



(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) 
1-0023077

(51)⁷ C07K 1/16, 14/765

(13) B

(21)	1-2013-02271	(22)	18.08.2011
(86)	PCT/CN2011/001374	18.08.2011	(87) WO2012/083580
(30)	201010606635.8	24.12.2010	CN
(45)	25.02.2020	383	(43) 25.09.2013
(73)	WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP. (CN) #666 Gaoxin Avenue, East Lake High-Tech Development Zone, Wuhan, Hubei 430079, China		
(72)	YANG, Daichang (CN), HE, Yang (CN), LI, Guangfei (CN), LIU, Jingru (CN)		
(74)	Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)		

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÁCH VÀ TÍNH SẠCH ALBUMIN HUYẾT THANH NGƯỜI TÁI TỔ HỢP TỪ HẠT GẠO CHUYỂN GEN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tách và tinh sạch albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ hạt gạo chuyển gen, bao gồm các bước: 1) cho dịch chiết thô của rHSA vào sắc ký trao đổi cation để thu được sản phẩm sơ cấp I; 2) cho sản phẩm sơ cấp I vào sắc ký trao đổi anion để thu được sản phẩm thứ cấp II; 3) cho sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký kỵ nước để thu được rHSA được tinh sạch. Phương pháp có thể còn bao gồm bước sắc ký ceramic hydroxypatit trước sắc ký kỵ nước.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học, và cụ thể là đề cập đến phương pháp phân tách và tinh sạch albumin huyết thanh người tái tổ hợp (rHSA - recombinant human serum albumin) từ hạt gạo chuyển gen trên phạm vi rộng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Albumin huyết thanh người (HSA) là một chuỗi đơn, protein không glycosyl hóa chứa 585 axit amin, có trọng lượng phân tử là 66,5kD và điểm đẳng điện nằm trong khoảng từ 4,7 đến 4,9. Nó là loại ít protein nhất trong huyết tương người, đạt đến khoảng 60% trong tổng protein huyết tương. Có khoảng 40g HSA trong một lít máu người. Ngoài việc có sẵn trong huyết tương, HSA cũng được tìm thấy ở các mô và sự bài tiết của cơ thể, da và các khoang bạch huyết. Với các điều kiện sinh lý học thông thường, HSA có tác dụng giữ áp suất thẩm lọc chất keo huyết tương, sự bổ dưỡng, thúc đẩy sự lành vết thương, như chất mang, đặc biệt trong sự vận chuyển nhiều các phân tử sinh học kỵ nước như kích thích tố, hoạt chất sinh học và thuốc trong máu. Do vậy, HSA là một protein y tế quan trọng mà chủ yếu được sử dụng lâm sàng để điều trị giảm protein-huyết gây ra do thiếu máu, bị cháy, bỏng, do phẫu thuật thẩm mỹ và thương tổn não, cũng như trong việc điều trị bệnh xơ gan, chứng thủy thũng thận và các bệnh tương tự.

Hiện tại, việc dùng HSA để chữa bệnh chủ yếu được thực hiện bằng cách chiết và phân tách từ huyết tương người. Tuy nhiên, việc thực hiện phương pháp này sẽ có những bất lợi sau: một mặt, nguồn huyết tương không đủ và nguồn cung cấp máu hạn

chế sẽ không thể đáp ứng được nhu cầu sản xuất HSA và các sản xuất liên quan đến chúng; mặt khác, bản thân máu cũng là một yếu tố rủi ro, ví dụ, nó có thể chứa mầm bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ví dụ như virus viêm gan, virus gây suy giảm miễn dịch của người (HIV) và các bệnh tương tự, mà dẫn đến hết sức quan ngại về việc sử dụng HSA được chiết từ huyết tương. Do vậy, vấn đề cần thiết ở đây là phát triển một quy trình thay thế để sản xuất HSA.

Với sự phát triển của kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp ADN hiện đại, các nhà nghiên cứu rất quan tâm đến việc sản xuất và ứng dụng albumin huyết thanh người tái tổ hợp (rHSA). Hơn nữa, hệ thống biểu hiện khác nhau đã được sử dụng thử nghiệm để sản xuất hàng loạt rHSA. Ví dụ, nhóm sinh vật chưa có nhân như trực khuẩn ruột kết (Latta, M. et al., Bio/Technology, 5:1309-1314, (1987)), bacillus subtilis (Saunders, C. W. et al, J. Bacteriol. 169: 2917-2925, (1987)), nhóm sinh vật có nhân như nấm men (WO 00/44772, EP0683233A2, US 5612196) và cũng có thể sử dụng nhân giống tế bào động vật để sản xuất rHSA. Tuy nhiên, cách tiếp cận này là không phù hợp cho sản xuất công nghiệp do mức biểu hiện thấp và chi phí sản xuất cao.

Đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số 200510019084.4 của các tác giả sáng chế bộc lộ phương pháp để sản xuất rHSA sử dụng tế bào nội nhũ hạt gạo làm hệ thống phản ứng sinh học, bao gồm: sử dụng vùng khởi động và các peptit tín hiệu được biểu hiện đặc hiệu ở nội nhũ hạt gạo để gián tiếp đưa rHSA vào hệ thống nội màng của tế bào nội nhũ hạt gạo và lưu giữ rHSA trong các thể protein của nội nhũ hạt gạo, do vậy cho phép rHSA tích lũy nhiều trong mầm hạt và cuối cùng đạt tới mức biểu hiện cao hơn. Mức biểu hiện của rHSA thu được ít nhất lớn hơn 0,3% dựa trên trọng lượng hạt gạo. Phương pháp có những ưu điểm của mức biểu hiện cao và chi phí

thấp, do vậy giải pháp này đề xuất khả năng phát triển một chiến lược mới để sản xuất thuốc protein.

rHSA được sản xuất bằng hệ thống biểu hiện bất kỳ cũng cần được tinh sạch trước khi đưa ra thị trường. Kỹ thuật tinh sạch có thể ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm cũng như chi phí sản xuất. Chi phí cho quá trình tinh sạch chiếm khoảng 80 đến 90% của tổng chi phí sản xuất. Hiện tại, không có quá trình tinh sạch dành cho việc tách và tinh sạch rHSA ra khỏi hạt gạo. Do vậy, rất khó khăn về kỹ thuật và rủi ro về kinh tế để phát triển một quá trình tinh sạch đơn giản và hiệu quả về chi phí để tinh sạch rHSA ra khỏi hạt gạo.

Hiện tại, kỹ thuật chiết rHSA ra khỏi tế bào nấm men và hỗn dịch thực vật đã được ghi nhận. Ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN101768206A bộc lộ một quy trình tinh sạch rHSA được biểu hiện trong *Pichia pastoris*, bao gồm: lọc nước canh thịt lên men chứa rHSA bằng màng ceramic và lần lượt cho dịch lọc qua sắc ký trao đổi cation, sắc ký kỵ nước và sắc ký trao đổi anion yếu để thu được rHSA được tinh sạch. Tuy nhiên, do sự khác biệt đáng kể của tạp chất trong hạt gạo, nấm men và tế bào hỗn dịch thực vật, các tình trạng kỹ thuật có thể không được sử dụng trực tiếp để phân tách và tinh sạch rHSA ra khỏi hạt gạo. Do vậy, mong muốn để phát triển một quy trình đơn giản và hiệu quả trong việc tách và tinh sạch rHSA ra khỏi hạt gạo để sản xuất rHSA với hiệu suất cao và tinh khiết cao, mà sẽ cung cấp nền tảng cho sản xuất công nghiệp trong tương lai.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phân tách và tinh sạch albumin huyết thanh người tái tổ hợp (rHSA) từ hạt gạo ở phạm vi rộng.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất các giải pháp kỹ thuật sau đây:

Phương pháp phân tách và tinh sạch albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ hạt gạo, lần lượt bao gồm các bước:

1) cho dịch chiết thô của albumin huyết thanh người tái tổ hợp vào sắc ký trao đổi cation để thu được sản phẩm sơ cấp I;

2) cho sản phẩm sơ cấp I vào sắc ký trao đổi anion để thu được sản phẩm thứ cấp II;

3) cho sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký kỵ nước để thu được albumin huyết thanh người tái tổ hợp được tinh sạch.

Ở bước 1), sắc ký trao đổi cation có thể được thực hiện trên nhựa sắc ký cation mạnh làm môi trường sắc ký, mà được chọn từ nhóm bao gồm UNO Sphere S, Nuvia S, Capto MMC, MacroPrep-CM. UNO Sphere S hoặc Capto MMC được lựa chọn.

Sắc ký trao đổi cation có thể sử dụng rửa giải gradien pH hoặc rửa giải gradien nồng độ NaCl. Rửa giải gradien pH là phương án được ưu tiên.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch đệm rửa giải đối với sắc ký trao đổi cation bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 0,25M, với độ pH 5,2.

Ở bước 2), sắc ký trao đổi anion có thể được thực hiện trên nhựa anion sắc ký mạnh làm môi trường sắc ký, mà được chọn từ nhóm bao gồm UNOsphere Q, Q Sepharosa FF và DEAE sepharosa FF. Q Sepharosa FF là phương án được ưu tiên.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch đệm rửa giải dùng để sắc ký trao đổi anion bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,2M, với độ pH 7,5.

Theo bước 3), sắc ký kỵ nước có thể được thực hiện trên môi trường sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm Phenyl sepharoza HP, Phenyl sepharoza FF, macro-prep t-butyl và macro-prep metyl. Phenyl sepharoza HP là phương án được ưu tiên.

Chất rửa giải chứa protein đích từ cột sắc ký kỵ nước có thể được thực hiện trong thành phẩm bởi kỹ thuật đã biết như cô đặc siêu lọc và đông khô.

Hơn nữa, phương pháp có thể bao gồm bước cho sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit trước sắc ký kỵ nước ở bước 3) nêu trên. Điều đó thể hiện, theo phương án đã nêu, sản phẩm thứ cấp chứa protein đích được đưa vào sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit như bước 3) và sau đó sắc ký kỵ nước để thu được protein đích được tinh sạch như ở bước 4).

Sắc ký ceramic hydroxypatit có thể được thực hiện trên môi trường sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit Typ I và sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit Typ II. Sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ I là phương án được ưu tiên.

Theo một phương án của sáng chế, dung dịch đệm tải được sử dụng trong sắc ký trao đổi cation bao gồm dung dịch đệm axetat, với độ pH dưới 5,0.

Dung dịch đệm rửa giải dùng để rửa protein đích được sử dụng trong sắc ký trao đổi cation có thể còn bao gồm dung dịch đệm axetat và natri clorua, hoặc dung dịch đệm phosphat và natri clorua, với độ pH từ 5,0 đến 6,7. Tốt hơn là, nồng độ natri clorua là 0,25M và độ pH của dung dịch đệm rửa giải là 5,2.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên UNO Sphere S hoặc Capto MMC, và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 0,25M, với độ pH 5,2 hoặc 6,7 được sử dụng.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên nuvia S làm môi trường sắc ký, và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 0,25M, với độ pH 5,0 hoặc 5,2 được sử dụng.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên Capto MMC làm môi trường sắc ký, và dung dịch đệm rửa bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 1M, với độ pH 4,7 được sử dụng để loại bỏ tạp chất; và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 1M, với độ pH 6,7 được sử dụng để rửa giải protein đích.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên MacroPrep-CM làm môi trường sắc ký, và dung dịch đệm rửa bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 1M, với độ pH 4,7 được sử dụng để loại bỏ tạp chất; và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,1M, với độ pH 6,5 được sử dụng để rửa giải protein đích.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên Q Sepharosa FF làm môi trường sắc ký, và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,25M, với độ pH từ 6,0 đến 7,0 được sử dụng.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên DEAE sepharosa FF làm môi trường sắc ký, và dung dịch đệm rửa bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,1M với độ pH từ 6,0 đến 7,0 được sử dụng để loại bỏ tạp chất; và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,25M với độ pH từ 6,0 đến 7,0 được sử dụng để rửa giải protein đích.

