



(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)



1-0025026

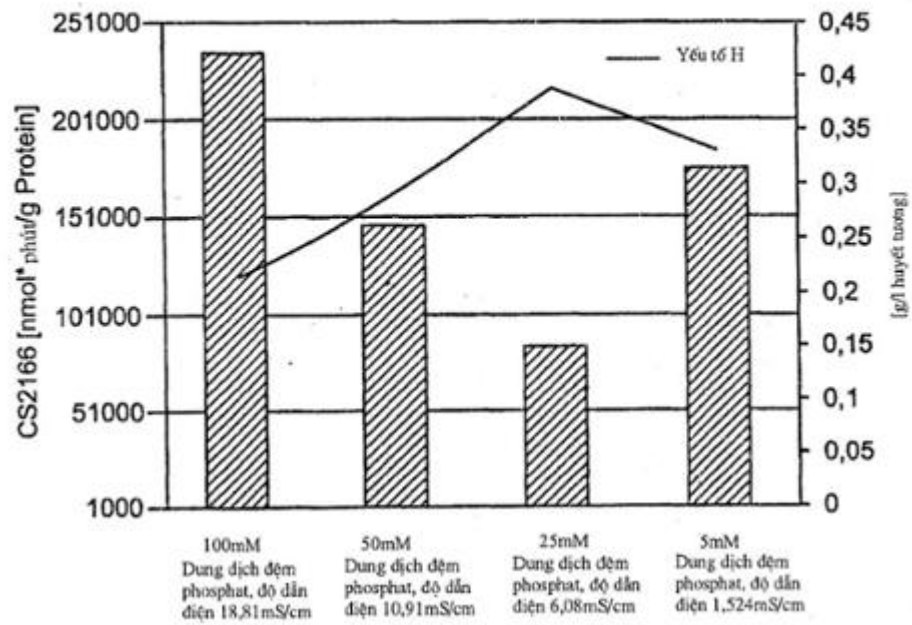
(51)⁷ A61K 9/08; A61K 47/18; C07K 16/00; (13) B
A61K 38/17; A61K 9/00

-
- (21) 1-2012-03905 (22) 26/05/2011
(86) PCT/US2011/038247 26/05/2011 (87) WO2011/150284 01/12/2011
(30) 2010202125 26/05/2010 AU; 12/789,365 27/05/2010 US; 12/842,944 23/07/2010 US
(45) 25/08/2020 389 (43) 27/05/2013 302A
(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) TESCHNER, Wolfgang (DE); SCHWARZ, Hans-Peter (AT); MADLENER, Ruth
(AT); SVATOS, Sonja (AT); PLJEVLJAKOVIC, Azra (AT); WEBER, Alfred (AT).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP LOẠI BỎ SERIN PROTEAZA BẰNG CÁCH XỬ LÝ BẰNG
SILIC ĐIOXIT NGHIỀN MỊN

(57) Sáng chế đề xuất các phương pháp mới để làm giảm hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp bào chế chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các chế phẩm lỏng nước và chế phẩm đông khô nhanh chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm để sử dụng trong điều trị bệnh, kiểm soát bệnh và/hoặc phòng ngừa bệnh.

Hệ dung dịch đệm phosphat: pH = 7,5



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bào chế chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm lỏng nước và chế phẩm đông khô nhanh chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm để sử dụng trong điều trị bệnh, kiểm bệnh và/hoặc phòng ngừa bệnh ở đối tượng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các sản phẩm máu thu được từ huyết tương được sử dụng không chỉ nhằm điều trị các bệnh về máu, mà cả các bệnh có nguồn gốc khác. Ví dụ, các sản phẩm globulin miễn dịch (immune globulin-IgG) từ huyết tương người được sử dụng lần đầu tiên vào năm 1952 để điều trị chứng suy giảm miễn dịch. Kể từ đó, chế phẩm chứa IgG được sử dụng một cách rộng rãi để điều trị ít nhất ba loại tình trạng bệnh lý chủ yếu: (1) các chứng suy giảm miễn dịch như chứng không có gama globulin huyết liên quan đến nhiễm sắc thể X, chứng giảm gama globulin huyết (chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát) và các tình trạng bệnh lý miễn dịch suy yếu mắc phải (chứng suy giảm miễn dịch thứ phát), dấu hiệu lượng kháng thể thấp; (2) các bệnh viêm và bệnh tự miễn; và (3) các bệnh nhiễm trùng cấp tính.

Tương tự, Yếu tố H được cho là tác nhân trị liệu hiệu quả đối với một vài bệnh ở người bao gồm chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (age-related macular degeneration-AMD), hội chứng huyết tán tăng ure máu (hemolytic uremic syndrome-aHUS) và bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng (membranoproliferative glomerulonephritis-MPGN). Cụ thể, mối quan hệ nhân quả giữa đa hình nucleotit đơn (single nucleotide polymorphism-

SNP) trong môđun protein kiểm soát bổ thể (complement control protein-CCP) 7 của Yếu tố H và chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) đã được xác định đặc điểm.

Các nghiên cứu đã cho thấy sự tương quan giữa việc giảm hàm lượng của protein ức chế inter-alpha (IaIp) trong huyết tương và tỷ lệ tử vong ở các bệnh nhân mắc bệnh nhiễm trùng máu nặng (xem: Lim et al., *J Infect Dis.* (2003) Sep 15;188(6):919-26 và Opal et al., *Crit Care Med.* (2007) Feb;35(2):387-92). Hơn thế nữa, một số nghiên cứu đã cho thấy việc dùng IaIp làm giảm tỷ lệ tử vong liên quan đến bệnh nhiễm trùng máu và sốc do nhiễm trùng máu (xem: Jourdain et al., *Am J Respir Crit Care Med.* (1997) Dec;156(6):1825-33; Yang et al., *Crit Care Med.* (2002) Mar;30(3):617-22; Lim et al., *J Infect Dis.* (2003) Sep 15;188(6):919-26; và Wu et al., *Crit Care Med.* (2004) Aug;32(8):1747-52; phần bộc lộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích).

Một số lưu ý về độ an toàn cần phải được quan tâm khi sản xuất và bào chế các chế phẩm sinh học thu được từ huyết tương. Các lưu ý này bao gồm các phương pháp loại bỏ và/hoặc làm bất hoạt các mầm bệnh có trong máu (ví dụ, các mầm bệnh là virus và vi khuẩn), hoạt tính kháng bổ thể và các tạp chất không mong muốn khác do việc sử dụng huyết tương của người cho. Các nghiên cứu đã khuyến cáo rằng việc dùng hoạt tính phân giải amit với hàm lượng cao có thể dẫn đến hiện tượng nghẽn mạch huyết khối không mong muốn (xem: Wolberg AS et al., *Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. Am J Hematol* 2000;65:30-34; và Alving BM et al., *Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. J Lab Clin Med* 1980; 96:334-346; phần bộc lộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích). Điểm đáng lo ngại nhất là việc rút giấy phép tự nguyện gần đây của chế phẩm octagam® (Octapharma) ở Hoa Kỳ và việc đình chỉ cấp phép lưu hành chế phẩm octagam® và chế phẩm octagam 10% bởi Ủy ban châu Âu sau khi gia tăng số lượng thông báo về hiện tượng nghẽn mạch huyết khối. Dường như chứng huyết khối tăng là do hàm lượng cao của hoạt tính phân giải amit trong các chế phẩm sinh học gây ra, do các tạp chất serin proteaza và tiền enzym serin proteaza, như Yếu tố XI, Yếu tố XIa, Yếu tố XII và Yếu tố XIIa gây ra

(Thông báo của Cơ quan quản lý dược phẩm Hoa Kỳ (FDA): Rút giấy phép lưu hành tự nguyện – 23 tháng 9 năm 2010 Chế phẩm dạng lỏng Octagam [Globulin miễn dịch dùng qua đường tĩnh mạch (người)] 5%; Octagam 50mg/ml, solution pour perfusion - Octapharma France - Mise en quarantaine de tous les lots, được công bố trực tuyến vào ngày 9 tháng 9 năm 2010 bởi AFSSAPS; và Questions and answers on the suspension of the marketing authorisations for Octagam (human normal immunoglobulin 5% and 10%), được công bố trực tuyến vào ngày 23 tháng 9 năm 2010 bởi Cơ quan quản lý dược phẩm châu Âu (European Medicines Agency)).

Các serin proteaza chuyên dụng, thường được biết là các yếu tố gây đông máu, là các thành phần không thể thiếu của cả quá trình hoạt hóa tiếp xúc và quá trình yếu tố mô bao gồm một loạt chu trình đông máu. Khi kích thích quá trình đông máu, các tiền enzym serin proteaza, là các tiền chất enzym không hoạt động, trở thành các proteaza được hoạt hoá có khả năng xúc tác cho quá trình hoạt hóa tiền enzym proteaza tiếp theo, để tạo ra một loạt chu trình hoạt hóa. Một loạt chu trình đông máu này lên đến cực điểm trong quá trình hoạt hóa Trombin (Yếu tố IIa) và Yếu tố XIIIa, mà lần lượt có chức năng chuyển hóa Fibrinogen (Yếu tố I) thành Fibrin (Yếu tố Ia) và liên kết chéo với fibrin để tạo ra cục fibrin.

Quá trình hoạt hóa tiếp xúc, còn được gọi là quá trình đông máu thực chất, bắt đầu với việc lần lượt hoạt hóa Kallikrein và Yếu tố XIIa (FXIIa) từ Prekallikrein và Yếu tố XII. Serin proteaza FXIIa được hoạt hoá sẽ phân cắt Yếu tố XI (FXI), chuyển hoá tiền enzym thành Yếu tố XIa (FXIa), là serin proteaza hoạt động tham gia vào quá trình hoạt hóa tiếp theo của Yếu tố Xa (FXa).

Do sự lo ngại ngày càng gia tăng về việc xuất hiện serin proteaza và các tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, trong lĩnh vực kỹ thuật này vẫn cần tìm ra các phương pháp làm giảm lượng các tạp chất này và cụ thể là FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Sáng chế đáp ứng được các yêu cầu này và các yêu cầu khác nữa bằng cách đề xuất các phương pháp nhằm mục đích đó và chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương chứa serin proteaza và tiền enzym serin proteaza với lượng thấp hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa trên việc bất ngờ phát hiện ra rằng các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza và cụ thể là FXI, FXIa, FXII và FXIIa, có thể được loại bỏ ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bằng cách xử lý bằng silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo khía cạnh này, sáng chế đề xuất các phương pháp làm giảm hoạt tính của serin proteaza, hàm lượng của serin proteaza và hàm lượng của tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương. Sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có tác dụng điều trị bệnh với hoạt tính của serin proteaza giảm, hàm lượng của serin proteaza giảm và hàm lượng của tiền enzym serin proteaza giảm, và chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo các phương án nhất định, phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo một phương án, bước làm giàu thứ nhất protein đích là bước làm kết tủa protein. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu. Theo một phương án khác, bước làm giàu thứ nhất protein đích là bước siêu lọc/lọc thẩm tách.

Theo các phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein đích trước khi cho chế phẩm đã được làm giàu này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo một phương án, bước làm giàu thứ hai protein đích là bước làm kết tủa protein. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa

protein là bước phân đoạn bằng rượu. Theo một phương án khác, bước làm giàu thứ hai protein đích là bước siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo phương án khác nữa, bước làm giàu thứ hai protein đích là bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký.

Theo các phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ ba protein đích sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo một phương án, bước làm giàu thứ ba protein đích là bước làm kết tủa protein. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu. Theo một phương án khác, bước làm giàu thứ ba protein đích là bước siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo phương án khác nữa, bước làm giàu thứ ba protein đích là bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký.

Theo các phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết protein đích thu được từ huyết tương; và (ii) rửa giải protein đích thu được từ huyết tương ra khỏi nhựa sắc ký. Theo phương án cụ thể, tạp chất không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i). Theo phương án cụ thể khác, tạp chất gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i), nhưng không được rửa giải ra khỏi nhựa sắc ký ở bước phụ (ii).

Theo các phương án cụ thể khác về phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một tạp chất; và (ii) tách nhựa này ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, trong đó protein đích thu được từ huyết tương không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i).

Theo các phương án nhất định về phương pháp này bao gồm bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký được mô tả trên đây, nhựa sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm nhựa trao đổi anion, nhựa trao đổi cation, nhựa tương tác kỵ nước, nhựa hỗn hợp, nhựa hydroxyapatit, nhựa ái lực phối tử, nhựa ái lực miễn dịch và nhựa sắc ký loại cỡ.

Theo các phương án cụ thể khác về phương pháp này bao gồm bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm việc tách ít nhất một tạp chất ra khỏi protein đích theo kích thước và/hoặc hình dạng bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký loại cỡ.

Theo các phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, protein đích thu được từ huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, protein của hệ bổ thể và chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I). Theo phương án cụ thể, protein của hệ bổ thể được chọn từ nhóm bao gồm Yếu tố H (FH), Yếu tố D, protein bổ thể C3 và protein gắn kết C4.

Theo phương án khác nữa về phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương là chất trung gian trong quy trình điều chế.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này; (c) rửa giải serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO₂ trong điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H vẫn được gắn kết; và (d) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO₂ và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 6,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO₂ và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 6,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO₂ và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO₂ và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH ít nhất khoảng 7,5.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 9,0.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện lớn hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện lớn hơn khoảng 20mS/cm. Theo một phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 50mS/cm. Theo phương án khác nữa về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 50mS/cm.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 trong điều kiện mà serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO_2 .

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 6,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 6,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin

proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ pH ít nhất khoảng 7,5.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 9,0.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện nhỏ hơn khoảng 20mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện nhỏ hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 20mS/cm. Theo phương án khác nữa về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H chứ không phải ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 .

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza bao gồm độ pH không lớn hơn khoảng 6,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch

trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza bao gồm độ pH không lớn hơn khoảng 6,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza bao gồm độ pH không lớn hơn khoảng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza bao gồm độ pH không bằng ít nhất khoảng 7,5.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 9,0.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không bao gồm độ dẫn điện lớn hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không bao gồm độ dẫn điện lớn hơn khoảng 20mS/cm. Theo một phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 50mS/cm. Theo phương án khác nữa về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 50mS/cm.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải Yếu tố H và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không

bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 6,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 6,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ pH lớn hơn khoảng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ pH bằng ít nhất khoảng 7,5.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch này bao gồm độ pH không lớn hơn 9,0.

Theo phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ dẫn điện nhỏ hơn khoảng 20mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ dẫn điện nhỏ hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án khác về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 20mS/cm. Theo phương án khác nữa về phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và Yếu tố H không bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) có hoạt tính của serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa I α I và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết I α I và ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; (c) rửa giải serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện mà I α I vẫn được gắn kết; và (d) rửa giải I α I ra khỏi SiO_2 .

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất phương pháp bảo chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin ($I\alpha I$) có hoạt tính của serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa $I\alpha I$ và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết $I\alpha I$ và ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải $I\alpha I$ ra khỏi SiO_2 trong điều kiện mà serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO_2 .

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất phương pháp bảo chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin ($I\alpha I$) có hoạt tính serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa $I\alpha I$ và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết $I\alpha I$ chứ không phải ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải $I\alpha I$ ra khỏi SiO_2 .

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất phương pháp bảo chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin ($I\alpha I$) có hoạt tính serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin ($I\alpha I$) và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết serin proteaza chứ không phải chất ức chế inter-alpha-trypsin ($I\alpha I$); và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này.

Theo các phương án nhất định của các khía cạnh được mô tả trên đây, chế phẩm này được cho tiếp xúc với SiO_2 với hàm lượng cuối cùng ít nhất là 1g SiO_2 /g protein. Theo một phương án khác của các khía cạnh được mô tả trên đây, chế phẩm này được cho tiếp xúc với SiO_2 với hàm lượng cuối cùng ít nhất là 2g SiO_2 /g protein. Theo một phương án khác của các khía cạnh được mô tả trên đây, chế phẩm này được cho tiếp xúc với SiO_2 với hàm lượng cuối cùng ít nhất là 2,5g SiO_2 /g protein.

Theo các phương án nhất định của các khía cạnh được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza này là Yếu tố XI. Theo một phương án khác của các khía cạnh được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza này là Yếu tố XIa. Theo một phương án khác của các khía cạnh được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền

enzym serin proteaza này là Yếu tố XII. Theo phương án khác nữa của các khía cạnh được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza này là Yếu tố XIIa.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương được bào chế theo quy trình là phương pháp làm giảm hoạt tính của serin proteaza theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh được mô tả trên đây. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng cho đối tượng. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch, trong cơ hoặc dưới da. Theo một phương án, chế phẩm này ở dạng dung dịch nước. Theo một phương án khác, chế phẩm này được làm đông khô nhanh.

Theo khía cạnh mười một, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương theo khía cạnh được mô tả trên đây để sử dụng trong điều trị bệnh liên quan đến hoạt tính khác thường của protein thu được từ huyết tương ở đối tượng. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, protein của hệ bổ thể và chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo khía cạnh mười hai, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H bao gồm các bước (a) cho phân đoạn kết tủa huyết tương chứa Yếu tố H đã được tạo huyền phù tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn, (b) rửa SiO₂ bằng đệm rửa có độ pH thấp và độ dẫn điện thấp và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ bằng đệm rửa giải có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện ít nhất là 10mS/cm. Theo các phương án cụ thể, phân đoạn kết tủa huyết tương chứa Yếu tố H là chất kết tủa chứa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann hoặc chất kết tủa B Kistler/Nitschmann. Theo các phương án nhất định, các phương pháp này còn bao gồm một hoặc nhiều bước bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm (d) kết tủa và loại bỏ ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải Yếu tố H, (e) kết tủa và thu hồi Yếu tố H từ chế phẩm đã được làm giàu này, (f) làm giàu thêm Yếu tố H bằng cách sắc ký trao đổi anion, (g) làm giàu thêm Yếu tố H bằng cách sắc ký ái lực heparin, (h) bước làm bất hoạt virus chuyên dụng và (i) cô đặc chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza đã được gắn kết, trong đó ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo một phương án, bước làm giàu thứ nhất protein đích là bước làm kết tủa protein. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu. Theo phương án cụ thể khác, bước làm giàu thứ nhất protein đích là bước siêu lọc/lọc thẩm tách.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein đích trước khi cho chế phẩm đã được làm giàu này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo một phương án, bước làm giàu thứ hai protein đích là bước làm kết tủa protein. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu. Theo một phương án, bước làm giàu thứ hai protein đích là bước siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo một phương án, bước làm giàu thứ hai protein đích là bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ ba protein đích sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo một phương án, bước làm giàu thứ ba protein đích là bước làm kết tủa protein. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu. Theo một phương án, bước làm giàu thứ ba protein đích là bước siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo một phương án, bước làm giàu thứ ba protein đích là bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được

từ huyết tương tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết protein đích thu được từ huyết tương; và (ii) rửa giải protein đích thu được từ huyết tương ra khỏi nhựa sắc ký. Theo một phương án cụ thể, ít nhất một tạp chất không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i). Theo phương án cụ thể khác, ít nhất một tạp chất gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i), nhưng không được rửa giải ra khỏi nhựa sắc ký ở bước phụ (ii).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một tạp chất; và (ii) tách nhựa này ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, trong đó protein đích thu được từ huyết tương không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, nhựa sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm nhựa trao đổi anion, nhựa trao đổi cation, nhựa tương tác kỵ nước, nhựa hỗn hợp, nhựa hydroxyapatit, nhựa ái lực phối tử, nhựa ái lực miễn dịch và nhựa sắc ký loại cỡ. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa trao đổi anion. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa trao đổi cation. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa tương tác kỵ nước. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa hỗn hợp. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa hydroxyapatit. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa ái lực phối tử. Theo một phương án, nhựa sắc ký là nhựa ái lực miễn dịch. Theo một phương án, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm việc tách ít nhất một tạp chất ra khỏi protein đích theo kích thước và/hoặc hình dạng bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký loại cỡ.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, protein đích thu được từ huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, protein của hệ bổ thể và chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I). Theo một phương án, protein thu được từ huyết tương là globulin miễn dịch (Ig). Theo một phương án, protein thu được từ huyết tương là albumin. Theo một phương án, protein thu được từ huyết tương là alpha-1-antitrypsin. Theo một phương án, protein thu được từ huyết tương là butyrylcholinesteraza. Theo một phương án, protein thu được từ huyết tương là protein của hệ bổ thể. Theo một phương án, protein của hệ bổ thể

được chọn từ nhóm bao gồm Yếu tố H (FH), Yếu tố D, protein bổ thể C3 và protein gắn kết C4. Theo một phương án, protein thu được từ huyết tương là chất ức chế inter-alpha-trypsin.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương là chất trung gian trong quy trình điều chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; (c) rửa giải serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch trong đó phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết; và (d) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 .

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nhỏ hơn 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 11mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 và độ dẫn điện nhỏ hơn 6mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 5mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH nhỏ hơn 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 11mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 và độ dẫn điện nhỏ hơn 6mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 5mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 bao gồm cường độ ion ít nhất 6mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 bao gồm cường độ ion ít nhất 11mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và cường độ ion nằm trong khoảng từ 4mS/cm đến 7mS/cm.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 trong điều kiện mà phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO_2 .

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nhỏ hơn 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 11mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5 và độ dẫn điện nhỏ hơn 6mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 5,0mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện ít nhất 11mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 4mS/cm đến 7mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 5mS/cm đến 6mS/cm.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H chứ không phải phân đoạn chủ yếu chứa ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 .

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện không lớn hơn 14mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 9mS/cm đến 14mS/cm.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không được gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện ít nhất 11mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không được gắn kết với SiO_2 bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 4mS/cm đến 7mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch này bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 5mS/cm đến 6mS/cm.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H; (b) rửa SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm

trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, dung dịch dùng để rửa SiO₂ có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, dung dịch dùng để rửa SiO₂ có độ pH bằng khoảng $6,0 \pm 0,2$.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm ban đầu chứa Yếu tố H là chất kết tủa phân đoạn II+III Cohn được tạo huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm ban đầu chứa Yếu tố H là chất kết tủa A Kistler/Nitschmann được tạo huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm ban đầu chứa Yếu tố H là chất kết tủa B Kistler/Nitschmann được tạo huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm kết tủa ít nhất một tạp chất từ dung dịch Yếu tố H thu hồi được, trong đó Yếu tố H không được kết tủa.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm kết tủa này là bước làm kết tủa bằng PEG.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm kết tủa bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, hàm lượng cuối cùng của PEG 4000 bằng $5 \pm 0,5\%$.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm kết tủa Yếu tố H ra khỏi dung dịch Yếu tố H thu hồi được.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm kết tủa này là bước làm kết tủa bằng PEG.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm kết tủa bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 15%.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, hàm lượng cuối cùng của PEG 4000 bằng $12 \pm 0,5\%$.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu Yếu tố H bằng kỹ thuật sắc ký.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm bước sắc ký trao đổi anion.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm bước sắc ký ái lực heparin.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm bước sắc ký trao đổi anion sau đó là bước sắc ký ái lực heparin.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm ít nhất một bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus chuyên dụng.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này bao gồm bước lọc nano.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước cô đặc chế phẩm chứa Yếu tố H bao gồm cả bước siêu lọc/lọc thẩm tách.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa I α I và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết I α I và ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này; (c) rửa giải serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO₂ trong điều kiện mà phân đoạn chủ yếu chứa I α I vẫn được gắn kết; và (d) rửa giải I α I ra khỏi SiO₂.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa I α I và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết I α I và ít nhất một serin proteaza; (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải I α I ra khỏi SiO₂ trong điều kiện mà phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO₂.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa I α I và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết I α I chứ không phải phân đoạn chủ yếu của ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải I α I ra khỏi SiO₂.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza

giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho dung dịch chứa chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I) và ít nhất một serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I); và (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm globulin miễn dịch G (IgG) có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước: (a) kết tủa phân đoạn huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu, 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 dịch nổi thứ nhất; (b) kết tủa IgG ra khỏi 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 lại huyền phù chất kết tủa thứ hai để tạo ra huyền phù; (d) cho huyền phù này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện dung dịch thích hợp để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (e) tách SiO₂ ra khỏi huyền phù này để tạo ra huyền phù đã được làm trong.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm các bước sau: (f) kết tủa IgG ra khỏi huyền phù đã được làm trong được tạo ra ở bước (e), ở bước làm kết tủa thứ ba, với một lượng rượu 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; (g) tạo lại huyền phù chất kết tủa thứ ba để tạo ra huyền phù; và (h) tách phân đoạn hoà tan ra khỏi huyền phù đã được tạo ra ở bước (e), nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa IgG đã được làm giàu.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu bằng phương pháp sắc ký trao đổi anion.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu bằng phương pháp sắc ký trao đổi cation.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm ít nhất một bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus chuyên dụng.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này bao gồm bước làm bất hoạt virus bằng dung môi/chất tẩy rửa (S/D).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này bao gồm bước lọc nano.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này bao gồm bước ủ ở độ pH thấp.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước (b) bao gồm việc điều chỉnh hàm lượng etanol của dịch nổi thứ nhất đã được tạo ra ở bước (a) đến 25% (thể tích/thể tích) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C .

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, nhiệt độ là khoảng -9°C .

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước (c) bao gồm việc tạo lại huyền phù chất kết tủa thu được ở bước (b) bằng đệm chứa phosphat và axetat, trong đó độ pH của đệm này được điều chỉnh bằng axit axetic bằng với lượng nằm trong khoảng từ 300ml đến 700ml trên mỗi 1000l đệm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước (d) bao gồm việc bổ sung SiO_2 đến hàm lượng cuối nằm trong khoảng từ 0,02 gam trên mỗi gam chất kết tủa đã được tạo ra ở bước (b) đến 0,06 gam trên mỗi gam chất kết tủa đã được tạo ra ở bước (b).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch thích hợp để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0 và độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 3mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,3.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2mS/cm.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước (e) bao gồm các bước phụ: (i) rửa thiết bị lọc ép bằng đệm chứa phosphat và axetat với lượng ít nhất bằng 3 lần thể tích chết của thiết bị lọc ép này, trong đó độ pH của đệm được điều chỉnh bằng axit axetic bằng với lượng nằm trong khoảng từ 50ml đến 200ml trên mỗi 1000L đệm, để tạo ra dung dịch rửa; và (ii) kết hợp dịch lọc thu được ở bước (f) với dung dịch rửa thu được ở bước (g), để tạo ra dung dịch.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, phương pháp này còn bao gồm bước phụ: (iii) xử lý dung dịch này bằng chất tẩy rửa.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, bước (h) còn bao gồm việc xử lý chế phẩm IgG đã được làm giàu bằng dung môi và chất tẩy rửa (S/D).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm IgG được làm giàu thu được ở bước (h) chứa ít nhất 85% hàm lượng IgG đo được trong phân đoạn huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu được dùng ở bước (a).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm IgG được làm giàu thu được ở bước (h) chứa ít nhất 90% hàm lượng IgG đo được trong phân đoạn huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu được dùng ở bước (a).

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được giảm ít nhất 90%.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được giảm ít nhất 95%.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được giảm ít nhất 98%.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được giảm ít nhất 99%.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là FXIa.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm này được cho tiếp xúc với SiO_2 với hàm lượng cuối cùng ít nhất là $1\text{g SiO}_2/\text{g protein}$.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm này được cho tiếp xúc với SiO_2 với hàm lượng cuối cùng ít nhất là $2\text{g SiO}_2/\text{g protein}$.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, chế phẩm này được cho tiếp xúc với SiO_2 với hàm lượng cuối cùng ít nhất là $2,5\text{g SiO}_2/\text{g protein}$.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XI.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XII.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa.

Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIIa.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm protein thu được từ huyết tương được bào chế theo quy trình bao gồm phương pháp làm giảm hoạt tính của serin proteaza theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

Theo phương án cụ thể của các chế phẩm được mô tả trên đây, chế phẩm này được bào chế để dùng cho đối tượng.

Theo phương án cụ thể của các chế phẩm được mô tả trên đây, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch, trong cơ hoặc dưới da.

Theo phương án cụ thể của các chế phẩm được mô tả trên đây, chế phẩm này là chế phẩm nước.

Theo phương án cụ thể của các chế phẩm được mô tả trên đây, chế phẩm này được là chế phẩm đông khô.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm protein thu được từ huyết tương theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 124 đến 128 để sử dụng trong điều trị bệnh liên quan đến hoạt tính khác thường của protein thu được từ huyết tương ở đối tượng. Theo một phương án, chế phẩm protein thu được từ huyết tương này được chọn trong số các protein thuộc nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, protein của hệ bổ thể và chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Tổng quan về sơ đồ quá trình phân đoạn huyết tương làm ví dụ.

Hình 2. Hàm lượng Yếu tố H trong các phân đoạn chọn lọc của quá trình phân đoạn protein thu được từ huyết tương ở quy mô công nghiệp, đo được bằng thử nghiệm ELISA

Hình 3. Minh họa Yếu tố H và hoạt tính phân giải amit (đo được bằng cách sử dụng cơ chất CS2166) được rửa giải ra khỏi SiO₂ trong điều kiện dung dịch với các độ dẫn điện khác nhau ở độ pH=7,5.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Giới thiệu

Do việc sử dụng rộng rãi các chế phẩm trị liệu protein máu thu được từ huyết tương, như các chế phẩm globulin miễn dịch, các yếu tố gây đông máu, các chất ức chế yếu tố gây đông máu và protein của hệ bổ thể, việc đảm bảo độ an toàn của các chế phẩm này là vô cùng quan trọng. Các mối lo ngại gần đây về hàm lượng phân giải amit của các chế phẩm này liên quan đến sự xuất hiện hiện tượng nghẽn mạch huyết khối ở bệnh nhân dùng chế phẩm protein thu được từ huyết tương, đã dẫn đến nhu cầu cấp bách trong lĩnh vực kỹ thuật này về phương pháp làm giảm các serin proteaza (ví dụ, FXIa và FXIIa) và các tiền enzym serin proteaza (ví dụ, FXI và FXII) trong quá trình sản xuất các chế phẩm sinh học này. Ưu điểm là, sáng chế dựa trên ít nhất một phần việc bất ngờ phát hiện ra rằng silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn có thể được sử dụng để gắn kết các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có mặt trong chế phẩm protein thu được từ huyết tương. Do vậy, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này để làm giảm hàm lượng các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza trong quá trình bào chế chế phẩm protein thu được từ huyết tương.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp bào chế dựa trên việc bất ngờ phát hiện ra rằng silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn có thể được sử dụng để loại bỏ một lượng đáng kể serin proteaza (ví dụ, FXIa và FXIIa) và tiền enzyme serin proteaza (ví dụ, FXI và FXII) ra khỏi các dung dịch protein thu được từ huyết tương. Do vậy, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này có thể được kết hợp một cách dễ dàng vào các quy trình bào chế hiện có, ví dụ, việc phân đoạn các mẫu huyết tương được gộp lại, tốt hơn là các mẫu huyết tương người, bằng etanol trong điều kiện lạnh (tổng quan xem: Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. Volume I: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317). Tuy nhiên, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này không bị giới hạn ở việc sử dụng chúng trong các phương pháp bào chế, bao gồm việc phân đoạn etanol. Các phương pháp khác để tinh chế protein thu được từ huyết tương cũng tương thích với các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, các phương pháp phân đoạn polyme (ví dụ, PEG) và sắc ký (ví dụ, phương pháp sắc ký trao đổi anion và/hoặc cation, phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch, phương pháp sắc ký loại cở, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, phương pháp sắc ký loại hỗn hợp và các phương pháp tương tự).

Hơn thế nữa, không giống các chế phẩm sinh học khác được tạo ra qua sự biểu hiện tái tổ hợp của các vector ADN ở các dòng tế bào vật chủ, protein thu được từ huyết tương được phân đoạn từ sự cho máu người và huyết tương. Do vậy, việc cung cấp các sản phẩm này không thể tăng lên bằng việc tăng dung lượng sản xuất một cách đơn thuần. Đúng hơn là lượng các sản phẩm máu có bán sẵn bị hạn chế bởi không sẵn có sự cung cấp thể cho máu và huyết tương. Nguyên nhân này dẫn đến sự thiếu nguồn huyết tương người thô sẵn có để bào chế các yếu tố máu thu được từ huyết tương mới ít có tiếng trên thị trường, bao gồm Yếu tố bổ thể H (CFH) và chất ức chế inter-alpha-trypsin protein (I α Ip).

Do việc thiếu huyết tương sẵn có để bào chế các sản phẩm thu được từ huyết tương mới, việc bào chế chúng phải được kết hợp vào khuôn khổ hiện có của các quy trình bào chế đã biết đối với các sản phẩm thu được từ huyết tương như globulin miễn dịch và albumin. Yếu tố H, được cho là có tác dụng điều trị bệnh hiệu quả đối với các bệnh AMD, aHUS và MPGN, bên cạnh các bệnh khác, là sản phẩm máu thu được từ huyết tương như

vậy mà đã thu hút được sự chú ý của các bác sĩ. Tuy nhiên, do các nguồn này chủ yếu phục vụ cho, ví dụ, việc bào chế globulin IgG gama, cần tìm ra các phương pháp bào chế Yếu tố H mà có thể đưa được vào sơ đồ sản xuất hiện có. Một vài phương pháp đã được đề xuất nhằm mục đích này, tuy nhiên, nhiều trong số các giải pháp được đề xuất đòi hỏi phải biến đổi sơ đồ sản xuất hiện có cho các sản phẩm có tiếng. Các thay đổi này sẽ đòi hỏi sự phê duyệt mới của các sản phẩm có tiếng và thậm chí có thể dẫn đến sự thay đổi các đặc điểm của các sản phẩm có tiếng này.

