



(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)



1-0040883

(51)^{2020.01} C07K 1/22; C07K 14/235; C07K 1/20

(13) B

(21) 1-2020-06170

(22) 15/03/2019

(86) PCT/KR2019/003051 15/03/2019

(87) WO 2019/190092 03/10/2019

(30) 10-2018-0035046 27/03/2018 KR

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/03/2021 396

(73) GREEN CROSS CORPORATION (KR)

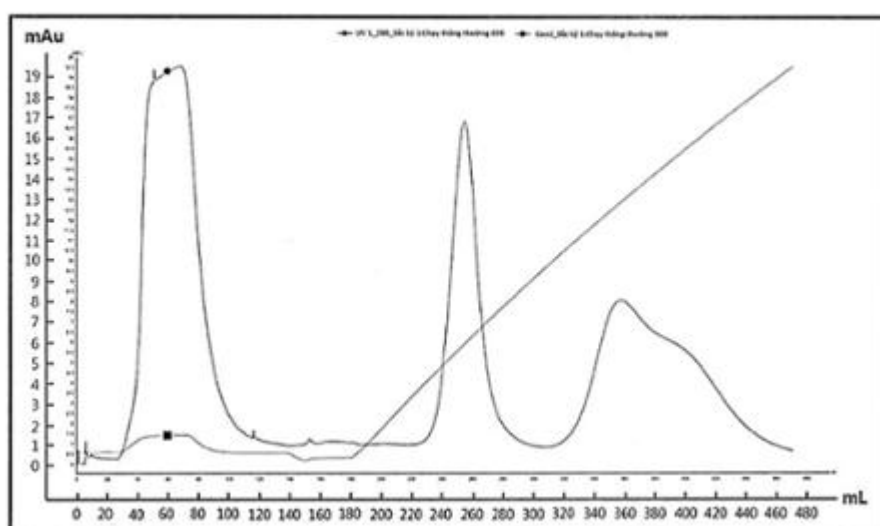
107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 16924, Republic of Korea

(72) PARK, Jong Kwan (KR); MOON, Jae Hoon (KR); CHOI, Gi Sub (KR); AHN, Dong Ho (KR); JEON, Hyung Jin (KR); KIM, Hae Ryun (KR); CHOI, Bo Mi (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN VÀ TINH CHẾ PROTEIN ĐỘC TỔ HO GÀ (PT)
HOẶC PROTEIN SỢI NGỪNG KẾT HỒNG CẦU (FHA)

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thu nhận protein từ *Bordetella pertussis* bao gồm quy trình sắc ký ái lực. Phương pháp theo sáng chế làm tăng sản lượng của các protein PT và FHA bằng cách phân tách các protein PT và FHA của *Bordetella Pertussis* bằng quy trình tinh chế sử dụng cột ái lực màu xanh. Ngoài ra, khi sử dụng, quy trình lọc có thể làm gia tăng đáng kể sản lượng của các protein đích so với quy trình phân tách sử dụng quy trình sắc ký rây phân tử (exclusion chromatography - SEC). Ngoài ra, phương pháp này sử dụng cột ái lực màu xanh để phân tách các protein PT và FHA đã làm giảm chi phí nhựa, thời gian xử lý, sự tiêu thụ chất đệm, và chi phí sản xuất và làm gia tăng đáng kể sản lượng của các protein PT và FHA.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp thu protein *Bordetella Pertussis*, bao gồm quy trình sắc ký ái lực.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ho gà là bệnh hô hấp cấp tính xảy ra chủ yếu ở trẻ sơ sinh và được đặc trưng bởi ho kéo dài trên 2 tuần. *Bordetella Pertussis* là loại cầu khuẩn Gram âm, hiếu khí, có kích thước ngắn, đã được báo cáo là gây bệnh ho gà. *Bordetella Pertussis* sử dụng con người làm vật chủ duy nhất và lây từ người sang người chủ yếu qua đường hô hấp. Ngoài ra, *Bordetella Pertussis* sống trên niêm mạc của đường hô hấp và gây bệnh cho cơ thể người. Vào những năm 1930, vaccin ho gà toàn tế bào đã được phát triển và được chứng minh là có tác dụng dự phòng bệnh ho gà. Ngoài ra, vaccin ho gà được sử dụng kết hợp với vaccin uốn ván và bạch hầu bất hoạt vào những năm 1940; tuy nhiên, các tác dụng phụ (co giật, phù nề, sốt và tác dụng tương tự) của vaccin ho gà toàn tế bào đã được báo cáo. Do đó, cần phải phát triển vaccin ho gà có tính an toàn.

Trong những năm 1950, các nghiên cứu về sinh bệnh học của *Bordetella Pertussis* đã được thực hiện và các thành phần như độc tố ho gà (pertussis toxin - PT), sợi ngưng kết hồng cầu (filamentous hemagglutinin - FHA), pertactin (PRN), và khuẩn mao (fimbriae - FIM) đã được báo cáo là các kháng nguyên. Sau đó, sự phát triển của vaccin ho gà vô bào, bao gồm bước phân tách và tinh chế các protein này đã được thực hiện. Từ những năm 1980, vaccin ho gà tinh chế đã được phát triển và được tiêm chủng lần đầu tiên ở Nhật Bản.

Mục đích của việc tinh chế vaccin ho gà là tạo ra các sản phẩm giàu protein đặc hiệu như PT, FHA, và PRN và không chứa nội độc tố. Theo truyền thống, các kháng nguyên này được tinh chế đồng thời bằng cách lặp lại bước kết tủa amoni sulphat và ly tâm gradien mật độ. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là tạo ra nhiều tạp chất và khó kiểm soát quá trình tinh sạch. Một phương pháp khác là tinh chế từng kháng

nguyên bằng cách sử dụng kết hợp các phương pháp vật lý và hóa học. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Hàn Quốc số 2015-0124973 bộc lộ chế phẩm vacxin ho gà vô bào chứa PT, FHA, và FIM týp 2 và 3.

Phương pháp hiện nay nhằm tinh chế PT và FHA, là những protein chủ yếu của *Bordetella Pertussis*, là phân tách PT và FHA có mặt trong dịch nuôi cấy bằng cách sử dụng quy trình sắc ký rây phân tử (size exclusion chromatography - SEC), một phương pháp được sử dụng cho các chế phẩm vắc xin thông thường. Tuy nhiên, phương pháp này rất khó mở rộng quy mô và có hiệu suất xử lý thấp. Ngoài ra, trong phương pháp sản xuất vacxin ho gà bao gồm bước phối hợp ba hoặc bốn thành phần, việc giảm sản lượng của ngay cả một thành phần có thể dẫn đến vấn đề kéo dài thời gian sản xuất nói chung cũng như vấn đề kinh tế gây ra do số lô sản xuất tăng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Liên quan đến vấn đề này, trong khi nghiên cứu nhằm giải quyết các vấn đề này bằng phương pháp SEC và tìm ra một phương pháp có hiệu quả cho phép sản xuất PT và FHA - các protein từ *Bordetella Pertussis*, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khi các protein PT và FHA được phân tách bằng quy trình sắc ký ái lực bằng cách sử dụng nhựa có gắn hợp chất đặc hiệu, không những thời gian và chi phí cần thiết cho phương pháp này giảm đáng kể, mà sản lượng của các protein đích cũng được gia tăng. Dựa trên các phát hiện này, các tác giả đã tạo ra sáng chế.

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình phân tách protein PT hoặc protein FHA, là các protein từ *Bordetella Pertussis*, bằng cách sử dụng cột ái lực.

Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất quy trình tinh chế protein PT hoặc protein FHA, là protein từ *Bordetella Pertussis*.

Giải quyết vấn đề

Nhằm đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình phân tách protein PT hoặc protein FHA trong dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis* đã được xử lý trước bằng quy trình sắc ký ái lực.

Nhằm đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất quy trình tinh chế protein PT, bao gồm bước loại bỏ nội độc tố từ protein PT này đã được phân tách ra trong quy trình sắc ký ái lực bằng quy trình sắc ký màng (membrane chromatography - MC).

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quy trình tinh chế protein FHA, bao gồm bước loại bỏ bằng nội độc tố từ protein FHA đã được phân tách ra trong quy trình sắc ký ái lực bằng quy trình sắc ký màng.