Theo một phương án của sáng chế, dịch chiết chứa rHSA được tinh sạch bằng sắc ký kỵ nước hơn nữa có thể bao gồm amoni sulfat. Nồng độ amoni sulfat có thể là từ 0,1M đến 1M.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký kỵ nước được thực hiện trên Phenyl sepharosa HP làm môi trường sắc ký, và nồng độ amoni sulfat ở dịch chiết chứa rHSA được tinh sạch là 0,4M.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký kỵ nước được thực hiện trên Phenyl sepharosa FF làm môi trường sắc ký, và nồng độ amoni sulfat ở dịch chiết chứa rHSA được tinh sạch là 0,1M.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký kỵ nước được thực hiện trên MacroPrep-t-Butyl làm môi trường sắc ký, và nồng độ amoni sulfat ở dịch chiết chứa rHSA được tinh sạch là từ 0,6M đến 1,0M.

Theo một phương án của sáng chế, sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit sử dụng dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat với độ pH từ 7,0 đến 7,5 để rửa giải protein đích.

rHSA đã nêu của sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng tế bào nội nhũ hạt gạo làm hệ thống phản ứng sinh học, mà được bộc lộ ở đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số 200510019084.4 được nộp bởi chủ đơn. rHSA biểu hiện trong gạo chuyển gen có thể được chiết bằng phương pháp bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số 201010597544.2 được nộp bởi chủ đơn, tốt hơn là bao gồm các bước sau:

i) trộn gạo chuyển gen được nghiền chứa rHSA với dung dịch đệm chiết tính theo trọng lượng/thể tích (kg/l) là 1:5, tiếp đó được chiết từ 1 đến 1,5 giờ ở nhiệt độ từ

55 đến 60°C để thu được hỗn hợp I; dung dịch đệm chiết bao gồm dung dịch đệm phosphat từ 10 đến 30mM, natri axetat từ 10 đến 20mM, amoni sulfat từ 15 đến 30mM và natri caprylat từ 5 đến 20mM, với độ pH từ 6,5 đến 8;

ii) điều chỉnh độ pH của hỗn hợp I ở bước i) từ 4,0 đến 4,5 và được kết tủa trong thời gian từ 3 đến 12 giờ để thu được hỗn hợp II;

iii) lọc hỗn hợp II thu được ở bước ii) để loại bỏ tinh bột hoặc protein không mong muốn, và sau đó thu dịch lọc để thu được dịch chiết thô chứa nồng độ rHSA cao.

Theo một phương án của sáng chế, bước lọc nêu trên bao gồm bước lọc bằng áp lực với thiết bị lọc khung phẳng dạng vải lọc, sau đó tinh sạch bằng quá trình vi lọc với màng sợi lỗ rỗng polyetesulfon. Màng sợi rỗng có kích thước lỗ là từ 0,20 μ m đến 0,45 μ m, tốt hơn là 0,22 μ m.

Các giải pháp kỹ thuật theo sáng chế có các ưu điểm sau:

1. Liên quan đến hàm lượng polysacarit và sắc tố cao ở hạt gạo, sắc ký trao đổi cation được sử dụng là bước sơ cấp theo sáng chế để nâng cao hiệu quả khả năng tải để thu về hoặc gắn kết rHSA, làm tăng hiệu quả sắc ký. Ngược lại, nếu sắc ký trao đổi anion được sử dụng làm bước sơ cấp, khả năng tải để thu về rHSA chỉ đạt khoảng 20% so với công suất theo lý thuyết. Trong khi đó, cả UNO Sphere S và Capto-MMC có đặc tính ổn định tuyệt vời và tuổi thọ lâu dài thậm chí ở hydroxit natri, làm kéo dài thời gian giảm môi trường sắc ký và đơn giản hóa các hoạt động tinh sạch theo sáng chế, và cuối cùng làm giảm chi phí của sản phẩm đích.

2. Sắc ký trao đổi anion được sử dụng như bước thứ cấp theo sáng chế. Sau khi tối ưu hóa các điều kiện, trên 80% protein không mong muốn ở hạt gạo có thể được

loại bỏ, vì vậy loại bỏ hiệu quả protein không mong muốn và thu được rHSA. Kể từ khi các sắc tố và polysacarit được loại bỏ khỏi hạt gạo ở bước sơ cấp bằng cách sắc ký trao đổi cation, ảnh hưởng của chúng lên khả năng tải và hiệu quả tinh sạch trong sắc ký trao đổi anion đã được loại bỏ.

3. Sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit được sử dụng ở bước thứ ba theo sáng chế để loại bỏ các dime và polyme vì nhiều dime hoặc polyme hơn có thể gây ra dị ứng khi rHSA được sử dụng khi tiêm thuốc. Bước này cải thiện đáng kể cho độ tinh khiết, đáp ứng được yêu cầu về độ tinh khiết cao đối với ứng dụng điều trị bệnh hoặc hơn thế.

4. Sắc ký kỵ nước được sử dụng ở bước cuối theo sáng chế. Sau khi thực hiện quy trình sắc ký ba bước, việc tinh sạch HPLC của sản phẩm đích có thể đạt được khoảng 99,0%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh của SDS-PAGE của các phân đoạn thu được từ sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên môi trường sắc ký khác nhau làm bước tinh sạch sơ cấp, trong đó A: môi trường UNOsphere S, B: môi trường Nuvia S, C: môi trường Capto MMC và D: môi trường MacroPrep-CM.

Fig.2 thể hiện biểu đồ so sánh của khả năng tải (thể tích) đối với dịch chiết rHSA giữa môi trường Nuvia S và môi trường UNO Sphere S ở tốc độ dòng chảy khác nhau (300cm/giờ, 600cm/giờ).

Fig.3 là hình ảnh của SDS-PAGE của các phân đoạn thu được bởi sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường sắc ký khác nhau làm bước tinh sạch sơ cấp, trong đó A: môi trường UNO Sphere Q, B: môi trường Q Sepharosa FF.

Fig.4 là biểu đồ thay đổi cho thấy khả năng tải đối với dịch chiết rHSA của môi trường Q Sepharosa FF và hàm lượng polysacarit trong dịch chiết rHSA trước hoặc sau bước thẩm tách.

Fig.5 là hình ảnh của SDS-PAGE của các phân đoạn thu được bởi sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường sắc ký khác nhau làm bước tinh sạch thứ cấp, trong đó A: môi trường Q Sepharosa FF, B: môi trường DEAE sepharosa FF.

Fig.6 là hình ảnh của SDS-PAGE của phân đoạn thu được bởi sắc ký kỵ nước được thực hiện trên môi trường sắc ký khác nhau làm bước tinh sạch cuối cùng, trong đó A: môi trường Phenyl Sepharosa HP, B: môi trường Phenyl Sepharosa FF, C: môi trường Macro Prep-t-Butyl.

Fig.7 là hình ảnh của SDS-PAGE của các phân đoạn rửa giải thu được bằng cách liên tục cho dịch chiết rHSA thô vào sắc ký trao đổi cation, sắc ký trao đổi anion và sắc ký kỵ nước, được thực hiện trên UNOsphere S(A), Q Sepharosa FF(B) và Phenyl Sepharosa HP(C) làm môi trường sắc ký, tương ứng.

Fig.8 là sắc ký HPLC của sản phẩm rHSA được tinh sạch (HPLC-SEC) thu được theo một phương án của sáng chế.

Fig.9 là hình ảnh của SDS-PAGE của phân đoạn rửa giải thu được bằng cách thực hiện sắc ký ceramic hydroxyapatit trên môi trường sắc ký Macro-prep ceramic hydroxyapatit typ I.

Fig.10 là sắc ký HPLC của sản phẩm rHSA được tinh sạch được thể hiện theo phương án khác của sáng chế.

Fig.11 là hình ảnh của SDS-PAGE ở phân đoạn rửa giải thu được bằng cách thực hiện lần lượt sắc ký trên môi trường Macro-prep ceramic hydroxypatit typ II và sắc ký kỵ nước trên môi trường Phenyl Sepharosa HP.

Fig.12 là sắc ký HPLC của sản phẩm rHSA được tinh sạch thu được theo phương án khác của sáng chế.

Trong các hình vẽ nêu trên, S: mẫu tải, FT: dịch truyền, Elu: chất rửa giải chứa rHSA, Elu 1: chất rửa giải chứa protein không mong muốn, Elu 2: chất rửa giải rHSA, CIP: phân đoạn tinh sạch tại chỗ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các dấu hiệu và các hiệu quả có lợi của sáng chế có thể được hiểu hơn từ các ví dụ sau đây. Ví dụ chỉ được minh họa và không nên xem như sự hạn chế đối với sáng chế ở bất kỳ cách nào.

Chọn lọc môi trường sắc ký và điều kiện rửa giải trong sắc ký trao đổi cation

Sáng chế xác định rằng môi trường sắc ký của sự trao đổi nhựa cation khi có tốc độ dòng chảy cao, bao gồm UNO Sphere S, Nuvia S, Capto MMC, v.v., được sản xuất bởi Bio-RAD.

Được phát hiện qua các thử nghiệm, từng Capto MMC, Nuvia S và UNO Sphere S có thể được sử dụng để tinh sạch rHSA. Capto MMC có hiệu quả tốt nhất trong việc tinh sạch protein, tiếp theo là UNO Sphere S và Nuvia S. Không có sự khác biệt đáng kể giữa hiệu quả trên sự tinh sạch protein của Nuvia S và UNO Sphere S. Tuy nhiên, dưới điều kiện tốc độ dòng chảy tương tự, khả năng tải của UNO Sphere S là 1,5 lần lớn hơn của Capto MMC; UNO Sphere S có tốc độ dòng chảy tương tự như Capto MMC; UNO Sphere S có sự ổn định tuyệt vời kể cả khi nồng độ cao của

hydroxit natri và có quá trình tinh sạch tốt hơn, tuổi thọ làm việc dài hơn và chi phí thấp hơn so với Capto MMC.

Nuvia S và UNO Sphere S có các đặc tính giống nhau nhưng có sự khác biệt ở sự kéo dài của các phôi tử và kích thước hạt nền. Với tốc độ dòng chảy tối ưu tương ứng của chúng, khả năng tải của Nuvia S là 1,4 lần lớn hơn so với của UNO Sphere S; tuy nhiên, tốc độ dòng chảy của Nuvia S là ít hơn phân nửa so với UNO Sphere S. Thay vào đó, UNO Sphere S có khả năng tải lớn hơn Nuvia S về tốc độ dòng chảy tương tự, và cả hai có khả năng tinh sạch gần như tương đương.

Xét các yếu tố khác nhau, UNO Sphere S, tốt nhất là được sử dụng làm môi trường sắc ký đối với sắc ký trao đổi cation.

Dịch chiết chứa rHSA được tải trên cột phủ UNO Sphere S ở độ pH tương đối thấp ($\text{pH} = 4,4$) để đảm bảo rằng rHSA có thể được hấp thu hoàn toàn trên dung môi, và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải gradient pH và dung dịch đệm rửa giải gradient NaCl tương ứng để nhận biết điều kiện rửa giải cơ bản.

