



(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) 
1-0021837

(51)⁷ **A61K 9/08, 47/18, 9/00, 38/17, C07K** (13) **B**
16/00

-
- | | | | |
|------|---|---------------|--------------------|
| (21) | 1-2014-03982 | (22) | 27.05.2010 |
| (62) | 1-2012-03906 | | |
| (86) | PCT/US2010/036470 | 27.05.2010 | (87) WO2011/149472 |
| (30) | 2010202125 | 26.05.2010 AU | 01.12.2011 |
| (45) | 25.10.2019 | 379 | (43) 26.01.2015 |
| (73) | 1. BAXALTA INCORPORATED (US)
1200 Lakeside Drive, Bannockburn, IL 60015, United States of America
2. BAXALTA GMBH (CH)
Thurgauerstrasse 130, CH-8152 Glattpark, Opfikon, Switzerland | | |
| (72) | BRUCKSCHWAIGER, Leopold (AT), SVATOS, Sonja (AT), NUERNBERGER, Julia (AT), TESCHNER, Wolfgang (DE), BUTTERWECK, Harald Arno (AT), SCHWARZ, Hans-Peter (AT), GUNDINGER, Thomas (AT), KOELBL, Bernhard (AT), GRAUSENBURGER, Reinhard (AT), PLJEVLJAKOVIC, Azra (AT) | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | |
-

(54) **PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM GIÀU GLOBULIN MIỄN DỊCH (IGG) TỪ HUYẾT TƯƠNG**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến để sản xuất các sản phẩm IVIG. Các phương pháp này có nhiều ưu điểm như làm giảm sự mất mát IgG trong quá trình tinh chế và cải thiện chất lượng sản phẩm cuối. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm trong nước và được phẩm thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch, tiêm dưới da, và/hoặc tiêm bắp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến để điều chế chế phẩm giàu globulin miễn dịch (IgG) từ huyết tương. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm IgG trong nước được điều chế từ phương pháp theo sáng chế và được phẩm chứa chế phẩm IgG này được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân có nhu cầu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sản phẩm globulin miễn dịch từ huyết tương người lần đầu tiên được sử dụng vào năm 1952 để điều trị suy giảm miễn dịch. Ban đầu, cách dùng globulin miễn dịch isotyp G (IgG) qua đường trong cơ hoặc dùng dưới da là các phương pháp được lựa chọn. Để tiêm, cần phải sử dụng IgG với lượng lớn hơn để điều trị hữu hiệu các bệnh khác nhau, tuy nhiên, các sản phẩm có thể dùng qua đường tĩnh mạch được phát triển với hàm lượng IgG nhỏ hơn (50mg/mL). Thông thường, globulin miễn dịch dùng qua đường tĩnh mạch (intravenous immunoglobulin - IVIG), chứa các globulin miễn dịch là globulin miễn dịch G (IgG) đã được kết hợp từ huyết tương của hơn một nghìn người hiến máu. Thông thường, khi chứa hơn 95% IgG chưa được cải biến, có chức năng cảm ứng phụ thuộc Fc nguyên vẹn, và chỉ lượng vết globulin miễn dịch A (IgA) hoặc globulin miễn dịch M (IgM), IVIG là các sản phẩm IgG vô trùng tinh khiết chủ yếu được sử dụng để điều trị ba nhóm tình trạng bệnh lý chính: (1) suy giảm miễn dịch như chứng thiếu gamma globulin-huyết có liên quan đến nhiễm sắc thể X, chứng giảm gamma globulin-huyết (suy giảm miễn dịch nguyên phát), và các tình trạng miễn dịch thỏa hiệp mắc phải (suy giảm miễn dịch thứ cấp), đặc trưng bởi nồng độ kháng thể thấp; (2) bệnh viêm và tự miễn; và (3) nhiễm khuẩn cấp tính.

Cụ thể, nhiều người mắc các rối loạn do suy giảm miễn dịch nguyên phát không có các kháng thể cần thiết để chống nhiễm khuẩn. Trong một số trường hợp, sự thiếu hụt này có thể được bổ sung bằng cách truyền IgG tinh khiết, thường là bằng cách dùng qua đường tĩnh mạch (nghĩa là, điều trị IVIG). Một số rối loạn suy giảm miễn dịch nguyên phát thường được điều trị theo cách này, bao gồm chứng thiếu gamma globulin-huyết có liên quan đến nhiễm sắc thể X (X-linked

Agammaglobulinemia - XLA), chứng suy giảm miễn dịch thông thường (Common Variable Immunodeficiency - CVID), hội chứng tăng IgM (Hyper-IgM Syndrome - HIM), chứng suy giảm miễn dịch nặng thể kết hợp (Severe Combined Immunodeficiency - SCID), và rối loạn suy giảm một số phân nhóm IgG (Blaese and Winkelstein, J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007).

Mặc dù việc điều trị bằng IVIG có thể rất hữu hiệu để kiểm soát các rối loạn suy giảm miễn dịch nguyên phát, cách điều trị này chỉ là sự thay thế tạm thời các kháng thể không được sản xuất bởi cơ thể, chứ không chữa khỏi được bệnh này. Do đó, các bệnh nhân phụ thuộc vào điều trị IVIG cần dùng liều lặp lại, thường là khoảng một tháng một lần trong suốt cuộc đời. Điều này khiến cho nhu cầu sản xuất liên tục chế phẩm IVIG là rất lớn. Tuy nhiên, không giống như các chế phẩm sinh học khác được sản xuất theo cách biểu hiện *in vitro* vật truyền ADN tái tổ hợp, IVIG chỉ được tách phân đoạn từ máu và huyết tương của những người hiến máu. Do vậy, sản lượng IVIG không thể gia tăng chỉ bằng cách gia tăng dung lượng sản xuất. Thay vào đó, mức IVIG hiện có trên thị trường bị giới hạn bởi nguồn cung hiện có từ người hiến máu và huyết tương.

Một số yếu tố điều chỉnh nhu cầu sử dụng IVIG, bao gồm việc chấp nhận điều trị bằng IVIG, xác định các chỉ định khác nữa mà việc điều trị bằng IVIG mang lại hiệu quả, và gia tăng chẩn đoán và kê đơn IVIG ở bệnh nhân. Đáng chú ý, nhu cầu toàn cầu đối với IVIG tăng gấp bốn lần từ năm 1990 và cho đến nay tiếp tục tăng với tốc độ hằng năm nằm trong khoảng từ 7% đến 10% (Robert P., Pharmaceutical Policy and Law, 11 (2009) 359-367). Ví dụ, Cơ quan huyết học quốc gia Úc (Australian National Blood Authority) đã thông báo rằng nhu cầu về IVIG ở Úc tăng 10,6% cho năm tài chính 2008-2009 (Báo cáo thường niên cơ quan huyết học quốc gia (National Blood Authority Australia Annual Report) 2008-2009).

Một phần do nhu cầu toàn cầu ngày càng tăng và các biến động trong việc cung cấp các sản phẩm globulin miễn dịch sẵn có, một số quốc gia, bao gồm Úc và Anh, đã thực hiện các chương trình quản lý nhu cầu để bảo vệ nguồn cung các sản

phẩm này dùng cho các bệnh nhân có nhu cầu cao nhất trong thời gian thiếu hụt sản phẩm.

Đã có thông báo rằng trong năm 2007 đã tách phân đoạn 26,5 triệu lít huyết tương, tạo ra 75,2 tấn IVIG, với hiệu suất sản xuất trung bình là 2,8g/L (xem tài liệu Robert P. trên đây). Thông báo này cũng ước tính rằng hiệu suất IVIG toàn cầu được mong đợi tăng đến khoảng 3,43g/L vào năm 2012. Tuy nhiên, do nhu cầu IVIG toàn cầu không ngừng tăng lên, dự tính là nằm trong khoảng từ 7% đến 13% hàng năm tính từ nay đến năm 2015, cần phải cải thiện hơn nữa hiệu suất IVIG nói chung để đáp ứng được nhu cầu toàn cầu.

Nhiều phương pháp điều chế IVIG đã được các nhà cung cấp sản phẩm IVIG thương mại áp dụng. Một vấn đề phổ biến đối với các phương pháp sản xuất IVIG hiện nay là hao hụt đáng kể IgG trong quy trình tinh chế, ước tính ít nhất là từ 30% đến 35% tổng lượng IgG của nguyên liệu ban đầu. Khó khăn là ở chỗ cần phải duy trì chất lượng của quá trình vô hoạt virus và loại bỏ các tạp chất có thể gây ra các phản ứng bất lợi, đồng thời giúp gia tăng hiệu suất IgG. Ở mức độ sản xuất IVIG hiện tại, mức gia tăng hiệu suất có thể bị coi là ít đã là rất đáng kể trên thực tế. Ví dụ, ở quy mô sản xuất của năm 2007, mức gia tăng hiệu suất 2%, nghĩa là tăng thêm 56mg/L, sẽ tạo ra thêm 1,5 tấn IVIG.

DE 100 08 619, EP 0 893 450, US 4 550 019 bộc lộ phương pháp sản xuất chế phẩm globulin miễn dịch. Các ứng dụng tương tự với: US 6 150 471, US 4 499 073; Cammerata-P.B., Cohen-P.P. Fractionation and Properties of Glutamic-Oxalacetic Transaminase. Jbc.org. 1981. 53-62. Curling-J-M. Methods of Plasma Protein Fractionation. Academic Press. 1980.

Trong loạt tài liệu hội thảo thứ tư đã được công bố về bào chế và các đặc tính của protein huyết thanh và huyết tương, Cohn và các đồng tác giả (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475) đã lần đầu tiên mô tả phương pháp tách phân đoạn protein huyết tương bằng rượu (phương pháp 6), cho phép phân lập một phân đoạn giàu IgG từ huyết tương người. Vài năm sau đó, Oncley và các đồng tác giả (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550) đã phát triển phương pháp của Cohn thành phương pháp (phương pháp 9) phân lập chế phẩm IgG tinh khiết.

Mặc dù đặt nền móng cho cả ngành công nghiệp sản xuất các yếu tố máu có nguồn gốc từ huyết tương, các phương pháp này lại không thể tạo ra các chế phẩm IgG có nồng độ đủ cao dùng để điều trị một số bệnh liên quan đến miễn dịch, bao gồm hội chứng Kawasaki, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, và suy giảm miễn dịch nguyên phát. Vì vậy, các phương pháp khác áp dụng các kỹ thuật khác nhau, như sắc ký trao đổi ion, đã được phát triển để đạt được độ tinh khiết cao hơn và nồng độ chế phẩm IgG cao hơn. Hoppe và các đồng tác giả (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34): 1749-1752) và Falksveden (Patent Thụy điển số 348942) và Falksveden và Lundblad (*Methods of Plasma Protein Fractionation* 1980) là những bậc thầy đầu tiên về việc áp dụng sắc ký trao đổi ion nhằm mục đích này.

Các phương pháp hiện đại khác áp dụng bước làm kết tủa, như kết tủa caprylat (Lebing *et al.*, *Vox Sang* 2003 (84):193-201) và kết tủa etanol phân đoạn (I+)II+III theo phương pháp phân đoạn của Cohn (Tanaka *et al.*, *Braz J Med Biol Res* 2000 (33)37-30) kết hợp với sắc ký cột. Gần đây nhất, Teschner và các đồng tác giả (*Vox Sang*, 2007 (92):42-55) đã bậc thầy phương pháp sản xuất sản phẩm IVIG 10%, trong đó trước tiên chất kết tủa ở nhiệt độ thấp được loại khỏi huyết tương được kết hợp lại và tiếp theo thực hiện phân đoạn bằng etanol lạnh theo phương pháp Cohn-Oncley cải biến, sau đó xử lý hợp chất trung gian bằng S/D, sắc ký trao đổi ion, lọc nano, và tùy ý siêu lọc/lọc thẩm tách.

Tuy nhiên, mặc dù độ tinh khiết, tính an toàn, và hiệu suất được tạo nên bởi các phương pháp sản xuất IgG này được cải thiện, một lượng đáng kể IgG sẽ bị hao hụt trong quá trình tinh chế. Ví dụ, Teschner và các đồng tác giả thông báo rằng phương pháp của họ làm tăng hiệu suất IgG 65% (Teschner và các đồng tác giả, *nêu trên*). Như đã được thông báo trong các hội nghị về sản phẩm huyết tương khác nhau, hiệu suất trung bình khi điều chế IgG ở quy mô lớn, như theo các hãng Baxter, CSL Behring, Upfront Technology, Cangene, Prometric BioTherapeutics, và Finnish Red Cross, nằm trong khoảng từ 61% đến 65% trong thùng chứa cuối cùng. Điều này cho thấy mức hao hụt ít nhất khoảng một phần ba lượng IgG có trong các phân đoạn huyết tương kết hợp lại trong quy trình sản xuất.

Vì vậy, cần có các phương pháp cải tiến và có hiệu quả hơn để sản xuất các sản phẩm IVIG. Sáng chế này đáp ứng được nhu cầu đó và các nhu cầu khác bằng cách đề xuất các phương pháp sản xuất IVIG tạo ra hiệu suất cao hơn ít nhất là 6% đến 10% so với hiệu suất đạt được hiện nay, cũng như chế phẩm IVIG thu được từ các phương pháp này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm giàu IgG (ví dụ, chế phẩm IVIG) từ huyết tương. Theo cách có lợi, các phương pháp được đề xuất theo sáng chế mang lại các cải tiến đáng kể so với các phương pháp sản xuất hiện tại để điều chế chế phẩm IVIG. Ví dụ, các phương pháp được đề xuất theo sáng chế cho phép gia tăng hiệu suất của IgG trong tổng lượng chế phẩm cuối mà không làm giảm độ tinh khiết cần thiết để dùng qua đường tĩnh mạch.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm giàu IgG từ huyết tương bao gồm các bước (a) làm kết tủa phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 6% đến 10% ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5 để thu được chất kết tủa thứ nhất và phần dịch nổi thứ nhất, (b) làm kết tủa IgG ra khỏi phần dịch nổi thứ nhất, ở bước làm kết tủa thứ hai, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 25% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ hai, (c) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ hai để tạo ra huyền phù, (d) làm kết tủa IgG ra khỏi huyền phù được tạo ra ở bước (c), ở bước làm kết tủa thứ ba, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 22% đến 28% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ ba, (e) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ ba để tạo ra huyền phù, và (f) tách phân đoạn hòa tan ra khỏi huyền phù được tạo ra ở bước (e), bằng cách đó tạo ra chế phẩm giàu IgG, trong đó ít nhất một trong số các bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa thứ hai, hoặc bước làm kết tủa thứ ba bao gồm bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một phương án, rượu được bổ sung vào ở bước làm kết tủa thứ nhất bằng cách phun. Theo một phương án khác, rượu được bổ sung vào ở bước làm kết tủa thứ hai bằng cách phun. Theo một phương án khác nữa, rượu được bổ sung vào ở bước làm kết tủa thứ ba bằng cách phun.

Theo một số phương án, độ pH của một hoặc nhiều dung dịch có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo các phương án liên quan, độ pH ở ít nhất một trong số các bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa thứ hai, hoặc bước làm kết tủa thứ ba đạt được bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào sau khi bổ sung rượu vào, hoặc trước và sau khi bổ sung rượu vào, trong và sau khi bổ sung rượu vào, hoặc trước, trong, và sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án có liên quan khác, độ pH của bước làm kết tủa có thể được duy trì trong toàn bộ phản ứng kết tủa bằng cách điều chỉnh độ pH một cách liên tục.

Theo một phương án cụ thể, độ pH của bước làm kết tủa thứ nhất được điều chỉnh sau khi bổ sung rượu vào bằng cách phun bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào. Theo một phương án khác, độ pH của bước làm kết tủa thứ hai được điều chỉnh sau khi bổ sung rượu vào bằng cách phun bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào. Theo một phương án khác nữa, độ pH của bước làm kết tủa thứ ba được điều chỉnh sau khi bổ sung rượu vào bằng cách phun bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào.

Ngoài ra, các phương pháp điều chế theo sáng chế có thể còn bao gồm bước sắc ký trao đổi ion (nghĩa là, sắc ký trao đổi anion và/hoặc sắc ký trao đổi cation), bước lọc nano, bước siêu lọc/lọc thẩm tách, hoặc kỹ thuật tinh chế thích hợp bất kỳ khác để gia tăng hơn nữa độ tinh khiết hoặc chất lượng của các chế phẩm IVIG.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm giàu IgG từ huyết tương bao gồm các bước điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh đến hoặc đến khoảng 7,0, (b) điều chỉnh nồng độ etanol của phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh ở bước (a) đến hoặc đến khoảng 25% (thể tích/thể tích) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C hoặc khoảng -7°C đến -9°C hoặc khoảng -9°C, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, (c) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (b), (d) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thu được ở bước (c) bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng hoặc bằng khoảng 600mL axit axetic bằng cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra huyền phù, (e) trộn silic đioxit đã nghiền mịn (SiO_2) với huyền phù thu được ở bước (d) trong thời gian ít nhất khoảng 30 phút, (f) lọc huyền

phù bằng máy lọc ép, bằng cách đó tạo ra dịch lọc, (g) rửa máy lọc ép bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat với thể tích ít nhất bằng 3 lần thể tích chết của máy lọc ép, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng hoặc bằng khoảng 150mL axit axetic bằng tính cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra dung dịch rửa, (h) kết hợp dịch lọc thu được ở bước (f) với dung dịch rửa thu được ở bước (g), bằng cách đó tạo ra dung dịch, và xử lý dung dịch này bằng chất tẩy rửa, (i) điều chỉnh độ pH của dung dịch thu được ở bước (h) đến bằng hoặc bằng khoảng 7,0 và bổ sung ethanol vào đến nồng độ cuối bằng hoặc bằng khoảng 25%, bằng cách đó tạo ra chất kết tủa, (j) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (i), (k) hòa tan chất kết tủa trong dung dịch nước chứa dung môi hoặc chất tẩy rửa và duy trì dung dịch này trong ít nhất 60 phút, (l) cho dung dịch sau bước (k) đi qua cột sắc ký trao đổi cation và rửa giải protein được hấp thụ trên cột vào dung dịch giải hấp, (m) cho dung dịch giải hấp thu được ở bước (l) đi qua cột sắc ký trao đổi anion để tạo ra dòng thải, (n) cho dòng thải thu được ở bước (m) đi qua thiết bị lọc nano để tạo ra dịch lọc nano, (o) cho dịch lọc nano thu được ở bước (n) đi qua màng siêu lọc để tạo ra dịch siêu lọc; và (p) thẩm tách dịch siêu lọc thu được ở bước (o) dựa vào dung dịch đệm lọc thẩm tách để tạo ra dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 8% (khối lượng/thể tích) đến khoảng 12% (khối lượng/thể tích), bằng cách đó thu được chế phẩm IgG cô đặc.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG trong nước điều chế được theo các phương pháp bộc lộ trong bản mô tả. Thông thường, chế phẩm IgG có độ tinh khiết cao (ví dụ, hàm lượng IgG ít nhất là 95%, 98%, 99%, hoặc lớn hơn), chứa nồng độ protein nằm trong khoảng từ 20g/L đến 200g/L, và chứa hàm lượng tạp chất IVIG nói chung, như IgG, IgM, Fibrinogen, Transferrin, ACA, chất có hoạt độ phân giải amit, PKA, và các chất tương tự là rất thấp.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất dược phẩm và chế phẩm chứa IgG thích hợp để dùng trong liệu pháp IVIG. Dược phẩm có độ tinh khiết cao (ví dụ, hàm lượng IgG ít nhất bằng 98%, 99%, hoặc lớn hơn), chứa protein với nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/L đến 200g/L, và chứa hàm lượng tạp chất IVIG nói chung, như IgG, IgM, Fibrinogen, Transferrin, ACA, các chất có hoạt độ phân giải amit, PKA, và

các chất tương tự là rất thấp. Thông thường, dược phẩm được bào chế thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch (nghĩa là, dùng để điều trị bằng IVIG), tiêm dưới da, hoặc tiêm bắp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm được sử dụng để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, hoặc nhiễm khuẩn cấp tính ở người cần điều trị. Ví dụ không giới hạn về bệnh và các tình trạng bệnh có thể được điều trị hoặc kiểm soát theo các phương pháp theo sáng chế bao gồm cấy ghép tủy xương dị sinh, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (idiopathic thrombocytopenic purpura - ITP), bệnh HIV ở trẻ nhỏ, suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh Kawasaki, bệnh đa dây thần kinh hủy myelin do viêm mạn tính (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - CIDP), ghép thận với thể nhận có tính kháng thể cao hoặc bằng thể cho không tương thích ABO, hội chứng mệt mạn tính, bệnh viêm ruột kết do thiếu hụt khuẩn thoi, bệnh viêm bì cơ và bệnh viêm đa cơ, bệnh mắt Graves, hội chứng Guillain-Barré, chứng loạn dưỡng cơ, bệnh viêm cơ thể vùi, hội chứng Lambert-Eaton, bệnh ban đỏ luput, bệnh thần kinh vận động đa ổ, bệnh xơ cứng rải rác (multiple sclerosis - MS), bệnh nhược cơ năng, bệnh giảm tiểu cầu dị miễn dịch sơ sinh, nhiễm Parvovirus B19, bệnh pemphigut, chứng ban xuất huyết sau tiêm truyền, chứng đào thải ghép thận, sảy thai/mất thai tự phát, hội chứng người cứng đờ, hội chứng co giật mắt theo nhiều hướng, bệnh nhiễm trùng nặng và sốc nhiễm trùng ở người trưởng thành bị ốm nặng, bệnh hoại tử biểu bì nhiễm độc, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, bệnh đa u tủy, chứng thiếu gamma globulin-huyết có liên quan đến nhiễm sắc thể X, chứng giảm gamma globulin-huyết, chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh xơ cứng rải rác thuyên giảm tái phát (Relapsing remitting multiple sclerosis – RRMS), bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là đồ thị thể hiện nồng độ IgG xác định được theo phương pháp ELISA (▲) và theo phương pháp định lượng bằng cách đo độ đục (●) và nồng độ protein tổng (■) có mặt trong dịch rửa sau lọc Phân đoạn II+III theo thể tích dung dịch đệm được dùng để rửa thiết bị lọc sau khi lọc tính theo số lần thể tích chết của thiết bị lọc.

Hình 2 là đồ thị thể hiện hoạt độ PKA trung bình trong các phân đoạn hòa tan chất kết tủa G sau khi chiết và làm trong ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 5,0 bằng cách bổ sung axit axetic vào có xử lý và không xử lý bằng Aerosil (silic đioxit).

Hình 3 là đồ thị thể hiện hàm lượng fibrinogen trung bình của các phân đoạn hòa tan chất kết tủa G sau khi chiết và làm trong ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 5,0 bằng cách bổ sung axit axetic vào có xử lý và không xử lý bằng Aerosil (silic đioxit).

Hình 4 là đồ thị thể hiện hoạt độ phân giải amit trung bình của các phân đoạn hòa tan chất kết tủa G sau khi chiết và làm trong ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 5,0 bằng cách bổ sung axit axetic vào có xử lý và không xử lý bằng Aerosil (silic đioxit).

Hình 5 là đồ thị thể hiện hoạt độ phân giải amit của các phân đoạn hòa tan chất kết tủa G được chiết và làm trong ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 7,8 sau khi ủ trong 2 tuần ở 4°C (♦) hoặc trong 1 tuần nữa ở nhiệt độ trong phòng (■).

Hình 6 là đồ thị thể hiện hoạt độ PKA của các phân đoạn hòa tan chất kết tủa G được chiết và làm trong ở độ pH nằm trong khoảng từ 3,8 đến 7,8.

Hình 7 là đồ thị thể hiện mức khác biệt về độ tinh khiết của dịch lọc phân đoạn II+III đã được cải biến có xử lý và không xử lý bằng silic oxit khói. Phổ sắc ký điện di trên xenluloza axetat của dịch lọc phân đoạn II+III cải biến của hình 7A thể hiện việc chỉ được làm trong bằng chất trợ lọc và của hình 7B thể hiện việc chỉ được làm trong sau khi xử lý bằng silic oxit khói.

Hình 8 là đồ thị thể hiện mức chuyển dịch độ pH từ 6,9 của phần dịch nổi Phân đoạn II+III sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa trong quá trình sản xuất IgG ở quy mô lớn.

Hình 9 là đồ thị thể hiện lượng axit axetic bằng theo độ pH của dung dịch đệm chiết kết tủa Phân đoạn II+III đã cải biến.

Hình 10 là đồ thị thể hiện lượng axit axetic bằng theo độ pH của dung dịch đệm sau khi rửa thiết bị lọc huyền phù Phân đoạn II+III đã cải biến.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng trong bản mô tả này để chỉ polypeptit về cơ bản được mã hoá bởi gen globulin miễn dịch hoặc các gen globulin miễn dịch, hoặc đoạn của nó, gắn kết đặc hiệu và nhận biết một chất cần phân tích (kháng nguyên). Các gen globulin miễn dịch đã được nhận biết bao gồm các gen vùng hằng định kappa, lambda, alpha, gama, delta, epsilon và mu, cũng như vô số các gen vùng thay đổi globulin miễn dịch. Chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc lambda. Chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, lần lượt xác định các nhóm globulin miễn dịch IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE tương ứng.

Ví dụ về đơn vị cấu trúc globulin miễn dịch (kháng thể) bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25kD) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50kD đến 70kD). Đầu tận cùng N của mỗi chuỗi xác định vùng thay đổi gồm khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chịu trách nhiệm chính trong việc nhận biết kháng nguyên. Các thuật ngữ chuỗi nhẹ thay đổi (V_L) và chuỗi nặng thay đổi (V_H) được dùng để chỉ các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương ứng.

Thuật ngữ "siêu lọc (ultrafiltration - UF)" được dùng trong bản mô tả này bao gồm nhiều phương pháp lọc màng khác nhau, trong đó áp suất thủy tĩnh ép một chất lỏng qua màng bán thấm. Chất rắn được tạo huyền phù và chất tan có phân tử lượng cao được giữ lại, trong khi nước và chất tan có phân tử lượng thấp đi qua màng này. Quy trình phân tách này thường được áp dụng để tinh chế và cô đặc dung dịch có phân tử lượng lớn (10^3 Da đến 10^6 Da), đặc biệt là dung dịch protein. Có sẵn nhiều màng siêu lọc tùy theo kích thước của phân tử cần giữ lại. Việc siêu lọc thường được đặc trưng bởi cỡ lỗ màng nằm trong khoảng từ 1kDa đến 1000kDa và áp suất vận hành nằm trong khoảng từ 0,01bar đến 10bar, và đặc biệt là có thể dùng để phân tách chất keo như protein ra khỏi các phân tử nhỏ như đường và muối.

Thuật ngữ "lọc thẩm tách" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ quá trình được thực hiện với các màng giống như siêu lọc và là quá trình lọc tiếp tuyến. Trong bước lọc thẩm tách, dung dịch đậm được đưa vào bể tái chế trong khi dịch lọc được tháo ra khỏi bộ phân vận hành. Trong các quá trình khi sản phẩm nằm trong phần

được giữ lại (ví dụ IgG), bước lọc thẩm tách rửa các hợp phần ra khỏi phần gom sản phẩm và đi vào dịch lọc, bằng cách đó thay dung dịch đệm và làm giảm nồng độ của các loại hợp chất không mong muốn.

Thuật ngữ "khoảng" được dùng trong bản mô tả này để chỉ phạm vi gần đúng bao gồm cộng hoặc trừ 10% so với trị số cụ thể. Chẳng hạn, "khoảng 20%" bao hàm phạm vi 18% đến 22%.

Thuật ngữ "trộn" được dùng trong bản mô tả này để mô tả hoạt động gây ra sự phân bố đồng đều hai hoặc nhiều hợp chất hoặc chất khác nhau trong dung dịch hoặc huyền phù bằng cách khuấy bất kỳ. Bước "trộn" theo sáng chế này không cần thiết đạt đến kết quả là sự phân bố hoàn toàn đều của tất cả các thành phần trong dung dịch hoặc huyền phù.

Thuật ngữ "dung môi" được dùng trong bản mô tả này bao hàm chất lỏng bất kỳ có khả năng hòa tan hoặc phân tán một hoặc nhiều chất khác. Dung môi có thể là dung môi vô cơ, như nước, hoặc có thể là chất lỏng hữu cơ, như etanol, axeton, metyl axetat, etyl axetat, hexan, xăng, v.v.. Khi được sử dụng trong thuật ngữ "xử lý bằng dung môi tẩy rửa", dung môi biểu thị dung môi hữu cơ (ví dụ, tri-N-butyl phosphat), là một phần của hỗn hợp dung môi tẩy rửa được dùng để làm bất hoạt virus được bao bằng lipid trong dung dịch.

Thuật ngữ "chất tẩy rửa" được sử dụng trong bản mô tả này theo cách thay thế cho thuật ngữ "chất hoạt động bề mặt" hoặc "tác nhân hoạt động bề mặt". Các chất hoạt động bề mặt thường là các hợp chất hữu cơ amphiphil, *nghĩa là*, đồng thời chứa các nhóm kỵ nước ("các đuôi") và các nhóm ưa nước ("các đầu"), khiến cho các chất hoạt động bề mặt tan trong cả dung môi hữu cơ và nước. Chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại dựa theo sự có mặt của các nhóm mang điện tích chính ở đầu của nó. Chất hoạt động bề mặt không ion không có các nhóm mang điện tích ở đầu của nó, trong khi chất hoạt động bề mặt ion lại mang điện tích ở đầu của nó. Chất hoạt động bề mặt ion lưỡng tính chứa một đầu với hai nhóm mang điện tích trái dấu. Một số ví dụ về các chất hoạt động bề mặt thông thường bao gồm: Anion (trên cơ sở anion sulfat, sulfonat hoặc carboxylat): perflooctanoat (PFOA hoặc PFO), perflooctansulfonat (PFOS), natri dodecyl sulfat (SDS), amoni lauryl sulfat, và các

muối alkyl sulfat bất kỳ, natri laureth sulfat (còn được gọi là natri lauryl ete sulfat, hoặc SLES), alkyl benzen sulfonat; cation (trên cơ sở các cation amoni bậc bốn): xetyl trimetylamoni bromua (CTAB) còn được gọi là hexadexyl trimetyl amoni bromua, và các muối alkyltrimetylamoni khác, xetylpyridinium clorua (CPC), amin từ mỡ động vật được polyetoxyl hoá (POEA), benzalkoni clorua (BAC), benzethoni clorua (BZT); axit béo mạch dài và muối của chúng: kể cả caprylat, axit caprylic, heptanoat, axit hexanoic, axit heptanoic, axit nanoic, axit decanoic, và các axit tương tự; ion lưỡng tính (lưỡng tính): đodexyl betain; cocamidopropyl betain; coco ampho glyxinat; không ion: alkyl poly(etylen oxit), alkylphenol poly(etylen oxit), copolyme của poly(etylen oxit) và poly(propylen oxit) (có tên thương mại là Poloxamers hoặc Poloxamines), alkyl polyglucosit, kể cả octyl glucosit, dexyl maltosit, rượu béo (ví dụ, rượu xetyl và rượu oleyl), cocamit MEA, cocamit DEA, polysorbat (Tween 20, Tween 80, v.v..), chất tẩy rửa Triton, và đodexyl dimetylamin oxit.

Các thuật ngữ điều trị "IgG qua đường tĩnh mạch" hoặc "IVIG" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp điều trị bằng cách cho bệnh nhân cần điều trị một số tình trạng bệnh như suy giảm miễn dịch, viêm nhiễm, và các bệnh tự miễn, dùng hỗn hợp gồm globulin miễn dịch IgG qua đường tĩnh mạch, tiêm dưới da, hoặc tiêm bắp. Các globulin miễn dịch IgG thường được gộp lại và được điều chế từ huyết tương. Các kháng thể nguyên vẹn hoặc đoạn của chúng có thể được sử dụng. Các globulin miễn dịch IgG có thể được bào chế ở nồng độ cao hơn (ví dụ, cao hơn 10%) dùng để tiêm dưới da, hoặc được bào chế để tiêm bắp. Điều này là đặc biệt phổ biến đối với các chế phẩm IgG chuyên dụng được bào chế với độ chuẩn trung bình lớn hơn đối với các kháng nguyên đặc hiệu (ví dụ, yếu tố Rho D, độc tố gây chứng ho lâu ngày, độc tố gây bệnh uốn ván, độc tố gây chứng ngộ độc thịt, bệnh dại, v.v..). Để dễ dàng thảo luận, các chế phẩm IgG đã được bào chế để dùng dưới da hoặc tiêm bắp đều được bao hàm trong thuật ngữ "IVIG" trong sáng chế này.