Ưu điểm của sáng chế

Theo sáng chế, các protein PT và FHA của *Bordetella Pertussis* được phân tách bằng quy trình tinh chế bằng cách sử dụng cột ái lực được nhồi đầy nhựa có gắn hợp chất đặc hiệu, và do đó hiệu quả sản xuất protein PT và FHA được gia tăng. Trong trường hợp các protein PT và FHA được phân tách bằng quy trình tinh chế này, lượng protein PT đã gia tăng đáng kể so với quy trình phân tách sử dụng quy trình SEC. Quy trình phân tách protein PT hoặc protein FHA bằng cách sử dụng cột ái lực làm giảm chi phí nhựa, thời gian xử lý, sử dụng đệm và chi phí sản xuất, và do đó có thể được sử dụng hiệu quả để sản xuất hàng loạt protein PT hoặc protein FHA.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Fig.1 minh họa lưu đồ của quy trình tổng thể đối với các protein PT và FHA.

Fig.2a minh họa sắc ký đồ của quy trình phân tách các protein PT và FHA bằng cách sử dụng phương pháp rửa giải gradien trong quy trình cột ái lực màu xanh.

Fig.2b minh họa khả năng phân tách các protein PT và FHA bằng cách rửa giải gradien, như được thể hiện trên SDS-PAGE.

Fig.3a minh họa sắc ký đồ của quy trình phân tách các protein PT và FHA bằng cách rửa giải theo bậc (300mM, 400mM, 450mM, 500mM, với NaCl nồng độ 1M) trong quy trình cột ái lực màu xanh.

Fig.3b minh họa khả năng phân tách các protein PT và FHA bằng cách rửa giải theo bậc (300mM, 400mM, 450mM, 500mM, với NaCl nồng độ 1M), như được thể hiện trên SDS-PAGE.

Fig.4a minh họa sắc ký đồ của quy trình phân tách các protein PT và FHA bằng cách rửa giải theo bậc (300mM, 400mM, 850mM, với NaCl nồng độ 1M) để xử lý cột ái lực màu xanh.

Fig.4b minh họa khả năng phân tách các protein PT và FHA bằng cách rửa giải theo bậc (300mM, 400mM, 850mM, với NaCl nồng độ 1M), như được thể hiện trên SDS- PAGE.

Fig.5a minh họa sắc ký đồ của quy trình phân tách này bằng cách sử dụng điều kiện tối ưu để phân tách các protein PT và FHA đã được đưa vào bằng cách tạo cột ái lực màu xanh cùng với thiết kế thử nghiệm (design of experiments - DOE) trong bảng 1.

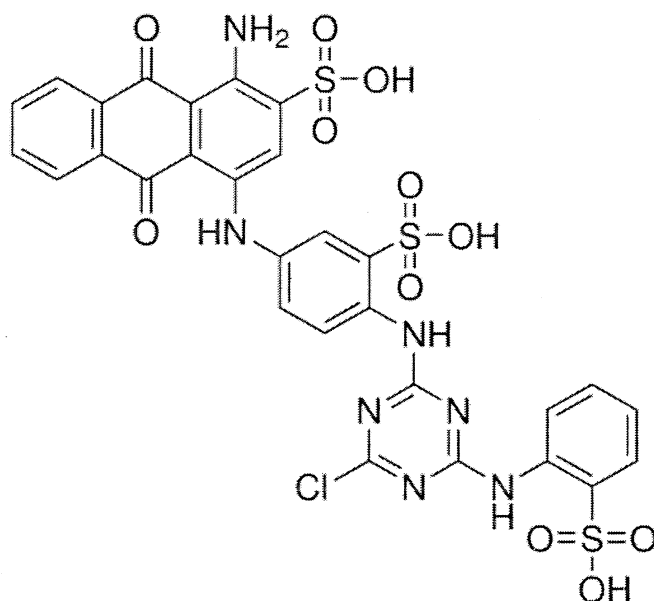
Fig.5b minh họa các kết quả thu được bằng cách thực hiện quy trình này trong điều kiện tối ưu để phân tách các protein PT và FHA, đã được thiết lập với DOE trong bảng 1, như được thể hiện trên SDS-PAGE.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đã đề xuất phương pháp tinh chế protein PT hoặc protein FHA, bao gồm bước phân tách, bằng cách sử dụng quy trình sắc ký ái lực, các protein PT và FHA trong dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis* đã được xử lý trước.

Ở đây, quy trình sắc ký này có thể bao gồm bước sử dụng nhựa có gắn hợp chất có cấu trúc Công thức 1:

[Công thức 1]



Hợp chất này có thể là Cibacron Blue 3G-A (Sigma-Aldrich). Theo sáng chế, quy trình cột ái lực, trong đó cột này được nhồi đầy nhựa được gắn hợp chất này, còn được gọi là "quy trình cột ái lực màu xanh" hoặc "quy trình sắc ký ái lực xanh."

Theo một phương án của sáng chế, thay vì dùng quy trình sắc ký rây phân tử (size exclusion chromatography - SEC), đây là phương pháp thường được sử dụng để phân tách protein PT và protein FHA, đã thực hiện quy trình sắc ký ái lực bằng cách sử dụng hợp chất Cibacron Blue 3G-A làm pha tĩnh để phân tách các protein PT và FHA có mặt trong dịch nuôi cấy.

Ngoài ra, quy trình sắc ký ái lực có thể được thực hiện bằng cách rửa giải theo bậc hoặc rửa giải gradient. Cụ thể là, có thể sử dụng phương pháp rửa giải gradient. Theo một phương án của sáng chế, các quy trình phân tách các protein PT và FHA đã được thực hiện bằng cách rửa giải theo bậc và rửa giải gradient nhằm thiết lập phương pháp có hiệu quả để phân tách các protein PT và FHA trong quy trình sắc ký ái lực màu xanh. Kết quả là, trong trường hợp quy trình này được thực hiện bằng cách rửa giải gradient, đã xác định rằng protein PT này và protein FHA được phân tách tốt trên SDS- PAGE.

Ở đây, thuật ngữ "rửa giải gradient" được dùng để chỉ phương pháp thực hiện bước rửa giải trong lúc liên tục thay đổi thành phần pha động. Ngoài ra, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "rửa giải theo từng bậc" là phương pháp thực hiện rửa giải thông qua chuyển đổi không liên tục, được thực hiện sau khi khả năng rửa giải tăng lên, đạt được bằng cách thay đổi nồng độ hoặc thành phần của dung môi chảy qua cột trong sắc ký.

Dung dịch đệm rửa giải được dùng trong phương pháp rửa giải gradient có thể là dung dịch natri phosphat. Ngoài ra, dung dịch đệm rửa giải này có thể chứa thêm dung dịch NaCl, và quy trình sắc ký ái lực xanh này có thể này được thực hiện bằng cách thay đổi nồng độ dung dịch NaCl.

Dung dịch natri phosphat có thể có nồng độ nằm trong khoảng từ 10mM đến 500mM, từ 20mM đến 350mM, từ 50mM đến 200mM, hoặc từ 100mM đến 150mM, và cụ thể là có nồng độ bằng 100mM. Ngoài ra, dung dịch natri phosphat chứa dung dịch NaCl có độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5, 6,8 đến 8,2, 7,2 đến 7,8, hoặc từ 7,4 đến 7,7, và cụ thể là có độ pH bằng 7,6. Ngoài ra, dung dịch đệm rửa giải này có thể là

nằm trong khoảng từ 15CV đến 35 CV, từ 20CV đến 33 CV, hoặc từ 23 CV đến 30 CV, và cụ thể là 25 CV. Ngoài ra, trong quy trình sắc ký này, các protein PT và FHA có thể được rửa giải riêng rẽ bằng cách tăng dần nồng độ dung dịch NaCl từ 0M đến 3 M, từ 0M đến 2 M, hoặc từ 0M đến 1 M.

Theo một phương án của sáng chế, các protein PT và FHA đích đã được rửa giải riêng rẽ bằng cách cho dung dịch natri phosphat 100mM có độ pH bằng 7,6 chảy qua trong 25 CV, đồng thời tăng dần nồng độ NaCl đến 1 M, trong đó PT được rửa giải trước và FHA được rửa giải sau.

Quy trình tinh chế sử dụng sắc ký ái lực có thể là có thể trải qua quy trình tiền xử lý trước bước rửa giải sử dụng phương pháp rửa giải gradien. Quy trình tiền xử lý này có thể được thực hiện thông qua các bước: i) rửa, ii) cân bằng cột này bằng cách dùng chất đệm cân bằng, iii) hấp phụ dung dịch chứa protein đích lên cột này, iv) tái cân bằng cột này bằng cách dùng chất đệm tái cân bằng, và v) rửa cột này bằng cách dùng chất đệm rửa.

