



(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)



1-0044112

(51)^{2021.01} C07K 1/22; B01D 15/36; B01D 15/38; (13) B
C07K 14/59; C07K 1/20; B01D 15/32;
C07K 1/18

(21) 1-2022-03344

(22) 10/12/2020

(86) PCT/KR2020/017999 10/12/2020

(87) WO 2021/132957 01/07/2021

(30) 10-2019-0175257 26/12/2019 KR

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/10/2022 415A

(71) LG CHEM, LTD. (KR)

128, Yeoui-daero Yeongdeungpo-gu, Seoul 07336, Republic of Korea

(72) JI, Hwang Woo (KR); YEO, Su Bin (KR); SUL, Sam Sook (KR); PARK, Jin Hyoung (KR); BANG, Yeon Jeong (KR).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHƯƠNG PHÁP TINH CHẾ HORMON KÍCH THÍCH NANG

(21) 1-2022-03344

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế hormon kích thích nang (follicle-stimulating hormon: FSH) có năng suất cao và độ tinh khiết cao.

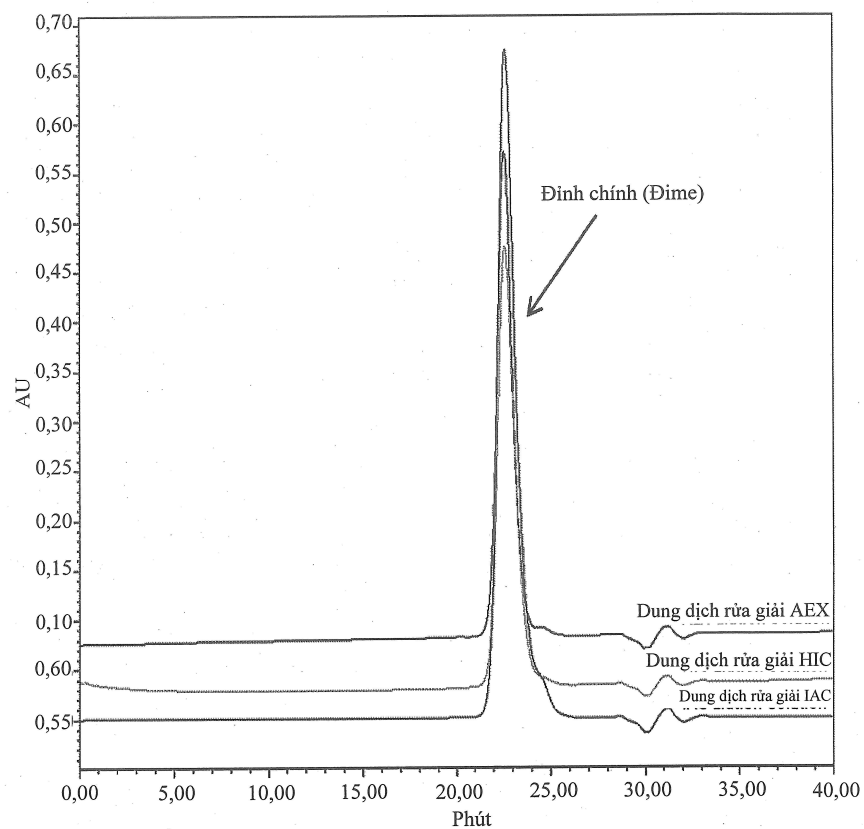


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế hormon kích thích nang (follicle-stimulating hormon: FSH) có năng suất cao và độ tinh khiết cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phương pháp điều trị protein khác nhau có thể được sử dụng làm các chất điều trị khác nhau đã được áp dụng không chỉ cho các nghiên cứu điều chế các protein tái tổ hợp mà còn cho các ứng dụng lâm sàng và thương mại hóa.

Một trong những protein tái tổ hợp (tức là hormon kích thích nang (FSH)) là hormon được sản xuất từ các tế bào tuyến sinh dục ở thùy trước tuyến yên; được giải phóng vào dòng máu; và hoạt động cùng với hormon tạo hoàng thể (luteinizing hormone: LH) để kiểm soát sự trưởng thành của tế bào trứng ở phụ nữ và quá trình sinh tinh ở nam giới. FSH ở người được sử dụng để điều trị cho phụ nữ không rụng trứng, kích thích sự phát triển đa nang trứng (quá trình phóng noãn), và các phương pháp hỗ trợ thụ thai (ví dụ, thụ tinh trong ống nghiệm (In Vitro Fertilization: IVF), tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection: ICSI), chuyển giao tử qua ống dẫn trứng (Gamete Intrafallopian Transfer: GIFT), và chuyển hợp tử qua ống dẫn trứng (Zygote Intrafallopian Transfer: ZIFT)). Ngoài ra, FSH ở người được sử dụng để kích thích sự trưởng thành của nang trứng ở phụ nữ có mức sản xuất FSH thấp hoặc không có FSH và để kích thích quá trình sinh tinh ở nam giới có mật độ tinh trùng thấp (oligospermia).

Do tầm quan trọng của FSH trong điều trị các rối loạn sinh sản, có nhu cầu cung cấp FSH tái tổ hợp có độ tinh khiết cao và hoạt tính đặc hiệu cao.

Điều trị FSH đòi hỏi phải tiêm nhiều lần, và các chế phẩm FSH có độ tinh khiết cao có thể được tiêm dưới da, cho phép bệnh nhân tự sử dụng nhờ đó có khả năng tăng sự thuận tiện và tuân thủ của bệnh nhân.

Công bố đơn quốc tế số WO 2006/051070 A1 đề cập đến phương pháp tinh chế FSH bao gồm các bước sau: 1) thực hiện sắc ký ái lực thuốc nhuộm, 2) thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước; và 3) thực hiện sắc ký pha đảo ngược; và phương pháp tinh chế FSH bao gồm các bước sau: 1) thực hiện sắc ký trao đổi anion, 2) thực hiện sắc ký ái lực

thuốc nhuộm, 3) thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước, 4) thực hiện sắc ký pha ngược, và 5) thực hiện sắc ký trao đổi anion.

Công bố đơn quốc tế số WO 2005/063811 A1 đề cập đến phương pháp tinh chế FSH tái tổ hợp ở người bao gồm các bước sau: 1) thực hiện sắc ký trao đổi ion; 2) thực hiện sắc ký ion kim loại cố định; và 3) thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction chromatography: HIC).

Công bố đơn quốc tế số WO 2007/065918 A2 đề cập đến phương pháp tinh chế FSH bao gồm các bước sau: thực hiện sắc ký ái lực thuốc nhuộm; thực hiện sắc ký trao đổi anion yếu; thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước; và thực hiện sắc ký trao đổi anion mạnh; có thể được thực hiện theo bất kỳ thứ tự nào.

Do đó, có nhu cầu liên tục về phương pháp mới để tinh chế các biến thể FSH và FSH tái tổ hợp. Cụ thể là, sắc ký ái lực thuốc nhuộm hầu hết được sử dụng trong bước thu nạp để tinh chế FSH. Mặc dù việc sử dụng sắc ký ái lực thuốc nhuộm có ưu điểm là rất tốt trong việc thu hồi protein đích bằng cách loại bỏ các thành phần trung bình trong môi trường nuôi cấy, nó cũng có nhược điểm về khả năng loại bỏ các tạp chất có nguồn gốc từ các tế bào chủ bị suy giảm. Các tạp chất này rất đa dạng và rất phức tạp, và do đó không thể xác định được là một loại. Do đó, có nguy cơ cao làm thay đổi chất lượng của protein đích, và cũng khó kiểm soát những thay đổi này. Ngoài ra, để loại bỏ thêm lượng lớn các tạp chất, cần phải có bước tinh chế phức tạp sau bước thu nạp, do đó làm giảm sản lượng.

