



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

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

(11)



1-0044313

(51)^{2020.01} C12N 7/02; A61K 35/76

(13) B

(21) 1-2021-03002

(22) 19/12/2019

(86) PCT/KR2019/018101 19/12/2019

(87) WO2020/130672 25/06/2020

(30) 10-2018-0166428 20/12/2018 KR

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/10/2021 403A

(71) HK INNO.N CORPORATION (KR)

6F, 7F, 8F, 100, Eulji-ro, Jung-gu, Seoul 04551, Republic of Korea

(72) YU, Jaelim (KR); CHAE, Jina (KR); JUNG, Eun Ju (KR); LEE, Dong Eok (KR).

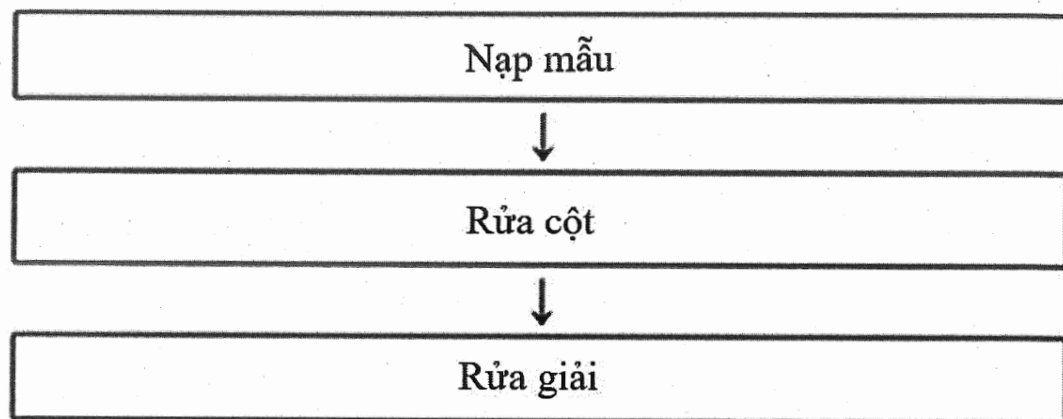
(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PHƯƠNG PHÁP TÍNH SẠCH VIRUT VACXIN SỬ DỤNG SẮC KÝ ÁI LỰC

(21) 1-2021-03002

(57) Sáng chế đề cập đến các phương pháp phân lập và tinh sạch virus vaccine sử dụng sắc ký ái lực, và cụ thể là, với phương pháp tinh sạch virus có khả năng thu được virus vaccine có độ tinh khiết cao và hiệu suất cao sử dụng sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực virus vaccine.

Fig.1



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phương pháp phân lập và tinh sạch virus vaccine sử dụng sắc ký ái lực, và cụ thể là, các phương pháp phân lập và tinh sạch virus có khả năng thu được virus vaccine có độ tinh khiết cao và hiệu suất cao sử dụng sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực với virus.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong nuôi cấy virus vaccine sử dụng các tế bào có nguồn gốc từ các loài khác ngoài con người làm các tế bào chủ, cần thiết phải loại bỏ các vật chất có nguồn gốc từ tế bào chủ. Trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan để loại bỏ các vật chất có nguồn gốc từ tế bào chủ đã sử dụng các phương pháp ly tâm gradien mật độ đường, sắc ký phân tách theo kích thước, hoặc sắc ký trao đổi ion. Do các phương pháp thông thường được sử dụng trong tinh sạch virus, các phương pháp này được sử dụng nhiều hơn phương pháp sắc ký ái lực bởi vì các phương pháp này dễ dàng áp dụng với bất kỳ loại virus nào.

Phương pháp ly tâm gradien mật độ đường là phương pháp tinh sạch các virus sử dụng sự chênh lệch mật độ được thực hiện bằng cách sử dụng đường, và là phương pháp truyền thống và lâu đời nhất, là phương pháp trong đó được sử dụng nhiều nhất trong giai đoạn đầu của các nghiên cứu, do không yêu cầu các nghiên cứu quá trình riêng biệt. Để ứng dụng phương pháp trong giai đoạn sản xuất công nghiệp, cần yêu cầu bổ sung các thiết bị đắt tiền, và quá trình như quá trình thẩm tích hoặc sắc ký phân tách theo kích thước để loại bỏ đường cần bổ sung, và do đó có nhược điểm là kéo dài tổng thời gian quá trình. Phương pháp cũng được báo cáo trong nghiên cứu rằng độ nhớt và áp suất thẩm thấu cao của đường tác động đến các protein lây nhiễm của virus làm giảm hiệu suất virus tổng thể của quá trình (Peng HH *et al.* (2006) *Anal Biochem*, 354(1):140–147).

Phương pháp sắc ký phân tách theo kích thước là phương pháp không bị ảnh hưởng do sự thay đổi protein hoặc áp suất thẩm thấu, và trong kỹ thuật trước đây (patent Trung Quốc số CN101695570B, CN101780278B), đã bộc lộ vaccine bị bất hoạt của bệnh tay-chân-miệng đã được điều chế sử dụng phương pháp sắc ký phân tách theo kích thước. Tuy nhiên, trong phương pháp sắc ký phân tách theo kích thước, do quá trình cô đặc quá mức liên quan như quá trình tiền xử lý, có nhược điểm ở chỗ cấu trúc virus bị phá vỡ do

quá trình cô đặc, hoặc hiệu suất bị giảm do bổ sung của quá trình. Ngoài ra, trong phương pháp sắc ký phân tách theo kích thước, do giới hạn trong việc mở rộng quy mô, việc áp dụng phương pháp này tương đối dễ dàng trong các giai đoạn nghiên cứu, nhưng có hạn chế trong việc áp dụng trong quy mô sản xuất hàng loạt trong công nghiệp.

Các nghiên cứu được tiến hành sử dụng sắc ký trao đổi ion có thể được sử dụng với thể tích mẫu virus bất kỳ (patent Trung Quốc số CN101695570B, Ashok Raj Kattur Venkatachalam *et al.* (2014) *Virology Journal*, 11:99). Hầu hết các nghiên cứu được tiến hành bằng phương pháp hấp phụ virus với nhựa mang điện tích, như diethylaminoethyl: DEAE, và sau đó rửa giải virus đã hấp phụ với dung dịch đệm có nồng độ muối cao. Tuy nhiên, để sử dụng sắc ký trao đổi ion, cần yêu cầu quá trình thẩm tích để hạ thấp nồng độ muối của mẫu, và có nhược điểm ở chỗ làm giảm hiệu suất do bổ sung của quá trình. Ngoài ra, do virus ngoài protein đơn còn chứa các loại protein khác nhau, virus có các điện tích khác, và do đó cần yêu cầu nghiên cứu quá trình để duy trì điều kiện rửa giải virus. Ngoài ra, phương pháp còn có nhược điểm ở chỗ tạp chất có các điện tích giống với virus có thể được rửa giải cùng chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Xuất phát từ các hạn chế còn tồn tại nêu trên trong kỹ thuật hiện có, các tác giả sáng chế đã nỗ lực tìm kiếm phương pháp để tinh sạch virus vaccine có độ tinh khiết cao và hiệu suất cao, và kết quả là, họ đã phát hiện ra phương pháp tinh sạch có khả năng thu được virus vaccine có độ tinh khiết cao và hiệu suất cao khi sử dụng sắc ký ái lực, từ đó hoàn thành sáng chế.

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tinh sạch virus vaccine bao gồm: (a) nạp mẫu có chứa virus vaccine lên cột sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực với virus; (b) rửa cột sắc ký ái lực với dung dịch rửa; và (c) thu hồi virus vaccine mong muốn từ cột sắc ký ái lực sử dụng dung dịch rửa giải.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất virus vaccine đã tinh sạch theo phương pháp tinh sạch.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo phương pháp tinh sạch của sáng chế, trong khi hầu hết tạp chất khác ngoài virus vaccine mong muốn được loại bỏ, virus vaccine có thể được tinh sạch có độ tinh

khuyết cao và hiệu suất cao phù hợp để sản xuất hàng loạt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ minh họa quy trình thực hiện phương pháp tinh sạch theo sáng chế;

Fig.2 và Fig.3 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa Capto™ DeVirS chứa dextran sulfat;

Fig.4 và Fig.5 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa HiTrap Heparin chứa heparin;

Fig.6 và Fig.7 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa Fractogel DEAE;

Fig.8 và Fig.9 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa Fractogel TMAE; và

Fig.10 và Fig.11 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa CIM DEAE.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết.