Cột này được nhồi đầy nhựa có thể được rửa bằng dung dịch NaCl. Ngoài ra, chất đệm cân bằng, đệm tái cân bằng, hoặc đệm rửa này có thể là dung dịch natri phosphat. Theo một phương án của sáng chế, cột này được rửa bằng dung dịch NaCl có nồng độ bằng 3M, và cột này được cân bằng và tái cân bằng bằng cách dùng dung dịch natri phosphat làm chất đệm cân bằng và chất đệm tái cân bằng. Ngoài ra, cột này được rửa bằng cách dùng dung dịch đệm rửa natri phosphat.

Ngoài ra, theo sáng chế, “dịch nuôi cấy vi khuẩn ho gà đã được xử lý trước” có thể thu được bằng các bước sau: 1) ly tâm dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis*; 2) tinh chế dịch nổi thu được bằng quy trình sắc ký hydroxyapatit (hydroxyapatit - HA); và 3) tinh chế dịch nổi đã tinh chế bằng quy trình sắc ký tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction chromatography - HIC).

Trước hết, thực hiện bước ly tâm dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis*.

Theo sáng chế, "*Bordetella Pertussis*", còn được gọi là *Bordetella parapertussis*, là trực khuẩn Gram âm có kích thước nhỏ nằm trong khoảng từ 0,3 đến

1µm. Trong số các protein chủ yếu của *Bordetella Pertussis*, PT là chữ viết tắt của độc tố ho gà (pertussis toxin). Protein PT này được tạo ra bởi *Bordetella Pertussis* và là chất độc, gây rối loạn chức năng hoặc có tác dụng gây chết trong cơ thể sống hoặc trong tế bào. Ngoài ra, FHA là chữ viết tắt của filamentous haemagglutinin adhesin, và là yếu tố độc lực của *Bordetella Pertussis* gây bệnh ho gà. Protein PT và protein FHA là các protein màng ngoài bám vào các tế bào biểu mô khí quản, thu được từ *Bordetella Pertussis*, và là các thành phần quan trọng của vacxin ho gà.

Theo một phương án của sáng chế, chủng *Bordetella Pertussis* được nuôi cấy trong MSS (modified stainerscholte medium– MSS) ở nhiệt độ 35°C, và ly tâm dịch nuôi cấy tế bào thu được trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, dịch nổi nuôi cấy không chứa tế bào được phân tách ra và được thu lấy từ đó.

Thứ hai, thực hiện bước tinh chế dịch nổi thu được bằng quy trình sắc ký hydroxyapatit.

Sau khi ly tâm, dung dịch ly giải tế bào hoặc dịch nuôi cấy tế bào, mảnh vỡ tế bào không cần thiết hoặc thành phần tương tự được loại bỏ bằng cách sử dụng quy trình sắc ký cột khác nhau hoặc phương pháp tương tự. Quy trình sắc ký cột này có thể là sắc ký hydroxyapatit (hydroxyapatit - HA), sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký loại trừ kích thước, sắc ký lọc gel, HPLC, HPLC pha đảo, sắc ký ái lực (sắc ký ái lực xanh), hoặc phương pháp tương tự. Theo một phương án của sáng chế, quy trình sắc ký hydroxyapatit được thực hiện như một quy trình tinh chế thứ nhất để xử lý trước đối với dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis*.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sắc ký hydroxyapatit” là sắc ký cột sử dụng các hạt tinh thể canxi phosphat làm chất hỗ trợ cho quá trình phân tách. Các ion phosphat tích điện âm và các nguyên tử canxi tích điện dương được xếp cách đều nhau trên bề mặt tinh thể này. Các protein có bề mặt phân tử thực sự có tương tác ion với các nguyên tử này đều có thể được hấp phụ vào nhựa trong cột này. Ngoài ra, protein đã được hấp phụ có thể được rửa giải bằng dung dịch đệm phosphat hoặc dung dịch tương tự.

Theo một phương án của sáng chế, trong sắc ký hydroxyapatit, các protein PT và

FHA được rửa giải bằng cách dùng dung dịch natri phosphat làm chất đệm cân bằng, dung dịch đệm rửa natri phosphat, và dung dịch natri phosphat chứa dung dịch NaCl làm chất đệm rửa giải.

Thứ ba, có thể được thực hiện bước tinh chế dịch nổi đã tinh chế bằng quy trình sắc ký tương tác kỵ nước.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký tương tác kỵ nước được dùng làm quy trình tinh chế thứ hai để xử lý trước đối với dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis*.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sắc ký tương tác kỵ nước” được dùng để chỉ quy trình phân tách sử dụng tương tác kỵ nước giữa chất nền có nhóm chức kỵ nước và phân tử. Chất nền này được phép có chức năng kỵ nước bằng cách biến tính agarosa ưa nước và bất hoạt. Agarosa đã biến tính thu được bằng cách cho alkylamin phản ứng với agarosa hoạt hóa CNBr. Ngoài ra, quy trình sắc ký tương tác kỵ nước được sử dụng rộng rãi để phân tách protein. Ngoài ra, trong quy trình sắc ký tương tác kỵ nước, cường độ ion có thể được làm giảm hoặc độ pH có thể được làm tăng lên để rửa giải protein.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch chứa các protein PT và FHA đã được rửa giải bằng cách dùng dung dịch natri phosphat chứa dung dịch NaCl làm chất đệm cân bằng, dung dịch đệm rửa natri phosphat, và dung dịch đệm rửa natri phosphat giải trong quy trình sắc ký tương tác kỵ nước.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein PT, bao gồm bước loại bỏ bằng quy trình sắc ký màng (membrane chromatography - MC), nội độc tố từ protein PT đã được phân tách trong quy trình sắc ký ái lực.

PT và FHA là các protein từ *Bordetella Pertussis* chứa nội độc tố, loại độc tố có mặt bên trong tế bào vi khuẩn. Do đó, nhằm tinh chế các protein PT và FHA để các protein này được sử dụng làm vaccin, phải thực hiện phương pháp loại bỏ nội độc tố.

Bước loại bỏ nội độc tố có thể được thực hiện bằng quy trình sắc ký ái lực hoặc sắc ký màng, và cụ thể là được thực hiện bằng quy trình sắc ký màng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sắc ký màng” chỉ phương pháp được dùng để

ting chế kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies - MAbs) và các phân tử sinh học khác, trong đó màng phẳng, có lỗ lớn được dùng sao cho tỷ lệ đối lưu lớn hơn tỷ lệ khuếch tán, và hiệu quả phân tách dung dịch là tương đối cao. Do đó, quy trình sắc ký màng cho phép virus, plasmid, phức hệ protein lớn, hoặc thành phần tương tự dễ di chuyển đến gần màng này và dễ dàng được phân tách. Sắc ký màng có sẵn trên thị trường bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi, Mustang Q (Pall Corporation), Sartobind Q (Sartorius Stedim Biotech GmbH), và màng tương tự.

Theo một phương án của sáng chế, quy trình Mustang Q được dùng làm quy trình sắc ký màng nhằm loại bỏ nội độc tố từ protein PT. Mustang-Q là màng được làm từ màng polyetesulfon kỵ nước (polyethersulfone - PES) giúp loại bỏ nội độc tố tích điện âm bằng trao đổi ion thông qua lớp phủ cao phân tử từ nhóm amin bậc bốn liên kết ngang. Trong sắc ký màng Mustang Q, đường kính lỗ nằm trong khoảng từ 0,6 μ m đến 1,0 μ m, cụ thể là nằm trong khoảng từ 0,7 μ m đến 0,9 μ m, và cụ thể hơn là 0,8 μ m có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế protein FHA, bao gồm bước loại bỏ bằng quy trình sắc ký màng, nội độc tố từ protein FHA đã được phân tách trong quy trình sắc ký ái lực xanh.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp Mustang Q được dùng làm quy trình sắc ký màng nhằm loại bỏ nội độc tố từ protein FHA.

Trong sắc ký màng Mustang Q, có thể sử dụng đường kính lỗ nằm trong khoảng từ 0,6 μ m đến 1,0 μ m, cụ thể là nằm trong khoảng từ 0,7 μ m đến 0,9 μ m, và cụ thể là 0,8 μ m.