Do đó, các tác giả sáng chế đã nỗ lực hết sức để hoàn thiện sáng chế bằng cách phát triển phương pháp tinh chế để thu được FSH ở độ tinh khiết cao và năng suất cao. Kết quả là, họ nhận thấy rằng bằng cách sắp xếp hiệu quả thứ tự của quá trình tinh chế, hiệu quả hoạt động của quá trình có thể được tăng lên trong khi có khả năng tăng sản lượng và tối đa hóa khả năng loại bỏ các tạp chất.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tinh chế hormon kích thích nang trứng (follicle stimulating hormone: FSH).

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Trong khi đó, các phần mô tả và phương án tương ứng được bộc lộ trong sáng chế

còn có thể được áp dụng cho các phân mô tả và các phương án khác. Tức là, tất cả các sự kết hợp của các yếu tố khác nhau được bộc lộ trong phần mô tả này nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả cụ thể dưới đây.

Ngoài ra, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận thấy hoặc xác định nhiều phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả ở đây bằng cách chỉ sử dụng thử nghiệm thông thường. Hơn nữa, các phương án tương đương này được hiểu là nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế hormon kích thích nang (follicle stimulating hormone: FSH) có năng suất cao và độ tinh khiết cao.

Cụ thể là, phương pháp tinh chế có thể là phương pháp tinh chế được thực hiện theo thứ tự sau đây, trong đó phương pháp này bao gồm (a) thực hiện sắc ký ái lực miễn dịch (immunoaffinity chromatography: IAC); (b) thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction chromatography: HIC); và (c) thực hiện sắc ký trao đổi anion (anion exchange chromatography: AEX).

Phương pháp tinh chế theo sáng chế có thể là phương pháp trong đó sắc ký trong mỗi bước từ (a) đến (c) chỉ được thực hiện một lần và không thực hiện thêm sắc ký bổ sung.

Sắc ký bổ sung có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm bao gồm sắc ký loại trừ kích thước, sắc ký ái lực thuốc nhuộm, sắc ký pha đảo ngược, và sắc ký trao đổi cation, tuy nhiên sắc ký bổ sung không bị giới hạn ở đó.

Phương pháp tinh chế theo sáng chế khác biệt ở chỗ nó có thể loại bỏ các protein có nguồn gốc từ tế bào chủ (tức là, các tạp chất) và cải thiện năng suất tinh chế ngay cả khi việc sắc ký ở mỗi bước từ (a) đến (c) chỉ được thực hiện một lần.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ minh họa các kết quả phân tích độ tinh khiết bằng SE-HPLC; và

Fig.2 là hình vẽ minh họa kết quả phân tích hàm lượng oxit bằng RP-HPLC.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hormon kích thích nang (FSH)” là hormon

được sản xuất từ các tế bào tuyến sinh dục ở thùy trước tuyến yên và được giải phóng vào dòng máu. FSH hoạt động cùng với hormon tạo hoàng thể (LH) để kiểm soát sự trưởng thành của tế bào trứng ở phụ nữ và quá trình sinh tinh ở nam giới. FSH và LH thuộc về nhóm glycoprotein dị số bao gồm hai chuỗi α và β không liên kết cộng hóa trị được mã hóa bởi các gen độc lập. Cả hai chuỗi α và β đều được glycosyl hóa. Trong khi tiểu đơn vị α bao gồm 92 gốc axit amin, tiểu đơn vị β bao gồm 111 gốc axit amin, trong đó mỗi tiểu đơn vị có hai vị trí glycosyl hóa liên kết asparagin.

FSH ở người được sử dụng để điều trị cho phụ nữ không rụng trứng, kích thích sự phát triển đa nang trứng (quá trình phóng noãn), và các phương pháp hỗ trợ thụ thai (ví dụ, IVF, ICSI, GIFT và CIFT). Ngoài ra, FSH ở người được sử dụng để kích thích sự trưởng thành của nang trứng ở phụ nữ có mức sản sinh FSH thấp hoặc không có FSH và để kích thích quá trình sinh tinh ở nam giới có mật độ tinh trùng thấp (oligospermia).

Trong phác đồ điều trị cụ thể để kích thích rụng trứng, bệnh nhân nhận FHS hàng ngày hoặc biến thể của FHS bằng cách tiêm với lượng khoảng 75 IU FSH/ngày đến khoảng 450 IU FSH/ngày trong khoảng 6 đến khoảng 12 ngày. Trong phác đồ điều trị cụ thể cho sự quá kích buồng trứng có kiểm soát, bệnh nhân được tiêm FHS hàng ngày hoặc biến thể của FHS bằng cách tiêm với lượng khoảng 150 IU FSH/ngày đến khoảng 600 IU FSH/ngày trong khoảng 6 đến khoảng 12 ngày.

Tức là, việc điều trị FSH cần phải tiêm nhiều lần, và do đó, các chế phẩm FSH có độ tinh khiết cao là cần thiết.

Với mục đích này, các tác giả sáng chế đã cố gắng cải thiện sản lượng, tối đa hóa khả năng loại bỏ các protein có nguồn gốc từ tế bào chủ (tức là, các tạp chất), và loại bỏ tối đa các tạp chất thông qua việc tối ưu hóa các bước quy trình trong quá trình rửa cột bằng cách sắp xếp hiệu quả thứ tự của quá trình tinh chế, nhờ đó đơn giản hóa số bước tinh chế và tăng hiệu quả của quá trình vận hành.

Từng bước của phương pháp tinh chế hormon kích thích nang sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trước tiên, bước (a) là bước thực hiện sắc ký ái lực miễn dịch (IAC).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sắc ký ái lực miễn dịch (IAC)” có nghĩa là phương pháp trong đó kháng thể chống lại vật liệu hoạt tính sinh lý cần được tinh chế được điều chế và liên kết cộng hóa trị với chất mang rắn; mẫu chứa vật liệu hoạt tính sinh lý cần được tinh chế được bổ sung vào phức chất mang kháng thể để cho phép vật

liệu hoạt tính sinh lý được hấp thụ vào kháng thể; chất rửa giải được bổ sung vào đó theo cách thích hợp để nhờ đó thu được vật liệu đích bằng cách rửa giải. Trong sáng chế, sắc ký ái lực miễn dịch để tinh chế FSH có nghĩa là nhựa trao đổi sử dụng nguyên tắc để chỉ thu nạp tùy chọn FSH bằng cách sử dụng cột, bao gồm protein đặc hiệu FSH (tức là, protein liên kết với tiểu đơn vị alpha hoặc tiểu đơn vị beta của FSH) và được điều chế bằng cách liên kết protein đặc hiệu FSH với chất nền thích hợp bằng cách sử dụng protein nhất định có các đặc điểm cấu trúc, vật lý, và hóa học tương tự.

Sắc ký ái lực miễn dịch để tinh chế FHS bao gồm nhựa CaptureSelect™ FHS (Thermo Fisher Scientific), v.v., tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó, và nói chung, có thể sử dụng bất kỳ loại nhựa nào được sử dụng cho sắc ký ái lực miễn dịch và liên kết đặc hiệu với FSH.

Phương pháp này có ưu điểm là cho phép thu nhận nhanh hơn và định lượng nhiều hơn các vật liệu hoạt tính sinh lý so với các phương pháp thông thường (tức là, các phương pháp như lọc gel, sắc ký trao đổi ion, v.v.).

Theo mục đích của sáng chế, sắc ký ái lực miễn dịch có thể thực hiện một hoặc nhiều bước bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm bước cân bằng, bước bơm mẫu, bước rửa, bước rửa giải, và bước làm sạch nhựa.

Để sử dụng nguyên tắc ái lực miễn dịch, có thể sử dụng dung dịch đệm trong khoảng độ pH từ 7 đến 8, và có thể sử dụng Tris với số mol từ 10 mM đến 50 mM; theo một phương án, có thể sử dụng dung dịch đệm như Tris, PBS, 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), sulfonat, 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), TES, phosphat, và/hoặc isopropanol, tuy nhiên dung dịch đệm không bị giới hạn ở đó.

