



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0044223
(51)⁷ C08B 37/00; C08L 5/00; C08H 1/00; (13) B
A61K 39/095

(21) 1-2019-06829 (22) 03/05/2018
(86) PCT/IB2018/053069 03/05/2018 (87) WO2018/203268 08/11/2018
(30) 201721015961 05/05/2017 IN
(45) 25/03/2025 444 (43) 25/06/2020 387A
(71) SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED (IN)
212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune Maharashtra, 411 028, India
(72) DHERE, Rajeev Mhalasakant (IN); PISAL, Sambhaji Shankar (IN); ANNAMRAJU,
Dattatreya Sarma (IN).
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÁCH POLYSACARIT VÀ CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH
CHỨA NÓ

(21) 1-2019-06829

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tách polysacarit từ mẫu sinh học, bao gồm các bước sau: (a) trộn dung dịch polysacarit thô với chất tẩy rửa anion; (b) bổ sung kiềm vào dung dịch; (c) trung hòa pH của dung dịch; (d) cho dung dịch vào xử lý kết tủa bằng rượu, tiếp đó ly tâm và thu dịch nổi; (e) loại bỏ chất tẩy rửa có trong dịch nổi; (f) cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng polysacarit. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm miễn dịch chứa polysacarit thu được từ phương pháp trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, và cụ thể hơn là đề cập đến phương pháp phân tách polysacarit và chế phẩm miễn dịch chứa polysacarit này .

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn não mô cầu (*Neisseria meningitidis*) là nguyên nhân chính gây nhiễm trùng màng (màng não) và dịch não tủy (CSF) bao quanh não và tủy sống, dẫn đến tử vong và tàn tật trên toàn thế giới.

Neisseria meningitidis, còn được gọi là não mô cầu, là vi khuẩn gram âm. Theo cấu trúc của bao nhầy polysacarit (PS), 13 nhóm huyết thanh của vi khuẩn não mô cầu đã được xác định, trong đó có 6 nhóm huyết thanh (A, B, C, W, X và Y) có khả năng gây bệnh dịch (tham khảo: Lee Harrison và cộng sự 2011).

Viêm màng não xảy ra trong các cụm nhỏ trên khắp thế giới với sự bùng phát theo mùa đối với tỷ lệ thay đổi của viêm màng não do vi khuẩn dịch bộc phát. Ảnh hưởng nặng nề nhất của bệnh viêm màng não mô cầu đã được quan sát thấy ở lục địa châu Phi, nhất là châu Phi cận Sahara, còn được gọi là vành đai viêm màng não. Các “Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh (CDC)” và Tổ chức Y tế Thế giới đã ước tính rằng bệnh viêm màng não gây ra 171.000 ca tử vong trên toàn thế giới vào năm 2000. Ngoài ra, báo cáo của CDC xác nhận sự xuất hiện của vi khuẩn não mô cầu là nguyên nhân hàng đầu gây viêm màng não và nhiễm trùng huyết ở trẻ em và thanh niên ở Hoa Kỳ. Do đó, vi khuẩn não mô cầu tiếp tục là bài toán về sức khỏe cộng đồng ở cả các nước phát triển và đang phát triển.

Năm 1996-97, dịch bệnh do vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A gây ra, hơn 250.000 trường hợp mắc bệnh và hơn 25.000 ca tử vong đã được báo cáo; thúc đẩy cộng đồng y tế thế giới cam kết phát triển vaccin sẽ loại trừ dịch bệnh viêm màng não nhóm A ở châu Phi.

Vào năm 2010, vaccin liên hợp polysacarit A não mô cầu, cụ thể là Menafrivac đã được đưa ra thành công ở lục địa châu Phi dẫn đến gần như biến mất dịch bệnh do vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A. Với sự ảnh hưởng ngày càng giảm của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A (Men-A), ảnh hưởng của não mô cầu nhóm huyết thanh khác như vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C (Men-C), vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh W (Men-W), vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh X (Men-X) và vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh Y (Men-Y) lại tăng lên. Để chống lại tác dụng mạnh mẽ này, nhiều loại vaccin đơn giá và đa giá bao gồm các nhóm huyết thanh nói trên đã được phát triển và đưa ra thị trường. Mặc dù vaccin liên hợp A, C, Y và W đa giá đã được cấp phép từ năm 2005 (Menactra®, Menveo®) để sử dụng cho trẻ em và người lớn ở Canada, Hoa Kỳ và Châu Âu; nhưng chúng có sẵn trên thị trường với giá rất cao, do đó nó không phù hợp với phần còn lại của cộng đồng thế giới.

Các bao nhầy nhóm huyết thanh A bao gồm các đơn vị lặp lại của O-axetyl hóa (α 1-6) được liên kết với N-axetyl-manosamin-1-phosphat. Polysacarit bao nhầy từ các nhóm huyết thanh B, C, W và Y bao gồm các dẫn xuất axit sialic; các nhóm huyết thanh B và C biểu hiện (α 2→8)- và (α 2→9) được liên kết với polyme đồng nhất axit sialic, và các trình tự xen kẽ của d-galactoza hoặc d-glucoza và axit sialic được biểu hiện bởi nhóm huyết thanh W và Y. Các tạp chất trong dịch lên men tương tác khác nhau với các nhóm chức (moiety) lặp lại có mặt trên polysacarit bao nhầy. Do đó, cần thiết phải có phương pháp loại bỏ những khác biệt này để tách các polysacarit bao nhầy vi khuẩn khác nhau từ các nhóm huyết thanh khác nhau.

Theo WHO Technical Report Series on Meningococcal Conjugate Vaccine (loạt báo cáo kỹ thuật của Tổ chức Y tế thế giới về vaccin liên hợp não mô cầu), polysacarit đã tách cần đáp ứng các đặc điểm kỹ thuật sau đây:

Bảng 1

Thông số kiểm soát	Chỉ số kỹ thuật theo WHO		
	Men-C	Men-W	Men-Y
Hàm lượng Polysacarit	>3 mg/ml	>3 mg/ml	>3 mg/ml
Tạp chất protein	<1%	<5%	<5%

Tạp chất axit nucleic	<1%	<2%	<2%
Hàm lượng axit sialic	>80%	>56%	>56%
Hàm lượng O-Axetyl	>1,5mM/gm PS	>0,3mM/gm PS	>0,3mM/gm PS
Hàm lượng nội độc tố	<100 EU/ μ g PS	<100 EU/ μ g PS	<100 EU/ μ g PS
Phân phối kích thước phân tử	75% trở lên 0,5 kD	80% trở lên 0,5 kD	80% trở lên 0,5 kD

Các phương pháp tinh chế cổ điển đối với PS bao nhầy vi khuẩn được sử dụng trong vaccin bao gồm một số bước kết tủa chọn lọc bằng etanol và/hoặc chất tẩy rửa cation, tiếp đó ly tâm liên tục, siêu ly tâm và khử protein bằng phenol.

Tài liệu sớm nhất đề cập đến phương pháp tách polysaccharit vi khuẩn não mô cầu từ nhóm huyết thanh A, B và C đã được xuất bản bởi Gotschlich và cộng sự (1969). Gotschlich và cộng sự đã sử dụng chất tẩy rửa cation Cetavlon (Hexadecyl trimethylamoni bromua) để nhanh chóng kết tủa các polysaccharit tích điện âm từ toàn bộ dịch nuôi cấy, sau đó sử dụng phương pháp phân ly phức hợp chất tẩy rửa-polysaccharit sử dụng cách chiết canxi clorua 0,9 M và ly tâm, kỹ thuật kết tủa etanol đã được sử dụng để loại bỏ axit nucleic trong khi protein được loại bỏ bằng cách xử lý polysaccharit bằng natri axetat, sau đó đồng nhất hóa bằng butanol chứa cloroform, cách thay thế bằng hỗn hợp nước nóng-phenol cũng được báo cáo. Phương pháp tinh chế cuối cùng liên quan đến kết tủa polysaccharit bằng etanol (4-5 lần) và axeton. Phương pháp này liên quan đến sự bất tiện của việc sử dụng cloroform và một lượng lớn etanol. (Tham khảo: T.P. Pato, Master's thesis, Instituto de Quimica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003, p. 95.)

Tanizaki và cộng sự đã đề xuất phương pháp tinh chế polysaccharit vi khuẩn não mô cầu C trong đó quá trình chiết xuất phenol được thay thế bằng quá trình cắt bởi proteinaza sử dụng hỗn hợp proteinaza K, nagarza và trypsin; Siêu lọc tiếp tuyến sợi rỗng giới hạn 100 kDa thay vì siêu ly tâm; tiếp đó là lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng, sử dụng màng giới hạn 100 kDa, được thực hiện trong 20 mM đệm Tris-HCl chứa 0,5% deoxycholat, để loại bỏ protein phân tử lượng thấp và lypopolysaccharit (LPS). Mặc dù sử dụng phương pháp cải tiến ở trên, chế phẩm polysaccharit đã tách vẫn chứa protein và axit nucleic lần lượt là 2% (w/w) và 1,5% (w/w) [Tham khảo: Tanizaki cộng sự; Journal of Microbiological Methods Volume 27, Issue

1, September 1996, Pages 19-23 và Goncalves cộng sự 2007;Formatex; Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology]

TP Pato và cộng sự (2006) đề xuất phương pháp tinh chế đã được sửa đổi cho polysacarit vi khuẩn não mô cầu C bao gồm quá trình ly tâm dòng chảy liên tục dịch nuôi cấy để loại bỏ các tế bào; cô đặc dịch nổi bằng cách lọc tiếp tuyến (giới hạn 100 kDa); bổ sung 0,5% natri deoxycholat (DOC), đun nóng đến 55°C trong 30 phút và lọc tiếp tuyến (giới hạn 100 kDa); sắc ký trao đổi anion (Nguồn 15Q) và sắc ký rây phân tử (Sepharoza CL-4B). [Tham khảo: T.P. Pato và cộng sự./J. Chromatogr. B 832 (2006) 262-267].

Sáng chế Mỹ US7491517B2 đề xuất sử dụng xetyltrimetylamoni bromua (CTAB), Etanol, Proteinaza K, cacbon hoạt tính và lọc gel để loại bỏ tạp chất trong quá trình tinh chế polysacarit vi khuẩn não mô cầu C. Tuy nhiên, quá trình nhiều bước dẫn đến thất thoát polysacarit và cacbon hoạt tính được sử dụng có thể làm phát sinh các chất lọc được không mong muốn.

Sáng chế quốc tế WO2017006349 đề xuất sử dụng kẽm axetat/amoni sulfat/natri xitrat để loại bỏ các tạp chất protein từ sản phẩm chiết thu hoạch vi khuẩn não mô cầu. Sáng chế cũng đề xuất sử dụng các enzym như Benzonaza, Proteinaza K hoặc Nargaza để phân hủy protein dư và/hoặc vật liệu axit nucleic, sau đó là tinh chế sắc ký.

Sáng chế quốc tế WO2015128798A1 đề xuất phương pháp loại bỏ tạp chất khỏi PS vi khuẩn não mô cầu C. Phương pháp sử dụng quá trình ủ ở 50-60°C với các chất tẩy rửa anion như natri deoxycholat hoặc HEPES, khử axetyl hóa polysacarit thô sử dụng NaOH 0,5 - 1,5 M ở 50°C trong 30 phút đến 10 giờ, và tinh chế thêm bằng cách lọc tuần hoàn có pha loãng và sắc ký tương tác kỵ nước (HIC).