Kết quả thể hiện rằng ở bước rửa giải gradient pH, rHSA được hấp thụ trên cột UNO Sphere S được giải hấp ít hơn khi độ pH của dung dịch đệm rửa giải trên 5,5, nó chỉ ra rằng độ pH của dung dịch đệm tải không nên lớn hơn 5,5; khi độ pH của dung dịch đệm rửa giải là 5,68, rHSA được rửa giải hoàn toàn từ cột. Vì vậy rHSA trên cột UNO Sphere S rất nhạy trong rửa giải gradient pH.

Trong rửa giải gradient nồng độ NaCl, protein đích rHSA được rửa giải khi nồng độ gradient natri clorua (NaCl) 1M là từ 35% đến 60%, điều đó thể hiện rằng rHSA trên cột UNO Sphere S không nhạy với rửa giải gradient nồng độ NaCl. Kết quả chứng minh rằng cả gradient pH và gradient NaCl có thể được sử dụng để rửa giải

rHSA. Hơn thế nữa, gradient pH rửa giải rHSA với độ nhạy hơn và thể tích dung dịch đệm rửa giải nhỏ hơn. Ngược lại, gradient NaCl không thể rửa giải rHSA dễ dàng, và yêu cầu nồng độ NaCl cao và thể tích dung dịch đệm rửa giải lớn hơn.

Xem xét từ việc hiệu quả tinh sạch và tỷ lệ hoàn nguyên, dung dịch đệm rửa giải thích hợp là dung dịch đệm phosphat (độ pH 5,2) chứa NaCl 0,25M.

Chọn lọc môi trường sắc ký và điều kiện rửa giải đối với sắc ký trao đổi anion

Giống như trao đổi nhựa cation, nhựa trao đổi anion cũng có thể được sử dụng cho sự tinh sạch rHSA. Sáng chế xác định rằng môi trường sắc ký của nhựa trao đổi anion khi có tốc độ dòng chảy cao và khả năng tải cao, bao gồm UNOsphere Q, Q Sepharosa FF, DEAE sepharosa FF, v.v..

Như đã thấy từ các thử nghiệm, mỗi UNOsphere Q; Q Sepharosa FF và DEAE sepharosa FF có thể được sử dụng cho việc tinh sạch rHSA. UNOsphere Q có tốc độ dòng chảy nhanh hơn Q Sepharosa FF, nhưng Q Sepharosa FF có sự hiệu quả tinh sạch tốt hơn UNOsphere Q; trong khi DEAE Sepharosa FF có việc hiệu quả tinh sạch tương tự nhưng tốc độ dòng chảy chậm hơn so với Q Sepharosa FF.

Như đã mô tả ở trên, vì môi trường sắc ký đối với sắc ký trao đổi cation, UNO-sphere S có khả năng tinh sạch hơi kém hơn Capto MMC. Tuy nhiên, nó đã được chứng minh bằng các thử nghiệm mà tác dụng này có thể được loại bỏ bằng sự cải thiện của khả năng tinh sạch hệ thống. UNO-sphere S sẽ không gây ra ảnh hưởng xấu trên sắc ký trao đổi anion tiếp theo. Theo một phương án của sáng chế được ưu tiên, Q sepharosa FF được ưu tiên sử dụng làm môi trường sắc ký đối với sắc ký trao đổi anion và dung dịch đệm rửa giải dùng để rửa giải protein đích bao gồm dung dịch đệm phosphat và NaCl 0,2M, với độ pH 6,8.

Xác định thứ tự sắc ký trao đổi anion và sắc ký trao đổi cation

Cả sắc ký trao đổi anion và sắc ký trao đổi cation có thể được sử dụng làm quá trình tinh sạch sơ cấp của rHSA, tuy nhiên, như được thấy trong các thử nghiệm khi nhựa trao đổi anion Q Sepharosa FF được sử dụng trong bước tinh sạch sơ cấp, khả năng tải của nó thấp hơn nhiều so với công suất theo lý thuyết. Có thể kết hợp với polysacarit có thể hòa tan và axit nucleic được biểu hiện nhiều ở hạt gạo. Vì polysacarit có thể hòa tan và axit nucleic mang điện tích âm có thể liên kết với Q Sepharosa FF để giảm khả năng tải của nó. Điều đó được chứng minh bằng các thử nghiệm hàm lượng của polysacarit có thể hòa tan trong dịch chiết rHSA có thể làm giảm bước thẩm tách, do vậy làm tăng khả năng tải của Q Sepharosa FF.

Ngược lại, môi trường sắc ký trao đổi cation như UNO sphere S, Nuvia S và Capto MMC không liên kết với polysacarit có thể hòa tan hoặc axit nucleic, tránh gây ra việc giảm khả năng tải. Do vậy, sắc ký trao đổi cation được xác định là quá trình tinh sạch sơ cấp và sắc ký trao đổi anion được xác định làm bước tinh sạch thứ cấp theo sáng chế.

Chọn lọc môi trường sắc ký đối với sắc ký kỵ nước

Sáng chế sử dụng môi trường sắc ký kỵ nước khác nhau với các đặc tính khác nhau đối với bước tinh sạch, bao gồm Phenyl sepharosa HP, Phenyl sepharosa FF (LS), macro-prep t-butyl và macro-prep methyl.

Phenyl sepharosa HP có đặc tính kỵ nước mạnh và khả năng tinh sạch rất tốt. Khả năng để loại bỏ hầu hết protein không mong muốn và tạp chất khác từ dịch chiết thô là quan trọng trong việc hiệu quả tinh sạch; Tuy nhiên, có một ít bất lợi trong việc

áp dụng môi trường sắc ký này vì cỡ hạt mịn của nó, tốc độ dòng chảy thấp và chế độ làm việc đặc hiệu.

So với Phenyl sepharoza HP, Phenyl sepharoza FF (LS) có phối tử và ma trận tương tự, nhưng đường kính khác nhau của nền hình cầu và mật độ phối tử khác nhau. Cỡ hạt trung bình của ma trận của Phenyl sepharoza FF (LS) là lớn hơn gấp ba lần so với Phenyl sepharoza HP, và vì vậy phân đoạn trước đó có tốc độ dòng chảy cao hơn. Khi được sử dụng để sản xuất rHSA, nó có thể làm ngắn thời gian sản xuất. MacroPrep-Butyl có tính kỵ nước yếu hơn Phenyl sepharoza FF và Phenyl sepharoza HP, trong khi macro-prep metyl thậm chí có tính kỵ nước yếu hơn so với MacroPrep-Butyl.

Phenyl sepharoza FF được thực hiện qua thử nghiệm ở chế độ làm việc tương tự như Phenyl sepharoza HP để thu về dịch truyền. Trong bước chọn lọc nồng độ muối ở mẫu tải, khi mẫu được tải với đệm cân bằng (PB 25mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5M, độ pH 6,8) và được rửa giải bằng nước 100%, đã phát hiện rằng có hơn 50% rHSA được giữ lại trên cột. Kết quả là nồng độ muối đệm cân bằng cần được giảm.

Các mẫu được lọc bởi cột UNO sphere S và cột Q sepharoza FF được bổ sung bằng amoni sulfat để điều chỉnh nồng độ amoni sulfat đến 0,2M và 0,1M, tương ứng trước khi tải trên cột Phenyl sepharoza FF (LS). Dịch truyền và dịch rửa giải nước tinh khiết được thu thập để thực hiện việc nhận biết SDS-PAGE. Kết quả thể hiện rằng Phenyl sepharoza FF (LS) có tính kỵ nước mạnh hơn so với Phenyl sepharoza HP và có hiệu quả tốt hơn để loại bỏ protein không mong muốn ở phân đoạn mẫu kể cả khi nồng độ amoni sulfat ở mẫu tải là ở mức thấp 0,1M. Sản phẩm thu được bằng Phenyl sepharoza FF (LS) có độ tinh khiết là 93,5%. Tuy nhiên, vẫn còn 30% rHSA bị thất thoát trên Phenyl sepharoza FF(LS). Theo kết quả thử nghiệm tương tự thu được, thử

nghiệm trên được thực hiện bằng cách sử dụng natri clorua thay cho amoni sulphat. Mặc dù sự thất thoát rHSA trên cột giảm đi, HPLC tinh khiết của sản phẩm vẫn đạt khoảng 93%.

Các mẫu được lọc bởi cột UNO sphere S và cột Q sepharoza FF được bổ sung amoni sulfat để điều chỉnh nồng độ amoni sulfat tới 1M, 0,8M hoặc 0,6M tương ứng, trước khi tải trên cột macro-prep t-butyl và cột macro-prep metyl. Dịch truyền và rửa giải bằng nước tinh khiết được thu thập để thực hiện nhận biết SDS-PAGE. Kết quả thể hiện macro-prep t-butyl và macro-prep metyl có tính kỵ nước rất kém. Chúng có khả năng tinh sạch kém trên rHSA, và rHSA thu được có độ tinh khiết là 90% nhờ HPLC.

Để chọn lọc được sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ I hoặc typ II, thực hiện so sánh hai typ sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit từ Bio Rad. Chúng tôi thấy sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ I tốt hơn typ II. Sau khi sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ I, hàm lượng monome có thể đạt đến 98,998%.

Như đã mô tả ở trên, mặc dù môi trường sắc ký khác có ưu điểm là tốc độ dòng chảy nhanh trên Phenyl sepharoza HP, chúng không thể đạt được hiệu quả tinh sạch có thể so sánh với Phenyl sepharoza HP. Phenyl sepharoza HP có tốc độ dòng chảy tương đối chậm, nhưng có thể đảm bảo rằng protein đích có độ tinh khiết là hơn 98%. Vì vậy Phenyl sepharoza HP được ưu tiên sử dụng làm môi trường đối với sắc ký kỵ nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và trang thiết bị

Thiết bị lọc áp lực dạng khung phẳng kiểu vải lọc, loại: XMS4/500-UB, được sản xuất bởi Shanghai Tianli Filter Press Co., Ltd (China); cột sợi lỗ rỗng 0,20 μ m, có sẵn từ Huzhou Kelu Membrane Technology Co., Ltd. (China);

Môi trường UNO Sphere S, nuvia S, Capto MMC, MacroPrep-CM, MacroPrep-methyl, MacroPrep-Butyl, có sẵn từ BIO-RAD (US) ;

Môi trường Q sepharoza, Phenyl sepharoza HP, Phenyl sepharoza FF, DEAE-sepharoza FF, có sẵn từ GE Healthcare (US);

C10/10, XK16/20 cột sắc ký, có sẵn từ GE Healthcare (US)

Cột sắc ký Biological 15/200, có sẵn từ BIO-RAD (US)

Ví dụ 1: Chiết rHSA từ hạt gạo chuyển gen

Hạt gạo chuyển gen có thể được thực hiện theo phương pháp được bộc lộ ở đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số 200510019084 của các tác giả sáng chế. Lúa được tách vỏ để thu được gạo nguyên cám và sau đó được nghiền để thu được gạo nghiền với độ mịn từ 80 đến 100 mắt lưới. Gạo nghiền được trộn với dung dịch đệm chiết theo tỉ lệ 1:5 (trọng lượng/thể tích, kg/L) và được chiết trong thời gian 1,5 giờ ở nhiệt độ 60°C. Dung dịch đệm chiết bao gồm dung dịch đệm phosphat 25mM, natri axetat 20mM, amoni sulfat 10mM, natri caprylat 10mM, và có độ pH 7,5. Hỗn hợp thu được được điều chỉnh đến độ pH 4,5 bằng axit axetic và được đặt trong thời gian ít nhất là 3 giờ để làm kết tủa protein không mong muốn. Sau đó hỗn hợp thu được được đưa lần lượt để lọc áp lực sử dụng thiết bị lọc áp lực khung phẳng (loại bằng vải lọc) và quá trình vi lọc bằng cột sợi lỗ rỗng với kích thước lỗ 0,22 μ m, để thu được dịch nổi có chứa rHSA. Nồng độ rHSA là khoảng 0,66 mg/mL.