Bước cân bằng có nghĩa là bước tạo môi trường (ví dụ, độ pH thích hợp, nồng độ muối, v.v.) trong cột để gắn FSH có trong môi trường nuôi cấy vào cột sắc ký.

Theo mục đích của sáng chế, trong bước (a) ở trên, các tạp chất bao gồm các protein có nguồn gốc từ tế bào chủ ngoại trừ FSH trong số các protein khác nhau được hấp phụ vào cột có thể được loại bỏ bằng cách thực hiện bước rửa một hoặc nhiều lần, và cụ thể là bằng cách thực hiện bước rửa ít nhất ba lần, tuy nhiên số lần thực hiện bước rửa không bị giới hạn ở đó.

Bước rửa đề cập đến bước loại bỏ các tạp chất khác bao gồm các protein có nguồn gốc từ tế bào chủ ngoại trừ FSH trong số các protein khác nhau được hấp phụ vào cột. Không chỉ các protein có nguồn gốc từ tế bào chủ mà các thành phần của môi trường nuôi cấy cũng có thể bị loại bỏ. Theo phương án này, bước rửa nhiều bước được sử dụng. Cụ thể, có thể sử dụng dung dịch đệm có độ pH trong khoảng từ 7 đến 8, và dung dịch đệm trong khoảng độ pH nêu trên có thể được áp dụng cho tất cả bước cân bằng, bước rửa và bước rửa giải.

Theo một phương án, trong bước rửa thứ nhất, có thể loại bỏ các tạp chất có đặc tính không đặc hiệu với nhựa sắc ký ái lực miễn dịch hoặc có tính chất đặc hiệu yếu, hoặc các tạp chất có tính kỵ nước tương đối yếu; và Tris với số mol từ 2 mM đến 50 mM, và cụ thể là Tris với số mol từ 2 mM đến 10 mM có thể được sử dụng, tuy nhiên Tris được sử dụng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, dung dịch rửa cho bước rửa thứ nhất có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm bao gồm Tris, PBS, 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), sulfonat, 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), TES, phosphat, và/hoặc isopropanol, tuy nhiên dung dịch rửa không bị giới hạn ở đó.

Trong bước rửa thứ hai, các tạp chất có ái lực liên kết ion tương đối yếu với nhựa sắc ký ái lực miễn dịch có thể được loại bỏ, và Tris có số mol từ 10 mM đến 50 mM, và cụ thể là Tris có số mol từ 10 mM đến 30 mM có thể được sử dụng, tuy nhiên Tris được sử dụng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, nồng độ muối được sử dụng có thể nằm trong khoảng 0,5 M-3 M, và cụ thể, có thể sử dụng nồng độ muối trong khoảng 0,5 M-1,5 M. Theo một phương án, muối được sử dụng có thể bao gồm natri sulfat, natri clorua, amoni sulfat, amoni clorua và/hoặc magie clorua, v.v., và cụ thể hơn có thể là natri clorua, tuy nhiên muối được sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Trong bước rửa thứ ba, các tạp chất có ái lực liên kết ion tương đối yếu với nhựa sắc ký ái lực miễn dịch so với FSH có thể được loại bỏ, và Tris có số mol từ 10 mM đến 50 mM, và cụ thể là Tris có số mol từ 10 mM đến 30 mM có thể được sử dụng, tuy nhiên Tris được sử dụng không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, nồng độ muối được sử dụng có thể nằm trong khoảng 0,01 M-0,5 M, và cụ thể, nồng độ muối trong khoảng 0,1 M-0,3 M có thể được sử dụng, tuy nhiên phạm vi của nồng độ muối được sử dụng không giới hạn ở đó. Theo một phương án, muối được sử dụng có thể bao gồm natri sulfat, natri clorua, amoni sulfat, amoni clorua và/hoặc magie clorua, v.v., và cụ thể hơn có thể bao gồm

magie clorua, tuy nhiên muối được sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Bước rửa giải đề cập đến bước thu hồi FSH liên kết với nhựa. Magie clorua ($MgCl_2$) có thể được sử dụng để bù ái lực miễn dịch giữa FSH và nhựa, và cụ thể, các điều kiện rửa giải có thể được thực hiện ở nồng độ muối từ 1,5 M đến 2,5 M trong dung dịch đệm có độ pH trong khoảng 7 đến 8. Theo một phương án, muối được sử dụng có thể bao gồm natri sulfat, natri clorua, amoni sulfat, amoni clorua và/hoặc magie clorua, v.v., và cụ thể hơn có thể bao gồm magie clorua, tuy nhiên muối được sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, như phương pháp khác để rửa giải FSH, có thể sử dụng dung dịch đệm glyxin có độ pH từ 2,5 đến 3,5, tuy nhiên dung dịch đệm được sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Bước làm sạch nhựa (resin cleaning: CIP) là bước để loại bỏ hoàn toàn FSH còn lại, các vi sinh vật, và các tạp chất khác còn lại trong cột để ngăn cản quá trình nhiễm chéo. Dung dịch đệm rửa giải được sử dụng có thể bao gồm axit xitric, axit axetic, axit phospho, PAB, ure, guanidin hydroclorua và/hoặc isopropanol, NaOH, và/hoặc etanol, v.v., và cụ thể, axit axetic ở nồng độ 0,1 M đến 1 M có thể được sử dụng, tuy nhiên dung dịch đệm rửa giải không bị giới hạn ở đó.

Trong phương pháp tinh chế FSH, bước (b) ở trên là bước để thực hiện sắc ký tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction chromatography: HIC).

Sắc ký tương tác kỵ nước đề cập đến nhựa trao đổi sử dụng tương tác thuận nghịch giữa các protein và bề mặt kỵ nước của môi trường. Các protein liên kết với cột trong các điều kiện cường độ ion cao (tức là, dưới nồng độ muối cao), và các protein này được phân tách khác biệt với nhau khi cường độ ion giảm dần.

Theo mục đích của sáng chế, sắc ký tương tác kỵ nước có thể thực hiện một hoặc nhiều bước được chọn từ nhóm bao gồm bước bơm mẫu, bước cân bằng, bước rửa, bước rửa giải và bước làm sạch nhựa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sắc ký tương tác kỵ nước (HIC)” đề cập đến phương pháp phân tách bằng cách sử dụng tương tác kỵ nước giữa chất nền có các nhóm chức kỵ nước (ví dụ, phenyl, octyl, (iso) propyl, butyl, etyl, v.v.) và các phân tử nhất định.

Cụ thể, sắc ký này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhựa HIC có bề mặt kỵ nước tương đối yếu (so với bề mặt kỵ nước mạnh hơn nhiều của nhựa pha đảo ngược). Các protein có đặc tính bề mặt kỵ nước thường bị thu hút bởi nhựa có nhóm ete, phenyl, butyl hoặc hexyl. Theo sáng chế, nhựa được sử dụng trong sắc ký tương tác kỵ nước có thể là nhựa trong đó nhóm chức là loại được chọn từ nhóm bao gồm phenyl, octyl, (iso) propyl, butyl và etyl, tuy nhiên nhựa không bị giới hạn ở đó, và có thể sử dụng bất kỳ nhựa nào thường được sử dụng trong sắc ký tương tác kỵ nước.

Bước cân bằng trong sắc ký tương tác kỵ nước đề cập đến bước tạo môi trường (ví dụ, độ pH thích hợp, nồng độ muối, v.v.) trong cột để gắn FSH được chứa trong dịch rửa giải thu được từ sắc ký ái lực miễn dịch vào cột. Cụ thể, nồng độ muối được sử dụng có thể nằm trong khoảng từ 1,5 M đến 2,5 M, và theo một phương án, có thể sử dụng natri sulfat, natri clorua, amoni sulfat và/hoặc amoni clorua, v.v.. Ngoài ra, có thể sử dụng dung dịch đệm có độ pH từ 7 đến 8, và có thể sử dụng Tris với số mol từ 10 mM đến 50 mM. Các điều kiện trên có thể được áp dụng cho tất cả các bước cân bằng, bước rửa và bước rửa giải.

