



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0022479

(51)⁷ **C12P 19/00**

(13) **B**

(21)	1-2013-02830	(22)	05.06.2008
(62)	1-2008-01378		
(30)	11/812,331	18.06.2007	US
(45)	25.12.2019	381	(43) 25.11.2013 308
(73)	Laboratoire Medidom S.A. (CH) Enetriederstrasse 44, CH-6060 Sarnen, Switzerland		
(72)	Stefano CARLINO (CH), René-Pierre BUNTER (CH)		
(74)	Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)		

(54) **DƯỢC PHẨM CHỨA MONOSIALOGLANGLIOSIT GM1 TINH KHIẾT CÓ NGUỒN GỐC TỪ LỢN**

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa monosialogangliosit GM1 tinh khiết thu được bằng quy trình tách và tinh chế monosialogangliosit GM1 bao gồm các bước (a) tách GM1 ra khỏi hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính bằng phương pháp sắc ký cột trao đổi ion bằng cách sử dụng dung môi giải hấp chứa các ion kali hoặc xesi; (b) thu hồi chất tan từ dung dịch đã được giải hấp; (c) thẩm lọc dung dịch chứa chất tan đã được thu hồi và (d) thẩm lọc lần hai sau khi bổ sung NaCl IM và thu hồi GM1. Độ tinh khiết của GM thu được là lớn hơn 99,0%.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến monosialogangliosit GM1, cụ thể hơn là đề cập đến được phẩm chứa monosialogangliosit GM1 tinh khiết có nguồn gốc từ lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các gangliosit là lớp glycosphingolipit có một hoặc nhiều gốc axit sialic, và được tìm thấy nhiều trong mô não và thần kinh của người và động vật. Monosialogangliosit GM1 đã được biết đến đối với nhiều ứng dụng trong lĩnh vực được, cụ thể là để sửa chữa và điều trị các rối loạn của hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại biên.

Gangliosit được chiết theo cách thích hợp từ mô não của bò hoặc lợn theo patent Mỹ số 4849413. Để thích hợp cho các ứng dụng trong lĩnh vực được, monosialogangliosit GM1 phải tiếp tục được tách và tinh chế.

Người ta đã biết cách xử lý hỗn hợp lipit chiết được này bằng các phương pháp hoá học hoặc enzym để chuyển các thành phần gangliosit khác thành monosialogangliosit GM1, để làm tăng hiệu suất monosialogangliosit GM1. Các phương pháp này bao gồm thủy phân bằng axit bằng cách sử dụng axit yếu như được mô tả trong patent Trung Quốc số 1353112, hoặc thủy phân bằng enzym bằng cách sử dụng sialidaza như được mô tả trong patent Mỹ số 5296360.

Việc tinh chế thêm hỗn hợp lipit giàu GM1 bằng cách sắc ký trên cơ sở kích thước bằng cách sử dụng hệ giải hấp clorofom:metanol:nước theo tỷ lệ 60:30:4,5 là được mô tả trong patent châu Âu số 150712. Patent châu Âu số 489352 mô tả việc tinh chế hỗn hợp lipit giàu GM1 bằng cách siêu lọc dung dịch chứa hỗn hợp lipit này với alpha-cyclo-dextrin, tiếp theo chiết GM1 bằng cách chiết bằng dung môi etanol. Đã được thông báo rằng GM1 có thể thu được với độ tinh khiết 95%.

Các quy trình này đã được cho thấy trước đó là có các hạn chế liên quan đến độ tinh khiết và hiệu suất GM1, và về chi phí và hiệu quả khi được sử dụng ở quy mô công nghiệp.

Để sử dụng làm thuốc, cần sản xuất được gangliosit GM1 có độ tinh khiết cao. Do đó, vẫn cần có các quy trình thu nhận gangliosit GM1 có độ tinh khiết cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng gangliosit GM1 có thể được tách ra khỏi các gangliosit khác một cách hữu hiệu bằng quy trình trên cơ sở sắc ký trao đổi ion.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng gangliosit GM1 có thể điều chế được với độ tinh khiết cao bằng quy trình trong đó GM1 được tách ra khỏi hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính bằng phương pháp sắc ký cột trao đổi ion bằng cách sử dụng dung môi giải hấp chứa các ion kali hoặc xesi.