Thuật ngữ "lượng hoặc liều lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu" hoặc "lượng hoặc liều lượng đủ/hữu hiệu" có nghĩa là liều lượng tạo ra tác dụng đích của việc dùng nó. Liều dùng chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị, và được chuyên gia trong lĩnh vực biết rõ bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết (xem: Lieberman,

Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); và *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, chẳng hạn).

Thuật ngữ "phun" được dùng trong bản mô tả này để chỉ cách phân phối chất lỏng vào một hệ, ví dụ, trong bước làm kết tủa bằng rượu, như bước làm kết tủa phân đoạn I hoặc II+III của Cohn có cải biến, ở dạng các giọt chất lỏng cực nhỏ hoặc dạng mù. Việc phun có thể đạt được bằng thiết bị áp lực bất kỳ, như một thùng chứa (ví dụ, bình phun), có đầu phun hoặc vòi phun và được vận hành bằng tay hoặc tự động để biến chất lỏng thành dạng mù cực mịn. Thông thường, việc phun được thực hiện trong khi hệ thống nhận chất lỏng được khuấy liên tục hoặc được trộn theo cách khác để đảm bảo sự phân bố nhanh và đều của chất lỏng trong hệ thống.

I. Tổng quan

Như được áp dụng thường xuyên trong y học hiện đại, các chế phẩm chứa các globulin miễn dịch (đặc biệt là IgG) cô đặc vô trùng được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh thuộc ba nhóm chính: các bệnh suy giảm miễn dịch, các bệnh viêm và tự miễn, và các bệnh nhiễm khuẩn cấp tính. Sản phẩm IgG thường được sử dụng, chính là globulin miễn dịch dùng qua đường tĩnh mạch hoặc IVIG, được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch, ví dụ, ở nồng độ bằng hoặc bằng khoảng 10% IgG. Các globulin miễn dịch cô đặc cũng có thể được bào chế để tiêm dưới da hoặc tiêm bắp, ví dụ, ở nồng độ bằng hoặc bằng khoảng 20% IgG. Để dễ dàng thảo luận, các chế phẩm IgG được bào chế để dùng dưới da hoặc tiêm bắp cũng được bao hàm trong thuật ngữ "IVIG" trong bản mô tả này.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất IVIG giúp gia tăng hiệu suất cuối cùng của sản phẩm, đồng thời vẫn tạo ra chế phẩm IVIG có chất lượng bằng hoặc cao hơn và trong một số trường hợp có nồng độ cao hơn. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tách phân đoạn của Cohn có cải biến nhằm làm giảm sự hao hụt IgG ở một hoặc nhiều bước làm kết tủa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG được bào chế theo phương pháp sản xuất cải tiến theo sáng chế. Theo cách có lợi, việc bào chế các chế

phẩm này là ít tốn kém hơn so với các sản phẩm thương mại hiện có do hiệu suất thu được theo phương pháp theo sáng chế là được cải thiện. Hơn nữa, các chế phẩm này là tinh khiết, hoặc nếu không thì tinh khiết hơn so với chế phẩm được sản xuất bằng cách áp dụng các phương pháp thương mại. Quan trọng là, các chế phẩm này là thích hợp để dùng trong việc điều trị các bệnh suy giảm miễn dịch, các bệnh viêm và tự miễn, và các bệnh nhiễm khuẩn cấp tính bằng IVIG. Theo một phương án, chế phẩm IgG có nồng độ IgG bằng hoặc bằng khoảng 10% để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo một phương án khác, chế phẩm IgG có nồng độ bằng hoặc bằng khoảng 20% dùng để tiêm dưới da hoặc tiêm bắp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm và chế phẩm được dụng chứa IgG theo phương pháp sản xuất cải tiến theo sáng chế này. Theo một số phương án, các được phẩm và chế phẩm này có các đặc tính cải thiện so với chế phẩm IVIG hiện có trên thị trường. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm và chế phẩm ổn định trong khoảng thời gian dài.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG được bào chế bằng cách áp dụng các phương pháp cải tiến theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh viêm và tự miễn, và bệnh nhiễm khuẩn cấp tính.

II. Phương pháp sản xuất IVIG

Thông thường, các chế phẩm globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được bào chế từ nguyên liệu ban đầu thích hợp bất kỳ, ví dụ, huyết tương được thu hồi hoặc huyết tương nguồn. Trong một ví dụ điển hình, máu hoặc huyết tương được thu nhận từ người hiến khỏe mạnh. Thông thường, máu được thu nhận từ động vật cùng loài với đối tượng sẽ dùng chế phẩm globulin miễn dịch (thường được gọi là các globulin miễn dịch “tương đồng”). Các globulin miễn dịch được phân lập từ máu theo các quy trình thích hợp, ví dụ, làm kết tủa (tách phân đoạn bằng rượu hoặc tách phân đoạn bằng polyetylen glycol), phương pháp sắc ký (sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực, sắc ký ái lực miễn dịch, v.v..) siêu ly tâm, và điều chế điện di, và các phương pháp tương tự. (ví dụ, xem: Cohn et al., *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Oncley et al., *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Barundern et al., *Vox Sang.* 7:157-74 (1962); Koblet et

al., *Vox Sang.* 13:93-102 (1967); các patent Mỹ số 5,122,373 và 5,177,194; chẳng hạn, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Trong nhiều trường hợp, các globulin miễn dịch được điều chế từ các sản phẩm chứa gama globulin được tạo ra theo phương pháp tách phân đoạn bằng rượu và/hoặc trao đổi ion và sắc ký ái lực mà các chuyên gia trong lĩnh vực đã biết rõ. Ví dụ, Phân đoạn II được tinh chế theo phương pháp của Cohn thường được dùng làm điểm khởi đầu để phân lập các globulin miễn dịch. Dịch đặc chứa Phân đoạn II theo phương pháp của Cohn dùng làm nguyên liệu ban đầu thường chứa khoảng 95 phần trăm IgG và bao gồm bốn phân nhóm IgG. Các phân nhóm IgG khác nhau có mặt trong Phân đoạn II ở cùng một tỷ lệ xấp xỉ như khi chúng được tìm thấy trong huyết tương của người đã được gom lại. Phân đoạn II được tinh chế tiếp trước khi bào chế thành sản phẩm để dùng. Ví dụ, dịch đặc Phân đoạn II có thể được hoà tan trong dung dịch rượu chứa nước lạnh tinh khiết và tạp chất được loại bỏ bằng cách làm kết tủa và lọc. Sau khi lọc lần cuối, huyền phù globulin miễn dịch có thể được lọc thẩm tách hoặc lọc thẩm tách (ví dụ, bằng cách sử dụng màng siêu lọc có giới hạn phân tử lượng danh nghĩa nhỏ hơn hoặc bằng 100.000 dalton) để loại bỏ rượu. Dung dịch có thể được cô hoặc pha loãng để đạt được nồng độ protein mong muốn và có thể được tinh chế tiếp theo các kỹ thuật mà các chuyên gia trong lĩnh vực đã biết rõ.

Hơn nữa, các bước điều chế khác có thể được áp dụng để làm giàu một isotyp hoặc phân nhóm globulin miễn dịch cụ thể. Ví dụ, sắc ký sepharosa protein A, protein G hoặc protein H có thể được sử dụng để làm giàu hỗn hợp gồm các globulin miễn dịch IgG, hoặc phân nhóm IgG đặc hiệu. Xem tài liệu: Harlow and Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); và patent Mỹ số 5,180,810, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Không giống như các phương pháp nêu trên, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm IgG cô đặc sử dụng nguyên liệu ban đầu có nồng độ thấp trong điều kiện lạnh. Thông thường, phương pháp theo sáng chế sử dụng cả bước tách phân đoạn bằng rượu theo phương pháp Cohn-Oncley có cải biến và bước

sắc ký trao đổi ion để thu được hiệu suất IgG cao, đồng thời duy trì chất lượng bằng, hoặc nếu không thì cao hơn, so với chất lượng của các chế phẩm IVIG thương mại hiện có trên thị trường. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra chế phẩm IgG cuối cùng chứa hàm lượng IgG đạt gần 75% hàm lượng được tìm thấy trong nguyên liệu huyết tương thô ban đầu. Các phương pháp này tiêu biểu cho sự gia tăng ít nhất 10% đến 12% hiệu suất IgG nói chung so với hiệu suất hiện có của các phương pháp tinh chế đã biết. Ví dụ, ước tính rằng quy trình sản xuất GAMMAGARD® LIQUID tạo ra hiệu suất cuối cùng nằm trong khoảng từ 60% đến 65% hàm lượng IgG được tìm thấy trong nguyên liệu ban đầu. Như vậy, các phương pháp theo sáng chế cải thiện đáng kể so với các kỹ thuật tinh chế IgG hiện có.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG tinh khiết chứa ít nhất 70% hàm lượng IgG tìm thấy trong nguyên liệu huyết tương thô ban đầu. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG tinh khiết chứa ít nhất 75% hàm lượng IgG được tìm thấy trong nguyên liệu huyết tương thô ban đầu. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất hỗn hợp IgG chứa ít nhất khoảng 65% hàm lượng IgG được tìm thấy trong nguyên liệu huyết tương thô ban đầu, hoặc ít nhất 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75% hàm lượng IgG được tìm thấy trong nguyên liệu huyết tương thô ban đầu hoặc nhiều hơn.

A. Phương pháp tách phân đoạn dựa trên việc làm kết tủa bằng rượu có cải biến/sắc ký trao đổi ion

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cải tiến sản xuất chế phẩm IgG thích hợp để dùng trong điều trị IVIG. Nói chung, các phương pháp này tạo ra các chế phẩm IgG có hiệu suất cao và có độ tinh khiết bằng, hoặc cao hơn, các phương pháp hiện đang được áp dụng để sản xuất các sản phẩm IVIG thương mại.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm IgG cô đặc từ huyết tương, ví dụ, 10% IVIG, phương pháp này bao gồm việc thực hiện ít nhất một bước làm kết tủa bằng rượu và ít nhất một bước sắc ký trao đổi ion. Cụ thể, nhiều bước trong cải tiến quy trình nêu trên khác với các quy trình trước đây, ví dụ, sử dụng 25% etanol ở nhiệt độ thấp hơn, bổ sung etanol vào bằng cách phun, điều chỉnh độ pH bằng cách phun, và sử dụng các hạt silic oxit đã được nghiền mịn.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước (a) làm kết tủa phân đoạn có ít plasmit trong điều kiện lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 6% đến 10% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để thu được phần dịch nổi giàu IgG, (b) làm kết tủa IgG ra khỏi phần dịch nổi này bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở nhiệt độ thấp hơn và ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất, (c) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ nhất được tạo ra ở bước (b) để tạo ra huyền phù, (d) xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (c) bằng chất tẩy rửa, (e) làm kết tủa IgG ra khỏi huyền phù này bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ hai, (f) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ hai được tạo ra ở bước (e) để tạo ra huyền phù, (g) xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (f) bằng dung môi và/hoặc chất tẩy rửa, và (h) thực hiện ít nhất một bước tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi ion, nhờ đó tạo ra chế phẩm IgG cô đặc. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (c) bằng silic đioxit đã được nghiền mịn (SiO_2) và lọc dung dịch trước bước (d).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chế phẩm IgG cô đặc từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước (a) điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh đến khoảng 7,0, (b) điều chỉnh nồng độ etanol của phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh ở bước (a) đến hoặc đến khoảng 25% (thể tích/thể tích) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến -9°C , bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, trong đó nồng độ etanol có thể được điều chỉnh bằng cách phun, (c) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (b), (d) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thu được ở bước (c) bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng axit axetic bằng với lượng nằm trong khoảng từ 400mL đến 700mL tính cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra huyền phù, (e) trộn silic đioxit đã nghiền mịn (SiO_2) với huyền phù thu được ở bước (d) trong thời gian ít nhất khoảng 30 phút, (f) lọc huyền phù bằng máy lọc ép, bằng cách đó tạo ra dịch lọc, (g) rửa máy lọc ép bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat với thể tích ít nhất bằng 3 lần thể tích chết của máy lọc ép, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng khoảng 150mL axit axetic bằng tính cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra dung dịch rửa, (h) kết hợp dịch lọc thu

được ở bước (f) với dung dịch rửa thu được ở bước (g), bằng cách đó tạo ra dung dịch, và xử lý dung dịch này bằng chất tẩy rửa, (i) điều chỉnh độ pH của dung dịch thu được ở bước (h) đến khoảng 7,0 và bổ sung etanol vào đến nồng độ cuối bằng hoặc bằng khoảng 25%, bằng cách đó tạo ra chất kết tủa, trong đó nồng độ etanol và/hoặc độ pH có thể được điều chỉnh bằng cách phun (j) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (i), (k) hòa tan chất kết tủa trong dung dịch nước chứa dung môi hoặc chất tẩy rửa và duy trì dung dịch này trong ít nhất 60 phút, (l) cho dung dịch sau bước (k) đi qua cột sắc ký trao đổi cation và rửa giải protein được hấp thụ trên cột trong dung dịch giải hấp, (m) cho dung dịch giải hấp thu được ở bước (l) đi qua cột sắc ký trao đổi anion để tạo ra dòng thải (nghĩa là, dòng chảy qua), (n) cho dòng thải thu được ở bước (m) đi qua thiết bị lọc nano để tạo ra dịch lọc nano, (o) cho dịch lọc nano thu được ở bước (n) đi qua màng siêu lọc để tạo ra dịch siêu lọc, và (p) thẩm tách dịch siêu lọc thu được ở bước (o) dựa vào dung dịch đệm lọc thẩm tách để tạo ra dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 8% (khối lượng/thể tích) đến 22% (khối lượng/thể tích), bằng cách đó thu được chế phẩm IgG cô đặc. Theo một phương án, nhiệt độ ở bước (b) bằng -7°C hoặc khoảng -7°C . Theo một phương án cụ thể, dung dịch đệm huyền phù ở bước (d) được điều chỉnh bằng khoảng 600mL axit axetic băng.

Theo một số phương án, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 8% đến 12%, ví dụ, khoảng 8%, hoặc khoảng 9%, 10%, 11%, hoặc 12%. Theo một phương án được ưu tiên, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 10%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 11%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 12%. Theo các phương án khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 13% đến 17%, ví dụ khoảng 13%, hoặc khoảng 14%, 15%, 16%, hoặc 17%. Theo các phương án khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 18% đến 22%, ví dụ, khoảng 18%, hoặc khoảng 19%, 20%, 21%, hoặc 22%. Theo một phương án được ưu tiên, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 20%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc bằng

khoảng 21%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 22%.

Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế có thể có một số cải tiến ở hai hoặc nhiều bước tách phân đoạn nêu trên. Ví dụ, các phương án có thể bao gồm các cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, bước hòa tan phân đoạn II+III cải biến, và/hoặc bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ nhất là bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ nhất là bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo một phương án nữa, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ nhất là điều chỉnh độ pH của dung dịch sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ nhất là duy trì độ pH trong suốt quá trình bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan khác, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ nhất là duy trì độ pH trong suốt thời gian ủ kết tủa bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH của dung dịch. Theo một số phương án, bước làm kết tủa thứ nhất có thể được cải tiến bằng cách thực hiện nhiều hơn một trong số các cải tiến này. Các cải tiến khác có thể được thực hiện ở bước này sẽ được bộc lộ ở phần dưới đây khi thảo luận về bước làm kết tủa thứ nhất – phân đoạn I được cải biến. Bằng cách thực hiện một hoặc nhiều cải tiến nêu trên, giảm được lượng IgG hao hụt trong tách phân đoạn bằng cách làm kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất và/hoặc giảm được phân đoạn IgG bị biến tính không thuận nghịch trong bước làm kết tủa này.

Theo một phương án, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến là bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến là bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo một phương án nữa, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến là điều chỉnh độ pH của dung dịch sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến là duy trì độ pH trong suốt quá trình bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan khác, cải tiến được tạo ra ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải

biến là duy trì độ pH trong suốt thời gian ủ kết tủa bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH của dung dịch. Theo một khía cạnh khác, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến được cải tiến bằng cách gia tăng nồng độ rượu đến bằng hoặc bằng khoảng 25%. Theo một phương án khác nữa, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến được cải tiến bằng cách hạ nhiệt độ ủ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Theo một số phương án, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến có thể được cải tiến bằng cách thực hiện nhiều hơn một trong số các cải tiến này. Các cải tiến khác có thể được thực hiện ở bước này sẽ được bộc lộ ở phần dưới đây khi thảo luận về bước làm kết tủa thứ hai – Phân đoạn II+III cải biến. Bằng cách thực hiện một hoặc nhiều cải tiến nêu trên, giảm được lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến và/hoặc giảm được phân đoạn IgG bị biến tính không thuận nghịch trong bước làm kết tủa này.

Theo một phương án, cải tiến được tạo ra ở bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến đạt được bằng cách gia tăng hàm lượng axit axetic bằng của dung dịch đệm hòa tan đến khoảng 0,06%. Theo một phương án khác, cải tiến được tạo ra ở bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến đạt được bằng cách duy trì độ pH của dung dịch trong suốt thời gian ủ hòa tan bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH của dung dịch. Theo một phương án khác, cải tiến được tạo ra ở bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến đạt được bằng cách trộn silic đioxit đã nghiền mịn (SiO_2) với huyền phù Phân đoạn II+III trước khi lọc. Theo một số phương án, bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến có thể được cải tiến bằng cách thực hiện nhiều hơn một trong số các cải tiến này. Các cải tiến khác có thể được thực hiện ở bước này sẽ được bộc lộ dưới đây khi thảo luận về bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến – Chiết chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến. Bằng cách thực hiện một hoặc nhiều cải tiến nêu trên, lượng IgG thu được trong huyền phù Phân đoạn II+III tăng lên và/hoặc lượng tạp chất trong huyền phù Phân đoạn II+III giảm đi.

Ví dụ về cải tiến được tạo ra ở bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến được thực hiện bằng cách rửa thiết bị lọc sau khi lọc bằng dung dịch đệm hòa tan với thể tích ít nhất bằng 3,6 thể tích chết chứa hoặc chứa khoảng 150mL axit axetic bằng cho 1000L. Các cải tiến khác có thể được thực hiện ở bước này sẽ được bộc lộ ở phần

dưới đây khi thảo luận về bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến – Xử lý sơ bộ và lọc Huyền phù Phân đoạn II+III cải biến. Bằng cách thực hiện một hoặc nhiều cải tiến nêu trên, giảm được lượng IgG hao hụt trong bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất và bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất và bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến và bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, và bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất, bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến, và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến, và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án khác, phương pháp này có thể có cải tiến ở tất cả các bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến, và bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một số phương án, cải tiến quy trình trong phương pháp tinh chế IgG theo sáng chế bao gồm việc bổ sung vào bằng cách phun một hoặc nhiều dung dịch vào mà theo cách khác sẽ được đưa vào phân đoạn huyết tương bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Ví dụ, theo một số phương án, việc cải tiến quy trình bao gồm bổ sung rượu (ví dụ, etanol) vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun nhằm mục đích làm kết tủa một hoặc nhiều loại protein. Theo các phương án khác, dung dịch có thể được thêm vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch làm thay đổi độ pH, dung dịch dung môi, dung dịch tẩy rửa, dung dịch đệm pha loãng, dung dịch thay đổi độ dẫn điện riêng, và các dung dịch tương tự. Theo một phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều bước làm kết tủa bằng rượu được thực hiện bằng cách bổ sung rượu vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun. Theo một phương án được ưu tiên thứ hai, một hoặc nhiều bước điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun.

Theo một số phương án, một cải tiến quy trình khác, mà có thể được kết hợp với một cải tiến quy trình khác bất kỳ, bao gồm điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương đang được làm kết tủa sau khi và/hoặc đồng thời với việc bổ sung tác nhân làm kết tủa (ví dụ, rượu hoặc polyetelen glycol). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất cải tiến quy trình, trong đó độ pH của phân đoạn huyết tương đang được làm kết tủa một cách tích cực được duy trì trong toàn bộ bước ủ hoặc bước giữ bằng cách giám sát và điều chỉnh độ pH một cách liên tục. Theo các phương án được ưu tiên, việc điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH bằng cách phun.

Theo các phương án khác, một cải tiến quy trình khác, mà có thể được kết hợp với một cải tiến quy trình khác bất kỳ, bao gồm việc áp dụng bước xử lý bằng silic oxit đã được nghiên cứu để loại bỏ tạp chất.

1. Điều chế huyết tương lạnh nồng độ thấp

Nguyên liệu ban đầu được dùng để điều chế chế phẩm IgG cô đặc thường bao gồm huyết tương thu hồi được (nghĩa là, huyết tương được tách từ máu nguyên vẹn *ex vivo*) hoặc huyết tương nguồn (nghĩa là, huyết tương thu được bằng cách tách hồng cầu ra khỏi huyết tương). Quy trình tinh chế thường bắt đầu bằng cách làm tan giá phần gom huyết tương đã được đông lạnh trước đó, đã được phân tích về tính an toàn và chất lượng. Bước làm tan giá thường được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn 6°C. Sau khi làm tan giá hoàn toàn huyết tương đã lạnh đông ở nhiệt độ thấp, thực hiện ly tâm trong điều kiện lạnh (ví dụ, $\leq 6^{\circ}\text{C}$) để tách chất kết tủa rắn ở nhiệt độ thấp ra khỏi phần dịch nổi ở dạng lỏng. Theo cách khác, bước tách có thể được thực hiện bằng cách lọc mà không phải là ly tâm. Tiếp theo, phần dịch nổi ở dạng lỏng (còn được gọi là “huyết tương nghèo lạnh” sau khi loại bỏ protein không hòa tan trong điều kiện lạnh bằng cách ly tâm từ huyết tương mới được làm tan giá) được xử lý trong bước tiếp theo. Nhiều bước khác nữa có thể được thực hiện tại thời điểm này để phân lập hoạt chất tránh chất ức chế yếu tố tám (phức hợp kháng chất ức chế đông máu) (factor eight inhibitor bypass activity - FEIBA), phức hợp Yếu tố IX, dịch cô đặc Yếu tố VII, hoặc phức hợp Antitrombin III.

2. Bước làm kết tủa thứ nhất – Tách phân đoạn I cải biến

Ở bước này, huyết tương nghèo kết tủa lạnh thường được làm lạnh đến khoảng $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và độ pH được điều chỉnh đến nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,3, tốt nhất là khoảng 7,2. Theo một phương án, độ pH của huyết tương nghèo kết tủa lạnh được điều chỉnh đến độ pH bằng hoặc bằng khoảng 7,2. Tiếp theo, etanol đã được làm lạnh từ trước được bổ sung vào trong khi huyết tương được khuấy đến nồng độ etanol đích bằng hoặc bằng khoảng 8% thể tích/thể tích. Cùng lúc, nhiệt độ được giảm tiếp đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -4°C đến 0°C . Theo một phương án được ưu tiên, nhiệt độ được giảm đến bằng hoặc bằng khoảng -2°C , để kết tủa các tạp chất như α_2 -macroglobulin, β_{1A} - và β_{1C} -globulin, fibrinogen, và Yếu tố VIII. Thông thường, bước làm kết tủa này sẽ có thời gian giữ ít nhất là khoảng 1 giờ, mặc dù thời gian giữ ngắn hơn hoặc lâu hơn cũng có thể được áp dụng. Tiếp theo, phần dịch nổi (Phần dịch nổi I), lý tưởng là chứa toàn bộ

hàm lượng IgG có mặt trong huyết tương nghèo kết tủa lạnh, được thu hồi tiếp bằng cách ly tâm, lọc, hoặc phương pháp thích hợp khác.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất cao trong phân đoạn Phân dịch nổi I so với các phương pháp thông thường khi được áp dụng cho bước tách phân đoạn thứ nhất đối với huyết tương nghèo kết tủa lạnh (xem tài liệu của Cohn và các đồng tác giả, nêu trên; và tài liệu của Oncley và các đồng tác giả, nêu trên). Theo một phương án, đạt được hiệu suất IgG cải thiện bằng cách bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, hiệu suất IgG cải thiện đạt được bằng cách bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo một phương án khác nữa, hiệu suất IgG cải thiện đạt được bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan, hiệu suất IgG cải thiện đạt được bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch trong suốt quá trình bổ sung rượu vào.

Theo một khía cạnh cụ thể, cải tiến liên quan đến phương pháp, trong đó lượng IgG hao hụt trong phân đoạn kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất giảm. Ví dụ, theo một số phương án, lượng IgG hao hụt trong phân đoạn kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất giảm so với lượng IgG hao hụt trong bước làm kết tủa thứ nhất của quy trình nêu ở phương pháp 6 của Cohn.

Theo một số phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5 sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,3 sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến khoảng 7,0 hoặc khoảng 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, hoặc 7,5 sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến khoảng 7,2 sau khi thêm rượu vào để làm kết tủa. Như vậy, theo một số phương án, lượng IgG hao hụt trong phân đoạn kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất giảm so với bước làm kết tủa tương tự trong đó độ pH của dung dịch được điều chỉnh trước khi chứ không phải sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án, độ pH được duy trì ở độ

pH mong muốn trong suốt thời gian giữ hoặc ủ kết tủa bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH của dung dịch. Theo một phương án, rượu là etanol.

Theo một số phương án, việc cải tiến quy trình thực hiện bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Như vậy, theo một số phương án, lượng IgG hao hụt trong phân đoạn kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất giảm so với bước làm kết tủa tương tự, trong đó rượu và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH được đưa vào bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo một phương án, rượu là etanol.

Theo một số phương án khác, việc cải tiến được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,3. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến bằng hoặc bằng khoảng 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, hoặc 7,5 sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa và bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến bằng hoặc bằng khoảng 7,2 sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa và bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo một phương án, rượu là etanol.

3. Bước làm kết tủa thứ hai – Phân đoạn II+III cải biến

Để làm giàu hàm lượng IgG hơn nữa và tinh chế phân đoạn, Phần dịch nổi I được đưa đến bước làm kết tủa thứ hai, là bước tách phân đoạn Phân đoạn II+III theo phương pháp Cohn-Oncley cải biến. Thông thường, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 6,6 đến 6,8. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến bằng hoặc bằng khoảng 6,7. Sau đó, rượu, tốt hơn là etanol, được bổ sung vào dung dịch trong khi khuấy đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 25% (thể tích/thể tích) để làm kết tủa IgG trong phân đoạn này. Theo một phương án được ưu tiên, rượu được thêm vào đến nồng độ cuối bằng

hoặc bằng khoảng 25% (thể tích/thể tích) để làm kết tủa IgG trong phân đoạn. Thông thường, các tạp chất như α_1 -lipoprotein, α_1 -antitrypsin, Gc-globulin, α_{1X} -glycoprotein, haptoglobulin, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, phân đoạn chứa yếu tố Christmas, globulin liên kết thyroxin, cholinesteraza, hypertensinogen, và albumin sẽ không bị kết tủa trong các điều kiện này.

Trước hoặc đồng thời với bước bổ sung rượu vào, dung dịch được làm lạnh tiếp đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Theo một phương án được ưu tiên, dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ bằng -7°C hoặc khoảng -7°C . Sau khi bổ sung xong rượu, độ pH của dung dịch ngay lập tức được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến bằng hoặc bằng khoảng 6,9. Thông thường, bước làm kết tủa sẽ bao gồm thời gian giữ ít nhất khoảng 10 giờ, mặc dù thời gian giữ ngắn hơn hoặc dài hơn cũng có thể được áp dụng. Tiếp theo, chất kết tủa (Phân đoạn II+III cải biến), lý tưởng là chứa ít nhất khoảng 85%, tốt hơn là ít nhất khoảng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 95%, hàm lượng IgG có mặt trong huyết tương nghèo kết tủa lạnh, được tách ra khỏi phần dịch nổi bằng cách ly tâm, lọc, hoặc phương pháp thích hợp khác và được thu nhận. So với các phương pháp thông thường được áp dụng làm bước tách phân đoạn thứ hai đối với huyết tương nghèo kết tủa lạnh (xem tài liệu của Cohn và các đồng tác giả, nêu trên; tài liệu của Oncley và các đồng tác giả, nêu trên), theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất cải thiện trong chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một phương án liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng IgG hao hụt trong phần dịch nổi II+III cải biến.

So với các phương pháp thông thường được áp dụng làm bước tách phân đoạn thứ hai đối với huyết tương nghèo kết tủa lạnh (xem tài liệu của Cohn và các đồng tác giả, nêu trên; tài liệu của Oncley và các đồng tác giả, nêu trên), theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất cải thiện trong chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một phương án, việc cải tiến được thực hiện bằng cách bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, việc cải tiến được thực hiện bằng cách bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, việc cải tiến được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của

dung dịch sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan, việc cải tiến được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch trong khi bổ sung rượu. Theo một phương án khác, việc cải tiến được thực hiện bằng cách gia tăng nồng độ rượu (ví dụ, etanol) đến khoảng 25% (thể tích/thể tích). Theo một phương án khác, việc cải tiến được thực hiện bằng cách giảm nhiệt độ của bước làm kết tủa đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Theo một phương án được ưu tiên, việc cải tiến được thực hiện bằng cách gia tăng nồng độ rượu (ví dụ, etanol) đến khoảng 25% (thể tích/thể tích) và giảm nhiệt độ này đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Để so sánh, cả Cohn và các đồng tác giả và Oncley và các đồng tác giả đều thực hiện kết tủa ở -5°C và Oncley và các đồng tác giả sử dụng 20% rượu, để làm giảm lượng tạp chất trong chất kết tủa. Theo cách có lợi, phương pháp theo sáng chế cho phép cực đại hóa hiệu suất IgG mà không kèm theo lượng tạp chất cao trong sản phẩm cuối.

Đã phát hiện ra rằng khi độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng 6,9 trước khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa, độ pH của dung dịch thay đổi từ 6,9 đến trị số nằm trong khoảng từ 7,4 đến 7,7, một phần là do sự kết tủa protein (xem Hình 8). Do độ pH của dung dịch thay đổi không còn là 6,9, nên việc làm kết tủa IgG trở nên kém thuận lợi và việc làm kết tủa một số tạp chất trở nên thuận lợi hơn. Theo cách có lợi, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa, tỷ lệ phần trăm IgG được thu hồi trong chất kết tủa Phân đoạn II+III là lớn hơn.

Do đó, theo một khía cạnh, cải tiến liên quan đến phương pháp trong đó giảm được lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến. Nói cách khác, tỷ lệ phần trăm của IgG ban đầu có mặt trong chất kết tủa Phân đoạn II+III tăng. Theo một số phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,1 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách duy trì độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,1 liên tục trong khoảng thời gian ủ kết tủa. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến trị số

nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa, hoặc đến độ pH bằng khoảng 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, hoặc 7,1 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến khoảng 6,9 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một số phương án, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0 liên tục trong khoảng thời gian ủ kết tủa, hoặc ở độ pH bằng khoảng 6,9 liên tục trong khoảng thời gian ủ kết tủa. Như vậy, theo một số phương án, lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa thứ hai giảm so với bước làm kết tủa tương tự trong đó độ pH của dung dịch được điều chỉnh trước khi mà không phải sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa hoặc giảm so với bước làm kết tủa tương tự trong đó độ pH của dung dịch không được duy trì trong toàn bộ khoảng thời gian ủ kết tủa. Theo một phương án, độ pH được duy trì ở độ pH mong muốn trong suốt thời gian giữ hoặc ủ kết tủa bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH của dung dịch. Theo một phương án, rượu là ethanol.

Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Như vậy, theo một số phương án, lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa thứ hai giảm so với bước làm kết tủa tương tự trong đó rượu và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH được đưa vào bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo một phương án, rượu là ethanol.

Theo một phương án khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách tiến hành bước làm kết tủa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Theo một phương án, bước làm kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ bằng -7°C hoặc khoảng -7°C . Theo một phương án khác, bước làm kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ bằng hoặc bằng khoảng -8°C . Theo một phương án khác, bước làm kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ bằng -9°C hoặc khoảng -9°C . Theo một số phương án, nồng độ rượu ở bước làm kết tủa nằm trong khoảng từ 23% đến 27%. Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ rượu nằm trong khoảng từ 24% đến 26%. Theo một phương án được ưu tiên khác, nồng độ rượu bằng hoặc bằng khoảng 25%. Theo các phương án khác, nồng độ

rượu có thể bằng hoặc bằng khoảng 23%, 24%, 25%, 26%, hoặc 27%. Theo một phương án cụ thể, bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở nhiệt độ bằng -7°C hoặc khoảng -7°C với nồng độ rượu bằng hoặc bằng khoảng 25%. Theo một phương án, rượu là etanol.