Ví dụ 2: sắc ký trao đổi cation làm bước tinh sạch sơ cấp

1. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên môi trường UNO Sphere S

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 8,7ml môi trường UNO Sphere S và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, axit axetic được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 4,5) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH đạt được của sản phẩm có độ ổn định. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy 600cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 6,1ms/cm và độ pH là 4,53. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri axetat 2g/L, axit axetic, độ pH 5,2, natri clorua 14,61g/L) ở tốc độ dòng chảy 300cm/giờ. Dịch rửa giải được thu thập và được quan sát bởi SDS-PAGE để thu được các phân có chứa rHSA. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.1A.

2. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên môi trường Nuvia S

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 9,3ml môi trường Nuvia S và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, axit axetic được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 4,5) ở tốc độ dòng chảy 300cm/giờ cho đến độ pH sản phẩm đạt đến độ ổn định. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 6,3ms/cm và độ pH là 4,56. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri axetat 2g/L, axit axetic, độ pH 5,0, natri clorua 14,61g/L) ở tốc độ dòng chảy 300cm/giờ. Chất rửa giải được thu thập và quan sát bởi SDS-PAGE để thu được các phân đoạn chứa rHSA. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.1B.

3. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên môi trường Capto MMC

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 15,1ml môi trường Capto MMC và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, axit axetic được bổ

sung để điều chỉnh độ pH đến 4,5) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ đến độ pH sản phẩm là 4,5 và ổn định. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy 600cm/giờ. Mẫu có độ dẫn 6,3ms/cm và độ pH 4,56. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri axetat 2g/L, axit axetic, độ pH 4,7, natri clorua 58,44g/L) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ để loại bỏ tạp chất và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, natri clorua 58,44g/L, pH 6,7) để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.1C.

4. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên Môi trường MacroPrep-CM

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 10ml Môi trường MacroPrep-CM được cân bằng với 300ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, axit axetic được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 4,5) ở tốc độ dòng chảy là 200cm/giờ đến độ pH của sản phẩm là 4,5 và ổn định. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 6,3ms/cm và độ pH là 4,56. Sau khi tải, mẫu được rửa sạch bằng dung dịch đệm rửa (natri axetat 2g/L, axit axetic, độ pH 4,7, natri clorua 58,44g/L) ở tốc độ dòng chảy là 200cm/giờ để loại bỏ tạp chất và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydrogen phosphat 3,5g/L, natri clorua 5,84g/L, độ pH 6,5) để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện trên Fig. 1D.

5. So sánh của khả năng tải giữa môi trường Nuvia S và môi trường UNO Sphere S

Hai cột XK16/100 được phủ tương ứng bằng khoảng 5ml Nuvia S và môi trường UNO Sphere S và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan

2g/L, axit axetic được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 4,5) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH của sản phẩm là 4,5. Mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột Nuvia S và cột UNO Sphere S ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ, tương ứng. Giá trị hấp thụ của UV280 trong suốt quá trình tải mẫu được ghi lại cho đến giá trị hấp thụ vượt qua trạng thái ổn định bằng 10%. Thể tích mẫu được ghi lại và khả năng tải thực tế trên mỗi milimét tương ứng của Nuvia S hoặc UNO Sphere S ở tốc độ dòng chảy của 300cm/giờ được tính.

Hơn nữa, cột UNO Sphere S được cân bằng với đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, axit axetic được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 4,5) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH sản phẩm là 4,5. Dịch chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột UNO Sphere S ở tốc độ dòng chảy là 600cm/giờ và giá trị hấp thụ của UV280 trong quá trình tải mẫu được ghi lại đạt đến giá trị hấp thụ vượt qua trạng thái ổn định là 10%. Thể tích mẫu được ghi lại và khả năng tải thực tế trên mỗi milimét của UNO Sphere S ở tốc độ dòng chảy là 600cm/giờ được tính. Sự so sánh khả năng tải được thể hiện ở Fig.2.

Ví dụ 3: Sắc ký trao đổi anion làm bước tinh sạch sơ cấp

1. Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường UNO Sphere Q

Cột Biological 15/200 được phủ bằng khoảng 10ml môi trường UNO Sphere Q và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydrogen phosphat 3,5g/L, hydroxit natri hoặc axit clohydric được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 7,5) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH sản phẩm là 7,5. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 được điều chỉnh đến độ pH 7,5 và được pha loãng bằng dung dịch đệm đến khi độ dẫn là ít hơn 10,0ms, và sau đó được

tải trên cột UNO Sphere Q ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Mẫu được rửa với dung dịch đệm rửa (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydrogen phosphat 3,5g/L, natri clorua 11,68g/L) để loại bỏ tạp chất và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, natri clorua 23,36g/L) để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 3A.

2. Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường Q Sepharosa FF

Cột Biological 15/200 được phủ bằng khoảng 10ml môi trường Q Sepharosa FF và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, hydroxit natri hoặc axit clohydric được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 7,0) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH của sản phẩm là 7,0. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 được điều chỉnh đến độ pH 6,8 và được pha loãng bằng dung dịch đệm cho đến độ dẫn là ít hơn 10,0 ms/cm, và sau đó được tải trên cột Q Sepharosa FF ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, natri clorua 5,84g/L) để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.3B.

3. Thử nghiệm cho khả năng tải thực tế của Q Sepharosa FF

Cột 10/100 được phủ bằng khoảng 5ml của môi trường Q Sepharosa FF và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri dihydrogen phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, hydroxit natri hoặc axit clohydric được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 7,0) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH của sản phẩm là 7,0 và ổn định. 250ml mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 được điều chỉnh đến độ pH 7,5 và được pha loãng bằng dung dịch đệm cho đến độ dẫn là ít hơn 10,0 ms/cm và tổng

thể tích là 1000ml. Mẫu đã được tải trên cột Q Sepharosa FF ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Giá trị hấp thụ UV280 trong quá trình tải mẫu được ghi lại cho đến giá trị hấp thụ vượt qua trạng thái ổn định bằng 10%. Thể tích mẫu được ghi lại và khả năng tải thực tế trên mỗi milimét của Q Sepharosa FF ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ được tính. Sau đó nhựa được tái sinh.

Mẫu chiết rHSA thu được ở ví dụ 1 được điều chỉnh đến độ pH 7,0 và được pha loãng bằng dung dịch đệm cho đến độ dẫn là ít hơn 10.0ms và sau đó được cô đặc để 400ml qua băng màng GE 30KD. Phương pháp axit sulphuric phenol được sử dụng để xác định hàm lượng polysaccharit trước và sau thẩm tách. Sau đó mẫu đã được tải được cân bằng trên cột Q Sepharosa FF. Giá trị hấp thụ UV280 trong quá trình tải mẫu được ghi lại cho đến giá trị hấp thụ vượt qua trạng thái ổn định là 10%. Thể tích mẫu được ghi lại và khả năng tải thực tế trên mỗi milimét của Q Sepharosa FF ở tốc độ dòng chảy được tính là 300cm/giờ. Sự thay đổi khả năng tải và sự thay đổi của hàm lượng polysaccharit được thể hiện ở Fig.4.

Ví dụ 4: Sắc ký trao đổi anion làm bước tinh sạch thứ cấp

Phần chiết chứa rHSA ở ví dụ 2 được chia thành hai phần bằng nhau để sử dụng ở các thử nghiệm sau.

1. Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường Q Sepharosa FF

Cột 15/200 được phủ bằng khoảng 7ml Q Sepharosa FF và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri dihydro phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, hydroxit natri hoặc axit clohydric được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 7,0) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH của sản phẩm là 7,0. Một phần của trong số các phần trên được điều chỉnh đến độ pH 7,0 và được pha loãng bằng dung dịch đệm

cho đến độ dẫn là ít hơn 10,0ms. Mẫu đã được tải trên cột Q Sepharosa FF ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, natri clorua 11,68g/L) để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 5A.

2. Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường DEAE sepharosa FF

Cột Biological 15/200 được phủ bằng khoảng 8ml DEAE Sepharosa FF và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri dihydro phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, với hydroxit natri hoặc axit clohydric được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 7,0) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ cho đến độ pH của sản phẩm là 7,0. Một phân đoạn khác trong số các phân đoạn trên được điều chỉnh đến độ pH 7,5 và được pha loãng bằng dung dịch đệm cho đến độ dẫn là ít hơn 10,0ms. Mẫu đã được tải trên cột DEAE Sepharosa FF ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 0,3g/L, dinatri hydro phosphat 3,5g/L, natri clorua 11,68g/L) để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.5B.

Ví dụ 5: Sắc ký kỵ nước làm bước tinh sạch cuối cùng

1. Sắc ký kỵ nước được thực hiện trên môi trường Phenyl Sepharosa HP

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 8ml Phenyl sepharosa HP và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2,32g/L, natri dihydro phosphat 2,81g/L, amoni sulfat 66g/L) ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ. Dịch chiết chứa rHSA 20ml thu được ở ví dụ 4 (Q Sepharosa FF) được bổ sung amoni sulfat (0,4M) để tạo độ dẫn là 80,0ms. Sau đó mẫu đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ.

Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 6A.

2. Sắc ký kỵ nước được thực hiện trên môi trường Phenyl Sepharosa FF

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 10ml Phenyl sepharosa FF và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2,32g/L, natri dihydro phosphat 2,81g/L, amoni sulfat 13,2g/L) ở tốc độ dòng chảy là 150cm/giờ. Dịch chiết chứa rHSA 20ml ở ví dụ 4 (Q Sepharosa FF) được bổ sung amoni sulfat (0.1M) để tạo độ dẫn là 80,0ms. Sau đó mẫu được sử dụng cho cột ở tốc độ dòng chảy là 150cm/giờ. Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 6B.

3. Sắc ký kỵ nước được thực hiện trên môi trường MacroPrep-t-Butyl

Cột 15/200 được phủ bằng khoảng 6ml MacroPrep-t-Butyl và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2,32g/L, natri dihydro phosphat 2,81g/L, amoni sulfat 13,2g/L) ở tốc độ dòng chảy là 150cm/giờ. 20ml dịch chiết chứa rHSA thu được ở ví dụ 3 (Q Sepharosa FF) được bổ sung amoni sulfat (tương ứng 1,0M, 0,8M, 0,6M,) để tạo độ dẫn là 130,0ms, 90,0ms, 70,0 ms, tương ứng. Sau đó các mẫu được sử dụng cho các cột ở tốc độ dòng chảy là 150cm/giờ. Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ thu được ở Fig. 6C.

Ví dụ 6: Sự phân tách và tinh sạch rHSA từ dịch chiết chứa rHSAtract

Bước 1): sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên UNO Sphere S làm bước tinh sạch sơ cấp

Cột XK16/20 được phủ bằng khoảng 12ml môi trường UNO Sphere S và được cân bằng với 500ml đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, axit axetic, độ pH 4,5) ở

tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. 300ml mẫu chiết chứa mẫu rHSAtract thu được ở ví dụ 1 đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy là 600cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 6,5ms/cm và độ pH là 4,5. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri axetat 2g/L, axit axetic, độ pH 5,0, natri clorua 14,61g/L) ở tốc độ dòng chảy là 200cm/giờ. Chất rửa giải được chọn và được quan sát bởi SDS-PAGE để thu được các phân đoạn chứa rHSA. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 7A.