Sáng chế đề xuất quy trình tách và tinh chế gangliosit GM1 theo điểm 1 yêu cầu bảo hộ.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất quy trình bao gồm các bước chung sau:

- (a) tách GM1 ra khỏi hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính bằng phương pháp sắc ký cột trao đổi ion bằng cách sử dụng dung môi giải hấp chứa các ion kali hoặc xesi;
- (b) thu hồi chất tan từ dung dịch đã được giải hấp;
- (c) thẩm lọc dung dịch nước chứa chất tan đã được thu hồi;
- (d) bổ sung muối natri vào và thẩm lọc dung dịch thu được; và
- (e) thu hồi GM1.

Quy trình theo sáng chế có ưu điểm là cho phép điều chế monosialogangliosit GM1 với độ tinh khiết cao. Theo sáng chế, monosialogangliosit GM1 có thể được điều chế với độ tinh khiết lớn hơn 98%, thậm chí lớn hơn 99,0%, và thậm chí là 99,9%.

Ngoài ra, quy trình theo sáng chế có ưu điểm là sử dụng các bước đơn giản, chi phí thấp và thích hợp để sử dụng ở quy mô công nghiệp.

Các mục đích và ưu điểm khác theo sáng chế sẽ được hiểu rõ từ yêu cầu bảo hộ và từ phần mô tả chi tiết và các ví dụ sau đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất quy trình tinh chế monosialogangliosit GM1, trong đó GM1 được tách ra khỏi hỗn hợp lipit chứa chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính bằng phương pháp sắc ký cột trao đổi ion bằng cách sử dụng dung môi giải hấp chứa các ion kali hoặc xesi.

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất quy trình điều chế monosialogangliosit GM1 có độ tinh khiết cao bao gồm các bước sau:

- (a) tách GM1 ra khỏi hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính bằng phương pháp sắc ký cột trao đổi ion bằng cách sử dụng dung môi giải hấp chứa các ion kali hoặc xesi;
- (b) thu hồi chất tan từ dung dịch đã được giải hấp ở bước (c);
- (c) thẩm lọc dung dịch nước chứa chất tan đã được thu hồi ở bước (d), để loại bỏ cặn muối kali và xesi;
- (d) bổ sung các ion natri vào, tốt hơn là ở dạng muối natri thích hợp, để thay thế các ion kali và xesi liên kết với GM1, và thẩm lọc dung dịch nước này, để loại bỏ cặn muối natri; và
- (e) thu hồi GM1, ở dạng muối natri của nó.

Hỗn hợp lipit có thể được điều chế từ dịch chiết lipit thô của mô não của bò, cừu, ngựa hoặc lợn.

Tốt hơn nếu hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính có thể được điều chế từ dịch chiết lipit chứa ít nhất 30%, tốt hơn là ít nhất 50%, và tốt hơn nữa là ít nhất 70% hỗn hợp các gangliosit. Phần còn lại của dịch chiết lipit này nói chung có thể bao gồm các sulfatit, các cerebrosit, các axit béo và các protein.

Tốt hơn nếu dịch chiết lipit này trước hết có thể được thẩm lọc qua màng có cỡ lỗ nằm trong khoảng từ 10000 đến 100000 Dalton, tốt hơn là khoảng 50000

Dalton, tốt hơn là để loại muối ra khỏi dung dịch. Để thẩm lọc, màng thẩm tách thông thường bất kỳ có thể được sử dụng. Tốt hơn nếu các băng lọc, ví dụ loại băng polysulfon SARTOCON® (Sartorius) có thể được sử dụng, ví dụ với ngưỡng 50000 Dalton.

Tốt hơn nếu dịch chiết lipid được xử lý bằng cách thủy phân để chuyển các thành phần gangliosit chủ yếu khác, ví dụ GT1b, GD1a và GD1b, thành GM1 để làm tăng hàm lượng GM1.

Việc thủy phân có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Tốt hơn nếu việc thủy phân được thực hiện bằng cách sử dụng một trong hai phương pháp thủy phân chung các gangliosit đã được biết rõ trong lĩnh vực này, gọi là thủy phân bằng axit và thủy phân bằng enzym.

