



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0040216

(51)^{2019.01} C07K 1/18; C07K 16/18

(13) B

(21) 1-2019-05702

(22) 30/03/2018

(86) PCT/EP2018/058365 30/03/2018

(87) WO2018/178375 04/10/2018

(30) BE2017/5211 30/03/2017 BE

(45) 25/06/2024 435

(43) 25/03/2020 384ASC

(73) Univercells S.A. (BE)

Rue Auguste Piccard 48, Gosselies, 6041 Belgium

(72) José CASTILLO (BE); Vasily MEDVEDEV (BE).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẤT HOẠT VIRUT KẾT HỢP VỚI TINH SẠCH DỊCH NUÔI
CHỨA PROTEIN QUAN TÂM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm bao gồm các bước: cho dịch nuôi có chứa protein quan tâm tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường tích điện âm, điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho pH có tính axit, nhờ đó, bất hoạt virus có mặt trong dịch nuôi và rửa giải protein quan tâm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp và kit để kết hợp bất giữ/tinh sạch và bất hoạt virus của dịch nuôi chứa protein quan tâm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Với số lượng ứng viên trị liệu protein ngày càng tăng, đặc biệt là kháng thể đơn dòng (mAb) bước vào các giai đoạn phát triển khác nhau, các công ty dược phẩm sinh học đang ngày càng tìm kiếm các giải pháp sáng tạo để giải quyết con đường này. Để phát triển quy trình sản xuất kháng thể, duy trì các đặc tính chất lượng mong muốn trong khi giảm thời gian đưa ra thị trường, duy trì hiệu quả chi phí và cung cấp sự linh hoạt trong sản xuất là những vấn đề chính trong việc cạnh tranh trên thị trường ngày nay. Vì các liệu pháp kháng thể có thể cần các liều lớn trong thời gian dài, được phải được sản xuất với số lượng lớn với chi phí và thời gian hiệu quả để đáp ứng các yêu cầu lâm sàng và mở đường cho thương mại hóa. Đây cũng là trường hợp đối với các protein trị liệu tái tổ hợp khác bao gồm nhưng không giới hạn ở protein dung hợp, enzym trị liệu và mảnh kháng thể.

Thông thường, protein được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào, sử dụng các dòng tế bào, dòng tế bào vi khuẩn hoặc virus được thiết kế để tạo ra protein quan tâm. Các dòng tế bào được nuôi dưỡng bằng môi trường phát triển phức hợp bao gồm đường, các axit amin, và các yếu tố tăng trưởng. Để sử dụng như là liệu pháp điều trị cho con người, một lượng hoặc mẫu dịch nuôi (ví dụ, sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được chưa được làm sạch), bao gồm các phân tử đích hoặc protein đích được biểu hiện bởi tế bào nuôi cấy, phải được xử lý để (i) bất hoạt một số loại virus có khả năng xuất hiện và (ii) tinh sạch và tách protein mong muốn từ hỗn hợp các hợp chất được nuôi tế bào và từ các sản phẩm phụ của chính các tế bào này. Nói chung, (i) và (ii) là những bước riêng biệt của quá trình tinh sạch protein mong muốn. Trong hầu hết các quy trình sản xuất hiện đại, protein quan tâm trước tiên được tinh sạch và sau đó được xử lý riêng biệt để bất hoạt virus có khả năng được chứa trong dịch nuôi.

Phương pháp như vậy được biết đến từ WO 2009/058812 A1 (D1) và Valdes et

al., (2002) (D2). D1 mô tả phương pháp tinh sạch kháng thể dựa trên sắc ký trao đổi cation. Dịch nuôi kháng thể được tinh sạch thu được sau đó có thể được xử lý để bất hoạt virus có trong dịch nuôi. Tương tự, D2 mô tả phương pháp tinh sạch protein và bất hoạt virus dựa trên quá trình tinh sạch ái lực của kháng thể đích trên cột sắc ký ái lực protein A sau đó là xử lý pH thấp của dịch rửa giải để bất hoạt các hạt virus còn lại. Mặc dù thực hiện tinh sạch protein và bất hoạt virus trong các bước riêng biệt là cách làm được chấp nhận, nhưng nó tốn nhiều thời gian và dẫn đến tăng số lượng thao tác và thời gian để thực hiện chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục tiêu của sáng chế này là mô tả phương pháp và kit khắc phục ít nhất là một phần những nhược điểm nêu trên. Do đó, phương pháp và kit để bất giữ/tinh sạch protein kết hợp với bất hoạt virus được mô tả.

Theo khía cạnh thứ nhất, phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm theo điểm 1 được mô tả.

Cụ thể hơn, phương pháp này mô tả:

- (a) cho dịch nuôi tiếp xúc với hạt hoặc môi trường tích điện âm,
- (b) điều hòa hạt hoặc môi trường sao cho pH của chúng có tính axit trong thời gian đủ sau khi tiếp xúc để làm bất hoạt một hoặc nhiều virus có trong dịch nuôi nêu trên và
- (c) rửa giải protein quan tâm từ thiết bị phân tách đã nêu.

Theo phương án, phương pháp được mô tả để bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm bao gồm các bước:

- điều hòa dịch nuôi để có độ dẫn dưới 15 mS/cm và pH nhỏ nhất là 3,
- cho dịch nuôi tiếp xúc với hạt hoặc môi trường tích điện âm,
- điều hòa các hạt hoặc môi trường để có độ pH nhỏ hơn 4,5 và duy trì độ pH này trong ít nhất là 5 phút,
- điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho độ dẫn của nó nhỏ nhất là 5 mS/cm và độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 8 từ đó rửa giải protein quan tâm.

Theo khía cạnh thứ hai, kit bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi có chứa protein quan tâm chứa ít nhất là hạt hoặc môi trường tích điện âm, các dung dịch phù

hợp để điều hòa các hạt hoặc môi trường và/hoặc dịch nuôi được mô tả và ít nhất là một tài liệu hướng dẫn cho người sử dụng.

Phương pháp và kit hoặc sáng chế này thể hiện một số ưu điểm trong đó đơn giản hóa quá trình tinh sạch protein bằng cách hợp nhất hai bước riêng biệt thành một bước và giảm nguy cơ nhiễm bẩn sản phẩm cuối, ví dụ như protein quan tâm. Điều này dẫn đến việc giảm thời gian sản xuất và chi phí do đó làm giảm giá thành của sản phẩm cuối. Hơn nữa, phương pháp được bộc lộ cung cấp tùy chọn xử lý xuôi liên tục sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được vì nó không thiết lập riêng biệt cho việc bất hoạt virus. Cụ thể là, phương pháp này cung cấp các ưu điểm trong việc xử lý xuôi sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được trong đó không áp dụng bước bắt giữ ái lực và việc bắt giữ phân tử đích được thực hiện bằng sắc ký trao đổi cation. So với các phương pháp liên quan đến các bước ái lực kết hợp với rửa giải pH thấp và bất hoạt virus hàng loạt - phương pháp được bộc lộ có thể làm giảm hàm lượng chất kết tụ và thậm chí ngăn ngừa sự kết tụ của các phân tử đích. Điều này bắt nguồn từ việc thực hiện bước bất hoạt virus trong khi phân tử quan tâm được liên kết với các hạt hoặc môi trường phân tách trao đổi cation. Phương pháp được bộc lộ làm tăng đáng kể năng suất tinh sạch/bất hoạt được kết hợp và chất lượng của các phân tử được tinh sạch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện lưu đồ bao gồm ba bước của phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm theo phương án của sáng chế.