Trong bước bơm mẫu, dịch rửa giải thu được bằng sắc ký ái lực miễn dịch có thể được sử dụng.

Theo mục đích của sáng chế, dung dịch đệm cân bằng được sử dụng trong bước rửa, và điều này để loại bỏ các tạp chất liên kết không đặc hiệu với nhựa.

Bước rửa giải có nghĩa là bước thu hồi FSH liên kết với nhựa. Để ức chế tương tác kỵ nước giữa FSH và nhựa, có thể yêu cầu môi trường không có muối hoặc nồng độ muối thấp. Ngoài ra, có thể sử dụng dung dịch đệm có độ pH trong khoảng từ 7 đến 8, và có thể sử dụng Tris với số mol từ 10 mM đến 50 mM, tuy nhiên dung dịch đệm không bị giới hạn ở đó.

Bước làm sạch nhựa (CIP) là bước để loại bỏ hoàn toàn FSH còn lại, các vi sinh vật và các tạp chất khác còn lại trong cột để ngăn cản quá trình nhiễm chéo. FSH còn lại có thể được loại bỏ bằng nước tinh khiết, và ngoài ra, có thể sử dụng natri hydroxit (NaOH), axit phospho, v.v., tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Theo mục đích của sáng chế, mục đích của bước (b) nêu trên là tăng thêm độ tinh khiết của FSH bằng cách loại bỏ thêm các tạp chất (ví dụ, protein tế bào chủ, v.v.) không thể loại bỏ được trong bước (a). Trong bước này, các protein của tế bào chủ có thể được

loại bỏ hiệu quả hơn bằng cách sử dụng thiết bị lọc có khả năng loại bỏ các protein có nguồn gốc từ tế bào chủ, sử dụng phản ứng kỵ nước, v.v., khác với phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch ở bước (a) trong cơ chế phân tách.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “protein tế bào chủ (host cell protein: HCP)” là protein khác với FSH, thường có nghĩa là protein có nguồn gốc từ tế bào chủ. Đối với các kháng thể hoặc protein có thể được sử dụng làm dược phẩm, tốt hơn là loại trừ HCP khỏi chế phẩm kháng thể hoặc protein ban đầu. Các protein của tế bào chủ cần được loại bỏ có nghĩa là bao gồm tất cả các tạp chất ngoại trừ FSH cần được tinh chế, và chúng có thể bao gồm không chỉ bản thân các protein của tế bào chủ, mà còn bao gồm cả ADN, các yếu tố phát triển tế bào, v.v. có nguồn gốc từ tế bào chủ. Do đó, khi loại bỏ các protein của tế bào chủ, chỉ có thể tinh chế protein đích với độ tinh khiết cao.

Trong phương pháp tinh chế FSH ở trên, bước (c) nêu trên là bước thực hiện sắc ký trao đổi anion (anion exchange chromatography: AEX).

Sắc ký trao đổi ion đề cập đến nhựa trao đổi sử dụng tương tác thuận nghịch của điện tích thực giữa môi trường và bề mặt protein (tức là, sự khác biệt về cường độ ion).

Các nhóm trao đổi ion mạnh đại diện bao gồm Q và SP, và các nhóm trao đổi ion yếu đại diện bao gồm DEAE, ANX, CM, v.v.. Vì mỗi nhóm có phạm vi độ pH khác nhau mang điện tích đủ, nên có độ chọn lọc thay thế. Các nhựa trao đổi ion được chia thành các nhựa trao đổi ion âm và nhựa trao đổi ion dương, và cụ thể, các nhựa trao đổi ion âm đã được sử dụng trong sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sắc ký trao đổi anion (AEX)” có nghĩa là sắc ký sử dụng cột chứa đầy nhựa trao đổi anion, và trong bước trên, các tạp chất, và cụ thể là các protein tế bào chủ, có thể được loại bỏ thêm bằng cách thực hiện sắc ký trao đổi anion, và các chất đồng phân có điểm đẳng điện mong muốn có thể được phân tách tùy chọn.

Nhựa trao đổi anion đề cập đến nhựa tổng hợp được thêm vào dung dịch nước khác để trao đổi các anion của nó với các anion cụ thể trong dung dịch nước, và cột trao đổi anion có thể hấp thụ các protein mang anion phía trên điểm đẳng điện. Trong trường hợp FSH theo sáng chế, bước tinh chế thứ ba có thể được thực hiện theo cách mà khi dung dịch đệm pH trung tính được sử dụng, protein (FSH) được gắn vào nhựa trao đổi anion vì điểm đẳng điện thấp, và protein đích (tức là, FSH) được tách ra khi đi qua dịch

rửa giải sau khi rửa.

Như nhựa trao đổi anion, những loại thường được sử dụng trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng, tuy nhiên nhựa trao đổi anion không bị giới hạn ở đó. Cụ thể, có thể sử dụng Q Sepharose, aminoethyl bậc bốn, amin bậc bốn (Q), v.v, và cụ thể, có thể sử dụng Q Fast Flow™.

Theo mục đích của sáng chế, sắc ký trao đổi anion có thể thực hiện một hoặc nhiều bước được chọn từ nhóm bao gồm bước bơm mẫu, bước cân bằng, bước rửa, bước rửa giải và bước làm sạch nhựa.

Bước cân bằng đề cập đến bước tạo môi trường (ví dụ, độ pH thích hợp, nồng độ muối, v.v.) trong cột để gắn FSH thu được từ sắc ký tương tác kỵ nước vào cột sắc ký. Có thể sử dụng dung dịch đệm trong khoảng độ pH từ 7 đến 8, và có thể sử dụng Tris với số mol từ 10 mM đến 50 mM; tuy nhiên dung dịch đệm không bị giới hạn ở đó. Dung dịch đệm có thể được áp dụng cho cả bước cân bằng và bước rửa giải không bao gồm bước rửa.

Bước rửa đề cập đến bước loại bỏ các tạp chất bị hấp phụ trong cột. Ngoài ra, các chất đồng phân khác với các chất đồng phân có điểm đẳng điện mong muốn có thể được loại bỏ tùy chọn. Có thể sử dụng dung dịch đệm có độ pH trong khoảng từ 5 đến 6, và axetat có số mol từ 1 mM đến 100 mM, và cụ thể là có thể sử dụng axetat có số mol từ 10 mM đến 50 mM, tuy nhiên dung dịch đệm không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, theo một phương án, có thể sử dụng axetat, xitrat, v.v., tuy nhiên dung dịch đệm được sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Bước rửa giải đề cập đến bước thu hồi FSH liên kết với nhựa. Các điều kiện rửa giải có thể là các điều kiện có nồng độ muối từ 0,05 M đến 0,2 M trong dung dịch đệm có độ pH trong khoảng từ 7 đến 8. Theo một phương án, natri sulfat, natri clorua, amoni sulfat và/hoặc amoni clorua, v.v. có thể được sử dụng, tuy nhiên muối được sử dụng không bị giới hạn ở đó.

Bước làm sạch nhựa (CIP) là bước để loại bỏ hoàn toàn FSH còn lại, các vi sinh vật, và các tạp chất khác còn lại trong cột để ngăn cản quá trình nhiễm chéo. Theo một phương án, có thể sử dụng natri hydroxit (NaOH), axit phospho, v.v., tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Các protein của tế bào chủ cần được loại bỏ có nghĩa là bao gồm tất cả các tạp chất ngoại trừ FSH cần được tinh chế như được mô tả ở trên, và chúng có thể bao gồm không chỉ bản thân các protein của tế bào chủ mà còn bao gồm cả ADN, các yếu tố phát triển tế bào, v.v. có nguồn gốc từ tế bào chủ. Do đó, khi loại bỏ các protein của tế bào chủ, chỉ có thể tinh chế protein đích với độ tinh khiết cao.