Ví dụ, WO 2007/066017 bộc lộ các phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H từ dịch nổi của chất kết tủa lạnh sâu. Phương pháp được bộc lộ này gồm việc chuẩn bị dịch nổi của chất kết tủa lạnh sâu, đưa dịch nổi này vào bước sắc ký trao đổi anion (AEC), đưa dòng thu được từ AEC vào bước sắc ký ái lực heparin (HAC), đưa nước rửa giải thu được từ HAC vào bước sắc ký trao đổi cation mạnh (CEC), đưa nước rửa giải thu được từ CEC vào bước sắc ký trao đổi anion mạnh (sAEC) và rửa giải Yếu tố H ra khỏi sAEC. Điều bất lợi là, dịch nổi của chất kết tủa lạnh sâu là các phân đoạn chất trung gian thông thường trong các quy trình bào chế nhiều sản phẩm máu thu được từ huyết tương quan trọng về mặt thương mại, bao gồm globulin IgG gama (IVIG và dưới da) và albumin. Việc đưa các phân đoạn này vào các bước sắc ký sẽ làm thay đổi dịch nổi của chất kết tủa lạnh sâu và có thể đòi hỏi các quy trình bào chế các sản phẩm máu nằm sau đã được thiết lập cần phải được làm thích ứng theo kiểu chưa biết. Ngoài việc cần phải xác nhận lại toàn bộ và có thể thiết kế lại các quy trình bào chế này, cũng cần phải có sự phê duyệt lại các quy trình bào chế này của các cơ quan cấp phép.

Tương tự, WO 2008/113589 bộc lộ các phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H từ huyết tương người. Cụ thể, công bố đơn này bộc lộ việc tinh chế Yếu tố H từ ba phân đoạn xử lý huyết tương đã biết, cụ thể là dịch nổi Phân đoạn I Cohn-Oncley, chất kết tủa Phân đoạn III Cohn-Oncley và phân đoạn chất kết tủa B Kistler/Nitschmann. Về phương pháp thứ nhất, WO 2008/113589 bộc lộ Yếu tố H có thể được loại bỏ ra khỏi dịch nổi Phân đoạn I Cohn-Oncley bằng cách bổ sung bước sắc ký ái lực heparin. Điều bất lợi là, dịch nổi Phân đoạn I Cohn-Oncley là chất trung gian phân đoạn thông thường trong các quy trình bào chế nhiều sản phẩm máu thu được từ huyết tương quan trọng về mặt thương

mại bao gồm globulin IgG gama (IVIG và dưới da) và albumin. Tương tự, nhiều quy trình bào chế globulin miễn dịch (ví dụ, IgG, IVIG, v.v.) không dựa vào bước làm kết tủa Phân đoạn III Cohn-Oncley hoặc kết tủa B Kistler/Nitschmann, ví dụ, dung dịch Gammagard® và Kiovig (do Baxter International Inc. cung cấp). Nhược điểm của việc đưa các bước bổ sung, như sắc ký ái lực heparin, bước làm kết tủa Phân đoạn III hoặc kết tủa B, vào sơ đồ sản xuất các sản phẩm máu có tiếng, như nêu trên, cũng cần phải xác nhận lại quy trình sản xuất, sự phê duyệt lại các quy trình bào chế từ các cơ quan có thẩm quyền và có thể cả hệ quả không dự đoán được về hiệu suất và/hoặc độ tinh khiết của các sản phẩm có tiếng này.

Do vậy, trong lĩnh vực kỹ thuật này vẫn cần tìm ra các phương pháp bào chế Yếu tố H không đòi hỏi việc sử dụng huyết tương đầu vào bổ sung hoặc việc thiết kế lại và phê duyệt lại các quy trình bào chế hiện có của các sản phẩm máu thu được từ huyết tương có ý nghĩa về mặt thương mại, như albumin và globulin IgG gama để dùng qua đường tĩnh mạch (IVIG) hoặc dưới da. Tốt hơn, nếu sáng chế ít nhất dựa trên một phần việc bất ngờ phát hiện ra rằng Yếu tố H, các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có thể được gắn kết một cách đồng thời với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn nhờ đó tách các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza ra khỏi protein đáng quan tâm thứ nhất không được gắn kết với (ví dụ, IgG) và sau đó nó được tách ra bằng cách rửa giải theo kiểu biệt hóa Yếu tố H và serin proteaza và các tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 . Tương tự, sáng chế ít nhất dựa trên một phần việc bất ngờ phát hiện ra rằng $\text{I}\alpha\text{Ip}$, các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có thể được gắn kết một cách đồng thời với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn và sau đó được tách ra bằng cách rửa giải theo kiểu biệt hóa $\text{I}\alpha\text{Ip}$ và serin proteaza và các tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 .

II. Định nghĩa

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “Yếu tố H” được dùng để chỉ thành phần protein theo quy trình bổ thể khác được mã hóa bằng gen yếu tố H bổ thể (ví dụ, CFH; NM000186; GeneID:3075; UniProt ID P08603; Ripoché et al., *Biochem. J.* 249:593-602(1988)). Yếu tố H được dịch mã thành 1.213 polypeptit tiền chất axit amin mà được xử lý bằng cách loại bỏ peptit tín hiệu gồm 18 axit amin để tạo ra protein Yếu tố H thuần thực (các axit amin từ 19 đến 1231). Yếu tố H được sử dụng trong bản mô tả sáng

chế bao hàm các thể biến dị tự nhiên, trình tự xen kẽ, dạng đồng chức năng hoặc thể đột biến bất kỳ của các protein mà có thể được phát hiện trong mẫu huyết tương, ví dụ, mẫu huyết tương người. Các ví dụ về Yếu tố H đột biến phát hiện được trong quần thể người bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, Y402H; V62I; R78G; R127L; Δ224; Q400K; C431S; T493R; C536R; I551T; R567G; C630W; C673S; C673Y; E850K; S890I; H893R; C915S; E936D; Q950H; Y951H; T956M; C959Y; W978C; N997T; V1007I; V1007L; A1010T; T1017I; Y1021F; C1043R; N1050Y; I1059T; Q1076R; R1078S; D1119G; V1134G; Y1142D; Q1143E; W1157R; C1163W; W1183L; W1183R; T1184R; L1189R; S1191L; G1194D; V1197A; E1198A; F1199S; R1210C; R1215G; R1215Q; YPTCAKR1225:1231FQS; và P1226S. Đã phát hiện ra rằng nhiều đột biến trong số các đột biến này liên quan đến nhiều bệnh và rối loạn bệnh lý bao gồm hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (atypical haemolytic uremic syndrome - aHUS), chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (age-related macular degeneration - AMD), bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng typ II (MPGNII), chứng thiếu hụt CFH và chứng khô màng đáy. Yếu tố H còn bao gồm các protein chứa các cải biến sau dịch mã. Ví dụ, tin rằng Yếu tố H được cải biến bằng N-acetylglucosamin (GlcNAc) ở các gốc 529, 718, 802, 822, 882, 911, 1029 và 1095.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “protein của chất ức chế inter-alpha” hoặc “IaIp” được dùng để chỉ họ bao gồm các chất ức chế proteaza của huyết tương bao gồm các polypeptit được mã hóa bằng một hoặc nhiều gen trong số gen tiền chất Alpha-1-microglobulin/bikunin (AMBP; UniGene ID:231948, bikunin polypeptit), gen chất ức chế Inter-alpha (globulin) H1 (ITIH1; UniGene ID:224173, polypeptit H1), gen chất ức chế Inter-alpha (globulin) H2 (ITIH2; UniGene ID:139782, polypeptit H2), gen chất ức chế Inter-alpha (globulin) H3 (ITIH3; UniGene ID:140017, polypeptit H3) hoặc gen chất ức chế Inter-alpha (globulin) H4 (glycoprotein nhạy Kallikrein huyết tương, polypeptit H4) (ITIH4; UniGene ID:3321613). Các chất ức chế proteaza IaIp làm ví dụ bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, IaI (bikunin, các polypeptit H1 và H2); PaI (bikunin và các polypeptit H3), IaLI (bikunin và các polypeptit H2), IaIH4P (polypeptit H4) và bikunin (Salier, J, et al., nêu trên).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu” được dùng để chỉ dịch nổi được tạo ra sau khi loại bỏ chất kết tủa lạnh sâu được tạo ra bởi việc làm tan giá huyết tương hoặc huyết tương được gộp lại ở nhiệt độ gần nhiệt độ đông lạnh, ví dụ, ở các nhiệt độ dưới khoảng 10°C, tốt hơn là ở nhiệt độ không lớn hơn 6°C. Trong ngữ cảnh của sáng chế, huyết tương có thể được dùng thay thế nhau với huyết tương thu hồi được (tức là huyết tương đã được tách ra khỏi máu toàn phần *ex vivo*) hoặc huyết tương nguồn (tức là huyết tương thu được bằng cách tách hồng cầu ra khỏi huyết tương). Việc làm kết tủa trong điều kiện lạnh sâu thường được thực hiện, ví dụ, bằng cách làm tan giá phần gộp huyết tương đã được làm đông lạnh trước đó, mà đã được thử nghiệm về độ an toàn và chất lượng, mặc dù huyết tương tươi cũng có thể được sử dụng. Sau khi kết thúc việc làm tan giá huyết tương đông lạnh ở nhiệt độ thấp, việc tách chất kết tủa lạnh sâu rã ra khỏi dịch nổi lỏng được thực hiện trong điều kiện lạnh (ví dụ, $\leq 6^{\circ}\text{C}$) bằng cách ly tâm hoặc lọc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nguồn dự trữ Cohn” được dùng để chỉ nguyên liệu ban đầu dùng để phân đoạn mẫu huyết tương hoặc nguồn dự trữ mẫu huyết tương. Nguồn dự trữ Cohn bao gồm huyết tương toàn phần, các mẫu huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu và nguồn dự trữ mẫu huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu mà có thể được cho qua bước xử lý sơ bộ hoặc không. Theo các phương án nhất định, nguồn dự trữ Cohn là mẫu huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu mà từ đó một hoặc nhiều yếu tố máu đã được loại bỏ ở bước tiền xử lý, ví dụ, hấp phụ vào pha rắn (ví dụ, nhôm hydroxit, silic đioxit nghiền mịn, v.v.) hoặc bước sắc ký (ví dụ, sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký ái lực heparin). Các yếu tố máu khác nhau bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, hoạt tính rẽ nhánh chất ức chế yếu tố tám (FEIBA), phức chứa Yếu tố IX, phần cô chứa Yếu tố VII hoặc phức chứa Antitrombin III, có thể được phân lập từ mẫu huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu để tạo ra nguồn dự trữ Cohn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bánh lọc Phân đoạn II+III” được dùng để chỉ pha rắn thu hồi được sau khi lọc hoặc ly tâm huyền phù bột nhão chứa Phân đoạn II+III Cohn-Oncoley hoặc dạng tương đương. Theo phương án được ưu tiên, huyền phù chứa Phân đoạn II+III sẽ được xử lý bằng chất hấp phụ, ví dụ, silic đioxit nghiền mịn,

để loại bỏ các tạp chất như lipit, fibrinogen, hoạt tính phân giải amit, hoạt tính prekallikren và lipoprotein. Theo phương án được ưu tiên khác, chất trợ lọc có thể được bổ sung vào huyền phù chứa Phân đoạn II+III trước khi ly tâm hoặc lọc. Theo phương án được ưu tiên nhất, huyền phù chứa Phân đoạn II+III sẽ được xử lý bằng cả chất hấp phụ và chất trợ lọc trước khi ly tâm hoặc lọc. Khi tách dịch nổi của huyền phù chứa Phân đoạn II+III đã được làm trong, vật liệu của pha rắn thu hồi được được coi là bánh lọc chứa Phân đoạn II+III.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “silic đioxit nghiền mịn” hoặc “đioxit silic nghiền mịn” được dùng để chỉ oxit của silic có công thức SiO_2 , sản xuất được theo cách cho phép hấp phụ Yếu tố H lên bề mặt của nó. Các dạng làm ví dụ của silic đioxit nghiền mịn thích hợp để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, silic oxit dạng khối, silic oxit sinh nhiệt, Aerosil®, Cab-O-Sil™, silic oxit dạng keo, diatomit và các dạng tương tự. Theo phương án được ưu tiên, các sản phẩm silic oxit dạng khối ưa nước thương mại được sử dụng cho các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Các ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về các sản phẩm này bao gồm các sản phẩm được Evonik Industries bán trên thị trường dưới tên thương mại Aerosil® (ví dụ, Aerosil 90, Aerosil 130, Aerosil 150, Aerosil 200, Aerosil 300, Aerosil 380, Aerosil OX 50, Aerosil EG 50, Aerosil TT 600, Aerosil 200 SP, Aerosil 300 SP và Aerosil 300/30).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh hoặc rối loạn liên quan đến chứng loạn chức năng Yếu tố H” được dùng để chỉ bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ ở đối tượng được gây ra bởi, được đặc trưng bởi hoặc dẫn đến việc làm giảm mức hoạt tính Yếu tố H ở đối tượng này. Nhằm các mục đích của sáng chế, hoạt tính Yếu tố H có thể được dùng để chỉ khả năng của Yếu tố H gắn kết protein hoặc phối tử, ví dụ, C3b, C3bBb, C3b2Bb, csbC3b, yếu tố bổ thể B (CFB), protein phản ứng C, tế bào màng trong, glycosaminoglycan (GAGs) hoặc theo cách khác, có thể được dùng để chỉ hoạt tính đồng yếu tố Yếu tố I của nó hoặc khả năng của nó để thúc đẩy sự phân ly không thuận nghịch của C3bBb và C3b2Bb. Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến chứng loạn chức năng Yếu tố H tạo ra chứng thiếu hụt C3 và dễ bị các bệnh nhiễm khuẩn. Trong một số trường hợp, các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến chứng loạn chức năng Yếu tố H bao

gồm các tình trạng bệnh lý được gây ra bởi hoặc có liên quan đến sự đột biến và hiện tượng đa hình của Yếu tố H mã hoá gen CFH (để tham khảo, xem: Barlow et al., *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:117-42, phần mô tả toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích). Các bệnh liên quan đến sự đột biến hoặc hiện tượng đa hình trong gen CFH bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, chứng thiếu hụt Yếu tố H, hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (atypical haemolytic uremic syndrome - aHUS), chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (age-related macular degeneration - AMD), bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng typ II (membranoproliferative glomerulonephritis type II - MPGNII; de Cordoba and de Jorge, *Clinical and Experimental Immunology* 151, 1–13 (2008)), chứng nhồi máu cơ tim (Kardys et al., *Journal of American College of Cardiology* 47, 1568–1575 (2006); Mooijaart et al., *Experimental Gerontology* 42, 1116–1122 (2007); Nicaud et al., *Journal of Molecular Medicine* 85, 771–775 (2007); Pai et al., *European Heart Journal* 28, 1297–1303 (2007); Stark et al., *Clinical Science (Lond)* 113, 213–218 (2007)), bệnh tim mạch vành/bệnh động mạch vành (coronary heart disease/coronary artery disease - CAD/CHD; (Meng et al., *BMC Medical Genetics* 8, 62 (2007); Pulido et al., *Mayo Clinic Proceedings* 82, 301–307 (2007); Topol et al., *Human Molecular Genetics* 15 Spec No 2, R117–R123 (2006)) và bệnh Alzheimer (Hamilton et al., *Neuromolecular Medicine* 9, 331–334 (2007); Zetterberg et al., *American Journal of Ophthalmology* 143, 1059–1060 (2007)). Toàn bộ nội dung phần mô tả của các tài liệu tham khảo nêu trên mô tả sự kết hợp giữa sự đột biến và hiện tượng đa hình trong gen CFH và các bệnh liên quan đến chứng loạn chức năng Yếu tố H được đưa vào đây bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh hoặc rối loạn liên quan đến hoạt tính bổ thể theo quá trình thay thế khác thường” được dùng để chỉ bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý do sự hoạt hóa không kiểm soát được hoặc khác thường theo quy trình bổ thể thay thế gây ra. Nói chung, sự hoạt hóa không kiểm soát được hoặc khác thường của quy trình bổ thể thay thế có thể dẫn đến tổn thương bên ngoài các tế bào và mô vật chủ, cũng như sự suy kiệt C3 và dễ mắc các bệnh nhiễm trùng gây bệnh tương ứng (ví dụ, nấm, vi khuẩn, virus và sinh vật đơn bào). Các ví dụ về các bệnh và rối loạn liên quan đến quy trình hoạt hóa bổ thể thay thế khác thường bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, các bệnh tự miễn khác nhau (như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh thận IgA, bệnh hen, bệnh luput

ban đỏ hệ thống, bệnh đa xơ cứng, hội chứng kháng phospholipit, bệnh viêm mạch liên quan đến ANCA, bệnh bong nước, bệnh viêm màng bồ đào, bệnh nhược cơ, bệnh viêm tuyến giáp Hashimoto), các bệnh về thận (như bệnh thận IgA, hội chứng tan huyết tăng ure máu, bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng), các bệnh khác như bệnh hen, bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa điểm vàng ở người trưởng thành, chứng huyết cầu tố niệu kịch phát về đêm, chứng phình động mạch chủ bụng, bệnh thiếu máu cục bộ và bệnh nhiễm khuẩn.

Thuật ngữ “siêu lọc (ultrafiltration - UF)” được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm các phương pháp lọc bằng màng, trong đó áp suất thủy tĩnh đẩy chất lỏng đi qua màng bán thấm. Các chất rắn được tạo huyền phù và chất tan có phân tử lượng cao được giữ lại, trong khi nước và các chất tan có phân tử lượng thấp đi qua màng này. Quy trình tách này thường được sử dụng để tinh chế và cô đặc các dung dịch đại phân tử (10^3Da - 10^6Da), đặc biệt là các dung dịch protein. Số lượng màng siêu lọc sẵn có tùy thuộc vào kích thước của các phân tử mà chúng sẽ giữ lại. Quá trình siêu lọc thường được đặc trưng bởi kích thước lỗ màng nằm trong khoảng từ 1kDa đến 1000kDa và áp suất vận hành nằm trong khoảng từ $0,01\text{ba}$ đến 10ba (1kPa đến 10kPa).

Thuật ngữ "lọc thẩm tách" được dùng trong bản mô tả này để chỉ quy trình được thực hiện bằng màng giống hoặc tương tự như siêu lọc và thường được thực hiện theo kiểu lọc dòng tiếp tuyến. Trong quá trình lọc thẩm tách, đệm được đưa vào bể tái chế trong khi dịch lọc được loại bỏ ra khỏi thiết bị vận hành. Trong các quy trình mà sản phẩm (ví dụ, Yếu tố H) được giữ lại trong đó, thì phương pháp lọc thẩm tách là đặc biệt hữu ích để tách protein ra khỏi các phân tử nhỏ, như đường và muối. Trong các trường hợp nhất định, phương pháp lọc thẩm tách có thể được áp dụng để trao đổi dung dịch, đệm hoặc các thành phần riêng biệt của hệ đệm.

Thuật ngữ "trộn" được sử dụng trong bản mô tả này mô tả hoạt động gây ra sự phân bố đều của hai hoặc nhiều hợp chất hoặc chất khác nhau trong dung dịch hoặc huyền phù bằng cách khuấy bất kỳ. Sự phân bố đều hoàn toàn của tất cả các thành phần trong dung dịch hoặc huyền phù là không cần thiết do bước “trộn” với nghĩa này được sử dụng trong bản mô tả sáng chế.

Thuật ngữ "dung môi" được sử dụng 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.. Như được sử dụng trong thuật ngữ "xử lý bằng chất tẩy rửa dung môi", thì dung môi biểu thị dung môi hữu cơ (ví dụ, tri-N-butyl phosphat), là một phần của hỗn hợp tẩy rửa dung môi 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 sáng chế có thể 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 là các amphiphil, tức 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 hòa tan trong cả dung môi hữu cơ và nước. Chất hoạt động bề mặt có thể được phân loại dựa trên 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 nói chung 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 biết đến là natri lauryl ete sulfat, hoặc SLES), alkyl benzen sulfonat; cation (trên cơ sở các cation amoni bậc bốn): xetyl trimetylamon bromua (CTAB) còn được gọi là hexadecyl trimetyl amoni bromua, và các muối alkyltrimetylamon khác, xetylpyridinium clorua (CPC), amin thu được từ mỡ động vật được polyetoxyl hoá (POEA), benzalkoni clorua (BAC), benzethoni clorua (BZT); axit béo mạch dài và muối của chúng: bao gồm caprylat, axit caprylic, heptanoat, axit hexanoic, axit heptanoic, axit nanoic, axit decanoic, và các axit tương tự; ion lưỡng tính (lưỡng tính): dodecyl 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, bao gồm octyl glucosit, dexyl maltosit, rượu béo (ví dụ, rượu xetylic và rượu

oleylic), cocamit MEA, cocamit DEA, polysorbat (Tween 20, Tween 80, v.v.), chất tẩy rửa Triton, và đodexyl dimetylamin oxit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lượng hoặc liều có hiệu quả điều trị" hoặc "lượng hoặc liều thích đáng/hữu hiệu" được dùng để chỉ liều tạo ra tác dụng mà nhờ đó nó được dùng. Liều chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị bệnh, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết rõ bằng cách sử 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; toàn bộ nội dung phần mô tả của các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích).

Thuật ngữ "phun" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ biện pháp phân phối chất lỏng vào hệ thống, ví dụ, ở bước làm kết tủa bằng rượu, như bước làm kết tủa phân đoạn I hoặc II+III Cohn, ở dạng các giọt chất lỏng cực nhỏ hoặc dạng phun mù. Việc phun có thể đạt được bằng thiết bị áp lực 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 tạo ra chất lỏng ở dạng phun mù cực mịn. Nói chung, việc phun được thực hiện trong khi thiết bị tiếp nhận chất lỏng được khuấy liên tục hoặc theo cách khác được trộn để đảm bảo sự phân bố nhanh và đều của chất lỏng trong thiết bị này.

Thuật ngữ "khoảng" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ phạm vi gần đúng bao gồm cộng hoặc trừ 10% trị số quy định. Ví dụ, cụm từ "khoảng 20%" bao hàm các trị số nằm trong khoảng từ 18% đến 22%. Như được sử dụng trong bản mô tả này, khoảng còn bao gồm lượng chính xác. Do đó, cụm từ "khoảng 20%" có nghĩa là các trị số "khoảng 20%" và cả trị số bằng "20%". Thuật ngữ "khoảng" được dùng để chỉ các trị số nằm trong khoảng bằng hoặc gần bằng trị số quy định.

Các thuật ngữ "liều" và "liều lượng" được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này. Liều được dùng để chỉ lượng hoạt chất được dùng cho mỗi cá thể vào mỗi lần dùng. Liều này thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm tần suất dùng; thể trọng và độ dung nạp của các cá thể; mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh; nguy cơ gây ra tác dụng phụ;

và đường dùng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết rằng liệu này có thể được thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên hoặc dựa trên sự tiến triển của việc điều trị bệnh. Thuật ngữ “dạng liệu” được dùng để chỉ dạng dược phẩm cụ thể và phụ thuộc vào đường dùng. Ví dụ, dạng liệu có thể ở dạng lỏng, ví dụ, dung dịch nước muối để tiêm.

Thuật ngữ “phòng ngừa” được dùng trong bản mô tả này để chỉ khả năng làm giảm hoặc làm giảm được tần suất xuất hiện của các triệu chứng do tình trạng bệnh lý liên quan đến sự suy giảm chức năng hoặc chứng loạn chức năng của protein máu.

Các thuật ngữ “trị liệu”, “điều trị”, và “làm thuyên giảm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc giảm bất kỳ về mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng do tình trạng bệnh lý liên quan đến sự suy giảm chức năng hoặc chứng loạn chức năng của protein máu. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị” và “phòng ngừa” không được dùng làm thuật ngữ tuyệt đối. Việc điều trị có thể là việc làm chậm bất kỳ sự khởi phát, làm thuyên giảm các triệu chứng, cải thiện khả năng sống sót của bệnh nhân, tăng thời gian hoặc tỷ lệ sống sót, v.v.. Tác dụng của việc điều trị bệnh có thể được so sánh với một cá thể hoặc một nhóm cá thể không được điều trị bệnh.

Thuật ngữ “phân đoạn chủ yếu” được dùng trong bản mô tả này để chỉ lượng ít nhất 10% quần thể protein cụ thể trong chế phẩm. Ví dụ, khi đề cập đến phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza trong chế phẩm, phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza này tương ứng với ít nhất 10% lượng serin proteaza có mặt trong chế phẩm này. Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% lượng quần thể protein cụ thể trong chế phẩm. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% lượng quần thể protein cụ thể trong chế phẩm. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% lượng quần thể protein cụ thể trong chế phẩm. Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% lượng quần thể protein cụ thể trong chế phẩm hoặc lượng quần thể protein cụ thể trong chế phẩm ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn.

III. Làm giảm hàm lượng serin proteaza và tiền enzym serin proteaza

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương bằng cách gắn kết serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza vào silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn và tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng Yếu tố XI trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố XI; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ Yếu tố XI đã được gắn kết.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng Yếu tố XIa trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố XIa; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ Yếu tố XIa đã được gắn kết.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng Yếu tố XII trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố XII; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ Yếu tố XII đã được gắn kết.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng Yếu tố XIIa trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các

bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố XIIa; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ Yếu tố XIIa đã được gắn kết.

Theo các phương án nhất định, phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein đích được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất bằng cách làm kết tủa một phần protein trong nguyên liệu ban đầu thu được từ huyết tương được gộp lại; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo một phương án, bước kết tủa một phần được thực hiện bằng cách sử dụng rượu. Theo phương án được ưu tiên, rượu là etanol. Theo phương án được ưu tiên khác, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất bằng cách siêu lọc và/hoặc lọc thẩm tách nguyên liệu ban đầu thu được từ huyết tương được gộp lại; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn

kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất bằng cách cho nguyên liệu ban đầu thu được từ huyết tương được gộp lại tiếp xúc với nhựa sắc ký; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo các phương án nhất định, nhựa sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm nhựa trao đổi anion, nhựa trao đổi cation, nhựa tương tác kỵ nước, nhựa hỗn hợp, nhựa hydroxyapatit, nhựa ái lực phối tử, nhựa ái lực miễn dịch và nhựa sắc ký loại cỡ. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein đích để tạo ra chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein đích được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong protein đích thu được từ huyết tương phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) làm giàu protein đích thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên,

serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Bảng 1. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai.

		Bước làm giàu thứ nhất*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ hai	Ppt	Var. 1	Var. 11	Var. 21	Var. 31	Var. 41	Var. 51	Var. 61	Var. 71	Var. 81	Var. 91
	UF/DF	Var. 2	Var. 12	Var. 22	Var. 32	Var. 42	Var. 52	Var. 62	Var. 72	Var. 82	Var. 92
	AEC	Var. 3	Var. 13	Var. 23	Var. 33	Var. 43	Var. 53	Var. 63	Var. 73	Var. 83	Var. 93
	CEC	Var. 4	Var. 14	Var. 24	Var. 34	Var. 44	Var. 54	Var. 64	Var. 74	Var. 84	Var. 94
	HIC	Var. 5	Var. 15	Var. 25	Var. 35	Var. 45	Var. 55	Var. 65	Var. 75	Var. 85	Var. 95
	HAC	Var. 6	Var. 16	Var. 26	Var. 36	Var. 46	Var. 56	Var. 66	Var. 76	Var. 86	Var. 96
	MMC	Var. 7	Var. 17	Var. 27	Var. 37	Var. 47	Var. 57	Var. 67	Var. 77	Var. 87	Var. 97
	LAC	Var. 8	Var. 18	Var. 28	Var. 38	Var. 48	Var. 58	Var. 68	Var. 78	Var. 88	Var. 98
	IAC	Var. 9	Var. 19	Var. 29	Var. 39	Var. 49	Var. 59	Var. 69	Var. 79	Var. 89	Var. 99
	SEC	Var. 10	Var. 20	Var. 30	Var. 40	Var. 50	Var. 60	Var. 70	Var. 80	Var. 90	Var. 100

* Ppt: Kết tủa

UF/DF: Siêu lọc/Lọc thẩm tách

AEC: phương pháp sắc ký trao đổi anion

CEC: phương pháp sắc ký trao đổi cation

HIC: phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước

HAC: phương pháp sắc ký hydroxyapatit

MMC: phương pháp sắc ký loại hỗn hợp

LAC: phương pháp sắc ký ái lực phối tử

IAC: phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch

SEC: phương pháp sắc ký loại cỡ

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu protein đích sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu protein đích được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong protein đích thu được từ huyết tương phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (d) làm giàu protein đích thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Tương tự, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) làm giàu protein đích thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (e) làm giàu protein đích thứ ba để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ ba. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu

tổ XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 101 đến Var. 1100, nêu trong các Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 10 hoặc Bảng 11.

Bảng 2. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước làm giàu chất kết tủa thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 101	Var. 111	Var. 121	Var. 131	Var. 141	Var. 151	Var. 161	Var. 171	Var. 181	Var. 191
	UF/DF	Var. 102	Var. 112	Var. 122	Var. 132	Var. 142	Var. 152	Var. 162	Var. 172	Var. 182	Var. 192
	AEC	Var. 103	Var. 113	Var. 123	Var. 133	Var. 143	Var. 153	Var. 163	Var. 173	Var. 183	Var. 193
	CEC	Var. 104	Var. 114	Var. 124	Var. 134	Var. 144	Var. 154	Var. 164	Var. 174	Var. 184	Var. 194
	HIC	Var. 105	Var. 115	Var. 125	Var. 135	Var. 145	Var. 155	Var. 165	Var. 175	Var. 185	Var. 195
	HAC	Var. 106	Var. 116	Var. 126	Var. 136	Var. 146	Var. 156	Var. 166	Var. 176	Var. 186	Var. 196
	MMC	Var. 107	Var. 117	Var. 127	Var. 137	Var. 147	Var. 157	Var. 167	Var. 177	Var. 187	Var. 197
	LAC	Var. 108	Var. 118	Var. 128	Var. 138	Var. 148	Var. 158	Var. 168	Var. 178	Var. 188	Var. 198
	IAC	Var. 109	Var. 119	Var. 129	Var. 139	Var. 149	Var. 159	Var. 169	Var. 179	Var. 189	Var. 199
	SEC	Var. 110	Var. 120	Var. 130	Var. 140	Var. 150	Var. 160	Var. 170	Var. 180	Var. 190	Var. 200

* Giống Bảng 1.

Bảng 3. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước siêu lọc/lọc thẩm tách thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 201	Var. 211	Var. 221	Var. 231	Var. 241	Var. 251	Var. 261	Var. 271	Var. 281	Var. 291
	UF/DF	Var. 202	Var. 212	Var. 222	Var. 232	Var. 242	Var. 252	Var. 262	Var. 272	Var. 282	Var. 292
	AEC	Var. 203	Var. 213	Var. 223	Var. 233	Var. 243	Var. 253	Var. 263	Var. 273	Var. 283	Var. 293
	CEC	Var. 204	Var. 214	Var. 224	Var. 234	Var. 244	Var. 254	Var. 264	Var. 274	Var. 284	Var. 294
	HIC	Var. 205	Var. 215	Var. 225	Var. 235	Var. 245	Var. 255	Var. 265	Var. 275	Var. 285	Var. 295
	HAC	Var. 206	Var. 216	Var. 226	Var. 236	Var. 246	Var. 256	Var. 266	Var. 276	Var. 286	Var. 296

	MMC	Var. 207	Var. 217	Var. 227	Var. 237	Var. 247	Var. 257	Var. 267	Var. 277	Var. 287	Var. 297
	LAC	Var. 208	Var. 218	Var. 228	Var. 238	Var. 248	Var. 258	Var. 268	Var. 278	Var. 288	Var. 298
	IAC	Var. 209	Var. 219	Var. 229	Var. 239	Var. 249	Var. 259	Var. 269	Var. 279	Var. 289	Var. 299
	SEC	Var. 210	Var. 220	Var. 230	Var. 240	Var. 250	Var. 260	Var. 270	Var. 280	Var. 290	Var. 300

* Giống Bảng 1.

Bảng 4. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký trao đổi anion thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 301	Var. 311	Var. 321	Var. 331	Var. 341	Var. 351	Var. 361	Var. 371	Var. 381	Var. 391
	UF/DF	Var. 302	Var. 312	Var. 322	Var. 332	Var. 342	Var. 352	Var. 362	Var. 372	Var. 382	Var. 392
	AEC	Var. 303	Var. 313	Var. 323	Var. 333	Var. 343	Var. 353	Var. 363	Var. 373	Var. 383	Var. 393
	CEC	Var. 304	Var. 314	Var. 324	Var. 334	Var. 344	Var. 354	Var. 364	Var. 374	Var. 384	Var. 394
	HIC	Var. 305	Var. 315	Var. 325	Var. 335	Var. 345	Var. 355	Var. 365	Var. 375	Var. 385	Var. 395
	HAC	Var. 306	Var. 316	Var. 326	Var. 336	Var. 346	Var. 356	Var. 366	Var. 376	Var. 386	Var. 396
	MMC	Var. 307	Var. 317	Var. 327	Var. 337	Var. 347	Var. 357	Var. 367	Var. 377	Var. 387	Var. 397
	LAC	Var. 308	Var. 318	Var. 328	Var. 338	Var. 348	Var. 358	Var. 368	Var. 378	Var. 388	Var. 398
	IAC	Var. 309	Var. 319	Var. 329	Var. 339	Var. 349	Var. 359	Var. 369	Var. 379	Var. 389	Var. 399
	SEC	Var. 310	Var. 320	Var. 330	Var. 340	Var. 350	Var. 360	Var. 370	Var. 380	Var. 390	Var. 400

* Giống Bảng 1.