Tian và cộng sự đề xuất phương pháp tinh chế PS vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C, W và Y, bao gồm việc sử dụng CTAB, Etanol, DOC, Capto Adhere (sắc ký trao đổi anion đa phương thức), Capto DEAE (anion yếu) và Shephadex G25, trong đó hàm lượng nội độc tố nhỏ hơn 25 EU/mg, hàm lượng protein dưới 10 mg/g, hàm lượng axit nucleic trong khoảng 1-7mg/g [Tham khảo: Tian và cộng sự 2013 GE Healthcare; Application note, 29216880 AA].

Phương pháp Gotschlich là phương pháp nhiều giai đoạn dẫn đến thất thoát đáng kể trong thu hồi sản phẩm, cụ thể là khoảng 37%. Việc sử dụng hóa chất như phenol có thể dẫn đến sự thay đổi cấu trúc không mong muốn trong chất mang polysacarit hoặc protein và cũng tạo ra chất thải độc hại phenol không mong muốn.

Sáng chế Mỹ US7491517B2, sáng chế quốc tế WO2017006349 và TP Pato và cộng sự (2006) đề xuất phương pháp sử dụng các enzym giúp phân hủy tạp chất protein và axit nucleic, tuy nhiên việc loại bỏ enzym và vật liệu thủy phân là nhiệm vụ khó khăn và có thể làm thất thoát sản phẩm. Hơn nữa, các cơ quan quản lý đã hạn chế sử dụng enzym động vật trong các sản phẩm cho con người vì nguy cơ nhiễm protein độc (prion). Việc sử dụng enzym, bên cạnh hạn chế là chi phí cao, còn mắc phải nhiều vấn đề quy định hơn trong khung cGMP, cụ thể như: nguồn gốc của enzym (từ động vật hoặc tái tổ hợp), sự thay đổi hoạt động của enzym giữa các nhà cung cấp và lô khác nhau, v.v...

Sáng chế quốc tế WO2017006349 và sáng chế Mỹ US4686102A đề xuất sử dụng amoni sulfat để kết tủa tạp chất protein và axit nucleic. Tuy nhiên, đôi khi nó cũng làm kết tủa các polysacarit bao nhầy, dẫn đến thất thoát polysacarit tổng số.

Natri Deoxycholat là chất tẩy rửa nhẹ và là một trong những chất tẩy rửa được sử dụng phổ biến nhất trong tinh chế polysacarit. Natri Deoxycholat với cấu trúc steroid cốt lõi ít biến tính và bị hạn chế về độ hòa tan, nó phá vỡ nội độc tố mà không ảnh hưởng đến cấu trúc hóa học; và do đó khi loại bỏ natri Deoxycholat, nội độc tố lấy lại hoạt động sinh học của chúng. Ngoài ra, các phương pháp dựa trên DOC không hoạt động hiệu quả để loại bỏ các tạp chất khỏi polysacarit, cụ thể là axit Sialic có chứa polysacarit. Điều này có thể là do hoạt động tẩy rửa yếu của DOC đối với liên kết Protein-Lipopolysacarit được hình thành trong quá trình hậu xử lý, dẫn đến hàm lượng nội độc tố và protein cao trong polysacarit phân tách cuối cùng. Hơn nữa Natri Deoxycholat là sản phẩm có nguồn gốc động vật, thậm chí dư lượng còn lại của nó trong sản phẩm cuối cùng có thể dẫn đến việc các cơ quan quản lý và các cộng đồng tôn giáo nhất định không chấp nhận sản phẩm.

Các kỹ thuật sắc ký như sắc ký rây phân tử, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký tương tác kỵ nước đã được sử dụng thành công để phân tách các polysacarit vi khuẩn với việc loại bỏ hiệu quả các tạp chất protein và axit nucleic. Mặc dù đã phân tách thành công polysacarit vi khuẩn đáp ứng các chỉ số kỹ thuật của WHO, việc sử dụng các kỹ thuật sắc ký liên quan đến lao

động nhiều bước và chuẩn bị mẫu tốn thời gian, liên quan đến các vấn đề về khả năng mở rộng, làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự thu hồi polysacarit bao nhầy và do đó không phải là lựa chọn chi phí thấp cho phương pháp hậu xử lý quy mô công nghiệp.

Phương pháp hậu xử lý các chế phẩm sinh học là nguyên nhân gốc rễ chiếm 20%-80% tổng chi phí sản xuất (Ansejo và Patrick, 1990), nên việc phát triển phương pháp hậu xử lý tiên tiến là điều cần thiết để giảm chi phí sản xuất và cho phép phân phối vacxin cho toàn bộ dân số bởi hệ thống y tế công cộng.

Hiện nay, phương pháp được sử dụng để thu được polysacarit ở dạng tinh khiết bao gồm một số bước xử lý chất tẩy rửa và kết tủa vi sai của dịch nuôi cấy được thu hoạch bằng dung môi hữu cơ như etanol.

Tuy nhiên, sau hai lý do chính sau đây bắt buộc phải tìm kiếm phương pháp thanh lọc thay thế.

Hiện nay, bước đầu tiên để loại bỏ tạp chất (protein, axit nucleic và nội độc tố) được thực hiện là sử dụng chất tẩy rửa anion natri deoxycholat (DOC). DOC là chất tẩy rửa mật có nguồn gốc động vật với cấu trúc steroid cốt lõi. Do cấu trúc cồng kềnh, nó có độ hòa tan hạn chế và khả năng biến tính ít hơn trên các đại phân tử sinh học. Ngoài ra, nguồn cung ổn định với chứng nhận theo quy định bắt buộc chỉ giới hạn ở một nhà cung cấp/nhà cung cấp duy nhất.

Tiêu thụ nhiều etanol và bao gồm các bước dư thừa (lọc cacbon) làm cho phương pháp này kém hiệu quả, tốn thời gian và chi phí.

Do đó, nhu cầu cấp thiết là phát triển các phương pháp thay thế, đơn giản, có thể mở rộng quy mô, hiệu quả về chi phí để tinh chế polysacarit vi khuẩn để thu hồi polysacarit với năng suất cao hơn. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế hậu xử lý hiệu quả và chi phí hợp lý để phân tách PS bao nhầy vi khuẩn, trong đó phương pháp làm giảm đáng kể nội độc tố, tạp chất protein và axit nucleic, do đó cho phép thu hồi polysacarit với hiệu suất cao hơn cũng như duy trì mức O-acetyl mong muốn theo chỉ số kỹ thuật của WHO.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất trình bày tinh chế thay thế để tinh chế polysaccharit bao nhầy vi khuẩn, cụ thể hơn là polysaccharit bao nhầy của vi khuẩn não mô cầu.

Phương pháp bao gồm bước cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng sản phẩm thu được thông qua lọc tiếp tuyến giới hạn 100 kDa, tiếp đó bổ sung chất tẩy rửa anion và kiềm mạnh để làm biến tính protein, axit nucleic và lipopolysaccharit. Chất chiết sinh học tiếp đó được ly tâm, lọc tuần hoàn có pha loãng và kết tủa polysaccharit vi khuẩn nhờ CTAB. Phương pháp cải thiện hiệu quả thu hồi polysaccharit, có thể áp dụng ở quy mô lớn, không sử dụng enzym, sử dụng hiệu quả chi phí và số bước tinh chế ít hơn. Phương pháp làm giảm đáng kể nội độc tố, tạp chất protein và axit nucleic, do đó cho phép thu hồi polysaccharit với hiệu quả cao hơn cũng như duy trì mức O-acetyl mong muốn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của polysaccharit Men-C;

Fig.2 là NMR của polysaccharit Men-Y;

Fig.3 là NMR của polysaccharit Men-W;

Fig.4 là NMR của polysaccharit Men-A;

Fig.5 là NMR của polysaccharit Men-X;

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh chung theo sáng chế, một trong những nhóm huyết thanh vi khuẩn quan tâm đã được phát triển trong môi trường phù hợp và được bất hoạt bằng cách sử dụng formaldehit hoặc phương pháp bất kỳ thường được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật; sản phẩm tiếp tục trải qua phương pháp hậu xử lý để phân tách và tinh chế polysaccharit bao nhầy. Các vi khuẩn được quan tâm để phân tách polysaccharit theo sáng chế thu được từ vi khuẩn gram âm được tuyển chọn từ chi bao gồm, nhưng không giới hạn, *Escherichia*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, v.v...; tốt hơn là polysaccharit bao nhầy được biểu hiện bởi nhóm huyết thanh của vi khuẩn não mô cầu *Neisseria meningitidis*. Theo khía cạnh khác, polysaccharit theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ nhóm bao gồm: *Helicobacter pylori*, *Chlamydia*

pneumoniae, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus* nhóm A, *Streptococcus* nhóm B Ia, Ib, II, III, V, VI, or VIII; *Streptococcus* nhóm C, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium* spp., *Clostridium difficile*, *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema* spp., *Borrelia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* spp., *Hemophilus ducreyi*, *Corynebacterium diphtheria*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Ehrlichia* spp., và *Rickettsia* spp., polysacarit của *Streptococcus pneumoniae* tuýp 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9A, 9F, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23B, 23F, 24F, 33F, 35B, 38 và 45; polysacarit của *Neisseria meningitidis* nhóm huyết thanh A, B, C, D, W135, X, Y, Z, 29E; và *H. influenzae* tuýp b.

Các vật liệu sinh học được sử dụng trong quá trình thí nghiệm như sau:

Polysacarit được phân tách từ:

Bảng 2

Tên sinh vật	Ký hiệu chủng	Nguồn cung cấp chủng
<i>Neisseria meningitidis</i> A	M1027	SynCo Biopartners (Hà Lan)
<i>Neisseria meningitidis</i> C	C11(60E)	CBER/FDA, Mỹ
<i>Neisseria meningitidis</i> W	S877	CBER/FDA, Mỹ
<i>Neisseria meningitidis</i> Y	M10659	CDC, Mỹ
<i>Neisseria meningitidis</i> X	M8210	CBER/FDA, Mỹ

Protein mang không liên hợp, cụ thể là CRM197 hoặc TT. CRM197 có nguồn gốc từ chủng tái tổ hợp CS463-003 (MB101) của *Pseudomonas fluorescens* từ Pfenex USA. TT có

nguồn gốc từ *Clostridium Tetani* (Harvard số 49205) thu được từ CRI, Cơ quan kiểm soát quốc gia, Kasauli, Himachal Pradesh, Ấn Độ. CRI lấy chủng này từ NVI, Hà Lan.

Theo phương án thực hiện thứ nhất của sáng chế, polysacarit bao nhầy vi khuẩn đã được làm sạch từ sản phẩm thu hoạch bất hoạt bằng cách ly tâm; và dịch nổi được lọc tuần hoàn có pha loãng bằng bộ lọc tiếp tuyến 100 kD. Người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hiểu rõ rằng phương pháp phù hợp bất kỳ khác có thể được sử dụng thay cho bước ly tâm và lọc tuần hoàn có pha loãng để cô đặc polysacarit bao nhầy vi khuẩn. Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện, polysacarit bao nhầy có nguồn gốc từ vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A, C, W, Y và X.

Theo phương án thực hiện thứ hai của sáng chế, sản phẩm giữ lại thu được trong phương án thực hiện thứ nhất được xử lý bằng chất hoạt động bề mặt/chất tẩy rửa anion. Chất tẩy rửa anion được chọn từ nhóm bao gồm alkyl sulfat, natri dodecyl sulfat, natri Deoxycholát, natri dodecyl sulfonat, natri s-alkyl sulfat, natri rượu béo polyoxyetylen ete sulfat, natri oleyl sulfat, N-oleoyl poly(axit amin) natri, natri alkylbenzen sulfonat, natri alpha olefin sulfonat, natri alkyl sulfonat, este axit alpha-sulfo monocarboxylic, este sulfoalkyl axit béo, sulfonat, succinat, alkyl naphthalen sulfonat, natri alkan sulfonat, natri ligninsulfonat, và natri alkyl glyxeryl ete sulfonat.