Theo sáng chế, thông qua phương pháp tinh chế FSH từ bước (a) đến (c) (tức là quy trình cột ba bước), cuối cùng có thể tinh chế FSH có độ tinh khiết cao và năng suất cao trong đó các tạp chất, cụ thể là các protein của tế bào chủ được loại bỏ hiệu quả.

Trong sáng chế này, sau các bước từ (a) đến (c), còn có thể thực hiện bất kỳ quy trình được chọn từ quy trình cô đặc và thẩm tách và quy trình lọc, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó. Ngoài ra, có thể bao gồm quy trình lọc virus và quy trình trao đổi chất đậm với dung dịch đậm gốc (UF/DF), tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Sau lần tinh chế cuối cùng, hàm lượng của các protein tế bào chủ (HCP) có thể nằm trong khoảng 0,001 ppm (phần triệu) đến 50 ppm, cụ thể là 0,01 ppm đến 40 ppm, 0,1 ppm đến 30 ppm, 1 ppm đến 30 ppm, 3 ppm đến 25 ppm, và 5 ppm đến 20 ppm, và cụ thể hơn là 0,01 ppm đến 12 ppm, tuy nhiên hàm lượng của các protein tế bào chủ không bị giới hạn ở đó. Theo một phương án của sáng chế, xác nhận rằng hàm lượng của các protein tế bào chủ được giảm xuống mức dưới 200 ppm sau lần tinh chế thứ nhất, ít hơn 50 ppm sau lần tinh chế thứ hai, và ít hơn 15 ppm sau khi lần tinh chế thứ ba (ví dụ 2-2). Cụ thể, cho thấy rằng hàm lượng của các protein tế bào chủ ít hơn 12 ppm chỉ có thể được thể hiện với ba bước của sắc ký ái lực miễn dịch, sắc ký tương tác kỵ nước, và sắc ký trao đổi anion theo thứ tự này, và nhờ đó khẳng định hiệu quả vượt trội của sáng chế (ví dụ 2-2).

Phương pháp nêu trên có thể để cân bằng cột bằng cách sử dụng dung dịch đệm có độ pH từ 7-8 trước khi bơm mẫu trong các bước từ (a) đến (c) nêu trên. Dung dịch đệm có thể là bất kỳ một hoặc nhiều dung dịch được chọn từ nhóm bao gồm Tris, PBS, 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), sulfonat, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), TES, và phosphat, và cụ thể là Tris, tuy nhiên dung dịch đệm không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, trong các bước từ (a) đến (c) của phương pháp nêu trên, bước rửa một

hoặc nhiều lần có thể được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch rửa có độ pH từ 4-8. Điều này là để loại bỏ các tạp chất cơ bản khỏi chất lỏng nuôi cấy và để tăng độ tinh khiết của mẫu. Dung dịch rửa có thể là dung dịch bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, kali clorua, magie clorua, kali phosphat, natri clorua, Tris, axit 3-morpholinopropan-1-sulfonic (MOPS), PIPES, 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] axit etansulfonic (HEPES), xitrat, axetat, suxinat, natri xitrat, natri axetat, natri suxinat, natri sulfat, amoni sulfat, amoni clorua và/hoặc magie clorua, tuy nhiên dung dịch rửa không bị giới hạn ở đó.

FSH được phân tách bằng phương pháp tinh chế theo sáng chế có thể đề cập đến phương pháp có độ tinh khiết từ 90% trở lên, tốt hơn là tối thiểu 90%, tối thiểu 91%, tối thiểu 92%, tối thiểu 93%, tối thiểu 94%, tối thiểu 95%, tối thiểu 96%, tối thiểu 97%, tối thiểu 98%, hoặc tối thiểu 99%, và tốt hơn nữa là tối thiểu 99%, tuy nhiên độ tinh khiết của FSH không bị giới hạn ở đó. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “độ tinh khiết” có nghĩa là FSH tinh khiết trong đó các tạp chất được loại bỏ. Ví dụ, nếu độ tinh khiết là 92%, 8% còn lại là các tạp chất. Hơn nữa, độ tinh khiết có thể chỉ đơn giản thể hiện độ tinh khiết của vật liệu được phân tách từ dung dịch rửa giải, tuy nhiên % của độ tinh khiết cuối cùng có thể thay đổi tùy thuộc vào độ tinh khiết của mẫu được nạp.

Ngoài ra, độ tinh khiết của FSH có thể được phân tích thông qua phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography: HPLC), điện di đứng trên gel poly-acrylamit có sử dụng natri dodecyl sulfat (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE), v.v. sau khi tinh chế từ dịch rửa giải, tuy nhiên phương pháp phân tích không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án này, xác nhận rằng sản lượng cuối cùng là tốt nhất và hàm lượng của các protein tế bào chủ (host cell protein: HCP) là thấp nhất khi quy trình được thực hiện theo thứ tự IAC -> HIC -> AEX, là phương pháp tinh chế của sáng chế. Những kết quả này không chỉ xác nhận rằng hiệu suất tinh chế tăng khi số lượng sắc ký được thực hiện tăng lên, mà còn cho thấy rằng hiệu quả tinh chế khác với theo từng quá trình tùy thuộc vào cách quá trình được thực hiện mặc dù ba loại sắc ký giống nhau (tức là, sắc ký ái lực miễn dịch, kỵ nước sắc ký tương tác, và sắc ký trao đổi anion) được sử dụng trong mỗi quá trình.

Ngoài ra, FSH được tinh chế bằng phương pháp tinh chế theo sáng chế có thể được

sử dụng làm protein điều trị. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “protein điều trị” là thuật ngữ chung cho các protein thường được sử dụng trong y sinh học, có nghĩa là protein có các hoạt tính sinh lý khác nhau. Hoạt động sinh lý có nghĩa là hoạt động điều chỉnh biểu hiện di truyền và các chức năng sinh lý để điều chỉnh các tình trạng bất thường do thiếu hụt hoặc tiết quá nhiều các chất liên quan đến điều hòa chức năng *in vivo*, và nó có thể bao gồm các phương pháp điều trị protein thông thường.

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây dựa trên các hình vẽ kèm theo. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Quá trình tinh chế

Ví dụ 1-1: Thứ tự của quá trình tinh chế

Bảng 1

Thử nghiệm số	Cột thứ nhất	Cột thứ hai	Cột thứ ba
1	IAC	-	-
2	IAC	HIC	-
3	IAC	HIC	AEX
4	IAC	AEX	-
5	IAC	AEX	HIC
6	HIC	-	-
7	HIC	AEX	-
8	HIC	AEX	IAC
9	HIC	IAC	-
10	HIC	IAC	AEX
11	AEX	-	-
12	AEX	IAC	-
13	AEX	IAC	HIC
14	AEX	HIC	-
15	AEX	HIC	IAC

Như được mô tả ở trên, để tối ưu hóa các bước tinh chế và trình tự của quá trình đối với FSH, protein FSH được tinh chế bằng 15 phương pháp tinh chế khác nhau. Tùy thuộc vào thử nghiệm, quá trình tinh chế được thực hiện đến bước 1, bước 2, hoặc bước

3, và chất lỏng tinh khiết của mỗi bước được thu thập.

Vì chất lỏng tinh khiết trong mỗi bước được sử dụng làm mẫu nạp cho bước sau, việc xử lý trước (ví dụ, pha loãng hoặc trao đổi chất đệm cho quy trình AEX; và bổ sung muối cho quy trình HIC, v.v.) có thể được thực hiện khi cần thiết. Tất cả các điều kiện của quá trình cơ bản để tinh chế IAC, HIC, và AEX đều được áp dụng theo cùng một cách.