Bảng 5. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký trao đổi cation thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 401	Var. 411	Var. 421	Var. 431	Var. 441	Var. 451	Var. 461	Var. 471	Var. 481	Var. 491
	UF/DF	Var. 402	Var. 412	Var. 422	Var. 432	Var. 442	Var. 452	Var. 462	Var. 472	Var. 482	Var. 492
	AEC	Var. 403	Var. 413	Var. 423	Var. 433	Var. 443	Var. 453	Var. 463	Var. 473	Var. 483	Var. 493
	CEC	Var. 404	Var. 414	Var. 424	Var. 434	Var. 444	Var. 454	Var. 464	Var. 474	Var. 484	Var. 494
	HIC	Var. 405	Var. 415	Var. 425	Var. 435	Var. 445	Var. 455	Var. 465	Var. 475	Var. 485	Var. 495

	HAC	Var. 406	Var. 416	Var. 426	Var. 436	Var. 446	Var. 456	Var. 466	Var. 476	Var. 486	Var. 496
	MMC	Var. 407	Var. 417	Var. 427	Var. 437	Var. 447	Var. 457	Var. 467	Var. 477	Var. 487	Var. 497
	LAC	Var. 408	Var. 418	Var. 428	Var. 438	Var. 448	Var. 458	Var. 468	Var. 478	Var. 488	Var. 498
	IAC	Var. 409	Var. 419	Var. 429	Var. 439	Var. 449	Var. 459	Var. 469	Var. 479	Var. 489	Var. 499
	SEC	Var. 410	Var. 420	Var. 430	Var. 440	Var. 450	Var. 460	Var. 470	Var. 480	Var. 490	Var. 500

* Giống Bảng 1.

Bảng 6. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp phương pháp thứ nhất sắc ký tương tác kỵ nước bước, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 501	Var. 511	Var. 521	Var. 531	Var. 541	Var. 551	Var. 561	Var. 571	Var. 581	Var. 591
	UF/DF	Var. 502	Var. 512	Var. 522	Var. 532	Var. 542	Var. 552	Var. 562	Var. 572	Var. 582	Var. 592
	AEC	Var. 503	Var. 513	Var. 523	Var. 533	Var. 543	Var. 553	Var. 563	Var. 573	Var. 583	Var. 593
	CEC	Var. 504	Var. 514	Var. 524	Var. 534	Var. 544	Var. 554	Var. 564	Var. 574	Var. 584	Var. 594
	HIC	Var. 505	Var. 515	Var. 525	Var. 535	Var. 545	Var. 555	Var. 565	Var. 575	Var. 585	Var. 595
	HAC	Var. 506	Var. 516	Var. 526	Var. 536	Var. 546	Var. 556	Var. 566	Var. 576	Var. 586	Var. 596
	MMC	Var. 507	Var. 517	Var. 527	Var. 537	Var. 547	Var. 557	Var. 567	Var. 577	Var. 587	Var. 597
	LAC	Var. 508	Var. 518	Var. 528	Var. 538	Var. 548	Var. 558	Var. 568	Var. 578	Var. 588	Var. 598
	IAC	Var. 509	Var. 519	Var. 529	Var. 539	Var. 549	Var. 559	Var. 569	Var. 579	Var. 589	Var. 599
	SEC	Var. 510	Var. 520	Var. 530	Var. 540	Var. 550	Var. 560	Var. 570	Var. 580	Var. 590	Var. 600

* Giống Bảng 1.

Bảng 7. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký hydroxyapatit thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 601	Var. 611	Var. 621	Var. 631	Var. 641	Var. 651	Var. 661	Var. 671	Var. 681	Var. 691
	UF/DF	Var. 602	Var. 612	Var. 622	Var. 632	Var. 642	Var. 652	Var. 662	Var. 672	Var. 682	Var. 692
	AEC	Var. 603	Var. 613	Var. 623	Var. 633	Var. 643	Var. 653	Var. 663	Var. 673	Var. 683	Var. 693
	CEC	Var. 604	Var. 614	Var. 624	Var. 634	Var. 644	Var. 654	Var. 664	Var. 674	Var. 684	Var. 694

	HIC	Var. 605	Var. 615	Var. 625	Var. 635	Var. 645	Var. 655	Var. 665	Var. 675	Var. 685	Var. 695
	HAC	Var. 606	Var. 616	Var. 626	Var. 636	Var. 646	Var. 656	Var. 666	Var. 676	Var. 686	Var. 696
	MMC	Var. 607	Var. 617	Var. 627	Var. 637	Var. 647	Var. 657	Var. 667	Var. 677	Var. 687	Var. 697
	LAC	Var. 608	Var. 618	Var. 628	Var. 638	Var. 648	Var. 658	Var. 668	Var. 678	Var. 688	Var. 698
	IAC	Var. 609	Var. 619	Var. 629	Var. 639	Var. 649	Var. 659	Var. 669	Var. 679	Var. 689	Var. 699
	SEC	Var. 610	Var. 620	Var. 630	Var. 640	Var. 650	Var. 660	Var. 670	Var. 680	Var. 690	Var. 700

* Giống Bảng 1.

Bảng 8. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký loại hỗn hợp thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 701	Var. 711	Var. 721	Var. 731	Var. 741	Var. 751	Var. 761	Var. 771	Var. 781	Var. 791
	UF/DF	Var. 702	Var. 712	Var. 722	Var. 732	Var. 742	Var. 752	Var. 762	Var. 772	Var. 782	Var. 792
	AEC	Var. 703	Var. 713	Var. 723	Var. 733	Var. 743	Var. 753	Var. 763	Var. 773	Var. 783	Var. 793
	CEC	Var. 704	Var. 714	Var. 724	Var. 734	Var. 744	Var. 754	Var. 764	Var. 774	Var. 784	Var. 794
	HIC	Var. 705	Var. 715	Var. 725	Var. 735	Var. 745	Var. 755	Var. 765	Var. 775	Var. 785	Var. 795
	HAC	Var. 706	Var. 716	Var. 726	Var. 736	Var. 746	Var. 756	Var. 766	Var. 776	Var. 786	Var. 796
	MMC	Var. 707	Var. 717	Var. 727	Var. 737	Var. 747	Var. 757	Var. 767	Var. 777	Var. 787	Var. 797
	LAC	Var. 708	Var. 718	Var. 728	Var. 738	Var. 748	Var. 758	Var. 768	Var. 778	Var. 788	Var. 798
	IAC	Var. 709	Var. 719	Var. 729	Var. 739	Var. 749	Var. 759	Var. 769	Var. 779	Var. 789	Var. 799
	SEC	Var. 710	Var. 720	Var. 730	Var. 740	Var. 750	Var. 760	Var. 770	Var. 780	Var. 790	Var. 800

* Giống Bảng 1.

Bảng 9. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký ái lực phối tử thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 801	Var. 811	Var. 821	Var. 831	Var. 841	Var. 851	Var. 861	Var. 871	Var. 881	Var. 891
	UF/DF	Var. 802	Var. 812	Var. 822	Var. 832	Var. 842	Var. 852	Var. 862	Var. 872	Var. 882	Var. 892
	AEC	Var. 803	Var. 813	Var. 823	Var. 833	Var. 843	Var. 853	Var. 863	Var. 873	Var. 883	Var. 893

	CEC	Var. 804	Var. 814	Var. 824	Var. 834	Var. 844	Var. 854	Var. 864	Var. 874	Var. 884	Var. 894
	HIC	Var. 805	Var. 815	Var. 825	Var. 835	Var. 845	Var. 855	Var. 865	Var. 875	Var. 885	Var. 895
	HAC	Var. 806	Var. 816	Var. 826	Var. 836	Var. 846	Var. 856	Var. 866	Var. 876	Var. 886	Var. 896
	MMC	Var. 807	Var. 817	Var. 827	Var. 837	Var. 847	Var. 857	Var. 867	Var. 877	Var. 887	Var. 897
	LAC	Var. 808	Var. 818	Var. 828	Var. 838	Var. 848	Var. 858	Var. 868	Var. 878	Var. 888	Var. 898
	IAC	Var. 809	Var. 819	Var. 829	Var. 839	Var. 849	Var. 859	Var. 869	Var. 879	Var. 889	Var. 899
	SEC	Var. 810	Var. 820	Var. 830	Var. 840	Var. 850	Var. 860	Var. 870	Var. 880	Var. 890	Var. 900

* Giống Bảng 1.

Bảng 10. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký ái lực miễn dịch thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu thứ ba	Ppt	Var. 901	Var. 911	Var. 921	Var. 931	Var. 941	Var. 951	Var. 961	Var. 971	Var. 981	Var. 991
	UF/DF	Var. 902	Var. 912	Var. 922	Var. 932	Var. 942	Var. 952	Var. 962	Var. 972	Var. 982	Var. 992
	AEC	Var. 903	Var. 913	Var. 923	Var. 933	Var. 943	Var. 953	Var. 963	Var. 973	Var. 983	Var. 993
	CEC	Var. 904	Var. 914	Var. 924	Var. 934	Var. 944	Var. 954	Var. 964	Var. 974	Var. 984	Var. 994
	HIC	Var. 905	Var. 915	Var. 925	Var. 935	Var. 945	Var. 955	Var. 965	Var. 975	Var. 985	Var. 995
	HAC	Var. 906	Var. 916	Var. 926	Var. 936	Var. 946	Var. 956	Var. 966	Var. 976	Var. 986	Var. 996
	MMC	Var. 907	Var. 917	Var. 927	Var. 937	Var. 947	Var. 957	Var. 967	Var. 977	Var. 987	Var. 997
	LAC	Var. 908	Var. 918	Var. 928	Var. 938	Var. 948	Var. 958	Var. 968	Var. 978	Var. 988	Var. 998
	IAC	Var. 909	Var. 919	Var. 929	Var. 939	Var. 949	Var. 959	Var. 969	Var. 979	Var. 989	Var. 999
	SEC	Var. 910	Var. 920	Var. 930	Var. 940	Var. 950	Var. 960	Var. 970	Var. 980	Var. 990	Var. 1000

* Giống Bảng 1.

Bảng 11. Các phương án làm ví dụ về việc kết hợp bước sắc ký loại cỡ thứ nhất, bước làm giàu thứ hai và thứ ba.

		Bước làm giàu thứ hai*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Bước làm giàu	Ppt	Var. 1001	Var. 1011	Var. 1021	Var. 1031	Var. 1041	Var. 1051	Var. 1061	Var. 1071	Var. 1081	Var. 1091
	UF/DF	Var. 1002	Var. 1012	Var. 1022	Var. 1032	Var. 1042	Var. 1052	Var. 1062	Var. 1072	Var. 1082	Var. 1092

	AEC	Var. 1003	Var. 1013	Var. 1023	Var. 1033	Var. 1043	Var. 1053	Var. 1063	Var. 1073	Var. 1083	Var. 1093
	CEC	Var. 1004	Var. 1014	Var. 1024	Var. 1034	Var. 1044	Var. 1054	Var. 1064	Var. 1074	Var. 1084	Var. 1094
	HIC	Var. 1005	Var. 1015	Var. 1025	Var. 1035	Var. 1045	Var. 1055	Var. 1065	Var. 1075	Var. 1085	Var. 1095
	HAC	Var. 1006	Var. 1016	Var. 1026	Var. 1036	Var. 1046	Var. 1056	Var. 1066	Var. 1076	Var. 1086	Var. 1096
	MMC	Var. 1007	Var. 1017	Var. 1027	Var. 1037	Var. 1047	Var. 1057	Var. 1067	Var. 1077	Var. 1087	Var. 1097
	LAC	Var. 1008	Var. 1018	Var. 1028	Var. 1038	Var. 1048	Var. 1058	Var. 1068	Var. 1078	Var. 1088	Var. 1098
	IAC	Var. 1009	Var. 1019	Var. 1029	Var. 1039	Var. 1049	Var. 1059	Var. 1069	Var. 1079	Var. 1089	Var. 1099
	SEC	Var. 1010	Var. 1020	Var. 1030	Var. 1040	Var. 1050	Var. 1060	Var. 1070	Var. 1080	Var. 1090	Var. 1100

* Giống Bảng 1.

Theo các phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết protein đích thu được từ huyết tương; và (ii) rửa giải protein đích thu được từ huyết tương ra khỏi nhựa sắc ký. Theo một phương án cụ thể, tạp chất không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i). Theo phương án cụ thể khác, tạp chất gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i), nhưng không được rửa giải ra khỏi nhựa sắc ký ở bước phụ (ii).

Theo các phương án nhất định khác của phương pháp được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một tạp chất; và (ii) tách nhựa này ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, trong đó protein đích thu được từ huyết tương không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i).

Theo các phương án nhất định về phương pháp được mô tả trên đây, protein đích thu được từ huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, protein của hệ bổ thể (ví dụ, Yếu tố H) và chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I). Theo phương án cụ thể, protein của hệ bổ thể được chọn từ nhóm bao gồm Yếu tố H (FH), Yếu tố D, protein bổ thể C3 và protein gắn kết C4.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm chứa protein là chất trung gian trong quy trình điều chế.

Theo các phương án nhất định về phương pháp này được đề xuất trong bản mô tả này, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 10%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 25%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 50%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 75%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 90%. Theo các phương án khác nữa, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 5% hoặc ít nhất 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc đến mức nhỏ hơn giới hạn phát hiện của hệ thử nghiệm.

Nói chung, lượng silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn cần thiết cho các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này thay đổi theo một số yếu tố bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, tổng lượng protein có mặt trong chế phẩm này, hàm lượng serin proteaza và tiền enzym serin proteaza (ví dụ, FXI, FXIa, FXII và FXIIa) trong chế phẩm này, protein đích và điều kiện dung dịch (ví dụ, độ pH, độ dẫn điện, v.v.). Ví dụ, SiO_2 có thể được bổ sung vào chế phẩm đích với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Theo một phương án khác, SiO_2 có thể được bổ sung vào chế phẩm đích với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1g/g protein đến 5g/g protein. Theo một phương án khác, SiO_2 có thể được bổ sung vào chế phẩm đích với hàm lượng nằm trong khoảng từ 2g/g protein đến 4g/g protein. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào với nồng độ cuối cùng ít nhất 1g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2,5g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo một phương án khác, SiO_2 có thể được bổ sung vào chế phẩm đích với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 5g/g protein. Theo một phương án khác, SiO_2 có thể được bổ sung vào chế phẩm đích với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,02g/g

protein đến 4g/g protein. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng ít nhất 0,1g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,2g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,25g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác nữa, silic đioxit nghiền mịn được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,01g/g tổng lượng protein hoặc ít nhất 0,02g, 0,03g, 0,04g, 0,05g, 0,06g, 0,07g, 0,08g, 0,09g, 0,1g, 0,2g, 0,3g, 0,4g, 0,5g, 0,6g, 0,7g, 0,8g, 0,9g, 1,0g, 1,5g, 2,0g, 2,5g, 3,0g, 3,5g, 4,0g, 4,5g, 5,0g, 5,5g, 6,0g, 6,5g, 7,0g, 7,5g, 8,0g, 8,5g, 9,0g, 9,5g, 10,0g/g tổng lượng protein hoặc lớn hơn.

Theo các phương án nhất định, trong đó protein đích được chiết ra khỏi phân đoạn kết tủa huyết tương được tạo huyền phù, chất trợ lọc, ví dụ, Celpure C300 (do Celpure cung cấp) hoặc Hyflo-Supper-Cel (do World Minerals cung cấp), sẽ 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 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg chất kết tủa đến 1,0kg/kg chất kết tủa hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg chất kết tủa đến 0,8kg/kg chất kết tủa hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg chất kết tủa đến 0,7kg/kg chất kết tủa. Theo các phương án khác, chất trợ lọc có thể được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg chất kết tủa đến 0,07kg/kg chất kết tủa hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg chất kết tủa đến 0,06kg/kg chất kết tủa hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg chất kết tủa đến 0,05kg/kg chất kết tủa. Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc này sẽ được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg chất kết tủa hoặc khoảng 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0kg/kg chất kết tủa.

A. Globulin miễn dịch

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch (Ig) thu được từ huyết tương. Theo một phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa Ig tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi

chế phẩm chứa Ig để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo một phương án, chế phẩm chứa Ig là chế phẩm chứa IgG. Theo các phương án khác, chế phẩm chứa Ig là IgA, IgM, IgG hoặc chế phẩm chứa hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein Ig được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký. Theo một phương án, chế phẩm chứa Ig là chế phẩm chứa IgG. Theo các phương án khác, chế phẩm chứa Ig là IgA, IgM, IgG hoặc chế phẩm chứa hỗn hợp của chúng.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig đã được làm giàu lần thứ hai, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein Ig được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) bước làm giàu thứ hai Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất

và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu Ig sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu Ig được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza trong chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza; (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza đã được gắn kết; và (d) bước làm giàu thứ hai Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Tương tự, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza trong chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) bước làm giàu thứ nhất Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) bước làm giàu thứ hai Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza; (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza đã được gắn kết; và (e) bước làm giàu thứ ba Ig để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ ba. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu

tổ XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 101 đến Var. 1100, nêu trong các Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 10 hoặc Bảng 11.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm chứa Ig là chất trung gian trong quy trình điều chế. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa Ig là chất trung gian trong quy trình điều chế IgG từ quy trình phân đoạn Cohn (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475; *J. Am. Chem. Soc.* 72:465-474 (1950)), quy trình phân đoạn Oncley (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550), quy trình tinh chế kiểu Đức (*J. Biol. Chem.* 164:109-118), quy trình tinh chế Hoppe (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34): 1749-1752), quy trình tinh chế Falksveden (patent Thụy Điển số 348942), quy trình tinh chế Falksveden và Lundblad (*Methods of Plasma Protein Fractionation* 1980), quy trình tinh chế Lebing (*Vox Sang* 2003 (84):193-201), quy trình tinh chế Tanaka (*Braz J Med Biol Res* 2000 (33)37-30)), quy trình tinh chế Teschner (*Vox Sang*, 2007 (92):42-55), quy trình phân đoạn Nitschmann (*Helv. Chim. Acta* 37:866-873), quy trình phân đoạn Kistler/Nitschmann (*Vox Sang.* 7:414-424 (1962)), quy trình tinh chế Barundern (*Vox Sang.* 7:157-74 (1962)), quy trình tinh chế Koblet (*Vox Sang.* 13:93-102 (1967)), quy trình tinh chế được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,122,373 hoặc 5,177,194, các quy trình được cải biến của chúng và các quy trình tinh chế giống hoặc tương tự quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm chứa IgG là nguồn dự trữ Cohn nghèo trong điều kiện lạnh sâu. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa IgG là dịch nổi Phân đoạn I Cohn hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa IgG là chất kết tủa Phân đoạn III Cohn đã được tạo lại huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa IgG là chất kết tủa Phân đoạn II+III Cohn đã được tạo lại huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa IgG là chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn đã được tạo lại huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa IgG là chất kết tủa G được tạo lại huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của

nó. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa IgG là chất kết tủa B Kistler/Nitschmann được tạo lại huyền phù hoặc phân đoạn tương đương của nó.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chất kết tủa Phân đoạn II+III IgG được tạo lại huyền phù. Đã phát hiện ra rằng có lợi nếu lượng Yếu tố XI, Yếu tố XII, Yếu tố XIa và/hoặc Yếu tố XIIa trong chất kết tủa Phân đoạn II+III IgG được tạo lại huyền phù có thể giảm được một cách đáng kể bằng cách bổ sung bước xử lý sơ bộ trước khi lọc/ly tâm. Theo một phương án, bước xử lý sơ bộ này bao gồm việc bổ sung hạt silic đioxit nghiền mịn (ví dụ, silic oxit dạng khói, Aerosil®), tiếp đó ủ trong thời gian từ 40 phút đến 80 phút, trong thời gian đó huyền phù được trộn đều. Theo các phương án nhất định, thời gian ủ nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút hoặc khoảng 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 phút hoặc dài hơn. Nói chung, việc xử lý sẽ 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 các phương án nhất định, việc xử lý 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 phương án cụ thể, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 10°C.

Tác dụng của việc xử lý bằng silic oxit dạng khói được minh họa bằng kết quả nêu trong các Ví dụ 3, 6 và 7. Trong các ví dụ này, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù và được xử lý bằng silic đioxit nghiền mịn với lượng khác nhau. Như có thể thấy được trong Bảng 22,

Bảng 27, Bảng 28 và, Bảng 29 hoạt tính của serin proteaza Yếu tố XI và XII và hàm lượng tiền enzym có thể giảm được ít nhất 90% bằng cách xử lý huyền phù này bằng SiO₂.

Theo các phương án nhất định, silic oxit dạng khói được bổ sung vào với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20g/kg bột nhão II+III đến 100g/kg bột nhão II+III (tức là đối với chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III được cải biến mà được chiết với tỷ lệ bằng 1:15, silic oxit dạng khói nên được bổ sung vào với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20g/16kg huyền phù II+III đến 100g/16kg huyền phù II+III hoặc với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,125% (trọng lượng) đến 0,625% (trọng lượng)). Theo các phương án nhất định, silic oxit dạng khói có thể được bổ sung vào với hàm lượng khoảng 20g/kg bột nhão

II+III hoặc khoảng 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 hoặc 100g/kg bột nhão II+III. Theo một phương án cụ thể, silic oxit dạng khối (ví dụ, Aerosil 380 hoặc chất tương đương) được bổ sung vào huyền phù chứa Phân đoạn II+III được cải biến đến hàm lượng cuối khoảng 40g/16kg II+III. Việc trộn được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong thời gian ít nhất từ 50 phút đến 70 phút.

Theo các phương án nhất định, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa IgG với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Theo một phương án khác, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa IgG với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 5g/g protein. Theo một phương án khác, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa IgG với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,02g/g protein đến 4g/g protein. Theo một phương án, SiO₂ được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng ít nhất 0,1g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,2g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,25g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 1g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2,5g trên mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác nữa, silic đioxit nghiền mịn được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,01g/g tổng lượng protein hoặc ít nhất 0,02g, 0,03g, 0,04g, 0,05g, 0,06g, 0,07g, 0,08g, 0,09g, 0,1g, 0,2g, 0,3g, 0,4g, 0,5g, 0,6g, 0,7g, 0,8g, 0,9g, 1,0g, 1,5g, 2,0g, 2,5g, 3,0g, 3,5g, 4,0g, 4,5g, 5,0g, 5,5g, 6,0g, 6,5g, 7,0g, 7,5g, 8,0g, 8,5g, 9,0g, 9,5g, 10,0g trên mỗi gam protein toàn phần hoặc nhiều hơn.

Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc, ví dụ Celpure C300 (do Celpure cung cấp) hoặc Hyflo-Supper-Cel (do World Minerals cung cấp), sẽ 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 với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg bột nhão II+III đến 1,0kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg bột nhão II+III đến 0,8kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg bột nhão II+III đến 0,7kg/kg bột nhão

II+III. Theo các phương án khác, chất trợ lọc có thể được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg bột nhão II+III đến 0,07kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg bột nhão II+III đến 0,06kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg bột nhão II+III đến 0,05kg/kg bột nhão II+III. Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc này sẽ được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng bằng khoảng 0,01kg/kg bột nhão II+III hoặc khoảng 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0kg/kg bột nhão II+III.

Theo một phương án, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khói trước khi lọc hoặc việc làm trong bằng cách ly tâm huyền phù chứa Phân đoạn II+III. Theo các phương án nhất định, việc xử lý bằng silic oxit dạng khói sẽ bao gồm việc bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg bột nhão II+III đến 0,07kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg bột nhão II+III đến 0,06kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg bột nhão II+III đến 0,05kg/kg bột nhão II+III hoặc khoảng 0,02kg/kg bột nhão II+III, 0,03kg/kg bột nhão II+III, 0,04kg/kg bột nhão II+III, 0,05kg/kg bột nhão II+III, 0,06kg/kg bột nhão II+III, 0,07kg/kg bột nhão II+III, 0,08kg/kg bột nhão II+III, 0,09kg/kg bột nhão II+III hoặc 0,1kg/kg bột nhão II+III và hỗn hợp này sẽ được ủ trong thời gian nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút hoặc khoảng 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 phút hoặc dài hơn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Theo một phương án khác, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khói mà làm giảm lượng fibrinogen dư, hoạt tính phân giải amit và/hoặc chất có hoạt tính hoạt hoá prekallikrein. Theo phương án cụ thể, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khói, mà làm giảm lượng FXI, FXIa, FXII và FXIIa trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch.

Nói chung, việc loại bỏ serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi các chế phẩm chứa globulin miễn dịch có thể thực hiện được bằng cách xử lý dung dịch chứa globulin miễn dịch bằng silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn ở độ pH và độ dẫn điện trong điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 .

Như được thể hiện trong các ví dụ, các điều kiện thích hợp bao gồm độ pH thấp và độ dẫn điện thấp.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0 để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và loại bỏ SiO_2 ra khỏi chế phẩm này. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,5. Theo phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,5. Theo

một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,4. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,3. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,2. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH bằng khoảng 5,1. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH bằng 4,0 hoặc 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, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 hoặc không lớn hơn 7,0. Theo các phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH không lớn hơn 4,0 hoặc không lớn hơn 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, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 hoặc không lớn hơn 7,0.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 3,0mS/cm để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và loại bỏ SiO_2 ra khỏi chế phẩm này. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 2,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 1,3mS/cm đến 1,7mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,9mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,8mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,7mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,6mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ

0,1mS/cm đến 1,5mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,4mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,3mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,2mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,1mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 0,9mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 0,8mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,2mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,3mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 0,4mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,6mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm đến 0,9mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion khoảng 0,8mS/cm. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion khoảng 0,1mS/cm hoặc không lớn hơn 0,2mS/cm, 0,3mS/cm, 0,4mS/cm, 0,5mS/cm, 0,6mS/cm, 0,7mS/cm, 0,8mS/cm, 0,9mS/cm, 1,0mS/cm, 1,1mS/cm, 1,2mS/cm, 1,3mS/cm, 1,4mS/cm, 1,5mS/cm, 1,6mS/cm, 1,7mS/cm, 1,8mS/cm, 1,9mS/cm, 2,0mS/cm, 2,1mS/cm, 2,2mS/cm, 2,3mS/cm, 2,4mS/cm, 2,5mS/cm,

2,6mS/cm, 2,7mS/cm, 2,8mS/cm, 2,9mS/cm hoặc 3,0mS/cm. Theo các phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion không lớn hơn 0,1mS/cm hoặc không lớn hơn 0,2mS/cm, 0,3mS/cm, 0,4mS/cm, 0,5mS/cm, 0,6mS/cm, 0,7mS/cm, 0,8mS/cm, 0,9mS/cm, 1,0mS/cm, 1,1mS/cm, 1,2mS/cm, 1,3mS/cm, 1,4mS/cm, 1,5mS/cm, 1,6mS/cm, 1,7mS/cm, 1,8mS/cm, 1,9mS/cm, 2,0mS/cm, 2,1mS/cm, 2,2mS/cm, 2,3mS/cm, 2,4mS/cm, 2,5mS/cm, 2,6mS/cm, 2,7mS/cm, 2,8mS/cm, 2,9mS/cm hoặc 3,0mS/cm.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ ở độ pH thấp và cường độ ion thấp để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và loại bỏ SiO₂ ra khỏi chế phẩm này. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,4 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,6mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo phương án cụ thể hơn, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,3 và có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm đến 0,9mS/cm. Theo phương án cụ thể hơn nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,2 có cường độ ion bằng khoảng 0,8mS/cm. Theo các phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ ở độ pH và cường độ ion theo biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1222 đến 3041, như được thể hiện trong Bảng 12, Bảng 13, Bảng 14 và Bảng 15.

Bảng 12. Các phương án làm ví dụ về điều kiện dung dịch hữu ích để gắn kết các serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza vào SiO₂.

		Độ pH								
		4,0-7,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0
Cường độ ion (mS/cm)	0,1-2,0	Var. 1222	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638
	0,1-1,9	Var. 1223	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639
	0,1-1,8	Var. 1224	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640
	0,1-1,7	Var. 1225	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641
	0,1-1,6	Var. 1226	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642

0,1-1,5	Var. 1227	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643
0,1-1,4	Var. 1228	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644
0,1-1,3	Var. 1229	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645
0,1-1,2	Var. 1230	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646
0,1-1,1	Var. 1231	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647
0,1-1,0	Var. 1232	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648
0,1-0,9	Var. 1233	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649
0,1-0,8	Var. 1234	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650
0,2-2,0	Var. 1235	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651
0,2-1,5	Var. 1236	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652
0,2-1,0	Var. 1237	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653
0,2-0,9	Var. 1238	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654
0,2-0,8	Var. 1239	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655
0,3-1,0	Var. 1240	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656
0,3-0,9	Var. 1241	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657
0,3-0,8	Var. 1242	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658
0,4-1,0	Var. 1243	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659
0,4-0,9	Var. 1244	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660
0,4-0,8	Var. 1245	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661
0,5-1,0	Var. 1246	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662
0,5-0,9	Var. 1247	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663
0,5-0,8	Var. 1248	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664
0,6-1,0	Var. 1249	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665
0,6-0,9	Var. 1250	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666
0,6-0,8	Var. 1251	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667
0,7-1,0	Var. 1252	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668
0,7-0,9	Var. 1253	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669
0,1	Var. 1254	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670

	0,2	Var. 1255	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671
	0,3	Var. 1256	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672
	0,4	Var. 1257	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673
	0,5	Var. 1258	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674
	0,6	Var. 1259	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675
	0,7	Var. 1260	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676
	0,8	Var. 1261	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677
	0,9	Var. 1262	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678
	1	Var. 1263	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679
	1,1	Var. 1264	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680
	1,2	Var. 1265	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681
	1,3	Var. 1266	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682
	1,4	Var. 1267	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683
	1,5	Var. 1268	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684
	1,6	Var. 1269	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685
	1,7	Var. 1270	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686
	1,8	Var. 1271	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687
	1,9	Var. 1272	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688
	2	Var. 1273	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689

Bảng 13. Các phương án làm ví dụ về điều kiện dung dịch hữu ích để gắn kết các serin proteaza và/hoặc tiền enzyme serin proteaza vào SiO₂.

		Độ pH								
		5,0-7,0	5,0-6,5	5,0-6,0	5,0-5,5	4,6-5,6	4,7-5,5	4,8-5,4	4,9-5,3	5,0-5,2
Cường độ ion (mS/cm)	0,1-2,0	Var. 1690	Var. 1742	Var. 1794	Var. 1846	Var. 1898	Var. 1950	Var. 2002	Var. 2054	Var. 2106
	0,1-1,9	Var. 1691	Var. 1743	Var. 1795	Var. 1847	Var. 1899	Var. 1951	Var. 2003	Var. 2055	Var. 2107
	0,1-1,8	Var. 1692	Var. 1744	Var. 1796	Var. 1848	Var. 1900	Var. 1952	Var. 2004	Var. 2056	Var. 2108
	0,1-1,7	Var. 1693	Var. 1745	Var. 1797	Var. 1849	Var. 1901	Var. 1953	Var. 2005	Var. 2057	Var. 2109
	0,1-1,6	Var. 1694	Var. 1746	Var. 1798	Var. 1850	Var. 1902	Var. 1954	Var. 2006	Var. 2058	Var. 2110
	0,1-1,5	Var. 1695	Var. 1747	Var. 1799	Var. 1851	Var. 1903	Var. 1955	Var. 2007	Var. 2059	Var. 2111
	0,1-1,4	Var. 1696	Var. 1748	Var. 1800	Var. 1852	Var. 1904	Var. 1956	Var. 2008	Var. 2060	Var. 2112

0,1-1,3	Var. 1697	Var. 1749	Var. 1801	Var. 1853	Var. 1905	Var. 1957	Var. 2009	Var. 2061	Var. 2113
0,1-1,2	Var. 1698	Var. 1750	Var. 1802	Var. 1854	Var. 1906	Var. 1958	Var. 2010	Var. 2062	Var. 2114
0,1-1,1	Var. 1699	Var. 1751	Var. 1803	Var. 1855	Var. 1907	Var. 1959	Var. 2011	Var. 2063	Var. 2115
0,1-1,0	Var. 1700	Var. 1752	Var. 1804	Var. 1856	Var. 1908	Var. 1960	Var. 2012	Var. 2064	Var. 2116
0,1-0,9	Var. 1701	Var. 1753	Var. 1805	Var. 1857	Var. 1909	Var. 1961	Var. 2013	Var. 2065	Var. 2117
0,1-0,8	Var. 1702	Var. 1754	Var. 1806	Var. 1858	Var. 1910	Var. 1962	Var. 2014	Var. 2066	Var. 2118
0,2-2,0	Var. 1703	Var. 1755	Var. 1807	Var. 1859	Var. 1911	Var. 1963	Var. 2015	Var. 2067	Var. 2119
0,2-1,5	Var. 1704	Var. 1756	Var. 1808	Var. 1860	Var. 1912	Var. 1964	Var. 2016	Var. 2068	Var. 2120
0,2-1,0	Var. 1705	Var. 1757	Var. 1809	Var. 1861	Var. 1913	Var. 1965	Var. 2017	Var. 2069	Var. 2121
0,2-0,9	Var. 1706	Var. 1758	Var. 1810	Var. 1862	Var. 1914	Var. 1966	Var. 2018	Var. 2070	Var. 2122
0,2-0,8	Var. 1707	Var. 1759	Var. 1811	Var. 1863	Var. 1915	Var. 1967	Var. 2019	Var. 2071	Var. 2123
0,3-1,0	Var. 1708	Var. 1760	Var. 1812	Var. 1864	Var. 1916	Var. 1968	Var. 2020	Var. 2072	Var. 2124
0,3-0,9	Var. 1709	Var. 1761	Var. 1813	Var. 1865	Var. 1917	Var. 1969	Var. 2021	Var. 2073	Var. 2125
0,3-0,8	Var. 1710	Var. 1762	Var. 1814	Var. 1866	Var. 1918	Var. 1970	Var. 2022	Var. 2074	Var. 2126
0,4-1,0	Var. 1711	Var. 1763	Var. 1815	Var. 1867	Var. 1919	Var. 1971	Var. 2023	Var. 2075	Var. 2127
0,4-0,9	Var. 1712	Var. 1764	Var. 1816	Var. 1868	Var. 1920	Var. 1972	Var. 2024	Var. 2076	Var. 2128
0,4-0,8	Var. 1713	Var. 1765	Var. 1817	Var. 1869	Var. 1921	Var. 1973	Var. 2025	Var. 2077	Var. 2129
0,5-1,0	Var. 1714	Var. 1766	Var. 1818	Var. 1870	Var. 1922	Var. 1974	Var. 2026	Var. 2078	Var. 2130
0,5-0,9	Var. 1715	Var. 1767	Var. 1819	Var. 1871	Var. 1923	Var. 1975	Var. 2027	Var. 2079	Var. 2131
0,5-0,8	Var. 1716	Var. 1768	Var. 1820	Var. 1872	Var. 1924	Var. 1976	Var. 2028	Var. 2080	Var. 2132
0,6-1,0	Var. 1717	Var. 1769	Var. 1821	Var. 1873	Var. 1925	Var. 1977	Var. 2029	Var. 2081	Var. 2133
0,6-0,9	Var. 1718	Var. 1770	Var. 1822	Var. 1874	Var. 1926	Var. 1978	Var. 2030	Var. 2082	Var. 2134
0,6-0,8	Var. 1719	Var. 1771	Var. 1823	Var. 1875	Var. 1927	Var. 1979	Var. 2031	Var. 2083	Var. 2135
0,7-1,0	Var. 1720	Var. 1772	Var. 1824	Var. 1876	Var. 1928	Var. 1980	Var. 2032	Var. 2084	Var. 2136
0,7-0,9	Var. 1721	Var. 1773	Var. 1825	Var. 1877	Var. 1929	Var. 1981	Var. 2033	Var. 2085	Var. 2137
0,1	Var. 1722	Var. 1774	Var. 1826	Var. 1878	Var. 1930	Var. 1982	Var. 2034	Var. 2086	Var. 2138
0,2	Var. 1723	Var. 1775	Var. 1827	Var. 1879	Var. 1931	Var. 1983	Var. 2035	Var. 2087	Var. 2139
0,3	Var. 1724	Var. 1776	Var. 1828	Var. 1880	Var. 1932	Var. 1984	Var. 2036	Var. 2088	Var. 2140

0,4	Var. 1725	Var. 1777	Var. 1829	Var. 1881	Var. 1933	Var. 1985	Var. 2037	Var. 2089	Var. 2141
0,5	Var. 1726	Var. 1778	Var. 1830	Var. 1882	Var. 1934	Var. 1986	Var. 2038	Var. 2090	Var. 2142
0,6	Var. 1727	Var. 1779	Var. 1831	Var. 1883	Var. 1935	Var. 1987	Var. 2039	Var. 2091	Var. 2143
0,7	Var. 1728	Var. 1780	Var. 1832	Var. 1884	Var. 1936	Var. 1988	Var. 2040	Var. 2092	Var. 2144
0,8	Var. 1729	Var. 1781	Var. 1833	Var. 1885	Var. 1937	Var. 1989	Var. 2041	Var. 2093	Var. 2145
0,9	Var. 1730	Var. 1782	Var. 1834	Var. 1886	Var. 1938	Var. 1990	Var. 2042	Var. 2094	Var. 2146
1	Var. 1731	Var. 1783	Var. 1835	Var. 1887	Var. 1939	Var. 1991	Var. 2043	Var. 2095	Var. 2147
1,1	Var. 1732	Var. 1784	Var. 1836	Var. 1888	Var. 1940	Var. 1992	Var. 2044	Var. 2096	Var. 2148
1,2	Var. 1733	Var. 1785	Var. 1837	Var. 1889	Var. 1941	Var. 1993	Var. 2045	Var. 2097	Var. 2149
1,3	Var. 1734	Var. 1786	Var. 1838	Var. 1890	Var. 1942	Var. 1994	Var. 2046	Var. 2098	Var. 2150
1,4	Var. 1735	Var. 1787	Var. 1839	Var. 1891	Var. 1943	Var. 1995	Var. 2047	Var. 2099	Var. 2151
1,5	Var. 1736	Var. 1788	Var. 1840	Var. 1892	Var. 1944	Var. 1996	Var. 2048	Var. 2100	Var. 2152
1,6	Var. 1737	Var. 1789	Var. 1841	Var. 1893	Var. 1945	Var. 1997	Var. 2049	Var. 2101	Var. 2153
1,7	Var. 1738	Var. 1790	Var. 1842	Var. 1894	Var. 1946	Var. 1998	Var. 2050	Var. 2102	Var. 2154
1,8	Var. 1739	Var. 1791	Var. 1843	Var. 1895	Var. 1947	Var. 1999	Var. 2051	Var. 2103	Var. 2155
1,9	Var. 1740	Var. 1792	Var. 1844	Var. 1896	Var. 1948	Var. 2000	Var. 2052	Var. 2104	Var. 2156
2	Var. 1741	Var. 1793	Var. 1845	Var. 1897	Var. 1949	Var. 2001	Var. 2053	Var. 2105	Var. 2157

Bảng 14. Các phương án làm ví dụ về điều kiện dung dịch hữu ích để gắn kết các serin proteaza và/hoặc tiền enzyme serin proteaza vào SiO₂.