Tuy nhiên, mỗi phần mô tả và phương án được bộ lộ trong sáng chế cũng có thể được ứng dụng với mỗi phần mô tả và phương án khác. Tức là, tất cả sự kết hợp của các thành phần khác được bộ lộ trong sáng chế thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi phần mô tả chi tiết dưới đây.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận ra hoặc xác định các phương án tương đương với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả trong sáng chế bằng cách chỉ sử dụng thử nghiệm thông thường. Ngoài ra, các phương án tương đương này được bao gồm trong sáng chế.

Fig.1 là sơ đồ thể hiện ví dụ của quy trình thực hiện phương pháp tinh sạch của sáng chế.

Tham chiếu trên Fig.1, sáng chế đề xuất phương pháp tinh sạch virus vaccin bao gồm: (a) nạp mẫu chứa virus vaccin lên cột sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực với virus; (b) rửa cột sắc ký ái lực với dung dịch rửa; và (c) thu hồi virus vaccin mong muốn từ cột sắc ký ái lực sử dụng dung dịch rửa giải.

Mỗi bước của phương pháp tinh sạch virus vaccine sẽ được mô tả chi tiết như sau. Đầu tiên, bước (a) là bước nạp mẫu chứa virus vaccine lên cột sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực với virus.

Chỉ cần mẫu có chứa virus vaccine chứa virus vaccine thì không bị hạn chế về vật liệu và các phương pháp sản xuất. Cụ thể là, mẫu có chứa virus vaccine có thể bao gồm virus đường ruột, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây. Mẫu có thể được điều chế từ các tế bào chủ khác ngoài tế bào nguồn gốc con người, nhưng sáng chế không bị giới hạn tại đây.

“Sắc ký ái lực” được sử dụng trong sáng chế là phương pháp sắc ký sử dụng vật liệu liên kết với protein đặc hiệu có ái lực. Vật liệu liên kết với protein đặc hiệu có ái lực là vật liệu trong đó nhóm chức được tiếp hợp với vật liệu polymeric, và liên kết với vật liệu có ái lực được hòa tan trong dung dịch phân cực hoặc không phân cực.

Để đạt được mục đích của sáng chế, sắc ký ái lực có thể là sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực với virus vaccine. Cụ thể là, sắc ký có thể được thực hiện sử dụng nhựa có khả năng liên kết đặc hiệu với protein virus vaccine. Ví dụ, nhựa ái lực virus vaccine có thể bao gồm ít nhất một nhóm được lựa chọn từ nhóm bao gồm dextran sulfat, heparin, và hỗn hợp của chúng. Ví dụ, nhựa ái lực với virus vaccine bao gồm Capto™ DeVirS (GE Healthcare) và HiTrap Heparin (GE Healthcare), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các nhựa này, và bất kỳ nhựa có khả năng liên kết đặc hiệu với protein virus vaccine có thể được thực hiện.

Ví dụ, nhựa Capto™ DeVirS có chứa dextran sulfat, nhựa HiTrap Heparin có chứa heparin, và các nhựa có liên kết đặc hiệu với protein virus vaccine.

Theo một phương án, trước khi nạp mẫu có chứa virus vaccine trong bước (a), cột có thể được cân bằng với dung dịch cân bằng có độ pH trong khoảng từ 7,5 đến 8,0. Cụ thể là, dung dịch cân bằng có thể bao gồm ít nhất một muối được lựa chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, natri clorua, Tris-HCl, 2-(N-morpholino)etansulfonic axit (MES), 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), PIPES, kali phosphat, kali clorua, và 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các dung dịch này.

Theo một phương án, phương pháp có thể còn bao gồm bước sắc ký trao đổi ion, cô đặc, và/hoặc thẩm tích trước bước (a). Bước này có tác dụng làm tăng độ tinh khiết

của mẫu bằng cách loại bỏ các tạp chất trong mẫu có chứa virus vaccin. Cụ thể là, trước bước (a), mẫu chứa virus vaccin được cô đặc và thẩm tích, và sau khi thực hiện trước quá trình tinh sạch bởi sắc ký trao đổi ion, mẫu chứa virus vaccin có thể được nạp lên cột sắc ký ái lực sử dụng nhựa ái lực. Bất kỳ thao tác nào để loại bỏ các tạp chất sơ cấp mà không liên kết với nhựa ái lực và tăng cường độ tinh khiết của mẫu có thể được áp dụng không hạn chế.

Theo một phương án, phương pháp tinh sạch virus vaccin sử dụng sắc ký ái lực có thể khác biệt ở chỗ quá trình cô đặc hoặc thẩm tích riêng rẽ không được thực hiện trước khi quá trình sắc ký ái lực. Trong trường hợp này, có thể thu được kết quả với hiệu suất cao và độ tinh khiết cao với quy trình đơn giản.

Theo phương pháp tinh sạch virus vaccin, bước (b) là bước sử dụng dung dịch rửa với cột sắc ký trên đó đã được nạp mẫu, là bước rửa mẫu với dung dịch rửa.

Dung dịch rửa có độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0. Cụ thể là, dung dịch rửa có thể chứa ít nhất một muối được lựa chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, natri clorua, Tris, 2-(N-morpholino)etansulfonic axit (MES), 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), PIPES, kali phosphat, kali clorua, và 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các dung dịch này.

Để đạt được mục đích của sáng chế, trong bước (b), các tạp chất mà không liên kết đặc hiệu với nhựa ái lực virus vaccin có thể được loại bỏ bằng dung dịch rửa.

Theo một phương án, phương pháp tinh sạch có thể còn bao gồm bước rửa trôi các tạp chất không ái lực với nhựa với dung dịch cân bằng sau bước (a) hoặc bước (b). Bước này có thể được thực hiện ít nhất một lần, nhưng thông thường, có thể được thực hiện không hạn chế cho đến khi đạt được trạng thái cân bằng.

Theo một phương án, phương pháp tinh sạch có thể còn bao gồm bước thực hiện tái cân bằng với dung dịch tái cân bằng trước bước (a) hoặc bước (b). Dung dịch tái cân bằng không phản ứng với bất kỳ chất nào giữa bước rửa và bước rửa giải, chảy trong cùng điều kiện như dung dịch cân bằng trong bước (a) từ đó virus vaccin không bị rửa giải, và sau đó tiếp tục chảy trước khi dung dịch rửa giải chảy để hoạt động như cầu nối giữa dung dịch rửa và dung dịch rửa giải.

Cụ thể là, dung dịch tái cân bằng có thể có độ pH trong khoảng từ 7,5 đến 8,0. Cụ

thể là, dung dịch tái cân bằng có thể chứa ít nhất một muối được lựa chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, natri clorua, Tris-HCl, 2-(N-morpholino)etansulfonic axit (MES), 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), PIPES, kali phosphat, kali clorua, và 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các muối này.

Trong phương pháp tinh sạch virus, bước (c) là bước thu hồi virus vaccine mong muốn từ cột sắc ký ái lực sử dụng dung dịch rửa giải.

Dung dịch rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0. Cụ thể là, dung dịch rửa giải có thể chứa ít nhất một muối được lựa chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, natri clorua, Tris-HCl, 2-(N-morpholino)etansulfonic axit (MES), 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), PIPES, kali phosphat, kali clorua, và 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES), nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các muối này.

Ngoài ra, dung dịch rửa giải có thể chứa từ 0,1 M đến 0,5 M natri clorua, nhưng các muối có thể tách virus vaccine mong muốn từ cột sắc ký ái lực có thể được sử dụng không giới hạn nồng độ.