Phương pháp thủy phân bằng axit có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng axit vô cơ loãng như axit clohydric loãng, axit sulphuric loãng và axit nitric loãng. Việc thủy phân bằng axit có thể được tác động bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch nước chứa dịch chiết lipid tới độ pH nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5, tốt hơn là độ pH=4,0, và gia nhiệt dung dịch này tới nhiệt độ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 90 đến 100°C trong thời gian cần để chuyển hoá hoàn toàn các thành phần gangliosit chủ yếu khác thành GM1. Thời gian cần để thủy phân các thành phần gangliosit chủ yếu thành GM1 phụ thuộc vào độ pH và nhiệt độ đã chọn. Nói chung, độ pH càng cao thì thời gian cần để thủy phân hoàn toàn càng lớn, và nhiệt độ phản ứng càng cao thì thời gian cần để thủy phân hoàn toàn càng ngắn. Nói chung, phản ứng thủy phân có thể thực hiện được trong khoảng thời gian từ 2 đến 5 giờ. Ví dụ, khi phản ứng thủy phân được thực hiện ở độ pH=4,0 và nhiệt độ 95°C thì thời gian cần để thủy phân hoàn toàn là 3 giờ.

Phương pháp thủy phân bằng enzym có thể được thực hiện bằng cách sử dụng sialidaza thích hợp bất kỳ. Tốt hơn nếu sialidaza của *Arthrobacter ureafaciens* chủng S hoặc sialidaza của *Vibrio cholerae* có thể được sử dụng. Tốt hơn nếu sialidaza của *Arthrobacter ureafaciens* chủng S hoặc sialidaza của *Vibrio cholerae* có hoạt tính đối với GT1a, GD1a, GD1b mà không có hoạt tính đối với GM1. việc thủy phân bằng enzym có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách điều

chỉnh độ pH của dung dịch nước chứa dịch chiết lipit tới độ pH mà ở đó enzyme được sử dụng có hoạt tính tối ưu, ví dụ ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 6, chẳng hạn độ pH=5, bằng cách bổ sung chất đệm thích hợp như chất đệm axetat, bằng cách bổ sung các ion Ca^{2+} trong trường hợp sialidaza là sialidaza của *Vibrio cholerae*, và gia nhiệt dung dịch này tới nhiệt độ mà ở đó enzyme được sử dụng có hoạt tính tối ưu, ví dụ ở nhiệt độ 37°C , trong thời gian cần để hoàn thành phản ứng chuyển dạng. Nói chung, phản ứng thủy phân có thể thực hiện được trong khoảng thời gian từ 12 đến 24 giờ, tùy thuộc vào số đơn vị enzyme được bổ sung vào.

Phương pháp thủy phân bằng axit ít được ưu tiên do nó là quá trình thủy phân không đặc hiệu và thường tạo ra hiệu suất GM1 thấp hơn do sự chuyển hoá thành các gangliosit khác. Quá trình thủy phân bằng axit còn dẫn đến sự tạo thành tạp chất asialo-GM1.

Phương pháp thủy phân bằng enzyme được ưu tiên do chúng thường tạo ra hiệu suất GM1 cao hơn do tính đặc hiệu cao của phản ứng chuyển dạng hoá học. Đối với phương pháp thủy phân bằng enzyme, sialidaza của *Arthrobacter ureafaciens* được ưu tiên do nó không cần bổ sung các ion Ca^{2+} cho hoạt tính của nó. Ngoài ra, do có trọng lượng phân tử 52000 Dalton (so với 82000 Dalton đối với sialidaza của *Vibrio cholerae*), nên nó có ưu điểm là được rửa sạch bằng cách thẩm lọc.

Để thu hồi hỗn hợp lipit được sản xuất theo cách này có hàm lượng cao monosialogangliosit GM1 từ dung dịch phản ứng, dung dịch phản ứng này tốt hơn là được thẩm lọc qua màng có cỡ lỗ nằm trong khoảng từ 10000 đến 100000 Dalton, tốt hơn là 50000 Dalton. Để thẩm lọc, màng thẩm tách thông thường bất kỳ có thể được sử dụng. Tốt hơn nếu các băng lọc, ví dụ loại băng polysulfon SARTOCON® (Sartorius) có thể được sử dụng, ví dụ với ngưỡng 50000 Dalton. Tiếp theo, chất đã thẩm lọc được sấy khô để thu được bột hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính. Việc sấy khô có thể thực hiện được bằng cách sấy phun hoặc sấy chân không.