Fig.2 thể hiện lưu đồ của phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm theo phương án của sáng chế.

Fig.3 thể hiện kết quả điện di SDS PAGE của phân đoạn rửa và phân đoạn protein đích mà cả hai thu được theo phương pháp của sáng chế.

Fig.4 thể hiện kết quả điện di SDS PAGE của các phân đoạn rửa và phân đoạn protein đích thu được theo phương pháp của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp và kit được bộc lộ để bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa các protein quan tâm như kháng thể, phân tử có nguồn gốc kháng thể, protein dung

hợp, enzym, v.v.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ được sử dụng ở đây, bao gồm các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học có ý nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Bằng những chỉ dẫn thêm, các định nghĩa thuật ngữ được đưa vào để hiểu rõ hơn bản chất của sáng chế.

Như được sử dụng trong tài liệu này, các thuật ngữ sau đây được hiểu như sau:

Các dạng số ít được sử dụng trong tài liệu này như các dạng số nhiều trừ khi bối cảnh thể hiện rõ ràng theo cách khác. Ví dụ, "ngăn" dùng để chỉ một hoặc nhiều ngăn.

Từ “khoảng” như được sử dụng trong tài liệu này đề cập đến giá trị có thể đo được, chẳng hạn như tham số, số lượng, thời lượng tạm thời và tương tự, có nghĩa là bao gồm sự biến thiên từ $\pm 20\%$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là $\pm 10\%$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là $\pm 5\%$ hoặc nhỏ hơn, thậm chí tốt hơn là $\pm 1\%$ hoặc nhỏ hơn, và tốt hơn nữa là $\pm 0,1\%$ hoặc nhỏ hơn và từ giá trị được chỉ định, cho đến mức này sự biến thiên như vậy là phù hợp để thực hiện trong sáng chế. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng giá trị mà từ bỏ nghĩa "khoảng" đề cập đến chính nó cũng được bộc lộ cụ thể.

Từ "bao gồm", “gồm có”, “gồm” như được sử dụng trong tài liệu này là từ đồng nghĩa với "chứa", “có chứa” và là bao hàm hoặc các từ kết thúc mở chỉ định sự xuất hiện của những thứ theo sau, ví dụ là thành phần và không loại trừ hoặc loại trừ sự xuất hiện của các thành phần, dấu hiệu kỹ thuật, thành phần, chi tiết, các bước bổ sung, không được trích dẫn, được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc được bộc lộ trong tài liệu này.

Các khoảng số được nêu bằng điểm cuối bao gồm tất cả các số và phân số nằm trong khoảng đó, cũng như các điểm cuối được nêu.

Sự thể hiện “% tính theo trọng lượng” (phần trăm trọng lượng), ở đây và xuyên suốt phần mô tả trừ khi có định nghĩa khác, dùng để chỉ trọng lượng tương đối của thành phần tương ứng dựa trên trọng lượng tổng thể của chế phẩm. Sự thể hiện “1% trọng lượng/trọng lượng” có thể hiểu là 1g thành phần tương ứng trên 100 g chế phẩm, sự thể hiện “% trọng lượng/thể tích” có thể hiểu là 1g thành phần tương ứng trên 100 mL của chế phẩm, sự thể hiện “% thể tích/thể tích” có thể hiểu là 1 mL thành phần tương ứng

trên 100 mL chế phẩm.

Theo khía cạnh thứ nhất, phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm bao gồm các bước:

- (a) cho dịch nuôi tiếp xúc với hạt hoặc môi trường tích điện âm,
- (b) điều hòa hạt hoặc môi trường sao cho pH của chúng có tính axit trong thời gian đủ sau khi tiếp xúc để làm bất hoạt một hoặc nhiều virus có trong dịch nuôi nêu trên, và
- (c) rửa giải protein quan tâm từ các hạt hoặc môi trường đã nêu.

Các thiết bị phân tách là các thiết bị được sử dụng để tách các tạp chất nhất định khỏi protein đích sau khi tìm kiếm. Thiết bị này bao gồm cột hoặc hộp sắc ký với các hạt hoặc môi trường được đóng gói trong đó. Theo sáng chế này, việc điều hòa các hạt hoặc môi trường có thể xảy ra trước hoặc sau khi cho dịch nuôi tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường phân tách điện tích âm đó. Phương pháp này cho phép tinh sạch protein quan tâm từ dịch nuôi và đồng thời bất hoạt các hạt virus có thể có trong dịch nuôi đó. Một mặt, các hạt hoặc môi trường phân tách liên kết có chọn lọc với protein quan tâm, cho phép loại bỏ các phân tử không phải đích khỏi dịch nuôi, do đó đảm bảo rằng, sau khi rửa giải từ thiết bị phân tách, thu được protein quan tâm có độ tinh khiết cao. Độ tinh khiết cao này còn tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình xử lý xuôi dịch rửa giải chứa protein quan tâm. Mặt khác, việc bất hoạt các hạt virus có thể có trong dịch nuôi thường rất cần thiết cho việc sử dụng protein quan tâm. Phương pháp này cho phép tinh sạch protein quan tâm và đồng thời làm bất hoạt có tính axit các hạt virus có thể liên kết với các hạt hoặc môi trường phân tách ngoài protein quan tâm. Điều này dẫn đến việc rửa giải protein quan tâm ở trạng thái tinh khiết, với hàm lượng tạp chất giảm và không có các hạt virus hoạt động nhất định mà nhạy cảm với sự bất hoạt virus có tính axit có thể ảnh hưởng xấu đến việc sử dụng tiếp theo của protein quan tâm. Do đó, thực hiện hai bước xử lý này như một bước duy nhất cho phép hợp lý hóa hơn nữa quy trình tinh sạch, khiến nó hoạt động hiệu quả hơn và ít tốn thời gian hơn.

Protein quan tâm có thể là kháng thể, mảnh kháng thể, dẫn xuất kháng thể hoặc protein dung hợp. Protein quan tâm cũng có thể là bất kỳ protein tái tổ hợp nào khác như là enzym, peptit hoặc polypeptit hoặc các phân tử sinh học khác được biểu hiện bởi các

tế bào.

Theo phương án, trước bước (a) pH của dịch nuôi đã nêu được điều chỉnh sao cho nó nằm dưới điểm đẳng điện (pI) của protein quan tâm. Theo phương án khác hoặc phương án tiếp theo, dịch nuôi được điều hòa theo độ dẫn được ưu tiên. Tốt hơn là, độ dẫn đã nêu lớn nhất là 25 mS/cm.