Tốt hơn là, chất hoạt động bề mặt anion là alkyl sulfat, tốt hơn nữa là natri dodecyl sulfat ở nồng độ cuối cùng trong khoảng 0,1% đến 4%, tốt hơn nữa là 1% được thêm vào sản phẩm không qua màng và khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Bản chất lưỡng tính của SDS làm cho nó trở thành một tác nhân phá vỡ liên kết hydro (chaotropic) mạnh, không chỉ phá vỡ các protein mà còn hòa tan chúng.

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ hai, sản phẩm thu hoạch bất hoạt có thể được xử lý trực tiếp bằng chất hoạt động bề mặt anion và tiếp tục cô đặc polysacarit bao nhầy làm giảm tạp chất xuống mức cần thiết, do đó có thể bỏ qua bước tẩy rửa cation.

Theo phương án thực hiện thứ ba của sáng chế, kiềm mạnh được thêm vào hỗn hợp thu được từ phương án thực hiện trên và được điều chỉnh về pH trong khoảng 9-11 với việc khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Chất kiềm mạnh nói trên được chọn từ nhóm bao gồm Natri hydroxit, Kali Hydroxit, Natri cacbonat, Hydroxyl amin, Trietyl amin và Liti Hydroxit.

Theo khía cạnh ưu tiên của phương án thực hiện thứ ba của sáng chế, kiểm mạnh là Natri hydroxit đã được bổ sung ở nồng độ cuối cùng từ 5-20M vào hỗn hợp thu được từ phương án thực hiện trên và điều chỉnh đến pH 10,5 bằng cách khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ ba của sáng chế, thay vì kiểm, EDTA và Natri axetat đã được thêm vào hỗn hợp thu được từ phương án thực hiện thứ hai, khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

Theo phương án thực hiện thứ tư của sáng chế, dung dịch thu được từ phương án thực hiện trên được trung hòa (pH 7,0) bằng cách bổ sung axit hữu cơ yếu. Axit hữu cơ yếu là hỗn hợp của một hoặc nhiều axit bao gồm axit formic, axit axetic, axit propionic, axit oxalic, v.v... Để trung hòa hỗn hợp, rượu ưa nước, tốt nhất là etanol được bổ sung đến nồng độ cuối cùng 30-35% và được ủ trong vài giờ ở nhiệt độ phòng đồng thời khuấy liên tục. Rượu ưa nước được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, rượu n-propyl, rượu isopropyl, axeton và rượu t-butyl; hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại trong số chúng; và nồng độ rượu dưới 65% hoặc trên 95%.

Theo phương án thực hiện thứ năm của sáng chế, chất tẩy rửa anion dư được loại bỏ khỏi dung dịch. Dung dịch thu được từ phương án thực hiện trên được ly tâm và dịch nổi được thu thập. Muối kali 0,1 M được trộn với dịch nổi, và sau khi hòa tan, hỗn hợp được ủ ở 2-8°C trên 3 giờ. Muối kali được chọn từ nhóm bao gồm kali clorua, kali axetat, kali sunfat, kali cacbonat, kali bicacbonat, kali phosphat, kali hydro phosphat, kali dihydrogen phosphat, kali nitrat và các muối kali khác hoặc hỗn hợp của chúng. Bước này tận dụng khả năng hòa tan thấp của kali dodecyl sulfat. Sau khi thêm muối kali, tốt nhất là KCl, SDS trong dung dịch được chuyển thành kali dodecyl sulfat, ít tan và dễ bị kết tủa, dẫn đến loại bỏ hoàn toàn SDS. Cần hiểu rằng, nồng độ KCl có thể thay đổi, để có được kết quả mong muốn bởi người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Phương pháp như được đề cập trong phương án thực hiện của sáng chế có thể được sửa đổi theo yêu cầu của người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật.

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ năm, chất tẩy rửa anion dư có thể được loại bỏ khỏi dung dịch bằng cách sử dụng phương pháp lọc gel, kết tủa etanol và nhựa trao đổi ion/cột Amberlite.

Theo phương án thực hiện thứ sáu của sáng chế, dung dịch thu được từ phương án thực hiện trên được ly tâm và dịch nổi được thu thập. Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2 μm , và phần còn lại không qua màng được lọc tuần hoàn có pha loãng bằng lọc tiếp tuyến 100 kDa.

Theo phương án thực hiện thứ bảy của sáng chế, phần còn lại không qua màng thu được theo phương án thực hiện trên đây được lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng đệm Tris-HCl ở nồng độ cuối cùng 25 mM. Tiếp đó bổ sung chất tẩy rửa cation đến nồng độ cuối cùng 1-2% và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ ở điều kiện khuấy liên tục. Chất tẩy rửa cation được chọn từ nhóm bao gồm muối xetyltrimetylamonium, muối tetrabutylamonium, muối myristyltrimetylamonium, và hexadimethrin bromua; hoặc hỗn hợp của chúng. Người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rõ rằng nồng độ chất tẩy rửa cation có thể thay đổi trong khoảng 0,1-0,4% để thu được sản phẩm mong muốn. Chất tẩy rửa cation tốt nhất là CTAB.

Theo phương án thực hiện thứ tám của sáng chế, dung dịch thu được từ phương án thực hiện trên có thể được ly tâm và CTAB-polysaccharit kết tủa được thu thập và hòa tan trong etanol 30-64%. Hỗn hợp hòa tan có thể tiếp tục được ly tâm để loại bỏ cặn không hòa tan.

Theo phương án thực hiện thứ chín của sáng chế, NaCl được bổ sung đến nồng độ cuối cùng 0,1M vào dịch nổi thu được từ phương án thực hiện trên ở điều kiện khuấy liên tục. Polysaccharit kết tủa được thu thập và hòa tan trong NaCl 1 M, sau đó kết tủa bằng rượu (30-64%).

Theo phương án thực hiện thứ mười của sáng chế, dung dịch thu được từ phương án thực hiện trên được lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng bằng nước tiệt (WFI) sử dụng lọc tiếp tuyến 100 kDa và được lọc qua màng lọc 0,2 μm và được lưu trữ ở hoặc dưới -20°C dưới dạng sản phẩm cuối cùng.

Theo phương án thực hiện thứ mười một của sáng chế, polysaccharit bao nhầy tinh khiết của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C, W và Y được thu nhận theo phương pháp dưới đây:

- Vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C, W và Y tương ứng được nuôi cấy trong môi trường phù hợp và được bất hoạt bằng formaldehyt;

- Natri Dodecyl Sulfat được bổ sung vào sản phẩm thu hoạch bất hoạt đến nồng độ cuối cùng 1% và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;
- Natri Hydroxit được bổ sung đến nồng độ cuối cùng là 05-20 mM và được điều chỉnh về pH 10,5 bằng cách khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ;
- Dung dịch thu được từ bước trên được trung hòa bằng cách thêm axit hữu cơ yếu, cụ thể là axit axetic;
- Bổ sung ethanol vào dung dịch trung hòa đến khi ethanol đạt nồng độ cuối cùng từ 30 đến 35%, hỗn hợp được ủ trong vài giờ đồng thời khuấy liên tục;
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và thu dịch nổi;
- 0,1 M KCl được bổ sung vào dịch nổi thu được và hỗn hợp được ủ ở 2-8°C trong thời gian không dưới 3 giờ;
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và dịch nổi được thu thập. Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2 μm và phần còn lại không qua màng lọc được lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng đệm Tris-HCl thông qua bộ lọc tiếp tuyến 100 kDa MWCO;
- Bổ sung vào phần còn lại không qua màng lọc ở bước trên bằng đệm Tris-HCl đến nồng độ cuối cùng 25 mM; tiếp theo bổ sung CTAB đến nồng độ cuối cùng là 2%; và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng không dưới 1 giờ;
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và kết tủa được thu thập rồi được hòa tan trong ethanol 30-64%. Hỗn hợp hòa tan tiếp tục được ly tâm để loại bỏ cặn không hòa tan;
- Bổ sung vào dịch nổi ở bước trên bằng NaCl đến nồng độ cuối cùng 0,1 - 0,3 M. PS kết tủa được hòa tan trong NaCl 1M, rồi sau đó hỗn hợp được kết tủa bằng rượu 30-64%;
- Dung dịch thu được từ bước trên đã được lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng với WFI bằng cách sử dụng bộ lọc tiếp tuyến 100 KDa và được cho đi qua bộ lọc 0,2 μm và được lưu trữ ở -20°C dưới dạng sản phẩm cuối cùng.

Theo phương án thực hiện thứ mười hai của sáng chế, phương pháp tinh chế như được đề cập trong phương án thực hiện thứ mười một tạo ra:

- Polysacarit của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C với tỷ lệ thu hồi từ 60-80%, trong đó hàm lượng nội độc tố dưới 50 EU/mg, hàm lượng protein nhỏ hơn 0,50% và hàm lượng axit nucleic dưới 0,20%.

- Polysacarit của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh Y với tỷ lệ thu hồi từ 60-80%, trong đó hàm lượng nội độc tố dưới 50 EU/mg, hàm lượng protein nhỏ hơn 0,50% và hàm lượng axit nucleic dưới 0,30%.

- Polysacarit vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh W với tỷ lệ thu hồi từ 60-80%, trong đó hàm lượng nội độc tố dưới 50 EU/mg, hàm lượng protein nhỏ hơn 0,5% và hàm lượng axit nucleic dưới 0,2%.

Theo phương án thực hiện thứ mười ba của sáng chế, polysacarit bao nhầy tinh khiết của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A và X đã thu được theo phương pháp dưới đây:

- Vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A và X được nuôi cấy trong môi trường phù hợp và được bất hoạt bằng cách sử dụng formaldehit;

- Natri dodecyl sulfat được bổ sung vào sản phẩm thu hoạch bất hoạt đến nồng độ cuối cùng trong 1% và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;

- EDTA và Natri axetat đã được bổ sung vào sản phẩm thu hoạch bất hoạt đến nồng độ cuối cùng là 1% và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;

- Etanol đã được bổ sung đến nồng độ cuối cùng từ 30 đến 35% và hỗn hợp ủ trong vài giờ với việc khuấy liên tục.

- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và thu được dịch nổi.

- KCl 0,1M được bổ sung vào dịch nổi và hỗn hợp được ủ ở 2-8°C trong hơn 3 giờ.

- Dung dịch thu được từ bước trên đã được ly tâm và dịch nổi được thu thập. Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2 μ m phần còn lại không qua màng lọc được cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng 25mM Tris-HCl bằng cách lọc tiếp tuyến MWCO 100kDa.

- CTAB được bổ sung để đạt nồng độ cuối cùng 1 - 2%; và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng không dưới 1 giờ.

- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và kết tủa được thu thập rồi được hòa tan trong etanol 30-64%. Hỗn hợp hòa tan tiếp tục được ly tâm để loại bỏ cặn không hòa tan.

- Bổ sung vào dịch nổi thu được bằng NaCl đến nồng độ cuối cùng 0,1 - 0,3 M. PS kết tủa được hòa tan trong NaCl 1M sau đó được kết tủa bằng cồn 30-64%.

- Dung dịch thu được từ bước trên được lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng với WFI bằng cách sử dụng bộ lọc tiếp tuyến 100 KDa và được cho đi qua màng lọc 0,2 μ m và được lưu trữ ở hoặc dưới -20°C dưới dạng sản phẩm cuối cùng.