Nói chung, hỗn hợp lipit này có thể có nồng độ GM1 nằm trong khoảng từ 10 đến 200g/l và tốt hơn là ít nhất 100g/l.

Theo quy trình của sáng chế, gangliosit GM1 được tách ra khỏi hỗn hợp lipid bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi ion.

Đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng khi chất giải hấp chứa các ion xesi hoặc kali được sử dụng thì có thể tách được GM1 ra khỏi hỗn hợp các monosialogangliosit khác.

Nói chung, các kỹ thuật trao đổi ion được sử dụng thông thường đã được phát hiện là không cho phép tách hữu hiệu GM1 ra khỏi các monosialogangliosit khác. Đặc biệt lưu ý là monosialogangliosit Fucosyl-GM1 có mặt dưới dạng tạp chất gangliosit chủ yếu trong hỗn hợp lipid thịt lợn sản xuất được bằng các phương pháp xử lý thủy phân đã biết.

Hai phân tử GM1 và Fucosyl-GM1 có các đặc tính vật lý rất giống nhau. Cả hai phân tử này đều có điện tích âm duy nhất, được tạo ra bởi nhóm carboxyl của axit sialic, và có trọng lượng phân tử giống nhau; lần lượt là 1558 và 1704. Do đó, khi được nạp lên cột trao đổi ion đã được cân bằng, cường độ liên kết của hai gangliosit này với nhựa là như nhau.

Đã nhận thấy rằng khi natri axetat được bổ sung vào dung môi giải hấp để làm tăng cường lực ion của dung môi giải hấp này, và tạo ra các điều kiện để thay thế các gangliosit, cả hai GM1 lẫn Fucosyl-GM1 đều được giải hấp đồng thời với cùng cường lực ion. Không thể tách được hai monosialogangliosit này.

Trong khi các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng khi các ion xesi hoặc kali được sử dụng, ví dụ, bằng cách bổ sung metanol kali hoặc xesi axetat, thì GM1 và Fucosyl-GM1 được giải hấp một cách riêng biệt, trong đó Fucosyl-GM1 được giải hấp trước. Sự tách ra này là hoàn toàn và mỗi gangliosit GM1 và Fucosyl-GM1 có thể được tách.

Nói chung, theo sáng chế, sự tách ghi nhận được có thể là do thực tế, trái với lý thuyết trao đổi ion thông thường, các chất tan GM1 và Fucosyl-GM1 không chỉ được giải phóng ra khỏi cột theo thứ tự cường lực của chúng liên kết với nhựa mà còn theo thứ tự ái lực của chúng đối với ion trái dấu mà chúng phải liên kết để tách ra khỏi gel. Do đó, theo lý thuyết này, nếu một trong hai chất tan có ái lực liên

kết khác nhau đối với ion trái dấu thì các chất tan này sẽ được giải phóng với 2 cường độ ion khác nhau, và việc tinh chế có thể thực hiện được.

Các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng các monosialogangliosit GM1 và Fuc-GM1 có cùng ái lực đối với natri song không có cùng ái lực đối với kali hoặc xesi, mặc dù thực tế cả 3 kim loại này đều thuộc cùng một nhóm. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng Fuc-GM1 có ái lực đối với kali và xesi cao hơn so với GM1, và nó sẽ được giải hấp trước.

Phương pháp sắc ký trao đổi ion theo sáng chế có ưu điểm là cho phép tách hữu hiệu GM1 ra khỏi Fucosyl-GM1. Ngoài ra, phương pháp này còn có ưu điểm là cho phép tách GM1 ra khỏi các axit béo tương ứng. Các axit béo có cùng điện tích như gangliosit song có ái lực cao hơn đối với các ion xesi hoặc kali.

Đối với sắc ký trao đổi ion, có thể sử dụng nhựa thích hợp bất kỳ. Tốt hơn nếu nhựa có nhóm amin bậc bốn có thể được sử dụng, ví dụ nhựa FRACTOGEL® EMD TMAE (S) hoặc các nhựa Sepharosa như các nhựa Q-Sepharose HP.