Cần phải hiểu rằng điều hòa độ dẫn và/hoặc độ pH của dịch nuôi có thể đạt được bằng bất kỳ phương pháp nào được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm pha loãng, trao đổi đệm, chuẩn độ hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng. Việc điều hòa độ dẫn của các hạt hoặc môi trường và pH đạt được bằng cách cho chảy qua các hạt hoặc môi trường đã nêu thể tích đủ của dung dịch có độ dẫn và/hoặc pH đích. Sự điều hòa nhằm mục đích làm giảm độ dẫn của dịch nuôi có thể đạt được bằng cách pha loãng dịch nuôi bằng nước siêu tinh khiết hoặc dung dịch đệm nồng độ muối thấp như natri axetat 20 mM pH 5,3. Sự điều hòa nhằm mục đích làm tăng độ dẫn của dịch nuôi có thể đạt được bằng cách chuẩn độ dịch nuôi bằng dung dịch natri clorua 5 M cho đến khi đạt được độ dẫn mong muốn. Độ pH của dung dịch có thể được hạ xuống bằng dung dịch axit clohydric 0,2M đến 1,0M hoặc axit axetic 1M. Độ pH của dung dịch có thể được tăng lên bằng dung dịch natri hydroxit 0,2M đến 1,0M hoặc TRIS bazơ 2M pH 9,50.

Theo phương án, dịch nuôi được điều hòa trước bước (a) sao cho độ dẫn của dịch nuôi đã nêu nhỏ nhất là 0,1 mS/cm, nhỏ nhất là 2 mS/cm, nhỏ nhất là 3 mS/cm, nhỏ nhất là 4 mS/cm, nhỏ nhất là 5 mS/cm hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Độ dẫn của dịch nuôi lớn nhất là 25 mS/cm, lớn nhất là 13 mS/cm, lớn nhất là 12 mS/cm, lớn nhất là 10 mS/cm, lớn nhất là 7 mS/cm, lớn nhất là 6 mS/cm, 5,5 mS/cm hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Dịch nuôi chứa protein quan tâm cũng được điều hòa trước bước (a) sao cho độ pH của dịch nuôi thấp hơn điểm đẳng điện (pI) của protein quan tâm. Độ pH của dịch nuôi nhỏ nhất là 3, nhỏ nhất là 4, nhỏ nhất là 4,5, nhỏ nhất là 5 và lớn nhất là 9, lớn nhất là 8, lớn nhất là 7, lớn nhất là 6 hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Việc điều hòa dịch nuôi trước bước (a) dẫn đến điện tích bề mặt dương tổng số của protein hoặc phân tử quan tâm và/hoặc độ dẫn có lợi cho sự liên kết của phân tử đã nêu với các hạt hoặc môi trường, cụ thể là các hạt hoặc môi trường trao đổi cation. Việc điều hòa này đảm bảo bất giữ được đúng protein quan tâm và tăng khả năng liên kết động của các hạt hoặc môi

trường.

Theo phương án tiếp theo, phương pháp này bao gồm các bước:

- điều hòa dịch nuôi sao cho độ dẫn của nó lớn nhất là 15 mS/cm và pH của nó nhỏ nhất là 3,
- cho dịch nuôi tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường phân tách tích điện âm, từ đó liên kết protein quan tâm với các hạt hoặc môi trường phân tách,
- điều hòa các hạt hoặc môi trường phân tách sao cho pH của nó có tính axit [lớn nhất là 4,5] và duy trì độ pH này trong ít nhất 1 phút, hoặc ít nhất 5 phút, do đó làm bất hoạt virus,
- điều hòa các hạt hoặc môi trường phân tách sao cho độ dẫn của nó nhỏ nhất là 5 mS/cm và độ pH của nó nằm trong khoảng từ 5 đến 8 từ đó rửa giải protein quan tâm.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các điều kiện được đề cập ở trên đặc biệt thuận lợi một mặt là cho sự liên kết tốt của protein quan tâm với các hạt hoặc môi trường phân tách và mặt khác là cho sự bất hoạt đồng thời của virus.

Đối với mục đích của sáng chế, dịch nuôi là bất kỳ nguyên liệu hoặc dung dịch nào chứa protein mong muốn. Tốt hơn là, dịch nuôi là ít nhất một sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được có thể thu được bằng cách nuôi cấy tế bào trong ít nhất một bình nuôi cấy tế bào như thiết bị phản ứng sinh học cho đến khi đạt đến điểm xác định trước của quy trình. Dịch nuôi là mẫu hoặc một lượng sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được. Dịch nuôi hoặc sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được được tùy chọn làm sạch trước khi được xử lý theo phương pháp được bộc lộ.

Theo phương án thay thế, phương pháp này còn bao gồm bước làm sạch dịch nuôi trước bước (a). Trong đó dịch nuôi là sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được, việc làm sạch này có thể được thực hiện khi sản phẩm nuôi cấy tế bào ở bên trong và/hoặc bên ngoài bình nuôi cấy tế bào hoặc thiết bị phản ứng sinh học. Việc làm sạch có thể đạt được bằng bất kỳ phương pháp nào được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Trong trường hợp khi dịch nuôi là sản phẩm nuôi cấy tế bào thu được được nuôi cấy trong môi trường huyền phù, việc làm sạch dịch nuôi chưa được làm sạch chứa sản phẩm nuôi cấy tế bào bắt đầu bằng việc xác định trọng lượng tế bào ướt (WCW) của sản

phẩm nuôi cấy tế bào sinh trưởng trong dịch huyền phù. WCW có thể được xác định theo bất kỳ phương pháp nào được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. WCW có thể được xác định như sau: dịch nuôi cấy tế bào được lấy ra khỏi thiết bị phản ứng sinh học sau khi đạt đến mật độ tế bào xác định trước. Theo phương án, ít nhất là 3 loại dịch nuôi từ 15 đến 50 ml mỗi loại được thu lại. Dịch nuôi được ly tâm ở 4000-5000 g trong vòng 5 đến 10 phút để các tế bào lắng xuống. Dịch nổi phía trên thu được bị loại bỏ và WCW được tính dựa trên sự chênh lệch giữa trọng lượng của ống ly tâm rỗng và trọng lượng của ống ly tâm chứa các tế bào đã lắng xuống. Trung bình của ba phép đo được tính và ghi nhận là WCW tính bằng gam trên lít.

Việc làm sạch dịch nuôi chưa được làm sạch chứa sản phẩm nuôi cấy tế bào bao gồm việc bổ sung vào sản phẩm nuôi cấy này axit béo có 7 đến 10 nguyên tử cacbon, alantoin, ít nhất một hợp chất dương điện, đất tảo diatome (DE) hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng. Các hợp chất này có thể ở dạng lỏng hoặc rắn và có thể được đưa vào dưới dạng hỗn hợp hoặc tách biệt với nhau.

Từ 0,3% đến 0,6% thể tích/thể tích axit béo, 0,5% đến 3% trọng lượng/thể tích alantoin và 0,01% đến 1% trọng lượng/thể tích ít nhất một hợp chất dương điện có thể được sử dụng để làm sạch dịch nuôi. Trong phương án khác hoặc phương án tiếp theo, từ 0,4% đến 0,5% trọng lượng/thể tích axit béo, 1% đến 2% trọng lượng/thể tích alantoin và 0,05% đến 0,1% trọng lượng/thể tích ít nhất một hợp chất dương điện đã nêu được sử dụng để làm sạch dịch nuôi. Trọng lượng phân tử của chitosan có thể nằm trong khoảng từ 30 kDa đến 1.000 kDa. Chitosan đã nêu có thể ở mức độ axetyl hóa bất kỳ.