		Độ pH								
		5,1	NMT 4,0	NMT 4,2	NMT 4,4	NMT 4,6	NMT 4,8	NMT 5,0	NMT 5,2	NMT 5,4
Cường độ ion (mS/cm)	0,1- 2,0	Var. 2158	Var. 2210	Var. 2262	Var. 2314	Var. 2366	Var. 2418	Var. 2470	Var. 2522	Var. 2574
	0,1- 1,9	Var. 2159	Var. 2211	Var. 2263	Var. 2315	Var. 2367	Var. 2419	Var. 2471	Var. 2523	Var. 2575
	0,1- 1,8	Var. 2160	Var. 2212	Var. 2264	Var. 2316	Var. 2368	Var. 2420	Var. 2472	Var. 2524	Var. 2576
	0,1- 1,7	Var. 2161	Var. 2213	Var. 2265	Var. 2317	Var. 2369	Var. 2421	Var. 2473	Var. 2525	Var. 2577
	0,1- 1,6	Var. 2162	Var. 2214	Var. 2266	Var. 2318	Var. 2370	Var. 2422	Var. 2474	Var. 2526	Var. 2578
	0,1- 1,5	Var. 2163	Var. 2215	Var. 2267	Var. 2319	Var. 2371	Var. 2423	Var. 2475	Var. 2527	Var. 2579
	0,1- 1,4	Var. 2164	Var. 2216	Var. 2268	Var. 2320	Var. 2372	Var. 2424	Var. 2476	Var. 2528	Var. 2580
	0,1- 1,3	Var. 2165	Var. 2217	Var. 2269	Var. 2321	Var. 2373	Var. 2425	Var. 2477	Var. 2529	Var. 2581

0,1-1,2	Var. 2166	Var. 2218	Var. 2270	Var. 2322	Var. 2374	Var. 2426	Var. 2478	Var. 2530	Var. 2582
0,1-1,1	Var. 2167	Var. 2219	Var. 2271	Var. 2323	Var. 2375	Var. 2427	Var. 2479	Var. 2531	Var. 2583
0,1-1,0	Var. 2168	Var. 2220	Var. 2272	Var. 2324	Var. 2376	Var. 2428	Var. 2480	Var. 2532	Var. 2584
0,1-0,9	Var. 2169	Var. 2221	Var. 2273	Var. 2325	Var. 2377	Var. 2429	Var. 2481	Var. 2533	Var. 2585
0,1-0,8	Var. 2170	Var. 2222	Var. 2274	Var. 2326	Var. 2378	Var. 2430	Var. 2482	Var. 2534	Var. 2586
0,2-2,0	Var. 2171	Var. 2223	Var. 2275	Var. 2327	Var. 2379	Var. 2431	Var. 2483	Var. 2535	Var. 2587
0,2-1,5	Var. 2172	Var. 2224	Var. 2276	Var. 2328	Var. 2380	Var. 2432	Var. 2484	Var. 2536	Var. 2588
0,2-1,0	Var. 2173	Var. 2225	Var. 2277	Var. 2329	Var. 2381	Var. 2433	Var. 2485	Var. 2537	Var. 2589
0,2-0,9	Var. 2174	Var. 2226	Var. 2278	Var. 2330	Var. 2382	Var. 2434	Var. 2486	Var. 2538	Var. 2590
0,2-0,8	Var. 2175	Var. 2227	Var. 2279	Var. 2331	Var. 2383	Var. 2435	Var. 2487	Var. 2539	Var. 2591
0,3-1,0	Var. 2176	Var. 2228	Var. 2280	Var. 2332	Var. 2384	Var. 2436	Var. 2488	Var. 2540	Var. 2592
0,3-0,9	Var. 2177	Var. 2229	Var. 2281	Var. 2333	Var. 2385	Var. 2437	Var. 2489	Var. 2541	Var. 2593
0,3-0,8	Var. 2178	Var. 2230	Var. 2282	Var. 2334	Var. 2386	Var. 2438	Var. 2490	Var. 2542	Var. 2594
0,4-1,0	Var. 2179	Var. 2231	Var. 2283	Var. 2335	Var. 2387	Var. 2439	Var. 2491	Var. 2543	Var. 2595
0,4-0,9	Var. 2180	Var. 2232	Var. 2284	Var. 2336	Var. 2388	Var. 2440	Var. 2492	Var. 2544	Var. 2596
0,4-0,8	Var. 2181	Var. 2233	Var. 2285	Var. 2337	Var. 2389	Var. 2441	Var. 2493	Var. 2545	Var. 2597
0,5-1,0	Var. 2182	Var. 2234	Var. 2286	Var. 2338	Var. 2390	Var. 2442	Var. 2494	Var. 2546	Var. 2598
0,5-0,9	Var. 2183	Var. 2235	Var. 2287	Var. 2339	Var. 2391	Var. 2443	Var. 2495	Var. 2547	Var. 2599
0,5-0,8	Var. 2184	Var. 2236	Var. 2288	Var. 2340	Var. 2392	Var. 2444	Var. 2496	Var. 2548	Var. 2600
0,6-1,0	Var. 2185	Var. 2237	Var. 2289	Var. 2341	Var. 2393	Var. 2445	Var. 2497	Var. 2549	Var. 2601
0,6-0,9	Var. 2186	Var. 2238	Var. 2290	Var. 2342	Var. 2394	Var. 2446	Var. 2498	Var. 2550	Var. 2602
0,6-0,8	Var. 2187	Var. 2239	Var. 2291	Var. 2343	Var. 2395	Var. 2447	Var. 2499	Var. 2551	Var. 2603
0,7-1,0	Var. 2188	Var. 2240	Var. 2292	Var. 2344	Var. 2396	Var. 2448	Var. 2500	Var. 2552	Var. 2604
0,7-0,9	Var. 2189	Var. 2241	Var. 2293	Var. 2345	Var. 2397	Var. 2449	Var. 2501	Var. 2553	Var. 2605
0,1	Var. 2190	Var. 2242	Var. 2294	Var. 2346	Var. 2398	Var. 2450	Var. 2502	Var. 2554	Var. 2606
0,2	Var. 2191	Var. 2243	Var. 2295	Var. 2347	Var. 2399	Var. 2451	Var. 2503	Var. 2555	Var. 2607
0,3	Var. 2192	Var. 2244	Var. 2296	Var. 2348	Var. 2400	Var. 2452	Var. 2504	Var. 2556	Var. 2608
0,4	Var. 2193	Var. 2245	Var. 2297	Var. 2349	Var. 2401	Var. 2453	Var. 2505	Var. 2557	Var. 2609

0,5	Var. 2194	Var. 2246	Var. 2298	Var. 2350	Var. 2402	Var. 2454	Var. 2506	Var. 2558	Var. 2610
0,6	Var. 2195	Var. 2247	Var. 2299	Var. 2351	Var. 2403	Var. 2455	Var. 2507	Var. 2559	Var. 2611
0,7	Var. 2196	Var. 2248	Var. 2300	Var. 2352	Var. 2404	Var. 2456	Var. 2508	Var. 2560	Var. 2612
0,8	Var. 2197	Var. 2249	Var. 2301	Var. 2353	Var. 2405	Var. 2457	Var. 2509	Var. 2561	Var. 2613
0,9	Var. 2198	Var. 2250	Var. 2302	Var. 2354	Var. 2406	Var. 2458	Var. 2510	Var. 2562	Var. 2614
1	Var. 2199	Var. 2251	Var. 2303	Var. 2355	Var. 2407	Var. 2459	Var. 2511	Var. 2563	Var. 2615
1,1	Var. 2200	Var. 2252	Var. 2304	Var. 2356	Var. 2408	Var. 2460	Var. 2512	Var. 2564	Var. 2616
1,2	Var. 2201	Var. 2253	Var. 2305	Var. 2357	Var. 2409	Var. 2461	Var. 2513	Var. 2565	Var. 2617
1,3	Var. 2202	Var. 2254	Var. 2306	Var. 2358	Var. 2410	Var. 2462	Var. 2514	Var. 2566	Var. 2618
1,4	Var. 2203	Var. 2255	Var. 2307	Var. 2359	Var. 2411	Var. 2463	Var. 2515	Var. 2567	Var. 2619
1,5	Var. 2204	Var. 2256	Var. 2308	Var. 2360	Var. 2412	Var. 2464	Var. 2516	Var. 2568	Var. 2620
1,6	Var. 2205	Var. 2257	Var. 2309	Var. 2361	Var. 2413	Var. 2465	Var. 2517	Var. 2569	Var. 2621
1,7	Var. 2206	Var. 2258	Var. 2310	Var. 2362	Var. 2414	Var. 2466	Var. 2518	Var. 2570	Var. 2622
1,8	Var. 2207	Var. 2259	Var. 2311	Var. 2363	Var. 2415	Var. 2467	Var. 2519	Var. 2571	Var. 2623
1,9	Var. 2208	Var. 2260	Var. 2312	Var. 2364	Var. 2416	Var. 2468	Var. 2520	Var. 2572	Var. 2624
2	Var. 2209	Var. 2261	Var. 2313	Var. 2365	Var. 2417	Var. 2469	Var. 2521	Var. 2573	Var. 2625

NMT = Không lớn hơn

Bảng 15. Các phương án làm ví dụ về điều kiện dung dịch hữu ích để gắn kết các serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza vào SiO₂.

		Độ pH							
		NMT 5,6	NMT 5,8	NMT 6,0	NMT 6,2	NMT 6,4	NMT 6,6	NMT 6,8	NMT 7,0
Cường độ ion (mS/cm)	0,1- 2,0	Var. 2626	Var. 2678	Var. 2730	Var. 2782	Var. 2834	Var. 2886	Var. 2938	Var. 2990
	0,1- 1,9	Var. 2627	Var. 2679	Var. 2731	Var. 2783	Var. 2835	Var. 2887	Var. 2939	Var. 2991
	0,1- 1,8	Var. 2628	Var. 2680	Var. 2732	Var. 2784	Var. 2836	Var. 2888	Var. 2940	Var. 2992
	0,1- 1,7	Var. 2629	Var. 2681	Var. 2733	Var. 2785	Var. 2837	Var. 2889	Var. 2941	Var. 2993
	0,1- 1,6	Var. 2630	Var. 2682	Var. 2734	Var. 2786	Var. 2838	Var. 2890	Var. 2942	Var. 2994
	0,1- 1,5	Var. 2631	Var. 2683	Var. 2735	Var. 2787	Var. 2839	Var. 2891	Var. 2943	Var. 2995
	0,1- 1,4	Var. 2632	Var. 2684	Var. 2736	Var. 2788	Var. 2840	Var. 2892	Var. 2944	Var. 2996
	0,1- 1,3	Var. 2633	Var. 2685	Var. 2737	Var. 2789	Var. 2841	Var. 2893	Var. 2945	Var. 2997
	0,1- 1,2	Var. 2634	Var. 2686	Var. 2738	Var. 2790	Var. 2842	Var. 2894	Var. 2946	Var. 2998

0,1-1,1	Var. 2635	Var. 2687	Var. 2739	Var. 2791	Var. 2843	Var. 2895	Var. 2947	Var. 2999
0,1-1,0	Var. 2636	Var. 2688	Var. 2740	Var. 2792	Var. 2844	Var. 2896	Var. 2948	Var. 3000
0,1-0,9	Var. 2637	Var. 2689	Var. 2741	Var. 2793	Var. 2845	Var. 2897	Var. 2949	Var. 3001
0,1-0,8	Var. 2638	Var. 2690	Var. 2742	Var. 2794	Var. 2846	Var. 2898	Var. 2950	Var. 3002
0,2-2,0	Var. 2639	Var. 2691	Var. 2743	Var. 2795	Var. 2847	Var. 2899	Var. 2951	Var. 3003
0,2-1,5	Var. 2640	Var. 2692	Var. 2744	Var. 2796	Var. 2848	Var. 2900	Var. 2952	Var. 3004
0,2-1,0	Var. 2641	Var. 2693	Var. 2745	Var. 2797	Var. 2849	Var. 2901	Var. 2953	Var. 3005
0,2-0,9	Var. 2642	Var. 2694	Var. 2746	Var. 2798	Var. 2850	Var. 2902	Var. 2954	Var. 3006
0,2-0,8	Var. 2643	Var. 2695	Var. 2747	Var. 2799	Var. 2851	Var. 2903	Var. 2955	Var. 3007
0,3-1,0	Var. 2644	Var. 2696	Var. 2748	Var. 2800	Var. 2852	Var. 2904	Var. 2956	Var. 3008
0,3-0,9	Var. 2645	Var. 2697	Var. 2749	Var. 2801	Var. 2853	Var. 2905	Var. 2957	Var. 3009
0,3-0,8	Var. 2646	Var. 2698	Var. 2750	Var. 2802	Var. 2854	Var. 2906	Var. 2958	Var. 3010
0,4-1,0	Var. 2647	Var. 2699	Var. 2751	Var. 2803	Var. 2855	Var. 2907	Var. 2959	Var. 3011
0,4-0,9	Var. 2648	Var. 2700	Var. 2752	Var. 2804	Var. 2856	Var. 2908	Var. 2960	Var. 3012
0,4-0,8	Var. 2649	Var. 2701	Var. 2753	Var. 2805	Var. 2857	Var. 2909	Var. 2961	Var. 3013
0,5-1,0	Var. 2650	Var. 2702	Var. 2754	Var. 2806	Var. 2858	Var. 2910	Var. 2962	Var. 3014
0,5-0,9	Var. 2651	Var. 2703	Var. 2755	Var. 2807	Var. 2859	Var. 2911	Var. 2963	Var. 3015
0,5-0,8	Var. 2652	Var. 2704	Var. 2756	Var. 2808	Var. 2860	Var. 2912	Var. 2964	Var. 3016
0,6-1,0	Var. 2653	Var. 2705	Var. 2757	Var. 2809	Var. 2861	Var. 2913	Var. 2965	Var. 3017
0,6-0,9	Var. 2654	Var. 2706	Var. 2758	Var. 2810	Var. 2862	Var. 2914	Var. 2966	Var. 3018
0,6-0,8	Var. 2655	Var. 2707	Var. 2759	Var. 2811	Var. 2863	Var. 2915	Var. 2967	Var. 3019
0,7-1,0	Var. 2656	Var. 2708	Var. 2760	Var. 2812	Var. 2864	Var. 2916	Var. 2968	Var. 3020
0,7-0,9	Var. 2657	Var. 2709	Var. 2761	Var. 2813	Var. 2865	Var. 2917	Var. 2969	Var. 3021
0,1	Var. 2658	Var. 2710	Var. 2762	Var. 2814	Var. 2866	Var. 2918	Var. 2970	Var. 3022
0,2	Var. 2659	Var. 2711	Var. 2763	Var. 2815	Var. 2867	Var. 2919	Var. 2971	Var. 3023
0,3	Var. 2660	Var. 2712	Var. 2764	Var. 2816	Var. 2868	Var. 2920	Var. 2972	Var. 3024
0,4	Var. 2661	Var. 2713	Var. 2765	Var. 2817	Var. 2869	Var. 2921	Var. 2973	Var. 3025
0,5	Var. 2662	Var. 2714	Var. 2766	Var. 2818	Var. 2870	Var. 2922	Var. 2974	Var. 3026

0,6	Var. 2663	Var. 2715	Var. 2767	Var. 2819	Var. 2871	Var. 2923	Var. 2975	Var. 3027
0,7	Var. 2664	Var. 2716	Var. 2768	Var. 2820	Var. 2872	Var. 2924	Var. 2976	Var. 3028
0,8	Var. 2665	Var. 2717	Var. 2769	Var. 2821	Var. 2873	Var. 2925	Var. 2977	Var. 3029
0,9	Var. 2666	Var. 2718	Var. 2770	Var. 2822	Var. 2874	Var. 2926	Var. 2978	Var. 3030
1	Var. 2667	Var. 2719	Var. 2771	Var. 2823	Var. 2875	Var. 2927	Var. 2979	Var. 3031
1,1	Var. 2668	Var. 2720	Var. 2772	Var. 2824	Var. 2876	Var. 2928	Var. 2980	Var. 3032
1,2	Var. 2669	Var. 2721	Var. 2773	Var. 2825	Var. 2877	Var. 2929	Var. 2981	Var. 3033
1,3	Var. 2670	Var. 2722	Var. 2774	Var. 2826	Var. 2878	Var. 2930	Var. 2982	Var. 3034
1,4	Var. 2671	Var. 2723	Var. 2775	Var. 2827	Var. 2879	Var. 2931	Var. 2983	Var. 3035
1,5	Var. 2672	Var. 2724	Var. 2776	Var. 2828	Var. 2880	Var. 2932	Var. 2984	Var. 3036
1,6	Var. 2673	Var. 2725	Var. 2777	Var. 2829	Var. 2881	Var. 2933	Var. 2985	Var. 3037
1,7	Var. 2674	Var. 2726	Var. 2778	Var. 2830	Var. 2882	Var. 2934	Var. 2986	Var. 3038
1,8	Var. 2675	Var. 2727	Var. 2779	Var. 2831	Var. 2883	Var. 2935	Var. 2987	Var. 3039
1,9	Var. 2676	Var. 2728	Var. 2780	Var. 2832	Var. 2884	Var. 2936	Var. 2988	Var. 3040
2	Var. 2677	Var. 2729	Var. 2781	Var. 2833	Var. 2885	Var. 2937	Var. 2989	Var. 3041

NMT = Không lớn hơn

A. Các phương pháp 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 để sản xuất chế phẩm chứa IgG thích hợp dùng trong điều trị IVIG. Nói chung, các phương pháp này tạo ra các chế phẩm chứa IgG có hiệu suất cao và có độ tinh khiết bằng, hoặc nếu không phải là cao hơn, các phương pháp đang được sử 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 chứa IgG cô đặc từ huyết tương, ví dụ, 10% IVIG, phương pháp này bao gồm bước làm kết tủa bằng rượu và ít nhất một bước sắc ký trao đổi ion. Cụ thể, nhiều bước trong quy trình cải tiến nêu trên khác với các quy trình đã biết, 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 nghiền mịn.

Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước (a) 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) 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 lại huyền phù chất kết tủa thứ nhất đã được tạo ra ở bước (b) để tạo ra huyền phù, (d) xử lý huyền phù đã được tạo ra ở bước (c) bằng chất tẩy rửa, (e) 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 lại huyền phù chất kết tủa thứ hai đã được tạo ra ở bước (e) để tạo ra huyền phù, (g) xử lý huyền phù đã được tạo ra ở bước (f) bằng dung môi và/hoặc chất tẩy rửa, và (h) phân đoạn bằng sắc ký trao đổi ion, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa IgG cô đặc. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước xử lý huyền phù đã được tạo ra ở bước (c) bằng silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn và lọc dung dịch trước bước (d).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa IgG cô đặc từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) điều chỉnh độ pH của phân đoạn huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu đến 7,0, (b) điều chỉnh nồng độ etanol của phân đoạn huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu ở bước (a) đến hoặc đến khoảng 25% (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 lại huyền phù chất kết tủa thu được ở bước (c) bằng đệm chứa phosphat và axetat, trong đó độ pH của đệm được điều chỉnh bằng axit axetic bằng với lượng nằm trong khoảng từ 400ml đến 700ml tính cho 1000L đệm, bằng cách đó tạo ra huyền phù, (e) trộn silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn 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 đệm chứa phosphat và axetat với thể tích ít nhất 3 lần thể tích chết của máy lọc ép, trong đó độ pH của đệm được điều chỉnh bằng khoảng 150ml axit axetic bằng tính cho 1000l 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 7,0 và bổ sung etanol đến nồng độ cuối bằng hoặc 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 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 (tức 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) lọc thẩm tách dịch siêu lọc thu được ở bước (o) dựa vào 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 chứa IgG cô đặc. Theo một phương án, nhiệt độ ở bước (b) là -7°C hoặc khoảng -7°C . Theo một phương án cụ thể, đệm huyền phù ở bước (d) được điều chỉnh bằng khoảng 600mL axit axetic băng.

Theo một số phương án nhất định, 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 khoảng 10%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc khoảng 11%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc 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 khoảng 20%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc khoảng 21%. Theo một phương án được ưu tiên khác, dịch lọc thẩm tách có nồng độ protein bằng hoặc khoảng 22%.

Theo một số phương án nhất định, phương pháp theo sáng chế có thể có một số cải tiến ở hai hoặc nhiều bước 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 chứa 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 này sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án có 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 có 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 nhất định, 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 trong phần dưới đây khi bàn 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 phân đoạn kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất và/hoặc giảm được phân đoạn IgG bị biến tính không thuận nghịch ở 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 có 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 có 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 khoảng 25%. Theo một phương án khác nữa, bước làm kết

tủa Phân đoạn II+III cải biến được cải tiến bằng cách giảm nhiệt độ ủ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Theo một số phương án nhất định, 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 trong 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 ở 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 nồng độ axit axetic băng của đệm hòa tan đến 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 này. 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 (SiO_2) nghiền mịn với huyền phù chứa Phân đoạn II+III trước khi lọc. Theo một số phương án nhất định, 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 trong phần dưới đây khi bàn luận về bước hòa tan Phân đoạn II+III cải biến – Chiết chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến. Bằng cách thực hiện một hoặc nhiều cải tiến nêu trên, lượng IgG thu được trong huyền phù chứa Phân đoạn II+III tăng lên và/hoặc lượng tạp chất trong huyền phù chứa Phân đoạn II+III giảm.

Ví dụ về cải tiến được tạo ra ở bước lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến được thực hiện bằng cách rửa thiết bị lọc sau khi lọc bằng đệm hòa tan với thể tích ít nhất 3,6 thể tích chết chứa hoặc chứa khoảng 150ml axit axetic băng cho 1000L. Các cải tiến khác có thể được thực hiện ở bước này sẽ được bộc lộ trong phần dưới đây khi bàn luận về bước lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến – Xử lý sơ bộ và lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến. Bằng cách thực hiện một hoặc nhiều cải tiến nêu trên, giảm được lượng IgG hao hụt ở bước lọc huyền phù chứa 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 chứa 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 chứa 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 chứa 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 chứa 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 chứa 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 chứa 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 chứa Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một số phương án nhất định, quy trình cải tiến trong phương pháp tinh chế IgG theo sáng chế bao gồm việc bổ sung 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 nhất định, 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 bị giới hạn ở, dung dịch làm thay đổi độ pH, dung dịch dung môi, dung dịch tẩy rửa, 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 nhất định, một cải tiến quy trình khác, 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 kết tủa sau khi và/hoặc đồng thời với việc bổ sung tác nhân làm kết tủa (ví dụ, rượu hoặc polyetelen glycol) vào. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất cải tiến quy trình, trong đó độ pH của phân đoạn huyết tương đang được kết tủa tích cực được duy trì ở 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 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 nghiền mịn để loại bỏ tạp chất.

1. Điều chế huyết tương nghèo kết tủa lạnh sâu

Chất ban đầu được dùng để bào chế chế phẩm chứa IgG cô đặc thường bao gồm huyết tương được thu hồi (tức là huyết tương được tách từ máu toàn phần *ex vivo*) hoặc huyết tương nguồn (tức là huyết tương thu được bằng cách tách hồng cầu ra khỏi huyết tương). Quy trình tinh chế thường bắt đầu từ phần gom huyết tương đông lạnh đã được làm tan giá 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 lớn hơn 6°C. Sau khi làm tan giá hoàn toàn huyết tương đã đông lạnh ở nhiệt độ thấp, thực hiện ly tâm trong điều kiện lạnh sâu (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 kết tủa lạnh” sau khi loại bỏ protein không hòa tan trong điều kiện lạnh bằng cách ly tâm ra khỏi huyết tương mới được làm tan giá) được xử lý ở bước tiếp theo. Nhiều bước khác có thể được thực hiện tại thời điểm này để phân lập hoạt tính rẽ nhánh chất ức chế yếu tố tám (factor eight inhibitor bypass activity - FEIBA), phức hợp Yếu tố IX, phần cô Yếu tố VII, hoặc phức hợp Antitrombin III.

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

Ở bước này, huyết tương nghèo kết tủa lạnh thường được làm lạnh đến nhiệt độ khoảng $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và độ pH được điều chỉnh đến trị số 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 khoảng 7,2. Tiếp theo, etanol đã được làm lạnh từ trước được bổ sung vào đồng thời huyết tương này được khuấy đến nồng độ etanol đích bằng hoặc khoảng 8% thể tích. Đồng thời, 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 khoảng -2°C , để làm kết tủa các tạp chất như α_2 -macroglobulin, β_{1A} - và β_{1C} -globulin, fibrinogen, và Yếu tố VIII. Nói chung, bước làm kết tủa này sẽ có thời gian giữ ít nhất khoảng 1 giờ, mặc dù thời gian giữ ngắn hơn hoặc dài 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 một phương pháp thích hợp khác.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất cao trong phân đoạn Phần dịch nổi I so với các phương pháp thường được áp dụng làm bước phân đoạn thứ nhất đối với huyết tương nghèo kết tủa lạnh (xem: Cohn và các đồng tác giả, nêu trên; 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, đạt được hiệu suất IgG cải thiện 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 có 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, việc cải tiến đề cập 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 nhất định, lượng IgG hao hụt trong phân đoạn kết tủa ở bước làm kết tủa thứ nhất giảm so với lượng IgG hao hụt ở bước làm kết tủa thứ nhất của quy trình nêu trong phương pháp 6 của Cohn.

Theo một số phương án nhất định, 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 để làm kết tủa vào. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,3 sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa vào. Theo các phương án khác, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 7,0 hoặc khoảng 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, hoặc 7,5 sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa vào. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 7,2 sau khi thêm rượu để làm kết tủa vào. Như vậy, theo một số phương án nhất định, 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 để làm kết tủa vào. 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 nhất định, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách bổ sung rượu 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 nhất định, 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.

[0001] Theo một số phương án nhất định khác, thực hiện cải tiến 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 để 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 khoảng 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, hoặc 7,5 sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa và bằng cách bổ sung rượu để làm kết tủa và/hoặc dung dịch dùng để điều chỉnh độ pH vào 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 khoảng 7,2 sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa vào và bằng cách bổ sung rượu để làm kết tủa và/hoặc dung dịch được dùng để điều chỉnh độ pH vào 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 phân đoạn Phân đoạn II+III theo phương pháp Cohn-Oncley cải biến. Nói chung, độ pH của dung dịch này 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 khoảng 6,7. Sau đó, rượu, tốt hơn là etanol, được bổ sung vào dung dịch này trong khi được khuấy đến nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 20% đến 25% (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 khoảng 25% (thể tích) để làm kết tủa IgG trong phân đoạn này. Nói chung, các tạp chất như α_1 -lipoprotein, α_1 -antitrypsin, Gc-globulin, α_{1X} -glycoprotein, haptoglobulin, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, phân

đoạn của 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, dung dịch này 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 này được làm lạnh đến nhiệt độ bằng -7°C hoặc khoảng -7°C . Sau khi bổ sung xong rượu, độ pH của dung dịch này 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 này được điều chỉnh đến bằng hoặc khoảng 6,9. Nói chung, 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 sử dụng. Tiếp theo, chất kết tủa (Phân đoạn II+III cải biến), lý tưởng là chứa ít nhất khoảng 85%, tốt hơn là chứa ít nhất khoảng 90%, tốt hơn nữa là chứa 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. So với các phương pháp thông thường được dùng làm bước phân đoạn thứ hai đối với huyết tương nghèo kết tủa lạnh (Cohn và các đồng tác giả, nêu trên; Oncley và các đồng tác giả, nêu trên), theo một vài phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất gia tăng trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một phương án có liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp mà lượng IgG hao hụt trong phần dịch nổi II+III cải biến giảm.

So với các phương pháp thông thường dùng làm bước phân đoạn thứ hai đối với huyết tương nghèo kết tủa lạnh (Cohn và các đồng tác giả, nêu trên; Oncley và các đồng tác giả, nêu trên), theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất gia tăng trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một phương án, thực hiện cải tiến bằng cách bổ sung rượu vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến bằng cách bổ sung chất làm thay đổi độ pH vào bằng cách phun. Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch này sau khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án có liên quan, thực hiện cải tiến bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch trong khi bổ sung rượu vào. Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến bằng cách gia tăng nồng độ rượu (ví dụ, ethanol) đến 25% (thể tích). Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến 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, thực hiện cải tiến bằng cách gia tăng nồng độ rượu (ví dụ, etanol) đến 25% (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 thực hiện việc làm 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 thành phẩm.

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, thì độ pH của dung dịch này 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 này 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 nhất định trở nên thuận lợi hơn. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa, tỷ lệ phần trăm IgG được thu hồi trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III là lớn hơn theo cách có lợi.

Do đó, theo một khía cạnh, việc cải tiến đề cập 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 chứa Phân đoạn II+III tăng. Theo một số phương án nhất định, thực hiện cải tiến quy trình này 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, thực hiện quy trình cải tiến bằng cách duy trì độ pH của dung dịch đến trị số nằm trong khoảng từ 6,7 đến 7,1 liên tục trong 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 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 để làm kết tủa. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 6,9 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu để làm kết tủa. Theo một số phương án nhất định, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,0 liên tục trong thời gian ủ kết tủa, hoặc ở độ pH bằng

khoảng 6,9 liên tục trong thời gian ủ kết tủa. Như vậy, theo một số phương án nhất định, 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 này được điều chỉnh trước khi mà không phải sau khi bổ sung rượu để làm kết tủa hoặc giảm so với bước làm kết tủa tương tự trong đó độ pH của dung dịch này 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 này. Theo một phương án, rượu là etanol.