Bước 2): sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên Q Sepharosa FF làm bước tinh sạch thứ cấp

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 13ml môi trường Q Sepharosa FF và được cân bằng với 400ml đệm cân bằng (natri axetat khan 6,51g/L, natri dihydro phosphat 0,72g/L, độ pH 6,8) ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Dịch chiết chứa rHSA thu được ở bước trước đó được pha loãng đến khoảng 200ml với độ dẫn là ít hơn 10,0ms và sau đó được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy là 300cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 8,3ms/cm và độ pH là 6,8. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (dinatri hydrogen phosphat 6,51g/L, natri dihydro phosphat 0,72g/L, natri clorua 11,69g/L) ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ. Chất rửa giải được chọn và quan sát bởi SDS-PAGE. dịch chiết chứa rHSAs được chọn. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 7B.

Bước 3): sắc ký kỵ nước được thực hiện trên Phenyl sepharosa HP làm bước tinh sạch cuối cùng

Cột XK16/100 được phủ bằng khoảng 12ml Phenyl sepharosa HP và được cân bằng với đệm cân bằng 200ml (natri axetat khan 2,32g/L, natri dihydro phosphat 2,81g/L, amoni sulfat 66g/L) ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ. Dịch chiết chứa rHSA 20ml được thể hiện ở bước trước đó được bổ sung amoni sulfat để tạo độ dẫn là

90,0ms. Sau đó mẫu đã được tải trên cột ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ. Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSAs. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.7C. Sắc ký HPLC của sản phẩm rHSA được tinh sạch được thể hiện trên Fig.8. rHSA có độ tinh khiết lớn hơn 99% (monome cộng các dime và polyme) bằng HPLC.

Ví dụ 7: Phân tách và tinh sạch của rHSA từ dịch chiết chứa rHSA

Ví dụ này sử dụng phương pháp bốn bước để phân tách và tinh sạch rHSA bằng việc lần lượt cho dịch chiết rHSA thô ở Ví dụ 1 vào sắc ký trao đổi cation, sắc ký trao đổi anion, sắc ký ceramic hydroxyapatit và sắc ký kỵ nước, được thực hiện trên UNOsphere S, Q Sepharosa FF, sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ I và Phenyl Sepharosa HP làm môi trường sắc ký, tương ứng. Sắc ký trao đổi cation và sắc ký trao đổi anion ở đây tương tự như ở Ví dụ 6.

Cột CHT được phủ bằng khoảng 15ml môi trường sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ I và được cân bằng với 200ml đệm cân bằng (phosphat natri 20mM + natri clorua 50mM, độ pH 7,5) ở tốc độ dòng chảy là 100 cm/giờ. Dịch chiết chứa rHSA thu được từ sắc ký trao đổi anion được tải trực tiếp lên cột ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 26ms/cm và độ pH từ 7,4 đến 7,6. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (phosphat natri 500mM, độ pH 7,5). Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSA. Khả năng tinh sạch rHSA được ước tính là $\leq 30\text{mg/g}$ CHT I và tỷ lệ hoàn nguyên rHSA ước tính là $\geq 80\%$. Cuối cùng, cột CHT cột ceramic hydroxyapatit có thể được tái sinh từ 3 đến 5 thể tích cột là đệm natri phosphat 500mM ở độ pH 7,0. Tinh sạch cột bằng NaOH 1 đến 2N và bảo quản ở NaOH 0,1N nếu muốn. Điện di đồ được thể hiện ở Fig. 9.

Sau đó, dịch chiết chứa rHSA được thể hiện ở trên được cho vào sắc ký kỵ nước theo cách tương tự ở Ví dụ 6. Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSA. Sắc ký HPLC của sản phẩm rHSA được tinh sạch được thể hiện ở Fig.10. rHSA độ tinh khiết khoảng 99% (chỉ monome) bởi HPLC.

Ví dụ 8: Phân tách và tinh sạch rHSA từ dịch chiết chứa rHSA

Ví dụ được thực hiện bởi phương pháp tương tự như ở Ví dụ 7 ngoại trừ sắc ký ceramic hydroxyapatit được thực hiện trên sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ II làm môi trường sắc ký.

Cột CHT được phủ bằng khoảng 15ml sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit typ II trung gian và được cân bằng với đệm cân bằng 200ml (phosphat natri 20mM + natri clorua 50mM, độ pH 7,0) ở tốc độ dòng chảy là 100 cm/giờ. Dịch chiết chứa rHSA thu được từ sắc ký trao đổi anion được tải trực tiếp trên cột ở tốc độ dòng chảy là 100cm/giờ. Mẫu có độ dẫn là 26ms/cm và độ pH là 7,4 đến 7,6. Sau khi tải, mẫu được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (phosphat natri 500mM, pH 7,0). Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSA. Khả năng tinh sạch rHSA được ước tính là $\leq 25\text{mg/g}$ CHT II và tỷ lệ hoàn nguyên của rHSA lên đến $\geq 85\%$. Cuối cùng, CHT cột hydroxyapatit gồm được tái sinh là 3 đến 5 thể tích cột là đệm natri phosphat 500mM ở độ pH 7,0. Tinh sạch cột bằng NaOH từ 1 đến 2N và bảo quản ở NaOH 0,1N nếu muốn.

Sau đó, dịch chiết chứa rHSA thu được từ bước trước đó được cho vào sắc ký kỵ nước theo bước tương tự ở Ví dụ 7. Dịch truyền được chọn để thu được dịch chiết chứa rHSA. Điện di đồ được thể hiện ở Fig.11. Sắc ký HPLC của sản phẩm rHSA

được tinh sạch được thể hiện ở Fig.12. rHSA có độ tinh khiết khoảng 99% (chỉ monome) bởi HPLC.

Có thể được thấy từ kết quả của các ví dụ 6 đến 8 mà sắc ký ceramic hydroxyapatit tăng hàm lượng monome ở sản phẩm rHSA cuối cùng một cách hiệu quả, cho phép nó đạt đến độ tinh khiết là 99%. Hơn nữa, sắc ký ceramic hydroxyapatit được vận dụng một cách đơn giản vì nó sử dụng tinh sạch triệt để để thu về rHSA được tinh sạch tương tự như cách được sử dụng ở bước Phenyl sepharosa HP và dung dịch rửa giải tương thích không có sự điều chỉnh nồng độ muối và trị số độ pH. Bằng sắc ký ceramic hydroxyapatite, rHSA tinh sạch đã đáp ứng được nhu cầu cho việc sử dụng để điều trị bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân tách và tinh sạch albumin huyết thanh người tái tổ hợp từ hạt gạo chuyển gen, lần lượt bao gồm các bước:

1) cho dịch chiết thô của albumin huyết thanh người tái tổ hợp vào sắc ký trao đổi cation để thu được sản phẩm sơ cấp I;

2) cho sản phẩm sơ cấp I vào sắc ký trao đổi anion để thu được sản phẩm thứ cấp II;

3) cho sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký kỵ nước để thu được albumin huyết thanh người tái tổ hợp được tinh sạch;

trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký ceramic hydroxyapatit trước sắc ký kỵ nước của bước 3).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên môi trường sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm UNO Sphere S, Capto MMC, Nuvia S và MacroPrep-CM.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên UNO Sphere S hoặc Capto MMC.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên môi trường sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm Q Sepharosa FF, UNO Sphere Q và DEAE sepharosa FF.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên Q Sepharosa FF.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sắc ký kỵ nước được thực hiện trên môi trường sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm Phenyl sepharosa HP, Phenyl sepharosa FF, macro-prep t-butyl và macro-prep metyl.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sắc ký kỵ nước được thực hiện trên Phenyl sepharosa HP.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sắc ký ceramic hydroxypatit được thực hiện trên môi trường sắc ký được chọn từ môi trường sắc ký Macro-prep ceramic hydroxypatit Typ I và Typ II.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dịch chiết thô nêu trên của albumin huyết thanh người tái tổ hợp được điều chế bằng phương pháp bao gồm các bước:

i) trộn hạt gạo chuyển gen được nghiền chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp với dung dịch đệm chiết tính theo trọng lượng/thể tích (kg/L) là 1:5 và chiết ở nhiệt độ từ 55 đến 60°C trong thời gian từ 1 đến 1,5 giờ để thu được hỗn hợp I; dung dịch đệm chiết này bao gồm dung dịch đệm phosphat từ 10 đến 30mM, natri axetat từ 10 đến 20mM, amoni sulfat từ 15 đến 30mM và natri caprylat từ 5 đến 20mM, có độ pH từ 6,5 đến 8;

ii) điều chỉnh độ pH của hỗn hợp I thu được ở bước i) từ 4,0 đến 4,5 và cho kết tủa hỗn hợp trong thời gian từ 3 đến 12 giờ để thu được hỗn hợp II;

iii) lọc hỗn hợp II thu được ở bước ii) và thu dịch lọc để thu được dịch chiết thô chứa albumin huyết thanh người tái tổ hợp với nồng độ cao; bước lọc này bao gồm các bước lọc bằng cách lọc bằng áp lực với thiết bị lọc khung phẳng dạng vải lọc, sau đó lọc bằng quá trình vi lọc với màng sợi lỗ rỗng polyetesulfon với kích thước lỗ từ 0,20µm đến 0,45µm.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sắc ký trao đổi cation sử dụng dung dịch đệm tải bao gồm dung dịch đệm axetat có độ pH nhỏ hơn 5,0; và

sắc ký trao đổi cation sử dụng dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat và natri clorua, hoặc dung dịch đệm phosphat và natri clorua, có độ pH từ 5,0 đến 6,7.

11. Phương pháp theo điểm 2, trong đó sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên:

- (i) UNO Sphere S và sử dụng dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 0,25M, có độ pH là 5,2; hoặc
- (ii) Nuvia S và sử dụng dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 0,25M, có độ pH là 5,0; hoặc
- (iii) Capto MMC, và sử dụng dung dịch đệm rửa bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 1M, với độ pH là 4,7 để loại bỏ protein không mong muốn, và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 1M, với độ pH 6,7 để rửa giải albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người; hoặc
- (iv) MacroPrep-CM, và sử dụng dung dịch đệm rửa bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 1M, có độ pH là 4,7 để loại bỏ protein không mong muốn, và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm axetat, natri clorua 1M, có độ pH là 6,5 để rửa giải albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên Q Sepharosa FF và sử dụng dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,25M, có độ pH từ 6,0 đến 7,0.

13. Phương pháp theo điểm 4, trong đó sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên DEAE sepharosa FF, và sử dụng dung dịch đệm rửa bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,1M với độ pH từ 6,0 đến 7,0 để loại bỏ protein không mong muốn, và dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat, natri clorua 0,25M, với độ pH từ 6,0 đến 7,0 để rửa giải albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người.

14. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sắc ký kỵ nước, sản phẩm thứ cấp II để được tinh sạch còn bao gồm amoni sulfat ở nồng độ từ 0,1M đến 1M.

15. Phương pháp theo điểm 6, trong đó sắc ký nước được thực hiện trên Phenyl sepharosa HP, và sản phẩm thứ cấp II để được tinh sạch còn bao gồm amoni sulfat ở nồng độ là 0,4M; hoặc

sắc ký nước được thực hiện trên Phenyl sepharosa FF, và sản phẩm thứ cấp II để được tinh sạch còn bao gồm amoni sulfat ở nồng độ là 0,1M; hoặc

sắc ký nước được thực hiện trên MacroPrep-t- Butyl, và sản phẩm thứ cấp II để được tinh sạch còn bao gồm amoni sulfat ở nồng độ từ 0,6M đến 1,0M.