Theo phương án, hợp chất dương điện là bất kỳ hạt nào mang điện dương như là polysacarit dương điện, polyme dương điện, chitosan, dẫn xuất chitosan, polyme tổng hợp như là polydiallyl dimethylamoni clorua (pDADMAC hoặc polyDDA), poly(alylamin) và polyetylenimin được benzyl hóa, các hạt có sẵn trên thị trường như là TREN (BioWorks, WorkBead TREN, cao) hoặc các chất hoạt động bề mặt cation như hexadexyltrimethylamoni bromua (còn được gọi là CTAB).

Theo phương án khác, công thức cấu tạo chung của axit béo là $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, trong đó n là số nguyên bao gồm từ 4 đến 12, hoặc bao gồm từ 5 đến 8. Axit béo có thể là axit enanthic (axit heptanoic), axit caprylic (axit octanoic), axit pelargonic (axit nonanoic), axit capric (axit decanoic), axit nonenoic hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của

chúng. Axit béo có thể được bổ sung vào dưới dạng muối, chẳng hạn như muối natri, ví dụ natri capryl. Phần béo của axit béo có thể bao gồm chuỗi các nguyên tử cacbon "mạch thẳng". Theo một số phương án, phần béo của axit béo có thể bao gồm chuỗi phân nhánh, chẳng hạn như axit 2-ethylhexanoic, chứa chuỗi 2 cacbon ở vị trí số 2 của chuỗi 6 cacbon chính, tạo ra tổng số 8 nguyên tử cacbon. Axit béo có thể bao gồm liên kết đôi tại vị trí bất kỳ trong chuỗi cacbon. Chuỗi axit béo có thể chứa 6 hoặc 7 hoặc 8 hoặc 9 nguyên tử cacbon.

Theo phương án khác nữa, axit béo, alantoin và ít nhất một hợp chất dương điện được bổ sung vào sản phẩm nuôi cấy tế bào bên trong thiết bị phản ứng sinh học và được để trong thiết bị phản ứng sinh học này trong khoảng từ 5 đến 360 phút, trong khoảng từ 15 đến 240 phút, trong khoảng từ 60 đến 120 phút, trong khoảng từ 30 đến 60 phút, hoặc trong một khoảng thời gian ở giữa chúng. Sản phẩm nuôi cấy tế bào được khuấy trộn ở khoảng từ 60 đến 120 vòng/phút ở nhiệt độ phòng hoặc cao hơn nhiệt độ phòng lên tới khoảng 37°C.

Theo phương án khác nữa, DE được bổ sung vào sản phẩm nuôi cấy tế bào sau khi bổ sung axit béo, alantoin và hợp chất dương điện và khuấy trộn trong các điều kiện nêu trên. Lượng DE được bổ sung vào nằm trong khoảng từ 20 đến 60%, từ 25 đến 45%, hoặc từ 30 đến 48%, từ 35 đến 45%, hoặc khoảng 40% WCE của sản phẩm nuôi cấy tế bào. DE có thể thuộc nhiều loại khác nhau có sẵn trên thị trường. Ví dụ, đối với sản phẩm nuôi cấy tế bào CHO, có thể sử dụng loại Celpure 300® hoặc loại Celpure 1000®, tùy thuộc vào thiết bị phản ứng sinh học.

Theo phương án, DE có thể được bổ sung vào sau 45 phút kể từ khi bổ sung axit béo, alantoin và hợp chất dương điện. Sau khi bổ sung DE, quá trình khuấy trộn được duy trì trong khoảng từ 5 đến 60 phút, trong khoảng từ 8 đến 40 phút, trong khoảng từ 10 đến 30 phút, trong khoảng từ 15 đến 20 phút. Quá trình khuấy trộn được duy trì ở khoảng từ 60 đến 180 vòng/phút. Sản phẩm nuôi cấy tế bào sau đó được lọc bằng cách sử dụng ít nhất một thiết bị lọc mà không thể thấm được DE. Thiết bị lọc đã nêu ít nhất có thể thấm một phần ít nhất là một số thành phần của sản phẩm nuôi cấy tế bào chưa làm sạch, bao gồm tạp chất nhỏ của tế bào chủ, và thấm hoàn toàn các protein hoặc phân tử quan tâm.

Sau khi đưa sản phẩm nuôi cấy tế bào vào thiết bị lọc, DE tích lũy ở một bên của

thiết bị lọc và dần dần tích tụ thành cấu trúc DE bao gồm nhiều kênh. Kích thước hoặc đường kính của các kênh này được xác định bởi kích thước hạt DE được bổ sung vào dung dịch thứ nhất. Kích thước hạt DE có thể được chọn theo kích thước của phân tử sinh học quan tâm và/hoặc các đặc tính chất của sản phẩm nuôi cấy tế bào và/hoặc các đặc tính của các tế bào được sử dụng để biểu hiện phân tử quan tâm (bao gồm loại tế bào (ví dụ tế bào CHO) và mật độ tế bào của sản phẩm thu được cần làm sạch). Cấu trúc DE hình thành đóng vai trò như là công cụ lọc. Các vật liệu lớn như tế bào, mảnh vụn tế bào và các phân tử không phải đích được giữ lại bởi cấu trúc DE, trong khi các phân tử sinh học đích, có kích thước nhỏ, chảy qua các kênh của cấu trúc DE. Do đó thu được sản phẩm nuôi cấy tế bào được làm sạch chứa protein quan tâm. Một cách tùy chọn, bộ phận lọc sâu được đặt ở dưới cấu trúc DE và thiết bị lọc. Bộ phận lọc sâu được chọn sao cho protein quan tâm đi qua nó mà giữ lại được các chất nhiễm hoặc tạp chất có thể có. Điều này còn làm giảm sự có mặt của chất nhiễm trong sản phẩm nuôi cấy tế bào được làm sạch. Làm sạch dịch nuôi hoặc sản phẩm nuôi cấy tế bào bằng cách sử dụng DE cải thiện khả năng lọc của tế bào nuôi cấy được xử lý/kết tụ bằng cách loại bỏ ít nhất một phần tạp chất và phân tử không phải đích khác của tế bào khỏi dịch nuôi.

Các hạt hoặc môi trường tích điện âm có thể là nhựa trao đổi cation. Các hạt hoặc môi trường đã nêu có thể là môi trường hoặc các hạt sắc ký trao đổi cation bất kỳ. Các hạt hoặc môi trường đã nêu có thể được đóng gói trong cột hoặc được sử dụng như là màng có sẵn trên thị trường. Hơn nữa, môi trường, cột hoặc màng sắc ký đã nêu có thể có bản chất đa phương thức với các đặc tính trao đổi cation, ví dụ, trao đổi cation chịu muối, trao đổi cation với các gốc kỵ nước, v.v.. Cột đã nêu được chuẩn bị để sử dụng tốt nhất theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau khi chuẩn bị, cột đã nêu có thể được điều hòa để có các tham số, nghĩa là độ pH và độ dẫn, bằng nhau, tương tự hoặc gần với các tham số của dịch nuôi có chứa phân tử đích. Môi trường sắc ký có thể trao đổi cation gọi là “mạnh” cũng như trao đổi cation gọi là “yếu”. Các hạt hoặc môi trường phân tách cũng có thể là màng phân tách chứa các nhóm chức hay còn gọi là chất hấp phụ màng. Tốt hơn là, hạt hoặc môi trường đã nêu được đóng gói trong cột hoặc hộp.