Theo một phương án khác, thực hiện quy trình cải tiến bằng cách bổ sung rượu vào để làm kết tủa và/hoặc dung dịch 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 nhất định, 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 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 phương án khác, thực hiện cải tiến quy trình này bằng cách tiến hành bước làm kết tủa ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -7°C đến -9°C . Theo một phương án nhất định, bước làm kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ -7°C hoặc khoảng -7°C . Theo một phương án khác, bước làm kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ bằng hoặc khoảng -8°C . Theo một phương án khác, bước làm kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ -9°C hoặc khoảng -9°C . Theo một số phương án nhất định, 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 khoảng 25%. Theo các phương án khác, nồng độ rượu có thể bằng hoặc 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 -7°C hoặc khoảng -7°C với nồng độ rượu bằng hoặc 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 sử dụng theo Oncley và các đồng tác giả, nêu trên, đến 25% và việc giảm nhiệt độ ủ từ -5°C , như được sử dụng theo các phương pháp của Cohn và Oncley, đến -7°C hoặc

khoảng -7°C là hàm lượng của IgG trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến tăng từ 5% đến 6%.

Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến quy trình 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 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 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, thực hiện cải tiến quy trình 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% đến 27%, tốt hơn là bằng hoặc khoảng 25%. Theo một phương án cụ thể khác, thực hiện quy trình cải tiến 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, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách làm kết tủa IgG ở nhiệt độ -7°C hoặc khoảng -7°C bằng hoặc khoảng 25% etanol được bổ sung bằng cách phun và tiếp theo điều chỉnh độ pH của dung dịch này đến bằng hoặc 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 khoảng 6,9 trong toàn bộ thời gian ủ hoặc giữ kết tủa.

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

Để hòa tan lượng IgG của chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến, đệm chiết đã làm lạnh được sử dụng để tạo lại huyền phù chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III ở tỷ lệ thông thường là 1 phần chất kết tủa bằng 15 phần đệm chiết. Các tỷ lệ tạo lại huyền phù thích hợp khác có thể được sử 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 nhất định, tỷ lệ tạo lại huyền phù 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 lớn 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 nhất định, 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 đệm chiết bằng hoặc khoảng 4,5. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của đệm chiết bằng hoặc khoảng 4,7. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của đệm chiết bằng hoặc khoảng 4,9. Nói chung, 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, phosphat monobazơ, phosphat điaxit, 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, đệm chiết có độ dẫn điện riêng nằm trong khoảng từ $0,5\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ đến $2,0\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Ví dụ, theo một số phương án nhất định, độ dẫn điện riêng của đệm chiết khoảng $0,5\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 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 $2,0\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực sẽ biết rõ cách tạo ra đệm chiết có độ dẫn điện riêng thích hợp.

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

Nói chung, 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 nhất định, 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 . Nói chung, quy trình chiết được tiến hành trong thời gian từ 60 đến 300 phút, hoặc từ 120 đến 240 phút, hoặc từ 150 đến 210 phút, trong khi huyền phù này được khuấy liên tục. Theo một số phương án nhất định, quy trình chiết được tiến hành trong khoảng 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210,

220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 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 đệm chiết chứa 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và từ 0,051% đến 0,06% axit axetic băng (thể tích), có thể đạt được sự gia tăng đáng kể về mức tăng hiệu suất trong hỗn hợp IgG cuối cùng mà không ảnh hưởng xấu đến độ tinh khiết của thành phẩm. Mối tương quan giữa axit axetic và độ pH của đệm chiết đã được chứng minh trên Hình 9. Theo một phương án được ưu tiên, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III được chiết bằng tỷ lệ phần giữa bột nhão và đệm bằng hoặc khoảng 1:15 ở độ pH bằng hoặc khoảng $4,5 \pm 0,2$.

Phát hiện ra rằng so với quy trình sản xuất GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare) hiện có sử dụng đệm chiết chứa 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và 0,051% axit axetic băng (thể tích), bằng cách gia tăng hàm lượng axit axetic băng đến bằng hoặc khoảng 0,06% (thể tích), theo cách có lợi có thể thu được sự gia tăng đáng kể về mức tăng hiệu suất trong chế phẩm IgG cuối. So với các phương pháp đã được áp dụng đã biết để chiết chất kết tủa được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ hai (GAMMAGARD® LIQUID), theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất gia tăng trong huyền phù chứa Phân đoạn II+III cải biến.

Theo một khía cạnh, việc cải tiến đề cập đến phương pháp trong đó giảm được lượng IgG hao hụt trong phân đoạn không hòa tan của chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một phương án, thực hiện cải tiến quy trình này bằng cách chiết chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến ở tỷ lệ 1:15 (chất kết tủa so với đệm) bằng dung dịch chứa 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và 0,06% axit axetic băng (thể tích). Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến bằng cách duy trì độ pH của dung dịch này trong toàn bộ quy trình chiết. Theo một phương án, độ pH của dung dịch này 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 này 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 này 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 này được duy trì ở hoặc khoảng 4,5 trong toàn bộ quy trình chiết.

Theo một khía cạnh khác, việc cải tiến đề cập đến phương pháp trong đó lượng IgG hòa tan từ chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III ở bước hòa tan Phân đoạn II+III gia tăng. Theo một phương án, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách hòa tan chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III trong đệm chứa 600ml axit axetic bằng cho 1000l. Theo một phương án khác, việc cải tiến đề cập đến phương pháp trong đó lượng tạp chất giảm sau khi IgG trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III được hòa tan. Theo một phương án, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách trộn silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn với huyền phù chứa 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 hòa tan của chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III cải biến (tức là bánh lọc chứa Phân đoạn II+III cải biến), huyền phù được lọc, thường là bằng cách sử 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 đất diatomit), và các thiết bị lọc sâu tương tự. Ví dụ về các thiết bị lọc thích hợp bao gồm nhưng không bị 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 mà không phải là lọc.

Mặc dù các cải tiến trong quy trình sản xuất nêu trên giảm đến mức tối thiểu lượng hao hụt IgG ở các bước ban đầu của quy trình tinh chế, các tạp chất quan trọng bao gồm các chất có hoạt tính PKA, hoạt tính phân giải amit, và fibrinogen, là lớn hơn nhiều khi, ví dụ, bột nhão 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 (xem: Ví dụ 2 đến Ví dụ 5).

Để chống lại việc các tạp chất chiết được trong các phương pháp theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng độ tinh khiết của chế phẩm chứa 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 bước bổ sung các hạt silic đioxit nghiền mịn (ví dụ, silic oxit dạng khói,

Aerosil®) sau đó ủ trong thời gian từ 40 đến 80 phút, trong thời gian này huyền phù được trộn liên tục. Theo một số phương án nhất định, thời gian ủ nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút, hoặc khoảng 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 phút, hoặc dài hơn. Nói chung, 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 nhất định, việc xử lý 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, 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 tìm thấy trong Ví dụ 17. Trong ví dụ này, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III được tạo huyền phù và chia thành hai mẫu, một mẫu được làm trong bằng chất trợ lọc 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 (Hình 7B). Như có thể thấy được 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 của IgG cao hơn nhiều so với mẫu chỉ được xử lý bằng chất trợ lọc (68,8% so với 55,7%; so sánh lần lượt bảng 17 và bảng 18).

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

Theo các phương án nhất định, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm chứa IgG với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Theo một phương án khác, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm chứa IgG với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 5g/g protein. Theo một phương án khác, SiO_2 được bổ sung vào chế phẩm chứa IgG với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,02g/g protein đến 4g/g protein. Theo một phương án, SiO_2 được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng ít nhất 0,1g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,2g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,25g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 1g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2,5g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác nữa, silic đioxit nghiền mịn được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,01g/g tổng lượng protein hoặc ít nhất 0,02g, 0,03g, 0,04g, 0,05g, 0,06g, 0,07g, 0,08g, 0,09g, 0,1g, 0,2g, 0,3g, 0,4g, 0,5g, 0,6g, 0,7g, 0,8g, 0,9g, 1,0g, 1,5g, 2,0g, 2,5g, 3,0g, 3,5g, 4,0g, 4,5g, 5,0g, 5,5g, 6,0g, 6,5g, 7,0g, 7,5g, 8,0g, 8,5g, 9,0g, 9,5g, 10,0g hoặc lớn hơn cho mỗi gam protein toàn phần.

Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc, ví dụ Celpure C300 (Celpure) hoặc Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), sẽ 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 với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg bột nhão II+III đến 1,0kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg bột nhão II+III đến 0,8kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg bột nhão II+III đến 0,7kg/kg bột nhão II+III. Theo các phương án khác, chất trợ lọc có thể được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg bột nhão II+III đến 0,07kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg bột nhão II+III đến 0,06kg/kg bột nhão II+III hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg bột nhão II+III đến 0,05kg/kg bột nhão II+III. Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc này sẽ được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng khoảng 0,01kg/kg bột nhão

II+III hoặc khoảng 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0kg/kg bột nhão II+III.

Phân đoạn đáng kể của IgG bị hao hụt ở bước lọc của quy trình sản xuất GAMMAGARD® LIQUID. Đã phát hiện ra rằng các phương pháp rửa sau lọc hiện có, bằng cách sử dụng 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. Đã bất ngờ phát hiện ra rằng cần đến ít nhất 3,0 thể tích chết, tốt hơn là 3,6 thể tích chết, đệm huyền phù để thu hồi một cách hữu hiệu tổng lượng IgG trong huyền phù đã được làm trong chứa Phân đoạn II+III cải biến (xem: Ví dụ 12 và Hình 1). Theo một số phương án nhất định, thiết bị lọc ép có thể được rửa bằng đệm huyền phù thích hợp. Theo một phương án cụ thể, đệm rửa sẽ chứa, ví dụ, 5mM natri phosphat monobazơ, 5mM axetat, và 0,015% axit axetic băng (thể tích).

Theo một khía cạnh, việc cải tiến đề cập đến phương pháp trong đó giảm được lượng IgG hao hụt ở toàn bộ bước lọc huyền phù chứa Phân đoạn II+III. Theo một phương án, thực hiện quy trình cải tiến bằng cách lọc sau rửa bằng ít nhất khoảng 3,6 thể tích chết đệm hòa tan chứa 150ml axit axetic băng cho 1000l. Mỗi quan hệ giữa lượng axit axetic băng và độ pH trong đệm sau rửa được thể hiện trên Hình 10. Theo một phương án, độ pH của đệm chiết sau rửa nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,3. Theo một phương án được ưu tiên, độ pH của đệm sau rửa nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,2. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của đệm sau rửa nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,1. Theo một phương án được ưu tiên khác, độ pH của 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 đã được tạo ra ở bước làm kết tủa thứ hai (GAMMAGARD® LIQUID), theo một vài phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra IgG với hiệu suất và độ tinh khiết gia tăng trong huyền phù chứa Phân đoạn II+III đã được làm trong. Theo một khía cạnh, việc cải tiến đề cập đến phương pháp trong đó giảm được lượng IgG hao hụt trong bánh lọc chứa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một khía cạnh khác, việc cải tiến đề cập đến phương pháp trong đó giảm được lượng tạp chất phát hiện được trong huyền phù chứa Phân đoạn II+III đã được làm trong.

Theo một phương án, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khối trước khi lọc hoặc việc làm trong bằng cách ly tâm huyền phù chứa Phân đoạn II+III. Theo các phương án nhất định, việc xử lý bằng silic oxit dạng khối sẽ bao gồm việc bổ sung 0,01kg/kg bột nhão II+III đến 0,07kg/kg bột nhão II+III hoặc 0,02kg/kg bột nhão II+III đến 0,06kg/kg bột nhão II+III hoặc 0,03kg/kg bột nhão II+III đến 0,05kg/kg bột nhão II+III hoặc khoảng 0,02kg/kg bột nhão II+III, 0,03kg/kg bột nhão II+III, 0,04kg/kg bột nhão II+III, 0,05kg/kg bột nhão II+III, 0,06kg/kg bột nhão II+III, 0,07kg/kg bột nhão II+III, 0,08kg/kg bột nhão II+III, 0,09kg/kg bột nhão II+III hoặc 0,1kg/kg bột nhão II+III và hỗn hợp này sẽ được ủ trong thời gian nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút hoặc khoảng 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 phút hoặc dài hơn ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Theo một phương án khác, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khối mà nó làm giảm lượng fibrinogen dư, hoạt tính phân giải amit và/hoặc chất có hoạt tính hoạt hoá prekallikrein. Theo phương án cụ thể, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khối mà làm giảm lượng FXI, FXIa, FXII và FXIIa trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch.

Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến quy trình này 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 chứa Phân đoạn II+III cải biến. Theo một số phương án nhất định, thiết bị lọc được rửa bằng 3,5 lần thể tích đến 4,5 lần 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 lần thể tích chết của thiết bị lọc. Theo một phương án cụ thể, thiết bị lọc ép được rửa bằng đệm huyền phù với lượng ít nhất khoảng 3,6 lần thể tích chết của thiết bị.

6. Xử lý bằng chất tẩy rửa

Để loại bỏ các tạp chất khác ra khỏi dịch lọc chứa Phân đoạn II+III cải biến, mẫu được xử lý tiếp bằng chất tẩy rửa. Các phương pháp để xử lý các phân đoạn thu được từ huyết tương bằng chất tẩy rửa là đã biết trong lĩnh vực này. Nói chung, phương pháp xử lý bằng chất tẩy rửa không ion tiêu chuẩn có thể được sử dụng cùng với các phương pháp nêu

trong bản mô tả sáng chế. Ví dụ, quy trình xử lý bằng chất tẩy rửa làm ví dụ được đưa ra dưới đây.

Một cách vắn tắt, polysorbat-80 được bổ sung vào dịch lọc chứa Phân đoạn II+III cải biến ở nồng độ cuối bằng khoảng 0,2% (khối lượng/thể tích) đồng thời khuấy và mẫu này 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 này 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 nhất định, 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 bị giới hạn ở, Octylglucoside, Digitonin, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (tức là polysorbate-20), Tween-80 (tức là polysorbate-80), alkyl poly(etylen oxit), chất tẩy rửa Brij, alkylphenol poly(etylen oxit), poloxam, octyl glucosit, dexyl maltosit, và các chất tẩy rửa tương tự.

Theo một phương án, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách bổ sung các chất phản ứng có tính tẩy rửa (ví dụ, polysorbate-80 và natri xitrat dehydrat) 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 chứa Phân đoạn II+III cải biến trong khi mẫu này được trộn để đảm bảo phân phối nhanh chóng các chất phụ gia. Theo một số phương án nhất định, tốt hơn là bổ sung các chất phản ứng rắn bằng cách rắc các chất rắn này trên một vùng 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 dưới dạng dòng chảy.

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

Để loại bỏ một vài protein nhỏ còn lại, như albumin và transferin, bước làm kết tủa thứ ba được thực hiện ở nồng độ 25% rượu. Tóm lại, 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 này đến nồng độ cuối bằng khoảng 25% (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 (tức là chất kết tủa G). Theo một phương án, hỗn hợp này được ủ trong ít nhất 2 giờ, hoặc trong 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 dài hơn. Theo một phương án được ưu tiên, hỗn hợp 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, việc cải tiến quy trình đề cập đến phương pháp trong đó giảm lượng IgG hao hụt trong phân đoạn dịch nổi của bước làm kết tủa thứ ba. Theo một số phương án nhất định, thực hiện cải tiến quy trình này 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 để làm kết tủa. Theo một phương án khác, thực hiện cải tiến quy trình bằng cách duy trì độ pH của dung dịch này đến trị số nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,2 liên tục trong 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 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 để làm kết tủa. Theo một phương án cụ thể, độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến 7,0 ngay sau khi hoặc trong khi bổ sung rượu để làm kết tủa. Theo một số phương án nhất định, độ pH của dung dịch được duy trì ở trị số nằm trong khoảng từ 6,9 đến 7,1 liên tục trong thời gian ủ kết tủa, hoặc ở độ pH bằng khoảng 7,0 liên tục trong thời gian ủ kết tủa. Như vậy, theo một số phương án nhất định, 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 này được điều chỉnh trước khi mà không phải sau khi thêm rượu để làm 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 để làm kết tủa và/hoặc dung dịch 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 nhất định, 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 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, đệm chiết lạnh được sử dụng để tạo lại huyền phù PptG. Một cách vắn tắt, chất kết tủa G được hoà tan theo tỷ lệ 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 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 gia tăng độ hoà tan của IgG, độ dẫn điện riêng của huyền phù này 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. 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 hòa 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. Nói chung, dung dịch thích hợp để chiết chất kết tủa G bao gồm WFI và đệm có độ dẫn điện riêng thấp. Theo một phương án, đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng nhỏ hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên, đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng nhỏ 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, đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng nhỏ hơn khoảng 6mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên khác, đệm có độ dẫn điện riêng thấp

có độ dẫn điện riêng nhỏ hơn khoảng 4mS/cm. Theo một phương án được ưu tiên khác, đệm có độ dẫn điện riêng thấp có độ dẫn điện riêng nhỏ hơn khoảng 2mS/cm.

9. Xử lý bằng chất tẩy rửa và dung môi

Để làm bất hoạt các tạp chất là các virus khác nhau có thể có mặt trong sản phẩm thu được từ huyết tương, tiếp theo dịch lọc PptG trong được xử lý bằng chất tẩy rửa và dung môi(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: Pelletier JP *et al.*, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(1):205-42). Nói chung, quy trình xử lý S/D tiêu chuẩn có thể được sử 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 vắn tắt, Triton X-100, Tween-20, và tri(n-butyl)phosphat (TNBP) được lần lượt bổ sung vào dịch lọc PptG đã được làm trong ở nồng độ cuối 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 thời gian ít nhất khoảng một giờ.

Theo một phương án, thực hiện quy trình cải tiến bằng cách bổ sung các chất phản ứng S/D (ví dụ, Triton X-100, Tween-20, và TNBP) 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 chất rắn vào dịch lọc PptG đã được làm trong trong khi dịch lọc này được trộn để đảm bảo phân phối nhanh chóng các hợp phần S/D. Theo một số phương án nhất định, tốt hơn là các chất phản ứng rắn được bổ sung vào bằng cách rắc các chất rắn này trên một vùng 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 tinh chế tiếp và cô IgG ra khỏi dịch lọc PptG đã được xử lý S/D, có thể sử dụng phương pháp 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 phương pháp 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 chứa

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 bằng sắc ký không hề dựa trên nguyên lý kết tủa bằng rượu. Công bố đơn quốc tế số WO 2005/073252 mô tả phương pháp tinh chế IgG bao gồm bước chiết chất kết tủa chứa 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 bước chiết chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III hoặc chất kết tủa chứa 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 chứa 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 độ xốp lớn được vận hành 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 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, IgG này sau đó được rửa giải ra khỏi cột bằng 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 sử dụng để loại bỏ các chất phản ứng S/D ra khỏi quy trình điều chế, cô dung dịch chứa IgG, hoặc đồng thời cả hai mục đích này. Theo một số phương án nhất định, 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 đệm rửa giải bằng khoảng $8,5 \pm 0,1$.

Theo một số phương án nhất định, dung dịch rửa giải từ 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 đệm thích hợp sao cho độ dẫn điện riêng của dung dịch này giảm. Theo một số phương án nhất định, độ pH của dung dịch rửa giải trong quá trình 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 dung dịch rửa giải được điều chỉnh đến độ pH bằng khoảng $6,0 \pm 0,1$. Tiếp theo, dung dịch rửa giải được nạp vào cột trao đổi anion, cột này liên kết một vài tạp chất được tìm thấy trong chế phẩm này. Dòng chảy ra từ cột, chứa phân đoạn IgG, được thu hồi trong suốt quá trình nạp cột và rửa. Theo một số phương án nhất định, các bước sắc ký trao đổi ion theo sáng chế có thể được thực hiện theo kiểu cột, kiểu mẻ, hoặc phương thức hỗn hợp gồm cả hai kiểu này.

Theo một số phương án nhất định, thực hiện quy trình cải tiến bằng cách bổ sung dung dịch 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 chứa 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 nhất định, 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 bị giới hạn ở, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, và 75N (Planova). 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 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 một cách đặc biệt gần cuối quy trình sản xuất giúp tạo ra chế phẩm chứa IgG có nồng độ protein cao gấp khoảng hai lần (200mg/ml) so với nồng độ

protein của chế phẩm chứa 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, nồng độ IgG bằng 200mg/mL không thể đạt được mà không làm thiếu hụt nghiêm trọng 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, cấu hình màng kênh mở đã được sử dụng. Ngay cả với màng kênh mở, một quy trình rửa sau đó được thiết kế một cách đặc biệt đã được sử dụng để thu được nồng độ mong muốn mà không làm thiếu hụt nghiêm trọng protein (lượng hao hụt nhỏ hơn 2%). Thậm chí, đáng ngạc nhiên hơn là nồng độ protein cao hơn 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 nhất định, bước siêu lọc được thực hiện trong thiết bị với lưới kênh mở và màng siêu lọc có giới hạn phân tử lượng danh nghĩa (nominal molecular weight cut off - NMWCO) nhỏ hơn khoảng 100kDa hoặc nhỏ hơn khoảng 90kDa, 80kDa, 70kDa, 60kDa, 50kDa, 40kDa, 30kDa hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án được ưu tiên, màng siêu lọc có NMWCO không lớn hơn 50kDa.

Sau khi hoàn thành bước siêu lọc, phần cô có thể được cô tiếp bằng cách lọc thẩm tách dựa vào dung dịch thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch hoặc tiêm bắp. Theo một số phương án nhất định, 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 0,26mM, hoặc ở nồng độ bằng khoảng 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, hoặc 3,0. Theo một phương án được ưu tiên, 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 phần cô ban đầu hoặc ít nhất khoảng 4, 5, 6, 7, 8, 9 lần thể tích phần cô 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 khoảng 5%, hoặc 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% hoặc lớn hơn. Theo một phương án, đạt được nồng độ protein cuối ít nhất khoảng 23% mà không cần bổ sung phân đoạn rửa sau đó vào dung dịch đã được cô. Theo một phương án khác, đạt được nồng độ protein cuối ít nhất khoảng 24% mà không cần bổ sung phân đoạn rửa sau đó vào dung dịch được cô. Đạt được nồng độ protein cuối ít nhất khoảng 25% mà không cần bổ sung phân đoạn rửa sau đó vào dung dịch này được cô. Nói chung, ở cuối quy trình cô đặc, độ pH của dung dịch nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,1.

Theo một phương án làm ví dụ, độ pH của chế phẩm chứa IgG được điều chỉnh đến 4,5 trước khi siêu lọc. Dung dịch này được cô đến nồng độ protein $5\% \pm 2\%$ khối lượng/thể tích nhờ siêu lọc. Màng UF có giới hạn phân tử lượng danh nghĩa (NMWCO) bằng 50.000 Dalton hoặc thấp hơn (màng Millipore Pellicon Polyether sulfon). Phần cô được lọc thẩm tách dùng mười lần thể tích dung dịch glyxin 0,25M, độ pH $4,5 \pm 0,2$. Trong toàn bộ thời gian lọc thẩm tách, dung dịch này được duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C. Sau khi 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 này được điều chỉnh bằng 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 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 được bảo chế được làm vô trùng tiếp bằng cách lọc qua thiết bị lọc màng có cỡ lỗ tuyệt đối không lớn hơn 0,22 micron, ví dụ, khoảng 0,2 micron. Tiếp theo, dung dịch này được nạp vô khuẩn vào trong thùng chứa cuối để nút kín một cách hợp lý, đồng thời lấy mẫu để kiểm tra.

Theo một phương án, chế phẩm chứa IgG được điều chỉnh tiếp đến nồng độ khoảng $10,2 \pm 0,2\%$ (khối lượng/thể tích) bằng 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 khoảng 30°C .

B. Yếu tố H

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương. Theo một phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm chứa Yếu tố H để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu protein chứa Yếu tố H thứ nhất để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu protein chứa Yếu tố H thứ nhất được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu protein chứa Yếu tố H thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu lần thứ hai, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu protein chứa Yếu tố H thứ nhất được

chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) làm giàu Yếu tố H thứ nhất để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) làm giàu Yếu tố H thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu Yếu tố H sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu Yếu tố H được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza thu được từ huyết tương trong chế phẩm chứa Yếu tố H phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) làm giàu Yếu tố H thứ nhất để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (d) làm giàu Yếu tố H thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, serin

proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Tương tự, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) làm giàu Yếu tố H thứ nhất để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) làm giàu Yếu tố H thứ hai để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (e) làm giàu Yếu tố H thứ ba để tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ ba. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 101 đến Var. 1100, nêu trong Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 10 hoặc Bảng 11.

1. Các phương pháp bào chế Yếu tố H thu được từ huyết tương

Về quy trình sản xuất, các quy trình yêu cầu bảo hộ bắt đầu từ huyết tương người là dựa trên việc phân đoạn các chất trung gian công nghiệp thông thường thu được, ví dụ, bằng cách làm kết tủa phân đoạn bằng etanol trong điều kiện lạnh (xem: Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. Volume I: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317). Theo một phương án được ưu tiên, quy trình tinh chế này là việc tinh chế Yếu tố H chức năng ra khỏi các phân đoạn phụ của quá trình phân đoạn huyết tương ở quy mô công nghiệp theo cách sao cho các quy trình bào chế các sản phẩm huyết tương đã biết và đã được cấp phép, dưới sự kiểm soát của các nhà quản lý dược phẩm, như globulin miễn dịch, không bị ảnh hưởng.

Ví dụ, bánh lọc thu được sau khi lọc huyền phù bột nhão chứa Phân đoạn II+III (xem: Teschner W *et al.*, *Vox Sang.* 2007 Jan;92(1):42-55), Phân đoạn I chất kết tủa (xem: Cohn *et al.*, (1946) *nêu trên*), Chất kết tủa III (xem: Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. Volume I: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317, trang 253) và chất kết tủa B (phương pháp của Kistler và Nitschmann; *nêu trên ở trang 253*) là các ví dụ về các nguồn Yếu tố H trong công nghiệp. Bắt đầu từ các phân đoạn phụ này, các quy trình tinh chế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tinh chế Yếu tố H. Các quy trình này có thể được dựa trên việc làm kết tủa bằng polyetylen glycol (xem: Nagasawa S, Stroud R M; *Mol Immunol* 1980; 17:1365-72), phương pháp sắc ký ái lực nhờ heparin được cố định (như đã trích dẫn trên đây), phương pháp sắc ký trao đổi ion (xem: Crossley L G, Porter R R; *Biochem J* 1980; 191:173-82) và phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước (xem: Ripoché J, Al Salihi A, Rousseaux J, Fontaine M; *Biochem J* 1984; 221, 89-96).

Theo một phương án, nguyên liệu ban đầu dùng cho sáng chế được điều chế bằng cách sử dụng các phân đoạn Cohn. Quá trình phân đoạn này là quá trình phân đoạn nổi tiếng được sử dụng để điều chế các chế phẩm chứa globulin miễn dịch có thể được điều chế từ huyết thanh của thể cho hoặc globulin miễn dịch đơn dòng vô tính hoặc tái tổ hợp. Trong ví dụ điển hình, máu được gom từ các thể cho khỏe mạnh. Nói chung, máu được gom từ cùng loài động vật với đối tượng sẽ được dùng chế phẩm chứa globulin miễn dịch (thường được gọi là globulin miễn dịch "đồng nhất"). Các globulin miễn dịch này phân lập được từ máu theo các quy trình thích hợp, ví dụ như, quy trình phân đoạn Cohn, siêu ly tâm, điều chế theo phép điện di, phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch, phân đoạn bằng polyetylen glycol hoặc các phương pháp tương tự. (ví dụ, xem tài liệu: 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; toàn bộ nội dung phần mô tả của các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích). Theo một phương án, sáng chế sử dụng các phân đoạn phế phẩm từ quy trình điều chế globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể,

sáng chế sử dụng phân đoạn có trong bánh lọc SiO₂ khi chiết phẩm chứa Phân đoạn II+III được lọc.

Nói chung, chế phẩm chứa Yếu tố H theo sáng chế có thể được bào chế từ các nguyên liệu ban đầu thích hợp bất kỳ, ví dụ, huyết tương thu hồi được hoặc huyết tương nguồn. Trong ví dụ điển hình, máu hoặc huyết tương được gom từ các thể cho khỏe mạnh. Nói chung, máu được gom từ cùng loài động vật với đối tượng sẽ được dùng chế phẩm chứa Yếu tố H (thường được gọi là Yếu tố H “đồng nhất”). Yếu tố H được phân lập từ máu hoặc huyết tương theo các quy trình thích hợp, như, ví dụ, kết tủa (phân đoạn bằng rượu hoặc phân đoạn bằng polyetylen glycol), các phương pháp sắc ký (phép sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp sắc ký ái lực miễn dịch, v.v.) siêu ly tâm và bào chế theo phép điện di và các phương pháp tương tự. (Ví dụ, xem tài liệu: Cohn et al., *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Deutsch et al., *J. Biol. Chem.* 164:109-118; Oncley et al., *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Cohn et al., *J. Am. Chem. Soc.* 72:465-474 (1950); Cohn et al., *Blood Cells and Plasma Proteins: Their State in Nature* (J.L. Tullis, ed), pp. 1-58, Academic Press, New York and London (1953); Nitschmann et al., *Helv. Chim. Acta* 37:866-873; Kistler and Nitschmann, *Vox Sang.* 7:414-424 (1962); 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; toàn bộ nội dung phân mô tả của các tài liệu này được đưa vào bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích).

Theo các phương án nhất định, Yếu tố H thu hồi được từ các nguyên liệu phế phẩm khác trong quy trình bào chế các sản phẩm máu thương mại quan trọng khác bằng cách phân đoạn huyết tương. Ví dụ, theo phương án làm ví dụ, Yếu tố H được chiết ra khỏi chất kết tủa chứa Phân đoạn I và/hoặc chiết từ bánh lọc đã được tạo ra sau khi ly tâm hoặc lọc bột nhão chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù. Tốt hơn, nếu theo các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, việc bào chế Yếu tố H ở quy mô công nghiệp có thể đạt được mà không cần bổ sung huyết tương đầu vào hoặc thiết kế lại và phê duyệt lại các quy trình bào chế hiện có đối với các sản phẩm máu thu được từ huyết tương thương mại quan trọng khác, như globulin IgG gamma để dùng qua đường tĩnh mạch (IVIG) hoặc dưới da.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm từ huyết tương bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi phân đoạn huyết tương và làm giảm hàm lượng FXI, FXIa, FXII và/hoặc FXIIa theo phương pháp xử lý bằng SiO_2 được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) kết tủa protein ra khỏi phân đoạn nghèo huyết tương trong điều kiện lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, với lượng rượu 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 dịch nổi thứ nhất; (b) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dịch nổi thứ nhất, ở bước làm kết tủa thứ hai, với lượng rượu 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; (c) tạo lại huyền phù chất kết tủa thứ hai để tạo ra huyền phù; (d) trộn silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn với huyền phù thu được ở bước (c); (e) tách huyền phù để tạo ra bánh lọc và dịch nổi; và (f) chiết Yếu tố H ra khỏi bánh lọc SiO_2 trong điều kiện dung dịch có khả năng làm giảm hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm cuối cùng. Theo phương án được ưu tiên, bánh lọc này được tách ra khỏi dịch nổi bằng cách lọc huyền phù qua thiết bị lọc ép có bộ lọc thích hợp. Theo một phương án, Yếu tố H có thể được chiết bằng cách tuần hoàn đệm chiết qua thiết bị lọc ép chứa bánh lọc.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu với hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm từ huyết tương bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi chất kết tủa chứa Phân đoạn I.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) kết tủa protein ra khỏi phân đoạn nghèo huyết tương trong điều kiện lạnh, ở bước làm kết tủa thứ nhất, với lượng rượu 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 dịch nổi thứ nhất; (b) chiết Yếu tố H ra khỏi chất kết tủa bằng đệm chiết Yếu tố H và (c) giảm hàm lượng serin proteaza hoặc tiền

enzym serin proteaza bằng cách xử lý chế phẩm này bằng SiO_2 , bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu từ huyết tương, bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi nguồn dự trữ của hai hoặc nhiều phân đoạn sản phẩm phụ để bào chế đã được tạo ra bằng quy trình được thiết kế để tạo ra protein máu thứ hai, ví dụ, globulin IgG gama. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước gộp chất kết tủa chứa Phân đoạn I và bánh lọc chứa phân đoạn II+III đã được tạo ra trong quá trình bào chế globulin IgG gama (ví dụ, IVIG) và chiết Yếu tố H ra khỏi các phân đoạn đã được gộp lại.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm có thể được tinh chế tiếp sau khi chiết ra khỏi chất kết tủa chứa Phân đoạn I và/hoặc bánh lọc chứa Phân đoạn II+III. Một số phương pháp khác nhau sẵn có để tinh chế tiếp Yếu tố H, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, bước làm kết tủa hoặc phân đoạn bổ sung, phương pháp sắc ký ái lực, phương pháp sắc ký trao đổi ion, phương pháp sắc ký tương tác kỵ nước, phép sắc ký loại cỡ, xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa (S/D), lọc nano, siêu lọc, lọc thẩm tách và các phương pháp tương tự.