Ví dụ 1-2: Các điều kiện tinh chế cho từng bước

Các chất đệm được sử dụng trong mỗi quá trình tinh chế và các điều kiện quá trình cụ thể được tóm tắt trong các bảng từ bảng 2 đến bảng 4 dưới đây.

Bảng 2: Quá trình IAC

Bước	Chất đệm được sử dụng	Dung tích bơm (CV)
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)	7
Bơm mẫu	chất lỏng nuôi cấy hoặc chất lỏng tinh khiết ở bước trước	-
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)	5
Rửa 1	5 mM Tris (độ pH 7,6)	7
Rửa 2	20 mM Tris (độ pH 7,6)/1 M NaCl	5
Rửa 3	20 mM Tris (độ pH 7,6)/0,2 M MgCl ₂	7
Rửa giải	20 mM Tris (độ pH 7,6)/2 M MgCl ₂	7
CIP	0,5 M axit acetic	5

Bảng 3: Quá trình HIC

Bước	Chất đệm được sử dụng	Dung tích bơm (CV)
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)/2 M NaCl	5
Bơm mẫu	chất lỏng nuôi cấy hoặc chất lỏng tinh khiết ở bước trước	-
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)/2 M NaCl	3
Rửa giải	20 mM Tris (độ pH 7,6)	10
Tái tạo	WFI	5
CIP	0,5 N NaOH	5

Bảng 4: Quá trình AEX

Bước	Chất đệm được sử dụng	Dung tích bơm (CV)
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)	5

Bơm mẫu	chất lỏng nuôi cấy hoặc chất lỏng tinh khiết ở bước trước	-
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)	3
Rửa	30 mM natri axetat (độ pH 5,6)	10
Cân bằng	20 mM Tris (độ pH 7,6)	5
Rửa giải	20 mM Tris (độ pH 7,6)/0,1 M NaCl	10
CIP	0,5 N NaOH	5

Ví dụ 2: Xác nhận các kết quả tinh chế

Ví dụ 2-1: Các kết quả của sản lượng

Các phép phân tích định lượng được thực hiện liên quan đến các protein trong các chất lỏng nuôi cấy và chất lỏng tinh khiết bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Octet Qk. Phương pháp sử dụng Octet Qk là phương pháp phân tích định lượng sử dụng phản ứng kháng nguyên/kháng thể, và chỉ có thể định lượng protein đích. Phương pháp phân tích như sau.

Ổn định chất cảm ứng sinh học bằng cách sử dụng chất đệm động lực học (Kinetics buffer) (Pall-ForteBio).

Thực hiện cố định bằng cách sử dụng chất đệm động lực học và kháng thể kháng FSH được đánh dấu sinh học.

Định lượng từng mẫu được pha loãng thích hợp với chất đệm động lực học. Thực hiện việc tái tạo bằng cách sử dụng chất đệm (20 mM Tris-HCl, độ pH 7,6, 1,7 M MgCl₂).

Thực hiện trung hòa bằng cách sử dụng chất đệm động lực học.

Sau đó, định lượng chất lỏng tinh khiết từ mỗi bước và phân tích sản lượng.

Các sản lượng cuối cùng theo thứ tự của quá trình tinh chế được tóm tắt trong bảng

5.

Bảng 5

Trường hợp	Thứ tự của quá trình tinh chế	Sản lượng cuối cùng (%)
1	IAC -> HIC -> AEX	66,7
2	IAC -> AEX -> HIC	57,3
3	HIC -> AEX -> IAC	4,2
4	HIC -> IAC -> AEX	11,2
5	AEX -> IAC -> HIC	54,6

6	AEX -> HIC -> IAC	49,4
---	-------------------	------

Kết quả là, xác nhận rằng sản lượng cuối cùng là tốt nhất khi quá trình được thực hiện theo thứ tự IAC -> HIC -> AEX (trường hợp 1) là phương pháp tinh chế của sáng chế. Kết quả này xác nhận rằng hiệu quả tinh chế khác nhau theo từng quá trình tùy thuộc vào thứ tự mà quy trình được thực hiện mặc dù các loại sắc ký giống nhau (tức là, sắc ký ái lực miễn dịch, sắc ký tương tác kỵ nước, và sắc ký trao đổi anion) được sử dụng trong mỗi quá trình, và quá trình được thực hiện theo thứ tự IAC -> HIC -> AEX là yếu tố quan trọng nhất.

Ví dụ 2-2: Các điều kiện phân tích HCP và các kết quả phân tích

Như bước tiền xử lý để phân tích hàm lượng HCP, chất lỏng tinh khiết được cô đặc với nước tinh khiết và chất đệm được trao đổi sử dụng phương pháp ly tâm với bộ lọc ly tâm Amicon. Phân tích định lượng các protein trong các mẫu trong đó đệm được trao đổi được thực hiện bằng thiết bị phân tích Octet Qk của Ví dụ 2-1. Phân tích hàm lượng HCP được thực hiện bằng cách sử dụng chất lỏng tinh khiết được cô đặc và trao đổi chất đệm. Phân tích HCP được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit “Thế hệ thứ 3 protein tế bào chủ CHO” (Cygnus). Phương pháp phân tích như sau.

Pha loãng từng mẫu thích hợp bằng chất đệm pha loãng sao cho hàm lượng HCP trong mẫu nằm trong dải tiêu chuẩn.

Nạp chất chống CHO:HRP vào đĩa giếng với lượng 100 μ L cho mỗi đĩa giếng.

Nạp mẫu chuẩn và mỗi mẫu vào mỗi đĩa giếng với lượng 50 μ L cho mỗi đĩa giếng và để chúng phản ứng ở $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ với tốc độ từ 400 vòng/phút đến 600 vòng/phút trong hai giờ.

Loại bỏ các chất phản ứng và rửa bằng dung dịch đệm rửa bốn lần.

Nạp chất nền TMB vào đĩa giếng với lượng 100 μ L mỗi giếng và cho phép phản ứng ở $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút.

Dừng phản ứng bằng cách thêm dung dịch dừng phản ứng vào đĩa giếng với lượng 100 μ L cho mỗi đĩa giếng.

Tính hàm lượng HCP cho mỗi quá trình tinh chế theo đơn vị ppm (phần triệu) bằng cách sử dụng giá trị định lượng của protein đích và hàm lượng HCP đo được.

Bảng 6

Thử nghiệm số	Thứ tự của quá trình tinh chế	Kết luận cuối cùng về chất lỏng tinh khiết (mg/mL)	HCP (ng/mL)	HCP (vòng/phút)
	Chất lỏng nuôi cấy (HCCF)	0,0113	95110,1	8416823,0
1	IAC	1,0685	190,6	178,4
2	IAC->HIC	1,0984	36,7	33,4
3	IAC->HIC->AEX	1,1875	12,6	10,6
4	IAC->AEX	1,0377	96,2	92,7
5	IAC->AEX->HIC	0,9506	55,0	57,9
6	HIC	0,2362	1914100,5	8103727,8
7	HIC->AEX	0,5244	2403125,9	4582619,9
8	HIC->AEX->IAC	0,4288	1392,8	3248,1
9	HIC->IAC	0,8382	815,0	972,3
10	HIC->IAC->AEX	0,5981	176,3	294,8
11	AEX	2,1599	11761441,5	5445363,9
12	AEX->IAC	0,9887	896,4	906,6
13	AEX->IAC->HIC	0,5316	96,1	180,8
14	AEX->HIC	3,2517	4178171,2	1284919,0
15	AEX->HIC->IAC	1,3911	1282,8	922,1

Kết quả là, hàm lượng HCP là thấp nhất khi quá trình được thực hiện theo thứ tự IAC -> HIC -> AEX (thử nghiệm số 3) là phương pháp tinh chế theo sáng chế. Ngoài ra, xác nhận rằng hàm lượng HCP thấp hơn khi sử dụng nhiều loại sắc ký so với khi sử dụng sắc ký riêng lẻ. Từ những kết quả này, xác nhận rằng hiệu quả tinh chế không chỉ tăng khi số lượng sắc ký tăng lên, mà còn khác nhau theo từng quá trình tùy thuộc vào thứ tự mà quá trình được thực hiện mặc dù ba loại sắc ký giống nhau (tức là, sắc ký ái lực miễn dịch, sắc ký tương tác kỵ nước và sắc ký trao đổi anion) được sử dụng trong mỗi quá trình.