Dịch nuôi được làm sạch và được điều hòa sau đó được mang tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường. Điều này có thể đạt được bằng cách đưa dịch nuôi vào cột sắc ký được đóng gói với các hạt hoặc môi trường hoặc cho nó tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường. Sự tiếp xúc giữa dịch nuôi được làm sạch và các hạt hoặc môi trường có thể

được thực hiện thủ công hoặc tự động bằng cách sử dụng ống và/hoặc bơm phù hợp và/hoặc dụng cụ sắc ký.

Vì các phân tử không phải đích có thể liên kết với các hạt hoặc môi trường, ít nhất một bước rửa được thực hiện một cách tùy chọn. Bước rửa có thể được thực hiện trước và/hoặc sau bước bất hoạt virus của phương pháp. Theo phương án tiếp theo, các hạt hoặc môi trường phân tách được rửa bằng cách:

- đưa dung dịch vào các hạt hoặc môi trường được sử dụng để cân bằng chúng và/hoặc

- điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho độ dẫn của nó thấp hơn độ dẫn rửa giải protein, từ 7 đến 15 mS/cm và/hoặc điều hòa pH của nó đến độ pH thấp hơn pH rửa giải protein, từ 3 đến 8. Việc rửa này sẽ loại bỏ các phân tử không phải đích khỏi các hạt hoặc môi trường phân tách trong khi giữ lại protein quan tâm liên kết với các hạt hoặc môi trường phân tách đã nêu. Điều này làm tăng độ tinh khiết của protein quan tâm sẽ được rửa giải ở giai đoạn sau.

Theo phương án, các hạt hoặc môi trường trong quá trình bất hoạt virus được điều hòa để có độ pH thấp do đó làm bất hoạt virus có trong dịch nuôi. Ngoài ra, việc giảm độ pH của các hạt hoặc môi trường phân tách dẫn đến tăng điện tích dương ròng của protein quan tâm do thu được proton (H^+) từ môi trường axit. Điều này đảm bảo độ thanh thải virus của phân đoạn sẽ được rửa giải và bất giữ/tinh sạch bằng sắc ký trái ngược với các phương pháp đã biết trong đó hai bước được thực hiện riêng biệt. Độ pH của các hạt/môi trường phân tách tốt hơn là được hạ thấp bằng cách sử dụng dung dịch đệm phù hợp. Độ pH đã nêu được hạ thấp sao cho nhỏ nhất là 2, nhỏ nhất là 2,5, nhỏ nhất là 3, nhỏ nhất là 3,4, nhỏ nhất là 3,6 hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Độ pH đã nêu lớn nhất là 4,5, lớn nhất là 4,3, lớn nhất là 4, lớn nhất là 3,9, lớn nhất là 3,8, lớn nhất là 3,7 hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Việc giảm độ pH của các hạt hoặc môi trường phân tách dẫn đến việc bất hoạt virus có trong dịch nuôi. Độ pH thấp của các hạt hoặc môi trường phân tách được duy trì trong ít nhất 1 phút, ít nhất 15 phút, ít nhất 25 phút, ít nhất 35 phút, ít nhất 45 phút, ít nhất 60 phút hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Độ pH thấp đã nêu được duy trì nhiều nhất là trong 4 giờ, nhiều nhất là trong 3 giờ, nhiều nhất là trong 2 giờ, nhiều nhất là trong 1 giờ hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Độ pH thấp của các hạt hoặc môi trường phân tách có thể được duy trì bằng cách dùng hoàn toàn

hoặc duy trì tốc độ dòng chảy thấp chảy qua các hạt hoặc môi trường phân tách. Tốc độ dòng chảy có thể khác nhau tùy thuộc vào quá trình này và có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 600 cm/giờ. Tốc độ dòng chảy có thể lớn nhất là 600 cm/giờ, lớn nhất là 500 cm/giờ, lớn nhất là 400 cm/giờ, lớn nhất là 300 cm/giờ hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Tốc độ dòng chảy đã nêu nhỏ nhất là 50 cm/giờ, nhỏ nhất là 100 cm/giờ, nhỏ nhất là 150 cm/giờ, nhỏ nhất là 200 cm/giờ hoặc bất kỳ giá trị trung gian nào. Tùy chọn, ít nhất một chất hỗ trợ thanh thải virus được bổ sung vào dung dịch đệm được sử dụng trong bước bất hoạt virus. Nồng độ của chất hỗ trợ thanh thải virus là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10% thể tích/thể tích, từ 1 đến 8% thể tích/thể tích, từ 3 đến 7% thể tích/thể tích, khoảng 5% thể tích/thể tích và tốt hơn là chất bất hoạt virus là rượu isopropyl. Ngoài ra, dung dịch rửa bất hoạt virus cũng có thể chứa triton X-100 và tri-n-butyl phosphat hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng để tạo thuận lợi cho việc thanh thải virus.

Theo phương án, sau khi bất hoạt virus, độ dẫn của các hạt/môi trường phân tách được duy trì không đổi, tức là lớn nhất là 7 mS/cm và nhỏ nhất là 0,1 mS/cm trong khi pH của nó được điều chỉnh đến độ pH từ 3 đến 9, từ 6 đến 8, từ 5 đến 8. Việc điều chỉnh độ pH đóng vai trò (i) chuẩn bị cho quá trình rửa giải protein quan tâm trong khi duy trì protein đã nêu liên kết với các hạt hoặc môi trường phân tách. Thật vậy, rửa giải trong điều kiện pH trung tính làm giảm đáng kể nguy cơ kết tụ protein quan tâm có xu hướng kết tụ trong điều kiện axit và (ii) đạt được độ tinh khiết cao hơn của protein khi các tạp chất còn lại trong các hạt hoặc môi trường phân tách rửa giải do sự chuyển dịch pH trong khi protein quan tâm vẫn liên kết với các hạt hoặc môi trường phân tách. Điều này làm tăng độ tinh khiết của protein quan tâm sẽ được rửa giải.

Sau đó, các hạt hoặc môi trường phân tách được điều hòa sao cho độ dẫn của chúng nhỏ nhất là 1 mS/cm, nhỏ nhất là 5 mS/cm, nhỏ nhất là 7 mS/cm, nhỏ nhất là 7,5 mS/cm, nhỏ nhất là 8 mS/cm, tại nhỏ nhất là 9 mS/cm và nhỏ nhất là 10 mS/cm. Độ dẫn đã nêu lớn nhất là 50 mS/cm, lớn nhất là 20 mS/cm, lớn nhất là 14 mS/cm, lớn nhất là 13 mS/cm, lớn nhất là 12 mS/cm và lớn nhất là 11 mS/cm. Điều này dẫn đến việc rửa giải protein quan tâm ở trạng thái tinh khiết và không có hoặc giảm hàm lượng tạp chất và/hoặc chất kết tụ.

Ở khía cạnh thứ hai, kit để bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm chứa ít nhất một loại hạt hoặc môi trường phân tách tích điện âm, mà được đóng gói trong cột, các dung dịch phù hợp để điều hòa các hạt hoặc môi trường

và/hoặc dịch nuôi được mô tả ở trên và ít nhất một tài liệu hướng dẫn cho người sử dụng.