Theo phương án thực hiện thứ mười bốn của sáng chế, phương pháp tinh chế như được đề cập trong phương án thực hiện thứ mười ba tạo ra:

- Polysacarit của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A với tỷ lệ thu hồi từ 60-80%, trong đó hàm lượng nội độc tố dưới 50 EU/mg, hàm lượng protein nhỏ hơn 0,50% và hàm lượng axit nucleic dưới 0,20%.

- Polysacarit của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh X với tỷ lệ thu hồi từ 60-80%, trong đó hàm lượng nội độc tố dưới 50 EU/mg, hàm lượng protein nhỏ hơn 0,50% và hàm lượng axit nucleic dưới 0,30%.

Theo phương án thực hiện thứ mười lăm của sáng chế, polysacarit tinh khiết được kết hợp với protein mang. Người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật hiểu rõ rằng protein mang được sử dụng để kết hợp với polysacarit có thể là protein mang bất kỳ được biết đến trong cùng lĩnh vực kỹ thuật. Các ví dụ không đặc hiệu của protein mang bao gồm protein mang được chọn từ nhóm, nhưng không giới hạn, gồm CRM 197, biến độc tố bạch hầu, biến độc tố uốn ván, biến độc tố ho gà, *E. coli* LT, *E. coli* ST, ngoại độc tố A từ *Pseudomonas aeruginosa*, phức hợp màng ngoài c (OMPC), protein lỗ, protein liên kết transferin, pneumolysin, protein bề mặt phế cầu A (PspA), protein bám dính phế cầu khuẩn (PsaA), protein bề mặt phế cầu khuẩn BVH-3 và BVH-11, kháng nguyên bảo vệ (PA) của *Bacillus anthracis*, yếu tố phù được giải độc (EF), yếu tố gây chết (LF) của *Bacillus anthracis*, albumin trứng, keyhole limpet hemocyanin (KLH), albumin huyết thanh người, albumin huyết thanh bò (BSA) và dẫn xuất protein tinh khiết của lao tố (tuberculin) (PPD).

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ mười lăm, trước khi kết hợp, polysacarit được tinh chế bằng phương pháp tức thời được xác định kích thước bằng phương

pháp hóa học hoặc cơ học bao gồm, nhưng không giới hạn, sóng âm, lò vi sóng, ozon hóa, bức xạ ion hóa, phá vỡ tế bào áp suất cao, thiết bị đồng nhất hóa, chất tạo vi lỏng, natri axetat, natri metaperiodat, gia nhiệt trong chân không, v.v...

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ mười lăm, polysacarit được tinh chế bằng phương pháp tức thời có thể được liên hợp với protein mang bằng cách sử dụng quá trình khử amin hóa, xyanyl hóa, hóa học liên hợp cacbodiimit.

Theo phương án thực hiện thứ mười sáu của sáng chế, chế phẩm miễn dịch đã được sản xuất. Chế phẩm bao gồm:

(a) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A và (ii) biến độc tố uốn ván;

(b) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C và (ii) CRM197;

(c) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh Y và (ii) CRM 197;

(d) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh W135 và (ii) CRM197; và

(e) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh X và (ii) biến độc tố uốn ván.

Theo phương án thực hiện thứ mười bảy của sáng chế, hàm lượng nội độc tố có thể được đo bằng “Kiểm nghiệm nội độc tố vi khuẩn bằng xét nghiệm đo độ đục động lực học (KTA)” hoặc kiểm nghiệm tỏa nhiệt ở thỏ; hàm lượng protein có thể được đo bằng phương pháp Lowry; và hàm lượng axit nucleic có thể được đo bằng phương pháp quang phổ. Cần hiểu rõ rằng phương pháp phù hợp bất kỳ khác có thể được sử dụng để định lượng nội độc tố, protein và hàm lượng axit nucleic.

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ mười bảy, phân phối kích thước phân tử của polysacarit tinh khiết của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A, C, W, Y và X có thể được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao rửa phân tử.

Theo khía cạnh khác của phương án thực hiện thứ mười sáu, hàm lượng O-axetyl có thể được đo bằng cách sử dụng xét nghiệm Hestrin so màu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất polysacarit vi khuẩn (phương pháp hậu xử lý vi khuẩn nấm mô cầu nhóm huyết thanh C)

Sử dụng phương pháp lên men được đề cập dưới đây, polysacarit đã được sản xuất.

Quy mô lên men: 300 lít

- Làm sạch tại chỗ (CIP), thử nghiệm giữ áp suất và khử trùng tại chỗ (SIP) thiết bị lên men được thực hiện.

- Sau khi hoàn thành SIP, môi trường lên men vô trùng được chuyển vô trùng sang thiết bị lên men.

- Thành phần môi trường

Môi trường lên men nhóm huyết thanh C

Bảng 3

Thành phần	Hàm lượng (g/l)
D - glucoza monohydrat	10
Natri Clorua	5,8
L-Arginin	1
L-Serin	1
Canxi Clorua	0,028
Sắt (II) Sulfat heptahydrat	0,01
Amoni Clorua	0,3
Di-kali Hydro Phosphat	4
Cao nấm men	5

Magie Clorua	0,4
Pepton đậu nành	3
Axit casamino	5
Natri L-glutamat Monohydrat	10
Amoni Sulfat	1,2
L-Xystin	0,3

Môi trường bổ sung dinh dưỡng nhóm huyết thanh C

Bảng 1

Thành phần	Hàm lượng (g/l)
D-glucoza monohydrat	200
Natri L-glutamat Monohydrat	150
Axit casamino	4
Amoni clorua	0,2

- Mức oxy hòa tan được điều chỉnh đến mức mong muốn.
- Môi trường lên men được cấy sinh vật nuôi cấy. Thiết bị lên men được vận hành theo chế độ bổ sung dinh dưỡng theo đợt 11 đến 14 giờ.
- Sau khi dịch nuôi cấy đạt OD mong muốn ở bước sóng 590 nm, quá trình nuôi cấy trong thiết bị lên men được bất hoạt bằng cách sử dụng formaldehit.
- Sau khi hoàn thành quá trình ủ, nhiệt độ được thiết lập ở $10 \pm 5^\circ\text{C}$ và tiếp đó tách tế bào bằng cách ly tâm.
- Dịch nổi được thu thập và trải qua quá trình lọc sâu; sản phẩm thu hoạch đã làm sạch được lọc bằng màng lọc $0,2 \mu\text{m}$ và được chuyển đến bước tinh chế.

Kết quả:

Bảng 5

Thông số	Men-C
Năng suất thu hoạch PS tổng số (mg/l)	703,33
Tạp chất nội độc tố (EU/mg PS)	>500
Tạp chất protein (%)	109
Tạp chất axit nucleic (%)	12,3

Ví dụ 2: Sản xuất polysacarit bao nhầy (phương pháp hậu xử lý vi khuẩn nấm mô cầu nhóm huyết thanh A, W, X và Y)

Sử dụng phương pháp được đề cập trong ví dụ 1, polysacarit bao nhầy vi khuẩn nấm mô cầu nhóm huyết thanh A, W, X và Y đã được sản xuất.

Môi trường lên men nhóm huyết thanh Y

Bảng 6

Thành phần	Hàm lượng (g/l)
D - glucoza monohydrat	10
Natri Clorua	5,8
Kali sulfat	1
L-Arginin	0,75
L-Serin	0,75
L-Xystein	0,4
Canxi Clorua	0,025
Sắt (II) Sulfat heptahydrat	0,01
Amoni Clorua	0,15
Di-kali Hydro Phosphat	4
Cao nấm men	3
Magie Clorua	0,3
Pepton đậu nành	3

Axit casamino	5
Thiamin hydroclorua	0,05
Natri L-glutamat Monohydrat	10
L-Tryptophan	0,2

Môi trường bổ sung dinh dưỡng nhóm huyết thanh Y

Bảng 7

Thành phần	Hàm lượng (g/l)
D-glucoza monohydrat	200
Natri L-glutamat Monohydrat	150
L-Arginin	1
L-Serin	1
Pepton đậu nành	10
Cao nấm men	16,6

Môi trường lên men nhóm huyết thanh W

Bảng 8

Thành phần	Hàm lượng (g/l)
D - glucoza monohydrat	10
Natri Clorua	5,8
Kali sulfat	1
L-Arginin	0,75
L-Serin	0,75
L-Xystein	0,4
Canxi Clorua	0,025
Sắt (II) Sulfat heptahydrat	0,01

Amoni Clorua	0,25
Di-kali Hydro Phosphat	4
Cao nấm men	3
Magie Clorua	0,3
Pepton đậu nành	3
Axit casamino	5
Thiamin hydroclorua	0,05
Natri L-glutamat Monohydrat	10

Môi trường bổ sung dinh dưỡng nhóm huyết thanh W

Bảng 9

Thành phần	Hàm lượng (g/l)
D-glucosa monohydrat	200
Natri L-glutamat Monohydrat	150
L-Arginin	4
L-Serin	4
Pepton đậu nành	4
Cao nấm men	4
Magie Clorua	1,6
Canxi Clorua	0,2
Amoni clorua	0,8

Kết quả:

Bảng 10

Thông số	Men-A	Men-X	Men-W	Men-Y
PS thô (mg/l)	2540	1024	733	1205

Nội độc tố (EU/ μ g PS)	>500	>500	>500	>500
Protein (%)	19,31	18,2	60,5	38
Axit nucleic (%)	1,2	1,16	12	3,3

Sản phẩm thu hoạch đã làm sạch thu được khi kiểm tra, hàm lượng PS (Polysacarit) 1-đạt được 6 gm/l. Sản phẩm thu hoạch sạch tiếp tục được tinh chế.

Ví dụ 3: Tinh chế các polysacarit bao nhầy (phương pháp hậu xử lý vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C) bằng SDS sau đó là kết tủa bằng rượu.

Polysacarit thô thu được theo ví dụ 1 được trộn với nồng độ SDS khác nhau. Etanol sau đó được bổ sung đến nồng độ cuối cùng thấp hơn khoảng 10% so với nồng độ mà polysacarit bắt đầu kết tủa. Dung dịch tiếp tục được lọc.

Nồng độ SDS được thử nghiệm:

0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% và 10%

Tất cả các nồng độ SDS đã đề cập ở trên cho thấy hiệu quả làm giảm tạp chất. Trên 4% SDS, không có sự khác biệt đáng kể về lượng tạp chất.

Hiệu quả giảm tạp chất tối ưu, nhất là protein, nhận được ở mức 1% SDS.

Polysacarit tinh khiết có tạp chất nội độc tố > 100 EU/ μ g polysacarit, trong khi giới hạn của WHO là <100 EU/ μ g polysacarit.

Ví dụ 4: Tinh chế polysacarit bao nhầy (phương pháp hậu xử lý vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C)

Phương pháp:

Hai nhóm thí nghiệm khác nhau đã được thực hiện, quy mô lên men 5 lít và 300 lít.

Sử dụng phương pháp tinh chế được đề cập dưới đây, polysacarit đã được tinh chế.

- Polysacarit thô thu được theo ví dụ 1, được lấy trong bình.
- Polysacarit thô được cô đặc gấp 3-6 lần bằng TFF sử dụng băng 100 kDa.