Ở bước đầu tiên, nhựa được cân bằng bằng dung môi thích hợp. Các dung môi thích hợp bao gồm etanol, metanol hoặc hỗn hợp metanol và clorofom. Tốt hơn nếu dung môi là metanol, bởi vì nó là dung môi hoà tan các gangliosit và các muối kali và xesi.

Tiếp theo, cột được nạp dung dịch chứa hỗn hợp lipit trong dung môi giải hấp thích hợp. Dung môi giải hấp có thể chứa cùng thành phần dung môi dưới dạng dung môi được sử dụng để cân bằng nhựa. Tốt hơn nếu dung môi được chọn là metanol. Việc giải hấp sơ bộ bằng dung môi giải hấp cho phép giải hấp các chất không được liên kết, ví dụ cerebrosit.

Tiếp theo, các ion kali hoặc xesi được bổ sung vào dung môi giải hấp. Tốt hơn nếu các ion kali hoặc xesi được sử dụng ở dạng dung dịch metanol chứa kali hoặc xesi axetat, format, propionat hoặc dưới dạng muối của axit hữu cơ khác. dung dịch metanol chứa natri hoặc kali axetat là được ưu tiên. Tốt hơn nếu kali hoặc xesi axetat có mặt trong dung môi giải hấp với lượng đủ để làm giảm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 1100 đến 1400 μ S/cm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1200 đến 1300 μ S/cm đối với dung môi giải hấp này. Dung dịch giải hấp chứa muối

natri hoặc kali này có thể được cho qua cột với nồng độ không đổi ở tốc độ chảy thích hợp bất kỳ, ví dụ, ở tốc độ chảy nằm trong khoảng từ 100 đến 140ml/giờ.

Khi việc tách được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình sắc ký trao đổi ion theo sáng chế thì các axit béo và Fuc-GM1 được giải hấp trước GM1, trong khi các sulfatit vẫn liên kết với cột có thể được giải hấp trong quá trình rửa cột.

Nước giải hấp chứa GM1 được thu gom và, tốt hơn, nếu dung môi giải hấp được giải hấp từ cột có thể được thu hồi bằng cách chưng cất.

Chất tan chứa GM1 có thể được thu hồi bằng cách sấy dung dịch nước giải hấp để thu được bột chứa GM1. Việc sấy có thể thực hiện được bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường, ví dụ, sấy phun hoặc sấy chân không.

Chất tan chứa GM1 có thể được tinh chế tiếp bằng cách thẩm lọc dung dịch nước chứa chúng qua màng có cỡ lỗ nằm trong khoảng từ 10000 đến 100000 Dalton, tốt hơn là 50000 Dalton để loại bỏ các muối kali hoặc xesi còn sót lại. Tùy chọn, axit vô cơ, ví dụ dung dịch nước axit sulphuric, axit nitric, hoặc tốt hơn là axit clohydric, có thể được bổ sung vào dung dịch này để điều chỉnh độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 8, tốt hơn là độ pH=7 trước khi thẩm lọc.

Các ion natri, thích hợp ở dạng dung dịch nước chứa muối natri, tốt hơn là NaCl, có thể được bổ sung tiếp vào dung dịch này, để thay thế các ion kali hoặc xesi liên kết với GM1, và thu nhận GM1 ở dạng muối natri sinh lý. Tiếp theo, dung dịch này được thẩm lọc lần hai để loại bỏ muối còn sót lại (ví dụ, NaCl), bằng cách sử dụng màng có cỡ lỗ nằm trong khoảng từ 10000 đến 100000 Dalton, tốt hơn là 50000 Dalton. Tốt hơn nếu các băng lọc, ví dụ loại băng polysulfon SARTOCON® (Sartorius) có thể được sử dụng, ví dụ với ngưỡng 50000 Dalton.

Tiếp theo, dung dịch này có thể được sấy để thu hồi GM1 ở dạng bột. Việc sấy có thể thực hiện được bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Tốt hơn nếu việc sấy được thực hiện bằng cách sấy phun hoặc sấy chân không.

GM1 thu được theo sáng chế có độ tinh khiết 98% hoặc hơn, thường nằm trong khoảng từ 99,0 đến 99,9%. GM1 thu được theo quy trình của sáng chế chứa tạp chất Fucosyl-GM1 nhỏ hơn 0,1%.