Virus vaccine mong muốn được tách ra sử dụng phương pháp tinh sạch theo sáng chế có thể có độ tinh khiết tối thiểu là 88%, và tốt hơn là, độ tinh khiết tối thiểu là 90%, tối thiểu 91%, tối thiểu 92%, tối thiểu 93%, tối thiểu 94%, tối thiểu 95%, tối thiểu 96%, tối thiểu 97%, hoặc tối thiểu 98%, nhưng không bị giới hạn ở đây. Thuật ngữ “tinh khiết” có nghĩa là virus vaccine tinh khiết từ đó các tạp chất được loại bỏ, và ví dụ, nếu độ tinh khiết là 92%, có nghĩa là 8% còn lại là tạp chất. Ngoài ra, độ tinh khiết có thể chỉ đơn giản là độ tinh khiết của chất được tách ra từ dung dịch đã rửa giải, nhưng % độ tinh khiết cuối cùng có thể khác nhau theo % độ tinh khiết của mẫu đã nạp.

Thuật ngữ “tạp chất” là bất kỳ chất nào khác ngoài virus vaccine mong muốn, và ví dụ, có thể chứa ADN nguồn gốc từ vật chủ, protein nguồn gốc từ vật chủ, v.v., nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các chất này.

Ngoài ra, độ tinh khiết của virus vaccine có thể được phân tích bởi phương pháp xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) cụ thể được cung cấp để đo các tạp chất nguồn gốc từ vật chủ từ lượng protein tổng số của dung dịch rửa giải, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp này,

và tất nhiên, độ tinh khiết của virus vaccin có thể được phân tích sử dụng CEX-HPLC, SEC-HPLC, v.v..

Theo sáng chế, tốt nhất là virus là virus đường ruột, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở virus này.

Ngoài ra, virus vaccin đã tinh sạch bằng phương pháp tinh sạch của sáng chế có thể được sử dụng làm vaccin hoặc thành phần gây miễn dịch, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ứng dụng này.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất virus vaccin đã tinh sạch theo phương pháp tinh sạch. Virus vaccin có thể được sử dụng làm vaccin hoặc thành phần gây miễn dịch, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở đây.

Ví dụ thực hiện của sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các phương án ví dụ. Tuy nhiên, các phương án ví dụ chỉ nhằm mục đích thể hiện và không hướng đến giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tinh sạch sử dụng nhựa Capto™ DeVirS chứa dextran sulfat

Trong ví dụ 1, hiệu suất tinh sạch virus vaccin và tỷ lệ loại bỏ tạp chất được xác nhận sử dụng nhựa Capto™ DeVirS chứa phối tử dextran sulfat.

Sử dụng 20 mM đệm natri phosphat độ pH 7,5 làm dung dịch cân bằng và dung dịch rửa (0 M natri clorua), và dung dịch rửa giải được điều chế và sử dụng với dung dịch đệm có độ pH 7,5 trong đó nồng độ mol của natri clorua có thể đạt tới 2 M trong dung dịch cân bằng.

Trước tiên, mẫu chứa virus vaccin có chứa virus đường ruột được nạp lên cột, và sau đó quá trình rửa được thực hiện bằng cách cho dung dịch rửa chảy qua. Tiếp theo, dung dịch rửa giải có nồng độ mol của natri clorua là từ 0 M đến 2 M được chảy qua với gradien nồng độ tuyến tính, dung dịch đã rửa giải được thu lại, và sau đó hàm lượng virus vaccin được đo với liều gây nhiễm 50% tế bào (Tissue Culture Infective Dosage 50%: TCID₅₀), và đo lượng hàm lượng của tạp chất.

Các Fig.2 và Fig.3 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa Capto™ DeVirS chứa dextran sulfat.

Tham chiếu trên Fig.2 và Fig.3, đã xác nhận rằng lượng lớn các tạp chất được loại bỏ khỏi mẫu đã nạp khi so sánh lượng tạp chất của mẫu đã nạp với lượng tạp chất của dòng chảy ra (flowthrough: F/T). Ngoài ra, đã xác nhận rằng hầu hết virus vaccin được tinh sạch mà không làm mất virus vaccin khi so sánh hàm lượng virus vaccin chứa trong mẫu đã nạp với hàm lượng virus vaccin của dòng chảy ra (F/T).

Trong khi đó, nồng độ natri clorua của dung dịch rửa giải được tăng từ 0 M đến 2 M để thu các phân đoạn tương ứng. Kết quả là, đã xác nhận rằng khi phân đoạn được thu trong nồng độ muối từ 0,1 M đến 0,9 M, tốt nhất là 0,1 M đến 0,5 M, đã loại bỏ được lượng lớn các tạp chất, và tương tự, hầu hết virus vaccin được tinh sạch mà không làm mất virus vaccin.

Ví dụ, đã xác nhận rằng khi các phân đoạn 3 và 4 được thu trong nồng độ muối từ 0,1 M đến 0,5 M, lượng virus vaccin được thu hồi là khoảng 81,1%, và đồng thời, tỷ lệ loại bỏ các tạp chất là khoảng 97,7%, và do đó hàm lượng các tạp chất là rất thấp so với các phân đoạn khác.

Ví dụ 2: Tinh sạch sử dụng nhựa HiTrap Heparin chứa heparin

Trong ví dụ 2, hiệu suất tinh sạch virus vaccin và tỷ lệ loại bỏ tạp chất được xác nhận sử dụng nhựa HiTrap Heparin chứa phối tử heparin.

Sử dụng 50 mM đệm Tris-HCl độ pH 8,0 làm dung dịch cân bằng và dung dịch rửa, và dung dịch rửa giải được điều chế và sử dụng sao cho nồng độ mol của natri clorua đạt đến 2 M trong dung dịch cân bằng.

Trước tiên, mẫu chứa virus vaccin chứa virus đường ruột được nạp lên cột, và sau đó quá trình rửa được thực hiện bằng cách cho dung dịch rửa chảy qua. Tiếp theo, dung dịch rửa giải có nồng độ mol của natri clorua từ 0 M đến 2 M được chảy qua với gradien nồng độ tuyến tính, dung dịch đã rửa giải được thu lại, và sau đó hàm lượng virus vaccin được đo với TCID₅₀, và đo được hàm lượng tạp chất.

Fig.4 và Fig.5 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa HiTrap Heparin chứa heparin.

Tham chiếu trên Fig.4 và Fig.5, đã xác nhận rằng một lượng lớn các tạp chất đã được loại bỏ khỏi mẫu đã nạp khi so sánh lượng tạp chất của mẫu đã nạp với lượng tạp chất của dòng chảy ra (F/T). Ngoài ra, đã xác nhận rằng hầu hết virus vaccin được tinh

sạch không bị làm mất virus vaccin khi so sánh hàm lượng virus vaccin được chứa trong mẫu đã nạp với hàm lượng virus vaccin của dòng chảy ra (F/T).

Trong khi đó, nồng độ natri clorua của dung dịch rửa giải được tăng từ 0 M đến 2 M để thu các phân đoạn tương ứng. Kết quả là, đã xác nhận rằng khi phân đoạn được thu trong khoảng nồng độ muối từ 0,1 M đến 0,9 M, tốt nhất là 0,1 M đến 0,5 M, và tốt nhất là từ 0,1 M đến 0,3 M, đã loại bỏ được lượng lớn các tạp chất, và đồng thời, hầu hết virus vaccin được tinh sạch không làm mất virus vaccin.

Ví dụ, đã xác nhận rằng các phân đoạn từ 4 đến 7 được thu trong khoảng nồng độ muối từ 0,1 M đến 0,5 M, lượng virus vaccin được thu hồi khoảng 85,4%, và đồng thời, tỷ lệ loại bỏ của các tạp chất là 92,0%.