Hiệu quả của việc gia tăng nồng độ rượu ở bước làm kết tủa thứ hai từ 20%, như được áp dụng theo tài liệu của Oncley và các đồng tác giả, nêu trên, đến 25% và việc giảm nhiệt độ từ -5°C , như được sử dụng trong các phương pháp của Cohn và Oncley, đến -7°C hoặc khoảng -7°C làm tăng hàm lượng của IgG trong chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến từ 5 % đến 6%.

Theo một phương án khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,1, tốt hơn là bằng hoặc bằng khoảng 6,9, ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa, duy trì độ pH của dung dịch ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,1, tốt hơn là bằng hoặc bằng khoảng 6,9, bằng cách điều chỉnh độ pH liên tục trong suốt khoảng thời gian ủ kết tủa, và bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo một phương án cụ thể khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách tiến hành bước làm kết tủa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C , tốt hơn là -7°C hoặc khoảng -7°C và bằng cách làm kết tủa IgG với nồng độ rượu nằm trong khoảng từ 23% và khoảng 27%, tốt hơn là bằng hoặc bằng khoảng 25%. Theo một phương án cụ thể khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách kết hợp tất cả các cải tiến đối với Phân đoạn II+III cải biến được đề xuất ở trên. Theo một phương án được ưu tiên, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách làm kết tủa IgG ở nhiệt độ bằng -7°C hoặc khoảng -7°C bằng hoặc bằng khoảng 25% etanol được bổ sung vào bằng cách phun và tiếp theo điều chỉnh độ pH của dung dịch đến bằng hoặc bằng khoảng 6,9 sau khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch được duy trì bằng hoặc bằng khoảng 6,9 trong toàn bộ thời gian ủ hoặc giữ kết tủa.

4. Chiết chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến

Để hòa tan hàm lượng IgG của chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, dung dịch đệm chiết đã làm lạnh được sử dụng để tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa Phân đoạn II+III ở tỷ lệ thông thường là 1 phần chất kết tủa với 15 phần dung dịch đệm chiết. Các tỷ lệ tạo huyền phù lại thích hợp khác có thể được áp dụng, ví dụ như ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1:8 đến 1:30, hoặc nằm trong khoảng từ 1:10 đến 1:20, hoặc nằm trong khoảng từ 1:12 đến 1:18, hoặc nằm trong khoảng từ 1:13 đến 1:17, hoặc nằm trong khoảng từ 1:14 đến 1:16. Theo một số phương án, tỷ lệ tạo huyền phù lại có thể là khoảng 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, hoặc cao hơn.

Dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa II+III cải biến thường có độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5. Theo một số phương án, dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0, theo các phương án khác, dung dịch chiết có độ pH bằng khoảng 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, hoặc 5,5. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng hoặc bằng khoảng 4,5. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng hoặc bằng khoảng 4,7. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm chiết bằng hoặc bằng khoảng 4,9. Thông thường, có thể đạt được yêu cầu về độ pH như vậy bằng cách sử dụng chất đệm được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, axetat, xitrat, monobasic phosphat, điaxit phosphat, hỗn hợp của chúng, và các chất đệm tương tự. Nồng độ chất đệm thích hợp thường nằm trong khoảng từ 5mM đến 100mM, hoặc nằm trong khoảng từ 10mM đến 50mM, hoặc khoảng 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM, hoặc 100mM chất đệm.

Tốt hơn là, dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện riêng nằm trong khoảng từ $0,5\text{mS.cm}^{-1}$ đến $2,0\text{mS.cm}^{-1}$. Ví dụ, theo một số phương án, độ dẫn điện riêng của dung dịch đệm chiết bằng khoảng $0,5\text{mS.cm}^{-1}$, hoặc khoảng 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, hoặc khoảng $2,0\text{mS.cm}^{-1}$. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực sẽ biết rõ cách tạo ra dung dịch đệm chiết có độ dẫn điện riêng thích hợp.

Theo một phương án cụ thể, ví dụ về dung dịch đệm chiết có thể chứa hoặc chứa khoảng 5mM natri phosphat monobazơ và chứa hoặc chứa khoảng 5mM axetat ở độ pH bằng hoặc bằng khoảng $4,5 \pm 0,2$ và độ dẫn điện riêng bằng hoặc bằng khoảng 0,7 đến 0,9mS/cm.

Thông thường, bước chiết được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C, hoặc nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Theo một số phương án, bước chiết có thể được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, hoặc 10°C. Theo một phương án cụ thể, bước chiết được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 10°C. Thông thường, quy trình chiết được tiến hành trong khoảng thời gian từ 60 đến 300 phút, hoặc từ 120 đến 240 phút, hoặc từ 150 đến 210 phút, trong khi huyền phù được khuấy liên tục. Theo một số phương án, quy trình chiết được tiến hành trong khoảng 60 phút, 70 phút, 80 phút, 90 phút, 100 phút, 110 phút, 120 phút, 130 phút, 140 phút, 150 phút, 160 phút, 170 phút, 180 phút, 190 phút, 200 phút, 210 phút, 220 phút, 230 phút, 240 phút, 250 phút, 260 phút, 270 phút, 280 phút, 290 phút, hoặc khoảng 300 phút. Theo một phương án được ưu tiên, quy trình chiết được tiến hành trong ít nhất 160 phút kèm theo khuấy liên tục.

Đã phát hiện ra rằng khi sử dụng dung dịch đệm chiết chứa 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và từ 0,051% đến 0,06% axit axetic băng (thể tích/thể tích), có thể làm tăng đáng kể hiệu suất trong hỗn hợp IgG cuối cùng mà không ảnh hưởng xấu đến độ tinh khiết của sản phẩm cuối. Mối tương quan giữa axit axetic và độ pH của dung dịch đệm chiết đã được thể hiện trên Hình 9. Theo một phương án được ưu tiên, chất kết tủa Phân đoạn II+III được chiết bằng tỷ lệ phần giữa dịch đặc và dung dịch đệm bằng hoặc bằng khoảng 1:15 ở độ pH bằng hoặc bằng khoảng $4,5 \pm 0,2$.

Theo cách có lợi, đã phát hiện ra rằng so với quy trình sản xuất GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare) hiện thời sử dụng dung dịch đệm chiết chứa 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và 0,051% axit axetic băng (thể tích/thể tích), thì có thể làm tăng đáng kể hiệu suất trong chế phẩm IgG cuối bằng cách tăng hàm lượng axit axetic băng đến bằng hoặc bằng khoảng 0,06% (thể tích/thể tích),. So với các phương pháp đã dùng trước đây để chiết chất kết tủa tạo ra ở bước

làm kết tủa thứ hai (GAMMAGARD® LIQUID), theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất được cải thiện trong huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một khía cạnh, cải tiến liên quan đến phương pháp, trong đó lượng IgG hao hụt trong phân đoạn không tan của chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến là giảm. Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách chiết chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến ở tỷ lệ 1:15 (chất kết tủa so với dung dịch đệm) bằng dung dịch chứa 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và 0,06% axit axetic bằng (thể tích/thể tích). Theo một phương án khác, việc cải tiến được thực hiện bằng cách duy trì độ pH của dung dịch trong toàn bộ quy trình chiết. Theo một phương án, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 4,1 đến 4,9 trong toàn bộ quy trình chiết. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 4,2 và khoảng 4,8 trong toàn bộ quy trình chiết. Theo một phương án được ưu tiên hơn, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 4,3 đến 4,7 trong toàn bộ quy trình chiết. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 4,4 đến 4,6 trong toàn bộ quy trình chiết. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch được duy trì ở hoặc ở khoảng 4,5 trong toàn bộ quy trình chiết.

Theo một khía cạnh khác, cải tiến liên quan đến phương pháp, trong đó lượng IgG hòa tan từ chất kết tủa Phân đoạn II+III trong bước hòa tan Phân đoạn II+III tăng. Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách hòa tan chất kết tủa Phân đoạn II+III trong dung dịch đệm chứa 600mL axit axetic bằng cho 1000L. Theo một phương án khác, cải tiến liên quan đến phương pháp, trong đó tạp chất giảm sau khi IgG trong chất kết tủa Phân đoạn II+III được hòa tan. Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách trộn silic đioxit đã nghiền mịn (SiO_2) với huyền phù Phân đoạn II+III trong thời gian ít nhất khoảng 30 phút.

5. Xử lý sơ bộ và lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến

Để loại bỏ phân đoạn không tan của chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến (nghĩa là, bánh lọc Phân đoạn II+III cải biến), huyền phù được lọc, thường là bằng cách áp dụng lọc sâu. Các thiết bị lọc sâu có thể được sử dụng trong các phương pháp

theo sáng chế bao gồm, thiết bị lọc sâu bằng kim loại, thủy tinh, gốm, hữu cơ (như diatomit), và các thiết bị lọc sâu tương tự. Ví dụ về các thiết bị lọc thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thiết bị lọc Cuno 50SA, Cuno 90SA, và Cuno VR06 (Cuno). Theo cách khác, bước tách có thể được thực hiện bằng cách ly tâm hơn là lọc.

Mặc dù các cải tiến trong quy trình sản xuất nêu trên làm giảm thiểu hao hụt IgG trong các bước ban đầu của quy trình tinh chế, các tạp chất quan trọng, bao gồm các hoạt chất PKA, hoạt chất phân giải amit, và fibrinogen, là cao hơn nhiều, ví dụ, khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH 4,5 hoặc độ pH 4,6, so với khi ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,0 (xem Ví dụ 2 đến Ví dụ 5).

Để hạn chế việc chiết các tạp chất trong các phương pháp theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng độ tinh khiết của chế phẩm IgG có thể tăng lên rất nhiều bằng cách bổ sung bước xử lý sơ bộ trước bước lọc/ly tâm. Theo một phương án, bước xử lý sơ bộ này bao gồm bổ sung các hạt silic đioxit đã được nghiền mịn (ví dụ, silic oxit dạng khói, Aerosil®) vào, sau đó ủ trong khoảng thời gian từ 40 đến 80 phút, trong khoảng thời gian này huyền phù được trộn liên tục. Theo một số phương án, thời gian ủ nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút, hoặc khoảng 30 phút, 35 phút, 40 phút, 45 phút, 50 phút, 55 phút, 60 phút, 65 phút, 70 phút, 75 phút, 80 phút, hoặc lâu hơn. Thông thường, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 10°C, hoặc nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Theo một số phương án, việc xử lý có thể được thực hiện ở khoảng 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, hoặc 10°C. Theo một phương án cụ thể, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 10°C.

Hiệu quả của việc xử lý bằng silic oxit dạng khói được minh họa bằng các kết quả được thấy trong Ví dụ 17. Trong ví dụ này, chất kết tủa Phân đoạn II+III được tạo huyền phù và chia thành hai mẫu, một mẫu được làm trong bằng chất trợ lọc chỉ ngay trước khi lọc (Hình 7A) và một mẫu được xử lý bằng silic oxit dạng khói trước khi bổ sung chất trợ lọc và lọc vào (Hình 7B). Như có thể thấy trong phổ sắc ký và trong dữ liệu định lượng, mẫu dịch lọc được xử lý sơ bộ bằng silic oxit dạng khói có độ tinh khiết IgG cao hơn nhiều so với mẫu chỉ được xử lý bằng chất trợ lọc (68,8% so với 55,7%; Các bảng so sánh 17 và 18, tương ứng).

Theo một số phương án, silic oxit dạng khối được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/kg dịch đặc II+III đến 100g/kg dịch đặc II+III (nghĩa là, đối với chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến được chiết ở tỷ lệ 1:15, silic oxit dạng khối cần phải được bổ sung vào ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20g/16kg huyền phù II+III đến 100g/16kg huyền phù II+III, hoặc ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,125% (khối lượng/khối lượng) đến khoảng 0,625% (khối lượng/khối lượng)). Theo một số phương án, silic oxit dạng khối có thể được bổ sung vào ở nồng độ bằng khoảng 20g/kg dịch đặc II+III, hoặc khoảng 25g/kg, 30g/kg, 35g/kg, 40g/kg, 45g/kg, 50g/kg, 55g/kg, 60g/kg, 65g/kg, 70g/kg, 75g/kg, 80g/kg, 85g/kg, 90g/kg, 95g/kg, hoặc 100g/kg dịch đặc II+III. Theo một phương án cụ thể, silic oxit dạng khối (ví dụ, Aerosil 380 hoặc chế phẩm tương đương) được bổ sung vào huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến đến nồng độ cuối bằng khoảng 40g/16kg II+III. Bước trộn được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong ít nhất từ 50 đến 70 phút.

Theo một số phương án, chất trợ lọc, ví dụ Celpure C300 (do Celpure cung cấp) hoặc Hyflo-Supper-Cel (do World Minerals cung cấp), được bổ sung vào sau khi xử lý bằng silic đioxit, để tạo điều kiện thuận lợi cho việc lọc sâu. Chất trợ lọc có thể được bổ sung vào đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,1kg/kg dịch đặc II+III đến 0,07kg/kg dịch đặc II+III, hoặc nằm trong khoảng từ 0,2kg/kg dịch đặc II+III đến 0,06kg/kg dịch đặc II+III, hoặc nằm trong khoảng từ 0,3kg/kg dịch đặc II+III đến 0,05kg/kg dịch đặc II+III. Theo một số phương án, chất trợ lọc được bổ sung vào đến nồng độ cuối bằng khoảng 0,1kg/kg dịch đặc II+III, hoặc khoảng 0,2kg/kg, 0,3kg/kg, 0,4kg/kg, 0,5kg/kg, 0,6kg/kg, hoặc 0,7kg/kg dịch đặc II+III.

Phân đoạn đáng kể IgG bị hao hụt trong bước lọc của quy trình sản xuất GAMMAGARD® LIQUID. Đã phát hiện ra rằng các phương pháp rửa sau lọc hiện thời, bằng cách sử dụng dung dịch đệm huyền phù với lượng gấp 1,8 thể tích chết để rửa khung lọc ép và các đường ống, là không đủ để thu hồi một cách tối ưu lượng IgG ở bước này. Bất ngờ là, đã phát hiện ra rằng cần đến ít nhất 3,0 thể tích chết, tốt hơn là 3,6 thể tích chết, dung dịch đệm huyền phù để thu hồi hữu hiệu tổng lượng IgG trong huyền phù đã được làm trong Phân đoạn II+III cải biến (xem, Ví dụ 12 và Hình 1). Theo một số phương án, thiết bị lọc ép có thể được rửa bằng dung dịch đệm huyền

phù thích hợp. Theo một phương án cụ thể, dung dịch đệm rửa chứa, ví dụ, 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và 0,015% axit axetic băng (thể tích/thể tích).

Theo một khía cạnh, cải tiến liên quan đến phương pháp, trong đó giảm được lượng IgG hao hụt trong toàn bộ bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III. Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách lọc sau rửa bằng ít nhất khoảng 3,6 thể tích chất dung dịch đệm hòa tan chứa 150mL axit axetic băng cho 1000L. Mối quan hệ giữa lượng axit axetic băng và độ pH trong dung dịch đệm sau rửa được thể hiện trên Hình 10. Theo một phương án, độ pH của dung dịch đệm chiết sau rửa nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,3. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm sau rửa nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,2. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm sau rửa nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,1. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của dung dịch đệm sau rửa nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,0.

So với các phương pháp đã dùng trước đây để làm trong huyền phù được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ hai (GAMMAGARD® LIQUID), theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất và độ tinh khiết được cải thiện trong huyền phù Phân đoạn II+III đã làm trong. Theo một khía cạnh, cải tiến liên quan đến phương pháp trong đó giảm được lượng IgG hao hụt trong bánh lọc Phân đoạn II+III cải biến. Theo một khía cạnh khác, cải tiến liên quan đến phương pháp trong đó giảm được lượng tạp chất phát hiện trong huyền phù Phân đoạn II+III đã làm trong.

Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách đưa vào bước xử lý bằng silic oxit dạng khối trước khi lọc hoặc làm trong bằng cách ly tâm huyền phù Phân đoạn II+III cải biến. Theo một số phương án, xử lý bằng silic oxit dạng khối bao gồm bổ sung silic oxit dạng khối với lượng nằm trong khoảng từ 0,1kg/kg dịch đặc II+III đến 0,07kg/kg dịch đặc II+III, hoặc từ 0,2kg/kg dịch đặc II+III đến 0,06kg/kg dịch đặc II+III, hoặc từ 0,3kg/kg dịch đặc II+III đến 0,05kg/kg dịch đặc II+III, hoặc khoảng 0,2kg/kg, 0,3kg/kg, 0,4kg/kg, 0,5kg/kg, 0,6kg/kg, hoặc 0,7kg/kg dịch đặc II+III, và hỗn hợp được ủ trong thời gian nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút, hoặc khoảng 30 phút, 35 phút, 40 phút, 45 phút, 50 phút, 55 phút, 60 phút, 65 phút, 70 phút, 75 phút, 80 phút, hoặc lâu hơn ở nhiệt độ nằm trong khoảng

từ 2°C đến 8°C. Theo một phương án khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách đưa vào bước xử lý bằng silic oxit dạng khói giúp làm giảm lượng fibrinogen, chất có hoạt độ phân giải amit, và/hoặc chất có hoạt tính hoạt hóa prekallikrein còn lại.

Theo một phương án khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách rửa thiết bị lọc sâu bằng từ 3 đến 5 thể tích chết của thiết bị lọc sau khi hoàn tất bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến. Theo một số phương án, thiết bị lọc được rửa bằng từ 3,5 thể tích đến 4,5 thể tích, hoặc ít nhất khoảng 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 thể tích chết của thiết bị lọc. Theo một phương án cụ thể, thiết bị lọc ép được rửa bằng dung dịch đệm huyền phù với lượng ít nhất bằng khoảng 3,6 thể tích chết của thiết bị.

6. Xử lý bằng chất tẩy rửa

Để loại bỏ các tạp chất khác ra khỏi dịch lọc Phân đoạn II+III cải biến, mẫu được đưa tiếp đi xử lý bằng chất tẩy rửa. Các phương pháp để xử lý các phân đoạn có nguồn gốc từ huyết tương bằng chất tẩy rửa là đã biết trong lĩnh vực này. Thông thường, phương pháp xử lý bằng chất tẩy rửa không ion tiêu chuẩn có thể được sử dụng cùng với các phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, quy trình xử lý bằng chất tẩy rửa làm ví dụ được đưa ra dưới đây.

Một cách vắn tắt, polysorbate-80 được bổ sung vào dịch lọc Phân đoạn II+III cải biến ở nồng độ cuối bằng khoảng 0,2% (khối lượng/thể tích) đồng thời khuấy và mẫu được ủ trong ít nhất 30 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Tiếp theo, natri xitrat dehydrat được trộn vào dung dịch ở nồng độ cuối bằng khoảng 8g/L và mẫu được ủ tiếp trong 30 phút, đồng thời khuấy liên tục ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C.

Theo một số phương án, chất tẩy rửa không ion thích hợp có thể được sử dụng. Ví dụ về chất tẩy rửa không ion thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, octylglucosit, Digitonin, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (nghĩa là, polysorbate-20), Tween-80 (nghĩa là, polysorbate-80), an alkyl poly(etylen oxit), chất tẩy rửa Brij, alkylphenol poly(etylen oxit), poloxame, octyl glucosit, dexyl maltoside, và các chất tẩy rửa tương tự.

Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách bổ sung các chất phản ứng có tính tẩy rửa (ví dụ, polysorbate-80 và natri xitrat dehydrat) vào bằng cách phun mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo các phương án khác, các chất phản ứng có tính tẩy rửa có thể được bổ sung ở dạng rắn vào dịch lọc Phân đoạn II+III cải biến trong khi mẫu được trộn để đảm bảo phân phối nhanh chóng các chất phụ gia. Theo một số phương án, tốt hơn là bổ sung các chất phản ứng rắn vào bằng cách rắc các chất rắn này trên một diện tích bề mặt đã được khoanh vùng của dịch lọc sao cho không xảy ra hiện tượng tăng quá nồng độ cục bộ như trong trường hợp bổ sung vào dưới dạng dòng chảy.

7. Bước làm kết tủa thứ ba – Kết tủa G

Để loại bỏ một số protein nhỏ còn lại, như albumin và transferin, bước làm kết tủa thứ ba được thực hiện ở nồng độ 25% rượu. Một cách vắn tắt, độ pH của dịch lọc II+III được xử lý bằng chất tẩy rửa được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6,9 đến 7,1, tốt nhất là khoảng 7,0, bằng dung dịch làm thay đổi độ pH thích hợp (ví dụ, dung dịch natri hydroxit 1M hoặc axit axetic 1M). Sau đó, rượu lạnh được bổ sung vào dung dịch đến nồng độ cuối bằng khoảng 25% (thể tích/thể tích) và hỗn hợp này được ủ trong khi khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -6°C đến -10°C trong ít nhất 1 giờ để tạo ra chất kết tủa thứ ba (nghĩa là, chất kết tủa G). Theo một phương án, hỗn hợp này được ủ trong ít nhất 2 giờ, hoặc ít nhất 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 7 giờ, 8 giờ, 9 giờ, 10 giờ, 11 giờ, 12 giờ, 13 giờ, 14 giờ, 15 giờ, 16 giờ, 17 giờ, 18 giờ, 19 giờ, 20 giờ, 21 giờ, 22 giờ, 23 giờ, 24 giờ, hoặc lâu hơn. Theo một phương án được ưu tiên, hỗn hợp này được ủ trong ít nhất 2 giờ. Theo một phương án được ưu tiên hơn, hỗn hợp này được ủ trong ít nhất 4 giờ. Theo một phương án được ưu tiên hơn, hỗn hợp này được ủ trong ít nhất 8 giờ.

Theo một khía cạnh, cải tiến liên quan đến phương pháp, trong đó giảm được lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa thứ ba. Theo một số phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án khác, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách duy trì độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 6,8

đến 7,2 liên tục trong khoảng thời gian ủ kết tủa. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 6,9 đến 7,1 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa, hoặc đến độ pH bằng khoảng 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, hoặc 7,2 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến khoảng 7,0 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu vào để làm kết tủa. Theo một số phương án, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 6,9 đến 7,1 liên tục trong khoảng thời gian ủ kết tủa, hoặc ở độ pH bằng khoảng 7,0 liên tục trong khoảng thời gian ủ kết tủa. Như vậy, theo một số phương án, giảm được lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa thứ ba so với bước làm kết tủa tương tự trong đó độ pH của dung dịch được điều chỉnh trước, chứ không phải sau khi, thêm rượu vào để kết tủa hoặc so với bước làm kết tủa tương tự trong đó độ pH của dung dịch không được duy trì trong toàn bộ khoảng thời gian ủ kết tủa. Theo một phương án, độ pH được duy trì ở độ pH mong muốn trong suốt thời gian giữ hoặc ủ kết tủa bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH của dung dịch. Theo một phương án, rượu là etanol.

Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Như vậy, theo một số phương án, giảm được lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa thứ ba so với bước làm kết tủa tương tự trong đó rượu và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH được đưa vào bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo một phương án, rượu là etanol.

8. Tạo huyền phù và lọc chất kết tủa G (PptG)

Để hòa tan lượng IgG trong chất kết tủa G, dung dịch đậm chiết lạnh được sử dụng để tạo huyền phù lại PptG. Một cách ngắn gọn, chất kết tủa G được hoà tan từ 1 thành 3,5 trong nước để tiêm (water for injection - WFI) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 8°C để đạt được trị số AU₂₈₀₋₃₂₀ nằm trong khoảng từ 40 đến 95. Tiếp theo, độ pH cuối cùng của dung dịch mà được khuấy trong ít nhất 2 giờ được điều chỉnh đến bằng hoặc bằng khoảng $5,2 \pm 0,2$. Theo một phương án, việc điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng dung dịch axit axetic 1M. Để tăng độ hoà tan của IgG, độ dẫn

điện riêng của huyền phù được tăng đến trị số nằm trong khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm. Theo một phương án, độ dẫn điện riêng được tăng bằng cách bổ sung natri clorua vào. Tiếp theo, dung dịch PptG đã được tạo huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc sâu thích hợp có cỡ lỗ danh nghĩa nằm trong khoảng từ 0,1µm đến 0,4µm để loại bỏ các hạt không tan bất kỳ. Theo một phương án, cỡ lỗ danh nghĩa của thiết bị lọc sâu bằng khoảng 0,2µm (ví dụ, thiết bị lọc Cuno VR06 hoặc các thiết bị tương đương) để thu được dịch lọc trong. Theo một phương án khác, dung dịch PptG đã được tạo huyền phù được ly tâm để thu hồi phần dịch nổi trong. Bước rửa sau lọc được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch natri clorua có độ dẫn điện riêng nằm trong khoảng từ 2,5mS/cm đến 6,0mS/cm. Thông thường, dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa G bao gồm, WFI và dung dịch đệm có độ dẫn điện riêng thấp. Theo một phương án, dung dịch đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng thấp hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên, dung dịch đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng thấp hơn khoảng 9mS/cm, 8mS/cm, 7mS/cm, 6mS/cm, 5mS/cm, 4mS/cm, 3mS/cm, 2mS/cm, hoặc 1mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên, dung dịch đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng thấp hơn khoảng 6mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng thấp hơn khoảng 4mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên khác, dung dịch đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng thấp hơn khoảng 2mS/cm.

9. Xử lý tẩy rửa bằng dung môi

Để làm bất hoạt các tạp chất virus khác nhau có thể có mặt trong sản phẩm thu được từ huyết tương, dịch lọc PptG trong được đưa tiếp đi xử lý bằng dung môi tẩy rửa (S/D). Các phương pháp xử lý các phân đoạn thu được từ huyết tương bằng chất tẩy rửa là đã biết trong lĩnh vực này (xem tài liệu: Pelletier JP *et al.*, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(1):205-42). Thông thường, quy trình xử lý S/D chuẩn có thể được áp dụng cùng với các phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, quy trình xử lý S/D làm ví dụ được đưa ra dưới đây.

Một cách ngắn gọn, Triton X-100, Tween-20, và tri(n-butyl)phosphat (TNBP) được bổ sung vào dịch lọc PptG đã làm trong tương ứng ở nồng độ cuối bằng

khoảng 1,0%, 0,3%, và 0,3%. Sau đó, hỗn hợp này được khuấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 18°C đến 25°C trong ít nhất khoảng một giờ.

Theo một phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách bổ sung các chất phản ứng S/D (ví dụ, Triton X-100, Tween-20, và TNBP) vào bằng cách phun mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Theo các phương án khác, các chất phản ứng có tính tẩy rửa có thể được bổ sung dưới dạng rắn vào dịch lọc PptG đã được làm trong khi dịch lọc này được trộn để đảm bảo phân phối nhanh chóng các thành phần S/D. Theo một số phương án, tốt hơn là các chất phản ứng rắn được bổ sung vào bằng cách rắc các chất rắn này trên một diện tích bề mặt đã được khoanh vùng của dịch lọc sao cho không xảy ra hiện tượng nồng độ quá mức cục bộ, như trong trường hợp bổ sung vào dưới dạng dòng chảy.

10. Sắc ký trao đổi ion

Để tiếp tục tinh chế và cô IgG từ dịch lọc PptG đã được xử lý S/D, có thể áp dụng sắc ký trao đổi cation và/hoặc sắc ký trao đổi anion. Các phương pháp tinh chế và cô đặc IgG bằng cách áp dụng sắc ký trao đổi ion là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, patent Mỹ số 5,886,154 mô tả phương pháp, trong đó chất kết tủa Phân đoạn II+III được chiết ở độ pH thấp (nằm trong khoảng từ 3,8 đến 4,5), sau đó làm kết tủa IgG bằng cách sử dụng axit caprylic, và cuối cùng thực hiện hai bước sắc ký trao đổi anion. Patent Mỹ số 6,069,236 mô tả sơ đồ tinh chế IgG theo phương pháp sắc ký mà không hề dựa trên nguyên lý làm kết tủa bằng rượu. Công bố đơn PCT số WO 2005/073252 mô tả phương pháp tinh chế IgG bao gồm bước chiết chất kết tủa Phân đoạn II+III, xử lý bằng axit caprylic, xử lý bằng PEG, và bước sắc ký trao đổi anion duy nhất. Patent Mỹ số 7,186,410 mô tả phương pháp tinh chế IgG bao gồm chiết chất kết tủa Phân đoạn I+II+III hoặc chất kết tủa Phân đoạn II, tiếp theo là bước trao đổi anion duy nhất được thực hiện ở độ pH kiềm. Patent Mỹ số 7,553,938 mô tả phương pháp bao gồm bước chiết chất kết tủa Phân đoạn I+II+III hoặc Phân đoạn II+III, xử lý bằng caprylat, và một bước hoặc hai bước sắc ký trao đổi anion. Patent Mỹ số 6,093,324 mô tả phương pháp tinh chế bao gồm bước sử dụng nhựa trao đổi anion có cỡ lỗ to được thực hiện ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,6. Patent Mỹ số 6,835,379 mô tả phương pháp tinh chế dựa trên sắc ký trao đổi cation khi không có

bước tách phân đoạn bằng rượu. Toàn bộ nội dung của các công bố nêu trên được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, dịch lọc PptG đã được xử lý bằng S/D có thể được cho qua cả hai bước sắc ký trao đổi cation và sắc ký trao đổi anion. Ví dụ, theo một phương án, dịch lọc PptG đã được xử lý bằng S/D được cho qua cột trao đổi cation, liên kết với IgG trong dung dịch. Tiếp theo, các chất phản ứng S/D có thể được rửa ra khỏi IgG đã được hấp thụ, sau đó IgG này được rửa giải khỏi cột bằng dung dịch đệm rửa giải có độ pH cao nằm trong khoảng từ 8,0 đến 9,0. Theo cách này, bước sắc ký trao đổi cation có thể được áp dụng để loại bỏ các chất phản ứng S/D ra khỏi chế phẩm, cô dung dịch chứa IgG, hoặc đồng thời cả hai mục đích này. Theo một số phương án, dung dịch đệm rửa giải có độ pH cao có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 8,2 đến 8,8, hoặc nằm trong khoảng từ 8,4 đến 8,6, hoặc độ pH bằng khoảng 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, hoặc 9,0. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dung dịch đệm rửa giải bằng khoảng $8,5 \pm 0,1$.

Theo một số phương án, dung dịch rửa giải ra khỏi cột trao đổi cation có thể được điều chỉnh đến độ pH thấp hơn, ví dụ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, và được pha loãng bằng dung dịch đệm thích hợp sao cho độ dẫn điện riêng của dung dịch giảm. Theo một số phương án, độ pH của dịch rửa giải trao đổi cation có thể được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 5,7 đến 6,3, hoặc nằm trong khoảng từ 5,9 đến 6,1, hoặc độ pH bằng khoảng 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, hoặc 6,5. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của dịch rửa giải được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng $6,0 \pm 0,1$. Tiếp theo, dịch rửa giải được nạp vào cột trao đổi anion, cột này liên kết một số tạp chất được tìm thấy trong chế phẩm. Dòng chảy ra từ cột, chứa phân đoạn IgG, được thu hồi trong quá trình nạp vào cột và rửa. Theo một số phương án, các bước sắc ký trao đổi ion theo sáng chế có thể được thực hiện theo phương thức cột, phương thức mẻ, hoặc phương thức kết hợp cả hai phương thức này.

Theo một số phương án, việc cải tiến quy trình được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH bằng cách phun, mà không phải bổ sung vào ở dạng dòng chảy.

11. Lọc nano và siêu lọc/lọc thẩm tách

Để giảm tiếp lượng virus chứa trong chế phẩm IgG theo sáng chế, dung dịch rửa giải dùng cho cột trao đổi anion có thể được lọc nano bằng cách sử dụng thiết bị lọc nano thích hợp. Theo một số phương án, thiết bị lọc nano có cỡ lỗ trung bình nằm trong khoảng từ 15nm đến 200nm. Ví dụ về thiết bị lọc nano thích hợp để dùng cho mục đích này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (do Millipore cung cấp), Planova 15N, 20N, 35N, và 75N (do Planova cung cấp). Theo một phương án cụ thể, thiết bị lọc nano có thể có cỡ lỗ trung bình nằm trong khoảng từ 15nm đến 72nm, hoặc nằm trong khoảng từ 19nm đến 35nm, hoặc khoảng 15nm, 19nm, 35nm, hoặc 72nm. Theo một phương án được ưu tiên, thiết bị lọc nano có cỡ lỗ trung bình bằng khoảng 35nm, như thiết bị lọc Asahi PLANOVA 35N hoặc thiết bị tương đương với nó.