- Natri dodecyl sulfat được bổ sung vào sản phẩm thu hoạch bất hoạt đến nồng độ cuối cùng 1% và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;
- Natri hydroxit được thêm vào đến nồng độ cuối cùng 08 - 20mM và được điều chỉnh về pH 10,5 bằng cách khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ;
- Dung dịch thu được từ bước trên được trung hòa bằng cách thêm axit axetic.
- Bổ sung etanol vào dung dịch trung hòa đến nồng độ cuối cùng là 33% và hỗn hợp được ủ trong vài giờ đồng thời khuấy liên tục.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và thu được dịch nổi.
- Nồng độ etanol được tăng lên 40%.
- KCl 0,1M đã được bổ sung vào dịch nổi và dung dịch được ủ ở 2 - 8°C không dưới 3 giờ.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và dịch nổi được thu thập. Polysacarit được kết tủa bằng cách tăng nồng độ etanol cuối cùng lên 65%.
- Viên polysacarit được hòa tan trong NaCl 1M. Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2 và phần còn lại không qua màng lọc được lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng đệm Tris-HCl 25 mM bằng lọc tiếp tuyến 100 kDa, để thu được polysacarit tinh khiết (Giai đoạn I).
- Bổ sung CTAB đến nồng độ cuối cùng 2%; và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và kết tủa được thu thập rồi được hòa tan trong etanol 96%. Hỗn hợp hòa tan tiếp tục được ly tâm để loại bỏ cặn không hòa tan.
- Bổ sung NaCl vào dịch nổi thu được từ bước trên đến nồng độ cuối cùng là 0,2 M. PS kết tủa được hòa tan trong NaCl 1 M, sau đó kết tủa PS sử dụng cồn 65%.
- Dung dịch thu được từ bước trên được lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng bằng dung dịch NaCl 0,5 M, sau đó là WFI sử dụng lọc tiếp tuyến 100 kD và được lọc qua màng lọc 0,2 μ m và được lưu trữ ở -20°C dưới dạng sản phẩm cuối cùng.

Kết quả:

Bảng 11

<i>N. Meningitidis</i> Nhóm huyết thanh C	Polysacarit thu hoạch thô		Polysacarit tinh chế giai đoạn I		Polysacarit tinh chế giai đoạn II	
Quy mô lên men	5 L	300 L	5 L	300 L	5 L	300 L
Thể tích PS	1	50	0,65	30	0,6	18
Nồng độ PS (mg/ml)	3,87	4,22	3,83	5,62	3,08	7,33
PS tổng số (g)	3,87	211	2,48	168	1,84	131,94
Tạp chất protein (%)	93,79	109,4 ₇	0,6	0,52	0,25	0,13
Tạp chất axit nucleic (%)	7,49	12,32	0,02	0,3	0,02	0,08
Tạp chất nội độc tố (EU/ μ g PS)	NA	NA	<20	<30	<20	40
Bước thu hồi(%)	NA	NA	64,3	79,9	74,23	78,25
Rây phân tử bằng HPLC (kDa)	NA	NA	434	450	392	376
Giới hạn hàm lượng O-Axetyl: >1,5 mMol/gm	NA	NA	2,8	2,85	2,64	2,6
Tổng số thu hồi cuối cùng(%)	NA	NA	64,3	79,9	64	62,5

Ghi chú: NA = Không áp dụng được

Hai nhóm thí nghiệm khác nhau đã được thực hiện, quy mô lên men 5 lít và 300 lít.

Kết quả cho thấy rằng việc sử dụng kết hợp chất tẩy rửa anion và kiềm có tác dụng mạnh đối với việc làm giảm hàm lượng tạp chất. Mức độ tạp chất ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II thấp hơn giới hạn chỉ số kỹ thuật của WHO đối với polysacarit Men-C.

Ở quy mô 5 lít và 300 lít, Tạp chất Protein (%) = <1%; Tạp chất axit nucleic (%) = < 0,3%; Tạp chất nội độc tố (EU/μg của PS) = < 40 EU/μg PS.

Ở cả hai quy mô và ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II, hiệu suất thu hồi của polysacarit tinh khiết cao hơn 60% so với mẫu thô.

Ví dụ 5: Tinh chế các polysacarit bao nhầy (phương pháp hậu xử lý vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh W và Y)

Phương pháp:

Hai nhóm thí nghiệm khác nhau đã được thực hiện, quy lên men 5 lít và 300 lít.

Sử dụng phương pháp tinh chế được đề cập dưới đây, polysacarit đã được tinh chế.

- Polysacarit thô thu được theo ví dụ 2, được lấy trong bình.
- Polysacarit thô được cô đặc gấp 3-6 lần bằng TFF sử dụng băng 100 kDa.
- Natri dodecyl sulfat được bổ sung vào sản phẩm thu hoạch bất hoạt đến nồng độ cuối cùng 1% và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;
- Natri hydroxit được thêm vào đến nồng độ cuối cùng 08 - 20 mM và được điều chỉnh về pH 10,5 bằng cách khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ;
- Dung dịch thu được từ bước trên được trung hòa bằng cách thêm axit axetic.
- Bổ sung etanol vào dung dịch trung hòa đến nồng độ cuối cùng là 33% và hỗn hợp được ủ trong vài giờ đồng thời khuấy liên tục.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và thu được dịch nổi.
- KCl 0,1M đã được bổ sung vào dịch nổi và dung dịch được ủ ở 2 - 8°C trong 8 giờ.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và dịch nổi được thu thập.
- Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2 và phần còn lại không qua màng lọc được lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng đệm Tris-HCl 25 mM bằng lọc tiếp tuyến 100 kDa, để thu được polysacarit tinh khiết (Giai đoạn I).

- Bổ sung CTAB đến nồng độ cuối cùng 2%; và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và kết tủa được thu thập rồi được hòa tan trong etanol 96%. Hỗn hợp hòa tan tiếp tục được ly tâm để loại bỏ cặn không hòa tan.
- Bổ sung NaCl vào dịch nổi thu được từ bước trên đến nồng độ cuối cùng là 0,25 M. PS kết tủa được hòa tan trong NaCl 1 M, sau đó kết tủa PS sử dụng cồn 65%.
- Dung dịch thu được từ bước trên được lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng bằng WFI sử dụng lọc tiếp tuyến 100 kD và được lọc qua màng lọc 0,2 μm và được lưu trữ ở -20°C dưới dạng sản phẩm cuối cùng (Giai đoạn II).

Kết quả:

Bảng 12

<i>N. Meningitidis</i> Nhóm huyết thanh Y	Polysacarit thu hoạch thô		Polysacarit tinh chế giai đoạn I		Polysacarit tinh chế giai đoạn II	
Quy mô lên men	5 L	300 L	5 L	300 L	5 L	300 L
Thể tích PS	1,25	50	0,75	35	0,8	29,5
Nồng độ PS (mg/ml)	5,67	7,23	7,23	7,88	5,39	8,41
PS tổng số (g)	7,08	361,5	5,42	275,8	4,31	248
Tạp chất protein (%)	38,62	38,03	2,21	1,64	0,16	0,08
Tạp chất axit nucleic (%)	1,94	3,31	0,69	0,25	0,11	0,71
Tạp chất nội độc tố (EU/ μg PS)	NA	NA	50	56	44	45
Bước thu hồi (%)	NA	NA	76,50	76,29	79,52	89,95
Kích thước phân tử bằng HPLC (kDa)	NA	NA	660	620	608	543

Giới hạn hàm lượng O-Axetyl: >0,3 mMol/gm	NA	NA	0,85	0,8	0,79	0,75
Tổng số thu hồi cuối cùng(%)	NA	NA	76,50	76,29	60,83	68,62

Bảng 13

<i>N. Meningitidis</i> Nhóm huyết thanh W	Polysacarit thu hoạch thô		Polysacarit tinh chế giai đoạn I		Polysacarit tinh chế giai đoạn II	
Quy mô lên men	5 L	300 L	5 L	300 L	5 L	300 L
Thể tích PS	1	39	0,8	28,5	0,8	16,5
Nồng độ PS (mg/ml)	4,26	5,65	3,5	6,01	3,25	8,75
PS tổng số (G)	4,26	220	2,8	171	2,6	144
Tạp chất protein (%)	62,1	60,53	3,4	2,16	<0,21	<0,21
Tạp chất axit nucleic (%)	7,98	12	0,85	1,16	0,1	0,09
Tạp chất nội độc tố (EU/μg PS)	NA	NA	<30	<40	<20	<10
Bước thu hồi(%)	NA	NA	65	77	92	84,2
Kích thước phân tử bằng HPLC (kDa)	NA	NA	400	420	395	380
Giới hạn hàm lượng O-Axetyl: >0,3 mMol/gm	NA	NA	1,21	1,15	1,05	0,99
Tổng số thu hồi cuối cùng(%)	NA	NA	65	77	61	65,4

Hai nhóm thí nghiệm khác nhau đã được thực hiện, quy mô lên men 5 lít và 300 lít.

Kết quả so sánh cho thấy rằng mức tạp chất ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II thấp hơn giới hạn chỉ số kỹ thuật của WHO đối với polysacarit Men-Y và Men-W.

Kết quả cho thấy rằng việc sử dụng kết hợp chất tẩy rửa anion và kiềm có tác dụng mạnh đối với việc làm giảm hàm lượng tạp chất. Mức độ tạp chất ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II thấp hơn giới hạn chỉ số kỹ thuật của WHO đối với polysacarit Men-Y và Men-W.

Ở quy mô 5 lít và 300 lít, Tạp chất Protein (%) = <3,5%; Tạp chất axit nucleic (%) = < 1,5%; Tạp chất nội độc tố (EU/ μ g của PS) = < 60 EU/ μ g PS.

Ở cả hai quy mô và ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II, hiệu suất thu hồi của polysacarit tinh khiết cao hơn 60% so với mẫu thô.

Ví dụ 6: Tinh chế các polysacarit bao nhầy (phương pháp hậu xử lý vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A và X)

Phương pháp:

Hai nhóm thí nghiệm khác nhau đã được thực hiện, quy lên men 5 lít và 300 lít.

Sử dụng phương pháp tinh chế được đề cập dưới đây, polysacarit đã được tinh chế.

- Polysacarit thô thu được theo ví dụ 2, được lấy trong bình.
- Polysacarit thô được cô đặc gấp 3-6 lần bằng TFF sử dụng băng 100 kDa.
- Natri dodecyl sulfat được bổ sung vào sản phẩm thu hoạch bất hoạt đến nồng độ cuối cùng 1% và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ;
- Natri Axetat, EDTA và Natri Dodecyl Sulfat đã được bổ sung đến nồng độ cuối cùng lần lượt là 6%, 2 mM và 1%; khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ;
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và thu được dịch nổi.
- KCl 0,1M đã được bổ sung vào dịch nổi và dung dịch được ủ ở 2 - 8°C trong 3 giờ.
- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và dịch nổi được thu thập.

- Dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,2 và phần còn lại không qua màng lọc được lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng đệm Tris-HCl 25 mM bằng lọc tiếp tuyến 100 kDa, để thu được polysacarit tinh khiết (Giai đoạn I).

- Bổ sung CTAB đến nồng độ cuối cùng 2%; và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

- Dung dịch thu được từ bước trên được ly tâm và kết tủa được thu thập rồi được hòa tan trong etanol 96%. Hỗn hợp hòa tan tiếp tục được ly tâm để loại bỏ cặn không hòa tan.

- Bổ sung NaCl vào dịch nổi thu được từ bước trên đến nồng độ cuối cùng là 0,2 M. PS kết tủa được hòa tan trong NaCl 1 M, tiếp đó kết tủa bằng cồn 65%.

- Dung dịch thu được từ bước trên được lọc tuần hoàn có pha loãng mở rộng bằng WFI sử dụng lọc tiếp tuyến 100 kD và được lọc qua màng lọc 0,2 μ m rồi được lưu trữ ở -20°C dưới dạng sản phẩm cuối cùng (Giai đoạn II).