Ví dụ so sánh 1: Tinh sạch sử dụng nhựa Fractogel DEAE

Trong ví dụ so sánh 1, hiệu suất tinh sạch virus vaccin và tỷ lệ loại bỏ tạp chất được xác nhận sử dụng nhựa Fractogel DEAE có chứa diethylaminoethyl (DEAE).

Sử dụng 50 mM đệm Tris-HCl độ pH 8,0 làm dung dịch cân bằng và dung dịch rửa, và dung dịch rửa giải được điều chế và sử dụng sao cho nồng độ natri clorua có thể đạt đến 2 M trong dung dịch cân bằng.

Trước tiên, mẫu chứa virus vaccin chứa virus đường ruột được nạp lên cột, và sau đó quá trình rửa được thực hiện bằng cách cho dung dịch rửa chảy qua. Tiếp theo, dung dịch rửa giải được chảy ra theo gradient nồng độ tuyến tính, dung dịch đã rửa giải được thu, và sau đó hàm lượng virus vaccin được đo với TCID₅₀, và hàm lượng tạp chất được đo.

Các Fig.6 và Fig.7 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa Fractogel DEAE.

Tham chiếu trên Fig.6 và Fig.7, khi nồng độ muối được tăng lên và các phân đoạn tương ứng được thu, trong phân đoạn 11 tại nồng độ muối đặc hiệu, virus vaccin được thu hồi khoảng 25,7%, và đồng thời, tỷ lệ loại bỏ tạp chất là 51,3%. Tức là, đã xác nhận rằng hàm lượng tạp chất là rất cao trong phân đoạn trong đó tỷ lệ thu hồi của virus vaccin là tương đối cao so với các phân đoạn khác.

Ví dụ so sánh 2: Tinh sạch sử dụng nhựa Fractogel TMAE

Trong ví dụ so sánh 2, hiệu suất tinh sạch virus vaccin và tỷ lệ loại bỏ tạp chất

được xác nhận sử dụng nhựa Fractogel TMAE chứa trimethylammoniumetyl (TMAE).

Sử dụng 50 mM đệm Tris-HCl độ pH 8,0 làm dung dịch cân bằng và dung dịch rửa, và dung dịch rửa giải được điều chế và sử dụng sao cho nồng độ natri clorua có thể đạt đến 2 M trong dung dịch cân bằng.

Trước tiên, mẫu chứa virus vaccin chứa virus đường ruột được nạp lên cột, và sau đó quá trình rửa được thực hiện bằng cách cho dung dịch rửa chảy qua. Dung dịch rửa giải được chảy qua với gradient nồng độ tuyến tính, dung dịch được rửa giải được thu, và sau đó hàm lượng virus vaccin được đo với TCID₅₀, và hàm lượng tạp chất được đo.

Fig.8 và Fig.9 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa Fractogel TMAE.

Tham chiếu trên Fig.8 và Fig.9, khi tăng nồng độ muối và các phân đoạn tương ứng được rửa giải, đã xác nhận rằng trong phân đoạn cụ thể (phân đoạn 5), virus vaccin được thu hồi khoảng 20,5%, và đồng thời, tỷ lệ loại bỏ tạp chất là 89,2%.

Ví dụ so sánh 3: Tinh sạch sử dụng nhựa CIM DEAE

Trong ví dụ so sánh 3, hiệu suất tinh sạch virus vaccin và tỷ lệ loại bỏ tạp chất được xác nhận bằng cách sử dụng thân đơn dạng đĩa chứa DEAE.

Sử dụng 50 mM đệm Tris-HCl độ pH 8,0 làm dung dịch cân bằng và dung dịch rửa, và dung dịch rửa giải được điều chế và sử dụng sao cho nồng độ natri clorua đạt đến 2 M trong dung dịch cân bằng.

Trước tiên, mẫu chứa virus vaccin chứa virus đường ruột được nạp lên cột, và sau đó quá trình rửa được thực hiện bằng cách cho dung dịch rửa chảy qua. Dung dịch cân bằng và dung dịch rửa giải được trộn với tỷ lệ định trước để chảy qua với gradient nồng độ tuyến tính sao cho nồng độ của natri clorua là 100 mM, 140 mM, 200 mM, 400 mM, và 600 mM, dung dịch đã rửa giải được thu, và sau đó hàm lượng virus vaccin được đo với TCID₅₀.

Fig.10 và Fig.11 là các biểu đồ thể hiện kết quả quá trình tinh sạch virus vaccin sử dụng nhựa CIM DEAE.

Tham chiếu trên các Fig.10 và Fig.11, khi tăng nồng độ muối và các phân đoạn được rửa giải, đã xác nhận rằng nồng độ muối là 140 mM, virus vaccin được thu hồi khoảng 34,2%, và xác nhận rằng việc áp dụng cho quá trình thực tế là khó khăn do áp

suất quá lớn trong quá trình.

Các phương pháp và kết quả của ví dụ 1 và ví dụ 2 và các ví dụ so sánh từ 1 đến 3 được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1:

	Ví dụ 1	Ví dụ 2	Ví dụ so sánh 1	Ví dụ so sánh 2	Ví dụ so sánh 3
Nhựa	Capto DeVirS	HiTrap Heparin	Fractogel DEAE	Fractogel TMAE	CIM DEAE
Nhà sản xuất	GE	GE	Merck Millipore	Merck Millipore	BIA separation
Thể tích cột (mL)	20	5	5	5	0,34
Dung dịch cân bằng	20 mM Natri phosphat độ pH 7,5	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0
Dung dịch rửa	20 mM Natri phosphat độ pH 7,5	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0
Dung dịch rửa giải	20 mM Natri phosphat độ pH 7,5 0,1 M đến 0,5 M NaCl	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0 0,1 M đến 0,5 M NaCl	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0 0,05 M đến 0,1 M NaCl	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0 0 M đến 0,1 M NaCl	50 mM Tris-HCl độ pH 8,0 0,05 M đến 0,14 M NaCl
Tỷ lệ loại bỏ tạp chất (%)	97,9	92,0	51,3	89,2	-
Hiệu suất tinh sạch (TCID ₅₀ , %)	81,1	85,4	25,7	20,5	34,2
Các kết quả	Tỷ lệ loại bỏ tạp chất rất tốt; chất mong muốn có thể được tách với hiệu suất cao (như thể hiện trên các Fig.2 đến Fig.5)		Chất mong muốn có thể được tách ra với hiệu suất cao nhưng tỷ lệ loại bỏ tạp chất thấp (như thể hiện trên Fig.6 và Fig.7)	Tỷ lệ loại bỏ tạp chất rất tốt, nhưng hiệu suất tinh sạch là rất thấp (như thể hiện trên Fig.8 và Fig.9)	Khó khăn trong sử dụng do áp suất cao trong quá trình thực hiện (như thể hiện trên Fig.10 và Fig. 11)

Các kết quả này chỉ ra rằng phương pháp để tinh sạch virus vắc xin sử dụng sắc ký ái lực của sáng chế, virus vắc xin mong muốn có thể được phân lập với tỷ lệ loại bỏ tạp chất cao và hiệu suất cao khi so sánh với các phương pháp thông thường sử dụng sắc ký trao đổi ion.

Rõ ràng rằng sáng chế được mô tả bên trên có thể được thực hiện các thay đổi dưới các dạng cụ thể khác nhau bởi những người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật mà không vượt khỏi nguyên lý kỹ thuật hoặc các đặc điểm của sáng chế. Do đó, các phương án được mô tả nêu trên nhằm thể hiện cho sáng chế, và không nhằm giới hạn sáng chế. Ví dụ, trong các ví dụ 1 và 2 được mô tả bên trên, hiệu suất tinh sạch virus vắc xin và tỷ lệ loại bỏ tạp chất được xác nhận sử dụng nhựa chứa dextran sulfat và nhựa chứa heparin, nhưng theo các ví dụ, nhựa trong đó dextran sulfat và heparin được trộn với tỷ lệ nhất định có thể được sử dụng.

Phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ được mô tả dưới đây thay cho phần mô tả chi tiết, và được hiểu rằng ý nghĩa và phạm vi của yêu cầu bảo hộ và tất cả thay đổi hoặc biến đổi tương đương của các phương án thực hiện đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tinh sạch virus vaccin bao gồm các bước:

(a) nạp mẫu bao gồm virus đường ruột trên cột sắc ký ái lực chứa nhựa ái lực virus; trong đó nhựa bao gồm dextran sulfat hoặc heparin;

(b) rửa cột sắc ký ái lực với dung dịch rửa; và

(c) thu hồi virus đường ruột mong muốn từ cột sắc ký ái lực sử dụng dung dịch rửa giải ở nồng độ muối 0,1 M đến 0,5 M.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhựa liên kết đặc hiệu với virus đường ruột.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch rửa giải ở bước (c) chứa natri clorua.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch rửa trong bước (b) chứa ít nhất một muối được lựa chọn từ nhóm bao gồm natri phosphat, natri clorua, Tris-HCl, 2-(N-morpholino)etansulfonic axit (MES), 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), PIPES, kali phosphat, kali clorua, và 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES).

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cân bằng cột với dung dịch cân bằng trước bước (a).

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó dung dịch cân bằng chứa ít nhất một muối được lựa chọn từ nhóm natri phosphat, natri clorua, Tris-HCl, 2-(N-morpholino)etansulfonic axit (MES), 3-morpholinopropan-1-sulfonic axit (MOPS), PIPES, kali phosphat, kali clorua, và 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonic axit (HEPES).

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cân bằng cột với dung dịch rửa sau ít nhất một trong các bước (a) và bước (b).

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tái cân bằng cột với dung dịch tái cân bằng sau ít nhất một trong các bước (a) và (b).

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mẫu được điều chế từ các tế bào chủ khác ngoài tế bào nguồn gốc con người.