Quy trình theo sáng chế có ưu điểm là cho phép tách hữu hiệu GM1 ra khỏi các monosialogangliosit khác. Cụ thể, quy trình theo sáng chế cho phép tách GM1 ra khỏi tạp chất Fucosyl-GM1.

Quy trình theo sáng chế có ưu điểm là cho phép điều chế monosialogangliosit GM1 với hiệu suất cao và độ tinh khiết cao.

GM1 được tinh chế theo quy trình của sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho các đối tượng là người hoặc động vật. Cụ thể, GM1 được tinh chế theo quy trình của sáng chế được dùng để điều trị cho người hoặc động vật có vú, cụ thể là để sửa chữa và điều trị các rối loạn và các bệnh của hệ thần kinh trung ương và ngoại biên, bao gồm đột quỵ não, bệnh Parkinson, tổn thương dây cột sống, bệnh Alzheimer, chứng loạn vận động muộn, chứng xơ cứng bên teo cơ, các bệnh dây thần kinh ngoại biên và bệnh dây thần kinh tự trị.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được lấy ví dụ minh họa bằng các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 1: Điều chế hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng gangliosit chính

Dịch chiết lipit chứa hỗn hợp các gangliosit có độ tinh khiết 70% được hoà tan vào nước tinh khiết ở nồng độ 25g/l. Tiếp theo, dung dịch này được thẩm lọc qua băng lọc polysulfon SARTOCON® (Sartorius) có ngưỡng 50000 Dalton.

Tiếp theo, 200L dung dịch này được cân bằng tới độ pH=5,5 bằng cách bổ sung dung dịch đệm axetat 50mM và canxi clorua 4mM. 3000U sialidaza của *Vibrio cholerae* được bổ sung vào và dung dịch này được gia nhiệt tới nhiệt độ 37°C trong thời gian 12 giờ để chuyển dạng hoàn toàn các gangliosit chủ yếu khác (GT1b, GD1a, GD1b) thành GM1. Dung dịch thu được có nồng độ GM1 nằm trong khoảng từ 14 đến 15g/l.

Sau khi thủy phân bằng enzym, dung dịch này được thẩm lọc qua băng lọc có ngưỡng 50000 Dalton. Tiếp theo, dung dịch NaCl 1M được bổ sung vào dịch thẩm lọc và dung dịch này được thẩm lọc lần hai. Sau khi thẩm lọc lần hai, dịch thẩm lọc được cô tới nồng độ GM1 bằng 100g/l bằng cách để chảy thẩm mà không

thay nước bất kỳ. Tiếp theo, dung dịch này được sấy chân không để thu được 3200g bột có nồng độ GM1 là 85% khi đo bằng HPLC.

Tinh chế GM1 từ hỗn hợp lipid chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng gangliosit chính

Dung dịch metanol ở nồng độ 10g/l được điều chế bằng cách sử dụng bột thu được ở bước trước đó, và dung dịch này được lọc qua hộp lọc Sartopore có cỡ lỗ 0,22µm (do hãng Sartorius AG sản xuất).

Tiếp theo, đối với mỗi chu kỳ, 7L dung dịch đã lọc được nạp lên cột FPLC chứa 20L nhựa FRACTOGEL® EMD TMAE (S) đã được cân bằng bằng metanol. Tiếp theo, cột này được giải hấp bằng dung dịch metanol:kali axetat có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 1200 đến 1300µS/cm, ở tốc độ chảy 120L/giờ. Các chu kỳ này được lặp lại cho đến khi hết dung dịch GM1.

Nước giải hấp (khoảng 60-70L) được cô liên tục bằng cách chưng cất, sau đó được sấy để thu được bột, và metanol được thu hồi. Bột thu được theo cách này là hỗn hợp giữa GM1 tinh khiết và kali axetat.