16. Phương pháp theo điểm 8, trong đó sắc ký ceramic hydroxypatit sử dụng dung dịch đệm rửa giải bao gồm dung dịch đệm phosphat với độ pH từ 7,0 đến 7,5.

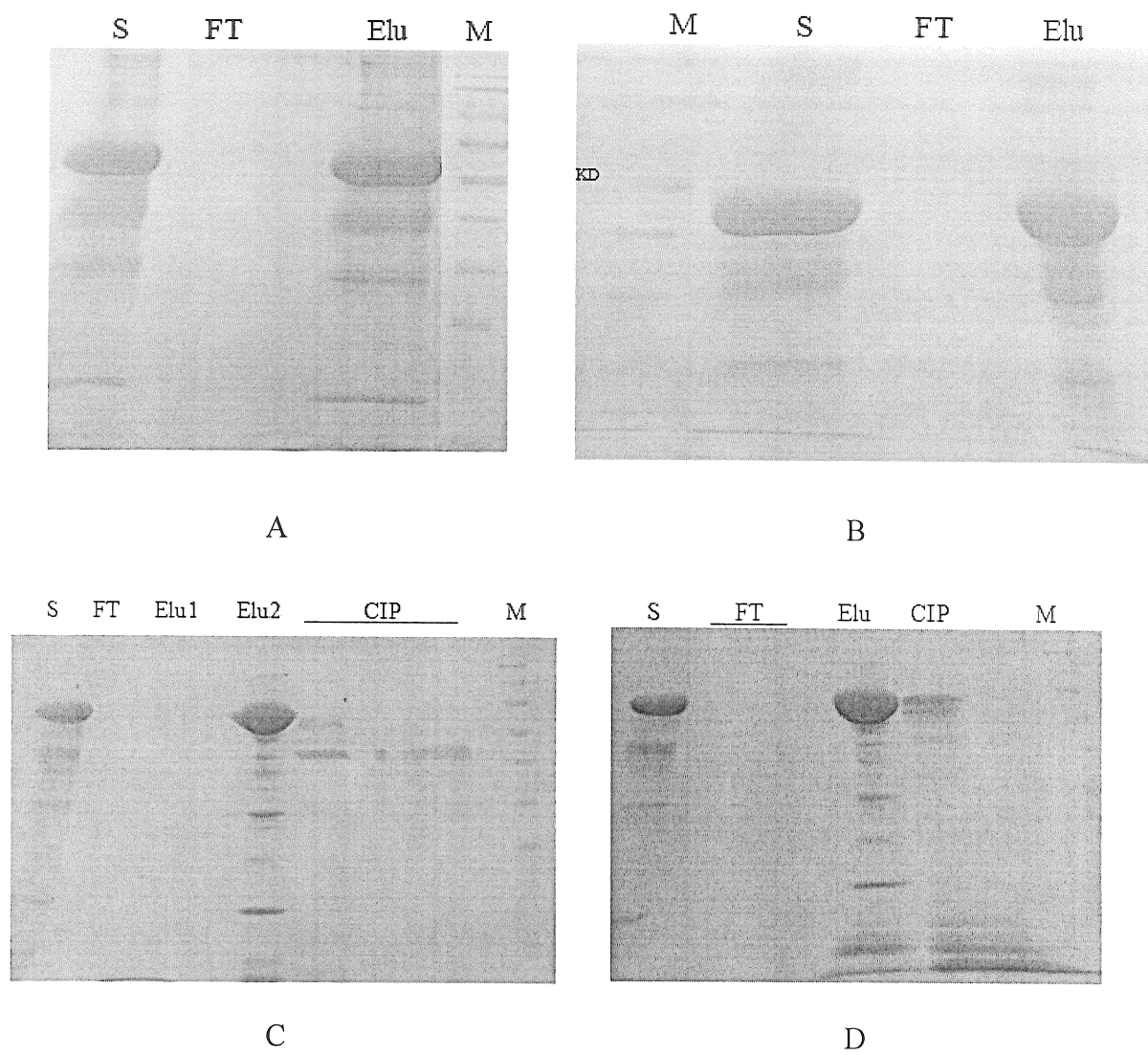


Fig. 1

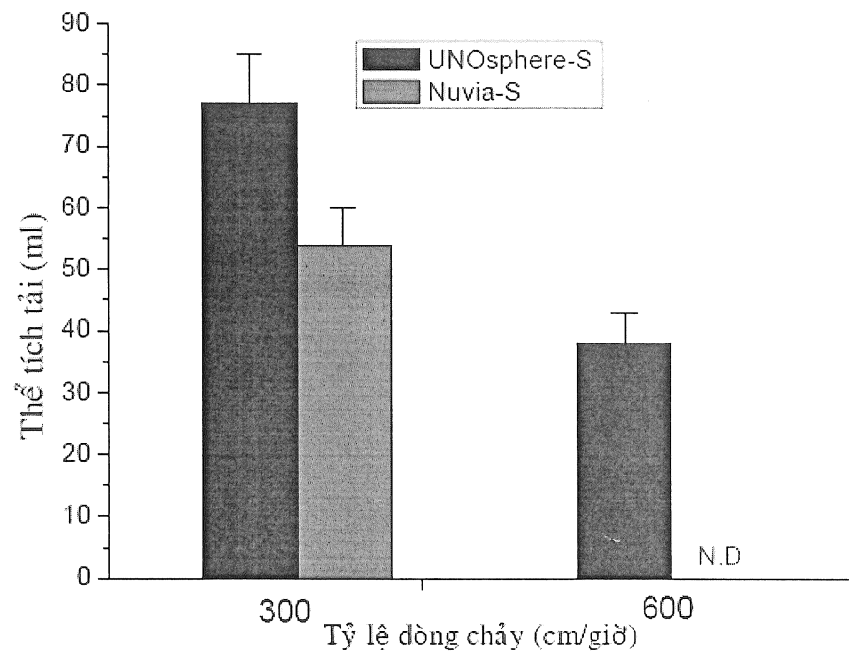


Fig. 2