Fig.1

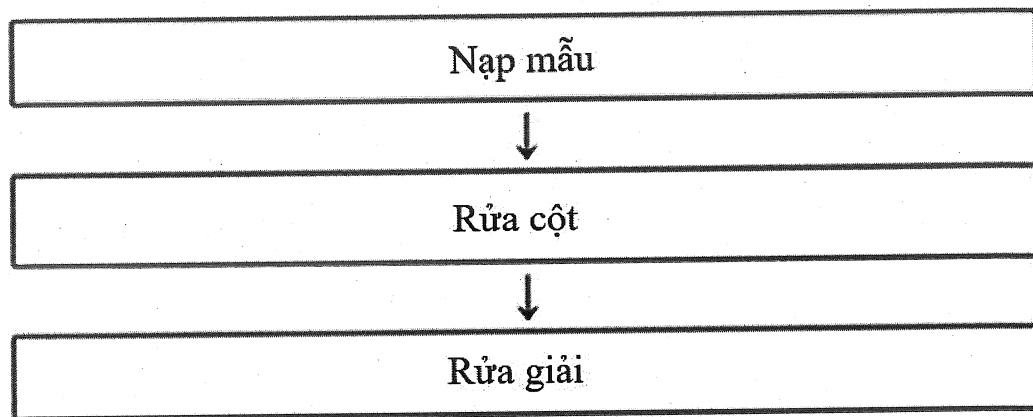


Fig.2

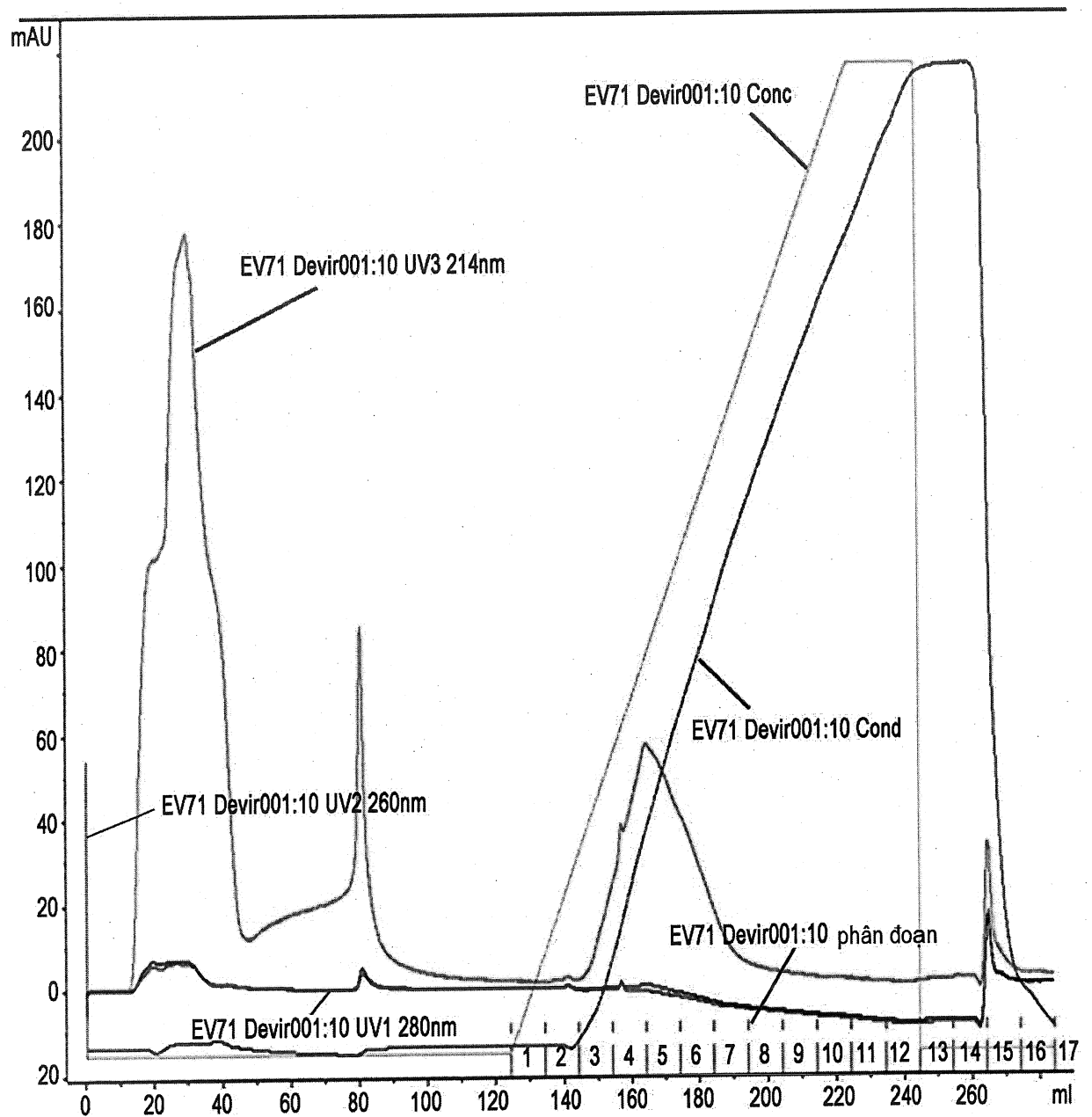


Fig.3

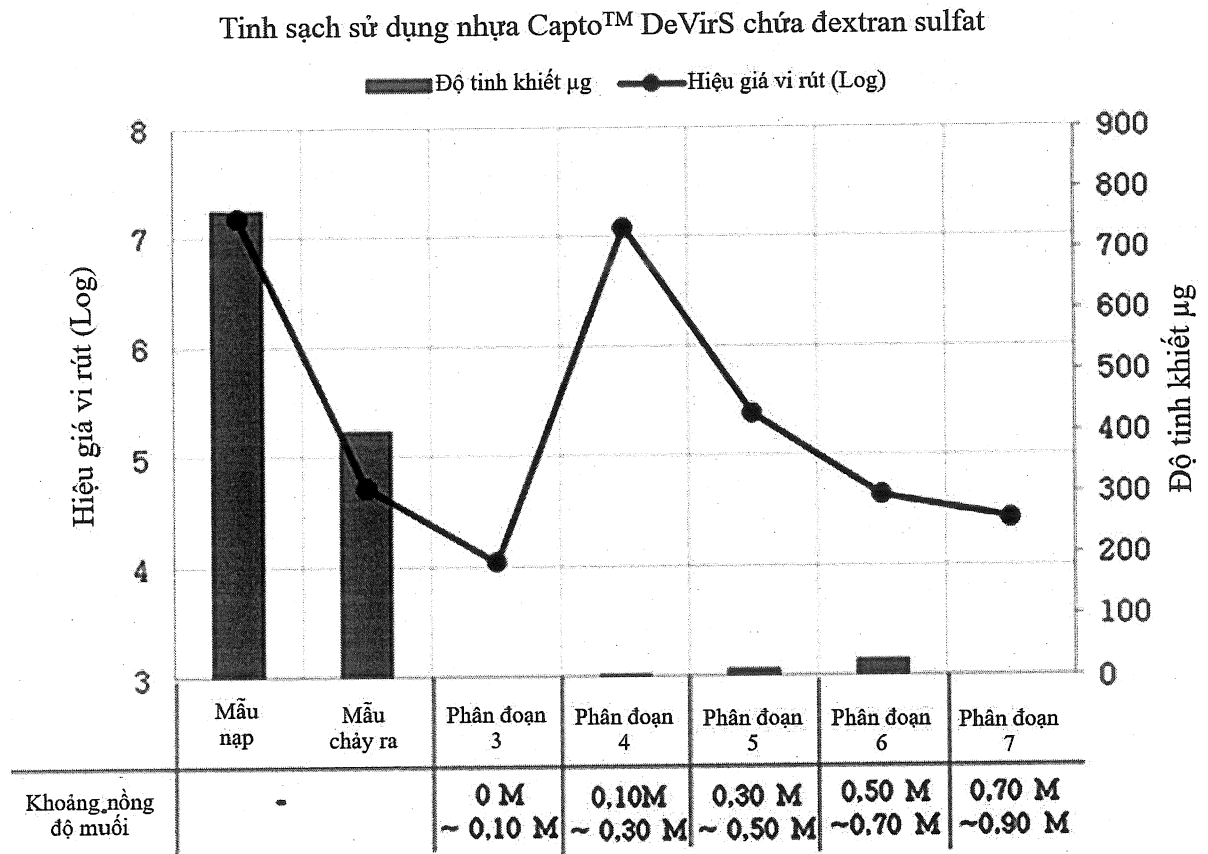


Fig.4