Quy trình phân phân tách và tinh chế các protein PT và FHA được minh họa trong Fig.1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa cho sáng chế, và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Nuôi cấy *Bordetella Pertussis*

Bordetella pertussis (Viện Y tế Quốc gia) được nuôi cấy trong môi trường MSS ở nhiệt độ 35°C trong 4 ngày. Về thời gian nuôi cấy, cụ thể là mất 1 ngày để nuôi cấy ban đầu, 1 ngày để nuôi cấy làm giàu sơ cấp, 1 ngày để nuôi cấy làm giàu thứ cấp, và 1 ngày để nuôi cấy chính.

Ví dụ 2. Quy trình ly tâm

Dịch nuôi cấy tế bào được phân tách thành dịch nổi nuôi cấy và cặn bằng cách ly tâm liên tục ở tốc độ 9.500 vòng/phút, với tốc độ dòng đầu vào là 100 l/giờ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

Ví dụ 3. Tinh chế HA

Dùng nước cất để loại bỏ dung dịch bảo quản nhựa hydroxyapatit (hydroxyapatit - HA), và sau đó thực hiện bước rửa bằng phản ứng với dung dịch NaOH 1M trong 1 giờ. Cân bằng đạt được bằng cách dùng dung dịch natri phosphat làm chất đệm cân bằng. Sau đó, dịch nổi nuôi cấy thu được bằng quá trình ly tâm được hấp phụ vào nhựa HA, và dịch nổi nuôi cấy còn sót lại được lấy ra bằng cách dùng chất đệm cân bằng. Sau đó, hoàn thành bước rửa bằng cách dùng dung dịch đệm rửa natri phosphat, và sau đó các protein PT và FHA được rửa giải bằng cách dùng dung dịch natri phosphat chứa dung dịch NaCl làm chất đệm rửa giải.

Ví dụ 4. Tinh chế trên cột HIC

Nước cất được cho chảy qua cột chứa đầy nhựa HIC trong 3CV ở tốc độ 120cm/giờ để loại bỏ dung dịch bảo quản. Sau đó, dung dịch NaOH 1M được cho chảy qua đó trong 4CV ở tốc độ 40cm/giờ để thực hiện bước rửa. Dung dịch natri phosphat chứa dung dịch NaCl làm chất đệm cân bằng, được cho chảy qua trong 5CV để đạt được trạng thái cân bằng. Sau khi cân bằng đã được hoàn tất, dung dịch rửa giải thu được nhờ quá trình tinh chế HA, được cho chảy qua cột HIC để hấp phụ. Dung dịch đệm cân bằng được cho chảy qua trong 5 CV để loại bỏ dung dịch còn sót lại trong cột này. Sau đó, dung dịch đệm rửa natri phosphat, được cho chảy qua đó trong 5CV để thực hiện bước rửa. Sau khi hoàn thành bước rửa, dung dịch natri phosphat được cho chảy qua trong 10CV để rửa giải các protein PT và FHA.

Ví dụ 5. Tinh chế trên cột ái lực màu xanh

Ví dụ 5.1. Tinh chế bằng phương pháp rửa giải gradien

Nước cất được cho chảy qua cột chứa đầy nhựa Cibacron Blue 3G-A trong 3CV ở tốc độ 60 cm/giờ để loại bỏ dung dịch bảo quản. Sau đó, dung dịch NaCl có nồng độ bằng 3M được cho chảy qua đó trong 3CV ở tốc độ 60cm/giờ để thực hiện bước rửa trước khi dùng. Dung dịch natri phosphat là chất đệm cân bằng, được cho chảy qua trong 5 CV để đạt được trạng thái cân bằng. Sau khi cân bằng đã được hoàn tất, dung dịch thu được bằng cách trộn dung dịch rửa giải HIC trong Ví dụ 1.4 với nước cất theo tỷ lệ 1:1, được cho chảy qua cột này để hấp phụ. Dung dịch đệm cân bằng được cho chảy qua trong 5CV để loại bỏ dung dịch còn sót lại trong cột này. Sau đó, dung dịch đệm rửa natri phosphat được cho chảy qua trong 5CV để thực hiện bước rửa.

Sau khi hoàn thành bước rửa, thực hiện bước rửa giải gradien, trong đó dung dịch natri phosphat chứa dung dịch NaCl được dùng làm chất đệm rửa giải. Ở đây, dung dịch NaCl có nồng độ tăng dần từ 100mM đến 500mM được cho chảy qua trong 10CV để phân tách protein PT và protein FHA. Ở đây, protein PT này được rửa giải trước và protein FHA được rửa giải sau, tùy theo sự khác biệt về khả năng gắn kết với nhựa của chúng. Các kết quả này được minh họa trên các Fig.2a và 2b.

Ví dụ 5.2. Tinh chế bằng cách rửa giải theo bậc

Nước cất được cho chảy qua cột chứa đầy nhựa Cibacron Blue 3G-A trong 3CV ở tốc độ 60 cm/giờ để loại bỏ dung dịch bảo quản. Sau đó, dung dịch NaCl có nồng độ bằng 3M được cho chảy qua đó trong 3CV ở tốc độ 60cm/giờ để thực hiện bước rửa trước khi dùng. Dung dịch đệm cân bằng natri phosphat được cho chảy qua trong 5 CV để đạt được trạng thái cân bằng. Sau khi cân bằng đã được hoàn tất, dung dịch thu được bằng cách trộn dung dịch rửa giải HIC trong ví dụ 1.4 và nước cất với tỷ lệ 1:1, được cho chảy qua cột này để hấp phụ. Dung dịch đệm cân bằng được cho chảy qua trong 5CV để loại bỏ dung dịch còn sót lại trong cột này. Sau đó, dung dịch đệm rửa natri phosphat được cho chảy qua trong 5CV để thực hiện bước rửa.

Sau khi hoàn thành bước rửa, thực hiện bước rửa giải theo bậc gồm 5 bước. Dung

dịch natri phosphat nồng độ 100mM có độ pH bằng 7,6 chứa dung dịch NaCl đã được dùng làm chất đệm rửa giải cho mỗi bước. Ở đây, dung dịch NaCl lần lượt được dùng ở các nồng độ theo từng bậc tương ứng là 300mM, 400mM, 450mM, 500mM, và 1M, và dung dịch này được cho chảy qua trong 10CV nhằm phân tách protein PT và protein FHA. Các kết quả này được minh họa trên các Fig.3a và 3b. Như được minh họa trên các Fig.3a và 3b, đã xác định rằng protein PT được rửa giải trong dung dịch NaCl có nồng độ 300mM và protein FHA được rửa giải bắt đầu từ nồng độ 400mM, tùy theo sự khác biệt về khả năng gắn kết của chúng.

Nhằm xác định thời điểm chính xác khi protein FHA được rửa giải, rửa giải theo bậc bao gồm 4 bậc, được thực hiện bằng cách thay đổi nồng độ dung dịch NaCl. Dung dịch NaCl đã được dùng ở các nồng độ theo từng bậc tương ứng là 300mM, 400mM, 850mM, và 1 M, và quy trình tiếp theo thì tương tự như trên. Các kết quả này được minh họa trên các Fig.4a và 4b. Như được minh họa trên các Fig.4a và 4b, protein PT vẫn được rửa giải trong dung dịch NaCl có nồng độ 300mM, và protein FHA được rửa giải trong dung dịch NaCl có nồng độ là 850mM.

Ví dụ 6. Thiết lập các điều kiện tối ưu để phân tách PT và FHA

Để thiết lập các điều kiện tối ưu nhằm phân tách PT và FHA bằng phương pháp rửa giải gradien, quá trình tinh chế đã được thực hiện ở quy mô nhỏ bằng cách thiết lập thiết kế thí nghiệm (design of experiments - DOE) trong bảng 1.

[Bảng 1]

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	Thứ tự chuẩn	Thứ tự chạy	Điểm giữa	Khối	SP	Độ pH	CV
1	1	3	1	1	50	7,4	20
2	2	10	1	1	150	7,4	20
3	3	9	1	1	50	7,8	20
4	4	11	1	1	150	7,8	20

5	5	1	1	1	50	7,4	30
6	6	8	1	1	150	7,4	30
7	7	7	1	1	50	7,8	30
8	8	4	1	1	150	7,8	30
9	9	5	0	1	100	7,6	25
10	10	6	0	1	100	7,6	25
11	11	2	0	1	100	7,6	25

Nước cất được cho chảy qua cột chứa đầy nhựa Cibacron Blue 3G-A trong 3CV ở tốc độ 60 cm/giờ để loại bỏ dung dịch bảo quản. Sau đó, dung dịch NaCl có nồng độ 3M được cho chảy qua đó trong 3CV ở tốc độ 60cm/giờ để thực hiện bước rửa trước khi dùng. Dung dịch đệm cân bằng natri phosphat được cho chảy qua trong 5 CV để đạt được trạng thái cân bằng. Sau khi cân bằng đã được hoàn tất, dung dịch thu được bằng cách trộn dung dịch rửa giải HIC trong Ví dụ 1.4 với nước cất theo tỷ lệ 1:1, được cho chảy qua cột này để hấp phụ. Dung dịch đệm cân bằng được cho chảy qua trong 5CV để loại bỏ dung dịch còn sót lại trong cột này. Sau đó, dung dịch đệm rửa natri phosphat được cho chảy qua trong 5CV để thực hiện bước rửa.