Tuỳ ý, bước siêu lọc/lọc thẩm tách có thể được thực hiện để cô đặc tiếp dịch lọc nano. Theo một phương án, một màng kênh mở được sử dụng cùng với một bước rửa sau đó và chế phẩm được thiết kế đặc trưng gần cuối của quy trình sản xuất giúp tạo ra chế phẩm IgG có nồng độ protein cao gấp khoảng hai lần (200mg/mL) so với nồng độ protein của chế phẩm IVIG đã biết (ví dụ, GAMMAGARD® LIQUID) mà không làm ảnh hưởng đến hiệu suất và độ ổn định khi bảo quản. Với hầu hết các màng siêu lọc thương mại sẵn có, không thể đạt được nồng độ IgG 200mg/mL mà không làm hao hụt đáng kể protein. Các màng này sẽ sớm bị tắc và do đó khó có thể thực hiện được bước rửa sau đó một cách thích hợp. Vì vậy, phải sử dụng cấu hình màng kênh mở. Ngay cả với màng kênh mở, phải áp dụng một quy trình sau rửa được thiết kế một cách đặc trưng để đạt được nồng độ mong muốn mà không làm hao hụt đáng kể protein (lượng hao hụt ít hơn 2%). Thậm chí, điều đáng ngạc nhiên hơn là nồng độ protein cao hơn đến 200mg/mL không làm ảnh hưởng đến khả năng làm bất hoạt virus của bước bảo quản ở độ pH thấp.

Sau khi lọc nano, dịch lọc có thể được cô đặc tiếp bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo một phương án, dịch lọc nano có thể được cô đặc bằng cách siêu lọc đến nồng độ protein nằm trong khoảng từ 2% đến 10% (khối lượng/thể tích). Theo một số phương án, bước siêu lọc được thực hiện trong kết cấu với sàng kênh mở và màng

siêu lọc có giới hạn phân tử lượng danh nghĩa (nominal molecular weight cut off - NMWCO) thấp hơn khoảng 100kDa hoặc thấp hơn khoảng 90kDa, 80kDa, 70kDa, 60kDa, 50kDa, 40kDa, 30kDa hoặc thấp hơn nữa. Theo một phương án được ưu tiên, màng siêu lọc có NMWCO không lớn hơn 50kDa.

Sau khi hoàn thành bước siêu lọc, dịch cô đặc có thể được cô tiếp bằng cách lọc thẩm tách bằng dung dịch thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch hoặc tiêm bắp. Theo một số phương án, dung dịch lọc thẩm tách có thể chứa chất làm ổn định và/hoặc chất đệm. Theo một phương án được ưu tiên, chất làm ổn định và chất đệm là glyxin ở nồng độ thích hợp, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,20M đến 0,30M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,22M đến 0,28M, hoặc nằm trong khoảng từ 0,24M đến 0,26M, hoặc ở nồng độ bằng khoảng 2,0M, 2,1M, 2,2M, 2,3M, 2,4M, 2,5M, 2,6M, 2,7M, 2,8M, 2,9M, hoặc 3,0M. Theo một phương án được ưu tiên, dung dịch đệm lọc thẩm tách chứa hoặc chứa khoảng 0,25M glyxin.

Thông thường, thể tích trao đổi cực đại gấp ít nhất khoảng 3 lần thể tích dịch cô đặc ban đầu hoặc ít nhất khoảng 4, 5, 6, 7, 8, 9 lần thể tích dịch cô đặc ban đầu hoặc nhiều hơn. Dung dịch IgG có thể được cô đến nồng độ protein cuối cùng nằm trong khoảng từ 5% đến 25% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 18% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 16% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 8% đến 14% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 9% đến 12%, hoặc đến nồng độ cuối bằng khoảng 5%, hoặc 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% hoặc cao hơn. Theo một phương án, đạt được nồng độ protein cuối ít nhất bằng khoảng 23% mà không cần bổ sung phân đoạn rửa sau đó vào dung dịch được cô. Theo một phương án khác, đạt được nồng độ protein cuối ít nhất bằng khoảng 24% mà không cần bổ sung phân đoạn sau rửa vào dung dịch được cô. Nồng độ protein cuối ít nhất bằng khoảng 25% đạt được mà không cần bổ sung phân đoạn sau rửa vào dung dịch được cô. Thông thường, ở cuối quy trình cô đặc, độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,1.

Theo một phương án được minh họa bằng ví dụ, độ pH của chế phẩm IgG được điều chỉnh đến khoảng 4,5 trước khi siêu lọc. Dung dịch này được cô đến nồng

độ protein bằng $5 \pm 2\%$ khối lượng/thể tích bằng cách siêu lọc. Màng UF có giới hạn phân tử lượng danh nghĩa (NMWCO) bằng 50.000 Dalton hoặc thấp hơn (màng Polyether sulfon Pellicon do Millipore cung cấp). Dịch cô đặc được lọc thẩm tách bằng mười lần thể tích dung dịch glyxin 0,25M, độ pH = $4,5 \pm 0,2$. Trong toàn bộ thời gian siêu lọc thẩm tách, dung dịch này được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Sau bước lọc thẩm tách, dung dịch này được cô đến nồng độ protein ít nhất bằng 11% (khối lượng/thể tích).

12. Chế phẩm

Sau khi hoàn thành bước lọc thẩm tách, nồng độ protein của dung dịch được điều chỉnh bằng dung dịch đệm lọc thẩm tách đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 5% đến 20% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 6% đến 18% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 16% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 8% đến 14% (khối lượng/thể tích), hoặc nằm trong khoảng từ 9% đến 12%, hoặc đến nồng độ cuối bằng khoảng 5%, hoặc 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, hoặc 20%. Theo một phương án được ưu tiên, nồng độ protein cuối của dung dịch nằm trong khoảng từ 9% đến 11%, tốt hơn nữa là khoảng 10%.

Khối dung dịch đã bào chế được vô trùng tiếp bằng cách lọc qua thiết bị lọc màng có cỡ lỗ tuyệt đối không lớn hơn khoảng 0,22 micron, ví dụ khoảng 0,2 micron. Tiếp theo, dung dịch này được nạp vô khuẩn vào trong thùng chứa cuối cùng để bịt kín một cách thích hợp, đồng thời lấy mẫu để kiểm tra.

Theo một phương án, chế phẩm IgG được điều chỉnh tiếp đến nồng độ khoảng $10,2 \pm 0,2\%$ (khối lượng/thể tích) bằng dung dịch đệm lọc thẩm tách. Nếu cần, độ pH được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 4,4 đến 4,9. Cuối cùng, dung dịch này được lọc vô trùng và được ủ trong ba tuần ở nhiệt độ bằng hoặc bằng khoảng 30°C.

13. Bổ sung rượu vào

Phát hiện ra rằng, theo cách có lợi, nhằm để tách phân đoạn IgG ra khỏi huyết tương, việc bổ sung rượu vào bằng cách phun mà không bổ sung vào ở dạng dòng

chảy làm giảm sự hao hụt hiệu suất IgG. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, trong quá trình bổ sung vào phân đoạn huyết tương, nồng độ rượu cục bộ cao quá mức tạm thời ở đầu chất lỏng đi vào có thể dẫn đến sự biến tính và sự hao hụt và/hoặc làm kết tủa không thuận nghịch IgG trong các bước mà trong đó IgG lẽ ra vẫn còn ở trong phần dịch nổi. Hơn nữa, tác động này có thể được khuếch đại khi rượu cần được bổ sung vào với thể tích lớn, như trong quy trình tinh chế ở quy mô công nghiệp bao gồm bước tách phân đoạn ít nhất 100l huyết tương được gộp lại.

Hiệu quả của việc bổ sung rượu vào bằng cách phun được minh họa bằng ví dụ trong Ví dụ 14, trong đó các mẫu huyết tương nghèo kết tủa lạnh được làm kết tủa bằng 8% etanol được đưa vào bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy (1 và 2) hoặc bổ sung vào bằng cách phun (3 và 4). Như có thể thấy trong Bảng 14, gần như 100% IgG có mặt trong huyết tương nghèo kết tủa lạnh được thu hồi trong phần dịch nổi khi etanol được thêm vào mẫu bằng cách phun, trong khi từ 4 đến 5% IgG bị hao hụt khi bổ sung rượu vào ở dạng dòng chảy. Điều này dẫn đến lượng IgG hao hụt nằm trong khoảng từ 0,20g/L đến 0,25g/L chỉ tính riêng ở bước này. Với sản lượng sản xuất của năm 2007, điều này có nghĩa là hao hụt khoảng 5,3 triệu gam (5.300 kilogam) IgG. Với giá IVIG trên thị trường hiện nay, dao động từ 50\$ đến 100\$ mỗi gam, mức hao hụt từ 4% đến 5% ở bước này khiến cho tổn thất kinh tế toàn cầu hàng năm lên tới nửa tỷ đôla.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp trong đó một hoặc nhiều bước làm kết tủa được thực hiện bằng cách bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một số phương án, việc bổ sung vào bằng cách phun có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị có áp suất bất kỳ, như vật chứa (ví dụ, bình phun), có đầu phun hoặc vòi phun và được vận hành bằng tay hoặc tự động để biến chất lỏng thành dạng mù cực mịn từ. Theo một số phương án, việc bổ sung vào bằng cách phun được thực hiện trong khi hệ thống được khuấy liên tục hoặc theo cách khác được trộn để đảm bảo sự phân bố chất lỏng nhanh và đều trong hệ thống.

14. Điều chỉnh độ pH

Profin kết tủa protein của các phân đoạn huyết tương phụ thuộc nhiều vào độ pH của dung dịch mà từ đó protein huyết tương được làm kết tủa. Điều này đã được

khai thác bởi các nhà khoa học khi tách phân đoạn protein huyết tương từ khi đưa ra các phương pháp của Cohn và Oncley lần lượt vào năm 1946 và 1949. Thông thường, độ pH của phân đoạn huyết tương được điều chỉnh trước khi bổ sung rượu vào để tạo điều kiện thuận lợi cho hiệu suất thu hồi đối với hợp phần quan tâm là cao nhất. Đã thấy rằng, theo cách có lợi, việc điều chỉnh độ pH của dung dịch ngay sau khi bổ sung rượu vào hoặc đồng thời với việc bổ sung rượu vào dẫn đến kết quả làm kết tủa rõ rệt hơn và có khả năng lặp lại hơn. Đã phát hiện ra rằng việc bổ sung etanol vào các phân đoạn huyết tương làm dao động độ pH của dung dịch, thường là làm tăng độ pH của dung dịch. Như vậy, phản ứng kết tủa sẽ xảy ra ở độ pH không tối ưu khi điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương đến độ pH đã định trước khi chứ không phải là sau khi bổ sung rượu vào.

Tương tự, việc làm kết tủa protein từ phân đoạn huyết tương sẽ ảnh hưởng đến môi trường tĩnh điện và do vậy sẽ làm thay đổi độ pH của dung dịch. Do đó, khi bước làm kết tủa đang xảy ra, thì độ pH của dung dịch sẽ khác với độ pH đã định mà cho phép thu hồi tối đa loại protein quan tâm. Điều này đặc biệt đúng với các bước làm kết tủa, trong đó phân đoạn lớn chứa protein được làm kết tủa, các bước làm kết tủa trong đó rượu được sử dụng với hàm lượng lớn, và các bước làm kết tủa đòi hỏi thời gian ủ dài.

Ảnh hưởng của việc điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương được minh họa bằng ví dụ là các kết quả thấy trong Ví dụ 16. Theo ví dụ này, IgG được làm kết tủa từ hai mẫu phân đoạn Phần dịch nổi I sau khi bổ sung rượu vào bằng cách phun. Độ pH của cả hai mẫu này được điều chỉnh đến 6,7 trước khi bổ sung rượu vào và được điều chỉnh lại đến 6,9 sau khi bổ sung rượu vào nhưng trước bước ủ kết tủa 10 giờ. Trong mẫu thứ nhất (đối chứng), độ pH được điều chỉnh trong suốt quá trình ủ trong 10 giờ, trong khi trong mẫu thứ hai (điều chỉnh liên tục), độ pH được điều chỉnh đến độ pH không đổi bằng 6,9 trong suốt quá trình ủ trong 10 giờ. Như có thể thấy trong Bảng 16, sau khi loại bỏ chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến từ các mẫu, phần dịch nổi thứ nhất chứa 0,2g IgG/L huyết tương, trong khi ở mẫu thứ hai, trong đó độ pH được giữ không đổi trong suốt quá trình ủ kết tủa, chỉ chứa 0,13g IgG/L huyết tương. Mức hao hụt giảm 0,07g IgG/L huyết tương ở mẫu thứ hai cho thấy, đối với

sản lượng sản xuất năm 2007, hao hụt khoảng 1,9 triệu gam (1900 kilogram) IgG. Theo giá IVIG trên thị trường hiện nay, dao động từ 50\$ đến 100\$ mỗi gam, mức hao hụt 1,5% ở bước này khiến tổn thất kinh tế toàn cầu hằng năm lên tới 200 triệu đôla.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phương pháp trong đó độ pH của phân đoạn huyết tương được điều chỉnh ngay sau khi bổ sung rượu vào. Theo các phương án liên quan, độ pH có thể được điều chỉnh trước khi và sau khi bổ sung rượu vào, hoặc trong khi và sau khi bổ sung rượu vào, hoặc trước khi, trong khi, và sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án liên quan, độ pH của dung dịch được điều chỉnh liên tục trong một hoặc nhiều bước làm kết tủa rượu hoặc ủ. Theo một số phương án, độ pH của dung dịch được điều chỉnh liên tục hoặc duy trì trong khi hệ thống được khuấy liên tục hoặc theo cách khác được trộn để đảm bảo sự phân phối chất làm thay đổi độ pH nhanh và đồng đều trong toàn hệ thống.

Tương tự với trường hợp bổ sung rượu vào ở dạng dòng chảy, đã phát hiện ra rằng việc bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào với thể tích lớn ở dạng dòng chảy có thể dẫn đến sự thay đổi độ pH cục bộ tạm thời, dẫn đến sự biến tính hoặc làm kết tủa protein không mong muốn. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp, trong đó chất làm thay đổi độ pH có thể được đưa vào một hoặc nhiều bước tách phân đoạn huyết tương theo cách bổ sung vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các phương pháp, trong đó độ pH của bước tách phân đoạn hoặc bước làm kết tủa huyết tương có thể được điều chỉnh bằng cách bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo một số phương án, bước bổ sung vào bằng cách phun có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị có áp suất bất kỳ, như vật chứa (ví dụ, bình phun), có đầu phun hoặc vòi phun và được vận hành bằng tay hoặc tự động để biến chất lỏng thành dạng mù cực mịn. Theo một số phương án, bước bổ sung vào bằng cách phun được thực hiện trong khi hệ thống được khuấy liên tục hoặc theo cách khác được trộn để đảm bảo sự phân phối nhanh và đồng đều chất lỏng trong toàn hệ thống.

III. Chế phẩm IgG cô đặc

Chế phẩm IVIG chứa các kháng thể nguyên vẹn đã được bộc lộ để dùng cho việc điều trị một số tình trạng bệnh tự miễn. (ví dụ, xem các công bố đơn patent Mỹ số

US 2002/0114802, US 2003/0099635, và US 2002/0098182). Chế phẩm IVIG được bộc lộ trong các tài liệu tham khảo này bao gồm cả các kháng thể đa dòng.

1. Chế phẩm IgG trong nước

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG trong nước được bào chế theo các phương pháp theo sáng chế. Thông thường, chế phẩm IgG được bào chế theo các phương pháp mới theo sáng chế này có hàm lượng và độ tinh khiết IgG cao. Ví dụ, chế phẩm IgG theo sáng chế có thể có nồng độ protein ít nhất bằng khoảng 3% (khối lượng/thể tích) và hàm lượng IgG có độ tinh khiết lớn hơn khoảng 90%. Các chế phẩm IgG có độ tinh khiết cao như vậy là thích hợp để dùng trong điều trị, ví dụ, điều trị IVIG. Theo một phương án, nồng độ IgG bằng khoảng 10% và được sử dụng để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo một phương án khác, nồng độ IgG bằng khoảng 20% và được sử dụng để tiêm dưới da hoặc tiêm bắp.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hỗn hợp IgG trong nước được bào chế theo phương pháp bao gồm các bước (a) làm kết tủa phân đoạn nghèo plasmit trong điều kiện lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 6% đến 10% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để thu được phần dịch nổi giàu IgG, (b) làm kết tủa IgG ra khỏi phần dịch nổi này bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất, (c) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ nhất được tạo ra ở bước (b) để tạo ra huyền phù, (d) xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (c) bằng chất tẩy rửa, (e) làm kết tủa IgG ra khỏi huyền phù bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ hai, (f) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ hai được tạo ra ở bước (e) để tạo ra huyền phù, (g) xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (f) bằng dung môi và/hoặc chất tẩy rửa, và (h) thực hiện ít nhất một bước tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi ion, nhờ đó tạo ra chế phẩm IgG cô đặc.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG được bào chế theo phương pháp bao gồm các bước (a) điều chỉnh độ pH của phân đoạn nghèo huyết tương trong điều kiện lạnh đến khoảng 7,0, (b) điều chỉnh nồng độ etanol của phân đoạn nghèo huyết tương trong điều kiện lạnh ở bước (a) đến khoảng 25% (thể tích/thể

tích) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -5°C đến -9°C , bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, (c) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (b), (d) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thu được ở bước (c) bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng 600mL axit axetic bằng cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra huyền phù, (e) trộn silic đioxit đã nghiền mịn (SiO_2) với huyền phù thu được ở bước (d) trong thời gian ít nhất khoảng 30 phút, (f) lọc huyền phù bằng máy lọc ép, bằng cách đó tạo ra dịch lọc, (g) rửa máy lọc ép bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat với thể tích ít nhất bằng 3 lần thể tích chết của máy lọc ép, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng 150mL axit axetic bằng cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra dung dịch rửa, (h) kết hợp dịch lọc thu được ở bước (f) với dung dịch rửa thu được ở bước (g), bằng cách đó tạo ra dung dịch, và xử lý dung dịch này bằng chất tẩy rửa, (i) điều chỉnh độ pH của dung dịch thu được ở bước (h) đến khoảng 7,0 và bổ sung etanol vào đến nồng độ cuối bằng khoảng 25%, bằng cách đó tạo ra chất kết tủa, (j) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (i), (k) hòa tan chất kết tủa trong dung dịch nước chứa dung môi hoặc chất tẩy rửa và duy trì dung dịch này trong ít nhất 60 phút, (l) cho dung dịch sau bước (k) đi qua cột sắc ký trao đổi cation và rửa giải protein được hấp thụ trên cột trong dung dịch giải hấp, (m) cho dung dịch giải hấp thu được ở bước (l) đi qua cột sắc ký trao đổi anion để tạo ra dòng thải, (n) cho dòng thải thu được ở bước (m) đi qua thiết bị lọc nano để tạo ra dịch lọc nano, (o) cho dịch lọc nano thu được ở bước (n) đi qua màng siêu lọc để tạo ra dịch siêu lọc, và (p) lọc thẩm tách dịch siêu lọc thu được ở bước (o) bằng dung dịch đệm lọc thẩm tách để tạo ra dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 8% (khối lượng/thể tích) đến 12% (khối lượng/thể tích), bằng cách đó thu được chế phẩm IgG cô đặc.

Theo một số phương án, chế phẩm IgG trong nước được bào chế bằng cách áp dụng phương pháp theo sáng chế bao gồm các cải tiến ở hai hoặc nhiều bước tách phân đoạn nêu trên. Ví dụ, theo một số phương án, có thể cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến, và/hoặc bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG trong nước được bảo chế theo phương pháp tinh chế theo sáng chế này, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung một hoặc nhiều dung dịch vào bằng cách phun, mà theo cách khác sẽ được đưa vào phân đoạn huyết tương bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước đưa rượu (ví dụ, etanol) vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun. Theo các phương án khác, dung dịch có thể được thêm vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch làm thay đổi độ pH, dung dịch dung môi, dung dịch tẩy rửa, dung dịch đệm pha loãng, dung dịch thay đổi độ dẫn điện riêng, và các dung dịch tương tự. Theo một phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều bước làm kết tủa bằng rượu được thực hiện bằng cách bổ sung rượu vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun. Theo một phương án được ưu tiên thứ hai, một hoặc nhiều bước điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG trong nước được bảo chế theo phương pháp tinh chế theo sáng chế này, trong đó phương pháp này bao gồm bước điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương được làm kết tủa sau và/hoặc đồng thời với bước bổ sung tác nhân làm kết tủa (ví dụ, rượu hoặc polyetelen glycol) vào. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất cải tiến quy trình trong đó độ pH của phân đoạn huyết tương được làm kết tủa tích cực được duy trì trong toàn bộ bước ủ hoặc giữ kết tủa bằng cách giám sát và điều chỉnh độ pH một cách liên tục. Theo các phương án được ưu tiên, việc điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG trong nước chứa protein ở nồng độ nằm trong khoảng từ 30g/L đến 250g/L. Theo một số phương án, nồng độ protein của chế phẩm IgG nằm trong khoảng từ 50g/L đến 200g/L, hoặc nằm trong khoảng từ 70g/L đến 150g/L, hoặc nằm trong khoảng từ 90g/L đến 120g/L, hoặc nồng độ thích hợp bất kỳ thuộc các khoảng này, ví dụ khoảng 30g/L, hoặc khoảng 35g/L, 40g/L, 45g/L, 50g/L, 55g/L, 60g/L, 65g/L, 70g/L, 75g/L, 80g/L, 85g/L, 90g/L, 95g/L, 100g/L, 105g/L, 110g/L, 115g/L, 120g/L, 125g/L, 130g/L, 135g/L, 140g/L,

145g/L, 150g/L, 155g/L, 160g/L, 165g/L, 170g/L, 175g/L, 180g/L, 185g/L, 190g/L, 195g/L, 200g/L, 205g/L, 210g/L, 215g/L, 220g/L, 225g/L, 230g/L, 235g/L, 240g/L, 245g/L, 250g/L, hoặc cao hơn. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm IgG trong nước có nồng độ bằng hoặc bằng khoảng 10%. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, chế phẩm có nồng độ $10,2\% \pm 0,2\%$ (khối lượng/thể tích). Theo một phương án được ưu tiên khác, chế phẩm IgG trong nước có nồng độ bằng hoặc bằng khoảng 20%.

Phương pháp theo sáng chế cho phép điều chế chế phẩm IgG có độ tinh khiết rất cao. Theo một phương án, ít nhất khoảng 95% tổng lượng protein trong chế phẩm theo sáng chế là IgG. Theo các phương án khác, ít nhất khoảng 96% protein là IgG, hoặc ít nhất khoảng 97%, 98%, 99%, 99,5% protein tổng, hoặc nhiều hơn, trong chế phẩm là IgG. Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất 97% protein tổng trong chế phẩm là IgG. Theo một phương án được ưu tiên khác, ít nhất 98% protein tổng trong chế phẩm là IgG. Theo một phương án được ưu tiên khác, ít nhất 99% protein tổng trong chế phẩm là IgG.

Tương tự, phương pháp theo sáng chế cho phép điều chế chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng cực thấp. Ví dụ, Bảng 19 thể hiện kết quả thử nghiệm tạp chất đối với ba mẫu dung dịch IgG được điều chế theo các phương pháp cải tiến theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng khoảng ít hơn 140mg/L IgA. Theo các phương án khác, chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng khoảng ít hơn 60mg/L IgA, tốt hơn là khoảng ít hơn 40mg/L IgA, tốt nhất là khoảng ít hơn 30mg/L IgA.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng khoảng ít hơn 50mg/L IgM. Theo các phương án khác, chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng khoảng ít hơn 25mg/L IgM, tốt hơn là khoảng ít hơn 10mg/L IgM, tốt hơn nữa là khoảng ít hơn 5mg/L IgM, tốt hơn nữa là khoảng ít hơn 4mg/L IgM, tốt hơn nữa là khoảng ít hơn 3mg/L IgM, tốt nhất là khoảng ít hơn 2,5mg/L IgM.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG có hoạt độ phân giải amit khoảng thấp hơn 100 PL-1nmol/mL phút. Theo các phương án khác, chế phẩm IgG có hoạt độ phân giải amit khoảng thấp hơn 50 PL-1nmol/mL phút, tốt hơn

là hoạt độ phân giải amit khoảng thấp hơn 25 PL-1nmol/mL phút, tốt hơn nữa là hoạt độ phân giải amit khoảng thấp hơn 20 PL-1 nmol/mL phút, tốt hơn nữa là hoạt độ phân giải amit khoảng thấp hơn 15 PL-1nmol/mL phút, tốt nhất là hoạt độ phân giải amit khoảng thấp hơn 10 PL-1nmol/mL phút.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 20mg/L. Theo các phương án khác, chế phẩm IgG chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 10mg/L, tốt hơn là chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 5mg/L, tốt hơn nữa là chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 2,5mg/L, tốt hơn nữa là chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 1mg/L, tốt hơn nữa là chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 0,5mg/L, tốt nhất là chứa fibrinogen với lượng khoảng ít hơn 0,25mg/L .

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG chứa chủ yếu các monome/đime IgG. Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG, trong đó ít nhất 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, hoặc 99,9% IgG là monome hoặc đime. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG, trong đó ít nhất 97% IgG là monome hoặc đime. Theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 99% IgG là monome hoặc đime. Theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 99,5% IgG là monome hoặc đime. Theo một phương án được ưu tiên hơn, ít nhất 99,7% IgG là monome hoặc đime.

2. Dược phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm và chế phẩm chứa IgG tinh khiết bào chế được theo các phương pháp nêu trên. Thông thường, dược phẩm và chế phẩm chứa IgG bào chế được theo các phương pháp mới theo sáng chế này có hàm lượng IgG và độ tinh khiết cao. Ví dụ, dược phẩm và chế phẩm chứa IgG theo sáng chế có thể có nồng độ protein ít nhất bằng khoảng 7% (khối lượng/thể tích) và hàm lượng IgG với độ tinh khiết lớn hơn khoảng 95%. Dược phẩm và chế phẩm chứa IgG có độ tinh khiết cao như vậy là thích hợp để dùng trong việc điều trị bệnh, ví dụ, điều trị IVIG. Theo một phương án được ưu tiên, dược phẩm chứa IgG được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch (ví dụ, điều trị IVIG).

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế được bào chế bằng cách bào chế chế phẩm IgG trong nước phân lập được bằng cách áp dụng phương pháp nêu trên. Thông thường, chế phẩm được bào chế sẽ được đưa qua ít nhất một, tốt hơn là ít nhất hai, tốt nhất là ít nhất ba, bước làm bất hoạt hoặc loại bỏ virus. Ví dụ không giới hạn về các bước làm bất hoạt hoặc loại bỏ virus có thể được sử dụng theo các phương pháp nêu trên bao gồm, xử lý bằng dung môi tẩy rửa (Horowitz *et al.*, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 và Kreil *et al.*, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, cả hai tài liệu này được đưa rõ ràng vào đây bằng cách viện dẫn), lọc nano (Hamamoto *et al.*, *Vox Sang* 1989 (56)230-236 và Yuasa *et al.*, *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, cả hai tài liệu này được đưa rõ ràng vào đây bằng cách viện dẫn), và ủ trong điều kiện độ pH thấp ở nhiệt độ cao (Kempf *et al.*, *Transfusion* 1991 (31)423-427 và Louie *et al.*, *Biologicals* 1994 (22):13-19).

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế có hàm lượng IgG nằm trong khoảng từ 80g/LL IgG và khoảng 120g/LL IgG. Thông thường, các chế phẩm IVIG này được bào chế bằng cách phân lập chế phẩm IgG từ huyết tương bằng cách áp dụng phương pháp theo sáng chế, cô đặc hỗn hợp, và bào chế chế phẩm cô đặc trong dung dịch thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch. Chế phẩm IgG có thể được cô đặc bằng cách áp dụng phương pháp thích hợp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương án, chế phẩm được cô đặc bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo một số phương án, thiết bị siêu lọc được sử dụng để cô đặc chế phẩm sử dụng màng siêu lọc có giới hạn phân tử lượng danh nghĩa (NMWCO) khoảng thấp hơn 100kDa hoặc khoảng thấp hơn 90kDa, 80kDa, 70kDa, 60kDa, 50kDa, 40kDa, 30kDa, hoặc thấp hơn. Theo một phương án được ưu tiên, màng siêu lọc có NMWCO không cao hơn 50kDa. Việc trao đổi dung dịch đệm có thể đạt được bằng cách áp dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Theo một phương án cụ thể, việc trao đổi dung dịch đệm đạt được bằng cách lọc thẩm tách.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa IgG, trong đó dược phẩm chứa IgG này được tinh chế từ huyết tương bằng cách áp dụng phương pháp bao gồm các bước (a) làm kết tủa phân đoạn nghèo plasmit trong điều kiện lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 6% đến 10% ở

độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để thu được phần dịch nổi giàu IgG, (b) làm kết tủa IgG ra khỏi phần dịch nổi này bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ nhất, (c) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ nhất được tạo ra ở bước (b) để tạo ra huyền phù, (d) xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (c) bằng chất tẩy rửa, (e) làm kết tủa IgG ra khỏi huyền phù bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 30% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ hai, (f) tạo huyền phù lại chứa chất kết tủa thứ hai được tạo ra ở bước (e) để tạo ra huyền phù, (g) xử lý huyền phù được tạo ra ở bước (f) bằng dung môi và/hoặc chất tẩy rửa, (h) thực hiện ít nhất một bước tách phân đoạn bằng sắc ký trao đổi ion; (i) thực hiện xử lý bằng dung môi tẩy rửa; và (j) cho chế phẩm qua bước lọc nano, bằng cách đó bào chế được chế phẩm chứa IgG.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất được phẩm chứa IgG, trong đó chế phẩm IgG này được tinh chế từ huyết tương bằng cách áp dụng phương pháp bao gồm các bước (a) điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh đến khoảng 7,0, (b) điều chỉnh nồng độ etanol của phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh ở bước (a) đến khoảng 25% (thể tích/thể tích) ở nhiệt độ nằm trong khoảng -5°C đến -9°C, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, (c) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu được ở bước (b), (d) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thu được ở bước (c) bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng 600mL axit axetic bằng tính cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra huyền phù, (e) trộn silic đioxit đã nghiền mịn (SiO₂) với huyền phù thu được ở bước (d) trong thời gian ít nhất khoảng 30 phút, (f) lọc huyền phù bằng máy lọc ép, bằng cách đó tạo ra dịch lọc, (g) rửa máy lọc ép bằng dung dịch đệm chứa phosphat và axetat với thể tích ít nhất bằng 3 lần thể tích chết của máy lọc ép, trong đó độ pH của dung dịch đệm được điều chỉnh bằng 150mL axit axetic bằng cho 1000L dung dịch đệm, bằng cách đó tạo ra dung dịch rửa, (h) kết hợp dịch lọc thu được ở bước (f) với dung dịch rửa thu được ở bước (g), bằng cách đó tạo ra dung dịch, và xử lý dung dịch này bằng chất tẩy rửa, (i) điều chỉnh độ pH của dung dịch thu được ở bước (h) đến khoảng 7,0 và bổ sung etanol vào đến nồng độ cuối bằng khoảng 25%, bằng cách đó tạo ra chất kết tủa, (j) tách chất lỏng và chất kết tủa ra khỏi hỗn hợp thu

được ở bước (i), (k) hòa tan chất kết tủa trong dung dịch nước chứa dung môi hoặc chất tẩy rửa và duy trì dung dịch này trong ít nhất 60 phút, (l) cho dung dịch sau bước (k) đi qua cột sắc ký trao đổi cation và rửa giải protein được hấp thụ trên cột trong dung dịch giải hấp, (m) cho dung dịch giải hấp thu được ở bước (l) đi qua cột sắc ký trao đổi anion để tạo ra dòng thải, (n) cho dòng thải thu được ở bước (m) đi qua thiết bị lọc nano để tạo ra dịch lọc nano, (o) cho dịch lọc nano thu được ở bước (n) đi qua màng siêu lọc để tạo ra dịch siêu lọc, và (p) lọc thẩm tách dịch siêu lọc thu được ở bước (o) bằng dung dịch đệm lọc thẩm tách để tạo ra dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein nằm trong khoảng từ 8% (khối lượng/thể tích) đến 12% (khối lượng/thể tích), bằng cách đó thu được chế phẩm IgG cô đặc.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa IgG, trong đó chế phẩm chứa IgG này được bảo chế bằng cách áp dụng phương pháp theo sáng chế bao gồm các cải tiến ở hai hoặc nhiều bước tách phân đoạn nêu trên. Ví dụ, theo một số phương án, có thể thực hiện cải tiến ở bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa Phân đoạn II+III cải biến, bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến, và/hoặc bước lọc huyền phù Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa IgG, trong đó chế phẩm IgG này được bảo chế bằng cách áp dụng phương pháp tinh chế theo sáng chế này, trong đó phương pháp này bao gồm bước bổ sung vào bằng cách phun một hoặc nhiều dung dịch, mà theo cách khác sẽ được đưa vào phân đoạn huyết tương bằng cách bổ sung vào ở dạng dòng chảy. Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước đưa rượu (ví dụ, etanol) vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun. Theo các phương án khác, dung dịch có thể được bổ sung vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch làm thay đổi độ pH, dung dịch dung môi, dung dịch tẩy rửa, dung dịch đệm pha loãng, dung dịch thay đổi độ dẫn điện riêng, và các dung dịch tương tự. Theo một phương án được ưu tiên, một hoặc nhiều bước làm kết tủa bằng rượu được thực hiện bằng cách bổ sung rượu vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun. Theo một phương án được ưu tiên thứ hai, một hoặc nhiều bước điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào phân đoạn huyết tương bằng cách phun.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa IgG, trong đó được phẩm chứa IgG được bảo chế theo phương pháp tinh chế theo sáng chế này, trong đó phương pháp này bao gồm bước điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương được kết tủa sau và/hoặc đồng thời với bước bổ sung tác nhân làm kết tủa (ví dụ, rượu hoặc polyetelen glycol) vào. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất cải tiến quy trình, trong đó độ pH của phân đoạn huyết tương được kết tủa tích cực được duy trì trong toàn bộ bước ủ hoặc giữ kết tủa bằng cách giám sát và điều chỉnh độ pH liên tục. Theo các phương án được ưu tiên, việc điều chỉnh độ pH được thực hiện bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm IgG chứa protein ở nồng độ nằm trong khoảng từ 70g/L đến 130g/L. Theo một số phương án, nồng độ protein của chế phẩm chứa IgG nằm trong khoảng từ 80g/L đến 120g/L, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 90g/L đến 110g/L, tốt nhất là bằng khoảng 100g/L, hoặc nồng độ thích hợp bất kỳ trong khoảng này, ví dụ khoảng 70g/L, 75g/L, 80g/L, 85g/L, 90g/L, 95g/L, 100g/L, 105g/L, 110g/L, 115g/L, 120g/L, 125g/L, hoặc 130g/L. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất được phẩm có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 100g/L. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, được phẩm có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 102g/L.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm IgG chứa protein ở nồng độ nằm trong khoảng từ 170g/L đến 230g/L. Theo một số phương án, nồng độ protein của chế phẩm IgG nằm trong khoảng từ 180g/L đến 220g/L, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 190g/L đến 210g/L, tốt nhất là bằng khoảng 200g/L, hoặc nồng độ thích hợp bất kỳ nằm trong các khoảng này, ví dụ khoảng 170g/L, 175g/L, 180g/L, 185g/L, 190g/L, 195g/L, 200g/L, 205g/L, 210g/L, 215g/L, 220g/L, 225g/L, hoặc 230g/L. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất được phẩm có nồng độ protein bằng hoặc bằng khoảng 200g/L.