Kết quả:

Bảng 14

<i>N. Meningitidis</i> Nhóm huyết thanh A	Polysacarit thu hoạch thô	Polysacarit tinh chế giai đoạn I	Polysacarit tinh chế giai đoạn II
Quy mô lên men	300 L	300 L	300 L
Thể tích PS	50	45	30
Nồng độ PS (mg/ml)	11,44	6,63	9,75
PS tổng số (g)	572	298,35	292,5
Tạp chất protein (%)	19,31	2,05	0,14
Tạp chất axit nucleic (%)	1,22	0,12	0,05
Tạp chất nội độc tố (EU/ μ g PS)	NA	29,08	35

SDS dư (ppm)	NA	<5	<5
Bước thu hồi(%)	NA	52	98
Kích thước phân tử bằng HPLC (kDa)	NA	350	306
Giới hạn hàm lượng O-Axetyl: >2 mMol/gm	NA	2,69	2,65
Tổng số thu hồi cuối cùng(%)	NA	52	51

Bảng 15

<i>N. Meningitidis</i> Nhóm huyết thanh X	Polysacarit thu hoạch thô	Polysacarit tinh chế giai đoạn I	Polysacarit tinh chế giai đoạn II
Quy mô lên men	300 L	300 L	300 L
Thể tích PS	55	40	30
Nồng độ PS (mg/ml)	5,05	5,23	6,21
PS tổng số (g)	277,75	209,2	186,30
Tạp chất protein (%)	18,21	0,6	0,54
Tạp chất axit nucleic (%)	1,16	0,76	0,14
Tạp chất nội độc tố (EU/μg PS)	NA	30	13,79
SDS dư (ppm)	NA	<5	<5
Bước thu hồi(%)	NA	75,3	88,9
Kích thước phân tử bằng HPLC (kDa)	NA	485	479

Tổng số thu hồi cuối cùng (%)	NA	75,3	67,25
--------------------------------------	----	------	-------

Kết quả so sánh cho thấy rằng mức tạp chất ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II thấp hơn giới hạn chỉ số kỹ thuật của WHO đối với polysaccharit Men-A và Men-X.

Kết quả cho thấy rằng việc sử dụng kết hợp chất tẩy rửa anion và kiềm có tác dụng mạnh đối với việc làm giảm hàm lượng tạp chất. Mức độ tạp chất ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II thấp hơn giới hạn chỉ số kỹ thuật của WHO đối với polysaccharit Men-A và Men-X.

Ở quy mô 5 lít và 300 lít, Tạp chất Protein (%) = <2,5%; Tạp chất axit nucleic (%) = < 1%; Tạp chất nội độc tố (EU/ μ g của PS) = < 40 EU/ μ g PS.

Ở cả hai quy mô và ở giai đoạn tinh chế I và giai đoạn tinh chế II, hiệu suất thu hồi của polysaccharit nhóm huyết thanh X tinh khiết cao hơn 60% so với mẫu thô, và polysaccharit nhóm huyết thanh A tinh khiết cao hơn 50% so với mẫu thô.

Ví dụ 7: Tính toán vện cấu trúc của polysaccharit (PS) được phân tách

Tham khảo Fig.1-5, là các phổ NMR.

Tính toán vện cấu trúc của các polysaccharit được phân tách của vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A, C, W, Y và X đã được xác minh bằng Cộng hưởng từ hạt nhân.

Phổ NMR được ghi lại có thể so sánh và xác nhận danh tính của chúng là một phần polysaccharit vi khuẩn não mô cầu hóa nhóm huyết thanh A, C, W, và Y được O-axetyl ; và polysaccharit nhóm huyết thanh X được N-axetyl hóa

Ví dụ 8: Phân tích so sánh phương pháp tinh chế dựa trên Natri Deoxycholat (DOC) và phương pháp tinh chế polysaccharit theo sáng chế

Phương pháp dựa trên Natri Deoxycholat (DOC) “Phương pháp cải tiến phương pháp tinh chế polysaccharit não mô cầu Tanizaki và cộng sự (Conjugate and Polysaccharide Vaccines, Poster 79, <http://neisseria.org/ipnc/1996/Neis1996-chap4.pdf>)” được tối ưu hóa như sau:

Sản phẩm thu hoạch 100 kD; xử lý bằng DOC + EDTA + NaOAc + (40%); Ly tâm, thu dịch nổi và lọc qua màng 0,2 μ m; cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng; xử lý bằng CTAB

(3%) ở nhiệt độ phòng; Ly tâm và thu thập viên CTAB-PS; Hòa tan viên CTAB-PS trong etanol 96% và kết tủa bằng NaCl 0,1 M; Hòa tan kết tủa trong etanol 40% và thêm NaCl 1 M (2-8°C); Ly tâm và thu thập dịch nổi; Lọc cacbon; Kết tủa PS bằng cách tăng nồng độ etanol; Hòa tan viên PS trong WFI rồi cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng với WFI và bảo quản ở -20°C sau khi lọc qua màng 0,2 µm.

Phương pháp dựa trên DOC đang được sử dụng rộng rãi trong toàn ngành để tinh chế các polysacarit được sử dụng làm kháng nguyên vaccin.

Hàm lượng tạp chất của polysacarit thu được bằng phương pháp dựa trên DOC được so sánh với phương pháp theo sáng chế.

Kết quả:

Bảng 16

		% Thu hồi cuối cùng	% protein	% Axit nucleic	Nội độc tố (EU/µg PS)
Men-A	DOC	65	<0,3	<0,2	<20
	SDS	64	<0,3	<0,2	<20
Men-C	DOC	65	<0,3	<0,2	<20
	SDS	62,00	<0,3	<0,2	<20
Men-W	DOC	60	<0,5	<0,5	<30
	SDS	70	<0,5	<0,5	<30
Men-Y	DOC	60	<0,5	<0,5	<30
	SDS	70	<0,5	<0,5	<30
Men-X	DOC	65	<0,3	<0,2	<20
	SDS	70	<0,3	<0,2	<20

Phương pháp theo sáng chế dựa trên SDS và phương pháp dựa trên DOC cho thấy kết quả tương tự đối với nhóm huyết thanh A và C, trong khi đối với phương pháp SDS của nhóm

huyết thanh W, Y và X cho thấy tỷ lệ thu hồi cuối cùng được cải thiện so với phương pháp DOC.

Kết quả cho thấy rằng, phương pháp SDS cải tiến có những lợi thế rõ ràng về cả hai mặt, dễ vận hành cũng như một số lợi thế khác, cụ thể như DOC là thành phần có nguồn gốc động vật và không tuân thủ HALAL. DOC được sản xuất và cung cấp bởi một nhà cung cấp duy nhất trên toàn thế giới, trong khi SDS là chất tẩy rửa tổng hợp, được chứng nhận HALAL và với nhiều nhà cung cấp có sẵn trên toàn cầu. DOC phá vỡ các nội độc tố mà không ảnh hưởng đến thành phần hóa học và một khi chất tẩy rửa được loại bỏ, nội độc tố có thể lấy lại hoạt tính sinh học của nó, trong khi SDS nhờ vào tính chất lưỡng tính, biến tính kết tụ cao hơn, hòa tan protein tốt hơn cũng như phá vỡ các nội độc tố không thể đảo ngược thành các đơn phân của nó.

Ưu điểm khác của phương pháp sử dụng SDS là giảm tiêu thụ hóa chất và vật tư tiêu hao (etanol, màng siêu lọc, màng lọc cacbon, v.v...). Ngoài ra, sử dụng SDS làm chất thay thế không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn cấu trúc của các polysaccharit.

Ví dụ 9: Chế phẩm miễn dịch được trình bày dưới đây đã được sản xuất và thử nghiệm khả năng gây miễn dịch.

Chế phẩm bao gồm:

(a) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A và (ii) biến độc tố uốn ván;

(b) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C và (ii) CRM197;

(c) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh Y và (ii) CRM 197;

(d) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh W135 và (ii) CRM197; và

(e) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh X và (ii) biến độc tố uốn ván.

Kết quả:

Kết quả cho thấy rằng chế phẩm miễn dịch đã có tác dụng gây miễn dịch.

Phương pháp theo sáng chế có tác dụng làm giảm đáng kể tạp chất nội độc tố, protein và axit nucleic, phương pháp có hiệu quả thu hồi cao hơn đối với polysacarit bao nhầy với mức O-axetyl mong muốn. Kết quả cho thấy rằng phương pháp theo sáng chế có lợi thế rõ ràng về mặt dễ vận hành cũng như một số lợi thế khác, cụ thể là:

- Vấn đề quy định: DOC là thành phần có nguồn gốc động vật và không tuân thủ HALAL. Nó được sản xuất và cung cấp bởi một nhà cung cấp duy nhất trên toàn thế giới, trong khi SDS là chất tẩy rửa tổng hợp, được chứng nhận HALAL và với một số nhà cung cấp có sẵn trên toàn cầu.

- Vấn đề về chức năng: DOC phá vỡ nội độc tố mà không ảnh hưởng đến thành phần hóa học và một khi chất tẩy rửa được loại bỏ, nội độc tố có thể lấy lại hoạt tính sinh học của, trong khi SDS nhờ vào tính chất lưỡng tính, biến tính kết tụ cao hơn, hòa tan protein tốt hơn cũng như phá vỡ các nội độc tố không thể đảo ngược thành các đơn phân của nó.

- Phương pháp sử dụng SDS làm giảm tiêu thụ hóa chất và vật tư tiêu hao (etanol, màng siêu lọc, màng lọc cacbon, v.v...), là lợi thế khác biệt.

- Phương pháp theo sáng chế làm giảm đáng kể các tạp chất tế bào khác. Hơn nữa, phương pháp giúp loại bỏ hiệu quả các chất phản ứng được sử dụng trong quá trình tiền xử lý và hậu xử lý.

- Ngoài ra, phương pháp theo sáng chế không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn cấu trúc của polysacarit, do đó duy trì khả năng miễn dịch gây của nó.

Thông qua phần mô tả chi tiết các phương án thực hiện, các nguyên tắc của sáng chế đã được làm rõ, cần lưu ý rằng các phương án thực hiện được mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân tách polysacarit từ vi khuẩn não mô cầu (*Neisseria Meningitidis*) có tuýp huyết thanh được lựa chọn từ nhóm bao gồm tuýp huyết thanh C, tuýp huyết thanh W và tuýp huyết thanh Y, bao gồm các bước sau:

- a) bổ sung chất tẩy rửa chứa natri dodecyl sulfat (SDS) vào dung dịch polysacarit thô;
- b) bổ sung natri hydroxit (NaOH) vào dung dịch;
- c) trung hòa pH của dung dịch;
- d) cho dung dịch vào xử lý kết tủa bằng rượu, tiếp đó ly tâm và thu dịch nổi;
- e) loại bỏ chất tẩy rửa có trong dịch nổi;
- f) cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng polysacarit;

trong đó, polysacarit tinh khiết thu được với hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng từ 60-80%.