Sau khi hoàn thành bước rửa, PT và FHA được phân tách bằng cách thực hiện phương pháp rửa giải gradien, sử dụng dung dịch natri phosphat trong 25CV, có nồng độ 100mM ở độ pH bằng 7,6, chứa dung dịch NaCl 1M làm chất đệm rửa giải. Ở đây, PT được rửa giải trước và FHA được rửa giải sau, tùy theo sự khác biệt về khả năng gắn của chúng với nhựa này. Các kết quả này được minh họa trên các Fig.5a và 5b.

Các quy trình phân tách được thực hiện theo các điều kiện tương ứng. Kết quả là, PT và FHA được phân tách hiệu quả nhất ở các điều kiện 9, 10, và 11. Từ đó, đã xác định rằng các điều kiện 9, 10, và 11 là các điều kiện tối ưu để phân tách PT và FHA bằng cách sử dụng phương pháp rửa giải gradien.

Ví dụ thử nghiệm 1. Xác định khả năng mở rộng quy mô của các điều kiện phân tách đã thiết lập

Nhằm xác định liệu các điều kiện phân tách PT và FHA đã được thiết lập ở quy mô nhỏ trong Ví dụ 6 có phải là tối ưu hay không, có được áp dụng ngay cả trong trường hợp mở rộng quy mô hay không, các quy trình phân tách đã được thực hiện bằng cách sử dụng các điều kiện ở quy mô lớn. Các kết quả này được thể hiện trong các bảng 2 và 3.

[Bảng 2]

Phương pháp	Số lô	Sản lượng PT (mg)
SEC	XaP1215	99
	XaP1218	110
	XaP1220	100
	XaP1301	112
	XaP1311	106
Sản lượng trung bình	-	105

[Bảng 3]

Phương pháp	Số lô	Sản lượng PT (mg)
Ái lực xanh	XaP1409	171
	XaP1415	162
	XaP1417	204
	XaP1418	174
	XaP1604	197
	XaP1605	206
Sản lượng trung bình	-	186

Như được thể hiện trong các bảng 2 và 3, trong trường hợp các điều kiện phân tách PT và FHA đã được thiết lập ở quy mô nhỏ được áp dụng ở quy mô lớn, sản lượng PT tăng thêm khoảng 80% so với trường hợp PT và FHA được phân tách quy trình SEC.

Điều này chỉ ra rằng các điều kiện phân tách PT và FHA đã được thiết lập ở quy mô nhỏ cũng có thể áp dụng cho quy mô lớn, và có nghĩa là quy trình cột ái lực màu xanh theo sáng chế là hiệu quả hơn về quy mô và sản lượng xử lý so với quy trình SEC, một quy trình phân tách PT và FHA thường được sử dụng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp thu nhận protein PT (độc tố ho gà) hoặc protein FHA (sợi ngưng kết hồng cầu), trong đó phương pháp này bao gồm bước:

phân tách các protein PT và FHA từ mẫu dịch nuôi cấy chứa *Bordetella Pertussis* bằng cách sử dụng quy trình sắc ký ái lực,

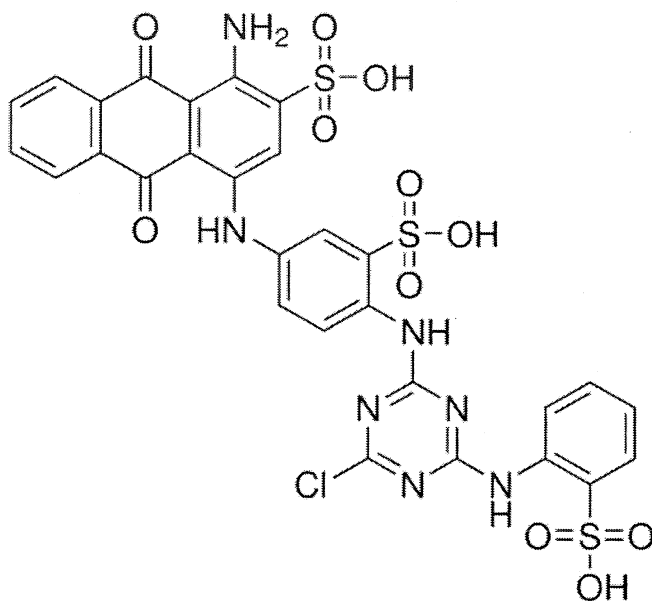
trong đó dung dịch đậm rửa giải cho quy trình này là dung dịch natri phosphat,

trong đó dung dịch đậm rửa giải này còn chứa thêm dung dịch NaCl,

trong đó nồng độ dung dịch NaCl được tăng dần từ 0M đến 3M, và

trong đó quy trình sắc ký này bao gồm bước sử dụng nhựa được gắn hợp chất có cấu trúc Công thức 1:

[Công thức 1]



2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch natri phosphat có độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch natri phosphat có nồng độ nằm trong khoảng từ 50mM đến 200mM.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó lượng dung dịch đệm rửa giải này nằm trong khoảng từ 15CV đến 35 CV.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trước khi thực hiện quy trình sắc ký ái lực, phương pháp này còn bao gồm các bước sau đây:

1. ly tâm dịch nuôi cấy *Bordetella Pertussis*;

2. tinh chế dịch nổi thu được trong bước 1) bằng quy trình sắc ký hydroxyapatit (hydroxyapatite – HA); và

3. tinh chế dịch nổi đã tinh chế ở bước 2) bằng quy trình sắc ký tương tác kỵ nước (HIC).

6. Phương pháp tinh chế protein PT, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

loại bỏ nội độc tố từ protein PT thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 bằng quy trình sắc ký màng (membrane chromatography - MC).

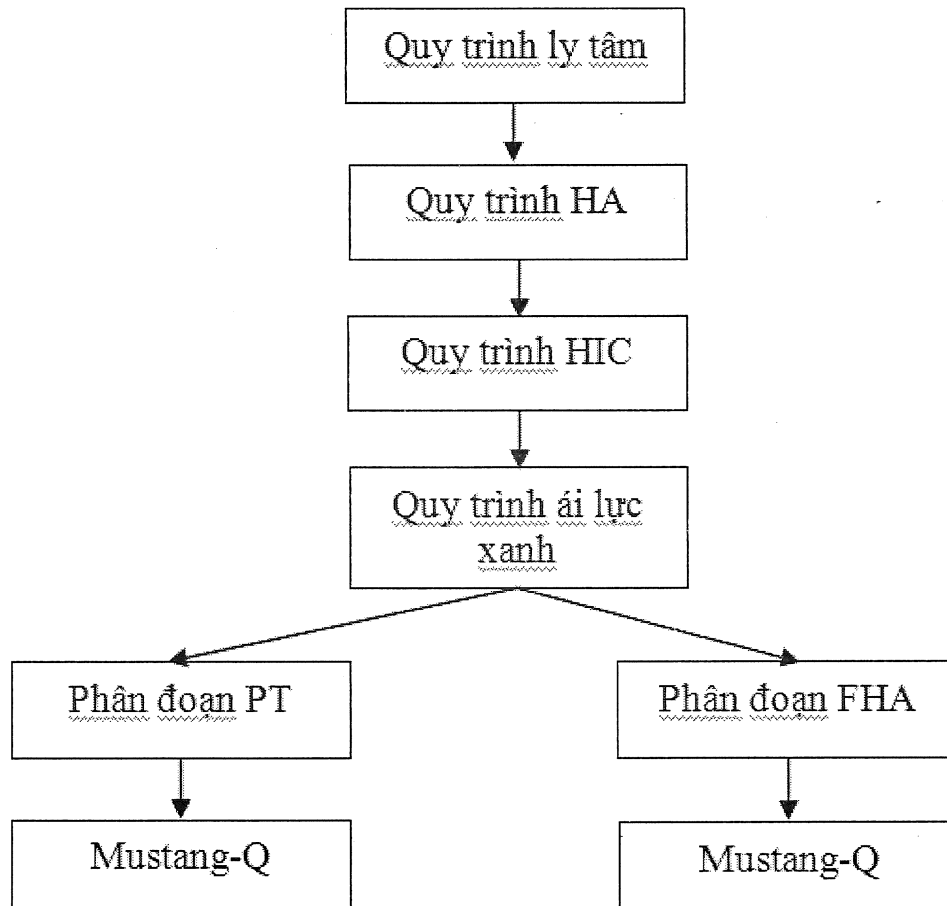
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó đường kính lỗ được sử dụng trong quy trình sắc ký màng nằm trong khoảng từ 0,6µm đến 1,0µm.