Các phương pháp theo sáng chế cho phép bảo chế được phẩm chứa IgG có độ tinh khiết cực cao. Ví dụ, theo một phương án, ít nhất khoảng 95% tổng lượng protein trong chế phẩm theo sáng chế là IgG. Theo các phương án khác, ít nhất khoảng 96% protein là IgG, hoặc ít nhất khoảng 97%, 98%, 99%, 99,5%, hoặc nhiều hơn, tổng

lượng protein của chế phẩm là IgG. Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất 97% tổng lượng protein của chế phẩm là IgG. Theo một phương án được ưu tiên khác, ít nhất 98% tổng lượng protein của chế phẩm là IgG. Theo một phương án được ưu tiên khác,, ít nhất 99% tổng lượng protein của chế phẩm là IgG.

Tương tự, các phương pháp theo sáng chế cho phép bào chế được phẩm IgG chứa tạp chất với hàm lượng rất thấp. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng khoảng ít hơn 100mg/L IgA. Theo các phương án khác, chế phẩm IgG chứa tạp chất với lượng khoảng ít hơn 50mg/L IgA, tốt hơn là khoảng ít hơn 35mg/L IgA, tốt nhất là khoảng ít hơn 20mg/L IgA.

Dược phẩm theo sáng chế thường gồm một hoặc nhiều chất đệm hoặc chất làm ổn định độ pH thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch, tiêm dưới da, và/hoặc tiêm bắp. Ví dụ không giới hạn về chất đệm thích hợp để bào chế chế phẩm IgG theo sáng chế bao gồm glyxin, xitrat, phosphat, axetat, glutamat, tartrat, benzoat, lactat, histidin hoặc các axit amin khác, gluconat, malat, suxinat, format, propionat, cacbonat, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng được điều chỉnh đến độ pH thích hợp. Thông thường, chất đệm là đủ để duy trì độ pH thích hợp trong chế phẩm trong khoảng thời gian dài. Theo một phương án được ưu tiên, chất đệm là glyxin.

Theo một số phương án, nồng độ của chất đệm trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 100mM đến 400mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 150mM đến 350mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 200mM đến 300mM, tốt nhất là khoảng 250mM. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, chế phẩm IVIG chứa glyxin với lượng nằm trong khoảng từ 200mM đến 300mM glyxin, tốt nhất là khoảng 250mM glyxin.

Theo một số phương án, độ pH của chế phẩm nằm trong khoảng từ 4,1 đến 5,6, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4,4 đến 5,3, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,1. Theo các phương án cụ thể, độ pH của chế phẩm có thể bằng khoảng 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, hoặc 5,6. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của chế phẩm nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,1.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể tùy ý còn bao gồm chất điều chỉnh nồng độ mol của chế phẩm. Ví dụ không giới hạn về chất điều chỉnh nồng độ mol bao gồm manitol, sorbitol, glyxerol, sucroza, glucoza, dextroza, levuloza,

fructoza, lactoza, polyetylen glycol, phosphat, natri clorua, kali clorua, canxi clorua, canxi gluconoglucoheptonat, đimetyl sulfon, và các chất tương tự.

Thông thường, chế phẩm theo sáng chế có nồng độ mol có thể so sánh được với nồng độ mol sinh lý, nằm trong khoảng từ 285mOsmol/kg đến 295mOsmol/kg (Lacy *et al.*, *Drug Information Handbook – Lexi-Comp* 1999:1254. Theo một số phương án, nồng độ mol của chế phẩm nằm trong khoảng từ 200mOsmol/kg đến 350mOsmol/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 240mOsmol/kg đến 300mOsmol/kg. Theo các phương án cụ thể, nồng độ mol của chế phẩm bằng khoảng 200mOsmol/kg, hoặc 210mOsmol/kg, 220mOsmol/kg, 230mOsmol/kg, 240mOsmol/kg, 245mOsmol/kg, 250mOsmol/kg, 255mOsmol/kg, 260mOsmol/kg, 265mOsmol/kg, 270mOsmol/kg, 275mOsmol/kg, 280mOsmol/kg, 285mOsmol/kg, 290mOsmol/kg, 295mOsmol/kg, 300mOsmol/kg, 310mOsmol/kg, 320mOsmol/kg, 330mOsmol/kg, 340mOsmol/kg, 340mOsmol/kg, hoặc 350mOsmol/kg.

Chế phẩm IgG theo sáng chế thường là ổn định ở dạng lỏng trong khoảng thời gian dài. Theo một số phương án, các chế phẩm này là ổn định trong ít nhất khoảng 3 tháng ở nhiệt độ trong phòng, hoặc ít nhất khoảng 4 tháng, 5 tháng, 6 tháng, 7 tháng, 8 tháng, 9 tháng, 10 tháng, 11 tháng, 12 tháng, 13 tháng, 14 tháng, 15 tháng, 16 tháng, 17 tháng, 18 tháng, 19 tháng, 20 tháng, 21 tháng, 22 tháng, 23 tháng, hoặc 24 tháng ở nhiệt độ trong phòng. Chế phẩm này cũng sẽ thường ổn định trong ít nhất khoảng 18 tháng trong điều kiện lạnh (thường là ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C), hoặc trong ít nhất khoảng 21 tháng, 24 tháng, 27 tháng, 30 tháng, 33 tháng, 36 tháng, 39 tháng, 42 tháng, hoặc 45 tháng trong điều kiện làm lạnh.

IV. Các phương pháp điều trị

Như thường được áp dụng trong y học hiện đại, các chế phẩm vô trùng chứa globulin miễn dịch cô đặc (đặc biệt là các IgG) được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh thuộc ba nhóm chính: các bệnh suy giảm miễn dịch, các bệnh viêm và tự miễn, và các bệnh nhiễm khuẩn cấp tính. Các chế phẩm IgG này cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh xơ cứng rải rác (đặc biệt là bệnh xơ cứng rải rác thuyên giảm-tái phát hay còn gọi là RRMS (relapsing-remitting multiple sclerosis)), bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson. Chế phẩm IgG đã tinh chế theo sáng chế là thích hợp để dùng cho các

mục đích này, cũng như các ứng dụng khác chấp nhận được về mặt lâm sàng của các chế phẩm IgG.

FDA đã phê chuẩn việc sử dụng IVIG để điều trị các chỉ định khác nhau, bao gồm cấy ghép tủy xương dị sinh, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh HIV ở trẻ nhỏ, bệnh suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh Kawasaki, bệnh đa dây thần kinh hủy myelin do viêm mạn tính (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy - CIDP), và ghép thận với thể nhận có tính kháng thể cao hoặc với thể cho không tương thích ABO. Theo một số phương án, chế phẩm IVIG theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc giám sát các bệnh và tình trạng bệnh này.

Hơn nữa, việc sử dụng IVIG ngoài hướng dẫn thường được đề xuất đối với các bệnh nhân dùng để điều trị hoặc giám sát các chỉ định khác nhau, ví dụ, hội chứng mệt mỏi mạn tính, bệnh viêm ruột kết do thiếu hụt khuẩn thoi, bệnh viêm bì cơ và bệnh viêm đa cơ, bệnh mắt Graves, hội chứng Guillain-Barré, chứng loạn dưỡng cơ, bệnh viêm cơ thể vùi, hội chứng Lambert-Eaton, bệnh ban đỏ luput, bệnh thần kinh vận động đa ổ, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh nhược cơ năng, bệnh giảm tiểu cầu dị miễn dịch sơ sinh, nhiễm Parvovirus B19, bệnh pemphigut, chứng ban xuất huyết sau tiêm truyền, chứng đào thải ghép thận, sảy thai tự phát/mất thai, hội chứng người cứng đờ, hội chứng co giật mắt theo nhiều hướng, bệnh nhiễm trùng nặng và sốc nhiễm trùng ở người trưởng thành bị ốm nặng, bệnh hoại tử biểu bì nhiễm độc, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, bệnh đa u tủy, chứng thiếu gamma globulin-huyết có liên quan đến nhiễm sắc thể X, và chứng giảm gamma globulin-huyết. Theo một số phương án, chế phẩm IVIG theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc giám sát bệnh và các tình trạng bệnh này.

Cuối cùng, ứng dụng làm ví dụ của IVIG để điều trị hoặc giám sát bệnh bao gồm bệnh suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh RRMS, bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson đã được đề xuất (công bố đơn patent Mỹ số U.S. 2009/0148463, toàn bộ nội dung của công bố này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, chế phẩm IVIG theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc giám sát bệnh suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh RRMS, bệnh Alzheimer, hoặc bệnh Parkinson.

Theo một số phương án bao gồm việc sử dụng hằng ngày, lượng hữu hiệu được dùng cho đối tượng có thể được xác định bởi bác sỹ điều trị có tính đến sự khác biệt giữa các cá thể về tuổi tác, thể trọng, mức độ nghiêm trọng của bệnh, đường dùng (ví dụ, dùng qua đường tĩnh mạch so với tiêm dưới da) và đáp ứng đối với việc điều trị. Theo một số phương án, chế phẩm globulin miễn dịch theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng với lượng nằm trong khoảng từ 5mg/kg đến 2000mg/kg mỗi ngày. Theo các phương án khác, chế phẩm globulin miễn dịch có thể được dùng với lượng ít nhất khoảng 10mg/kg, ít nhất 15mg/kg, ít nhất 20mg/kg, ít nhất 25mg/kg, ít nhất 30mg/kg, hoặc ít nhất 50mg/kg. Theo các phương án khác, chế phẩm globulin miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng ở liều lượng lên tới khoảng 100mg/kg, lên tới khoảng 150mg/kg, lên tới khoảng 200mg/kg, lên tới khoảng 250mg/kg, lên tới khoảng 300mg/kg, lên tới khoảng 400mg/kg mỗi ngày. Theo các phương án khác, liều lượng chế phẩm globulin miễn dịch có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn. Ngoài ra, các chế phẩm globulin miễn dịch có thể được dùng ở dạng một hoặc nhiều liều mỗi ngày. Các nhà lâm sàng học hiểu rõ bệnh được điều trị bởi các chế phẩm IgG có thể xác định được liều dùng thích hợp cho mỗi bệnh nhân theo tiêu chí đã biết trong lĩnh vực.

Theo sáng chế, thời gian cần thiết để hoàn thành một tiến trình điều trị có thể được xác định bởi bác sỹ điều trị và có thể thay đổi từ ngắn như là một ngày đến dài hơn như là một tháng. Theo một số phương án, tiến trình điều trị có thể từ 1 đến 6 tháng.

Lượng hữu hiệu chế phẩm IVIG được dùng cho đối tượng bằng cách dùng qua đường tĩnh mạch. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” dùng để chỉ lượng chế phẩm IVIG tạo ra sự cải tiến hoặc khắc phục được hậu quả của bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng. Lượng hữu hiệu được dùng cho đối tượng có thể được xác định bởi bác sỹ điều trị có tính đến sự khác biệt giữa các cá thể về tuổi tác, thể trọng, bệnh hoặc tình trạng bệnh cần điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh và đáp ứng đối với việc điều trị. Theo một số phương án, chế phẩm IVIG có thể được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 5mg/kg đến 2000mg/kg mỗi lần dùng. Theo một số phương án, liều dùng có thể ít nhất bằng khoảng 5mg/kg, hoặc ít nhất bằng khoảng 10mg/kg, hoặc ít nhất khoảng 20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg, 50mg/kg, 60mg/kg, 70mg/kg, 80mg/kg,

90mg/kg, 100mg/kg, 125 mg/kg, 150mg/kg, 175 mg/kg, 200mg/kg, 250mg/kg, 300mg/kg, 350mg/kg, 400mg/kg, 450mg/kg, 500mg/kg, 550mg/kg, 600mg/kg, 650mg/kg, 700mg/kg, 750mg/kg, 800mg/kg, 850mg/kg, 900mg/kg, 950mg/kg, 1000mg/kg, 1100mg/kg, 1200mg/kg, 1300mg/kg, 1400mg/kg, 1500mg/kg, 1600mg/kg, 1700mg/kg, 1800mg/kg,, 1900mg/kg, hoặc ít nhất khoảng 2000mg/kg.

Liều dùng và tần xuất của việc điều trị bằng IVIG, không kể các yếu tố khác, sẽ phụ thuộc vào bệnh hoặc tình trạng bệnh cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh ở bệnh nhân. Thông thường, đối với rối loạn chức năng miễn dịch sơ cấp, liều lượng nằm trong khoảng từ 100mg/kg đến 400mg/kg thể trọng sẽ được dùng khoảng từ 3 đến 4 tuần một lần. Đối với các bệnh thần kinh và tự miễn, liều lượng lên tới 2g/kg thể trọng được thực hiện trong từ ba đến sáu tháng, mỗi tháng một đợt tổng 5 ngày. Phương pháp này thường được kết hợp với điều trị duy trì bao gồm sử dụng IVIG với lượng nằm trong khoảng từ 100mg/kg đến 400mg/kg thể trọng trong khoảng thời gian 3 đến 4 tuần một lần. Thông thường, bệnh nhân sẽ nhận liều dùng hoặc điều trị trong khoảng thời gian 14 đến 35 ngày một lần, hoặc khoảng 21 đến 28 ngày một lần. Tần xuất điều trị, không kể các yếu tố khác, sẽ phụ thuộc vào, bệnh hoặc tình trạng bệnh cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh ở bệnh nhân.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất được phẩm IVIG được sử dụng để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, hoặc nhiễm khuẩn cấp tính ở người cần điều trị. Theo một phương án liên quan, sáng chế đề xuất chế phẩm IVIG được sản xuất theo phương pháp theo sáng chế dùng để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, hoặc nhiễm khuẩn cấp tính ở người cần điều trị.

Theo một số phương án, bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, hoặc nhiễm khuẩn cấp tính được chọn từ cấy ghép tủy xương dị sinh, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), HIV ở trẻ nhỏ, suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh Kawasaki, bệnh đa dây thần kinh hủy myelin do viêm mạn tính (CIDP), ghép thận với thể nhận có tính kháng thể cao hoặc với thể cho không tương thích ABO, hội chứng mệt mạn tính, bệnh viêm ruột kết do thiếu hụt khuẩn thoi, bệnh viêm bì cơ và bệnh viêm đa cơ, bệnh mắt Graves, hội chứng

Guillain-Barré, chứng loạn dưỡng cơ, bệnh viêm cơ thể vùi, hội chứng Lambert-Eaton, bệnh ban đỏ luput, bệnh thần kinh vận động đa ổ, bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh nhược cơ năng, bệnh giảm tiểu cầu dị miễn dịch sơ sinh, nhiễm Parvovirus B19, bệnh pemphigut, chứng ban xuất huyết sau tiêm truyền, chứng đảo thái ghép thận, sảy thai tự phát/mất thai, hội chứng người cứng đờ, hội chứng co giật mắt theo nhiều hướng, bệnh nhiễm trùng nặng và sốc nhiễm trùng ở người trưởng thành bị ốm nặng, bệnh hoại tử biểu bì nhiễm độc, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, bệnh đa u tủy, chứng thiếu gamma globulin-huyết có liên quan đến nhiễm sắc thể X, chứng giảm gamma globulin-huyết, chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh RRMS, bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ dễ dàng nhận ra một loạt các thông số không quan trọng mà có thể được thay đổi hoặc cải biến để mang lại các kết quả cơ bản giống hoặc tương tự.

Ví dụ 1

Ví dụ này cho thấy rằng lượng đáng kể fibrinogen, hoạt độ phân giải amit, hoạt tính prekallikrein, và lipoprotein có thể được loại bỏ khỏi huyền phù chứa dịch đặc Phân đoạn II+III cải biến đã được chiết bằng cách xử lý bằng Aerosil trước khi lọc.

Silic oxit dạng khói (Aerosil 380) hiện được sử dụng để hấp phụ fibrinogen, hoạt độ phân giải amit, hoạt tính prekallikrein, và lipoprotein. Để nghiên cứu ảnh hưởng của Aerosil một cách cụ thể hơn, sáu mẫu huyền phù Phân đoạn II+III cải biến được xử lý bằng Aerosil với lượng khác nhau trước khi lọc. Một cách ngắn gọn, dung dịch đệm hòa tan chứa 5mM natri axetat/5mM dung dịch đệm natri dihydrophosphat độ pH = 4,5 được sử dụng để tạo huyền phù lại chứa dịch đặc II+III cải biến, được điều chế như đã nêu trong bản mô tả, ở tỷ lệ 15g dung dịch đệm hòa tan tính cho mỗi gam dịch đặc II+III. Sau khi bổ sung dịch đặc vào, huyền phù này được khuấy trong một giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong môi trường có kiểm soát độ pH (giới hạn IPC của độ pH: từ 4,9 đến 5,3). Tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng,

độ pH của huyền phù này thường dịch chuyển đến độ pH bằng khoảng 5,1, và do vậy việc điều chỉnh tiếp độ pH là không cần thiết. Sau khi chiết bổ sung, trong ít nhất 120 phút, Aerosil 380, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0mg đến 100mg cho mỗi gam dịch đặc II+III, được bổ sung vào thùng chứa và huyền phù được ủ trong một giờ. Diatomit được thêm vào trước khi lọc sâu bằng thiết bị lọc Cuno 50SA. Sau khi lọc, thiết bị lọc được rửa bằng dung dịch đệm chiết chứa 8g L^{-1} xitrat và 0,2% polysorbat 80 (độ pH=5,0) và dung dịch rửa được thêm vào dịch lọc này. Tiếp theo, dịch lọc và rửa kết hợp được xử lý bằng Polysorbate 80 để tiếp tục hòa tan tạp chất kỵ nước, ví dụ lipoprotein, và IgG được làm kết tủa bằng 25% etanol (độ pH =7) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -8°C đến -10°C . Chất kết tủa Ppt G thu được gần như có màu trắng và có độ tinh khiết IgG cao hơn. Tiếp theo, chất kết tủa này được hoà tan trong nước tinh khiết ở tỷ lệ 7g nước cho 2g chất kết tủa Ppt G.

Dung dịch IgG được phân tích tỷ lệ thu hồi IgG và tạp chất sau bước lọc Cuno. Cụ thể, hoạt độ phân giải amit (PL-1), hoạt độ PKA, và fibrinogen được xác định (Bảng 3). Đáng chú ý là, như thấy trong Bảng 3, quy trình chiết bằng cách sử dụng từ 40 đến 60mg Aerosil 380 cho mỗi gam dịch đặc II+III tạo ra tỷ lệ thu hồi IgG ở mức chấp nhận được và giảm đáng kể hoạt độ phân giải amit và hoạt độ PKA, cũng như giảm đáng kể lượng fibrinogen trong dịch lọc. So với bước chiết được thực hiện mà không xử lý bằng Aerosil, việc bổ sung 40mg Aerosil 380 cho mỗi gam dịch đặc II+III làm giảm gần 90% hoạt độ PKA và hàm lượng fibrinogen và giảm 60% hoạt độ phân giải amit, đồng thời duy trì tỷ lệ thu hồi IgG tương tự (73%).

Bảng 1. Tác động của lượng Aerosil 380 ở bước lọc Cuno II+III (chiết bằng các điều kiện GAMMAGARD® LIQUID)

Aerosil	IgG	IgG	PL-1	PKA	Fibrinogen
mg g^{-1} dịch đặc II+III	g l^{-1} huyết tương	Tỷ lệ thu hồi	$\mu\text{mol phút}^{-1} \text{g}^{-1}$ protein (Ppt G)	IU g^{-1} protein (Ppt G)	mg g^{-1} protein (Ppt G)
0	4,9	72%	1,3	2403	19,5
20	5,2	82%	0,7	974	8,2
40	4,8	73%	0,5	290	2,1
60	4,8	71%	0,3	90	0,1
80	4,2	63%	dưới giới hạn phát hiện	37	0,0

100	4,3	65%	dưới giới hạn phát hiện	16	0,0
-----	-----	-----	-------------------------	----	-----

Ví dụ 2

Ví dụ này cho thấy rằng lượng đáng kể fibrinogen có thể được loại khỏi huyền phù chứa dịch đặc Phân đoạn II+III cải biến đã được chiết bằng cách xử lý bằng Aerosil trước khi lọc. Mục đích của thí nghiệm này là nhằm tìm ra các điều kiện thích hợp để loại bỏ fibrinogen một cách hữu hiệu mà không làm hao hụt IgG một cách đáng kể.

Dịch đặc II+III cải biến, điều chế được theo phương pháp theo sáng chế, được hoà tan trong 5mM natri axetat/5mM natri phosphat monobazơ đệm pH 4,5. Tỷ lệ hòa tan là 15kg đệm cho 1kg dịch đặc II+III. Lượng axit axetic được bổ sung vào dung dịch đệm được lựa chọn sao cho độ pH sau khi khuấy trong sáu mươi phút là 4,9. Để đồng hóa hoàn toàn huyền phù, huyền phù này được khuấy tới hai mươi giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trước khi được tách thành 6 phần, mỗi phần 50mL trong cốc mở có dung tích 100mL, trong đó có sẵn Aerosil 380 với lượng khác nhau, như được thể hiện trong Bảng 2. Tiếp theo, dung dịch chứa huyền phù II+III được khuấy trong 80 phút với sự có mặt của Aerosil, trước khi xử lý và phân tích. Sau khi khuấy, tất cả các mẫu được ly tâm bằng thiết bị Heraeus Cryofuge 8500i ở tốc độ 4600 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C trong ống falcon loại có dung tích 50mL.

Trong thí nghiệm này, tiến hành xác định lượng IgG bằng cách áp dụng thử nghiệm định lượng bằng cách đo độ đục, thử nghiệm này được lựa chọn do các trị số chính xác hơn, so với thử nghiệm ELISA, ở nồng độ cao được tìm thấy trong dung dịch chứa huyền phù II+III. Để giảm thiểu sự kích ứng của độ đục không đặc hiệu, các mẫu này được lọc qua thiết bị lọc cỡ lỗ 0,45µm trước khi thử nghiệm. Đối với IgM, IgA, và fibrinogen, thử nghiệm ELISA được ưu tiên do nồng độ của các tạp chất này trong huyền phù là thấp hơn. Kết quả của thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Để xác định rõ hơn tác động của việc xử lý bằng Aerosil đối với việc loại bỏ fibrinogen và sự hao hụt IgG như đã mô tả trong Ví dụ 1, nồng độ Aerosil được chuẩn độ tiếp trong khoảng từ 0mg đến 40mg cho mỗi gam dịch đặc II+III cải biến. Kết quả

được thể hiện trong Bảng 2 cho thấy hiệu quả cao của Aerosil trong việc làm giảm lượng fibrinogen trong phân đoạn này. Đáng chú ý là, việc sử dụng 40mg cho mỗi gam dịch đặc II+III làm giảm đến 90% fibrinogen, trong khi chỉ làm giảm tỷ lệ thu hồi IgG trong bánh lọc 10%.

Bảng 2. Kết quả thu được khi thay đổi các điều kiện hòa tan sau khi chiết II+III bằng 5mM NaAc / 5mM NaH₂PO₄ độ pH=4,5 ở tỷ lệ pha loãng 1kg II+III cho 15kg dung dịch đệm sau khi ly tâm

Điều kiện hòa tan		Trị số trong phần dịch nổi													
		Protein (Biuret)		IgM (xác định bằng ELISA)		IgG (xác định bằng độ đục)		IgA (xác định bằng ELISA)		Fibrinogen (xác định bằng ELISA)					
Điều kiện	Thời gian khuấy thêm (phút)	độ pH	Độ dẫn điện riêng (mScm ⁻¹)	(gl ⁻¹)	(g)	(gl ⁻¹ huyết tương g)	(μg mL ⁻¹ huyết tương g)	(gl ⁻¹ huyết tương g)	(Mg mL ⁻¹ huyết tương g)	(gl ⁻¹ huyết tương g)	(μg mL ⁻¹ huyết tương g)	(gl ⁻¹ huyết tương g)	(μg mL ⁻¹ huyết tương g)	(gl ⁻¹ huyết tương g)	(μg mL ⁻¹ huyết tương g)
Mẫu trắng 80 phút	80	5,0	1,5	13,76	0,69	8,5	476	0,29	7,19	4,44	993	0,61	400	0,25	
Aerosil 5	mg g ⁻¹ dịch đặc II+III	80	5,0	1,5	13,40	0,67	8,3	457	0,28	7,30	4,51	983	0,6	353	0,22
Aerosil 10		80	5,0	1,5	13,44	0,67	8,3	464	0,29	6,97	4,30	1009	0,62	272	0,17
Aerosil 15		80	5,0	1,5	12,01	0,60	7,4	451	0,28	7,04	4,35	1005	0,62	230	0,14
Aerosil 30		80	5,0	1,5	12,49	0,62	7,7	468	0,29	6,77	4,18	944	0,58	95	0,06
Aerosil 40		80	5,0	1,5	12,21	0,61	7,5	449	0,28	6,71	4,14	899	0,66	41	0,03

Ví dụ 3.

Ví dụ này cho thấy rằng các điều kiện thích hợp cho phép chiết được IgG từ dịch đặc Phân đoạn II+III cải biến với hiệu quả cao, đồng thời hạn chế lượng tạp chất bất lợi. Cụ thể là, các thông số được kiểm tra bao gồm nồng độ axit axetic được dùng trong dung dịch đệm hòa tan II+III và xử lý dung dịch được chiết bằng Aerosil trước khi lọc.

Dịch đặc II+III được chiết trong 5mM natri axetat, 5mM natri dihydrophosphat và các lượng axit axetic đậm đặc khác nhau, như được thể hiện trong Bảng 1, trong 180 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C, tiếp theo bổ sung Aerosil 380 vào như được thể hiện trong Bảng 1. Sau khi khuấy trong một giờ,

huyền phù này được làm trong bằng thiết bị lọc Cuno 50SA với sự có mặt của diatomit. Bước rửa sau thiết bị lọc được thực hiện bằng dung dịch đệm giống với dung dịch đệm dùng cho bước chiết chỉ khác về lượng axit axetic, như được thể hiện trong Bảng 1, bằng cách sử dụng 40% thể tích huyền phù trước khi lọc. Bước làm kết tủa chất kết tủa G với sự có mặt của 25% rượu etylic; 8g l⁻¹ natri xitrat, và 0,2% Tween 80 (độ pH = 7) ở -8°C được thực hiện và sau khi giữ trong 8 giờ, thực hiện phân tách bằng cách ly tâm bằng thiết bị Heraeus Cryofuge 8500i trong cốc mô làm bằng thép không gỉ ở tốc độ 4600 vòng/phút trong 30 phút ở -10°C. Chất kết tủa được hoà tan trong nước tinh khiết theo tỷ lệ 1:2.