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm việc làm kết tủa các tạp chất ra khỏi chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo các phương án nhất định, bước này bao gồm việc làm kết tủa ít nhất một tạp chất, ví dụ, lipid hoặc protein, ra khỏi chế phẩm này và sau đó tách chất kết tủa đó ra khỏi dịch nổi chứa Yếu tố H. Tùy ý, sau đó Yếu tố H có thể được kết tủa ra khỏi dịch nổi trong chất kết tủa riêng biệt.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm chứa Yếu tố H được chiết ra khỏi phân đoạn huyết tương (ví dụ, chất kết tủa chứa Phân đoạn I, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III, Chất kết tủa B kết tủa, v.v.) được làm giàu tiếp bằng cách làm kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi dung dịch này bằng cách sử dụng PEG với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 2,5% đến 7,5%. Theo một phương án khác, PEG được sử dụng với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo một phương án khác, PEG được sử dụng với nồng độ cuối

cùng nằm trong khoảng từ 4% đến 6%. Theo phương án khác nữa, PEG được sử dụng với nồng độ cuối cùng khoảng 5%.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa Yếu tố H được chiết ra khỏi phân đoạn huyết tương (ví dụ, chất kết tủa chứa Phân đoạn I, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III, Chất kết tủa B kết tủa, v.v.) được làm giàu tiếp bằng cách làm kết tủa Yếu tố H ra khỏi dung dịch này bằng cách sử dụng PEG với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 9% đến 15%. Theo một phương án khác, PEG được sử dụng với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 14%. Theo một phương án khác, PEG được sử dụng với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 11% đến 13%. Theo phương án khác nữa, PEG được sử dụng với nồng độ cuối cùng khoảng 12%.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa Yếu tố H được chiết ra khỏi phân đoạn huyết tương (ví dụ, chất kết tủa chứa Phân đoạn I, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III, Chất kết tủa B kết tủa, v.v.) được làm giàu tiếp bằng cách (a) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi dung dịch này; (b) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dung dịch này; và (c) thu hồi chất kết tủa chứa Yếu tố H. Theo các phương án nhất định, bước làm kết tủa được thực hiện bằng rượu (ví dụ, metanol hoặc etanol), PEG hoặc hỗn hợp của chúng. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa được thực hiện bằng PEG. Theo các phương án nhất định, hàm lượng PEG của bước làm kết tủa thứ nhất nằm trong khoảng từ 2,5% đến 7,5% và hàm lượng PEG của bước làm kết tủa thứ hai nằm trong khoảng từ 9% đến 15%. Theo phương án cụ thể, hàm lượng PEG của bước thứ nhất nằm trong khoảng từ 4% đến 6% và hàm lượng PEG của bước thứ hai nằm trong khoảng từ 11% đến 13%. Theo phương án cụ thể hơn, hàm lượng PEG của bước làm kết tủa thứ nhất khoảng 5% và hàm lượng PEG của bước làm kết tủa thứ hai khoảng 12%. Theo các phương án khác nữa, hàm lượng PEG của bước làm kết tủa thứ nhất và thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm các biến số từ Var. 1101 đến Var. 1221, được nêu trong Bảng 16.

Bảng 16. Hàm lượng PEG để làm giàu chế phẩm chứa Yếu tố H.

Hàm lượng PEG – Bước làm kết tủa thứ nhất												
		2,5%	3,0%	3,5%	4,0%	4,5%	5,0%	5,5%	6,0%	6,5%	7,0%	7,5%

Hàm lượng PEG – Bước làm kết tủa thứ hai	2,5%	Var. 1101	Var. 1112	Var. 1123	Var. 1134	Var. 1145	Var. 1156	Var. 1167	Var. 1178	Var. 1189	Var. 1200	Var. 1211
	3,0%	Var. 1102	Var. 1113	Var. 1124	Var. 1135	Var. 1146	Var. 1157	Var. 1168	Var. 1179	Var. 1190	Var. 1201	Var. 1212
	3,5%	Var. 1103	Var. 1114	Var. 1125	Var. 1136	Var. 1147	Var. 1158	Var. 1169	Var. 1180	Var. 1191	Var. 1202	Var. 1213
	4,0%	Var. 1104	Var. 1115	Var. 1126	Var. 1137	Var. 1148	Var. 1159	Var. 1170	Var. 1181	Var. 1192	Var. 1203	Var. 1214
	4,5%	Var. 1105	Var. 1116	Var. 1127	Var. 1138	Var. 1149	Var. 1160	Var. 1171	Var. 1182	Var. 1193	Var. 1204	Var. 1215
	5,0%	Var. 1106	Var. 1117	Var. 1128	Var. 1139	Var. 1150	Var. 1161	Var. 1172	Var. 1183	Var. 1194	Var. 1205	Var. 1216
	5,5%	Var. 1107	Var. 1118	Var. 1129	Var. 1140	Var. 1151	Var. 1162	Var. 1173	Var. 1184	Var. 1195	Var. 1206	Var. 1217
	6,0%	Var. 1108	Var. 1119	Var. 1130	Var. 1141	Var. 1152	Var. 1163	Var. 1174	Var. 1185	Var. 1196	Var. 1207	Var. 1218
	6,5%	Var. 1109	Var. 1120	Var. 1131	Var. 1142	Var. 1153	Var. 1164	Var. 1175	Var. 1186	Var. 1197	Var. 1208	Var. 1219
	7,0%	Var. 1110	Var. 1121	Var. 1132	Var. 1143	Var. 1154	Var. 1165	Var. 1176	Var. 1187	Var. 1198	Var. 1209	Var. 1220
	7,5%	Var. 1111	Var. 1122	Var. 1133	Var. 1144	Var. 1155	Var. 1166	Var. 1177	Var. 1188	Var. 1199	Var. 1210	Var. 1221

Theo các phương án nhất định, phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu còn bao gồm ít nhất một, tốt hơn là hai, bước sắc ký để làm gia tăng tiếp độ tinh khiết của chế phẩm này. Nói chung, phương pháp sắc ký thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để làm giàu tiếp chế phẩm chứa Yếu tố H, ví dụ, chiết ra khỏi chất kết tủa chứa Phân đoạn I hoặc bánh lọc chứa Phân đoạn II+III. Theo các phương án nhất định, trước khi làm giàu theo phương pháp sắc ký, chế phẩm chứa Yếu tố H chiết được sẽ được cho qua một hoặc nhiều bước làm kết tủa bổ sung, như được mô tả trên đây, để làm giảm các tạp chất có mặt trong chế phẩm này, làm giảm thể tích nạp cho bước sắc ký, và/hoặc trao đổi đệm của chế phẩm này.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa Yếu tố H có thể được làm giàu tiếp bằng bước sắc ký bao gồm sắc ký trao đổi anion (AEC), sắc ký trao đổi cation (CEC), sắc ký ái lực heparin, sắc ký trao đổi kỵ nước (HIC), sắc ký hydroxyapatit (HAP), sắc ký ái lực miễn dịch, phép sắc ký loại cỡ (tức là lọc gel) hoặc bước sắc ký thích hợp khác. Bước sắc ký có thể được thực hiện theo kiểu mẻ hoặc cột.

Theo phương án được ưu tiên, phương pháp này bao gồm bước áp dụng sắc ký trao đổi anion và sắc ký ái lực heparin.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này để bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu còn bao gồm ít nhất một, tốt hơn nếu ít nhất là hai, tốt nhất nếu ít nhất là ba, bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus mà có thể được sử dụng trong các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm xử lý bằng chất tẩy rửa dung môi (xem: Horowitz *et al.*, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 và Kreil *et al.*, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, toàn bộ nội dung của cả hai tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích), lọc nano (xem: Hamamoto *et al.*, *Vox Sang* 1989 (56)230-236 và Yuasa *et al.*, *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, toàn bộ nội dung của cả hai tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích), ủ trong điều kiện độ pH thấp và nhiệt độ cao (xem: Kempf *et al.*, *Transfusion* 1991 (31)423-427 và Louie *et al.*, *Biologicals* 1994 (22):13-19) và xử lý nhiệt chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm đông khô nhanh (xem: Piskiewicz *et al.*, *Thromb Res.* 1987 Jul 15;47(2):235-41; Piskiewicz *et al.*, *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989;(56):44-54; Epstein and Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* 1990 Mar;114(3):335-40).

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu an toàn về mặt virus có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm bao gồm các bước (i) chiết Yếu tố H ra khỏi bánh lọc chứa Phân đoạn II+III bằng cách sử dụng SiO₂, (ii) làm kết tủa thứ nhất để làm kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chế phẩm chứa Yếu tố H, (iii) làm kết tủa thứ hai để làm kết tủa Yếu tố H ra khỏi chế phẩm này và (iv) thực hiện ít nhất một bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu an toàn về mặt virus. Theo một phương án, bước làm kết tủa là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, hàm lượng PEG của bước làm kết tủa thứ nhất và thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm các biến số từ Var. 1101 đến Var. 1221, được nêu trong Bảng 16.

2. Cùng gắn kết và rửa giải biệt hóa

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm cùng chiết Yếu tố H và serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi chế phẩm thu được từ huyết tương đã được gộp lại bằng cách gắn kết protein vào silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn, rửa giải serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch thứ nhất và tiếp theo rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm ban đầu là chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù hoặc chất kết tủa tương đương của chúng.

Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; (c) rửa giải serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch, trong đó Yếu tố H vẫn được gắn kết; và (d) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 .

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H vẫn được gắn kết được dùng để chỉ điều kiện rửa giải có chọn lọc serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza, trong khi phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% Yếu tố H gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% Yếu tố H gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% Yếu tố H gắn kết với SiO_2 . Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% Yếu tố H gắn kết với SiO_2 hoặc lượng ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn của Yếu tố H gắn kết với SiO_2 .

Theo các phương án nhất định, việc rửa giải biệt hóa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và Yếu tố H được thực hiện bằng cách cho tiếp xúc một cách liên tục (tức là rửa giải từng bước) với SiO_2 trong điều kiện dung dịch thứ nhất (ví dụ, đệm rửa giải thứ nhất) thích hợp để rửa giải phần lớn serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H gắn kết và điều kiện dung dịch thứ hai (ví dụ, đệm rửa giải thứ hai) thích hợp để rửa giải phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H gắn kết ra khỏi SiO_2 .

Theo các phương án khác, việc rửa giải biệt hóa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và Yếu tố H được thực hiện bằng cách thay đổi một cách từ từ điều kiện dung dịch (tức là rửa giải theo gradien) từ điều kiện dung dịch thứ nhất thích hợp để rửa giải phần lớn serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H gắn kết đến điều kiện dung dịch thứ hai thích hợp để rửa giải phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H gắn kết ra khỏi SiO_2 . Theo cách này, hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 có thể chồng lên nhau một phần. Bằng cách phân đoạn việc rửa giải và xác định đặc điểm của từng phân đoạn, nguồn dự trữ Yếu tố H có thể được tạo ra từ các phân đoạn có hàm lượng Yếu tố H cao và hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza thấp.

Điều kiện dung dịch mà có thể được thay đổi để thu được kết quả mong muốn từ phương pháp được mô tả trên đây bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, độ pH của dung dịch, độ dẫn điện của dung dịch, nhiệt độ của dung dịch, hàm lượng Yếu tố H trong chế phẩm này và hàm lượng SiO_2 dùng trong phương pháp này. Nói chung, khoảng độ pH thích hợp đối với các phương pháp làm giảm hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu nằm trong khoảng từ 3 đến 11. Độ dẫn điện thích hợp đối với các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 100mS/cm. Nhiệt độ thích hợp để thực hiện các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ -10°C đến 90°C . Silic đioxit nghiền mịn có thể được sử dụng với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Cuối cùng, chế phẩm chứa Yếu tố H có thể có hàm lượng thay đổi trong khoảng từ 0,001mg/ml đến 100mg/ml.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 11,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 1,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5. Theo phương án khác nữa, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0.

Theo phương án cụ thể, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ pH khoảng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, độ pH khoảng 7,5. Theo một phương án khác, độ pH khoảng 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH khoảng 3,0 hoặc khoảng 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, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 hoặc 11,0.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ pH ít nhất bằng 6,0. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất bằng 6,5. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, độ pH ít nhất bằng 7,5. Theo các phương án khác nữa, độ pH của dung dịch ít nhất bằng 3,0 hoặc ít nhất bằng 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 hoặc lớn hơn.

Theo một phương án khác của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 9,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH không lớn hơn 11,0 hoặc 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 hoặc nhỏ hơn nữa.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ dẫn điện ít nhất 10mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo các phương án khác nữa, độ dẫn điện của điều kiện dung dịch ít nhất là 2mS/cm hoặc ít nhất là 3mS/cm, 4mS/cm, 5mS/cm, 6mS/cm, 7mS/cm, 8mS/cm, 9mS/cm, 10mS/cm, 11mS/cm, 12mS/cm, 13mS/cm, 14mS/cm, 15mS/cm, 16mS/cm, 17mS/cm, 18mS/cm, 19mS/cm, 20mS/cm, 21mS/cm, 22mS/cm, 23mS/cm, 24mS/cm, 25mS/cm, 26mS/cm, 27mS/cm, 28mS/cm, 29mS/cm, 30mS/cm, 31mS/cm, 32mS/cm, 33mS/cm, 34mS/cm, 35mS/cm, 36mS/cm, 37mS/cm, 38mS/cm, 39mS/cm, 40mS/cm, 41mS/cm, 42mS/cm, 43mS/cm, 44mS/cm, 45mS/cm, 46mS/cm, 47mS/cm, 48mS/cm, 49mS/cm, 50mS/cm, 55mS/cm, 60mS/cm, 65mS/cm, 70mS/cm, 75mS/cm, 80mS/cm, 85mS/cm, 90mS/cm, 95mS/cm, 100mS/cm hoặc lớn hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 100mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 50mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 100mS/cm. Theo phương án khác nữa, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 50mS/cm.

Như được thể hiện trong Ví dụ 5 và được minh họa trên Hình 3, đã phát hiện ra rằng việc sử dụng các điều kiện dung dịch bao gồm độ pH lớn hơn 6,0 (ví dụ, 7,5) và tăng độ dẫn điện (ví dụ, lớn hơn 6,0mS/cm), sẽ làm tăng mức độ rửa giải các serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 và làm giảm mức độ rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 . Tốt hơn, nếu phát hiện này có thể được sử dụng để đề xuất các phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có mặt trong chế phẩm chứa Yếu tố H. Theo phương án cụ thể về các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ dẫn điện ít nhất khoảng 10mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện ít nhất bằng 10mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,5. Theo một phương án khác, điều

kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện ít bằng nhất 20mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện ít nhất bằng 20mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,5.

3. Cùng gắn kết và rửa giải Yếu tố H ưu tiên

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm bước cùng chiết Yếu tố H và serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza từ chế phẩm thu được từ huyết tương được gộp lại bằng cách gắn kết protein vào silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn và rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 trong điều kiện mà phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết vẫn được gắn kết với SiO_2 . Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm ban đầu là chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù hoặc chất kết tủa tương đương của chúng.

Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết.

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết được dùng để chỉ điều kiện rửa giải theo cách ưu tiên Yếu tố H, trong khi phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ

lượng ít nhất 75% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 hoặc lượng ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn của serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 .

Điều kiện dung dịch mà có thể được thay đổi để thu được kết quả mong muốn từ phương pháp được mô tả trên đây bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, độ pH của dung dịch, độ dẫn điện của dung dịch, nhiệt độ của dung dịch, hàm lượng Yếu tố H trong chế phẩm này và hàm lượng SiO_2 trong phương pháp này. Nói chung, khoảng pH thích hợp cho các phương pháp làm giảm hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu nằm trong khoảng từ 3 đến 11. Độ dẫn điện thích hợp đối với các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 100mS/cm. Nhiệt độ thích hợp để thực hiện các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ -10°C đến 90°C . Silic đioxit nghiền mịn có thể được sử dụng với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Cuối cùng, chế phẩm chứa Yếu tố H có thể chứa hàm lượng thay đổi trong khoảng từ 0,001mg/ml đến 100mg/ml.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 11,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 1,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5. Theo phương án khác nữa, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0.

Theo phương án cụ thể, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết có độ pH khoảng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, độ pH khoảng 7,5. Theo một phương án khác, độ pH khoảng 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH bằng 3,0 hoặc khoảng 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, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9,

7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 hoặc 11,0.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết có độ pH ít nhất bằng 6,0. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất bằng 6,5. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, độ pH ít nhất 7,5. Theo các phương án khác nữa, độ pH của dung dịch ít nhất bằng 3,0 hoặc ít nhất bằng 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 hoặc lớn hơn.

Theo một phương án khác, của phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết có độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 9,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH không lớn hơn 11,0 hoặc 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết có độ dẫn điện không lớn hơn 20mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện không lớn hơn 10mS/cm. Theo các phương án khác nữa, độ dẫn điện của điều kiện dung dịch không lớn hơn 20mS/cm hoặc không lớn hơn 19mS/cm, 18mS/cm, 17mS/cm, 16mS/cm, 15mS/cm, 14mS/cm, 13mS/cm, 12mS/cm, 11mS/cm, 10mS/cm, 9mS/cm, 8mS/cm, 7mS/cm, 6mS/cm, 5mS/cm, 4mS/cm, 3mS/cm, 2mS/cm hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được rửa giải ra khỏi SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 20mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 6mS/cm. Theo phương án khác nữa, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 6mS/cm.

Như được thể hiện trong Ví dụ 5 và được minh họa trên Hình 3, đã phát hiện ra rằng việc áp dụng các điều kiện dung dịch bao gồm độ pH lớn hơn 6,0 (ví dụ, 7,5) và làm giảm độ dẫn điện (ví dụ, nhỏ hơn 20mS/cm), sẽ làm tăng mức độ rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ và làm giảm mức độ rửa giải các serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO₂. Tốt hơn, nếu phát hiện này có thể được sử dụng để đề xuất các phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có mặt trong chế phẩm chứa Yếu tố H. Trong các phương pháp theo phương án cụ thể được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được rửa giải ra khỏi SiO₂ và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết có độ dẫn điện không lớn hơn 20mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện không lớn hơn 10mS/cm và độ pH ít nhất 7,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 2mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 2mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,5.

4. Gắn kết ưu tiên của Yếu tố H

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H chứ không phải ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂.

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết với SiO₂ dùng để chỉ điều kiện cho phép Yếu tố H gắn kết theo cách ưu tiên với SiO₂, trong khi phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn không được gắn kết trong dung dịch. Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza

trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu hoặc ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc nhiều hơn, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu.

Các điều kiện dung dịch có thể được thay đổi để thu được kết quả mong muốn từ phương pháp được mô tả trên đây bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, độ pH của dung dịch, độ dẫn điện của dung dịch, nhiệt độ của dung dịch, hàm lượng Yếu tố H trong chế phẩm này và hàm lượng SiO_2 dùng trong phương pháp này. Nói chung, độ pH thích hợp đối với các phương pháp làm giảm hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu nằm trong khoảng từ 3 đến 11. Độ dẫn điện thích hợp đối với các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 100mS/cm. Nhiệt độ thích hợp để thực hiện các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ -10°C đến 90°C . Silic đioxit nghiền mịn có thể được sử dụng với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Cuối cùng, chế phẩm chứa Yếu tố H có thể có hàm lượng thay đổi trong khoảng từ 0,001mg/ml đến 100mg/ml.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 11,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 1,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5. Theo phương án khác nữa, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0.

Theo phương án cụ thể, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ pH khoảng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, độ pH khoảng 7,5. Theo một

phương án khác, độ pH khoảng 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH bằng 3,0 hoặc khoảng 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, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 hoặc 11,0.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO₂ và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ pH ít nhất bằng 6,0. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất bằng 6,5. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, độ pH ít nhất bằng 7,5. Theo các phương án khác nữa, độ pH của dung dịch này ít nhất bằng 3,0 hoặc ít nhất bằng 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 hoặc lớn hơn.

Trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo một phương án khác được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO₂ và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 9,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH không lớn hơn 11,0 hoặc 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO₂ và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ dẫn điện ít nhất 10mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo các phương án khác nữa, độ dẫn điện của điều kiện dung dịch ít nhất bằng 2mS/cm hoặc ít nhất bằng 3mS/cm, 4mS/cm, 5mS/cm, 6mS/cm, 7mS/cm, 8mS/cm, 9mS/cm, 10mS/cm, 11mS/cm, 12mS/cm, 13mS/cm, 14mS/cm, 15mS/cm, 16mS/cm, 17mS/cm, 18mS/cm, 19mS/cm, 20mS/cm, 21mS/cm, 22mS/cm, 23mS/cm, 24mS/cm, 25mS/cm, 26mS/cm, 27mS/cm, 28mS/cm, 29mS/cm, 30mS/cm, 31mS/cm, 32mS/cm, 33mS/cm, 34mS/cm, 35mS/cm, 36mS/cm, 37mS/cm, 38mS/cm, 39mS/cm, 40mS/cm, 41mS/cm, 42mS/cm, 43mS/cm, 44mS/cm, 45mS/cm, 46mS/cm, 47mS/cm, 48mS/cm,

49mS/cm, 50mS/cm, 55mS/cm, 60mS/cm, 65mS/cm, 70mS/cm, 75mS/cm, 80mS/cm, 85mS/cm, 90mS/cm, 95mS/cm, 100mS/cm hoặc lớn hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 100mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 50mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 100mS/cm. Theo phương án khác nữa, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 50mS/cm.

Như được thể hiện trong Ví dụ 5 và được minh họa trên Hình 3, đã phát hiện ra rằng việc sử dụng các điều kiện dung dịch bao gồm độ pH lớn hơn 6,0 (ví dụ, 7,5) và độ dẫn điện cao hơn (ví dụ, cao hơn 6,0mS/cm), sẽ làm giảm ái lực của các serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza với SiO_2 và tăng ái lực của Yếu tố H với SiO_2 . Tốt hơn, nếu phát hiện này có thể được sử dụng để đề xuất các phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có mặt trong chế phẩm chứa Yếu tố H. Trong các phương pháp theo phương án cụ thể được mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H được gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết có độ dẫn điện ít nhất khoảng 10mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện ít nhất bằng 10mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện ít nhất bằng 20mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch bao gồm độ dẫn điện ít nhất bằng 20mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,5.

5. Gắn kết ưu tiên serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước (a) cho chế phẩm chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong

điều kiện thích hợp để gắn kết serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải Yếu tố H; và (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này.

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó Yếu tố H không được gắn kết với SiO₂ được dùng để chỉ điều kiện cho phép serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết ưu tiên với SiO₂, trong khi phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn không được gắn kết trong dung dịch này. Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% Yếu tố H trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% Yếu tố H trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% Yếu tố H trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% Yếu tố H trong chế phẩm ban đầu. Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% Yếu tố H trong chế phẩm ban đầu hoặc ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc nhiều hơn Yếu tố H trong chế phẩm ban đầu.

Điều kiện dung dịch mà có thể được thay đổi để thu được kết quả mong muốn từ phương pháp được mô tả trên đây bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, độ pH của dung dịch, độ dẫn điện của dung dịch, nhiệt độ của dung dịch, hàm lượng Yếu tố H trong chế phẩm này và hàm lượng SiO₂ dùng trong phương pháp này. Nói chung, khoảng pH thích hợp đối với các phương pháp làm giảm hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu nằm trong khoảng từ 3 đến 11. Độ dẫn điện thích hợp đối với các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 100mS/cm. Nhiệt độ thích hợp để thực hiện các phương pháp được mô tả trên đây nằm trong khoảng từ -10°C đến 90°C. Silic dioxit nghiền mịn có thể được sử dụng với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Cuối cùng, chế phẩm chứa Yếu tố H có thể có hàm lượng thay đổi trong khoảng từ 0,001mg/ml đến 100mg/ml.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO₂ và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 11,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng

từ 6,0 đến 11,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0. Theo một phương án khác, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5. Theo phương án khác nữa, độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0.

Theo phương án cụ thể, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ pH khoảng 7,0. Theo phương án cụ thể khác, độ pH khoảng 7,5. Theo một phương án khác, độ pH khoảng 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH bằng 3,0 hoặc khoảng 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, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 hoặc 11,0.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ pH ít nhất 6,0. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất 6,5. Theo một phương án khác, độ pH ít nhất 7,0. Theo phương án khác nữa, độ pH ít nhất 7,5. Theo các phương án khác nữa, độ pH của dung dịch ít nhất 3,0 hoặc ít nhất 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 hoặc lớn hơn.

Trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo một phương án khác của mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ pH không lớn hơn 11,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 10,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 9,0. Theo một phương án khác, độ pH không lớn hơn 8,0. Theo các phương án khác nữa, độ pH không lớn hơn 11,0 hoặc 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ dẫn điện không lớn hơn 20mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện không lớn hơn 10mS/cm. Theo các phương án khác nữa, độ dẫn điện của điều kiện dung dịch không lớn

hơn 20mS/cm hoặc không lớn hơn 19mS/cm, 18mS/cm, 17mS/cm, 16mS/cm, 15mS/cm, 14mS/cm, 13mS/cm, 12mS/cm, 11mS/cm, 10mS/cm, 9mS/cm, 8mS/cm, 7mS/cm, 6mS/cm, 5mS/cm, 4mS/cm, 3mS/cm, 2mS/cm hoặc nhỏ hơn.

Theo một phương án, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 20mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm. Theo một phương án khác, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 20mS/cm đến 6mS/cm. Theo phương án khác nữa, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 6mS/cm.

Như được thể hiện trong Ví dụ 5 và được minh họa trên Hình 3, đã phát hiện ra rằng việc áp dụng các điều kiện dung dịch bao gồm độ pH lớn hơn 6,0 (ví dụ, 7,5) và làm giảm độ dẫn điện (ví dụ, nhỏ hơn 20mS/cm), sẽ làm tăng sự rửa giải của Yếu tố H khỏi SiO_2 và làm giảm sự rửa giải của các serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza khỏi SiO_2 . Tốt hơn, nếu phát hiện này có thể được sử dụng để đề xuất các phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và tiền enzym serin proteaza có mặt trong chế phẩm chứa Yếu tố H. Trong các phương pháp theo phương án cụ thể mô tả trên đây, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 và phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H không gắn kết có độ dẫn điện không lớn hơn 20mS/cm và độ pH ít nhất 7,0. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện dung dịch là có độ dẫn điện không lớn hơn 10mS/cm và độ pH ít nhất 7,5. Theo một phương án khác, điều kiện dung dịch là có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 2mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,0. Theo phương án khác nữa, điều kiện dung dịch là có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 10mS/cm đến 2mS/cm và độ pH ít nhất bằng 7,5.

6. Phương pháp chiết Yếu tố H ra khỏi chất kết tủa huyết tương

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa Yếu tố H, phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương đã được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết

Yếu tố H, (b) rửa SiO₂ bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm và (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa Phân đoạn I Cohn, chất kết tủa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của chúng. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO₂ có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO₂ có độ pH bằng 6,0±0,2. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm.

Theo các phương án nhất định, phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu bao gồm việc làm kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu, trong đó Yếu tố H không cùng kết tủa. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương đã được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H, (b) rửa SiO₂ bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm, (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm và (d) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải chứa Yếu tố H, trong đó Yếu tố H không được kết tủa, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa Phân đoạn I Cohn, chất kết tủa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO₂ có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO₂ có độ pH bằng 6,0±0,2. Theo

một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm. Theo một phương án, bước làm kết tủa tạp chất là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa tạp chất bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 ở bước làm kết tủa tạp chất bằng $5 \pm 0,5\%$.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu bao gồm việc làm kết tủa Yếu tố H ra khỏi chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H, (b) rửa SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm, (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm, (d) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải Yếu tố H, để tạo ra dịch nổi chứa Yếu tố H và (e) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dịch nổi, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa chứa Phân đoạn I Cohn, chất kết tủa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm. Theo một phương án, bước làm kết tủa tạp chất là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa tạp chất bằng PEG bao gồm bước làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 ở bước làm kết tủa tạp chất

bằng $5 \pm 0,5\%$. Theo một phương án, bước làm kết tủa Yếu tố H là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa Yếu tố H bằng PEG bao gồm bước làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 15%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 bằng $12 \pm 0,5\%$ ở bước làm kết tủa Yếu tố H.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu bao gồm việc thực hiện phương pháp sắc ký trao đổi anion chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương đã được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H, (b) rửa SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm, (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm, (d) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải Yếu tố H, để tạo ra dịch nổi chứa Yếu tố H, (e) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dịch nổi, (f) tạo lại huyền phù chất kết tủa chứa Yếu tố H, (g) gắn kết Yếu tố H có mặt trong chất kết tủa đã được tạo lại huyền phù với nhựa trao đổi anion và (h) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa trao đổi anion, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa chứa Phân đoạn I Cohn, chất kết tủa chứa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm. Theo một phương án, bước làm kết tủa tạp chất là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa tạp chất bằng PEG bao gồm bước làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 ở

bước làm kết tủa tạp chất bằng $5\pm 0,5\%$. Theo một phương án, bước làm kết tủa Yếu tố H là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa Yếu tố H bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 15%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 bằng $12\pm 0,5\%$ ở bước làm kết tủa Yếu tố H.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu bao gồm việc thực hiện phương pháp sắc ký ái lực heparin chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương đã được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H, (b) rửa SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm, (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm, (d) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải Yếu tố H, để tạo ra dịch nổi chứa Yếu tố H, (e) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dịch nổi, (f) tạo lại huyền phù chất kết tủa chứa Yếu tố H, (g) gắn kết Yếu tố H có mặt trong chất kết tủa đã được tạo lại huyền phù với nhựa trao đổi anion, (h) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa trao đổi anion, (i) gắn kết Yếu tố H có mặt trong nước rửa giải trao đổi anion với nhựa có ái lực với heparin và (j) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa có ái lực với heparin, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa chứa Phân đoạn I Cohn, chất kết tủa chứa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH bằng $6,0\pm 0,2$. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm. Theo một phương án, bước làm kết tủa tạp chất là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa tạp chất bằng PEG bao gồm

việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 ở bước làm kết tủa tạp chất bằng $5 \pm 0,5\%$. Theo một phương án, bước làm kết tủa Yếu tố H là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa Yếu tố H bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 15%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 bằng $12 \pm 0,5\%$ ở bước làm kết tủa Yếu tố H.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước cho chế phẩm chứa Yếu tố H qua bước chuyên dụng để loại bỏ và/hoặc làm bất hoạt virus. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương đã được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H, (b) rửa SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm , (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm , (d) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải Yếu tố H, để tạo ra dịch nổi chứa Yếu tố H, (e) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dịch nổi, (f) tạo lại huyền phù chất kết tủa chứa Yếu tố H, (g) gắn kết Yếu tố H có mặt trong chất kết tủa đã được tạo lại huyền phù với nhựa trao đổi anion, (h) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa trao đổi anion, (i) gắn kết Yếu tố H có mặt trong nước rửa giải trao đổi anion với nhựa có ái lực với heparin, (j) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa có ái lực với heparin và (k) thực hiện bước chuyên dụng để loại bỏ và/hoặc làm bất hoạt virus được chọn từ nhóm bao gồm bước lọc nano, xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa (S/D), xử lý nhiệt và ủ ở độ pH thấp, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa chứa Phân đoạn I Cohn, chất kết tủa chứa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$. Theo

một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm. Theo một phương án, bước làm kết tủa tạp chất là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa tạp chất bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 ở bước làm kết tủa tạp chất bằng $5 \pm 0,5\%$. Theo một phương án, bước làm kết tủa Yếu tố H là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa Yếu tố H bằng PEG bao gồm bước làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 15%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 bằng $12 \pm 0,5\%$ ở bước làm kết tủa Yếu tố H.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước cô đặc chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau (a) cho chế phẩm chứa chất kết tủa huyết tương đã được tạo huyền phù chứa Yếu tố H và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết Yếu tố H, (b) rửa SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và độ dẫn điện nhỏ hơn 4mS/cm, (c) rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO_2 bằng dung dịch có độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ dẫn điện lớn hơn 10mS/cm, (d) kết tủa ít nhất một tạp chất ra khỏi chất rửa giải Yếu tố H, để tạo ra dịch nổi chứa Yếu tố H, (e) kết tủa Yếu tố H ra khỏi dịch nổi, (f) tạo lại huyền phù chất kết tủa chứa Yếu tố H, (g) gắn kết Yếu tố H có mặt trong chất kết tủa đã được tạo lại huyền phù với nhựa trao đổi anion, (h) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa trao đổi anion, (i) gắn kết Yếu tố H có mặt trong nước rửa giải trao đổi anion với nhựa có ái lực với heparin, (j) rửa giải Yếu tố H ra khỏi nhựa có ái lực với heparin, (k) thực hiện bước chuyên dụng để loại bỏ và/hoặc làm bất hoạt virus được chọn từ nhóm bao gồm bước lọc nano, xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa (S/D), xử lý nhiệt và ủ ở độ pH thấp và (l) cô đặc Yếu tố H bằng cách siêu lọc/lọc thẩm tách, nhờ đó tạo ra chế phẩm chứa Yếu tố H đã được làm giàu. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là một hoặc nhiều yếu tố trong số FXI, FXIa, FXII và FXIIa. Theo các phương án nhất định, chất kết tủa huyết tương là chất kết tủa chứa Phân

đoạn I Cohn, chất kết tủa chứa phân đoạn II+III Cohn, chất kết tủa chứa Phân đoạn I+II+III Cohn, chất kết tủa A Kistler/Nitschmann, chất kết tủa B Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa SiO_2 có độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$. Theo một phương án, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện ít nhất 20mS/cm. Theo phương án cụ thể, dung dịch dùng để rửa giải Yếu tố H có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 25mS/cm đến 40mS/cm. Theo một phương án, bước làm kết tủa tạp chất là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa tạp chất bằng PEG bao gồm việc làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 3% đến 7%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 ở bước làm kết tủa tạp chất bằng $5 \pm 0,5\%$. Theo một phương án, bước làm kết tủa Yếu tố H là bước làm kết tủa bằng PEG. Theo phương án cụ thể, bước làm kết tủa Yếu tố H bằng PEG bao gồm bước làm kết tủa bằng PEG 4000 với nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10% đến 15%. Theo phương án cụ thể hơn, nồng độ cuối cùng của PEG 4000 bằng $12 \pm 0,5\%$ ở bước làm kết tủa Yếu tố H.

C. Chất ức chế Inter-alpha-Trypsin (I α I)

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa I α I thu được từ huyết tương. Theo một phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa I α I tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm chứa I α I để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein I α I để tạo ra chế phẩm chứa I α I đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước

làm giàu thứ nhất protein IαI được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein IαI để tạo ra chế phẩm chứa IαI đã được làm giàu lần thứ hai, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein IαI được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa IαI thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất IαI để tạo ra chế phẩm chứa IαI đã được làm giàu lần thứ nhất thu được từ huyết tương; (b) bước làm giàu thứ hai IαI để tạo ra chế phẩm chứa IαI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu IαI sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu IαI được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa IαI thu được từ huyết tương,

phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất I α I để tạo ra chế phẩm chứa I α I đã được làm giàu lần thứ nhất thu được từ huyết tương; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (c) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (d) bước làm giàu thứ hai I α I để tạo ra chế phẩm chứa I α I thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Tương tự, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa I α I thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) bước làm giàu thứ nhất I α I để tạo ra chế phẩm chứa I α I đã được làm giàu lần thứ nhất thu được từ huyết tương; (b) bước làm giàu thứ hai I α I để tạo ra chế phẩm chứa I α I thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (d) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (e) bước làm giàu thứ ba I α I để tạo ra chế phẩm chứa I α I đã được làm giàu lần thứ ba thu được từ huyết tương. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 101 đến Var. 1100, nêu trong Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 10 hoặc Bảng 11.