Cụ thể, có thể thấy rằng hàm lượng HCP có thể khác nhau khoảng nhiều hơn 3.000 lần giữa quá trình trong đó việc tinh chế được thực hiện theo thứ tự HIC-> AEX-> IAC (thử nghiệm số 8) và quá trình trong đó việc tinh chế được thực hiện theo thứ tự IAC -> HIC -> AEX là phương pháp tinh chế của sáng chế, mặc dù ba loại sắc ký giống nhau (tức là, sắc ký ái lực miễn dịch, sắc ký tương tác kỵ nước, và sắc ký trao đổi anion) được sử dụng trong cả hai quy trình. Các kết quả này cho thấy rằng thứ tự quá trình là yếu tố

quan trọng nhất trong phương pháp tinh chế của sáng chế.

Ví dụ 2-3: Các kết quả phân tích độ tinh khiết bằng SE-HPLC

Thử nghiệm được thực hiện để phân tích độ tinh khiết của FSH thông qua phân tích SE-HPLC. Axetonitril được thêm vào dung dịch natri phosphat để điều chế pha động có độ pH 7. Sau đó, cột được cân bằng và mẫu được bơm vào đó. Độ tinh khiết được xác nhận dựa trên các đỉnh thu được bằng cách cho chảy đủ qua pha động. Độ tinh khiết cho mỗi bước tinh chế như được thể hiện trên Fig.1.

Như được thể hiện trên Fig.1, xác nhận rằng độ tinh khiết của đỉnh chính (tức là, đỉnh dime (dimer)) tăng lên khi quá trình tinh chế được thực hiện tiếp tục.

Ví dụ 2-4: Kết quả phân tích hàm lượng oxit bằng RP-HPLC

Thử nghiệm được thực hiện để phân tích hàm lượng oxit của FSH thông qua phân tích RP-HPLC. Pha động (B) với độ pH 2,5 được điều chế bằng cách thêm axetonitril vào pha động kali phosphat (A) và kali phosphat. Sau đó, cột được cân bằng và mẫu được bơm vào đó. Hàm lượng oxit được xác nhận bằng các đỉnh thu được bằng cách cho chảy hai pha động trong điều kiện gradien nồng độ. Hàm lượng oxit cho mỗi bước tinh chế được thể hiện trên Fig.2.

Như được thể hiện trên Fig.2, xác nhận rằng khi quá trình tinh chế tiếp tục, độ tinh khiết tăng lên trong khi đỉnh oxit hạ xuống.

Dựa trên phần mô tả ở trên, những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng sáng chế có thể được thực hiện dưới các hình thức cụ thể khác mà không vượt khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm cơ bản của sáng chế. Trong trường hợp này, các phương án ví dụ được mô tả ở trên chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngược lại, sáng chế nhằm mục đích không chỉ đề cập đến các phương án ví dụ mà còn bao gồm các thay đổi, sửa đổi, các phương án tương đương và khác nữa đều thuộc nguyên lý và phạm vi bảo hộ của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo phương pháp tinh chế của sáng chế, bằng cách sắp xếp hiệu quả thứ tự của quá trình tinh chế, có thể tăng hiệu quả hoạt động của quá trình đồng thời cải thiện năng suất FSH và tối đa hóa khả năng loại bỏ các tạp chất.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tinh chế hormon kích thích nang (follicle-stimulating hormon: FSH) được thực hiện theo thứ tự các bước sau đây:

(a) thực hiện phép sắc ký ái lực miễn dịch (immunoaffinity chromatography: IAC);
(b) thực hiện phép sắc ký tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction chromatography: HIC); và

(c) thực hiện phép sắc ký trao đổi anion (anion exchange chromatography: AEX),
trong đó phép sắc ký ái lực miễn dịch (IAC) bao gồm bước rửa giải được thực hiện bằng dung dịch rửa giải có pH nằm trong khoảng 7 hoặc cao hơn và 8 hoặc thấp hơn.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phép sắc ký trong mỗi bước (a) đến (c) chỉ được thực hiện một lần và không thực hiện thêm sắc ký bổ sung.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phép sắc ký bổ sung là một hoặc nhiều sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm sắc ký loại trừ kích thước, sắc ký ái lực thuốc nhuộm, sắc ký pha đảo ngược, và sắc ký trao đổi cation.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phép sắc ký trong mỗi bước còn bao gồm thực hiện thêm một hoặc nhiều bước được chọn từ bước bơm mẫu, bước cân bằng, bước rửa và bước rửa giải.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phép sắc ký ái lực miễn dịch (IAC) được thực hiện bằng cách sử dụng nhựa có đặc tính liên kết đặc hiệu với hormon kích thích nang (FSH).

6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc rửa giải trong bước (a) được thực hiện một hoặc nhiều lần bằng cách sử dụng dung dịch rửa giải có độ pH trong khoảng 7 hoặc cao hơn và 8 hoặc thấp hơn.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó dung dịch rửa giải trong bước (a) là bất kỳ một hoặc nhiều dung dịch được chọn từ nhóm bao gồm Tris, PBS, 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), sulfonat, 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), TES, phosphat, và isopropanol.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó dung dịch rửa giải trong bước (a) có nồng độ mol trong khoảng từ 2 mM đến 50 mM.

9. Phương pháp theo điểm 6, trong đó dung dịch rửa giải trong bước (a) bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm natri sunfat, natri clorua, amoni sunfat, amoni clorua và magie clorua.
10. Phương pháp theo điểm 6, trong đó dung dịch rửa giải trong bước (a) có nồng độ muối trong khoảng 0,1 M hoặc cao hơn và 3 M hoặc thấp hơn.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (a) bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm natri sunfat, natri clorua, amoni sunfat, amoni clorua và magie clorua.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (a) có nồng độ muối trong khoảng 1,5 M hoặc cao hơn và 2,5 M hoặc thấp hơn.
13. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc rửa giải ở bước (c) được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch rửa giải có độ pH trong khoảng 4,5 hoặc cao hơn và 6,5 hoặc thấp hơn.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (c) bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm xitrat, axetat, suxinat, natri xitrat, natri axetat và natri suxinat.
15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (c) có nồng độ mol trong khoảng 20 mM đến 40 mM.
16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trước khi nạp mẫu hormon kích thích nang (FSH) giữa các bước (a) đến (c), cột sắc ký được cân bằng bằng cách sử dụng chất đệm có độ pH trong khoảng 7 hoặc cao hơn và 8 hoặc thấp hơn.
17. Phương pháp theo điểm 4, trong đó việc rửa giải ở bước (c) được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch rửa giải có độ pH trong khoảng 7 hoặc cao hơn và 8 hoặc thấp hơn.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (c) bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều muối được chọn từ nhóm bao gồm natri sunfat, natri clorua, amoni sunfat, amoni clorua và magie clorua.
19. Phương pháp theo điểm 17, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (c) có nồng độ muối trong khoảng 0,5 M hoặc cao hơn và 0,2 M hoặc thấp hơn.

20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hormon kích thích nang (FSH) được tinh chế bằng phương pháp theo điểm 1 có độ tinh khiết, trong đó trị số HCP (protein tế bào chủ) là 50 ppm hoặc ít.