Bảng 3. Ảnh hưởng của lượng axit axetic dùng để điều chỉnh độ pH của dung dịch đệm chiết và lượng Aerosil để tinh chế đến hiệu suất IgG và độ tinh khiết về Ppt G và lượng IgG hao hụt trong bánh lọc

Dung dịch đệm hòa tan	Aerosil (mg g ⁻¹ II+III)	0	20	40	40
	Axit axetic (g l ⁻¹)	0,40	0,40	0,40	0,51
	độ pH	4,52	4,52	4,52	4,46
Dịch chiết II+III	độ pH	5,00	5,00	5,50	4,94
	Độ dẫn điện riêng (mS cm ⁻¹)	1,340	1,340	1,340	1,344
Dung dịch đệm rửa trước/sau	Axit axetic (g l ⁻¹)	0,12	0,12	0,12	0,12
	độ pH	5,02	5,02	5,02	5,02
Dịch lọc II+III	CAE albumin (%)	11,9	12,5	12,3	10,7
	CAE α/β-globulin	25,5	22,9	18,9	17,2
	CAE protein biến tính	3,2	0,0	0,0	0,0
	CAE (% γ-globulin)	59,4	64,6	68,8	72,1
	độ pH	5,00	5,03	5,04	4,92
hao hụt IgG trong bánh lọc	(g l ⁻¹ huyết tương)	0,09	0,20	0,56	0,29
PptG hòa tan	CAE albumin (%)	0,3	0,5	0,3	0,3
	CAE α/β-globulin	16,2	14,3	12,5	13,0
	CAE protein biến tính	0,0	0,0	0,0	0,0
	CAE (% γ-globulin)	83,5	85,2	87,2	86,7
	fibrinogen (mg l ⁻¹ huyết tương)	129	32	<4	4
	PKA (IU mg ⁻¹ protein)	126	60	9	10
	PL-1 (μmol mL ⁻¹ g ⁻¹)	0,9	0,6	0,5	0,6
dịch nổi PptG	độ pH	7,20	7,35	7,30	6,96

Hao hụt IgG trong phần dịch nội PptG	(g l ⁻¹ huyết tương)	0,14	0,13	0,11	0,09
--	---------------------------------	------	------	------	------

Như có thể thấy trong Bảng 1, việc bổ sung Aerosil vào huyền phù chứa dịch đặc II+III có ảnh hưởng đáng kể đến độ tinh khiết γ -globulin trong phân đoạn Ppt G. Khi không xử lý bằng Aerosil, độ tinh khiết γ -globulin chỉ là 83,5%, trong khi bổ sung 40mg Aerosil cho mỗi gam dịch đặc II+III vào huyền phù chứa dịch đặc II+III làm tăng độ tinh khiết γ -globulin lên tới 87,2%. Như đã được thể hiện rõ, bước xử lý bằng Aerosil làm giảm đáng kể fibrinogen, PKA và hoạt độ phân giải amit. Một hạn chế của việc hấp phụ tạp chất trên Aerosil là ở chỗ hao hụt IgG trong bánh lọc tăng lên khi tăng lượng Aerosil. Tuy nhiên, như được thể hiện trong Bảng 1, việc gia tăng nồng độ axit axetic trong dung dịch đệm chiết bù trừ được một phần ảnh hưởng của Aerosil đến mức hao hụt IgG trong bánh lọc, và làm giảm hơn nữa mức hao hụt IgG trong phân đoạn Ppt G trong phần dịch nội. Như có thể thấy trong Bảng 1, khi tăng lượng axit axetic trong dung dịch đệm hòa tan từ 400 μ l cho mỗi lít dịch đặc đến 510 μ l cho mỗi lít dịch đặc, thì lượng IgG hao hụt trong bánh lọc giảm đi gần 50%. Theo cách có lợi, nồng độ axit axetic cao không ảnh hưởng đến độ tinh khiết γ -globulin trong phân đoạn Ppt G (độ tinh khiết là 87,2% khi sử dụng 400 μ l cho mỗi lít dịch đặc so với độ tinh khiết là 86,7% khi sử dụng 510 μ l cho mỗi lít dịch đặc). Hơn nữa, kết quả cho thấy sự chênh lệch về độ pH do sự khác nhau về lượng axit axetic là không đáng kể, do khả năng đệm cao của axit axetic gần với trị số pka của nó là 4,75 (Merck). Điều này gợi ý rằng để đạt được độ chính xác cao hơn khi sản xuất ở quy mô lớn, thì axit axetic cần phải được bổ sung vào theo trọng lượng. Do vậy, ảnh hưởng của Aerosil đến độ tinh khiết lớn hơn nhiều so với ảnh hưởng của axit axetic đến độ tinh khiết, trong phạm vi nghiên cứu, như được thể hiện bởi hàm lượng γ -globulin được xác định theo CAE.

Ví dụ 4

Kết quả được thấy trong Ví dụ 3 gợi ý rằng lượng IgG hao hụt trong bánh lọc phụ thuộc rất nhiều vào lượng axit axetic được dùng để điều chỉnh độ pH của dung dịch đệm chiết ở nồng độ Aerosil đã định. Để làm rõ hơn nữa ảnh hưởng này, dịch đặc II+III cải biến được chiết trong nước tinh khiết trong khoảng 120 phút để thu được

huyền phù đồng nhất và được chia thành 4 phần. Các phần này được điều chỉnh đến độ pH lần lượt bằng 3,8, 4,2, 4,6, và 5,0, bằng axit axetic 1M, sau đó được chiết tiếp trong 120 phút nữa. Tiếp theo, việc xử lý bằng Aerosil được thực hiện bằng 40mg Aerosil 380 cho mỗi gam dịch đặc II+III. Sau khi khuấy trong một giờ, huyền phù này được làm trong bằng thiết bị lọc Cuno 50SA với sự có mặt của diatomit. Việc rửa sau thiết bị lọc được thực hiện với 100 phần trăm thể tích huyền phù trước khi lọc bằng dung dịch đệm chiết được điều chỉnh đến độ pH nêu trên. Dịch lọc được xử lý bằng 8g l⁻¹ natri xitrat và 0,2% Tween 80, được điều chỉnh đến độ pH 7,0, và IgG được làm kết tủa bằng 25% rượu ở -8°C. Chất kết tủa PptG được thu hồi bằng cách ly tâm ở 4600 vòng/phút trong 30 phút ở -10°C trong thiết bị Heraeus Cryofuge 8500i bằng cách sử dụng cốc mô làm bằng thép không gỉ. Tiếp theo, chất kết tủa được hoà tan trong nước tinh khiết ở tỷ lệ 7g nước cho 2g chất kết tủa Ppt G. Tiếp theo, các phân đoạn tương ứng được phân tích tỷ lệ thu hồi IgG, hoạt độ PKA, hàm lượng fibrinogen, và hoạt độ phân giải amit, để xác định sự phụ thuộc của tỷ lệ thu hồi vào độ pH (Bảng 4).

Bảng 4. Sự phụ thuộc của mức loại bỏ fibrinogen, hoạt độ PKA và hoạt độ phân giải amit bằng cách chiết và làm trong bằng cách xử lý bằng Aerosil vào độ pH

Độ pH chiết và làm trong bằng axit axetic	Nồng độ của axit axetic sau khi điều chỉnh độ pH (mM)	Hao hụt IgG trong bánh lọc (g l ⁻¹ huyết tương)	Hao hụt IgG trong phần dịch nổi PptG (g l ⁻¹ huyết tương)	Tổng hao hụt IgG (g l ⁻¹ huyết tương)	Chất kết tủa G		
					PKA (IU mg ⁻¹)	fibrinogen (mg l ⁻¹ huyết tương)	PL-1 (μmol mL ⁻¹ g ⁻¹)
3,8	75	0,02	0,85	0,87	138	243	-
4,2	25	0,04	0,53	0,57	35	182	-
4,6	10	0,07	0,05	0,12	2	99	2
5,0	5	0,19	0,06	0,25	0,6	3	0,5
3,8	75	-	-	-	116	304	3,8
4,2	25	0,02	0,34	0,36	44	313	2,6
4,6	10	0,04	0,52	0,56	8	148	1,7
5,0	5	0,14	0,09	0,23	3	10	<0,2

Bảng 4 cho thấy rằng PKA, hoạt độ phân giải amit (PL-1), và mức loại bỏ fibrinogen bởi Aerosil là kém hiệu quả ở độ pH thấp trong quá trình làm trong. Có thể nhận thấy từ kết quả thu được theo bảng này, độ pH hữu hiệu nhất để loại bỏ hữu hiệu

PKA, hoạt độ phân giải amit (PL-1), và fibrinogen, đồng thời duy trì tỷ lệ thu hồi IgG hữu hiệu trong phân đoạn Ppt G, là khoảng pH=5. Nồng độ axit axetic cao làm hao hụt IgG đáng kể trong phần dịch nổi Ppt G ($0,85\text{g l}^{-1}$ với sự có mặt của 75mM axit axetic) trong khi sự hao hụt IgG trong bánh lọc giảm đến mức tối thiểu.

Ví dụ 5

Để xác định sự phụ thuộc của việc xử lý bằng Aerosil đến kết quả thấy trong Ví dụ 4, thử nghiệm này được lặp lại, nhưng bỏ qua bước xử lý bằng Aerosil. Một cách ngắn gọn, dịch đặc II+III được chiết trong nước tinh khiết trong khoảng 120 phút để thu được huyền phù đồng nhất và được chia thành 4 phần. Các phần này được điều chỉnh lần lượt đến độ pH=3,8, 4,2, 4,6, và 5,0, bằng axit axetic 1M, sau đó chiết lần thứ hai trong 120 phút nữa. Sau đó, huyền phù được làm trong bằng thiết bị lọc Cuno 50SA với sự có mặt của diatomit. Việc rửa sau thiết bị lọc được thực hiện bằng 100 phần trăm thể tích huyền phù trước lọc bằng dung dịch đệm chiết được điều chỉnh đến độ pH nêu trên. Dịch lọc được xử lý bằng 8g l^{-1} natri xitrat và 0,2% Tween 80, được điều chỉnh đến độ pH=7,0, và IgG được làm kết tủa bằng 25% rượu ở nhiệt độ -8°C . Chất kết tủa Ppt G được thu hồi bằng cách ly tâm với tốc độ 4600 vòng/phút trong 30 phút ở -10°C trong thiết bị Heraeus Cryofuge 8500i bằng cách sử dụng cốc mô làm bằng thép không gỉ. Tiếp theo, chất kết tủa được hoà tan trong nước tinh khiết ở tỷ lệ 7g nước cho 2g chất kết tủa Ppt G. Tiếp theo, các phân đoạn tương ứng được phân tích tỷ lệ thu hồi IgG, hoạt độ PKA, hàm lượng fibrinogen, và hoạt độ phân giải amit, để xác định sự phụ thuộc của tỷ lệ thu hồi vào độ pH (Bảng 5).

Bảng 5

Sự phụ thuộc của việc loại bỏ fibrinogen, hoạt độ PKA và hoạt độ phân giải amit bằng cách chiết và làm trong mà không xử lý bằng Aerosil vào độ pH

					Chất kết tủa G		
Độ pH chiết và làm trong bằng axit axetic	Nồng độ của axit axetic sau khi điều chỉnh độ pH (mM)	Hao hụt IgG trong bánh lọc (g l^{-1} huyết tương)	Hao hụt IgG trong phần dịch nổi PptG (g l^{-1} huyết tương)	Tổng hao hụt IgG (g l^{-1} huyết tương)	PKA (IU mg^{-1})	fibrinogen (mg l^{-1} huyết tương)	PL-1 ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{g}^{-1}$)

3,8	75	0,00	0,42	0,42	214	173	3,9
4,2	25	0,01	0,19	0,20	170	134	3,2
4,6	10	0,01	0,09	0,10	38	193	1,4
5,0	5	0,09	0,04	0,13	6,4	114	0,4
3,8	75	0,00	0,53	0,53	193	355	3,8
4,2	25	0,00	0,28	0,28	171	346	3,2
4,6	10	0,01	0,14	0,15	131	340	1,5
5,0	5	0,16	0,05	0,21	5,3	189	<0,2

Phù hợp với kết quả được thấy trong Ví dụ 4, việc gia tăng độ pH của dung dịch đậm chiết/dung dịch đậm hòa tan đến 5,0 làm tăng một chút lượng hao hụt IgG trong bánh lọc, tuy nhiên, lượng hao hụt này được bù lại nhiều hơn bởi mức giảm hao hụt IgG lớn hơn trong phần dịch nổi Ppt G.

Khi kết quả ở Ví dụ 4 và Ví dụ 5 được so sánh, có thể nhận thấy rằng việc xử lý bằng Aerosil làm giảm hoạt độ PKA còn lại thấy ở phân đoạn PptG hòa tan khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH thấp hơn (3,8, 4,2, và 4,6), mà không phải ở độ pH=5,0 (Hình 2). Ngược lại, việc xử lý bằng Aerosil làm giảm đáng kể hàm lượng fibrinogen của phân đoạn Ppt G hòa tan khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH cao hơn (Hình 3; độ pH bằng 4,6 và 5,0 so với độ pH bằng 3,8 và 4,2). Việc xử lý bằng Aerosil dường như không làm ảnh hưởng đến hoạt độ phân giải amit còn lại thấy ở phân đoạn Ppt G hòa tan (Hình 4). Đáng chú ý là, lượng của cả ba tạp chất trong phân đoạn Ppt G hòa tan được giảm đáng kể khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH = 5,0, so với độ pH bằng 3,8, 4,2, và 4,6.

Ví dụ 6

Như có thể thấy trong các ví dụ nêu trên, lượng hao hụt IgG trong bánh lọc và phần dịch nổi Ppt G được giảm thiểu hóa khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 4,6. Tuy nhiên, các Ví dụ trước đó cũng chứng minh rằng các tạp chất quyết định, bao gồm hoạt độ PKA, hoạt độ phân giải amit, và hàm lượng fibrinogen, cao hơn nhiều khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH = 4,5 hoặc 4,6 so với khi bước chiết xảy ra ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,0. Do đó, ví dụ này được thực hiện để xác định xem liệu lượng tạp chất cao hơn được thấy khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH 4,5 có thể được bù lại bằng cách gia tăng lượng Aerosil được sử

dụng để hấp phụ các tạp chất, đồng thời duy trì lượng IgG hao hụt ít trong bánh lọc và phần dịch nổi Ppt G.

Cùng với những phương pháp này, việc chiết dịch đặc II+III cải biến được thực hiện như đã nêu trên, bằng dung dịch đệm chiết có độ pH bằng 4,5. Bước gia tăng lượng Aerosil 380, lên tới 200mg cho mỗi gam dịch đặc II+III, được bổ sung vào sau đó và huyền phù này được khuấy trong một giờ. Việc xử lý mẫu được thực hiện như đã nêu trên.

Như có thể thấy trong bảng 6, việc loại bỏ cả fibrinogen và hoạt độ PKA được cải thiện đáng kể bằng cách làm trong bằng Aerosil với lượng lớn. Lượng hao hụt IgG trong bánh lọc do gắn vào Aerosil tăng lên với lượng lớn Aerosil, mặc dù ảnh hưởng này phần nào đã được bù đắp bởi sự giảm hao hụt IgG trong phần dịch nổi Ppt G. Tuy nhiên, hoạt độ phân giải amit không thể giảm một cách đáng kể bởi lượng lớn Aerosil khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH=4,5. Hơn nữa, mặc dù độ tinh khiết γ -globulin được cải thiện với lượng Aerosil cao hơn, trong tất cả các trường hợp độ tinh khiết này vẫn còn thấp hơn giới hạn kỹ thuật là >86% đối với Ppt G dường như là do độ pH thấp ở bước chiết và làm trong.

Bảng 6

Bảng 6 thể hiện kết quả của việc thay đổi nồng độ Aerosil khi chiết và làm trong ở độ pH=4,5

				Chất kết tủa G			
Lượng Aerosil (mg) cho mỗi gam II+III	Hao hụt IgG trong bánh lọc (g l^{-1} huyết tương)	Hao hụt IgG trong phần dịch nổi PptG (g l^{-1} huyết tương)	Tổng hao hụt IgG (g l^{-1} huyết tương)	PKA (IU mg^{-1})	fibrinogen (mg l^{-1} huyết tương)	PL-1 ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{g}^{-1}$)	CAE (% gamma globulin)
0	0,01	0,21	0,22	177,1	272	5,4	69,1
40	0,13	0,50	0,63	9,3	173	1,8	76,8
100	0,11	0,30	0,41	0,1	76	6,1	79,4
200	0,25	0,08	0,33	dưới giới hạn phát hiện	10	4,5	84,1

Ví dụ 7

Ví dụ này cho thấy rằng ảnh hưởng của độ pH của dung dịch đệm chiết đến việc loại bỏ tạp chất sau khi tạo huyền phù lại và làm trong dịch đặc II+III.

Bước chiết ở độ pH thấp đối với dịch đặc II+III cải biến được thực hiện ở độ pH = 4,2 bằng cách sử dụng tỷ lệ 15g đệm cho mỗi gam dịch đặc II+III. Tiếp theo, huyền phù được chia thành 3 phần và độ pH được điều chỉnh lần lượt đến 4,5, 4,7, hoặc 5,0 bằng dung dịch Tris 3M. Sau đó, mỗi dung dịch được chia tiếp thành hai phần, được ủ trong một giờ ở nhiệt độ 4°C hoặc 25°C. Thực hiện bước lọc bằng thiết bị Cuno 50(90)SA bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa sau natri axetat 10mM có độ pH bằng với độ pH của dung dịch đệm làm trong tương ứng. Dịch lọc được xử lý bằng 8g L⁻¹ xitrat và 0,2% Tween 80, và sau đó IgG được làm kết tủa bằng cách bổ sung 25% rượu etylic vào ở -10°C trong ít nhất 8 giờ. Chất kết tủa được thu hồi bằng cách ly tâm như đã mô tả trước đây, và chất kết tủa này được hoà tan trong 2 lần thể tích nước tinh khiết. Huyền phù thu được được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc Cuno VR06, trong dung dịch cuối cùng có độ dẫn điện riêng bằng khoảng 1,3mScm⁻¹.

Để đánh giá các điều kiện khác nhau, lượng IgG, IgA, IgM, transferrin, fibrinogen, và các tạp chất khác được xác định. Kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 7, cho thấy việc làm trong huyền phù chứa dịch đặc II+III là phụ thuộc vào độ pH. Trong khoảng pH từ 4,5 đến 5,0, lượng IgA, IgM, transferin, và fibrinogen không thay đổi đáng kể, nhưng các protein không mong muốn khác có mặt ở hàm lượng cao hơn so với khi sử dụng dung dịch đệm có độ pH thấp hơn. Đã tính được rằng các tạp chất khác này chiếm 10% tổng lượng protein ở độ pH=4,5, nhưng ít hơn 1% ở độ pH=5. Hàm lượng IgG cao nhất ở độ pH=5,0, trong khi sự phụ thuộc của hàm lượng IgG và lượng tạp chất vào nhiệt độ, nằm trong khoảng từ 4°C đến 25°C, là không đáng kể.

Bảng 7

Bảng 7 so sánh mức giảm tạp chất từ II+III được hòa tan vào dịch lọc VR06 bằng cách thay đổi độ pH và nhiệt độ trong khoảng thời gian ủ trong 1 giờ sau khi tạo huyền phù lại đối với dịch đặc II+III và sau đó lọc sau khi chiết ở độ pH thấp mà không sử dụng các phụ gia

Độ pH ở các bước ủ và lọc	Nhiệt độ của bước ủ và bước lọc thứ nhất	Bước	% so với protein					
			IgG xác định theo phương pháp đo độ đục	IgA xác định theo ELISA	IgM xác định theo ELISA A	transferrin xác định theo ELISA	fibrinogen xác định theo ELISA	Các tạp chất khác tính được
4,5	4°C	II+III hòa tan	55,0	7,9	3,6	4,3	3,0	29,3
		Dịch lọc Cuno 90	51,7	8,5	4,0	1,6	2,5	31,7
		Ppt G hòa tan	64,4	8,3	4,4	0,1	2,8	20,0
		Dịch lọc VR06	71,8	9,5	5,1	0,1	3,0	10,6
	25°C	II+III hòa tan	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Dịch lọc Cuno 90	52,3	8,0	4,2	1,6	2,6	31,3
		Ppt G hòa tan	64,5	7,4	4,8	0,1	3,8	19,4
		Dịch lọc VR06	72,5	9,1	5,0	0,1	3,3	9,9
4,7	4°C	II+III hòa tan	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Dịch lọc Cuno 50	49,4	8,2	3,7	1,6	2,5	34,6
		Ppt G hòa tan	68,8	9,5	5,0	0,1	3,5	13,2
		Dịch lọc VR06	76,5	9,8	5,4	0,1	3,5	4,7
	25°C	II+III hòa tan	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Dịch lọc Cuno 50	49,6	8,6	3,7	1,5	3,1	33,6
		Ppt G hòa tan	66,9	8,8	4,9	0,1	4,1	15,2
		Dịch lọc VR06	75,8	10,2	5,3	0,1	4,3	4,3
5,0	4°C	II+III hòa tan	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Dịch lọc Cuno 50	52,5	9,3	3,4	1,7	2,1	31,0
		Ppt G hòa tan	76,9	10,1	4,9	0,1	3,0	5,0
		Dịch lọc VR06	83,6	10,6	4,5	0,1	3,0	0,0
	25°C	II+III hòa tan	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Dịch lọc Cuno 50	53,4	8,9	3,4	1,8	2,6	30,0
		Ppt G hòa tan	76,6	10,3	4,8	0,1	3,9	4,3
		Dịch lọc VR06	79,9	10,9	4,7	0,1	3,6	0,8

Như có thể thấy trong Bảng 8, việc phân tích tiếp phân đoạn Ppt G hòa tan và dịch lọc VR06 cho thấy rằng việc sử dụng dung dịch đệm có độ pH = 4,5 đối với các bước làm trong II+III và xử lý dịch lọc II+III làm tăng lượng kết tụ và các hợp phần có phân tử lượng thấp. Ảnh hưởng này còn được tăng cường hơn nữa khi các bước này được thực hiện ở 25°C mà không phải thực hiện ở 4°C. Ngược lại, khi các mẫu được xử lý ở độ pH cao hơn (độ pH = 5,0), thì huyền phù Ppt G và dịch lọc thu được chứa lượng hợp chất có phân tử lượng ~350 kDa (dimer IgG hoặc IgA) là cao hơn so với khi dung dịch được xử lý ở độ pH=4,5 (Bảng 8). Hơn nữa, việc xử lý ở độ pH thấp hơn khiến cho hoạt độ phân giải amit cao hơn so với khi xử lý ở độ pH=5,0.

Bảng 8

Ảnh hưởng của độ pH và nhiệt độ trong quá trình ủ và lọc huyền phù chứa dịch đặc II+III đến hoạt độ PKA và hoạt độ phân giải amit của chất kết tủa G được hòa tan và đến phân bố kích cỡ phân tử trong dịch lọc VR06.

Độ pH của bước ủ và tất cả các bước lọc Độ pH	Nhiệt độ của bước ủ và bước lọc thứ nhất Nhiệt độ (°C)	Ppt G hòa tan				Dịch lọc VR06			
		Hoạt độ PKA		Hoạt độ phân giải amit (PL-1)		Phân bố kích thước phân tử (%)			
		IU mL ⁻¹	IU g ⁻¹	nmol mL ⁻¹ . phút ⁻¹	nmol phút ⁻¹ . g ⁻¹	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60kDa
4,5	4	60,2	2028	171,8	5788	28,33	6,61	6321	1,85
4,5	25	103,4	3569	239,4	8264	29,44	6,02	61,76	2,79
4,7	4	1343,2	38029	152,1	4306	23,71	8,82	65,82	1,64
4,7	25	2215,9	67702	180,2	5506	2454	8,02	6506	2,38
5,0	4	134,5	4009	67,6	2015	17,81	10,78	70,03	1,38
5,0	25	186,6	5738	873	2685	19,16	10,54	68,84	1,46

Ví dụ 8

Kết quả thể hiện trong bảng 7 và bảng 8 cho thấy rằng việc tạo huyền phù lại chứa chất kết tủa II+III cần phải được thực hiện ở nhiệt độ lạnh (từ 2°C đến 8°C) và chỉ ra rằng độ pH cần phải được giữ ở 5,0 để giảm thiểu sự hòa tan các hợp phần có phân tử lượng cao (>450KDa) và các hợp phần có phân tử lượng thấp (>70KDa), cũng như hợp phần có hoạt độ phân giải amit. Việc làm trong hữu hiệu sau khi tạo huyền phù chứa dịch đặc II+III sẽ làm giảm lượng tạp chất nạp vào quy trình sắc ký bên dưới đối với Ppt G và do đó là chìa khóa để đáp ứng khả năng tái tạo các chi tiết kỹ thuật vật chứa cuối cùng của IVIG. Để khẳng định thêm về phát hiện này, dịch đặc II+III cải biến được hòa tan và xử lý, như nêu trên, dịch đặc II+III cải biến được hòa tan ở

độ pH=4,2 và tiếp theo được điều chỉnh đến độ pH bằng 4,5, 4,7, hoặc 5,0. Như có thể thấy ở Bảng 9, IgM được loại bỏ một cách hữu hiệu ở độ pH = 5,0 trong suốt quá trình tạo huyền phù dịch đặc II+III và làm trong hơn là khi loại bỏ ở độ pH = 4,5. Trong thử nghiệm này, hiệu suất IgG là tương tự ở độ pH = 5,0 và 4,5.

Bảng 9

Hiệu suất IgG, IgA, IgM, transferin và fibrinogen ở các bước khác nhau của quá trình tạo huyền phù lại chứa dịch đặc II+III, lọc và kết tủa Ppt G

Độ pH của bước ủ và cả bước lọc	Nhiệt độ của bước ủ và bước lọc thứ nhất	Bước	Hiệu suất %					
			Protein tổng	IgG xác định theo phương pháp ELISA	IgA xác định theo phương pháp ELISA	IgM xác định theo phương pháp ELISA	Transferin xác định theo phương pháp ELISA	Fibrinogen xác định theo phương pháp ELISA
4,5	4°C	II+III hòa tan	100,0	100,0	1041,0	100,0	100,0	100,0
		Dịch lọc Cuno 50	100,2	92,9	100,2	97,8	118,7	66,3
		Dịch lọc Cuno 90	97,0	91,1	106,3	108,6	123,2	80,1
		Phản dịch nổi Ppt G	33,5	4,4	-	-	-	-
		Ppt G hòa tan	71,7	83,9	75,6	89,6	5,0	66,5
		Dịch lọc VRO6	65,3	85,2	78,8	93,1	5,2	64,8
	25°C	II+III hòa tan	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Dịch lọc Cuno 50	101,0	92,3	100,9	104,4	113,2	98,7
		Dịch lọc Cuno 90	97,2	92,4	98,9	113,4	123,9	84,6
		Phản dịch nổi Ppt G	33,8	5,1	-	-	-	-
		Ppt G hòa tan	72,9	85,5	68,8	97,5	4,7	89,9
		Dịch lọc VRO6	68,3	90,0	78,9	95,9	5,5	75,0
4,7	4°C	II+III hòa tan	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	1' 00,0
		Dịch lọc Cuno 50	93,5	83,9	98,0	98,0	115,9	75,3
		Phản dịch nổi Ppt G	27,5	2,7	-	-	-	-
		Ppt G hòa tan	64,8	81,1	78,2	90,2	4,5	73,9
		Dịch lọc VRO6	60,5	84,1	75,0	92,1	5,1	70,2
	25°C	II+III hòa tan	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

5,0	4°C	Dịch lọc Cuno 50	94,7	85,3	103,1	98,5	113,8	95,8
		Phần dịch nổi Ppt G	28,5	4,1	-	-	-	-
		Ppt G hòa tan	65,3	79,5	73,1	90,9	5,0	87,0
		Dịch lọc VRO6	61,9	85,3	80,7	93,0	5,3	86,9
		II+III hòa tan	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	25°C	Cum 50 filtrate	86,1	82,3	101,5	81,5	117,5	59,8
		Phần dịch nổi Ppt G	26,0	4,1	-	-	-	-
		Ppt G hòa tan	58,1	81,2	74,8	79,3	4,5	57,0
		Dịch lọc VRO6	54,0	82,1	72,5	67,8	4,7	52,5
		II+III hòa tan	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Dịch lọc Cuno 50	88,0	85,4	99,7	83,2	124,1	75,4
		Phần dịch nổi Ppt G	23,4	1,5	-	-	-	-
		Ppt G hòa tan	60,5	84,2	79,0	81,6	4,5	78,2
		Dịch lọc VRO6	59,0	85,7	82,0	77,6	4,5	69,0

Ví dụ 9

Để đánh giá độ pH tối ưu ở bước chiết dịch đặc II+III, để giảm thiểu các hoạt tính phân giải protein trong dịch lọc, độ pH trong suốt quá trình chiết và lọc được thay đổi trong khoảng rộng từ 3,8 đến 7,8. Nhằm mục đích này, dịch đặc II+III cải biến được chiết ở độ pH thấp ở tỷ lệ 1+8. Sau khi khuấy trong một khoảng thời gian ngắn, để thu được thể phân tán đồng nhất, huyền phù được chia thành 8 phần, độ pH được điều chỉnh bằng axit axetic hoặc dung dịch đệm Tris đến pH 3,8, 4,2, 4,6, 5,0, 6,6, 7,0, 7,4 hoặc 7,8, và được chiết trong 120 phút nữa. Sau đó, độ pH được điều chỉnh đến 5,1 và bước làm trong được thực hiện bằng cách ly tâm trong ống Falcon có dung tích 50mL. thực hiện kết tủa Ppt G trong các điều kiện tiêu chuẩn. Hoạt độ phân giải amit và PKA được xác định trong phân đoạn hòa tan Ppt G như được thể hiện trên hình 5 và hình 6.

Như có thể thấy trong mẫu được bảo quản ở 4°C trên Hình 5, hoạt độ phân giải amit được giảm thiểu khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH=5,0. Nhấn mạnh thêm rằng không nên giữ các mẫu này ở nhiệt độ cao (nhiệt độ trong phòng) trong khoảng thời gian dài, hoạt độ phân giải amit tăng sau khi bảo quản phân đoạn hòa tan

Ppt G ở nhiệt độ trong phòng trong một tuần. Tương tự, như có thể thấy trên hình 6, hoạt độ PKA giảm thiểu khi dịch đặc II+III được chiết ở độ pH=5,0 hoặc lớn hơn.

Ví dụ 10

Ví dụ này đánh giá sự phụ thuộc của mức hao hụt hiệu suất IgG vào độ pH trong quá trình chiết và làm trong. Một cách ngắn gọn, 110g dịch đặc II+III cải biến được tạo huyền phù lại ở tỷ lệ 15g nước tinh khiết trên một gam dịch đặc II+III, tiếp theo là bước chiết trong 120 phút. Tiếp theo, mẫu này được chia làm bốn phần và độ pH được điều chỉnh bằng axit axetic đến độ pH=3,8, 4,2, 4,6, hoặc 5,0. Thực hiện chiết sơ bộ trước khi chia thành bốn phần ở độ pH ban đầu để đảm bảo bốn phần giống hệt nhau, sau đó bốn phần này được điều chỉnh tiếp đến độ pH nêu trên và được chiết tiếp trong một giờ nữa. Sau đó, các mẫu được làm trong bằng thiết bị lọc Cuno 50SA ở cùng độ pH áp dụng cho mỗi bước chiết và kết tủa Ppt G. Sau khi lọc Cuno, tất cả các phần được xử lý theo cách giống nhau, nghĩa là làm kết tủa chuẩn chất kết tủa G ở độ pH=7,0 đối với tất cả các phần. Kết quả của hai thử nghiệm này được tóm tắt trong Bảng 10 và Bảng 11 dưới đây.

Bảng 10

Tỷ lệ thu hồi protein và IgG trong dịch lọc cũng như các kết quả MSD và CAE của chất kết tủa G đã được hòa tan lại

		38/1				41				
		độ pH của bước chiết và làm trong	3,8	4,2	4,6	5,0	3,5	4,2	4,6	5,0
		nồng độ axit axetic sau khi điều chỉnh độ pH	75	25	10	5	75	25	10	5
	Dịch lọc	tỷ lệ thu hồi protein (%)	100,3	99,6	92,8	76,0	106,4	107,5	99,7	81,0
		tỷ lệ thu hồi IgG (%)	87,6	89,8	90,3	86,0	96,2	97,3	95,1	88,3
Chất kết tủa G		>450kDa	19,2	20,5	14,8	13,2	22,5	22,8	20,7	16,8
		~350kDa	8,7	7,6	10,5	11,7	5,2	5,0	7,7	9,4
		~160kDa	69,5	69,2	72,9	74,2	66,0	66,6	67,5	72,0
		<70kDa	2,7	2,7	1,8	1,0	6,2	5,6	4,1	1,9
		CAE (% gama globulin)	67,4	68,3	78,1	86,7	60,3	69,8	77,5	85,1

Bảng 11

Mức hao hụt IgG trong bước chiết và làm trong cũng như hoạt tính phân giải protein và fibrinogen trong chất kết tủa G đã được hòa tan lại

độ pH chiết và làm trong bằng axit axetic	Nồng độ của axit axetic sau khi điều chỉnh độ pH (mM)				Chất kết tủa G		
		Hao hụt IgG trong bánh lọc (g l ⁻¹ huyết tương)	Hao hụt IgG trong phần dịch nổi PptG (g l ⁻¹ huyết tương)	Tổng hao hụt IgG (g l ⁻¹ huyết tương)	PKA (IU mg ⁻¹)	fibrinogen (mg l ⁻¹ huyết tương)	PL-1 (μmol mL ⁻¹ g ⁻¹)
3,8	75	0,00	0,42	0,42	214	173	3,9
4,2	25	0,01	0,19	0,20	170	134	3,2
4,6	10	0,01	0,09	0,10	30	193	1,4
5,0	5	0,09	0,04	0,13	6,4	114	0,4
3,8	75	0,00	0,53	0,53	193	355	3,8
4,2	25	0,00	0,28	0,28	171	346	3,2
4,6	10	0,01	0,14	0,15	131	340	1,5
5,0	5	0,16	0,05	0,21	5,3	189	0,2

Dữ liệu nêu trên xác nhận kết quả thể hiện trên Hình 5 và Hình 6 về mức độ hoạt hoá các enzym phân giải protein bằng cách chiết ở độ pH thấp. Đồng thời, dữ liệu này chứng tỏ rằng việc chiết ở độ pH thấp làm hao hụt IgG ít hơn do độ hoà tan của tất cả protein tăng. Các kết quả này phù hợp với Ví dụ nêu trên. Ngoài ra, mức hao hụt IgG được thể hiện trong Bảng 11 cho thấy rằng nồng độ axit axetic càng cao, thì dẫn đến độ pH càng thấp, dẫn đến hao hụt IgG trong bánh lọc càng ít nhưng hao hụt IgG trong phần dịch nổi của chất kết tủa G lại càng cao. Điều này có thể được giải thích là do nồng độ axetat cao hơn ở bước làm kết tủa sau khi chiết ở độ pH thấp.