1. Cùng gắn kết và rửa giải biệt hóa

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa IαI thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm bước cùng chiết IαI và serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza từ chế phẩm thu được từ huyết tương được gộp lại bằng cách gắn kết protein vào silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn, rửa giải serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch thứ nhất và tiếp theo rửa giải IαI ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm ban đầu là chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù hoặc chất kết tủa tương đương của chúng.

Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa IαI và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết IαI và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; (c) rửa giải serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch trong đó IαI vẫn được gắn kết; và (d) rửa giải IαI ra khỏi SiO_2 .

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó IαI vẫn được gắn kết được dùng để chỉ điều kiện rửa giải có chọn lọc serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza, trong khi phân đoạn chủ yếu chứa IαI vẫn được gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% IαI gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% IαI gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% IαI gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% IαI gắn kết với SiO_2 . Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% IαI gắn kết với SiO_2 hoặc lượng ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn của IαI gắn kết với SiO_2 .

Theo các phương án nhất định, việc rửa giải biệt hóa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và I α I được thực hiện bằng cách cho chúng tiếp xúc một cách liên tục (tức là rửa giải từng bước) với SiO₂ trong điều kiện dung dịch thứ nhất (ví dụ, đệm rửa giải thứ nhất) thích hợp để rửa giải phần lớn serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải phân đoạn chủ yếu chứa I α I đã được gắn kết và điều kiện dung dịch thứ hai (ví dụ, đệm rửa giải thứ hai) thích hợp để rửa giải phân đoạn chủ yếu chứa I α I đã được gắn kết ra khỏi SiO₂.

Theo các phương án khác, việc rửa giải biệt hóa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và I α I được thực hiện bằng cách thay đổi một cách từ từ điều kiện dung dịch (tức là rửa giải theo gradien) từ điều kiện dung dịch thứ nhất thích hợp để rửa giải phần lớn serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải phân đoạn chủ yếu chứa I α I đã được gắn kết đến điều kiện dung dịch thứ hai thích hợp để rửa giải phân đoạn chủ yếu chứa I α I đã được gắn kết ra khỏi SiO₂. Theo cách này, hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và I α I được rửa giải ra khỏi SiO₂ có thể chồng lên nhau một phần. Bằng cách phân đoạn việc rửa giải và xác định đặc điểm của từng phân đoạn, nguồn dự trữ I α I có thể được tạo ra từ các phân đoạn có hàm lượng I α I cao và hàm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza thấp.

2. Cùng gắn kết và rửa giải I α I có chọn lọc

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa I α I thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm bước cùng chiết I α I và serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi chế phẩm thu được từ huyết tương được gộp lại bằng cách gắn kết protein vào silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn và rửa giải I α I ra khỏi SiO₂ trong điều kiện mà phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết vẫn được gắn kết với SiO₂. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm ban đầu là chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù hoặc chất kết tủa tương đương của chúng.

Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa I α I và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic

điôxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết I α I và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải I α I ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết.

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết được dùng để chỉ điều kiện rửa giải có chọn lọc I α I, trong khi phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 . Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 hoặc lượng ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn của serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 .

3. Gắn kết ưu tiên I α I

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa I α I thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước (a) cho chế phẩm chứa I α I và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic điôxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết I α I chứ không phải ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này; và (c) rửa giải I α I ra khỏi SiO_2 .

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza không được gắn kết với SiO_2 được dùng để chỉ điều kiện cho phép I α I ưu tiên gắn kết với SiO_2 , trong khi phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza hoặc

tiền enzym serin proteaza vẫn không được gắn kết trong dung dịch. Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu. Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu hoặc lượng ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm ban đầu.

4. Gắn kết ưu tiên serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm chứa IαI thu được từ huyết tương có lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza giảm, phương pháp này bao gồm các bước (a) cho chế phẩm chứa IαI và ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza chứ không phải IαI; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này.

Theo các phương án nhất định, điều kiện dung dịch trong đó IαI không được gắn kết với SiO_2 được dùng để chỉ điều kiện cho phép serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết ưu tiên với SiO_2 , trong khi phân đoạn chủ yếu chứa IαI vẫn không được gắn kết trong dung dịch. Theo một phương án, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 10% IαI trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 25% IαI trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 50% IαI trong chế phẩm ban đầu. Theo một phương án khác, phân đoạn chủ yếu được dùng để chỉ lượng ít nhất 75% IαI trong chế phẩm ban đầu. Theo các phương án khác nữa, phân đoạn chủ yếu được dùng để

chỉ lượng ít nhất 10% I α I trong chế phẩm ban đầu hoặc ít nhất 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 hoặc lớn hơn I α I trong chế phẩm ban đầu.

D. Alpha-1-Antitrypsin (A1PI)

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa alpha-1-antitrypsin (A1PI) thu được từ huyết tương. Theo một phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) cho chế phẩm chứa A1PI tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm chứa A1PI để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII).

Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein A1PI được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI đã được làm giàu lần thứ hai, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein A1PI được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) bước làm

giàu thứ hai A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Theo các phương án nhất định, các phương pháp được mô tả trên đây còn bao gồm bước làm giàu A1PI sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu A1PI được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương phương pháp bao gồm các bước sau: (a) bước làm giàu thứ nhất A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (d) bước làm giàu thứ hai A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1.

Tương tự, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết

tương, phương pháp này bao gồm các bước: (a) bước làm giàu thứ nhất A1PI để tạo ra chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) bước làm giàu thứ hai A1PI để tạo ra chế phẩm chứa Ig thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (e) bước làm giàu A1PI thứ ba để tạo ra chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ ba. Theo phương án được ưu tiên, serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là Yếu tố XIa (FXIa), Yếu tố XIIa (FXIIa), Yếu tố XI (FXI) và/hoặc Yếu tố XII (FXII). Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 101 đến Var. 1100, nêu trong các Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 10 hoặc Bảng 11.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm chứa A1PI là chất trung gian trong quy trình điều chế. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa A1PI là chất trung gian trong quy trình điều chế từ quy trình phân đoạn Cohn (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475; *J. Am. Chem. Soc.* 72:465-474 (1950)), quy trình phân đoạn Oncley (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550), quy trình phân đoạn Kistler/Nitschmann (*Vox Sang.* 7:414-424 (1962)), quy trình tinh chế được bộc lộ trong các patent Mỹ số 6,974,792 hoặc 7,807,435, các quy trình được cải biến của chúng và các quy trình tinh chế giống hoặc tương tự quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Toàn bộ nội dung của các tài liệu tham khảo nêu trên được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích.

Ví dụ, nhiều phương pháp bào chế chế phẩm chứa A1PI là đã biết không chỉ là bước làm kết tủa phân đoạn huyết tương bằng polyetylen glycol 4000, mà còn bao gồm bước xử lý các phân đoạn huyết tương khác nhau (chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-1 Cohn hoặc Dịch nổi A hoặc A+1 Kistler và Nitschmann) (Feldman and Winkelman, *Blood Separation and Plasma Fractionation* (1991), Wiley-Liss, Inc., pp. 341-383). Trong các quy trình tinh chế tinh vi hơn, các phân đoạn máu tương ứng được tinh chế theo phương pháp

DEAE xenluloza, ví dụ (Basis et al. (*Vopr. Med. Khim.* 33 (1) (1987), 54-59)), được xử lý bằng nguyên liệu sắc ký ái lực hoặc với nguyên liệu sắc ký trao đổi cation (EP 0 698 615 A1). Patent Mỹ số 6,974,792 mô tả quy trình tinh chế để thu được A1PI với hoạt tính riêng cao bằng cách sử dụng chất kết tủa chứa Phân đoạn V Cohn. Patent Mỹ số 7,807,435 mô tả quy trình tinh chế để tạo ra chế phẩm chứa A1PI với hiệu suất cao hơn, bằng cách sử dụng chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-1 và/hoặc phân đoạn IV-4 Cohn.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm chứa A1PI là nguồn dự trữ Cohn nghèo trong điều kiện lạnh. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa A1PI là chất kết tủa chứa Phân đoạn V Cohn hoặc phân đoạn tương đương của nó đã được tạo lại huyền phù. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa A1PI là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-1 Cohn hoặc phân đoạn tương đương của nó đã được tạo lại huyền phù. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa A1PI là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-4 Cohn hoặc phân đoạn tương đương của nó đã được tạo lại huyền phù. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm chứa A1PI là Dịch nổi A Kistler/Nitschmann hoặc phân đoạn tương đương của nó.

Nói chung, việc loại bỏ serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi các chế phẩm chứa A1PI có thể thực hiện được bằng cách xử lý chế phẩm chứa A1PI này bằng silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện dung dịch với độ pH và độ dẫn điện mà serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza gắn kết với SiO_2 .

Theo một phương án, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khối trước khi lọc hoặc việc làm trong bằng cách ly tâm chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI. Theo một phương án, bước xử lý bằng SiO_2 bao gồm việc bổ sung hạt silic đioxit nghiền mịn (ví dụ, silic oxit dạng khối, Aerosil®) sau đó ủ trong thời gian từ 40 phút đến 16 giờ, trong thời gian đó huyền phù này được trộn đều. Theo các phương án nhất định, thời gian ủ nằm trong khoảng từ 50 phút đến 70 phút hoặc khoảng 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 phút hoặc dài hơn. Theo các phương án khác, thời gian ủ ít nhất 1 giờ hoặc ít nhất 2 giờ, 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 hoặc dài hơn. Theo phương án cụ thể, thời gian ủ ít nhất 15 giờ. Nói chung, việc xử lý sẽ được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 25°C hoặc nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C . Theo các phương

án nhất định, việc xử lý 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, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C hoặc 25°C. Theo phương án cụ thể, việc xử lý được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 25°C. Theo phương án cụ thể, các cải tiến của quy trình này được thực hiện bằng cách kết hợp việc xử lý bằng silic oxit dạng khối, mà làm giảm lượng FXI, FXIa, FXII và FXIIa trong chế phẩm chứa globulin miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng nằm trong khoảng từ 20g/kg chất kết tủa đến 100g/kg chất kết tủa. Theo các phương án nhất định, silic oxit dạng khối có thể được bổ sung vào với hàm lượng khoảng 20g/kg chất kết tủa hoặc khoảng 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 hoặc 100g/kg chất kết tủa. Theo một phương án cụ thể, silic oxit dạng khối (ví dụ, Aerosil 380 hoặc chất tương đương) được bổ sung vào chất kết tủa tạo lại huyền phù đến hàm lượng cuối khoảng 40g/kg chất kết tủa.

Theo các phương án nhất định, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa A1PI với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 10g/g protein. Theo một phương án khác, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa A1PI với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,01g/g protein đến 5g/g protein. Theo một phương án khác, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa A1PI với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,02g/g protein đến 4g/g protein. Theo một phương án, SiO₂ được bổ sung vào chế phẩm chứa A1PI với hàm lượng cuối cùng ít nhất 0,1g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,2g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,25g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 1g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo phương án cụ thể khác, silic oxit dạng khối được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 2,5g cho mỗi gam protein toàn phần. Theo các phương án cụ thể khác nữa, silic đioxit nghiền mịn được bổ sung vào với hàm lượng ít nhất 0,01g/g tổng lượng protein hoặc ít nhất 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4,

0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0g/g tổng lượng protein hoặc lớn hơn.

Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc, ví dụ Celpure C300 (Celpure) hoặc Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), sẽ 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 với hàm lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,01kg/kg chất kết tủa đến 1,0kg/kg chất kết tủa hoặc nằm trong khoảng từ 0,02kg/kg chất kết tủa đến 0,8kg/kg chất kết tủa hoặc nằm trong khoảng từ 0,03kg/kg chất kết tủa đến 0,7kg/kg chất kết tủa. Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc này sẽ được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng ít nhất 0,01kg/kg chất kết tủa hoặc ít nhất 0,02kg/kg, 0,03kg/kg, 0,04kg/kg, 0,05kg/kg, 0,06kg/kg, 0,07kg/kg, 0,08kg/kg, 0,09kg/kg, 0,1kg/kg, 0,2kg/kg, 0,3kg/kg, 0,4kg/kg, 0,5kg/kg, 0,6kg/kg, 0,7kg/kg, 0,8kg/kg, 0,9kg/kg hoặc 1,0kg/kg chất kết tủa. Theo các phương án nhất định, chất trợ lọc này sẽ được bổ sung vào với hàm lượng cuối cùng khoảng 0,01kg/kg chất kết tủa hoặc khoảng 0,02kg/kg, 0,03kg/kg, 0,04kg/kg, 0,05kg/kg, 0,06kg/kg, 0,07kg/kg, 0,08kg/kg, 0,09kg/kg, 0,1kg/kg, 0,2kg/kg, 0,3kg/kg, 0,4kg/kg, 0,5kg/kg, 0,6kg/kg, 0,7kg/kg, 0,8kg/kg, 0,9kg/kg hoặc 1,0kg/kg chất kết tủa.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0 để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong

khoảng từ 4,5 đến 6,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,5 đến 5,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,5. Theo phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,6. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,7 đến 5,5. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,4. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,3. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,2. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH khoảng 5,1. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH bằng 4,0 hoặc 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, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 hoặc không lớn hơn 7,0. Theo các phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH không lớn hơn 4,0 hoặc không lớn hơn 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, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 hoặc không lớn hơn 7,0.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ

ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 2,0mS/cm để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,9mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,8mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,7mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,6mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,5mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,4mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,3mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,2mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,1mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 0,9mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 0,8mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,2mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,3mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,1mS/cm đến 0,4mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO₂ có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,5mS/cm đến 1,0mS/cm.

Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,6mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm đến 0,9mS/cm. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion bằng khoảng 0,8mS/cm. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion bằng khoảng 0,1mS/cm hoặc không lớn hơn 0,2mS/cm, 0,3mS/cm, 0,4mS/cm, 0,5mS/cm, 0,6mS/cm, 0,7mS/cm, 0,8mS/cm, 0,9mS/cm, 1,0mS/cm, 1,1mS/cm, 1,2mS/cm, 1,3mS/cm, 1,4mS/cm, 1,5mS/cm, 1,6mS/cm, 1,7mS/cm, 1,8mS/cm, 1,9mS/cm, 2,0mS/cm, 2,1mS/cm, 2,2mS/cm, 2,3mS/cm, 2,4mS/cm, 2,5mS/cm, 2,6mS/cm, 2,7mS/cm, 2,8mS/cm, 2,9mS/cm hoặc 3,0mS/cm. Theo các phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 có cường độ ion không lớn hơn 0,1mS/cm hoặc không lớn hơn 0,2mS/cm, 0,3mS/cm, 0,4mS/cm, 0,5mS/cm, 0,6mS/cm, 0,7mS/cm, 0,8mS/cm, 0,9mS/cm, 1,0mS/cm, 1,1mS/cm, 1,2mS/cm, 1,3mS/cm, 1,4mS/cm, 1,5mS/cm, 1,6mS/cm, 1,7mS/cm, 1,8mS/cm, 1,9mS/cm, 2,0mS/cm, 2,1mS/cm, 2,2mS/cm, 2,3mS/cm, 2,4mS/cm, 2,5mS/cm, 2,6mS/cm, 2,7mS/cm, 2,8mS/cm, 2,9mS/cm hoặc 3,0mS/cm.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa A1PI thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH thấp và cường độ ion thấp để gắn kết serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza. Theo phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 5,4 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,6mS/cm đến 1,0mS/cm. Theo phương án cụ thể hơn, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,9 đến 5,3 có cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,7mS/cm đến 0,9mS/cm. Theo phương án cụ thể hơn nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,2 có cường độ ion khoảng 0,8mS/cm. Theo các phương án khác nữa, phương pháp này bao gồm bước cho chế phẩm này tiếp xúc với SiO_2 ở độ pH và cường độ ion theo biến số

bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1222 đến Var. 3041, như được thể hiện trong các Bảng 12, Bảng 13, Bảng 14 và Bảng 15.

1. Gắn kết và rửa giải các serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI đã được tạo lại huyền phù. Nói chung, chất kết tủa có thể là chất được làm kết tủa bất kỳ trong quá trình phân đoạn huyết tương được gộp lại, tốt hơn là huyết tương người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI đã được tạo lại huyền phù ở trạng thái không hoà tan tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện dung dịch với độ pH thấp thứ nhất để gắn kết serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza và để duy trì A1PI ở trạng thái không hoà tan, tách các phần hoà tan và không hoà tan của huyền phù, rửa giải serin và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch với độ pH thấp thứ hai thích hợp để duy trì phân đoạn chủ yếu chứa A1PI ở trạng thái không hoà tan, tách các phần hoà tan và không hoà tan của huyền phù và chiết A1PI ra khỏi phần không hoà tan. Theo một phương án, SiO_2 được trộn trước hoặc trong quá trình phản ứng kết tủa và được thu hồi cùng với chất kết tủa. Theo phương án cụ thể, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-1 Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-4 Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn V Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa IV Kistler/Nitschmann. Theo phương án khác nữa, chất kết tủa là chất kết tủa C Kistler/Nitschmann.

Trong phương pháp theo một phương án được đề xuất trên đây, điều kiện của dung dịch thứ nhất có độ pH thấp thứ nhất bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung

dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm.

Trong phương pháp theo một phương án khác được đề xuất trên đây, điều kiện của dung dịch thứ nhất có độ pH thấp thứ nhất bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 2,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 0,5mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 2,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 0,5mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo các phương án khác nữa, điều kiện của dung dịch thứ nhất có độ pH thấp thứ nhất bao gồm độ pH và cường độ ion theo biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1222 đến Var. 3041, như được thể hiện trong Bảng 12, Bảng 13, Bảng 14 và Bảng 15.

Trong phương pháp theo một phương án được đề xuất trên đây, điều kiện của dung dịch có độ pH thấp thứ hai bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 và 7,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$ và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$ và cường độ ion lớn hơn khoảng 5,0mS/cm.

Trong phương pháp theo một phương án khác của được đề xuất trên đây, điều kiện của dung dịch có độ pH thấp thứ hai bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn khoảng 6,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn khoảng 7,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn khoảng 10mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 6,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion lớn hơn khoảng 7,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và

cường độ ion lớn hơn khoảng 10mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$ và cường độ ion lớn hơn khoảng 10mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$ và cường độ ion lớn hơn khoảng 10mS/cm.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI đã được tạo lại huyền phù, bao gồm các bước cho chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI đã được tạo lại huyền phù ở trạng thái không hoà tan tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện dung dịch với độ pH thấp thứ nhất bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn 5,0 mS liên kết serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza và để duy trì A1PI ở trạng thái không hoà tan, tách các phần hoà tan và không hoà tan của huyền phù, rửa giải serin và/hoặc tiền enzym serin proteaza ra khỏi SiO_2 trong điều kiện dung dịch với độ pH thấp thứ hai bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion lớn hơn 5,0 mS để duy trì phân đoạn chủ yếu chứa A1PI ở trạng thái không hoà tan, tách các phần hoà tan và không hoà tan của huyền phù và chiết A1PI ra khỏi phần không hoà tan. Theo một phương án, SiO_2 được trộn trước hoặc trong quá trình phản ứng kết tủa và được thu hồi cùng với chất kết tủa. Theo phương án cụ thể, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-1 Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-4 Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn V Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa IV Kistler/Nitschmann. Theo phương án khác nữa, chất kết tủa là chất kết tủa C Kistler/Nitschmann.

2. Gắn kết các serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza và chiết A1PI

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza trong chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI đã được tạo lại huyền phù. Nói chung, chất kết tủa có thể là chất được làm kết tủa bất kỳ trong quá trình phân đoạn huyết tương được gộp lại, tốt hơn là huyết tương người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho chất kết tủa từ huyết tương chứa A1PI đã được tạo lại huyền phù ở trạng thái không hoà tan tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều

kiện dung dịch với độ pH thấp thứ nhất để gắn kết serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza và để duy trì A1PI ở trạng thái không hoà tan, tách các phần hoà tan và không hoà tan của huyền phù, chiết A1PI ra khỏi phần không hoà tan trong điều kiện dung dịch với độ pH thứ hai và tách phần hoà tan ra khỏi phần không hoà tan, trong đó phân đoạn chủ yếu chứa serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza vẫn được gắn kết với SiO_2 trong quá trình chiết A1PI ra khỏi phần không hoà tan. Theo một phương án, SiO_2 được trộn trước hoặc trong quá trình phản ứng kết tủa và được thu hồi cùng với chất kết tủa. Theo phương án cụ thể, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-1 Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn IV-4 Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa chứa Phân đoạn V Cohn. Theo một phương án khác, chất kết tủa là chất kết tủa IV Kistler/Nitschmann. Theo phương án khác nữa, chất kết tủa là chất kết tủa C Kistler/Nitschmann.

Trong phương pháp theo một phương án được đề xuất trên đây, điều kiện dung dịch thứ nhất bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 7,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 7,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5,0mS/cm.

Trong phương pháp theo một phương án khác được đề xuất trên đây, điều kiện dung dịch thứ nhất bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0

đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 2,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 0,5mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 2,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 1,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 0,5mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $5,5 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $6,0 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo các phương án khác nữa, điều kiện của dung dịch thứ nhất có độ pH thấp thứ nhất bao gồm độ pH và cường độ ion theo biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1222 đến Var. 3041, như được thể hiện trong Bảng 12, Bảng 13, Bảng 14 và Bảng 15.

Trong phương pháp theo một phương án được đề xuất trên đây, điều kiện dung dịch thứ hai bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 9,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $7,5 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $8,0 \pm 0,2$ và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 10,0mS/cm.

Trong phương pháp theo một phương án khác được đề xuất trên đây, điều kiện dung dịch thứ hai bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 9,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 8,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 7,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 và 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 6,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 và 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 2mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 và cường độ ion nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm.

Trong phương pháp theo một phương án khác được đề xuất trên đây, điều kiện dung dịch thứ hai bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 9,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 8,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 7,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 6,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 5mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 4,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 3,0mS/cm. Theo một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,0 và cường độ ion nhỏ hơn khoảng 2mS/cm. Theo

một phương án khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5 và cường độ ion nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm. Theo phương án cụ thể, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $7,5 \pm 0,2$ và cường độ ion nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm. Theo phương án cụ thể khác, điều kiện của dung dịch này bao gồm độ pH bằng $8,0 \pm 0,2$ và cường độ ion nằm trong khoảng từ 2mS/cm đến 10mS/cm.

IV. Dược phẩm

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm mà được bào chế theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm này sẽ được bào chế để dùng trong lĩnh vực được (tức là làm dược phẩm). Nói chung, các chế phẩm chứa protein máu thu được từ huyết tương được bào chế theo các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này sẽ có hoạt tính phân giải amit giảm và sẽ tạo ra đặc điểm an toàn tốt hơn so với chế phẩm sinh học thu được từ huyết tương hiện có trên thị trường. Theo phương án được ưu tiên, các chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này sẽ có hàm lượng Yếu tố XI, Yếu tố XIa, Yếu tố XII và/hoặc Yếu tố XIIa giảm.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (b) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI),

butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm được mô tả trên đây được bào chế theo phương pháp còn bao gồm bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein đích được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất bằng cách làm kết tủa một phần protein trong nguyên liệu ban đầu thu được từ huyết tương được gộp lại; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (c) tách SiO₂ ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo một phương án, việc làm kết tủa một phần được thực hiện bằng cách sử dụng rượu. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất bằng cách siêu lọc và/hoặc lọc thẩm tách nguyên liệu ban đầu thu được từ huyết tương được gộp lại; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO₂) nghiền mịn trong điều kiện

thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo một phương án, việc làm kết tủa một phần được thực hiện bằng cách sử dụng rượu. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất bằng cách cho nguyên liệu ban đầu thu được từ huyết tương được gộp lại tiếp xúc với nhựa sắc ký; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết. Theo một phương án, việc làm kết tủa một phần được thực hiện bằng cách sử dụng rượu. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm được mô tả trên đây được bào chế theo phương pháp còn bao gồm bước làm giàu thứ hai protein đích để tạo ra chế phẩm đã

được làm giàu lần thứ hai, trước khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu thứ nhất protein đích được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) bước làm giàu thứ hai protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza; và (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzyme serin proteaza đã được gắn kết. Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin ($\text{I}\alpha\text{I}$).

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm được mô tả trên đây được bào chế theo phương pháp còn bao gồm bước làm giàu protein đích sau khi cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn. Theo các phương án nhất định, bước làm giàu protein đích được chọn từ nhóm bao gồm bước làm kết tủa protein (ví dụ, bước phân đoạn bằng rượu), bước siêu lọc/lọc thẩm tách và bước sắc ký.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) bước làm giàu thứ nhất

protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ nhất này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (d) bước làm giàu thứ hai protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai. Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 1 đến Var. 100, nêu trong Bảng 1. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng của serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm dùng trong việc điều trị tình trạng bệnh lý liên quan đến chứng thiếu hụt hoặc chứng loạn chức năng protein máu. Theo các phương án nhất định, protein thu được từ huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương bào chế được theo phương pháp bao gồm các bước: (a) bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất; (b) bước làm giàu thứ hai protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ hai; (c) cho chế phẩm đã được làm giàu lần thứ hai này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp

để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; (d) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza đã được gắn kết; và (e) bước làm giàu thứ ba protein đích để tạo ra chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ ba. Theo các phương án nhất định, việc kết hợp các bước làm giàu thứ nhất và thứ hai được chọn từ biến số bất kỳ trong số các biến số từ Var. 101 đến Var. 1100, nêu trong các Bảng 2, Bảng 3, Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6, Bảng 7, Bảng 8, Bảng 9, Bảng 10 hoặc Bảng 11. Theo một phương án, chế phẩm này được bào chế để dùng làm dược phẩm. Theo phương án cụ thể, chế phẩm này được bào chế để dùng qua đường tĩnh mạch. Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm này được bào chế để dùng trong cơ. Theo một phương án khác, chế phẩm này được bào chế để dùng dưới da. Theo phương án khác nữa, chế phẩm này được bào chế để dùng trong mắt. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo các phương án nhất định của các chế phẩm được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết protein đích thu được từ huyết tương; và (ii) rửa giải protein đích thu được từ huyết tương ra khỏi nhựa sắc ký. Theo một phương án cụ thể, tạp chất không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i). Theo phương án cụ thể khác, tạp chất gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i), nhưng không được rửa giải ra khỏi nhựa sắc ký ở bước phụ (ii).

Theo các phương án nhất định khác của các chế phẩm được mô tả trên đây, bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ: (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu lần thứ nhất tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một tạp chất; và (ii) tách nhựa này ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, trong đó protein đích thu được từ huyết tương không được gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i).

Trong các chế phẩm theo các phương án nhất định được đề xuất trong bản mô tả này, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 10%.

Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 25%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 50%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 75%. Theo một phương án khác, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 90%. Theo các phương án khác nữa, lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza cụ thể giảm được ít nhất 5% hoặc ít nhất 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%. Theo một phương án, mức độ giảm serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được dùng để chỉ mức độ giảm đạt được ở bước xử lý bằng SiO₂ riêng biệt. Theo một phương án khác, mức độ giảm serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza được dùng để chỉ hàm lượng của tạp chất trong chế phẩm cuối cùng, so với chế phẩm bào chế được theo cách tương tự không có bước xử lý bằng SiO₂.

Theo một phương án, dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này được bào chế bằng cách chế hóa chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương phân lập được bằng cách sử dụng phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Nói chung, chế phẩm bào chế được sẽ được cho qua ít nhất một, tốt hơn nếu ít nhất hai, tốt nhất nếu ít nhất ba, bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus. Các ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về bước loại bỏ hoặc làm bất hoạt virus mà có thể được sử dụng trong các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm bước xử lý bằng chất tẩy rửa dung môi (xem: 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 vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng vì tất cả các mục đích), lọc nano (xem: Hamamoto et al., *Vox Sang* 1989 (56)230-236 và Yuasa et al., *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, toàn bộ nội dung của cả hai tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích) và ủ trong điều kiện độ pH thấp và nhiệt độ cao (xem: Kempf et al., *Transfusion* 1991 (31)423-427 và Louie et al., *Biologicals* 1994 (22):13-19). Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI),

butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một phương án, dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này chứa một hoặc nhiều chất đệm hoặc chất làm ổn định độ pH thích hợp để dùng qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong cơ và/hoặc trong mắt. Các ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về chất đệm thích hợp để bào chế chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm glyxin, xitrat, phosphat, axetat, glutamat, tartrat, benzoat, lactat, histidin hoặc các axit amin khác, gluconat, malat, succinat, format, propionat, cacbonat hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng được điều chỉnh đến độ pH thích hợp. Nói chung, chất đệm sẽ có mặt với lượng đủ để duy trì độ pH thích hợp trong chế phẩm này trong thời gian dài. Theo phương án được ưu tiên, chất đệm là glyxin. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một số phương án nhất định, dược phẩm được đề xuất trong bản mô tả này có thể tùy ý còn chứa chất để điều chỉnh nồng độ mol của chế phẩm này. Các ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế 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, dimetyl sulfon và các phương pháp tương tự.

Thông thường, các chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này sẽ có nồng độ mol tương đương 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 các phương án nhất định, nồng độ mol của chế phẩm này 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 này thường là 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.

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

V. Các phương pháp điều trị

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến chứng thiếu hụt hoặc chứng loạn chức năng protein máu ở đối tượng cần điều trị bệnh bằng cách dùng liều hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng của serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm bào chế được theo phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương này được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương có hàm lượng của serin proteaza và/hoặc tiền enzym serin proteaza giảm để bào chế thuốc dùng để điều trị tình trạng bệnh lý liên quan đến chứng thiếu hụt hoặc chứng loạn chức năng protein máu. Theo các phương án nhất định, protein thu được từ huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, Yếu tố H, protein của hệ bổ thể và protein của chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

A. Globulin miễn dịch

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

lý thuộc ba nhóm chính: suy giảm miễn dịch, các bệnh viêm và tự miễn, và nhiễm khuẩn cấp tính. Các chế phẩm chứa IgG này cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh đa xơ cứng (đặc biệt là bệnh đa xơ cứng thuyên giảm - tái phát (relapsing-remitting multiple sclerosis -RRMS)), bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson. Chế phẩm chứa IgG đã được 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 chứa IgG.

FDA đã phê chuẩn việc sử dụng IVIG để điều trị bệnh theo các chỉ định khác nhau bao gồm việc cấy ghép tủy xương dị sinh, bệnh ung thư bạch cầu lympho bào mạn tính, chứng ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (idiopathic thrombocytopenic purpura - ITP), bệnh HIV ở trẻ nhỏ, chứng 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 nhất định, chế phẩm chứa IVIG theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc kiểm soát các bệnh và tình trạng bệnh lý này.

Hơn thế nữa, việc sử dụng IVIG không theo chỉ định của bác sỹ thường được đề xuất đối với các bệnh nhân để điều trị hoặc kiểm soát các chỉ định khác nhau, ví dụ, hội chứng mệt mỏi mạn tính, bệnh viêm ruột kết do thiếu hụt clostridium, 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, chứng ban đỏ luput, bệnh thần kinh vận động đa ổ, bệnh đa xơ cứng (multiple sclerosis - MS), bệnh nhược cơ năng, chứng giảm tiểu cầu dị miễn dịch mới sinh, bệnh nhiễm Parvovirus B19, bệnh pemphigut, chứng ban xuất huyết sau tiêm truyền, chứng thải loại sau ghép thận, sảy thai tự phát/mất thai, hội chứng người cứng đờ, hội chứng co giật mắt theo nhiều hướng, bệnh nhiễm khuẩn nặng và sốc nhiễm khuẩn 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, vô gama globulin huyết liên kết với nhiễm sắc thể X, và giảm gama globulin huyết. Theo một số phương án nhất định, chế phẩm chứa IVIG theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc kiểm soát bệnh và các tình trạng bệnh lý này.

Cuối cùng, ứng dụng làm ví dụ của IVIG để điều trị hoặc kiểm soát bệnh bao gồm chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát, RRMS, bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson đã được đề xuất (công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số U.S. 2009/0148463, toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án nhất định, chế phẩm chứa IVIG theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc kiểm soát chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát, 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 việc tiêm dưới da) và đáp ứng đối với việc điều trị bệnh. Theo một số phương án nhất định, chế phẩm chứa 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 chứa globulin miễn dịch có thể được dùng cho đối tượng với 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 của chế phẩm chứa globulin miễn dịch có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn. Ngoài ra, các chế phẩm chứa 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 chứa IgG có thể xác định được liều dùng thích hợp đối với mỗi bệnh nhân theo tiêu chí đã biết trong lĩnh vực này.

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

Lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa IVIG được dùng cho đối tượng bằng cách dùng qua đường tĩnh mạch. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng của chế phẩm chứa IVIG làm thuyên giảm hoặc khắc phục được hậu quả của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý 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 lý cần được điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh và đáp ứng đối với việc điều trị bệnh. Theo một số phương án nhất định, chế phẩm chứa 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 nhất định, liều dùng có thể ít nhất khoảng 5mg/kg, hoặc ít nhất 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 suất của việc điều trị bệnh bằng IVIG, không kể các yếu tố khác, sẽ phụ thuộc vào bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân. Nói chung, đối với rối loạn chức năng miễn dịch nguyên phát, liều lượng nằm trong khoảng từ 100mg/kg đến 400mg/kg thể trọng sẽ được dùng trong thời gian 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 thời gian từ ba đến sáu tháng, mỗi tháng một đợt trong 5 ngày. Phương pháp này nói chung được kết hợp với việc điều trị duy trì bao gồm việc sử dụng IVIG với lượng nằm trong khoảng từ 100mg/kg đến 400mg/kg thể trọng trong thời gian từ 3 đến 4 tuần một lần. Nói chung, bệnh nhân sẽ nhận liều dùng hoặc điều trị bệnh trong thời gian từ 14 đến 35 ngày một lần, hoặc trong thời gian từ 21 đến 28 ngày một lần. Tần suất điều trị bệnh, không kể các yếu tố khác, sẽ phụ thuộc vào, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý cần điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân.