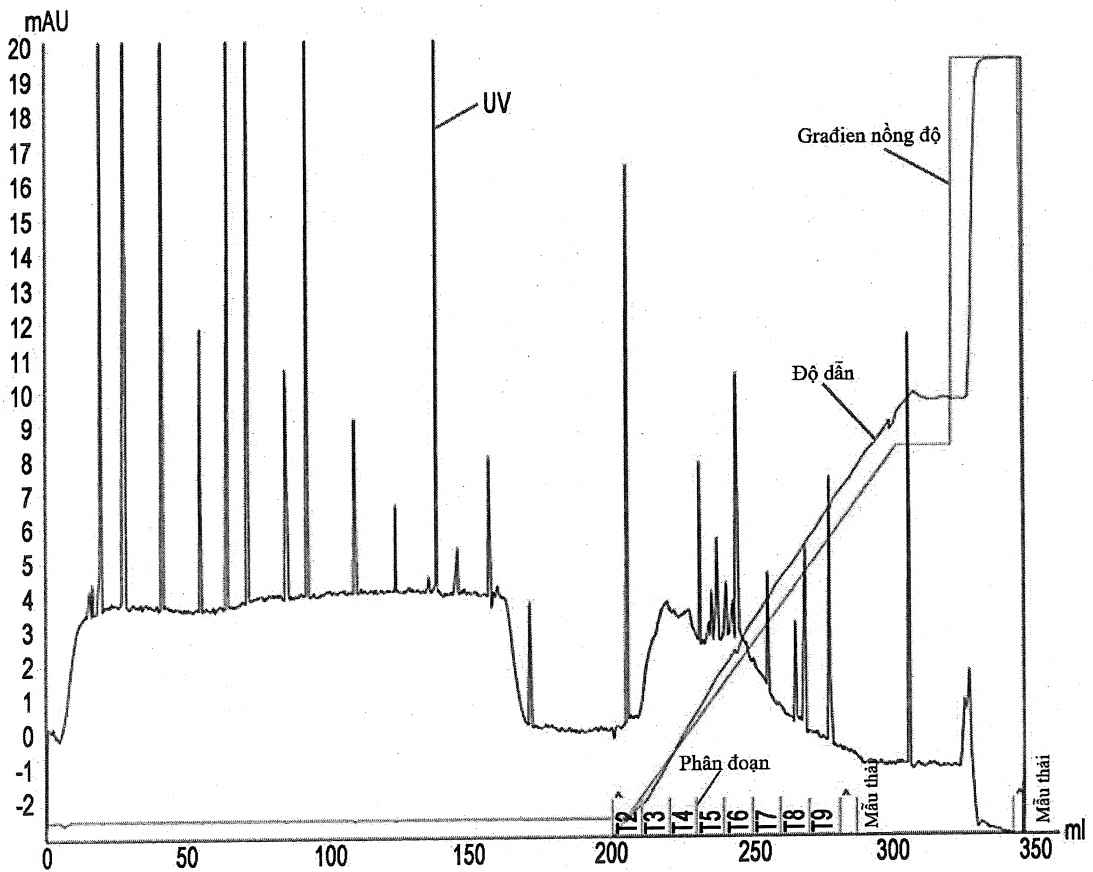


Fig.5

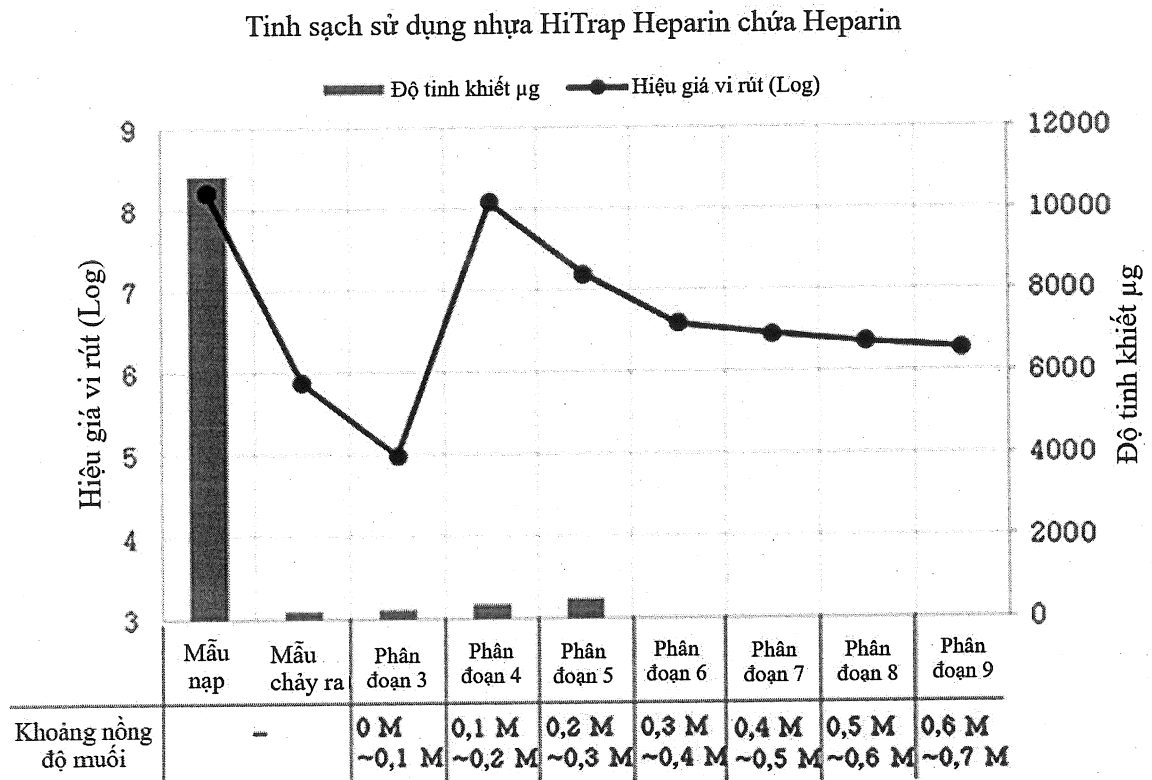


Fig.6

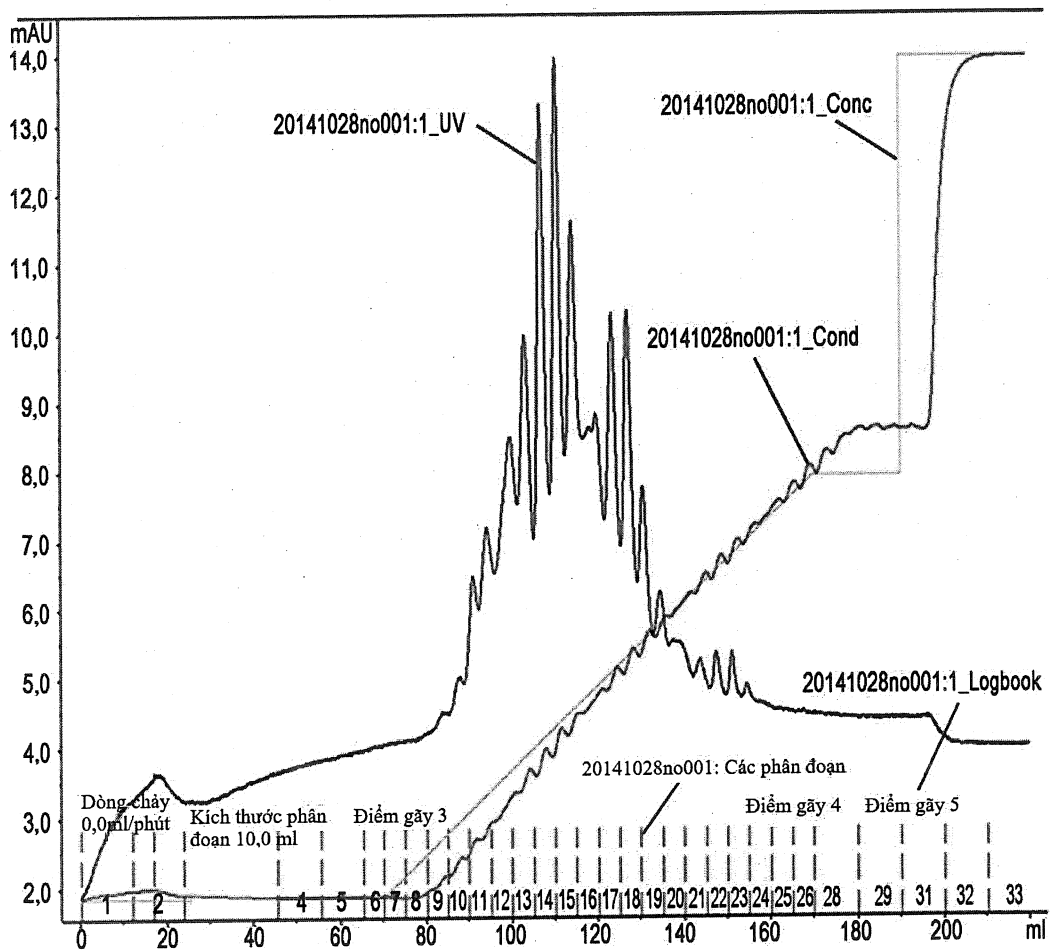


Fig.7

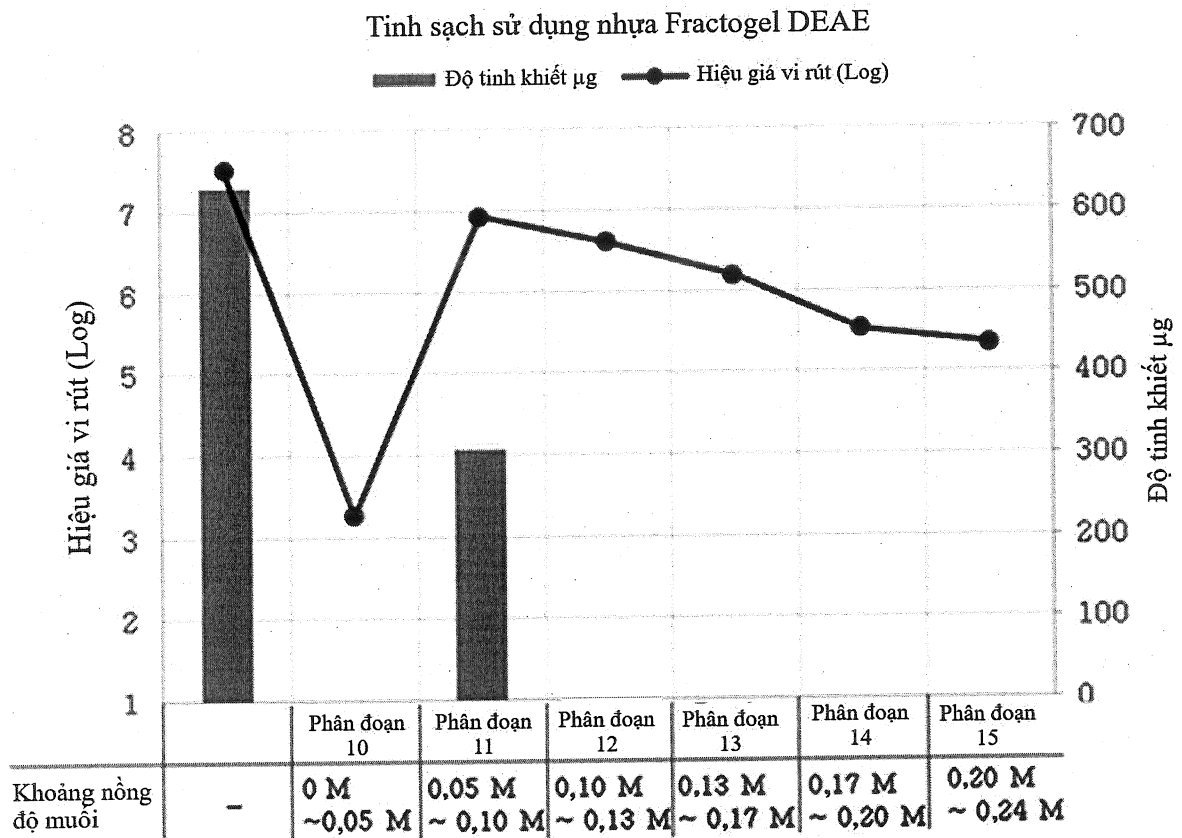