Ví dụ 11

Để xác định các điều kiện chiết II+III thích hợp, quy trình sử dụng bước chiết ở độ pH thấp bằng nước tinh khiết được điều chỉnh đến độ pH=4,3 bằng axit axetic và được điều chỉnh lại đến độ pH=4,9 trước khi lọc được so sánh với bước chiết trong natri axetat 5mM/natri đi-hydro phosphat 5mM bằng 600g axit axetic cho 1000 lít dung dịch đậm chiết, tạo ra độ pH hòa tan nằm trong khoảng từ 4,8 đến 4,9. Các thử nghiệm được thực hiện ở quy mô thực nghiệm, bắt đầu với 3,8kg đến 5kg dịch đặc II+III. Tất cả các thử nghiệm bao gồm bước xử lý bằng Aerosil với 40g Aerosil cho 1 kg dịch

đặc II+III. Để làm trong, sử dụng thiết bị lọc ép Strassburger với khung lọc có kích thước 30cmx30cm có lắp tấm lọc Cuno 50SA. Bước rửa sau được thực hiện bằng 4 lần thể tích chết của thiết bị lọc ép, bằng dung dịch đệm natri axetat 5mM/natri dihydro phosphat 5mM, với 150g axit axetic cho 1000 lít dung dịch đệm. Thực hiện ly tâm chất kết tủa G bằng thiết bị ly tâm Ceba® Z61H ở tốc độ 17000 vòng/phút (đường kính rôto bằng 10,5cm) ở tốc độ dòng 40 lít/giờ. Kết quả thử nghiệm này đã thực hiện hai lần được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12

So sánh bước chiết ở độ pH thấp tại độ pH=4,3 và thay đổi đến độ pH=4,9 trước khi xử lý bằng Aerosil với bước chiết bằng các điều kiện GAMMAGARD® LIQUID cải tiến bằng 600g axit axetic bằng cho 1000L dung dịch đệm chiết

Thí nghiệm	Đơn vị	P00809N G2	P00909N G2	P01509N G2	P02209N G2	P02509N G2	P02609N G2
Phương pháp		Chiết ở độ pH thấp			600g HAc cho 100l dung dịch đệm chiết		
Dịch đặc II+III	Lô số	VNEGJ0 39	VNGBJ0 22	VNGBJ2 16	VNGBJ2 16	VNGBJ0 22	VNEGJ03 9
	kg	5,00	5,00	4,97	4,96	4,96	3,36
PEG	L	10,65	118,70	123,32	123,31	117,65	92,35
Dịch chiết II+III							
protein	g	1316	1310	1364	1336	1347	1022
Hiệu suất protein (BIURET)	g l ⁻¹	12,3	11,0	11,1	10,8	11,5	12,4
Hiệu suất IgG (ELISA)	g l ⁻¹	6,09	5,89	6,25	5,50	6,06	6,38
Hiệu suất IgA (ELISA)	g l ⁻¹	1,06	0,96	0,96	1,00	1,01	1,10
Hiệu suất IgM (ELISA)	g l ⁻¹	0,40	0,40	0,47	0,40	0,43	0,48
Dịch lọc							
protein	g	957	1007	1036	955	926	731
Hiệu suất protein (BIURET)	g l ⁻¹	9,0	8,5	8,4	7,7	11,5	12,4
Hiệu suất IgG (ELISA)	g l ⁻¹	5,7	5,82	5,45	5,02	6,08	6,38
Hiệu suất IgA (ELISA)	g l ⁻¹	1,03	0,88	0,96	0,90	1,01	1,10
Hiệu suất IgM (ELISA)	g l ⁻¹	0,32	0,39	0,37	0,27	0,43	0,48

Dịch chiết bánh lọc							
Hiệu suất IgG (ELISA)	g l ⁻¹	-	-	-	0,07	0,07	0,07
Phần dịch nổi Ppt G							
protein		196	130	188	187	163	109
Hiệu suất protein (BIURET)	g l ⁻¹	1,8	1,1	1,5	1,5	1,4	1,3
Hiệu suất IgG (ELISA)	g l ⁻¹	0,05	0,02	0,03	0,05	0,03	0,04

Như có thể thấy trong bảng 12, cả hai quy trình chiết đều cho tỷ lệ thu hồi IgG tương tự. Kết quả nêu trong các ví dụ từ 3 đến 10, cho thấy rằng các tạp chất khác nhau có thể được giảm thiểu bằng cách chiết dịch đặc II+III ở độ pH=5,0, kết quả được thể hiện trong Bảng 12 cho thấy việc chiết ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 4,9 bằng 600g axit axetic bằng cho 1000L1000L dung dịch đệm chiết là hữu hiệu hơn chiết ở độ pH thấp và sau đó điều chỉnh độ pH từ 4,8 đến 5,0.

Ví dụ 12

Trong quá trình sản xuất, các khung lọc ép và đường ống nối với và đi từ thùng chứa có thể tích rỗng đáng kể, thể tích này vẫn được nạp huyền phù hoặc dịch lọc trước khi bắt đầu bước rửa sau đó. Khi bước rửa sau đó kết thúc, thể tích rỗng này vẫn còn ở trong thiết bị lọc ép. Các quy trình tiêu chuẩn có tính đến thể tích rỗng này bằng cách rửa bằng khoảng từ một đến hai lần thể tích chết của thiết bị lọc ép. Để xác định xem liệu các quy trình rửa sau lọc có cho phép thu hồi hữu hiệu tổng lượng IgG hay không, các thử nghiệm bằng cách thay đổi các thể tích dung dịch đệm rửa được thực hiện đối với quy trình tinh chế IgG sản xuất ở quy mô lớn hơn. Hình 1 thể hiện sự phụ thuộc của thể tích rửa sau (được xác định bởi thể tích chết hoặc thể tích rỗng) vào lượng IgG còn lại và protein tổng.

Đáng chú ý là, như có thể thấy trên hình 1, việc rửa sau lọc bằng cách sử dụng khoảng 2 lần thể tích chết của thiết bị lọc ép dẫn đến sự hao hụt đáng kể lượng IgG thu hồi, do dung dịch rửa chứa khoảng 1,5g IgG trong một lít dung dịch rửa. Đã bất ngờ phát hiện ra rằng, cần có dung dịch đệm sau rửa với thể tích bằng 3,6 lần thể tích chết của thiết bị lọc ép để thu hồi IgG một cách có hiệu quả (được biểu thị bằng mũi tên trên Hình 1). Hơn nữa, việc rửa sau đó bằng nhiều hơn 3,6 lần thể tích chết

của thiết bị lọc ép là không thiết thực, do nó làm loãng dịch lọc mà không thu hồi thêm IgG.

Ví dụ 13

Trong bước làm kết tủa II+III, nồng độ rượu tăng từ 20 đến 25% và nhiệt độ giảm từ -5°C đến -7°C . Khi hòa tan dịch đặc II+III, ít nhất 600mL axit axetic băng được sử dụng cho thể tích 1000L để điều chỉnh độ pH của dung dịch đậm tạo huyền phù lại chứa dịch đặc II+III, trong khi mà tỷ lệ sử dụng trước đây là 510mL axit axetic băng/1000L1000L dung dịch đậm. Tỷ lệ chiết là 1 + 15 với dung dịch đậm axit axetic. Để làm trong, 0,04g đến 0,06g Aerosil (thường là ở giới hạn dưới của khoảng này, ví dụ, 0,04g) được thêm vào mỗi gam dịch đặc II+III. Để rửa sau đó, sử dụng dung dịch đậm rửa sau với thể tích gấp khoảng bốn lần (4x) thể tích chết của thiết bị lọc. Ví dụ, 4,3 x thể tích chết của thiết bị lọc ép được sử dụng trong một thí nghiệm cụ thể trong khi 3,6 x thể tích chết được sử dụng trong một thí nghiệm khác. Thể tích rửa sau gấp bốn lần thể tích chết hoặc nhiều hơn được tăng từ 1,8 x thể tích chết đã được sử dụng trước đó. Dung dịch đậm được điều chỉnh bằng 150mL axit axetic băng được sử dụng cho 1000L dung dịch đậm, gia tăng so với tỷ lệ 120mL axit axetic băng/1000L dung dịch đậm đã được sử dụng trước đó. Các thay đổi này khiến cho hiệu suất IgG tăng 8% và độ tinh khiết γ -globulin ít nhất là 86%. Lượng IgG còn lại rất thấp được tìm thấy trong dịch chiết từ bánh lọc, khi chiết bằng natri phosphat 0,1M + NaCl 150mM (độ pH=7,4, độ dẫn điện riêng 25,5mS/cm).

Ví dụ 14

A. Tối ưu hóa phân đoạn I: bổ sung ethanol vào bằng cách phun so với bổ sung từng dòng; điều chỉnh độ pH đến pH=7,0 hoặc 7,5 sau khi bổ sung ethanol vào

Bảng 13 thể hiện hiệu suất IgG theo các phương pháp hiện đang được áp dụng và đưa ra ví dụ so sánh trong các thử nghiệm được mô tả dưới đây. Hao hụt 15% đến 20% IgG từ phần gom Cohn đến dịch lọc. Hao hụt khoảng 0,4g IgG trong phần dịch nổi II+III cho mỗi lít huyết tương.

Bảng 13

	Hiệu suất IgG (2009)					
	g/L huyết tương			% phần gom Cohn		
Phân đoạn	LA B1 (nguồn)	Vienna (nguồn)	LA B5 (đã biến đổi)	L.A. (nguồn)	Vienna (nguồn)	L.A. (đã biến đổi)
Phần gom Cohn	6,18 (5,28- 7,02)	6,26 (5,43-6,68)	7,49 * (6,41-8,41)	100	100	100
Phần dịch nổi II+III	0,41 (0,23- 0,63)	0,39 (0,33-0,47)	0,37 (0,23-0,48)	6,6	6,2	4,9
chất kết tủa II+III (theo tính toán)	5,77	5,87	7,12	93,4	93,8	95,1
dịch lọc II+III	4,93 (4,21- 5,57)	5,19 (4,11-5,48)	6,43 (6,11-7,02)	80	83	86

* LA B5 được thu hồi từ phần gom huyết tương Cohn: nồng độ IgG thấp hơn do đuổi bằng nước muối. LA B1 trung bình được thu hồi từ phần gom huyết tương Cohn: 8,52g/L.

Phương pháp

Phần gom Cohn được làm tan giá ở nhiệt độ nằm trong khoảng 24°C đến 27°C trong thời gian 6 giờ đến 7 giờ trong thùng 14 lít. Sau đó, nguyên liệu này được trộn qua đêm ở nhiệt độ nằm trong khoảng 2°C đến 8°C. Tiếp theo, phần gom được chia thành bốn phần (mỗi phần 800g):

- 1: bổ sung ethanol vào theo dòng, sau đó điều chỉnh độ pH đến 7,0
- 2: bổ sung ethanol vào theo dòng, sau đó điều chỉnh độ pH đến 7,5
3. Bổ sung ethanol bằng cách phun, sau đó điều chỉnh độ pH đến 7,0
4. Bổ sung ethanol bằng cách phun, sau đó điều chỉnh độ pH đến 7,5

Trước tiên, tất cả các phần được làm lạnh đến 0°C. Tiếp theo, 8% ethanol được bổ sung thành dòng vào các phần 1 và 2 và bổ sung bằng cách phun vào các phần 3 và 4 bằng cách sử dụng đầu phun. Trong cả hai phương pháp này, ethanol được thêm vào ở tốc độ xấp xỉ như nhau. Trong quá trình bổ sung ethanol vào, máy điều lạnh được điều chỉnh đến -5°C và 75mL ethanol được thêm vào mỗi phần trong khi trộn. Độ pH

được điều chỉnh đến 7,0 hoặc 7,5 bằng axit axetic 1M. Tiếp theo, dung dịch được ủ trong 1 giờ. Sau khi ủ, dung dịch được ly tâm bằng thiết bị ly tâm với tốc độ 4600 vòng/phút; 30 phút; -2°C).

Kết quả

Hiệu suất IgG được xác định định lượng bằng cách đo độ đục và được thể hiện trong Bảng 14. Thu được hiệu suất gần như 100% IgG trong phần dịch nổi phân đoạn I bằng phương pháp cải tiến (phun etanol), trong khi theo phương pháp bổ sung etanol vào thì mức hao hụt IgG thường nằm trong khoảng từ 0,2 đến 0,25g/L huyết tương. Các kết quả này cho thấy phương pháp cải tiến có thể làm tăng hiệu suất IgG lên tới 0,2g/L huyết tương trong sản xuất.

Bảng 14

Mẫu	Khối lượng (g)	Định lượng IgG bằng cách đo độ đục (giá trị trung bình của 3 lần đo)				
		mg/mL	g	%	Độ tinh khiết (%)	g/L huyết tương
Huyết tương nghèo kết tủa lạnh	800	5,72	4,57	100,00	12,2	5,72
Phần dịch nổi 1	856	5,10	4,37	95,57	12,6	5,46
Phần dịch nổi 2	853	5,16	4,41	96,36	12,7	5,51
Phần dịch nổi 3	853	5,36	4,58	100,14	13,1	5,72
Phần dịch nổi 4	848	5,33	4,52	98,90	13,0	5,65

B. Quy mô thực nghiệm: Phân đoạn I (phun so với bổ sung từng dòng; điều chỉnh độ pH đến 7,4 sau khi bổ sung etanol vào) và Phân đoạn II+III (điều chỉnh độ pH đến 6,7 trước khi bổ sung etanol vào, điều chỉnh lại đến 6,9 sau khi bổ sung etanol vào)

Ví dụ 15

Phương pháp

2,8kg huyết tương được làm tan giá trong khi trộn ở 2°C . Phân đoạn I: 8% etanol được thêm vào và độ pH được điều chỉnh đến 7,4 bằng cách sử dụng dung dịch axit axetic 5M. Trong khi trộn, huyền phù được làm lạnh đến nhiệt độ -2°C . Các điều kiện phun đạt được bằng cách sử dụng đầu phun. Ở cả hai phương pháp, bước bổ sung etanol và axit axetic 5M vào được thực hiện ở tốc độ xấp xỉ như nhau. Sau khi ủ

trong 1 giờ, dung dịch được ly tâm bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm CEPA ở nhiệt độ bằng -4°C .

Phân đoạn II+III: độ pH được điều chỉnh đến 6,7 bằng cách sử dụng dung dịch đệm có độ pH = 4, tiếp theo 25% etanol được thêm vào (1) bằng cách phun hoặc (2) bằng cách bổ sung từng dòng vào như được thực hiện theo cách thông thường. Sau đó, độ pH được điều chỉnh lại đến 6,9. Tiến hành ủ trong 10 giờ ở -7°C .

Kết quả

Mức hao hụt IgG trong phân đoạn II+III khi bổ sung 25% etanol vào được xác định định lượng bằng cách đo độ đục và được thể hiện trong Bảng 15. Các số đo IgG có dao động ở mức độ nhất định, vì vậy cần phải lấy trị số trung bình của phương pháp tối ưu hóa này.

Bảng 15

	Hao hụt IgG trong Phân đoạn I	Phần dịch nổi Phân đoạn II+III, bổ sung 25% etanol	IgG trong dịch lọc
Thử nghiệm	g/L huyết tương	g/L huyết tương	% phần gom Cohn
NG2C73	0,47	0,08	85,28
NG2C73-1	0,34	0,03	92,27
NG2C73-2	0,05	0,06	95,94
Trung bình	0,29	0,06	91,16
Đối chứng (bổ sung etanol từng dòng)	0,29	0,10	87,38

Cho tới thời điểm làm kết tủa phân đoạn II+III chỉ có 0,35g IgG/Lít huyết tương bị hao hụt. Đạt được sự gia tăng hiệu suất trong phân đoạn II+III là 0,04g IgG cho mỗi lít huyết tương bằng cách áp dụng phương pháp phun so với bổ sung 25% etanol vào ở dạng từng dòng; và tăng hiệu suất 0,3g IgG cho mỗi lít huyết tương (trị số trung bình nằm trong khoảng từ 0,4g/L đến 0,06g/L), so với bổ sung 20% etanol vào ở dạng dòng như được áp dụng trong sản xuất hiện nay. Hiệu suất IgG trong dịch lọc cao hơn đáng kể so với mẫu đối chứng và cao hơn nhiều so với hiệu suất đạt được trong sản xuất hiện nay là 80% đến 86% khi bổ sung 20% etanol vào ở dạng từng dòng vào kết tủa II+III.

C. Phân đoạn II+III (20% etanol): duy trì độ pH ban đầu trong tất cả các phân đoạn II+III nêu trên

Ví dụ 16

Phương pháp

50 lít huyết tương được làm tan giá trong khi trộn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 17°C đến 20°C trong 27 giờ. Phân đoạn I được thực hiện như đã nêu trong các phần trên đây ở dạng quy trình đã tối ưu hóa. Phần dịch nổi I được tách riêng thành hai phần:

(1) điều chỉnh độ pH trong trường hợp xấu nhất: điều chỉnh độ pH trước và sau khi bổ sung etanol nhưng không điều chỉnh trong khoảng thời gian ủ.

(2) điều chỉnh độ pH tối ưu: điều chỉnh độ pH trước khi và sau khi bổ sung etanol và điều chỉnh lại độ pH tiếp theo trong suốt khoảng thời gian giữ.

Dung dịch này được khuấy liên tục trong suốt khoảng thời gian giữ.

Độ pH của phần dịch nổi của I được điều chỉnh trong cả hai phần đến 6,7 trước khi bổ sung etanol vào bằng cách sử dụng dung dịch đệm có độ pH = 4. Etanol được thêm vào bằng cách phun và độ pH được điều chỉnh lại đến 6,9 sau khi bổ sung etanol.

Ở phần (1), thực hiện điều chỉnh độ pH với mức độ thận trọng ít hơn để giả thiết viễn cảnh về trường hợp xấu nhất. Độ pH của dung dịch được điều chỉnh ngay sau khi bổ sung etanol vào mà không điều chỉnh trong suốt quá trình ủ. Ở phần (2), độ pH được điều chỉnh lại đến trị số không đổi nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0 trong suốt thời gian ủ là 10 giờ.

Kết quả

IgG được xác định định lượng lại bằng cách đo độ đục và được thể hiện trong Bảng 16. Bằng cách điều chỉnh liên tục độ pH đến trị số không đổi đến khoảng 6,9 trong suốt thời gian giữ, chi hao hụt 0,13g IgG cho mỗi lít huyết tương so với lượng hao hụt trung bình là 0,4g/L huyết tương khi sản xuất ở quy mô lớn. Đạt được mức gia tăng hiệu suất 0,07g IgG trên một lít huyết tương so với mẫu đối chứng (không kèm theo phun mà khuấy liên tục trong khoảng thời gian giữ). Đạt được mức gia tăng hiệu

suất nằm trong khoảng từ 0,20g đến 0,30g IgG cho mỗi lít huyết tương so với phương pháp thông thường hiện đang áp dụng (hao hụt 0,38g IgG cho mỗi lít huyết tương, xem Bảng 13).

Bảng 16

	Mẫu	Thể tích	IgG được định lượng bằng cách đo độ đục	
		kg	Hiệu suất (%)	g/L huyết tương
Phần gom	Huyết tương	45,20	100,00	4,90
Phân đoạn I	Phần dịch nổi I	68,66	102,61	5,03
Điều chỉnh độ pH tối ưu	Phần dịch nổi II+III	53,09	0,26	0,13
Mẫu đối chứng	Phần dịch nổi II+III	52,69	0,41	0,20

Kết luận

Hao hụt IgG trong phần dịch nổi II+III giảm từ mức hiện tại là 0,4g IgG/L huyết tương trong các mẻ sản xuất đến mức 0,13g/L huyết tương ở bước làm kết tủa bằng 20% etanol, và đến mức thấp hơn 0,08g/L huyết tương ở bước làm kết tủa bằng 25% etanol khi etanol được bổ sung vào bằng cách phun và tiếp tục giữ độ pH = $6,9 \pm 0,1$ trong suốt quá trình kết tủa.

Ở kết tủa I, bổ sung etanol vào trước khi điều chỉnh độ pH bằng cách phun làm tăng hiệu suất IgG từ 0,1g/L đến 0,2g/L huyết tương trong phần dịch nổi phân đoạn I.

Thảo luận

IgG được xác định bằng cách đo độ đục trong tất cả các thử nghiệm và có thể có mức dao động ít nhất $\pm 5,0\%$ (như được chỉ ra bởi nhà sản xuất thiết bị đo độ đục, Siemens AG). Vì vậy, có thể là mức gia tăng hiệu suất thực tế đạt được theo phương pháp cải tiến trong sản xuất có thể thấp hơn một chút hoặc cao hơn một chút so với mức được nêu trong các ví dụ này.

Để chứng minh rõ hơn về việc gia tăng hiệu suất bởi các phương pháp mới và cải tiến, khối lượng chất kết tủa IgG được so sánh với khối lượng trung bình của chất

kết tủa IgG thu được từ cùng một nguồn gốc huyết tương trong sản xuất. Thu được 18kg chất kết tủa IgG trên 1000 lít Cohn Pool từ nguồn Mỹ theo phương pháp sản xuất hiện đang được sử dụng, trái ngược với nghiên cứu ở quy mô thực nghiệm (phần B nêu trên) ở đó thu được 20,8kg chất kết tủa IgG (20% etanol và điều chỉnh tối ưu hóa độ pH ở phân đoạn II+III, bổ sung dung dịch đệm và etanol vào bằng cách phun). Điều này làm tăng hơn 2kg chất kết tủa IgG cho 1000 lít Cohn Pool.

Ví dụ 17

Ví dụ này cho thấy rằng việc bổ sung bước xử lý bằng silic oxit dạng khối trước khi lọc huyền phù Phân đoạn II+III tạo ra dịch lọc IgG có độ tinh khiết cao hơn. Một cách ngắn gọn, huyết tương nghèo kết tủa lạnh được phân đoạn như đã nêu trên đối với giai đoạn Phân đoạn II+III, tại thời điểm này nó được chia thành hai mẫu. Mẫu thứ nhất được làm trong chỉ bằng cách bổ sung chất trợ lọc trước khi lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III theo cách tiêu chuẩn (Hình 7A). Mẫu thứ hai được đưa đi xử lý sơ bộ bằng silic oxit dạng khối, như nêu trong bản mô tả, trước khi bổ sung chất trợ lọc vào và lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III theo cách tiêu chuẩn (Hình 7B).

Tiếp theo, hợp phần protein của dịch lọc được tách bằng cách điện di trên xenluloza axetat và diện tích của mỗi pic được tính toán bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Như có thể thấy trong phổ sắc ký và dữ liệu định lượng, mẫu thứ hai mà được xử lý bằng silic oxit dạng khối trước khi lọc tạo ra dịch lọc có độ tinh khiết IgG lớn hơn nhiều so với mẫu không được xử lý bằng silic oxit dạng khối (68,8% so với 55,7 γ -globulin; so sánh Bảng 18 với Bảng 16).

Bảng 17. Phân tích định lượng pic protein được tách bằng cách điện di trên xenluloza axetat từ huyền phù chứa Phân đoạn II+III được làm trong bằng cách chỉ bổ sung chất trợ lọc trước khi lọc, như được thấy trên Hình 7A.

Số pic từ trái sang phải	Phân đoạn	
	Diện tích (%)	
1	55,7	γ -globulin
2	3,2	Protein biến tính
3	3,7	γ -globulin
4	25,5	α/β -globulin
5	11,9	albumin

Bảng 18. Định lượng pic protein được phân tách bằng cách điện di trên xenluloza axetat từ huyền phù chứa Phân đoạn II+III được xử lý sơ bộ bằng silic oxit dạng khối và được làm trong bằng cách bổ sung chất trợ lọc trước khi lọc, như được thấy trên Hình 7B.

Số pic từ trái sang phải	Diện tích (%)	Phân đoạn
1	68,8	γ -globulin
2	18,9	α/β -globulin
8	12,3	albumin

Ví dụ 18

Ví dụ này minh họa bước siêu lọc và bào chế chế phẩm chứa 20% IgG thích hợp để tiêm dưới da. Chế phẩm này được gom trong suốt quá trình sản xuất các chế phẩm IgG 20% ở quy mô mở rộng và tiền lâm sàng. Quy trình được sử dụng để sản xuất các lô 20% trước bước lọc nano là như đã nêu trên. Siêu lọc thẩm tách/lọc thẩm tách được cải tiến để cô đặc dung dịch đến 20%. Để giảm hao hụt sản lượng đến mức tối thiểu, dịch sau rửa của thiết bị siêu lọc được sử dụng để lọc thẩm tách được cô đặc bằng một thiết bị thứ hai nhỏ hơn có trang bị các màng tương tự và sau đó được bổ sung vào khối dung dịch.

Bất ngờ là, có thể nhận ra rằng việc bất hoạt virus trong suốt quá trình bảo quản ở độ pH thấp không bị ảnh hưởng bởi nồng độ protein của dung dịch. Tương tự, việc khử virus đạt được ở cả dung dịch 10% (GAMMAGARD® LIQUID) và dung dịch 20%. Vì vậy, bước bảo quản ở độ pH thấp làm bước khử virus được duy trì đối với sản phẩm 20%.

Trước khi lọc nano, nồng độ glyxin của dung dịch IgG được điều chỉnh đến nồng độ đích bằng 0,25M. Tiếp theo, dung dịch được cô đặc đến nồng độ protein bằng $6\% \pm 2\%$ khối lượng/thể tích nhờ siêu lọc (UF). Độ pH được điều chỉnh đến $5,2 \pm 0,2$. Màng UF được sử dụng có Giới hạn Khối lượng phân tử Danh nghĩa (NMWCO) bằng 50.000 dalton hoặc thấp hơn và được thiết kế đặc biệt để dùng cho sản phẩm có độ nhớt cao (ví dụ, màng V screen do Millipore cung cấp).

Sau đó, dịch cô đặc được lọc thẩm tách bằng dung dịch glyxin 0,25M, độ pH = $4,2 \pm 0,2$. Thể tích trao đổi tối thiểu bằng 10 lần thể tích dịch cô đặc ban đầu. Trong suốt quá trình siêu lọc/lọc thẩm tách, dung dịch được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 4°C đến 20°C.

Sau khi lọc thẩm tách, dung dịch được cô đến nồng độ protein ít nhất bằng 22% (khối lượng/thể tích). Nhiệt độ dung dịch được điều chỉnh đến trị số nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C.

Để thu hồi hoàn toàn lượng protein còn lại trong hệ thống, thực hiện bước rửa sau đổi với hệ thống siêu lọc thứ nhất lớn hơn bằng ít nhất 2 lần thể tích chết theo phương thức tái tuần hoàn để đảm bảo rằng toàn bộ lượng protein được rửa khỏi hệ thống. Tiếp theo, dịch sau rửa của hệ thống siêu lọc thứ nhất được cô đặc đến nồng độ protein ít nhất bằng 22% khối lượng/thể tích bằng hệ thống siêu lọc thẩm tách/lọc thẩm tách thứ hai có trang bị màng cùng loại có kích thước bằng một phần mười thiết bị thứ nhất hoặc ít hơn. Dịch cô đặc sau rửa này được thêm vào khối dung dịch trước đó. Tiếp theo, hệ thống siêu lọc thứ hai được rửa. Bước rửa sau này được áp dụng để điều chỉnh nồng độ protein của chế phẩm cuối cùng. Nhiệt độ dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C.

Để bào chế dung dịch cuối cùng, nồng độ protein được điều chỉnh đến khoảng $20,4\% \pm 0,4\%$ (khối lượng/thể tích) bằng dung dịch rửa sau của hệ thống siêu lọc thứ hai nhỏ hơn và/hoặc bằng dung dịch đậm lọc thẩm tách. Độ pH được điều chỉnh đến nằm trong khoảng từ 4,4 đến 4,9, nếu cần thiết.

Ví dụ 19

Để so sánh phân đoạn IgG được thu hồi trong dịch lọc Phân đoạn II+III trong quy trình sản xuất GAMMAGARD® LIQUID hiện tại, thực hiện tinh chế IgG ở quy mô sản xuất theo năm bước bằng cách áp dụng các phương pháp cải tiến để kết tủa và hòa tan Phân đoạn II+III nêu trong sáng chế. Một cách ngắn gọn, bước làm kết tủa các phân gom IgG Cohn với nồng độ IgG ban đầu bằng khoảng 6,14g/L được thực hiện ở -7°C với 25% etanol được bổ sung vào dưới dạng dòng chảy, so với -5°C và 20% etanol, như được dùng trong quy trình sản xuất hiện tại. Tiếp theo, chất kết tủa Phân đoạn II+III cải biến được chiết ở tỷ lệ 1/15 bằng dung dịch đậm hòa tan có độ pH =

4,3 hoặc được điều chỉnh bằng axit axetic bằng 0,06%, và sau đó được lọc qua thiết bị lọc sâu với bước rửa cuối bằng dung dịch đệm hòa tan có thể tích bằng 4,3 thể tích chết của thiết bị lọc. Như có thể thấy trong Bảng 18, dịch lọc Phân đoạn II+III cải biến được điều chế theo các phương pháp cải tiến theo sáng chế chứa IgG trong phân gom Cohn ban đầu với tỷ lệ phần trăm cao hơn đáng kể (ít nhất tăng 8,0%) so với dịch lọc Phân đoạn II+III được điều chế theo quy trình sản xuất hiện tại (lần lượt 91,1% và 91,6% so với 83,1% và 83,8%,).

Bảng 18. Tỷ lệ thu hồi IgG trung bình trong dịch lọc Phân đoạn II+III của tất cả các mẻ sản xuất của Baxter được thực hiện ở Viên trong năm 2008 và một phần năm 2009, so với tỷ lệ thu hồi IgG của các mẻ được sản xuất theo các phương pháp cải tiến theo sáng chế này.

Quy trình	Sản xuất tại Viên		Quy mô nghiên cứu và phát triển mở rộng	
	Hiện tại	Năm 2008		
IgG trong phân gom Cohn (g/L)	6,26	6,31	6,14	6,13
Rượu ở bước làm kết tủa II+III (%)	20	20	25	25
mL axit axetic/1000L dung dịch đệm hòa tan	510	510	Hòa tan ở độ pH=4,3; điều chỉnh đến độ pH=4,9 trước khi lọc	600
Aeosil (g/g dịch đặc)	0,045	0,04	0,04	0,04
Thể tích rửa sau tính theo thể tích chết của thiết bị lọc ép	1,8	1,8	4,3	4,3
IgG trung bình trong dịch lọc (% so với phân gom Cohn)	83,1% 57 lô	83,8% 200 lô	91,1% 3 lô	91,6% 2 lô
Mức gia tăng IgG trong dịch lọc	Không áp dụng	Không áp dụng	+ 8,0%	+8,5%

Ví dụ 20

Để xác định độ tinh khiết của chế phẩm IgG theo sáng chế, ba lô IgG được điều chế theo các phương pháp cải tiến theo sáng chế. Sản phẩm IgG cuối cùng của các quy trình tinh chế này được kiểm tra một số tạp chất, bao gồm IgA, IgM, hoạt độ phân giải amit, C3, và fibrinogen, cũng như để xác định tỷ lệ phần trăm của monome/dime IgG trong hỗn hợp cuối. Như có thể thấy trong Bảng 19 dưới đây, việc

sản xuất theo các phương pháp cải tiến theo sáng chế tạo ra khối chế phẩm cuối cùng với tỷ lệ thu hồi IgG tăng, từ 73,6% đến 78,5% chất ban đầu so với từ 60% đến 70% đối với các phương pháp hiện đang được sử dụng, đồng thời cũng duy trì profin độ tinh khiết, nếu không nói là cao hơn, so với các tiêu chuẩn sản xuất IgG hiện tại.

Bảng 19. Lượng tạp chất và hợp phần monome/dimere IgG trong chế phẩm IgG được điều chế theo các phương pháp sản xuất cải tiến theo sáng chế.