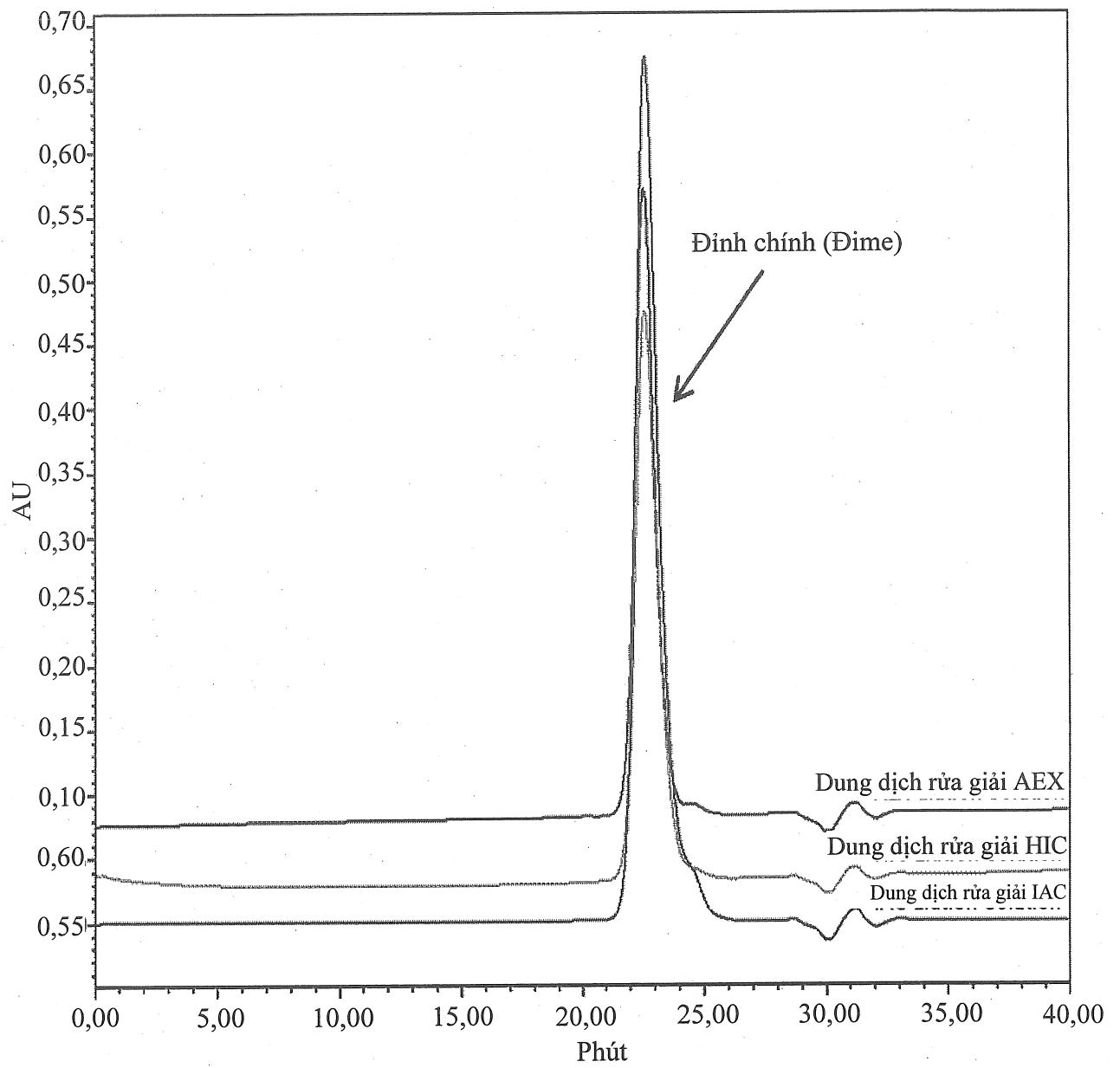


Fig.1

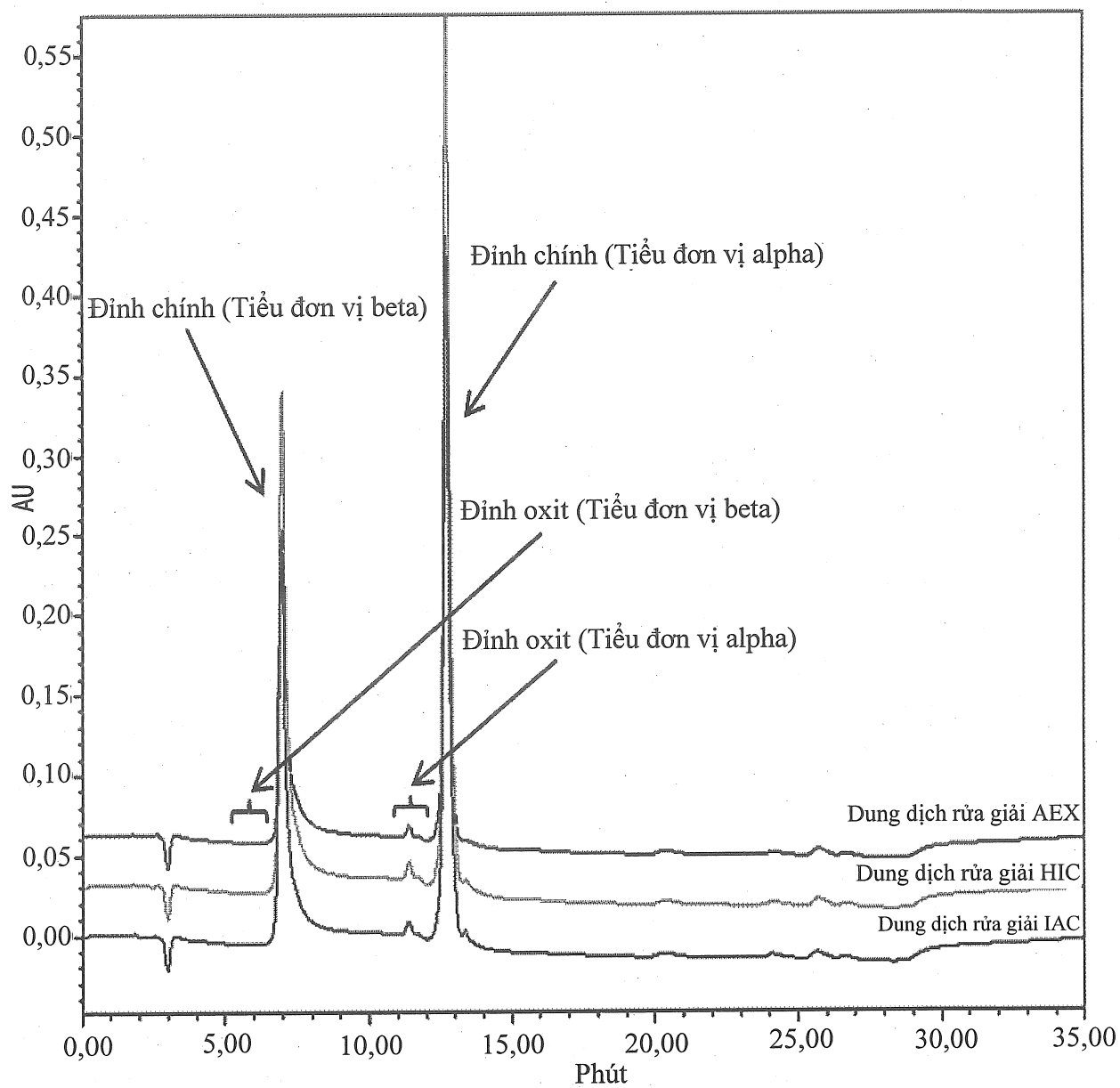


Fig.2