Bột thu được theo cách này được hoà tan trong nước tinh khiết tới nồng độ 25g/l, và được cân bằng tới độ pH=7 bằng cách bổ sung dung dịch HCl 18%. Dung dịch tạo thành được thẩm lọc qua băng lọc có ngưỡng 50000 Dalton. Tiếp theo, dung dịch NaCl 1M được bổ sung vào dịch thẩm lọc và dung dịch này lại được thẩm lọc qua băng lọc có ngưỡng 50000 Dalton. Sau khi thẩm lọc lần hai, dịch thẩm lọc được cô tới nồng độ nằm trong khoảng từ 100 đến 120g/l bằng cách để chảy thẩm mà không thay nước bất kỳ.

Tiếp theo, dung dịch đã cô được lọc qua bộ lọc có cỡ lỗ 0,22µm và sấy bằng cách sấy phun để thu được 2700g bột GM1 màu trắng hoặc trắng be, xác nhận được bằng TLC, bột GM1 này có độ tinh khiết 99,8% đo được bằng HPLC. Bột GM1 thu được này có hàm lượng Fuc-GM1 nhỏ hơn 0,1% đo được bằng HPLC.

Ví dụ so sánh

Quy trình điều chế và tinh chế GM1 được thực hiện như ở Ví dụ 1 trên đây, ngoại trừ ở chỗ, trong sắc ký cột, dung dịch metanol:kali axetat được thay bằng dung dịch metanol:natri axetat.

3100g bột GM1 thu được chứa 91% GM1 và 8% Fuc-GM1, đo được bằng HPLC.

Từ các ví dụ trên đây, có thể thấy rằng độ tinh khiết của GM1 thu được là thấp hơn nhiều khi natri axetat được sử dụng để giải hấp GM1. Điều này có thể là do thực tế ion trái dấu natri không tạo ra sự khác biệt bất kỳ giữa GM1 và Fuc-GM1 trong quá trình giải hấp, so với các ion trái dấu kali hoặc xesi, hai ion này làm tách hoàn toàn hai đỉnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa monosialogangliosit GM1 có nguồn gốc từ lợn, được tạo ra theo quy trình tinh chế monosialogangliosit GM1 bao gồm bước tách monosialogangliosit GM1 ra khỏi Fucosyl-GM1 trong hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 là thành phần gangliosit chính bằng sắc ký cột trao đổi ion sử dụng dung môi rửa giải bao gồm các ion kali hoặc caesi, có độ tinh khiết 99,0% hoặc cao hơn và chứa ít hơn 0,1% Fucosyl-GM1, và trong đó hỗn hợp lipit nêu trên chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần chính thu được bằng cách thủy phân bằng axit hoặc thủy phân bằng enzym dịch chiết lipit.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó quy trình tinh chế này bao gồm các bước sau:
 - (a) tách GM1 ra khỏi hỗn hợp lipit chứa monosialogangliosit GM1 dưới dạng thành phần gangliosit chính bằng sắc ký cột trao đổi ion sử dụng dung môi rửa giải bao gồm các ion kali hoặc caesi,
 - (b) thu hồi chất tan từ dung dịch rửa giải,
 - (c) thẩm lọc dung dịch nước của chất tan đã thu hồi ở bước (b),
 - (d) bổ sung muối natri và thẩm lọc dung dịch nước thu được, và
 - (e) thu hồi GM1 ở dạng muối natri của nó.
3. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó dung môi rửa giải bao gồm kali hoặc caesi axetat.
4. Dược phẩm theo điểm 3, trong đó dung môi rửa giải là dung dịch metanol của kali hoặc caesi axetat.
5. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó bước thẩm lọc được tiến hành nhờ sử dụng màng có cỡ lỗ 10000-100000 Dalton.
6. Dược phẩm theo điểm 2, trong đó việc thu hồi GM1 ở bước (e) bao gồm sấy khô dung dịch thu được sau khi thẩm lọc bằng cách sấy phun hoặc sấy chân không để tạo ra bột.

7. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó hỗn hợp lipit thu được bằng cách thủy phân hỗn hợp lipit thu được bằng cách thủy phân dịch chiết lipit từ mô não lợn chứa hỗn hợp của gangliosit có độ tinh khiết nhỏ nhất là 50%.

8. Dược phẩm theo điểm 7, trong đó bước thủy phân bằng enzym được thực hiện bằng cách xử lý dịch chiết lipit từ mô não lợn bằng *Arthrobacter ureafaciens strain S* sialidaza hoặc *Vibrio cholerae* sialidaza.