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 40°C trong ít nhất một tuần.
48. Phương pháp theo điểm 1, phương pháp này bao gồm bước làm giàu thêm các globulin miễn dịch trong chế phẩm globulin miễn dịch đã được làm giàu, tạo ra chế phẩm IgG đã được làm giàu cuối cùng bao gồm ít nhất là 98% IgG.
49. Phương pháp theo điểm 48, trong đó chế phẩm IgG đã được làm giàu cuối cùng bao gồm ít nhất là 99% IgG.

50. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này tạo ra ít nhất là 4 g IgG cho mỗi lít vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).
51. Phương pháp theo điểm 50, trong đó phương pháp này tạo ra ít nhất là 4,25 g IgG cho mỗi lít vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).
52. Phương pháp theo điểm 50, trong đó phương pháp này tạo ra ít nhất là 4,5 g IgG cho mỗi lít vốn Cohn được sử dụng trong bước (a).
53. Phương pháp theo điểm 1, trong đó alpha-1-kháng trypsin (A1PI) được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.
54. Phương pháp theo điểm 1, trong đó fibrinogen được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.
55. Phương pháp theo điểm 1, trong đó yếu tố H được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.
56. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein ức chế Inter-alpha-Trypsin ($\text{I}\alpha\text{Ip}$) được tinh chế tiếp ra khỏi phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất.
57. Phương pháp theo điểm 53, trong đó phân đoạn không hòa tan của hỗn dịch thứ nhất được xử lý bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2).
58. Phương pháp theo điểm 1, trong đó albumin được tinh chế tiếp ra khỏi dịch nổi thứ nhất.
59. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vốn Cohn là huyết tương đã tách tủa lạnh.
60. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất kết tủa thứ nhất chứa ít nhất 90% lượng A1PI của vốn Cohn.
61. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất kết tủa thứ nhất chứa ít nhất 95% lượng A1PI của vốn Cohn.



Hình 1