Fig.1 và Fig.2 thể hiện lưu đồ của phương pháp theo các phương án của sáng chế. Lưu đồ trong Fig.1 thể hiện phác thảo chung của phương án. Theo bước a thứ nhất, protein quan tâm có trong dịch nuôi liên kết với các hạt hoặc môi trường phân tách tích điện âm. Theo bước b, virus có trong dịch nuôi bị bất hoạt bằng cách điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho đạt được độ pH axit, điều này cũng cho phép liên kết protein với các hạt hoặc môi trường phân tách. Cuối cùng, protein quan tâm được rửa giải trong bước c).

Fig.2 minh họa các bước của phương pháp khả thi. Trong bước 1 thứ nhất, dịch nuôi chưa được làm sạch được cung cấp, trong bước 2 sẽ được làm sạch tùy chọn bằng cách loại bỏ các hạt vật chất. Trong bước 3 tùy chọn, dịch nuôi được điều hòa trước theo độ dẫn và/hoặc pH được ưu tiên. Dịch nuôi sau đó được tiếp xúc với các hạt/môi trường phân tách thường được đóng gói trong cột hoặc hộp. Trong bước tiếp theo (bước 6), các hạt/môi trường phân tách được điều hòa đến độ pH axit. Độ pH này sẽ cho phép sự liên kết với protein quan tâm nhưng cũng làm bất hoạt bất kỳ virus nào có trong dịch nuôi. Lưu ý rằng một trong hai bước 2 và 6 có thể được hoàn thành trước bước kia tùy thuộc vào phương án. Một cách tùy chọn, trong bước 5 và 7, có thể thực hiện rửa để loại bỏ các phân tử không phải đích. Trong bước 8 cuối cùng, protein sẽ được rửa giải khỏi các hạt hoặc môi trường, kết quả thu được protein quan tâm được tinh sạch.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tinh sạch kháng thể đơn dòng IgG1 và bất hoạt virus của loài gặm nhấm từ dịch nuôi cấy tế bào CHO.

Kháng thể đơn dòng IgG1 được tinh sạch từ dịch nuôi cấy tế bào CHO dựa trên phương pháp theo phương án khả thi. Fig.2 minh họa trình tự các bước trong quá trình tinh sạch và bất hoạt virus của kháng thể đơn dòng IgG1. Sản phẩm nuôi cấy tế bào CHO thu được chưa được làm sạch (Fig.2 - bước 1) được xử lý bằng axit caprylic (0,45% thể tích/thể tích), allantoin (1% trọng lượng/thể tích), chitosan trọng lượng phân tử cao (0,08% trọng lượng/thể tích) và đất tảo diatome phân lớp Celpure 300 © (38% trọng lượng/trọng lượng trọng lượng tế bào ướt) và được làm sạch (Fig.2 - bước 2) bằng cách lọc dịch nuôi cơ thể với đất tảo diatome ở pH 5,30. Sản phẩm nuôi cấy tế bào biểu hiện

kháng thể đơn dòng IgG1 với điểm đẳng điện lý thuyết là 8,61.

Sau khi làm sạch ở trên, sản phẩm thu được được làm sạch thêm với bộ lọc sâu Sartoclear DL20. Sản phẩm thu được đã làm sạch được pha loãng đến độ dẫn 5 mS/cm với nước siêu tinh khiết (Fig.2 - bước 3). Độ pH của sản phẩm thu được đã làm sạch được điều chỉnh đến 5,3 bằng axit axetic 1M (Fig.2 - bước 3). Môi trường trao đổi cation mạnh Toyopearl GigaCap S-650M, được đóng gói sẵn trong cột sắc ký có thể tích cột (CV) là 5 ml, với kích thước đáy là 8 mm x 100 mm, được sử dụng làm phương tiện bắt giữ/bất hoạt virus và áp dụng quy trình sau:

- cột sắc ký được khử trùng bằng natri hydroxit 0,5N trong 60 phút với tốc độ dòng chảy là 100 cm/giờ và sau đó được trung hòa bằng HEPES 50 mM pH 7,0, 5 CV ở tốc độ 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được điều hòa bằng natri axetat 50 mM, natri clorua 1M pH 5,30 đối với 10 CV với tốc độ dòng chảy là 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được cân bằng với natri axetat 50 mM, natri clorua có độ dẫn là 5,0 mS/cm, pH 5,3 đối với 10 CV với tốc độ dòng chảy là 600 cm/giờ;
- sản phẩm thu được đã làm sạch chứa protein quan tâm đã được nạp vào cột với tốc độ 600 cm/giờ (Fig.2 - bước 4);
- môi trường trao đổi cation được rửa (rửa 1, Fig.2 - bước 5) bằng đệm cân bằng: natri axetat 50 mM, natri clorua có độ dẫn 5,0 mS/cm đối với 5 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- việc bất hoạt virus đã được thực hiện (rửa 2, Fig.2 - bước 6) bằng cách cho dung dịch natri axetat 50 mM, dung dịch pH 3,70 qua môi trường trao đổi cation với tốc độ 100 cm/h trong 60 phút;
- môi trường trao đổi cation được rửa (rửa 3, Fig.2 - bước 7) bằng đệm cân bằng: natri axetat 50 mM, natri clorua có độ dẫn 5,0 mS/cm đối với 5 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được rửa (rửa 4) bằng natri axetat 50 mM, natri clorua, độ dẫn 11 mS/cm, pH 5,30 đối với 7 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- protein quan tâm được rửa giải (Fig.2 - bước 8) bằng natri axetat 50 mM, natri

clorua, độ dẫn 14,5 mS/cm, pH 5,30 ở tốc độ dòng chảy 150 cm/giờ;

- môi trường trao đổi cation được tách bằng natri axetat 50 mM, NaCl 1M pH 5,30 đối với 5 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được khử trùng bằng NaOH 0,5N trong 60 phút với tốc độ dòng chảy 100 cm/giờ và được bảo quản trong HEPES 50 mM, 20% thể tích/thể tích etanol pH 7,0.

Protein quan tâm được rửa giải và thu thập trong các phân đoạn khác nhau được phân tích. Nồng độ protein đích trong phân đoạn chảy qua được theo dõi bằng thử nghiệm Fc-ELISA và kết quả là âm tính trong từng phân đoạn được thu thập cũng như trong phân góp chảy qua. Phân đoạn rửa và phân đoạn rửa giải được phân tích bằng SDS-PAGE (Fig.3) xác nhận rằng các phân đoạn rửa (làn 1 trong Fig.3) chứa chủ yếu là tạp chất LMW và tỷ lệ rất nhỏ protein quan tâm. Phân đoạn rửa giải (làn 2, Fig.3) chứa kháng thể đích. Làn 3 của Fig.3 thể hiện băng và làn 10 của Fig.3 thể hiện chỉ thị trọng lượng phân tử. Hàm lượng của protein tế bào chủ trong phân đoạn rửa giải được theo dõi bằng kit ELISA HCP có bán trên thị trường từ Cygnus Technologies, và nồng độ các HCP trong phân đoạn rửa giải được ước tính là khoảng 500 ppm.