8. Phương pháp tinh chế protein FHA, trong đó phương pháp này bao gồm các bước sau:

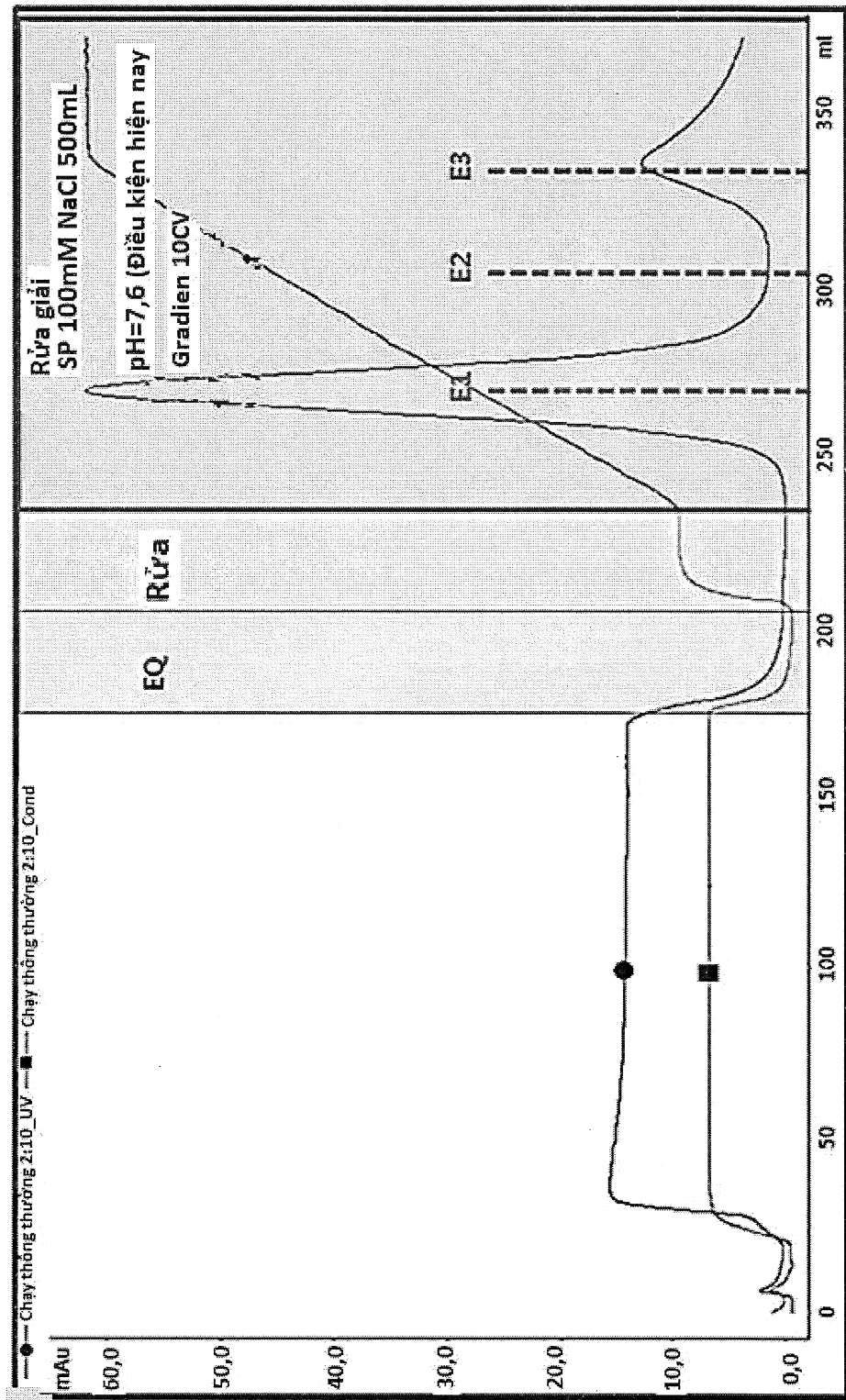
loại bỏ nội độc tố từ protein FHA thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 bằng quy trình sắc ký màng (membrane chromatography - MC).

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó đường kính lỗ được sử dụng trong quy trình sắc ký màng nằm trong khoảng từ 0,6µm đến 1,0µm.