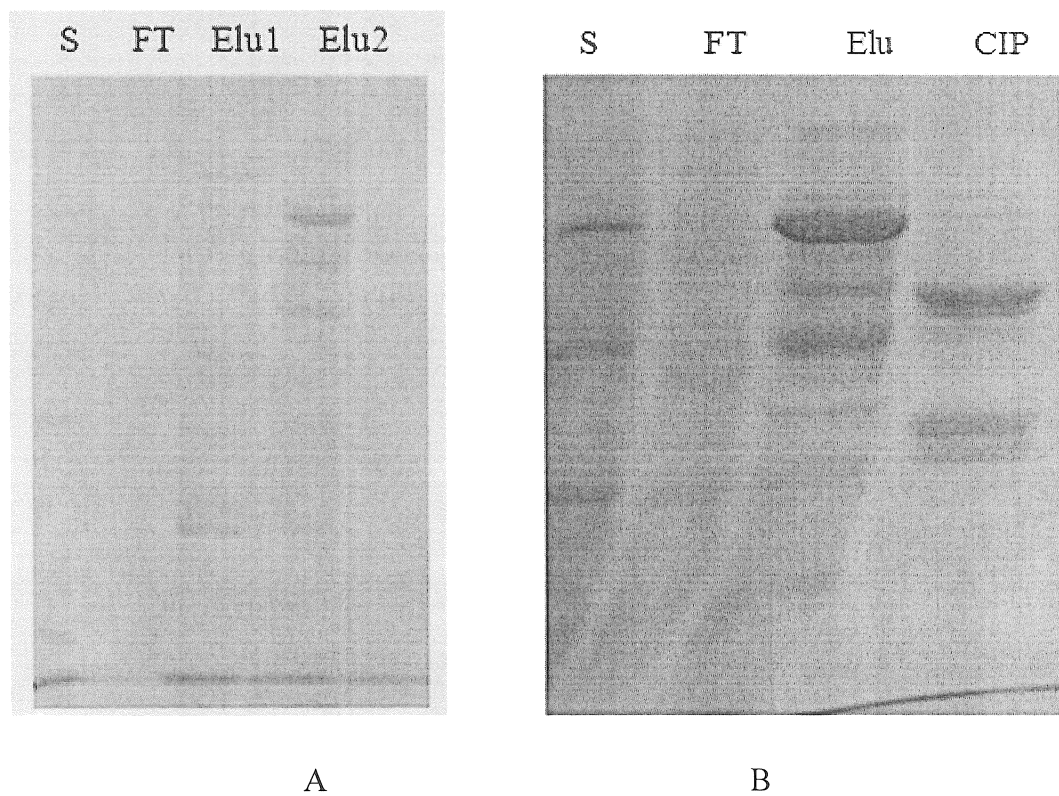


Fig. 3

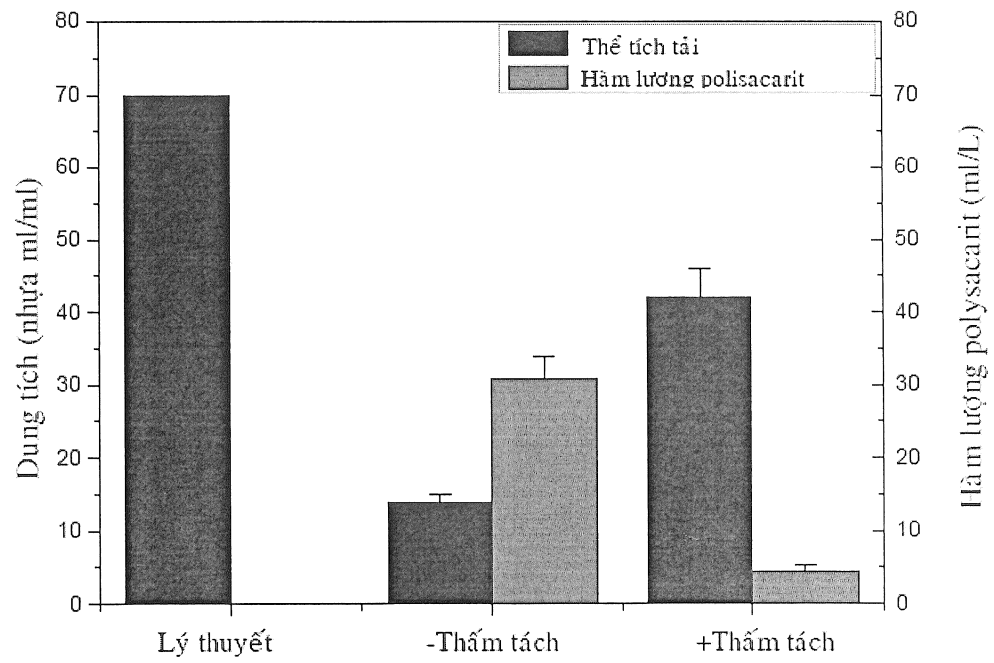


Fig. 4

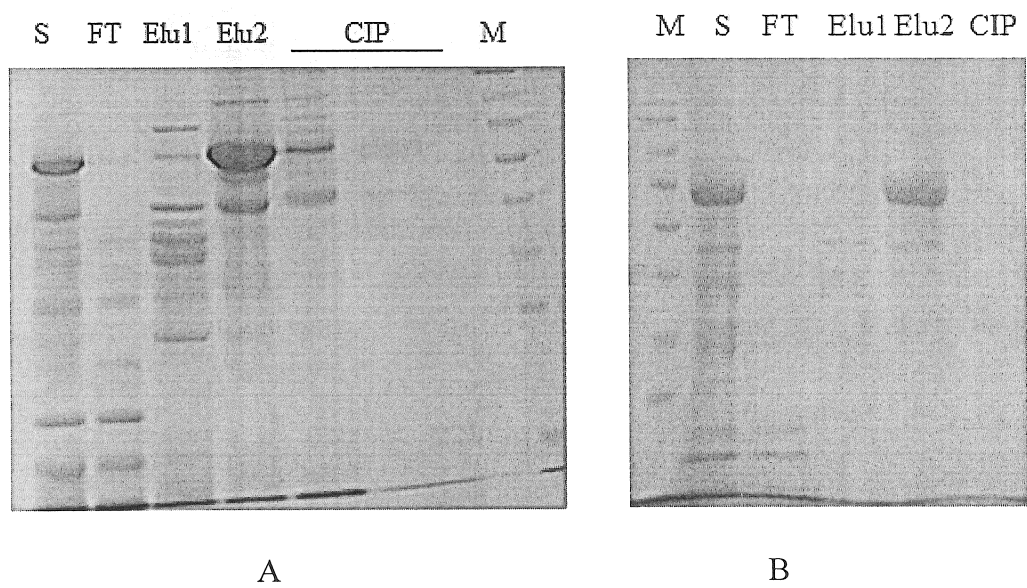


Fig. 5

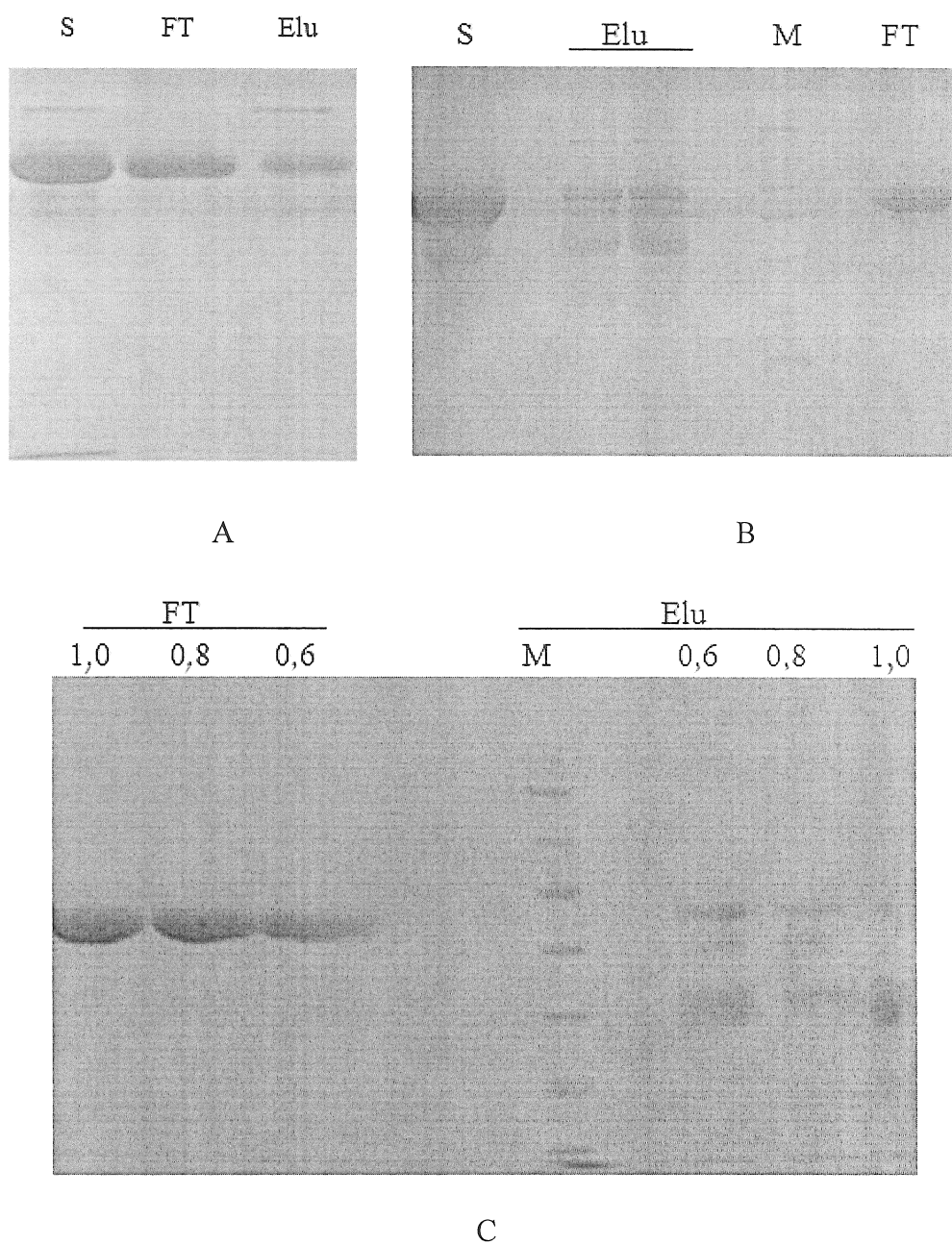


Fig. 6

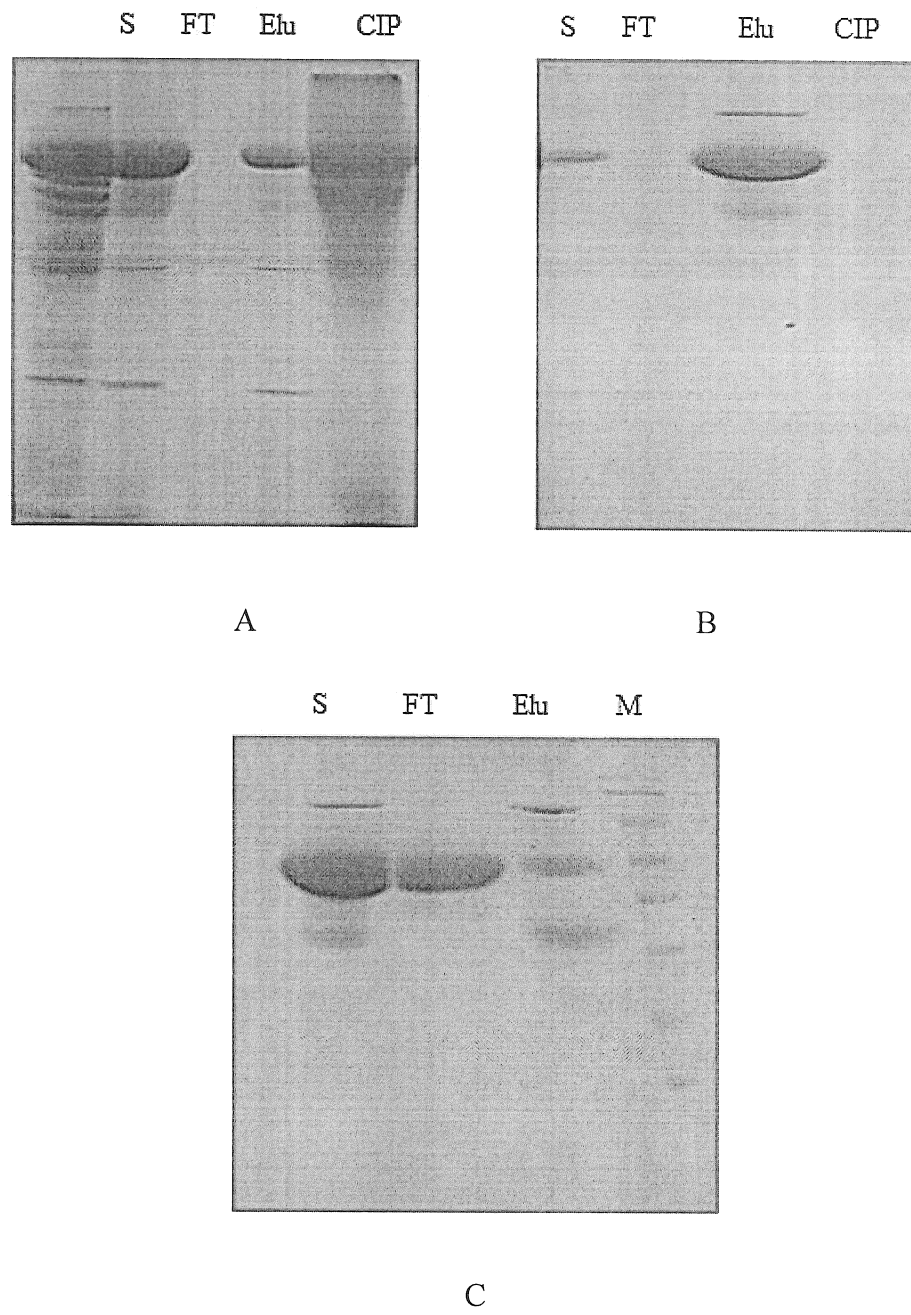
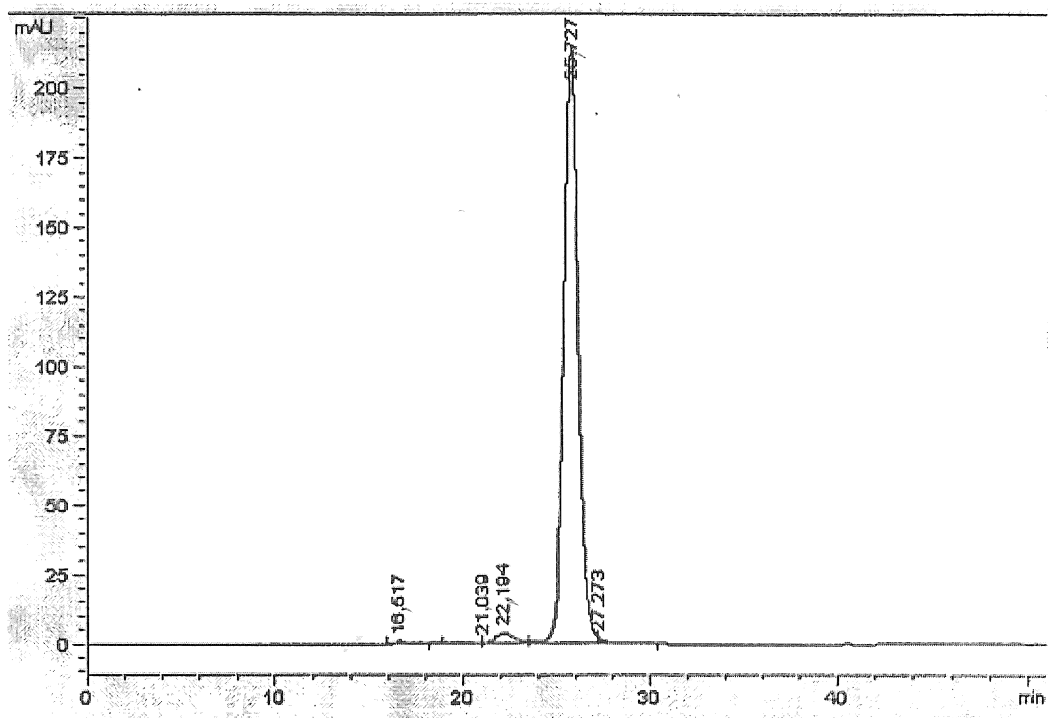