Ví dụ 2: Tinh sạch kháng thể đơn dòng IgG1 và bất hoạt virus từ dịch nuôi cấy tế bào CHO.

Kháng thể đơn dòng IgG1 được tinh sạch từ dịch nuôi cấy tế bào CHO dựa trên phương pháp theo phương án của sáng chế. Fig.2 minh họa trình tự các bước trong quá trình tinh sạch và bất hoạt virus của kháng thể đơn dòng IgG1. Sản phẩm nuôi cấy tế bào CHO thu được chưa được làm sạch (Fig.2 - bước 1) được xử lý bằng axit caprylic (0,45% thể tích/thể tích), alantoin (1% trọng lượng/thể tích), chitosan trọng lượng phân tử cao (0,08% trọng lượng/thể tích) và đất tảo diatome loại Celpure 300 (38% trọng lượng/trọng lượng của trọng lượng tế bào ướt) và được làm sạch (Fig.2 - bước 2) bằng cách lọc thể dịch nuôi bằng đất tảo diatome ở pH 5,30. Sản phẩm nuôi cấy tế bào biểu hiện kháng thể đơn dòng IgG1 có điểm đẳng điện lý thuyết là 8,61.

Sau khi làm sạch ở trên, sản phẩm thu được được làm sạch thêm bằng bộ lọc sâu Millipore B1HC. Dịch nuôi đã làm sạch được pha loãng đến độ dẫn 5 mS/cm bằng nước siêu tinh khiết (Fig.2 - bước 3). Độ pH của sản phẩm thu được đã làm sạch được điều chỉnh đến 5,3 bằng axit axetic 1M (Fig.2 - bước 3). Môi trường trao đổi cation Toyopearl

GigaCap S-650M, được đóng gói sẵn trong cột sắc ký có thể tích cột (CV) 5 ml, với kích thước đáy là 8 mm x 100 mm, được sử dụng làm phương tiện bắt giữ/bất hoạt virus và áp dụng quy trình sau:

- cột sắc ký được khử trùng bằng natri hydroxit 0,5N trong 60 phút với tốc độ dòng chảy là 100 cm/giờ và sau đó được trung hòa bằng HEPES 50 mM pH 7,0, 5 CV ở tốc độ 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được điều hòa bằng natri axetat 30 mM, NaCl 1M pH 5,30 đối với 10 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được cân bằng với natri axetat 30 mM, natri clorua có độ dẫn là 5,0 mS/cm, pH 5,30 đối với 10 CV với tốc độ dòng chảy là 600 cm/giờ;
- sản phẩm thu được đã làm sạch chứa protein quan tâm được nạp vào cột với tốc độ 600 cm/giờ (Fig.2 - bước 4);
- môi trường trao đổi cation được rửa (rửa 1, Fig.2 - bước 5) bằng đệm cân bằng natri axetat 30 mM, natri clorua với độ dẫn 5,0 mS/cm đối với 5 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được rửa (rửa 2, Fig.2 - bước 5) bằng natri axetat 30 mM, natri clorua với độ dẫn 11 mS/cm, pH 5,3 đối với 7 CV với tốc độ dòng chảy thẳng là 600 cm/giờ;
- bất hoạt virus được thực hiện (rửa 3, Fig.2 - bước 6) bằng cách cho đi qua natri axetat 30 mM, natri clorua với độ dẫn 5 mS/cm, pH 3,7 trong 45 phút với tốc độ dòng chảy thẳng là 100 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được rửa (rửa 4, Fig.2 - bước 7) bằng HEPES 30 mM, natri clorua với độ dẫn 5 mS/cm, pH 7,2 đối với 6 CV với tốc độ dòng chảy 600 cm/giờ;
- protein quan tâm được rửa giải (Fig.2 - bước 8) với HEPES 20 mM, natri clorua, độ dẫn 12 mS/cm, trong 4CV ở tốc độ dòng chảy thẳng là 150 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được điều hòa bằng HEPES 20 mM, natri clorua 1M pH 7,2 đối với 5 CV với tốc độ dòng chảy thẳng là 600 cm/giờ;
- môi trường trao đổi cation được khử trùng bằng natri hydroxit 0,5N trong 60 phút với tốc độ dòng chảy 100 cm/giờ và được bảo quản trong HEPES 50 mM, 20% thể

tích/thể tích etanol pH 7,0.

Protein quan tâm được rửa giải và thu thập trong các phân đoạn khác nhau được phân tích. Nồng độ protein đích, tức là kháng thể, trong phân đoạn chảy qua được theo dõi bằng thử nghiệm Fc-ELISA và kết quả là âm tính trong từng phân đoạn được thu thập cũng như trong phần góp chảy qua. Phân đoạn rửa và phân đoạn rửa giải được phân tích bằng SDS-PAGE (Fig.4) xác nhận rằng các phân đoạn rửa (làn 1 và 2 trong Fig.4) chứa chủ yếu là tạp chất LMW và tỷ lệ rất nhỏ protein quan tâm. Phân đoạn rửa giải (làn 3, Fig.4) chứa kháng thể đích. Làn 4 của Fig.4 thể hiện băng và làn 10 của Fig.4 thể hiện chỉ thị trọng lượng phân tử. Hàm lượng của protein tế bào chủ trong phân đoạn rửa giải được giám sát bằng kit ELISA HCP có sẵn trên thị trường từ Cygnus, và nồng độ các HCP trong phân đoạn rửa giải được ước tính là khoảng 500 ppm.

Sáng chế không bị hạn chế đối với bất kỳ hình thức thực hiện nào được mô tả trước đây và một số sửa đổi có thể được thêm vào ví dụ được trình bày mà không cần đánh giá lại các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm bao gồm các bước:
 - (a) điều hòa dịch nuôi sao cho độ dẫn của nó lớn nhất là 15 mS/cm và pH của nó nhỏ nhất là 3,
 - (b) cho dịch nuôi tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường tích điện âm,
 - (c) điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho pH của chúng lớn nhất là 4,5 và duy trì độ pH này trong ít nhất 1 phút hoặc 5 phút sau khi tiếp xúc để làm bất hoạt một hoặc nhiều virus có trong dịch nuôi nêu trên,
 - (d) điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho độ dẫn của chúng nhỏ nhất là 5 mS/cm và pH của nó nằm trong khoảng từ 5 đến 8, và
 - (e) rửa giải protein quan tâm này từ các hạt hoặc môi trường đã nêu.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, trước bước (b), pH của dịch nuôi đã nêu được điều chỉnh sao cho nó thấp hơn điểm đẳng điện (pI) của protein quan tâm.
3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các hạt hoặc môi trường trong bước (c) được điều hòa trong ít nhất 1 phút.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, trước bước (b), dịch nuôi được điều hòa sao cho độ dẫn của dịch nuôi này lớn nhất là 25 mS/cm.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước điều hòa các hạt hoặc môi trường đã nêu xảy ra trước bước cho dịch nuôi tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường đã nêu.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước rửa giải protein đã nêu xảy ra ở pH từ 3 đến 9 hoặc từ 5 đến 8.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó bước rửa giải protein đã nêu xảy ra ở độ dẫn nhỏ nhất là 0,1 mS/cm.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dịch nuôi được điều hòa trước bước cho dịch nuôi đã nêu tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường đã nêu sao cho độ dẫn của chúng nhỏ nhất là 0,1 mS/cm và lớn nhất là 25 mS/cm, nhỏ nhất là 2 mS/cm và lớn nhất là 12 mS/cm, nhỏ nhất là 3 mS/cm và lớn nhất là 10 mS/cm, nhỏ nhất là 4 mS/cm và lớn nhất là 7 mS/cm, nhỏ nhất là 5 mS/cm và lớn nhất là 6 mS/cm,

và /hoặc

sao cho pH của nó nhỏ nhất là 3 và lớn nhất là 9, nhỏ nhất là 4,5 và lớn nhất là 7, nhỏ nhất là 5 và lớn nhất là 6.

9. Phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm bao gồm các bước:

- (a) cho dịch nuôi tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường tích điện âm,
- (b) điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho pH của chúng có tính axit trong thời gian đủ sau khi tiếp xúc để bất hoạt một hoặc nhiều virus có trong dịch nuôi đã nêu, và
- (c) rửa giải protein quan tâm từ các hạt hoặc môi trường đã nêu,

trong đó các hạt hoặc môi trường trong quá trình bất hoạt virus được điều hòa sao cho pH nhỏ nhất là 2,5 và lớn nhất là 4,3, nhỏ nhất là 3 và lớn nhất là 4, nhỏ nhất là 3,2 và lớn nhất là 3,9, nhỏ nhất là 3,6 và lớn nhất là 3,8, trong đó tốt hơn là pH trong quá trình bất hoạt virus được duy trì trong ít nhất là 1 phút và nhiều nhất là 4 giờ, hoặc ít nhất là 45 phút và nhiều nhất là 60 phút.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các hạt hoặc môi trường trong quá trình rửa giải được điều hòa sao cho độ dẫn của chúng nhỏ nhất là 1 mS/cm và lớn nhất là 50 mS/cm, nhỏ nhất là 5 mS/cm và lớn nhất là 20 mS/cm, nhỏ nhất là 7,5 mS/cm và lớn nhất là 15 mS/cm, tùy chọn nhỏ nhất là 8 mS/cm và lớn nhất là 13 mS/cm, tùy chọn nữa là nhỏ nhất là 9 mS/cm và lớn nhất là 12 mS/cm, nhỏ nhất là 10 mS/cm và lớn nhất là 11 mS/cm.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dịch nuôi là dịch nuôi được làm sạch.

12. Phương pháp bất hoạt virus kết hợp với tinh sạch dịch nuôi chứa protein quan tâm bao gồm các bước:

- (a) cho dịch nuôi tiếp xúc với các hạt hoặc môi trường tích điện âm,
- (b) điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho pH của chúng có tính axit trong thời gian đủ sau khi tiếp xúc để bất hoạt một hoặc nhiều virus có trong dịch nuôi đã nêu, và
- (c) rửa giải protein quan tâm đã nêu từ các hạt hoặc môi trường đã nêu,

trong đó quá trình làm sạch dịch nuôi đã nêu bao gồm việc thêm vào dịch nuôi chưa được làm sạch ít nhất là một axit béo có 7 đến 10 nguyên tử cacbon và/hoặc

alantoin; ít nhất một hợp chất dương điện tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm polysacarit điện dương, polyme dương điện, chitosan, dẫn xuất chitosan, polyme tổng hợp, polydiallyl dimethylamoni clorua (pDADMAC), chất hoạt động bề mặt cation; và

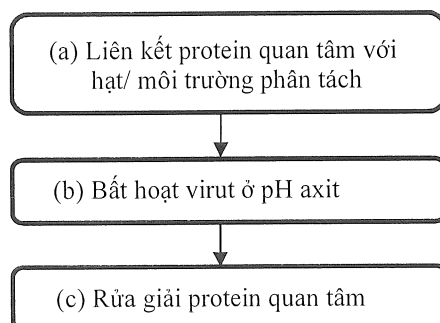
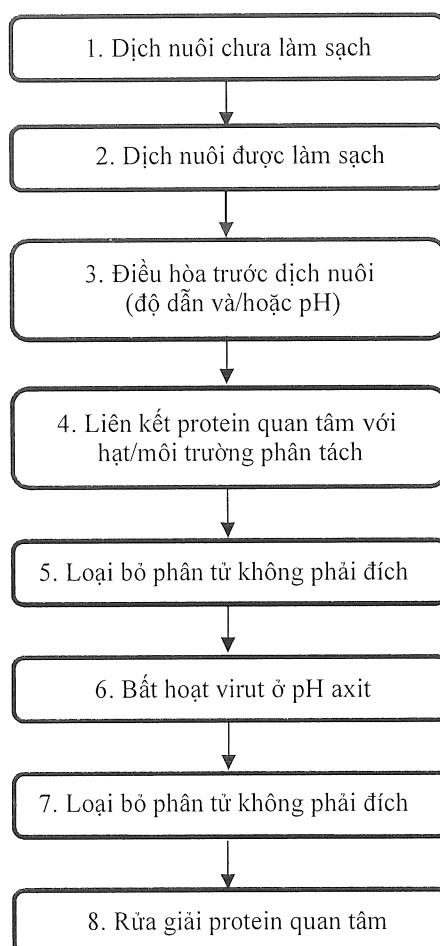
đất tảo diatome hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên còn bao gồm các bước trước và/hoặc sau bước bất hoạt virus, là:

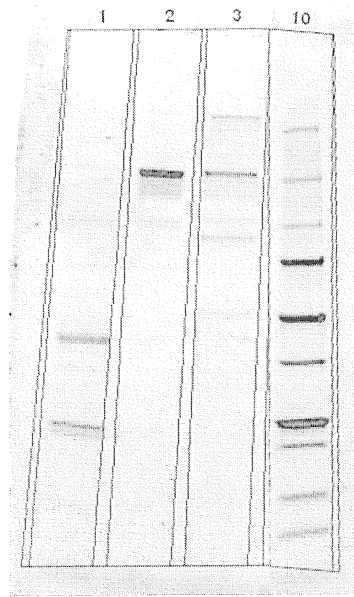
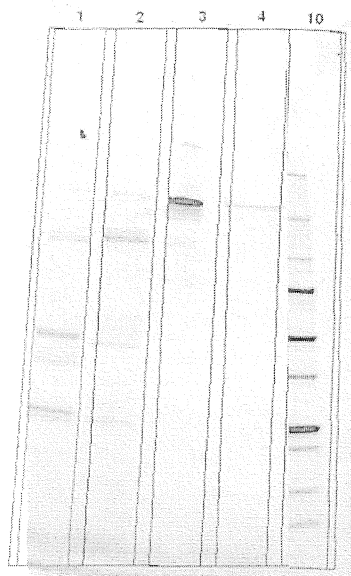
- điều hòa các hạt hoặc môi trường sao cho độ dẫn của nó thấp hơn độ dẫn rửa giải protein do đó loại bỏ các phân tử không phải đích ra khỏi các hạt hoặc môi trường đã nêu, và/hoặc

- điều hòa pH.

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước tiếp xúc bao gồm việc đưa dịch nuôi vào thiết bị phân tách có các hạt và môi trường tích điện âm.

**Fig. 1****Fig. 2**

2/2

**Fig 3****Fig. 4**