Fig.8

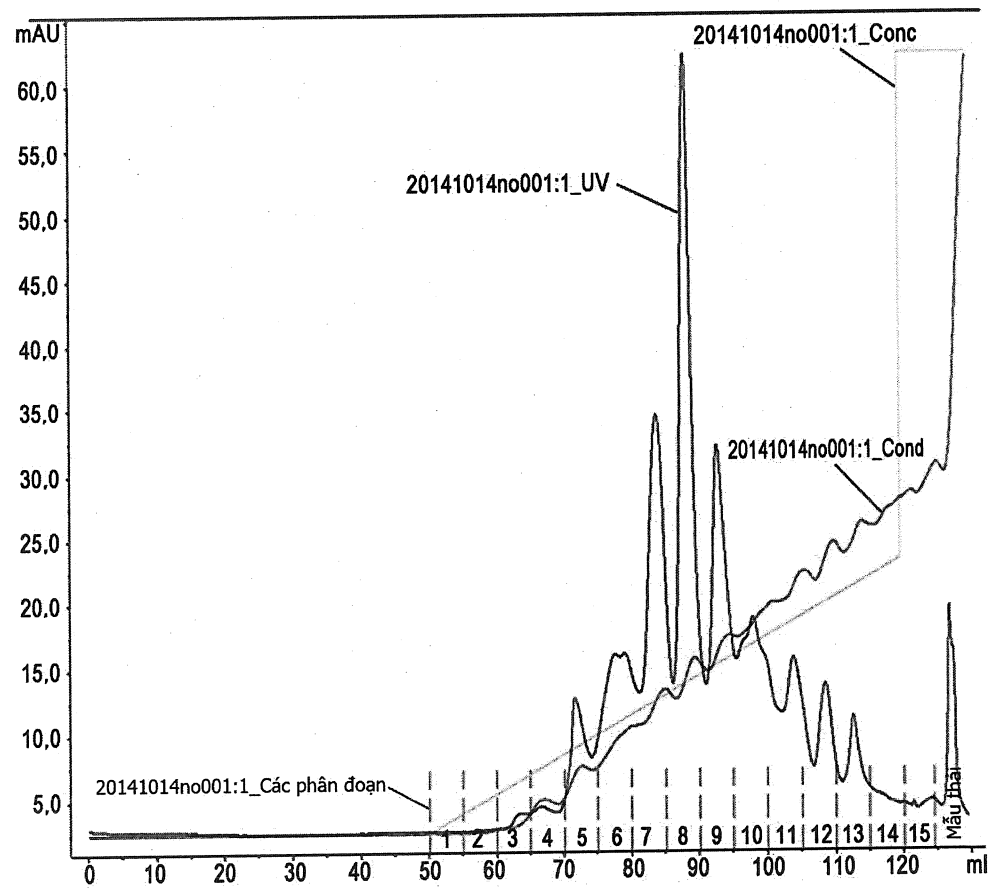


Fig.9

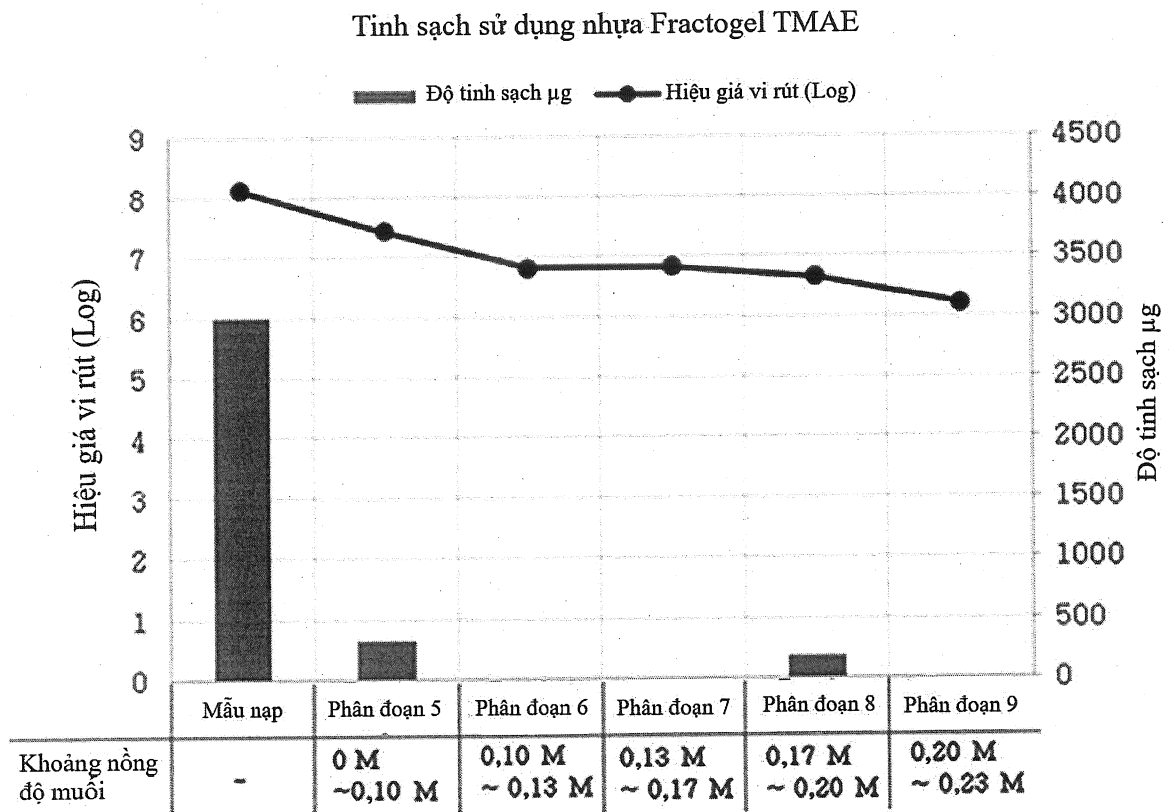


Fig.10

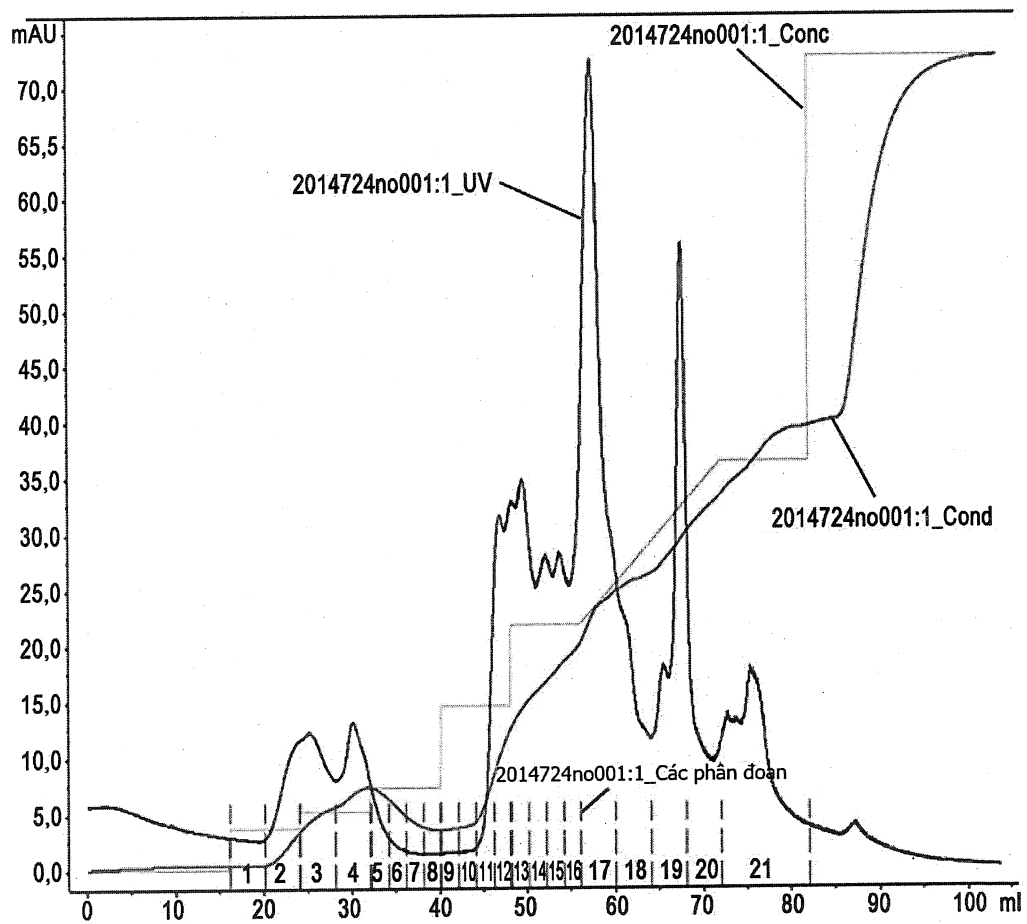


Fig.11