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

- g) trộn dung dịch polysacarit với chất tẩy rửa cation;
- h) cho dung dịch vào ly tâm và thu tủa; và
- i) hòa tan tủa trong rượu, tiếp đó kết tủa polysacarit bằng muối.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó

polysacarit tinh khiết thu được từ vi khuẩn não mô cầu tuýp huyết thanh C có O-axetyl hóa ở mức $> 1,5 \text{ mMol/ g}$, tạp chất protein $< 1\%$, tạp chất axit nucleic $< 1\%$ và tạp chất nội độc tố $< 50 \text{ EU/ } \mu\text{g}$;

polysacarit tinh khiết thu được từ vi khuẩn não mô cầu tuýp huyết thanh Y có O-axetyl hóa ở mức $> 0,3 \text{ mMol/ g}$, tạp chất protein $< 5\%$, tạp chất axit nucleic $< 2\%$ và tạp chất nội độc tố $< 60 \text{ EU/ } \mu\text{g}$; và

polysacarit tinh khiết thu được từ vi khuẩn não mô cầu tuýp huyết thanh W có O-axetyl hóa ở mức $> 0,3 \text{ mMol/ g}$, tạp chất protein $< 5\%$, tạp chất axit nucleic $< 2\%$ và tạp chất nội độc tố $< 50 \text{ EU/ } \mu\text{g}$.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ cuối của chất tẩy rửa SDS nằm trong khoảng từ 0,1% đến 4%, tốt hơn nữa là 1%.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ cuối cùng của natri hydroxit (NaOH) trong dung dịch nằm trong khoảng từ 5-50 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5-20 mM, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 8-15 mM.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó độ pH của dung dịch sau khi bổ sung natri hydroxit (NaOH) nằm trong khoảng từ pH 9-11, tốt nhất là pH 10,5.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch được trung hòa (độ pH là 7,0) bằng cách bổ sung axit hữu cơ yếu.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó axit hữu cơ yếu là loại được chọn từ nhóm bao gồm axit formic, axit axetic, axit propionic, và axit oxalic, tốt nhất là axit axetic.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước loại bỏ chất tẩy rửa được thực hiện bằng cách sử dụng ít nhất một trong các phương pháp xử lý bằng muối kali, lọc gel, xử lý bằng etanol, và nhựa trao đổi ion/cột Amberlite.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước loại bỏ chất tẩy rửa được thực hiện bằng cách kết tủa chất tẩy rửa sử dụng muối kali.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó muối kali được chọn từ nhóm bao gồm kali clorua, kali axetat, kali sulfat, kali cacbonat, kali bicacbonat, kali phosphat, kali hydro phosphat, kali dihydrogen phosphat, kali nitrat và các muối kali khác hoặc hỗn hợp của chúng.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó muối kali là kali clorua.
13. Phương pháp theo điểm 10, trong đó nồng độ cuối của muối kali trong dung dịch là 100 mM.
14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polysacarit là polyme của các gốc axit sialic.
15. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chất tẩy rửa cation được chọn từ nhóm bao gồm muối xetyltrimetylmoni, muối tetrabutylmoni, muối myristyltrimetylmoni, và hexadimethrin bromua; hoặc hỗn hợp của chúng.

16. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chất tẩy rửa cation là xetyltrimetylamoni bromua (CTAB).
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó nồng độ của chất tẩy rửa cation nằm trong khoảng từ 1% đến 2%.
18. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó rượu là rượu ưa nước.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó rượu ưa nước được chọn từ nhóm bao gồm metanol, etanol, rượu n-propyl, rượu isopropyl, axeton và rượu t-butyl; hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều loại trong số chúng.
20. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó rượu là etanol.
21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng polysacarit được thực hiện bằng cách lọc tiếp tuyến, với màng MWCO 100 kDa.
22. Phương pháp theo điểm 2, trong đó muối được sử dụng để kết tủa được chọn từ nhóm bao gồm natri clorua, amoni clorua, kali clorua, hoặc hỗn hợp của chúng.
23. Phương pháp theo điểm 2, trong đó muối được sử dụng để kết tủa là natri clorua.
24. Phương pháp theo điểm 2, trong đó nồng độ muối trong khoảng 0,25 M đến 2M.
25. Phương pháp phân tách polysacarit từ vi khuẩn não mô cầu (*Neisseria Meningitidis*) có tuýp huyết thanh được lựa chọn từ nhóm bao gồm tuýp huyết thanh A và tuýp huyết thanh X, bao gồm các bước sau:
- a) bổ sung chất tẩy rửa chứa natri dodecyl sulfat (SDS) vào dung dịch polysacarit thô;
 - b) bổ sung EDTA và natri axetat vào dung dịch;
 - c) đưa dung dịch vào kết tủa bằng rượu, tiếp đó ly tâm và thu dịch nổi;
 - d) loại bỏ chất tẩy rửa có trong dịch nổi; và
 - e) cô đặc và lọc tuần hoàn có pha loãng polysacarit;

trong đó, polysacarit tinh khiết thu được với hiệu suất thu hồi nằm trong khoảng từ 60-80%.

26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó phương pháp còn bao gồm các bước sau:

- g) trộn dung dịch polysacarit vi khuẩn với chất tẩy rửa cation;
- h) cho dung dịch vào ly tâm và thu hạt tủa; và
- i) hòa tan hạt tủa trong rượu, tiếp đó kết tủa polysacarit bằng muối.

27. Phương pháp theo điểm 26, trong đó:

polysacarit tinh khiết thu được từ vi khuẩn não mô cầu tuýp huyết thanh A có O-axetyl hóa ở mức > 2 mMol/ g, tạp chất protein $< 3\%$, tạp chất axit nucleic $< 1\%$ và tạp chất nội độc tố < 50 EU/ μg ;

polysacarit tinh khiết thu được từ vi khuẩn não mô cầu tuýp huyết thanh X có tạp chất protein $< 1\%$, tạp chất axit nucleic $< 1\%$ và tạp chất nội độc tố < 50 EU/ μg .

28. Phương pháp theo điểm 25, trong đó nồng độ cuối cùng của natri dodexyl sulfat (SDS) trong khoảng 0,1% đến 4%, tốt hơn nữa là 1%.

29. Phương pháp theo điểm 25, trong đó bước loại bỏ natri dodexyl sulfat được thực hiện bằng cách sử dụng ít nhất một trong các phương pháp xử lý bằng muối kali, lọc gel, xử lý bằng etanol, và nhựa trao đổi ion/cột Amberlite.

30. Phương pháp theo điểm 25, trong đó bước loại bỏ chất tẩy rửa được thực hiện bằng cách kết tủa chất tẩy rửa sử dụng muối kali.

31. Phương pháp theo điểm 25, trong đó nồng độ cuối cùng của muối kali trong dung dịch là 100mM.

32. Phương pháp theo điểm 30, trong đó muối kali được chọn từ nhóm bao gồm kali clorua, kali axetat, kali sulfat, kali cacbonat, kali bicacbonat, kali phosphat, kali hydro phosphat, kali dihydrogen phosphat, kali nitrat và các muối kali khác hoặc hỗn hợp của chúng.

33. Phương pháp theo điểm 26, trong đó chất tẩy rửa cation được chọn từ nhóm bao gồm muối xetyltrimetylamoni, muối tetrabutylamoni, muối myristyltrimetylamoni, và hexadimethrin bromua; hoặc hỗn hợp của chúng.

34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó chất tẩy rửa cation là xetyltrimetylamoni bromua (CTAB).

35. Phương pháp theo điểm 34, trong đó nồng độ cuối cùng của chất tẩy rửa cation trong khoảng 0,5 đến 3,0%, tốt nhất là 1%.

36. Chế phẩm miễn dịch chứa ít nhất một trong số:

a) liên hợp của (i) polysacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh A và (ii) vacxin uốn ván;

b) liên hợp của (i) polysacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh C và (ii) CRM197;

c) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh Y và (ii) CRM197;

d) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh W135 và (ii) CRM197; và

e) liên hợp của (i) sacarit bao nhầy vi khuẩn não mô cầu nhóm huyết thanh X và (ii) vacxin uốn ván;

trong đó chế phẩm bao gồm:

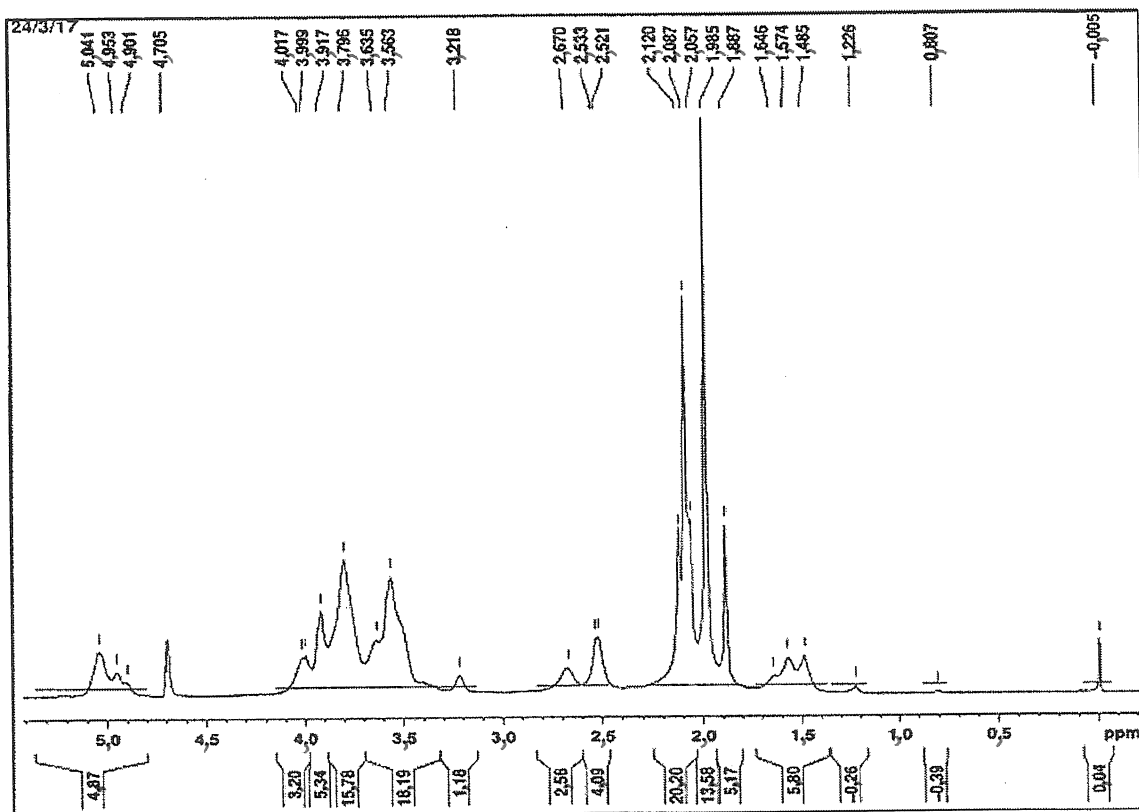
ít nhất một liên hợp protein-polysacarit;

sucroza ở nồng độ 3% w/v; và

natri xitrat ở nồng độ 0,5% w/v;