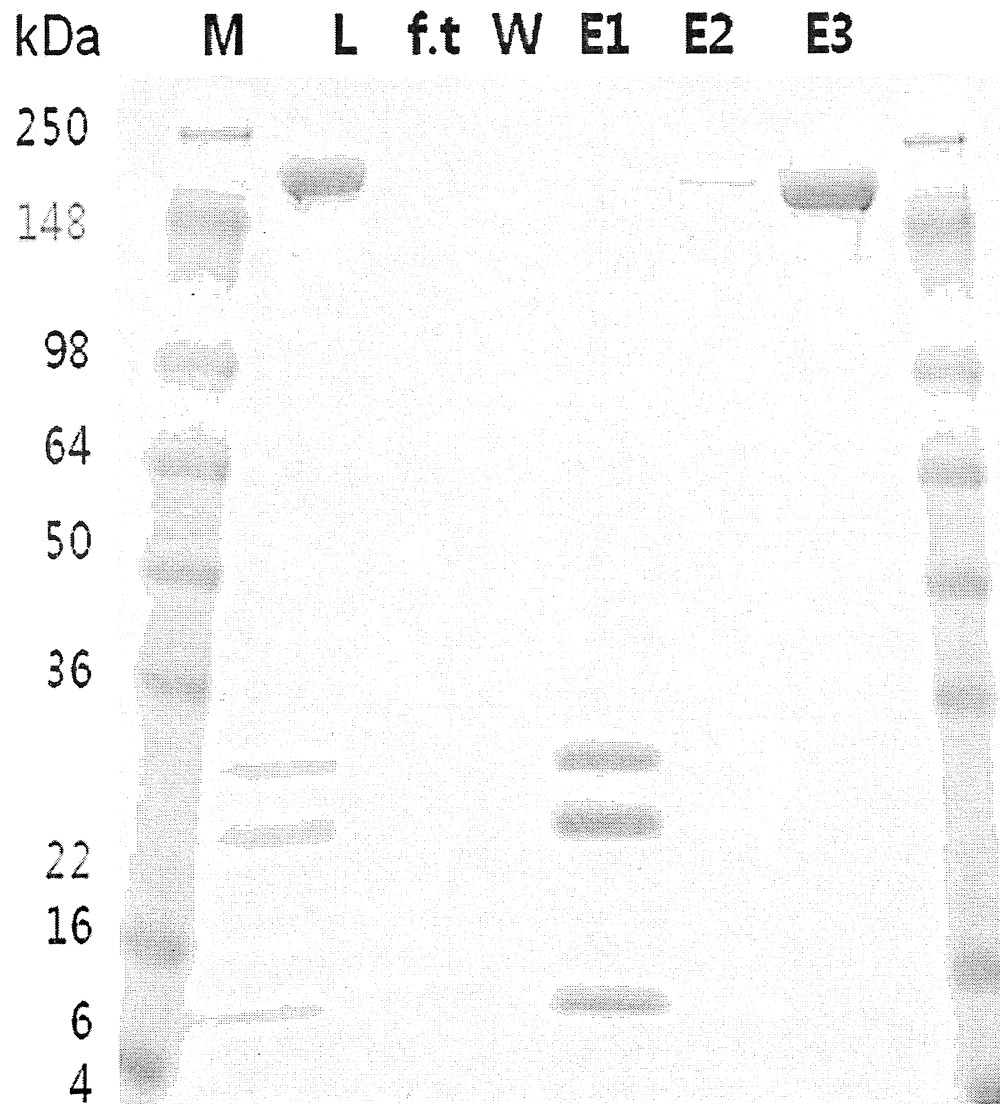
【Fig. 1】



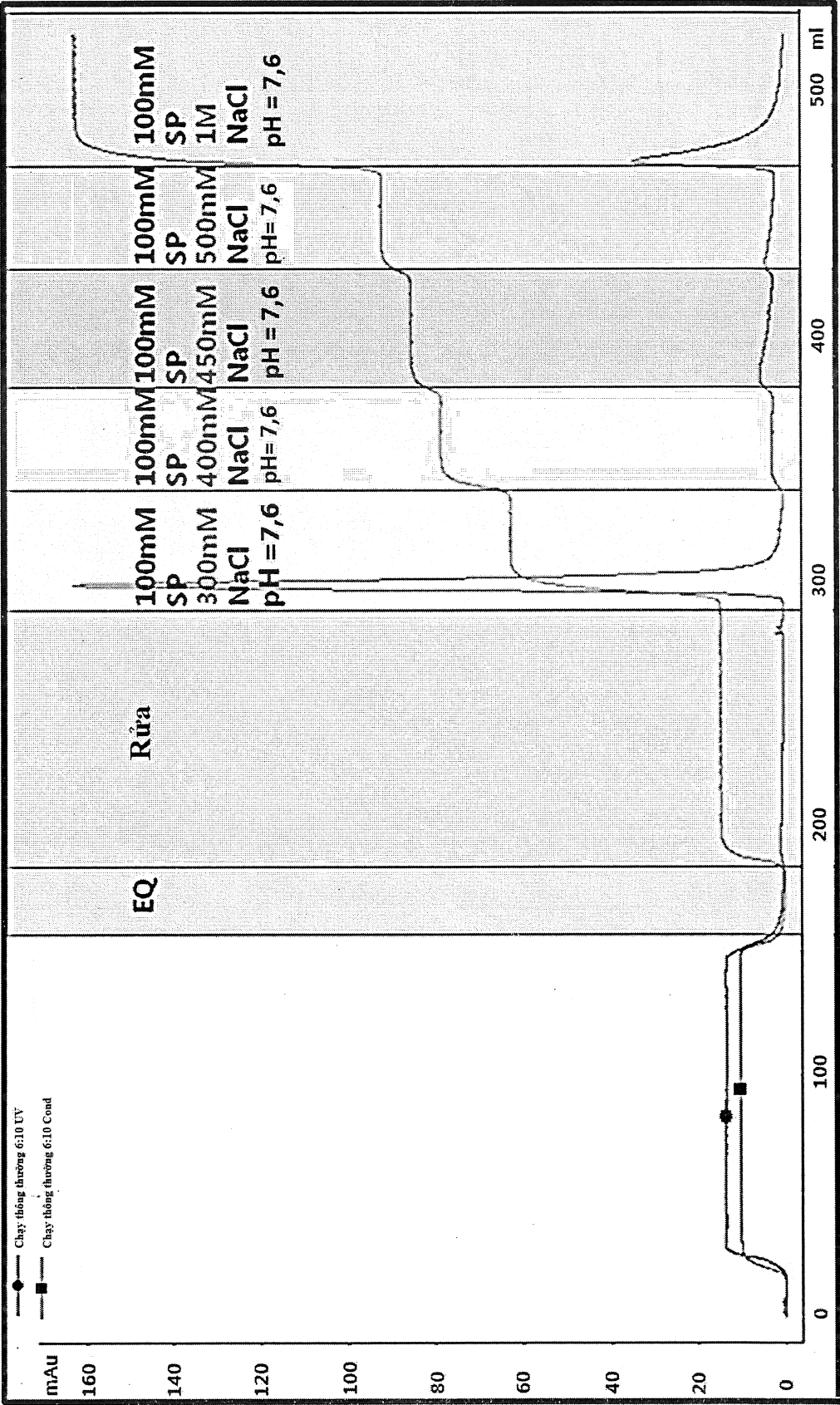
【Fig. 2a】



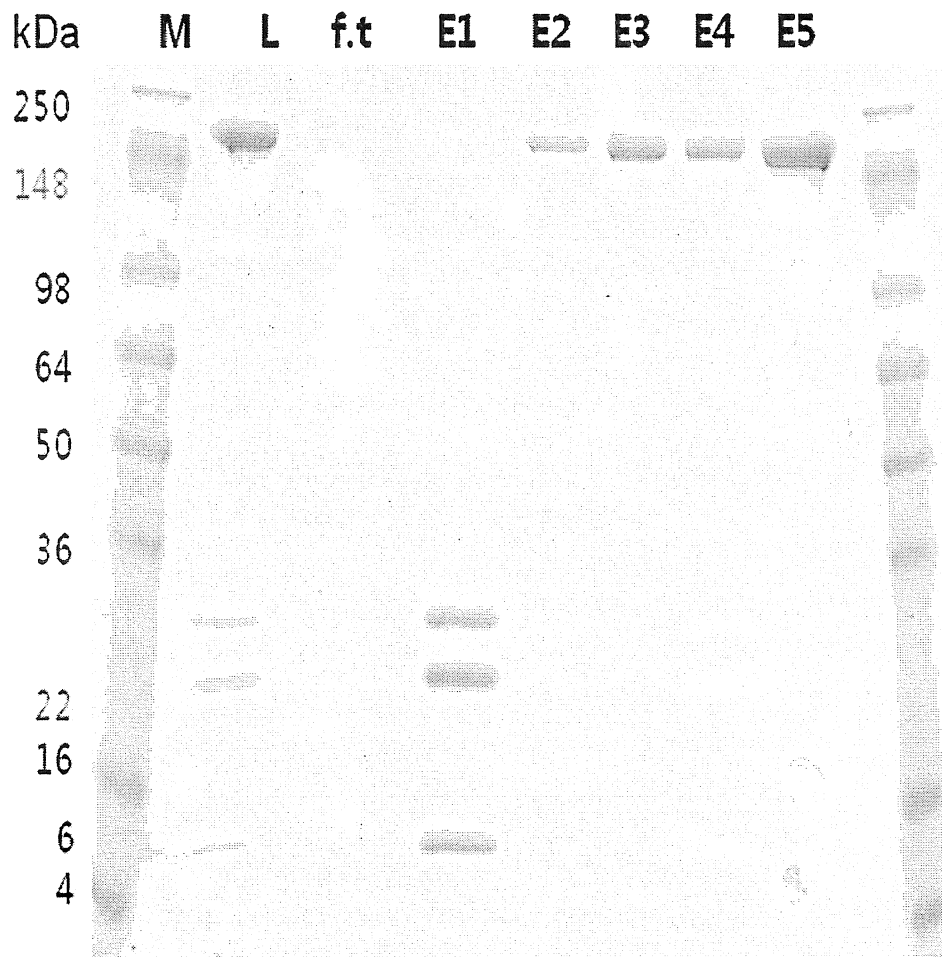
【Fig. 2b】