Fig. 7



#	Thời gian	Vùng	Chiều cao	Chiều rộng	Hệ số đối	
					xung	% Vùng
1	16,517	56,7	9,5E-1	0,9955	0,308	0,462
2	21,039	15,4	3,1E-1	0,8197	2,522	0,125
3	22,194	290,3	3,8	1,2808	0,907	2,367
4	25,727	11843,6	214,3	0,9211	0,952	96,589
5	27,273	55,9	1,9	0,3545	0	0,456

Fig.8

23077

CHT I

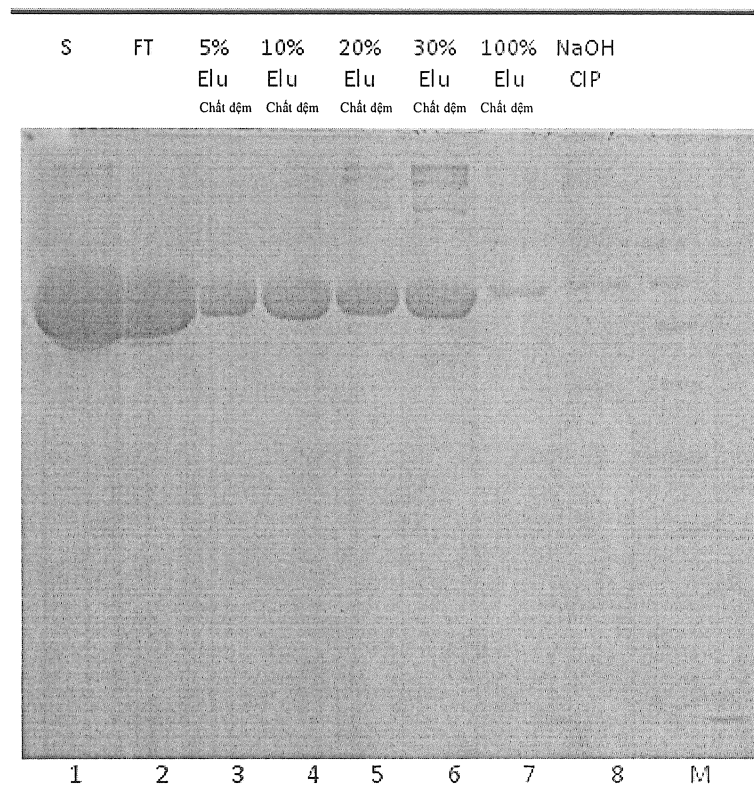
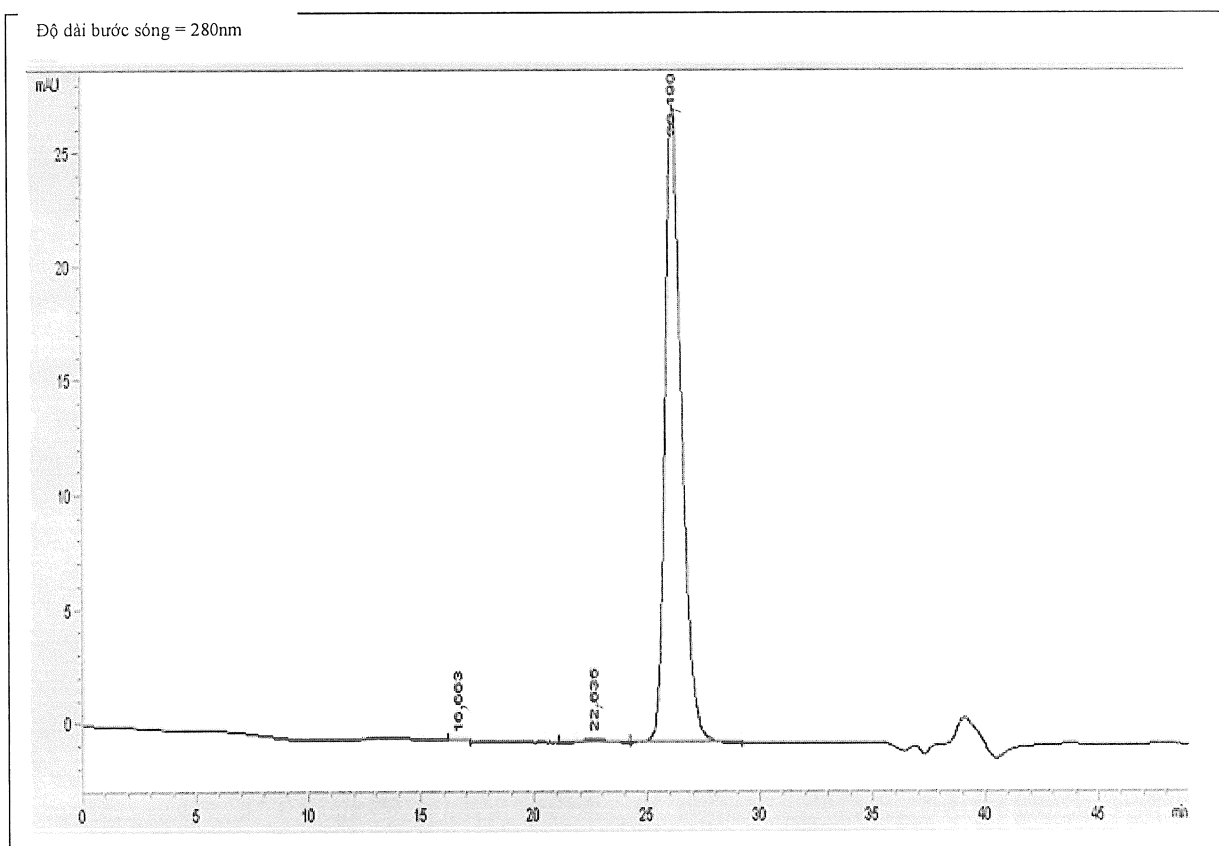


Fig. 9



#	Thời gian	Vùng	Chiều cao	Chiều rộng	Hệ số đối xứng	% Vùng
1	16,663	1	2,9E-2	0,5724	0,966	0,069
2	22,635	13,6	1,8E-1	1,2672	0,836	0,934
3	26,19	1445,4	27,9	0.8619	0,853	98,998

	Polyme (%)	Dime (%)	Monome (%)
Hàm lượng	0,069	0,934	98,998

Fig. 10

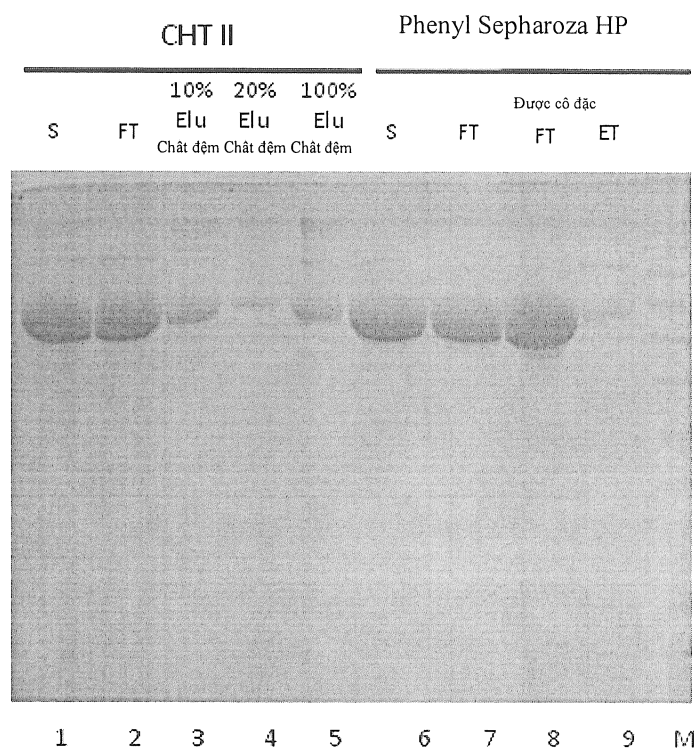
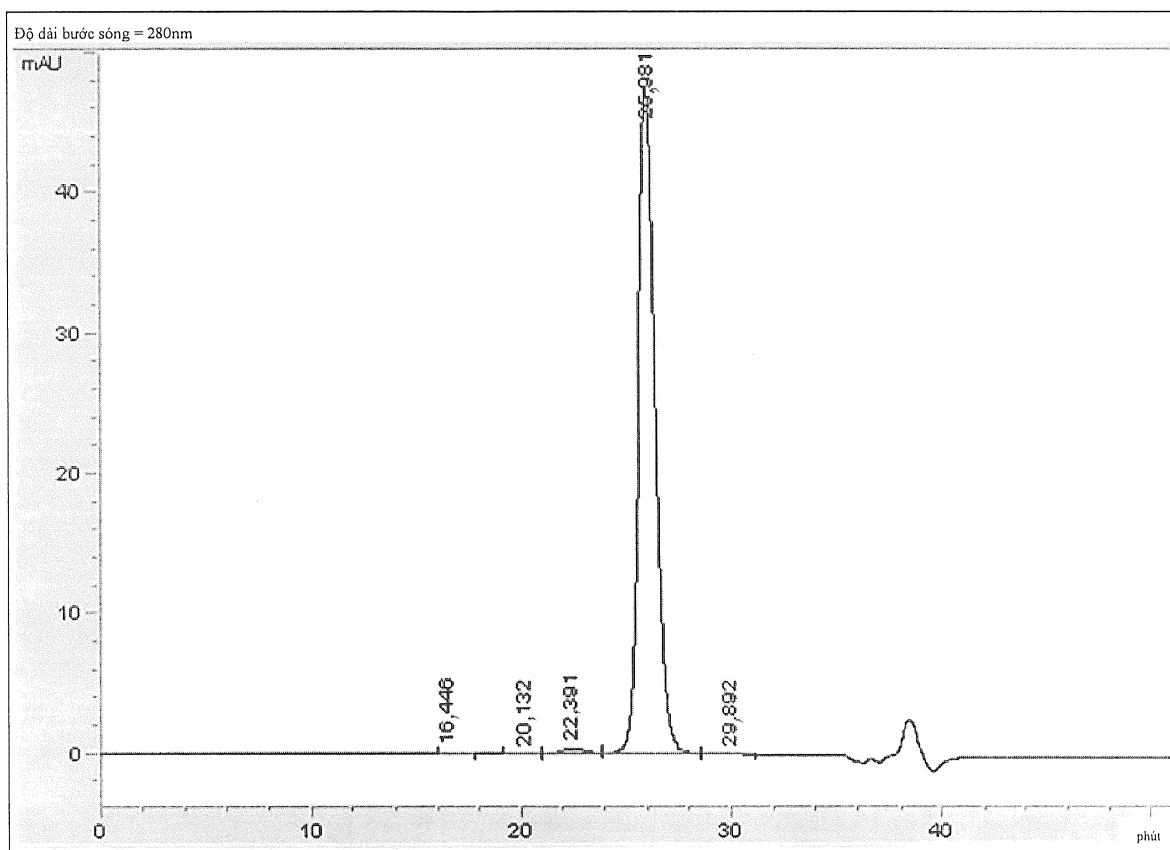


Fig. 11



#	Thời gian	Vùng	Chiều cao	Chiều rộng	Hệ số đối xứng	% Vùng
1	16,446	4	8,1E-2	0,8184	0,232	0,145
2	20,132	2,4	4,3E-2	0,9231	0,551	0,087
3	22,391	34,9	4,2E-1	1,3826	0,787	1,269
4	25,981	2704,6	47,6	0,9461	0,905	98,312
5	29,892	5,1	5,7E-2	15,025	1,82	0,187

	Polyme (%)	Dime (%)	Monome (%)
Hàm lượng	0,145	1,269	98,312

Fig. 12