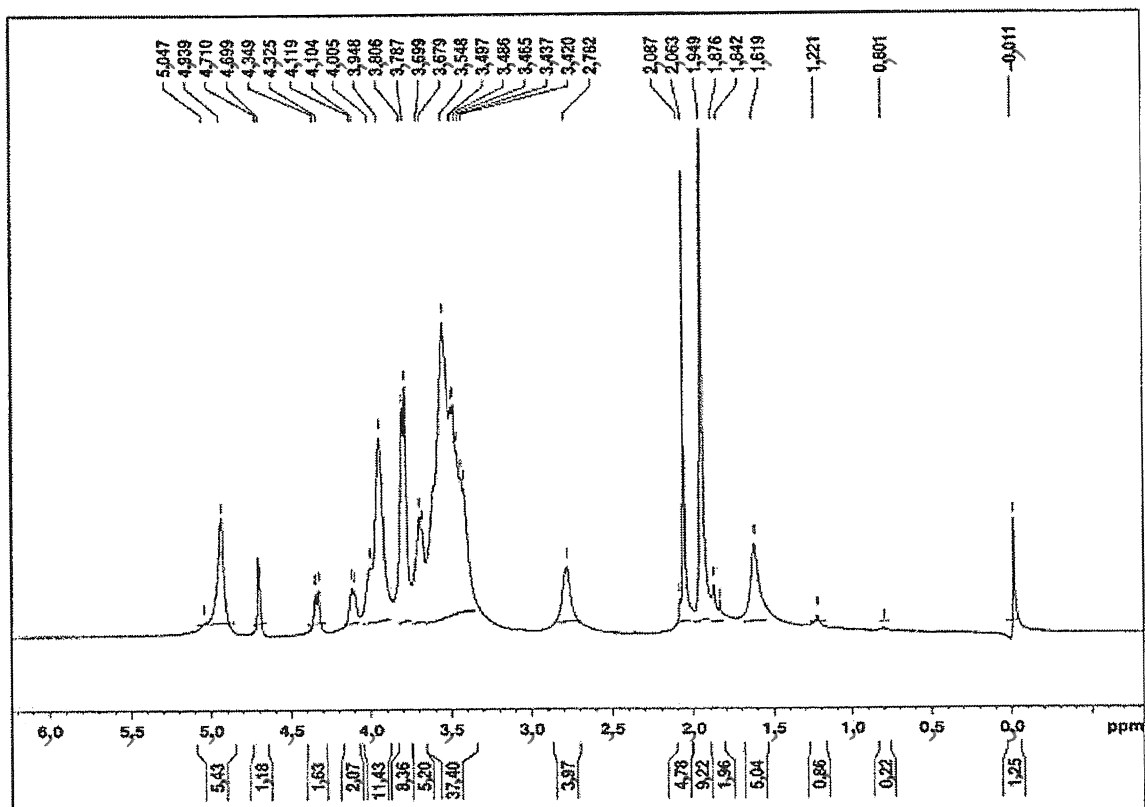
trong đó polysacarit được phân tách bởi phương pháp theo một trong các điểm nêu trên.

Fig.1



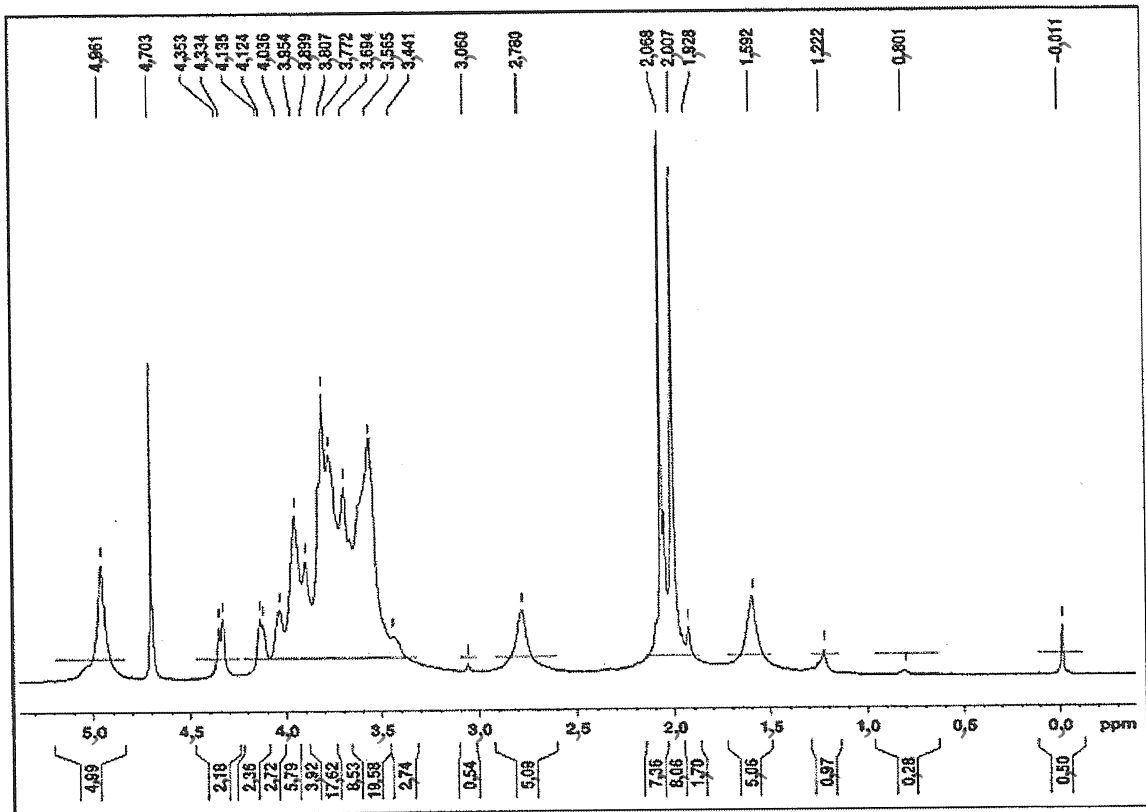
Phổ NMR của polysaccharit Men-C

Fig.2



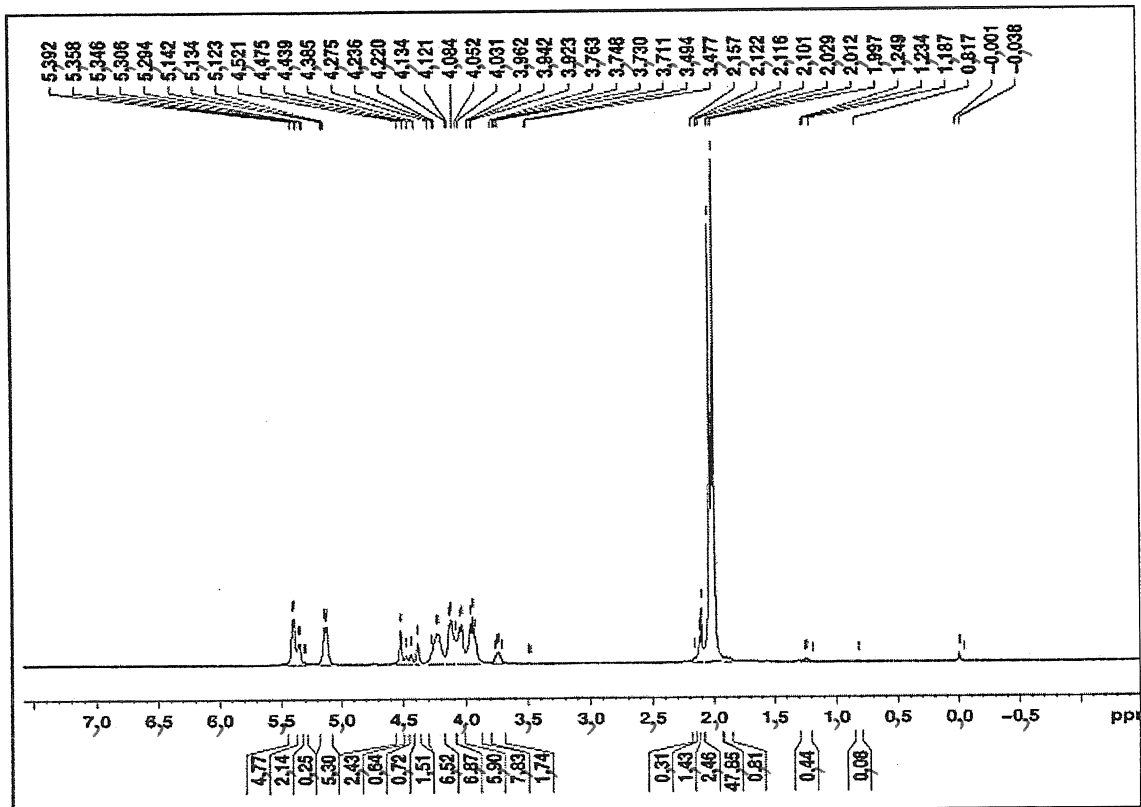
Phổ NMR của polysaccharit Men-Y

Fig.3



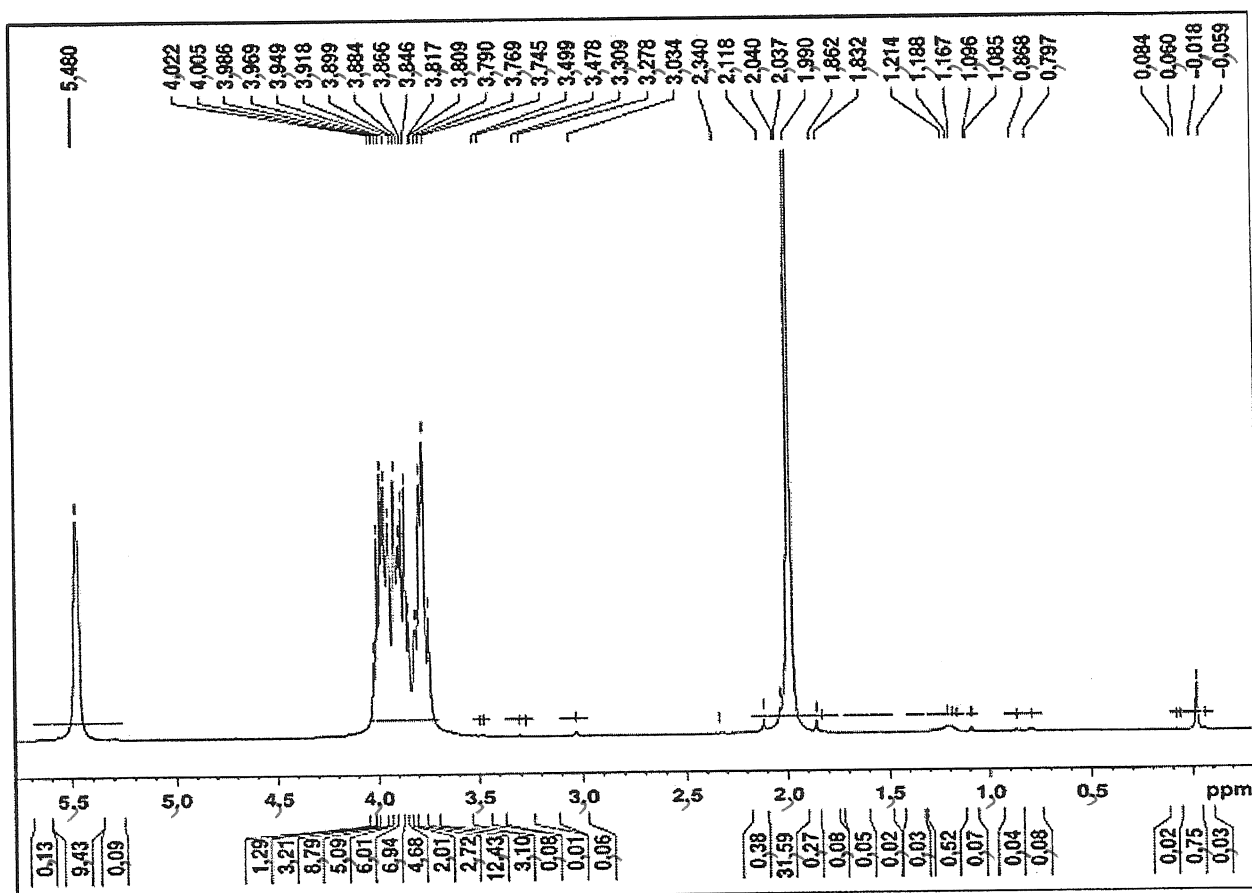
Phổ NMR của polysacarit Men-W

Fig.4



Phổ NMR của polysacarit Men-A

Fig.5



Phổ NMR của polysacarit Men-X