Lựa chọn	1	3	6
Thí nghiệm số (PO.. 10NO2)	19	20	21
Hiệu suất protein trong dòng chảy qua ANX [g/L huyết tương]	4,35	4,35	4,38
Tỷ lệ thu hồi IgG: nguyên liệu ban đầu Cohn/sản phẩm [%]	73,6	78,5	78,5
Mô tả đặc trưng của sản phẩm cuối			
IgA [$\mu\text{g/mL}$ ở 10% protein]	29	26	chưa xác định được
IgM [$\mu\text{g/mL}$ ở 10% protein]	1,1	1,1	chưa xác định được
Hoạt độ phân giải amit [PL-1 nmol/mL phút]	chưa xác định được	<10	<10
MSD monome/dimere [%]	99,7	99,9	99,7
C3 [$\mu\text{g/mL}$ ở 10% protein]	chưa xác định được	chưa xác định được	chưa xác định được
Fibrinogen [$\mu\text{g/mL}$ ở 10% protein]	<0,2	chưa xác định được	chưa xác định được

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp điều chế chế phẩm giàu IgG từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) làm kết tủa phân đoạn nghèo huyết tương trong điều kiện lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 6% đến 10% ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5 để thu được chất kết tủa thứ nhất và phần dịch nổi thứ nhất;

(b) làm kết tủa IgG ra khỏi phần dịch nổi thứ nhất, ở bước làm kết tủa thứ hai, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 23% đến 27% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,1 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C để tạo ra chất kết tủa thứ hai;

(c) tạo huyền phù lại đối với chất kết tủa thứ hai để tạo ra huyền phù;

(d) làm kết tủa IgG ra khỏi huyền phù được tạo ra ở bước (c), ở bước làm kết tủa thứ ba, bằng rượu với lượng nằm trong khoảng từ 22% đến 28% ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,3 để tạo ra chất kết tủa thứ ba;

(e) tạo huyền phù lại chất kết tủa thứ ba để tạo ra huyền phù; và

(f) tách phân đoạn hòa tan ra khỏi huyền phù được tạo ra ở bước (e), bằng cách đó tạo ra chế phẩm giàu IgG.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ của bước làm kết tủa (b) bằng -7°C.

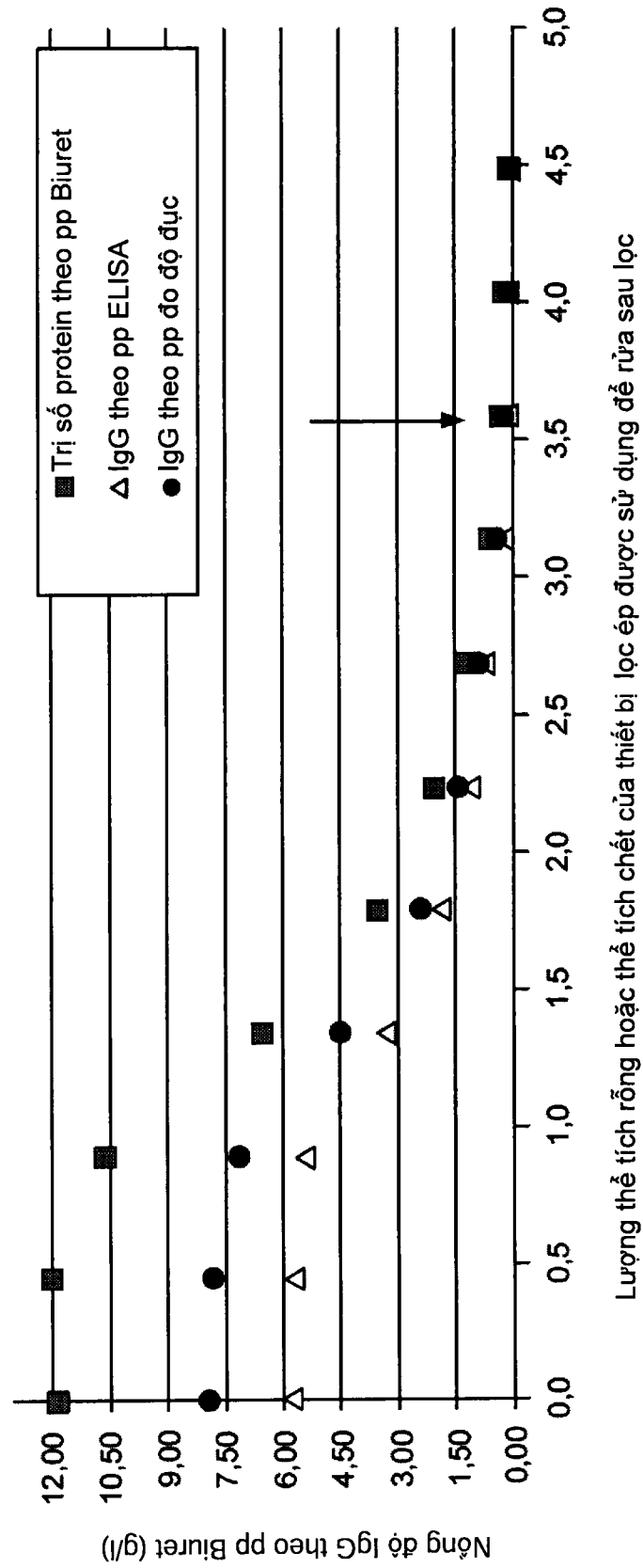
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ rượu ở bước làm kết tủa (b) bằng khoảng 25%.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất một bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa thứ hai, hoặc bước làm kết tủa thứ ba bao gồm bước bổ sung rượu bằng cách phun, bổ sung bằng cách phun rượu ở dạng các hạt rất nhỏ hoặc dạng mù.

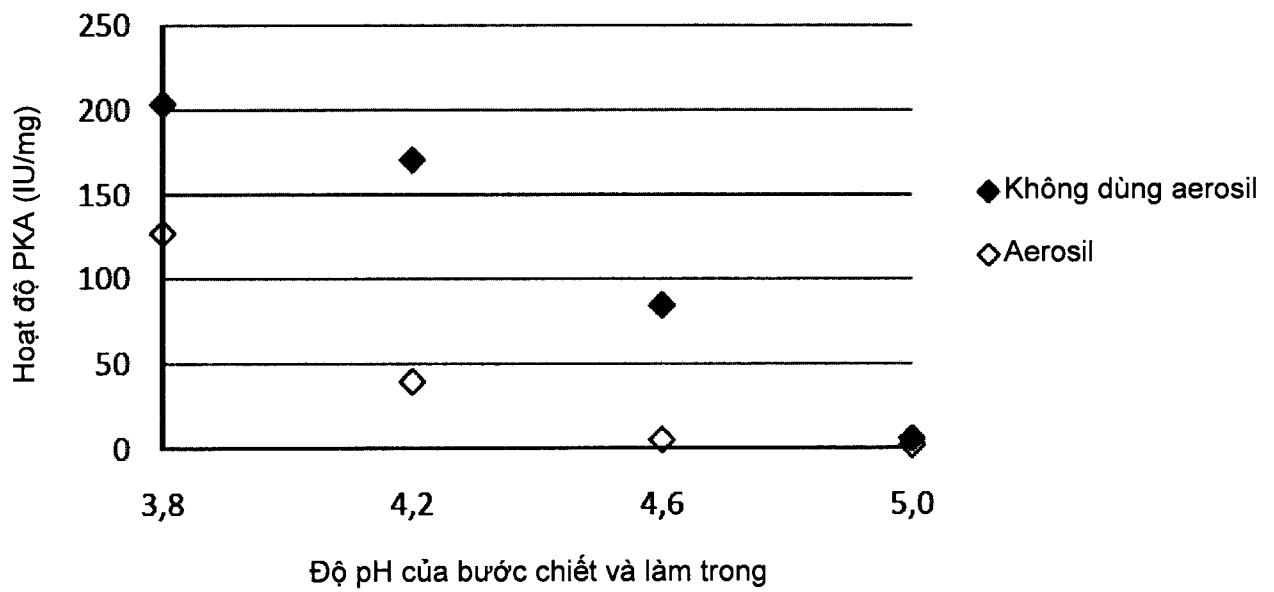
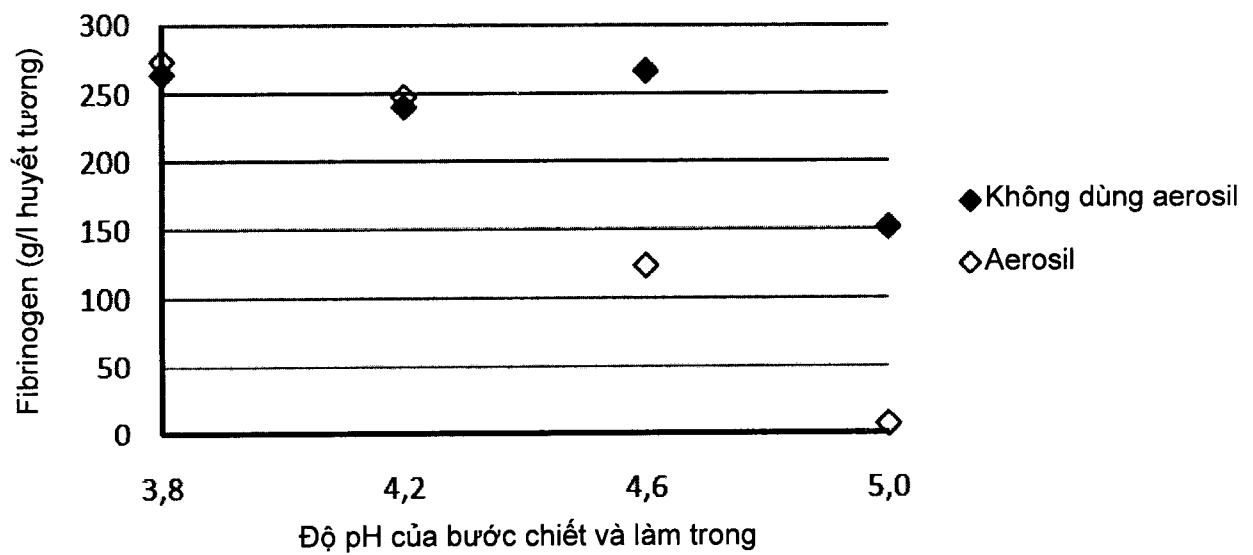
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa thứ hai, và bước làm kết tủa thứ ba bao gồm bước bổ sung bằng cách phun rượu, bổ sung bằng cách phun rượu có dạng giọt rất nhỏ hoặc dạng mù.

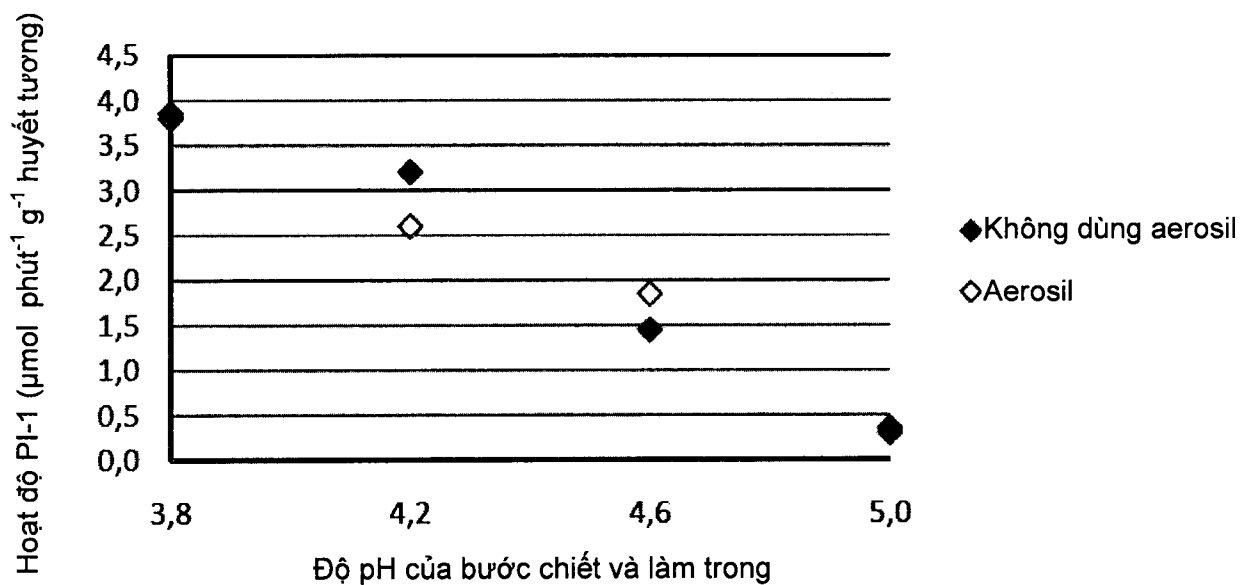
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó độ pH của ít nhất một trong số các bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa thứ hai, hoặc bước làm kết tủa thứ ba đạt được bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào sau khi bổ sung rượu vào.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó độ pH của tất cả các bước làm kết tủa thứ nhất, bước làm kết tủa thứ hai, và bước làm kết tủa thứ ba đạt được bằng cách bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào sau khi bổ sung rượu vào.
8. Phương pháp theo điểm 6 hoặc 7, trong đó việc bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào bao gồm bổ sung dung dịch làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó độ pH của bước làm kết tủa được cải biến trước và sau khi bổ sung rượu vào, trong và sau khi bổ sung rượu vào, hoặc trước, trong, và sau khi bổ sung rượu vào.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó độ pH của ít nhất một bước làm kết tủa được duy trì trong toàn bộ bước làm kết tủa bằng cách điều chỉnh độ pH một cách liên tục.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó chất kết tủa được tạo ra ở bước (c) được tạo huyền phù lại bằng dung dịch đệm với lượng nằm trong khoảng từ 12L đến 18L cho mỗi kilogram chất kết tủa, tốt hơn nếu trong đó chất kết tủa được tạo ra trong bước (b) được tạo huyền phù lại bằng dung dịch đệm với lượng khoảng 15L cho mỗi kilogram chất kết tủa.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó huyền phù được tạo ra ở bước (c) được xử lý bằng silic đioxit đã được nghiền mịn.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó huyền phù được tạo ra ở bước (c) được xử lý bằng silic đioxit được nghiền mịn với lượng nằm trong khoảng từ 0,02kg đến 0,06kg trên mỗi kg chất kết tủa thứ hai được tạo huyền phù lại.
14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước xử lý silic đioxit đã được nghiền mịn bao gồm bước trộn silic đioxit đã được nghiền mịn với huyền phù được tạo ra trong bước (c) trong thời gian ít nhất 30 phút.
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước lọc nano.
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó bước lọc nano bao gồm việc sử dụng thiết bị lọc nano có cỡ lỗ trung bình bằng khoảng 35nm.
18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó chế phẩm giàu IgG thu được ở bước (f) chứa ít nhất 85% hàm lượng IgG được tìm thấy trong phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh được sử dụng ở bước (a), tốt hơn nếu trong đó chế phẩm giàu IgG thu được ở bước (f) chứa ít nhất 90% hàm lượng IgG được tìm thấy trong phân đoạn huyết tương nghèo kết tủa lạnh được sử dụng ở bước (a).
19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó độ tinh khiết của IgG trong chế phẩm cuối cùng ít nhất bằng khoảng 95%, tốt hơn nếu ít nhất bằng 98%, tốt hơn nữa nếu ít nhất bằng 99%.
20. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó huyết tương là huyết tương người.

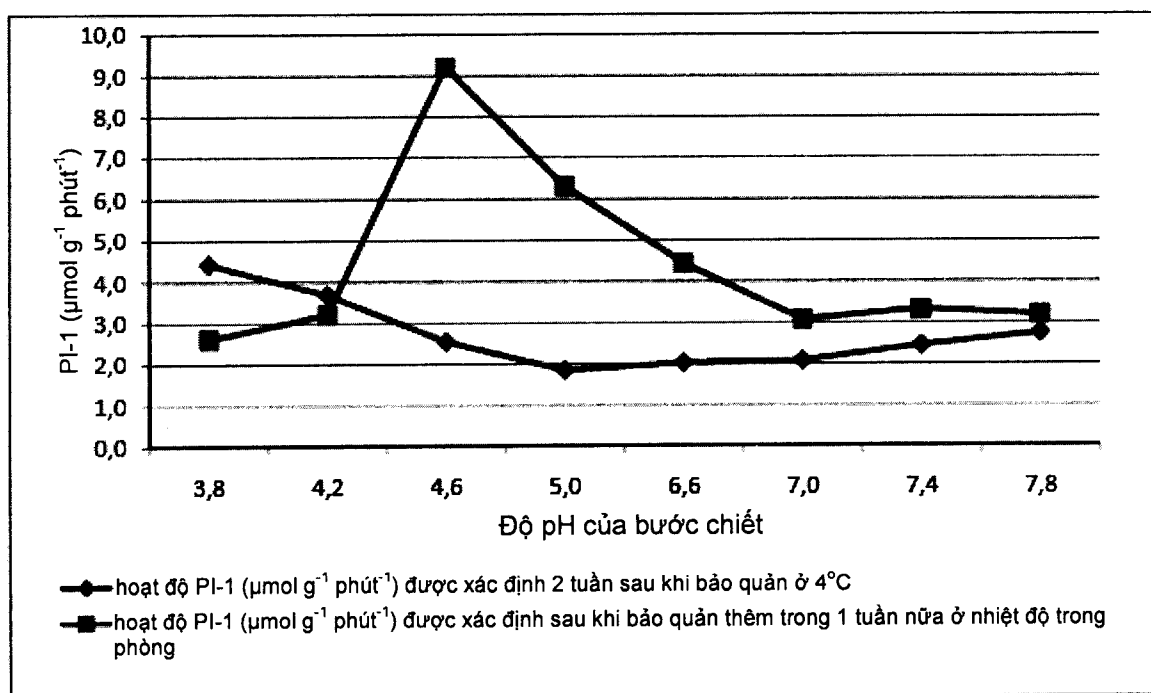


Hình 1

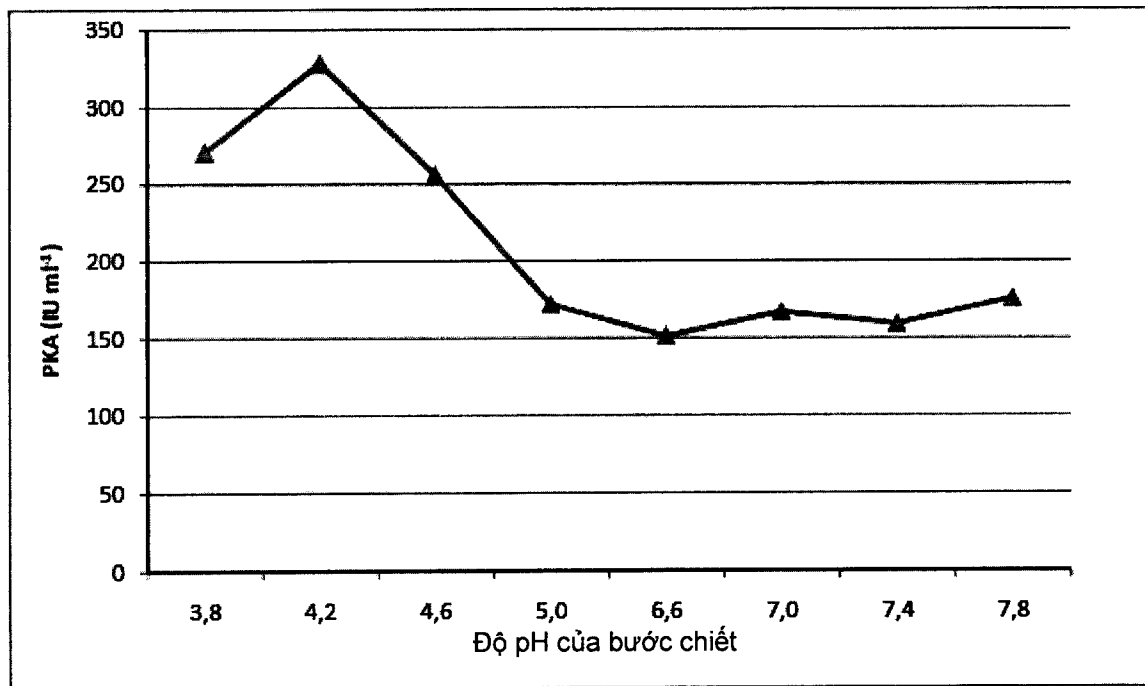
**Hình 2****Hình 3**



Hình 4

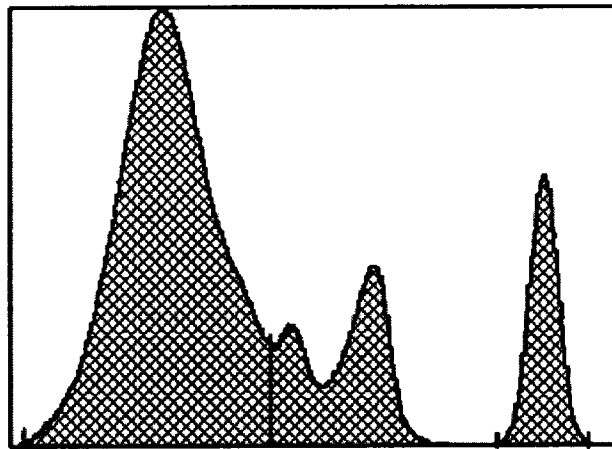


Hình 5

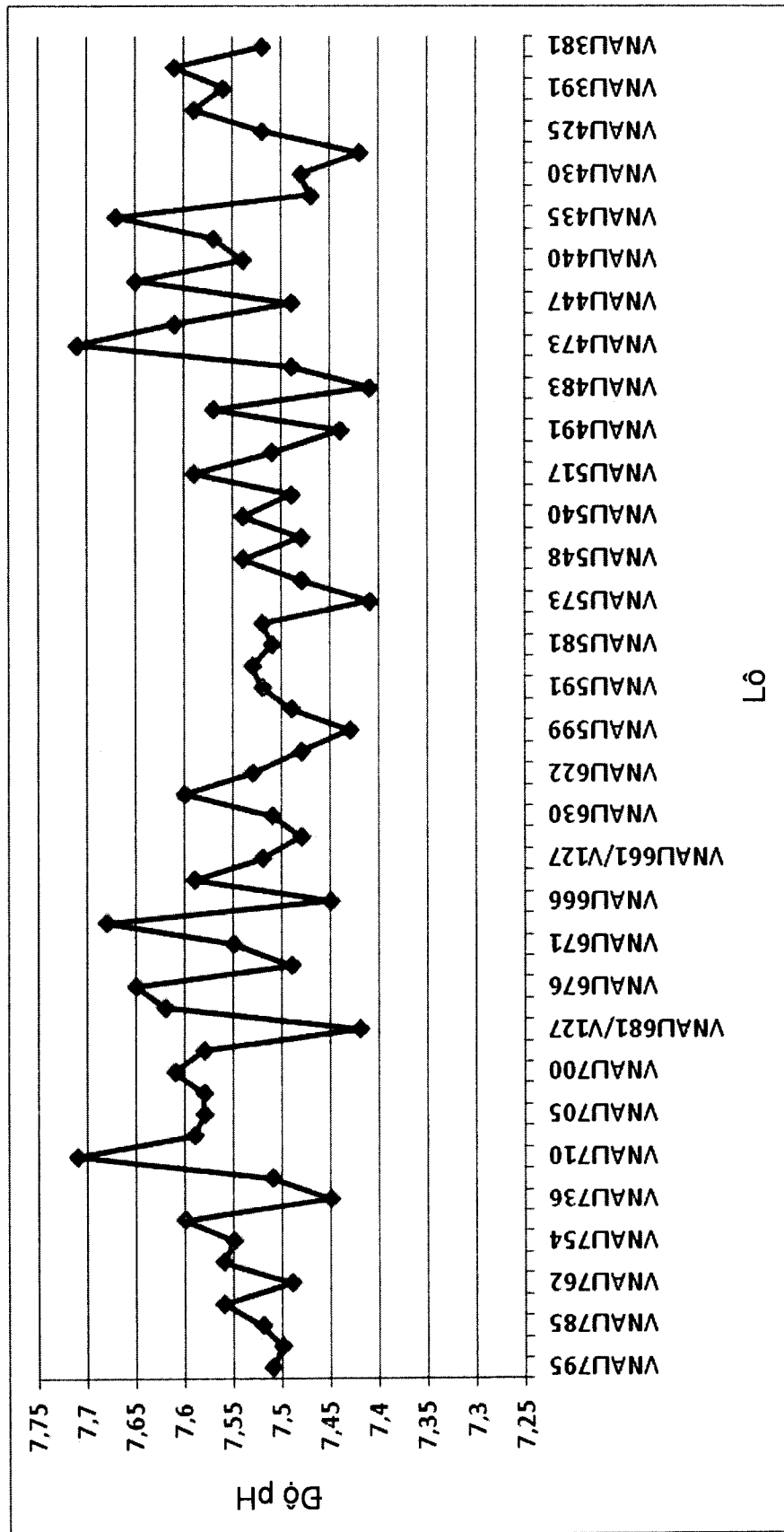
**Hình 6**



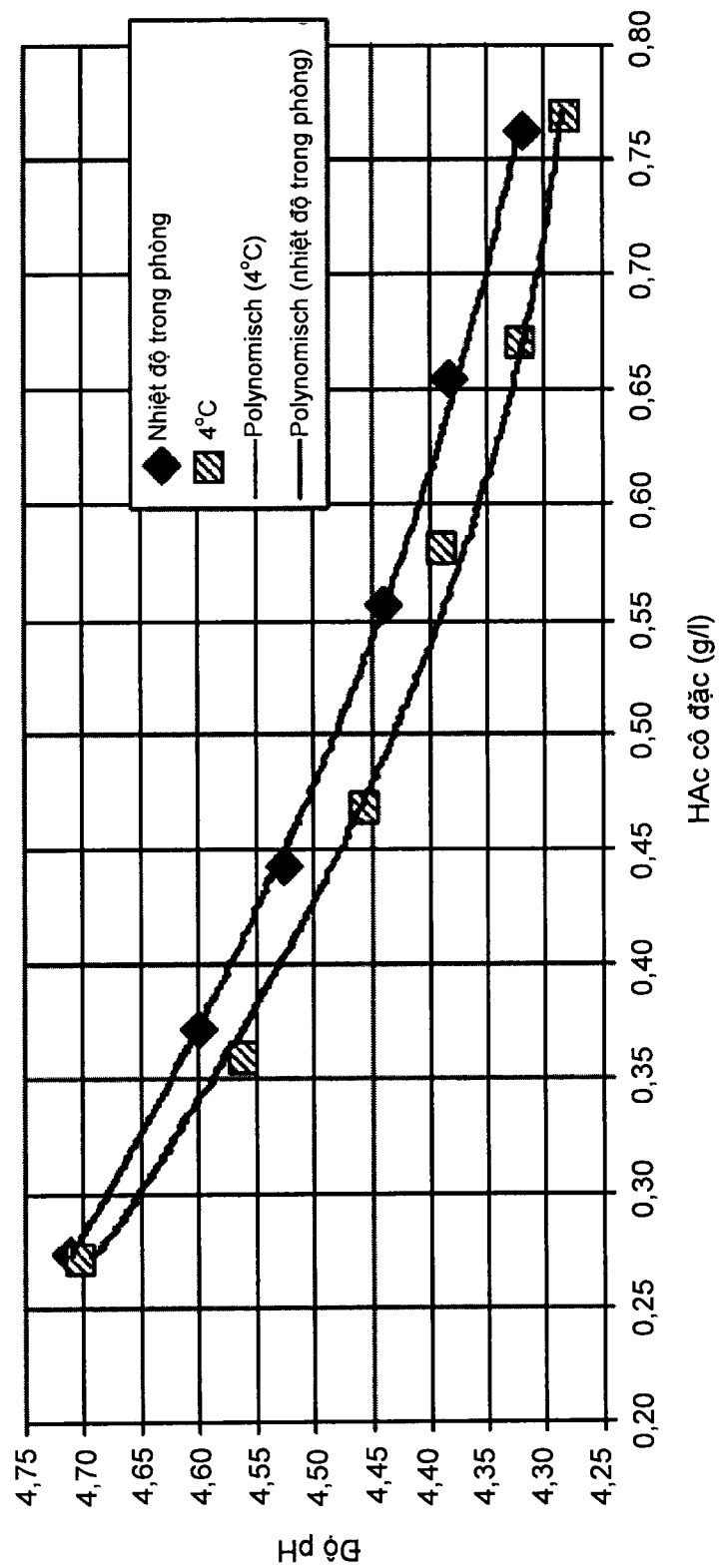
Hình 7A



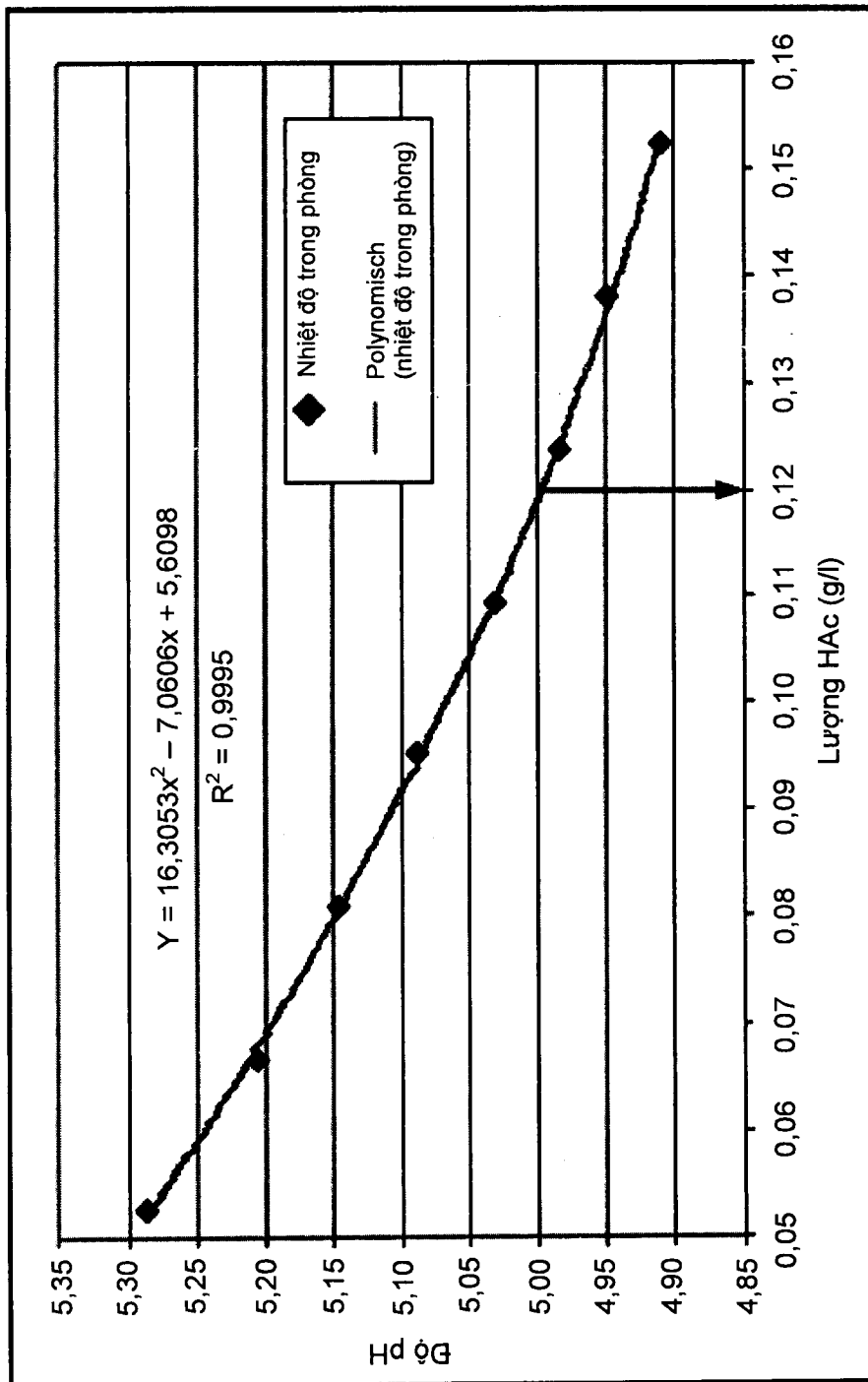
Hình 7B



Hình 8



Hình 9



Hình 10