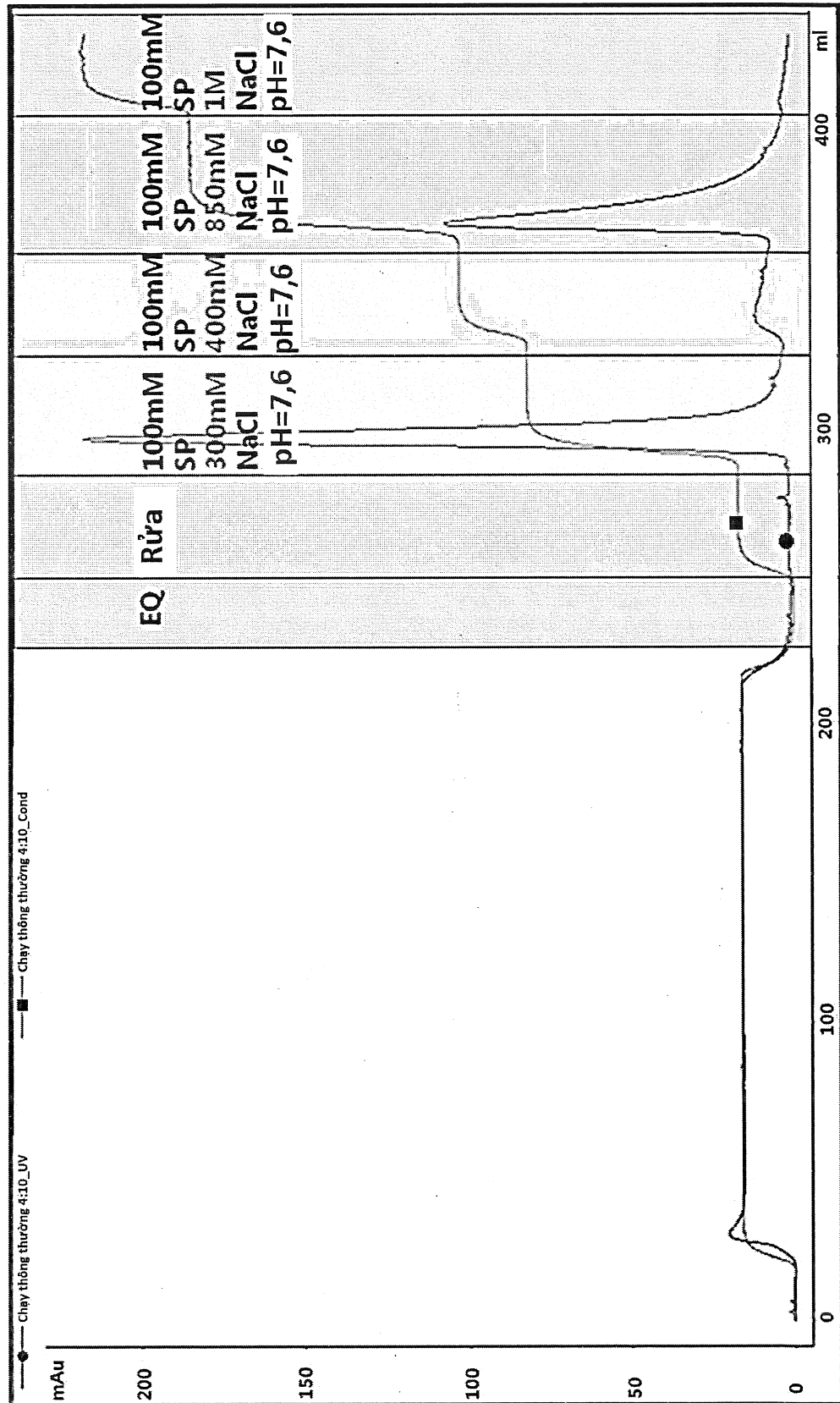
【Fig. 3a】



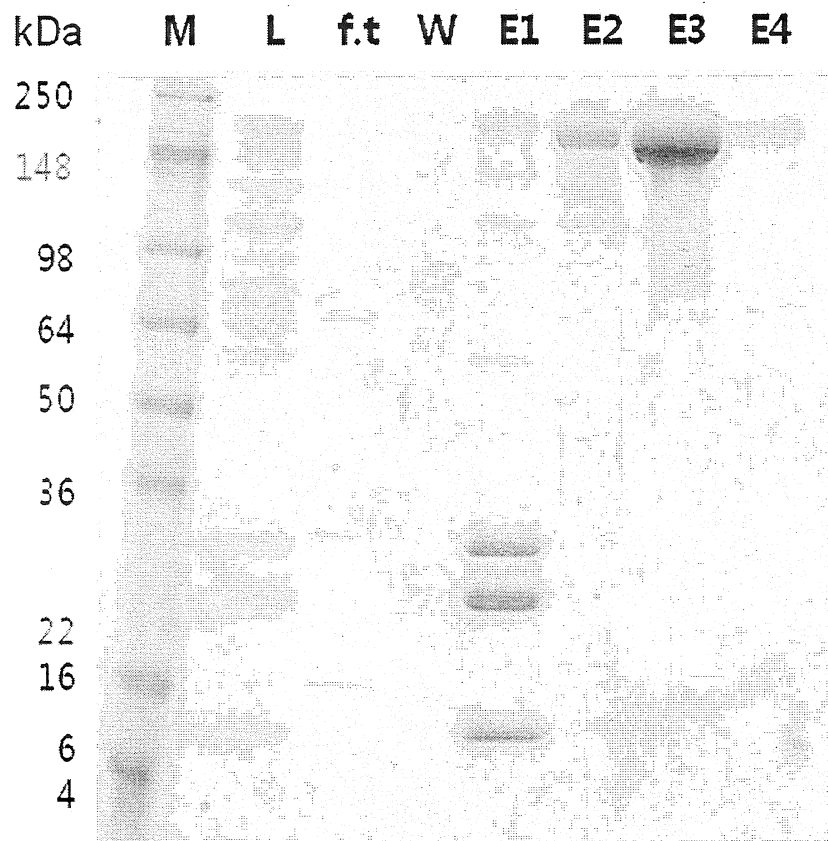
【Fig. 3b】



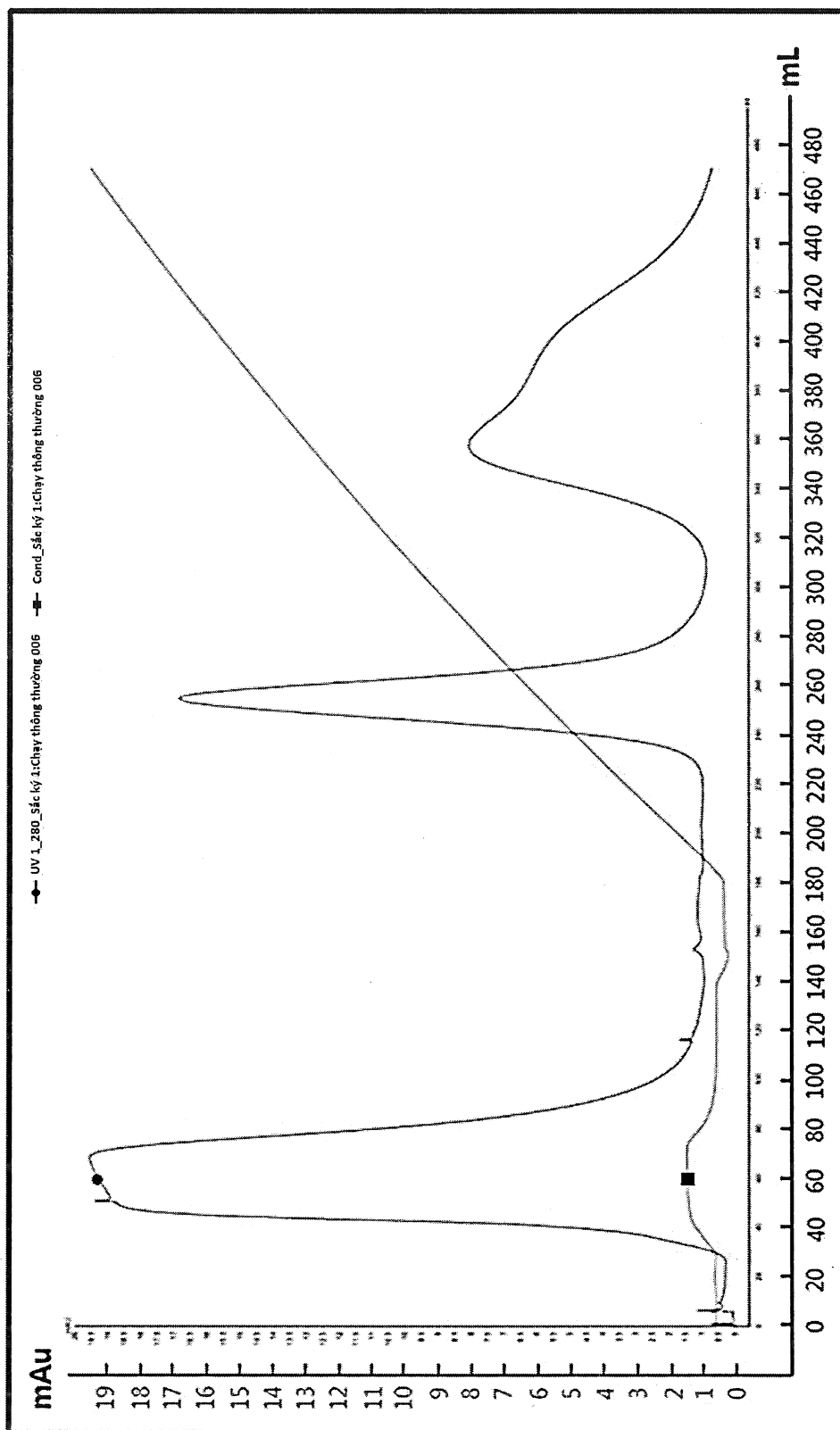
【Fig. 4a】



【Fig. 4b】



【Fig. 5a】



【Fig. 5b】