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

pháp theo sáng chế dùng để điều trị bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, hoặc bệnh nhiễm khuẩn cấp tính ở người cần điều trị.

Theo một số phương án nhất định, bệnh suy giảm miễn dịch, bệnh tự miễn, hoặc bệnh nhiễm khuẩn cấp tính được chọn từ việc cấy ghép tủy xương dị sinh, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, chứng ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh HIV ở trẻ nhỏ, chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát, bệnh Kawasaki, bệnh đa dây thần kinh hủy myelin do viêm mạn tính (CIDP), việc ghép thận với thể nhận có tính kháng thể cao hoặc với thể cho không tương thích ABO, hội chứng mệt mỏi mạn tính, bệnh viêm ruột kết do thiếu hụt clostridium, 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, chứng ban đỏ luput, bệnh thần kinh vận động đa ổ, bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh nhược cơ năng, chứng giảm tiểu cầu dị miễn dịch mới sinh, nhiễm Parvovirus B19, bệnh pemphigut, chứng ban xuất huyết sau tiêm truyền, chứng thải loại sau ghép thận, sảy thai tự phát/mất thai, hội chứng người cứng đờ, hội chứng co giật mắt theo nhiều hướng, bệnh nhiễm khuẩn nặng và sốc nhiễm khuẩn ở người trưởng thành bị ốm nặng, hoại tử biểu bì nhiễm độc, bệnh ung thư bạch cầu lympho mạn tính, đa u tủy, vô gama globulin huyết liên kết nhiễm sắc thể X, giảm gama globulin huyết, chứng suy giảm miễn dịch nguyên phát, RRMS, bệnh Alzheimer, và bệnh Parkinson.

B. Yếu tố H

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến chứng loạn chức năng Yếu tố H hoặc hoạt hóa bổ thể thay thế khác thường ở đối tượng cần điều trị bệnh bằng cách cho dùng liều hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa Yếu tố H bào chế được theo phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một phương án, chế phẩm chứa Yếu tố H được bào chế bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi chất kết tủa chứa Phân đoạn I. Theo một phương án khác, chế phẩm chứa Yếu tố H được bào chế bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi bánh lọc chứa Phân đoạn II+III.

Theo các phương án nhất định, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến chứng loạn chức năng Yếu tố H được chọn từ nhóm bao gồm hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển

hình (aHUS), chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD), bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng typ II (MPGNII), chứng nhồi máu cơ tim, bệnh tim mạch vành/bệnh động mạch vành (CAD/CHD) và bệnh Alzheimer. Theo một phương án cụ thể, bệnh là hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (aHUS). Theo phương án cụ thể khác, bệnh là chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD). Theo phương án cụ thể khác, bệnh là bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng typ II (MPGNII).

Theo các phương án nhất định, phương pháp được đề xuất để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến quy trình hoạt hóa bổ thể thay thế khác thường ở đối tượng cần điều trị bệnh bằng cách cho đối tượng này dùng liệu hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa Yếu tố H được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một phương án, chế phẩm chứa Yếu tố H được bào chế bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi chất kết tủa chứa Phân đoạn I. Theo một phương án khác, chế phẩm chứa Yếu tố H được bào chế bằng cách chiết Yếu tố H ra khỏi bánh lọc chứa Phân đoạn II+III.

Theo các phương án nhất định, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến hiện tượng quy trình hoạt hóa bổ thể thay thế khác thường được chọn từ nhóm bao gồm bệnh tự miễn (như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh thận IgA, bệnh hen, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh đa xơ cứng, hội chứng kháng phospholipit, bệnh viêm mạch kết hợp với ANCA, bệnh bọng nước, bệnh viêm màng bồ đào, bệnh nhược cơ, bệnh viêm tuyến giáp Hashimoto), bệnh thận (như bệnh thận IgA, hội chứng tan huyết tăng ure máu, bệnh viêm cầu thận tăng sinh màng) bệnh hen, bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa điểm vàng ở người trưởng thành, chứng huyết cầu tố niệu kịch phát về đêm, chứng phình động mạch chủ bụng, bệnh thiếu máu cục bộ chức năng hoặc trao đổi chất thương tổn và bệnh nhiễm khuẩn.

Các dược phẩm được đề xuất theo sáng chế có thể được dùng riêng biệt hoặc kết hợp với các chế phẩm để điều trị bệnh khác. Các chế phẩm này có thể được kết hợp dưới dạng một phần của dược phẩm này.

1. Cách dùng

Theo sáng chế, thời gian cần để hoàn thành một tiến trình điều trị có thể được xác định bởi bác sĩ và có thể thay đổi trong thời gian từ ngắn như một ngày đến dài hơn như

một tháng. Theo các phương án nhất định, tiến trình điều trị có thể nằm trong khoảng từ 1 tháng đến 6 tháng.

Lượng hữu hiệu của chế chứa Yếu tố H được dùng cho đối tượng theo cách thích hợp bất kỳ để điều trị bệnh hoặc rối loạn. Ví dụ, theo các phương án nhất định, Yếu tố H có thể được dùng qua đường tĩnh mạch, trong mắt, dưới da và/hoặc trong cơ. Theo phương án được ưu tiên, phương pháp điều trị chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi ở đối tượng cần điều trị được đề xuất bao gồm việc cho bệnh nhân dùng trong mắt chế phẩm chứa Yếu tố H.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa Yếu tố H được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng theo kiểu toàn thân hoặc cục bộ. Việc dùng toàn thân bao gồm: việc dùng qua đường miệng, qua chân bì, dưới chân bì, trong màng bụng, dưới da, qua đường mũi, dưới lưỡi hoặc trong trực tràng. Đường dùng hệ thống thích hợp nhất là qua đường miệng. Cách dùng theo kiểu cục bộ để dùng cho mắt bao gồm: khu trú, trong dịch kính, quanh mắt, qua củng mạc, sau nhãn cầu, gần củng mạc, nội nhãn hoặc qua thiết bị trong mắt. Các phương pháp được ưu tiên để phân phối cục bộ bao gồm phân phối qua củng mạc cho điểm vàng bằng cách dùng sau củng mạc; bằng cách tiêm trong dịch kính; hoặc qua ống thông, như các phương pháp được mô tả trong patent Mỹ số 6,413,245, phần mô tả toàn bộ nội dung của patent này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích. Theo cách khác, các chất ức chế có thể được phân phối bằng thiết bị phân phối kéo dài được cấy trong dịch kính hoặc qua củng mạc hoặc bằng các cách phân phối cho mắt theo cách cục bộ đã biết khác.

Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng chế phẩm chứa Yếu tố H làm thuyên giảm hoặc chữa được bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở đối tượng này. Lượng hữu hiệu được dùng cho đối tượng có thể được xác định bởi bác sĩ khi xem xét các sự khác biệt giữa các cá thể về tuổi, thể trọng, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được điều trị, bệnh mức độ nghiêm trọng và đáp ứng với việc điều trị bệnh. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa Yếu tố H có thể được dùng cho đối tượng với liều bằng hoặc nằm trong khoảng từ 5mg/kilogam đến 2000mg/kilogam cho mỗi lần dùng. Theo các phương án nhất định, liều này có thể ít nhất bằng hoặc khoảng 5mg/kg hoặc ít

nhất bằng hoặc khoảng 10mg/kg hoặc ít nhất bằng hoặc khoảng 20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg, 50mg/kg, 60mg/kg, 70mg/kg, 80mg/kg, 90mg/kg, 100mg/kg, 125mg/kg, 150mg/kg, 175mg/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 2000mg/kg. Liều lượng và tần suất điều trị bệnh bằng Yếu tố H sẽ phụ thuộc vào, ngoài các yếu tố khác, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý đang được điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân.

2. Chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi (Age-Related Macular Degeneration -AMD)

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi ở đối tượng cần điều trị bệnh bằng cách cho đối tượng này dùng liều hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa Yếu tố H được đề xuất trong bản mô tả này.

Chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi (AMD) là nguyên nhân hàng đầu gây mù cho người già trên 60 tuổi. Ngày nay, đã có ước tính rằng khoảng từ 35% đến 40% số người trên 75 tuổi đều mắc AMD ở một mức độ nhất định. Cũng đã có ước tính rằng khoảng 50 triệu người trên thế giới mắc bệnh này, trong đó chỉ tính riêng Hoa Kỳ là 10 triệu. Hiện nay, khoảng 155.000 trường hợp mắc AMD mới được chẩn đoán mỗi năm. Do dân số thế giới tiếp tục già đi, nên số lượng chẩn đoán hằng năm được cho là sẽ tăng lên gấp ba lần vào năm 2020. Đây là bệnh nguy hiểm phá hủy vùng nhìn trung tâm ở các cá thể mắc bệnh, lấy mất khả năng của họ để thực hiện các hoạt động của cuộc sống thường nhật như đọc sách và lái xe.

AMD là bệnh tiến triển chậm liên quan đến các tế bào của các lớp võng mạc ngoài (bao gồm các cơ quan tiếp nhận ánh sáng và các tế bào biểu mô sắc tố võng mạc (retinal pigment epithelial - RPE) trợ giúp cho các cơ quan tiếp nhận ánh sáng này), cũng như các tế bào trong lớp mạch máu liền kề của mắt, còn được gọi là màng mạch. Chứng thoái hoá điểm vàng được đặc trưng bởi sự phá vỡ của điểm vàng, một phần nhỏ của võng mạc trung tâm (có đường kính khoảng 2mm) chịu trách nhiệm về vùng nhìn có độ nét cao. Chứng

thoái hoá điểm vàng khởi phát muộn (tức là AMD) thường được gọi là "khô" hoặc "ướt". Dạng mạch máu tân sinh ướt ("rỉ dịch") của AMD làm ảnh hưởng khoảng 10% số người mắc bệnh và được đặc trưng bởi sự phát triển mạch máu bất thường từ mao mạch của màng mạch mắt qua RPE, thường dẫn đến sự xuất huyết, sự rỉ dịch, tạo sẹo và/hoặc bong võng mạc nặng. Khoảng 90% số lượng bệnh nhân mắc AMD có dạng bệnh khô hoặc không tạo mạch máu tân sinh mà được đặc trưng bởi chứng teo của RPE và mất cơ quan tiếp nhận ánh sáng của điểm vàng.

AMD được đặc trưng bởi sự xuất hiện mảng cặn, được gọi là "điểm vàng," mà tích tụ trên màng Bruch, là composit đa lớp của các thành phần nền ngoại bào tách RPE (lớp ngoài cùng của võng mạc) từ màng mạch nằm dưới. Điểm vàng có thể quan sát được bằng cách khám đáy mắt. Các mảng này đã được xác định đặc điểm một cách kỹ lưỡng bằng nghiên cứu kính hiển vi trên các mắt được bệnh nhân mắc AMD tặng. Mảng quan sát được trong mắt sống khi xem xét lâm sàng được phân loại thành điểm vàng mềm hoặc điểm vàng cứng, theo vài tiêu chí bao gồm kích thước tương đối, mật độ và hình dạng của mảng. Các nghiên cứu mô hóa học và hóa mô miễn dịch cho thấy điểm vàng chứa nhiều lipid, polysacarit, glycosaminoglycan và protein.

Hiện nay, chưa có cách điều trị AMD, mặc dù vài cách điều trị đã được thấy là hữu hiệu để theo dõi bệnh. Kỹ thuật quang đông laser trên mạch bất thường ở dạng bệnh ướt là phương pháp điều trị chuẩn. Cách điều trị này bị giới hạn bởi ở chỗ chỉ các tổn thương của mạch máu tân sinh được chỉ ra rõ mới có thể được điều trị theo cách này và 50% số bệnh nhân vẫn bị chảy dịch ra từ mạch (Fine *et al.*, 2000). Vì cần năng lượng của tia laser cho việc điều trị này, cơ quan tiếp nhận ánh sáng trong vùng được điều trị cũng bị hỏng và bệnh nhân cũng thường bị mù trong tâm điểm của mắt ngay sau khi điều trị. Các chỗ thương tổn của mạch máu tân sinh mới cuối cùng cũng sẽ phát triển trở lại, vì vậy cần phải điều trị lại. Các biện pháp can thiệp khác bao gồm việc thay đổi lối sống bằng cách dùng hút thuốc và bắt đầu điều trị bệnh bằng chất chống oxy hoá. Việc điều trị bệnh chống hình thành mạch bằng cách sử dụng các chất ức chế VEGF, ví dụ, tiêm ranibizumab hoặc bevacizumab vào trong mắt cũng đã được khuyến cáo.

Gần đây đã phát hiện ra rằng khoảng 35% số người mang hiện tượng đa hình do một nucleotit gây ra (single nucleotide polymorphism-SNP) theo một hoặc cả bản sao gen Yếu tố H của chúng. Người đồng hợp tử có nguy cơ phát triển chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi cao gấp 7 lần, trong khi dị hợp tử có nguy cơ phát triển bệnh cao gấp từ hai đến ba lần. SNP, nằm ở modul 7 CCP của Yếu tố H, đã được thấy là ảnh hưởng đến sự tương tác giữa Yếu tố H và cả protein phản ứng C và heparin, thể hiện mối quan hệ nhân quả giữa SNP và bệnh. Hiện tượng đa hình này là hiện tượng đa hình Y420H.

Trong phương pháp theo một phương án hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, đối tượng này không có các triệu chứng bất kỳ của AMD.

Trong phương pháp theo một phương án khác hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, đối tượng này có điểm vàng.

Trong phương pháp theo một phương án khác hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, đối tượng này có nguy cơ phát triển bệnh AMD tăng.

Trong phương pháp theo một phương án khác hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, việc dùng được thực hiện qua đường tĩnh mạch.

Trong phương pháp theo một phương án khác hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, phương pháp này còn bao gồm việc điều trị đối tượng có các dấu hiệu và/hoặc các triệu chứng của AMD.

Trong phương pháp theo một phương án khác hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, đối tượng này đã được chẩn đoán mắc AMD.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh cho đối tượng là người được cho là có nguy cơ phát triển chứng thoái hóa điểm vàng do tuổi, bao gồm việc

cho đối tượng này dùng chế phẩm chứa Yếu tố H theo sáng chế với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hoặc phòng ngừa bệnh và lặp lại việc dùng này một cách định kỳ.

Trong phương pháp theo một phương án điều trị bệnh cho đối tượng là người được cho là có nguy cơ phát triển chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi, việc dùng được lặp lại trong thời gian hữu hiệu để làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hoá điểm vàng ở đối tượng này.

Trong phương pháp theo một phương án khác điều trị bệnh cho đối tượng là người được cho là có nguy cơ phát triển chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi, đối tượng người này được cho là có nguy cơ phát triển chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi như được xác định dựa trên sự xuất hiện của một hoặc nhiều chất chỉ báo di truyền kết hợp với sự phát triển của chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi.

Trong phương pháp theo một phương án khác điều trị bệnh cho đối tượng là người được cho là có nguy cơ phát triển chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi, chất chỉ báo di truyền là hiện tượng đa hình.

Trong phương pháp theo một phương án khác hạn chế sự hoạt hóa bổ thể dẫn đến việc làm chậm sự tiến triển hoặc sự khởi phát chứng thoái hoá điểm vàng do tuổi (AMD) ở đối tượng, đối tượng này không được chẩn đoán về AMD.

C. Chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I)

Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị bệnh và các bệnh liên quan đến việc làm giảm chức năng I α Ip hoặc chứng loạn chức năng I α Ip bằng cách cho dùng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa I α Ip theo sáng chế. Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến việc làm giảm chức năng I α Ip hoặc chứng loạn chức năng I α Ip là bệnh nhiễm trùng máu.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất liệu hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa I α Ip bào chế được theo phương pháp theo sáng chế dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự giảm chức năng I α Ip hoặc chứng loạn chức năng I α Ip ở đối tượng

cần điều trị bệnh. Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự giảm được chức năng IaIp hoặc chứng loạn chức năng IaIp là bệnh nhiễm trùng máu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị các bệnh và rối loạn liên quan đến việc tăng hoạt tính của serin proteaza huyết tương bằng cách cho dùng chế phẩm chứa IaIp theo sáng chế với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh. Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tăng hoạt tính của serin proteaza huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm bệnh nhiễm trùng máu, sốc do nhiễm trùng máu, sốc nội độc tố, chứng đông máu rải rác nội mạch, chứng tăng sinh sợi, chứng ngộ độc do bệnh than, bệnh ung thư di căn, thương tổn mô trong quá trình phẫu thuật, bệnh thận, bệnh mạch máu, chứng đông máu, bệnh tiểu đường và bệnh viêm toàn thân.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất liều hữu hiệu để điều trị bệnh của chế phẩm chứa IaIp bào chế được theo phương pháp theo sáng chế dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến tăng hoạt tính của serin proteaza huyết tương ở đối tượng cần điều trị. Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tăng hoạt tính của serin proteaza huyết tương được chọn từ nhóm bao gồm bệnh nhiễm trùng máu, sốc do nhiễm trùng máu, sốc nội độc tố, chứng đông máu rải rác nội mạch, chứng tăng sinh sợi, ngộ độc do bệnh than, bệnh ung thư di căn, thương tổn mô trong quá trình phẫu thuật, bệnh thận, bệnh mạch máu, chứng đông máu, bệnh tiểu đường và bệnh viêm toàn thân.

D. Cách dùng

Theo sáng chế, thời gian cần để hoàn thành một tiến trình điều trị bệnh có thể được xác định bởi bác sĩ và có thể thay đổi trong thời gian từ ngắn như một ngày đến dài hơn như một tháng. Theo các phương án nhất định, tiến trình điều trị bệnh có thể kéo dài từ 1 tháng đến 6 tháng.

Lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa IaIp được dùng cho đối tượng theo cách thích hợp bất kỳ để điều trị bệnh hoặc rối loạn. Ví dụ, theo các phương án nhất định, IaIp có thể được dùng qua đường tĩnh mạch, dưới da và/hoặc trong cơ. Theo phương án được ưu tiên, phương pháp điều trị bệnh nhiễm khuẩn ở đối tượng cần điều trị được đề xuất bao gồm việc cho bệnh nhân dùng chế phẩm chứa IaIp trong tĩnh mạch (IV).

Theo các phương án nhất định, các chế phẩm chứa IaIp được đề xuất trong bản mô tả này có thể được dùng toàn thân hoặc cục bộ. Việc dùng theo toàn thân bao gồm các đường dùng: qua đường miệng, dưới chân bì, trong màng bụng, dưới da, qua đường mũi, dưới lưỡi hoặc trong trực tràng. Việc dùng cục bộ bao gồm các đường dùng: khu trú, dưới da, trong cơ và trong màng bụng.

Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” được dùng để chỉ lượng chế phẩm chứa IaIp làm thuyên giảm hoặc chữa được bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở đối tượng này. Lượng hữu hiệu được dùng cho đối tượng có thể được xác định bởi bác sĩ khi xem xét riêng biệt sự khác biệt về tuổi, thể trọng, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được điều trị, bệnh mức độ nghiêm trọng và đáp ứng với việc điều trị này. Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa IaIp có thể được cho đối tượng dùng với liều nằm trong khoảng từ 5mg/kilogam đến 2000mg/kilogam cho mỗi lần dùng. Theo các phương án nhất định, liều này có thể ít nhất khoảng 5mg/kg hoặc ít nhất 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, 125mg/kg, 150mg/kg, 175mg/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 lượng và tần suất của việc điều trị bệnh bằng IaIp sẽ phụ thuộc vào, ngoài các yếu tố khác, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý đang được điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở bệnh nhân.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nhằm xác định dư lượng và hoạt tính của serin proteaza có mặt trong chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, đặc điểm hoạt tính phân giải amit được xác định đối với hai chế phẩm chứa IgG hiện có bán trên thị trường, là các chế phẩm bào chế được mà không được xử lý bằng SiO₂: OCTAGAM® (Globulin miễn dịch 5% dùng qua đường tĩnh mạch; Octapharma) và Subcuvia (Globulin miễn dịch 16% dùng dưới da; Baxter); hai chế phẩm chứa IgG hiện có bán trên thị trường được bào chế bằng cách xử lý bằng SiO₂:

Gammagard Liquid (Globulin miễn dịch 10% dùng qua đường tĩnh mạch; Baxter) và phương pháp tinh chế Yếu tố H hiện đang được phát triển. Điều đáng chú ý là, chế phẩm chứa Yếu tố H được tinh chế như được mô tả trên đây, bằng cách gắn kết và tiếp theo rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ nghiền mịn.

Một cách vắn tắt, đặc điểm hoạt tính phân giải amit của mỗi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương được xác định bằng cách thử nghiệm với các cơ chất tạo màu sau với các tính đặc hiệu enzyme khác nhau: PL-1 (phổ rộng), S-2288 (phổ rộng), S-2266 (FXIa, kallikrein theo tuyến), S-2222 (FXa, trypsin), S-2251 (Plasmin) và S-2302 (Kallikrein, FXIa và FXIIa). Hoạt tính hoạt hoá tiền kallikrein (PKKA) và lượng đơn vị Yếu tố XIa cũng được xác định. Như được thể hiện trong Bảng 17, chế phẩm chứa IgG thu được từ huyết tương được bào chế mà không sử dụng bước hấp phụ SiO₂ chứa mức hoạt tính phân giải amit và FXIa với lượng đáng kể. Trái lại, cả hai lô Gammagard Liquid được thử nghiệm đều có hoạt tính phân giải amit và FXIa với lượng tối thiểu. Phù hợp với kết quả này, chế phẩm chứa Yếu tố H bào chế được bằng cách gắn kết và rửa giải ra khỏi SiO₂ nghiền mịn, có hoạt tính phân giải amit và FXIa với lượng rất cao.

Bảng 17. Hoạt tính phân giải amit của các chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương khác nhau.

Tính đặc hiệu	Cơ chất tạo màu	Yếu tố H	Chế phẩm chứa IGIV sẵn có trên thị trường			IGSC
		Mẫu FH012 FC steril	Octagam 5% (Octapharma) #B842A843 2	Mê 1 Gammagard Liquid 10% (Baxter) #LE12G142AD	Mê 2 Gammagard Liquid 10% (Baxter) #LE12HE76	Subcuvia 16% (Baxter) #VNG1H02 0
		Tốc độ thủy phân [nmol/ml x phút]				
Phổ rộng	PL-1	73,7	18,3	<10	<10	22,1
Phổ rộng	S-2288	241	29	<5	<5	46
FXIa, kallikrein tuyến	S-2266	171	27,1	<5	<5	34,2
Fxa, Trypsin	S-2222	8,3	<5	<5	<5	<5
Plasmin	S-2251	7,3	<5	<5	<5	<5
Kallikrein, FXIa, FXIIa	S-2302	563	70,1	<5	7,6	99,6
PKKA	IE/mL	9,5	<4	<4	<4	<4
F-XIa	mU/mL	510,8	1,37	<0,04	<0,04	0,79

Ví dụ 2

Để tìm ra sơ đồ có tính kinh tế để bào chế Yếu tố H từ mẫu huyết tương, mà cho phép thu hồi các yếu tố máu bổ sung từ cùng mẫu huyết tương, lô huyết tương người được gộp lại được cho phân đoạn theo sơ đồ nêu trong sơ đồ khối được thể hiện trên Hình 1. Như được thể hiện trên Hình 2, phần lớn Yếu tố H (khoảng 90%) có mặt trong nguồn dự trữ Cohn nghèo trong điều kiện lạnh sâu từ huyết tương người có thể phát hiện được trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III. Lượng Yếu tố H nhỏ hơn, không đáng kể (khoảng 10%) cũng có thể phát hiện được trong chất kết tủa chứa Phân đoạn I. Điều này là phù hợp với kết quả nêu trong công bố đơn Quốc tế số WO 2011/011753, toàn bộ nội dung của nó được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích.

Yếu tố H được chiết ra khỏi sản phẩm phụ là bánh lọc chứa SiO_2 nghiền mịn được tạo ra do việc lọc chế phẩm “xử lý Aerosil” ngược dòng trực tiếp với chế phẩm 6, “dịch lọc chứa Phân đoạn II+III,” bằng cách cho đệm chiết Yếu tố H tuần hoàn qua thiết bị lọc ép này. Sau đó, các muối và một số tạp chất được loại bỏ ra khỏi chiết phẩm của bánh lọc này nhờ bước làm kết tủa thứ nhất được thực hiện ở độ pH bằng 8,0 bằng cách bổ sung ethanol vào đến nồng độ cuối bằng 15% và ủ ở nhiệt độ -6°C trong thời gian tối thiểu là bốn giờ. Độ pH của hỗn hợp phản ứng kết tủa được điều chỉnh lại đến 8,0 sau khi ủ trong 1 giờ. Sau đó, chất kết tủa được loại bỏ ra khỏi dịch nổi này bằng cách ly tâm. Yếu tố H được làm giàu tiếp bằng bước làm kết tủa thứ hai được thực hiện ở độ pH bằng 6,0 bằng cách bổ sung ethanol vào đến nồng độ cuối bằng 25% và ủ ở nhiệt độ -10°C trong thời gian tối thiểu là 8 giờ. Sau đó, chất kết tủa chứa Yếu tố H thu hồi được bằng cách ly tâm.

Chất kết tủa được tạo ra nhờ bước làm kết tủa thứ hai được hoà tan theo tỷ lệ 1:9 trong đệm hòa tan có cường độ ion thấp và được xử lý bằng S/D để làm bất hoạt các virut có vỏ bằng lipid. Yếu tố H được làm giàu tiếp bằng cách sắc ký trao đổi anion bằng cách sử dụng nhựa DEAE-Sepharose FF. Một cách vắn tắt, Yếu tố H được gắn kết với nhựa DEAE-Sepharose trong điều kiện cường độ ion thấp và được rửa giải bằng cách tăng cường độ ion của dung dịch này. Sau đó, độ dẫn điện của nước rửa giải DEAE-Sepharose được giảm và Yếu tố H được làm giàu tiếp bằng cách sắc ký ái lực Heparin. Một cách vắn tắt,

Yếu tố H được gắn kết với nhựa Heparin-Sepharosa FF trong điều kiện cường độ ion thấp và được rửa giải bằng cách tăng cường độ ion của dung dịch này. Như được thể hiện trong Bảng 18, phần lớn Yếu tố H được gắn kết với nhựa DEAE và Heparin.

Bảng 18. Gắn kết Yếu tố H với nhựa sắc ký.

Lô	1. DEAE-Sepharosa FF		2. Heparin-Sepharosa FF	
	FH006	FH012	FH006	FH012
Nạp (Protein)	30,6mg/ml	28,0mg/ml	3,3mg/ml	2,1mg/ml
FH gắn kết với nhựa	87,4%	96,3%	100%	99,4%

Sau đó, yếu tố H được rửa giải ra khỏi nhựa Heparin được cho qua bước siêu lọc/lọc thẩm tách theo các quy trình chuẩn, tiếp đó là bước sắc ký loại cỡ trên cột Superdex 200. Sau đó, yếu tố H thu hồi được từ bước sắc ký loại cỡ được cô đặc bằng cách siêu lọc, lọc tiệt trùng và được bảo chế với nồng độ protein cuối cùng bằng 50mg/ml trong đệm PBS.

Chế phẩm Yếu tố H cuối cùng (FH012) được xác định đặc điểm về mức đồng nhất, các tạp chất và hoạt tính phân giải amit. Độ phân tán đơn của chế phẩm Yếu tố H được xác định đặc điểm bằng phép sắc ký loại cỡ. Như được thể hiện trong Bảng 19, phần lớn protein có mặt trong chế phẩm Yếu tố H cuối cùng được di chuyển với kích thước ước tính bằng 400kDa khi được nhồi vào cột HP-SEC.

Bảng 19. Sự phân bố kích thước phân tử của chế phẩm FH012 cuối cùng xác định được theo HP-SEC.

Mẫu	Pic 1 >450kDa	Pic 2 400kDa	Pic 3 160kDa
	% diện tích		
FC FH012	0,3	97,6	2,1

Nồng độ nội độc tố, độ pH, vẻ ngoài và nồng độ protein cuối cùng được xác định đối với chế phẩm Yếu tố H cuối cùng. Như được thể hiện trong Bảng 20, chế phẩm này có nồng độ nội độc tố thấp (<0,5 EU/ml) xác định được theo thử nghiệm dịch thủy phân amebaxyt của con sam (LAL).

Bảng 20. LAL, độ pH, vẻ bên ngoài và nồng độ protein của chế phẩm chứa FH012 cuối cùng.

LAL	<0,5 EU/ml (không chứa chất sinh nhiệt)
Độ pH	7,1
Vẻ bên ngoài	Không màu và không có hạt nhìn thấy được
Nồng độ protein	4,54%

Nồng độ của các tạp chất protein trong chế phẩm cuối cùng chứa Yếu tố H được xác định. Như được thể hiện trong Bảng 21, các protein bổ thể và globulin miễn dịch IgG là nguyên nhân dẫn đến nồng độ protein cuối cùng trong chế phẩm chứa Yếu tố H nhỏ hơn 1%.

Bảng 21. Các tạp chất trong chế phẩm chứa FH012 cuối cùng.

Tạp chất	Nồng độ	Tỷ lệ phần trăm theo protein toàn phần
IgG	51µg/ml	0,11%
C3	321,5µg/ml	0,71%
C3a	17,5µg/ml	0,04%
C5a	3,7ng/ml	<0,01%
C4	1,94µg/ml	<0,01%
EDTA	72µg/ml	

Cuối cùng, hoạt tính phân giải amit và nồng độ proteaza được xác định như được thông báo trong Ví dụ 1. Như được thể hiện trong Bảng 17, Yếu tố H thu được từ huyết tương được tinh chế theo sơ đồ nêu trong ví dụ này có hoạt tính phân giải amit và nồng độ FXIa cao.

Ví dụ 3

Nhằm thể hiện khả năng loại bỏ hoạt tính phân giải amit ra khỏi chế phẩm protein thu được từ huyết tương, chất kết tủa Phân đoạn II+III Cohn đã được tạo lại huyền phù được xử lý bằng silic dioxit (SiO₂) nghiền mịn. Một cách vắn tắt, huyết tương nghèo trong điều kiện lạnh sâu của người đã được gộp lại được phân đoạn theo sơ đồ tinh chế IgG được bộc lộ trong bản mô tả này, để tạo ra chất kết tủa Phân đoạn II+III. Chất kết tủa Phân đoạn

II+III này được tạo lại huyền phù trong đệm chiết có độ dẫn điện thấp ($\text{pH}=5,1\pm0,2$; $\sim 0,8\text{mS/cm}$) ở nhiệt độ được duy trì trong khoảng từ 0°C đến 8°C . Aerosil® 380 (do Evonik Industries AG cung cấp) được bổ sung vào đến hàm lượng cuối của chất kết tủa II+III nằm trong khoảng từ 40g/kg đến 60g/kg. Sau khi bổ sung chất trợ lọc CELPURE® C300 (do Advanced Minerals Corporation cung cấp) vào đến hàm lượng cuối của chất kết tủa II+III bằng 0,5kg/kg, huyền phù này được lọc bằng cách sử dụng bộ lọc sâu. Sau đó, chế phẩm globulin miễn dịch trong dịch lọc được thử nghiệm về hàm lượng tiền enzyme FXI. Như được thể hiện trong Bảng 22, việc xử lý huyền phù Phân đoạn II+III bằng SiO_2 nghiền mịn làm giảm gần 90% hàm lượng tiền enzyme của Yếu tố XI của chế phẩm này.

Bảng 22. Các tạp chất trong chế phẩm FH012 cuối cùng.

Huyền phù được tạo lại chứa phân đoạn II+III						Dịch lọc Cuno chứa chiết phẩm Phân đoạn II+III				
Lô	Bột nhão chứa Phân đoạn II+III, (kg)	Phân đoạn II+III đã hòa tan (L)	Tiền enzyme của Yếu tố XI (U/ml)	Tiền enzyme của Yếu tố XI (1000s của U)	Tiền enzyme của Yếu tố XI (%)	Thể tích dịch lọc chứa Phân đoạn II+III, (L)	Tiền enzyme của Yếu tố XI (U/ml)	Tiền enzyme của Yếu tố XI (1000s của U)	Tiền enzyme của Yếu tố XI (%huyền phù tạo lại chứa Phân đoạn II+III)	% Loại bỏ
1	117	469	5,25	2460	100	2250	0,11	247	10,1%	89,9%
2	118	475	5,13	2435	100	2290	0,11	251	10,3%	89,7%
3	119	479	4,51	2162	100	2300	0,12	276	12,8%	87,2%

Ví dụ 4

Để đánh giá mức độ rửa giải các serin proteaza ra khỏi bánh lọc SiO_2 nghiền mịn, như điều chế được trong Ví dụ 3, đệm rửa giải chứa đệm phosphat với các nồng độ khác nhau (100mM, 50mM, 25mM và 5mM) được sử dụng để rửa giải protein ra khỏi SiO_2 ở hai độ pH khác nhau (6,0, 7,5). Một cách vắn tắt, bánh lọc này được hoà tan với tỷ lệ 1:5 trong hệ đệm thích hợp và được lọc qua các bộ lọc sâu (Cuno 50 SA). Sau đó, hoạt tính phân giải amit và chế phẩm chứa Yếu tố H của mỗi nước rửa giải được xác định (Bảng 23 và Bảng 24). Như được thể hiện trong Bảng 23, ở độ dẫn điện và độ pH nhỏ hơn (tức là 6,0), mức độ rửa giải hoạt tính phân giải amit đo được bằng cơ chất CS2166 (FXIa, Protein C đã được hoạt hoá) giảm.

Trong điều kiện rửa giải ở độ pH=7,5 (Bảng 24), mức độ rửa giải Yếu tố H giảm khi tăng độ dẫn điện, trong khi mức độ rửa giải serin proteaza tăng khi tăng độ dẫn điện. Điều bất ngờ là, ở độ dẫn điện cực kỳ thấp (dung dịch phosphat 5mM; 0,882mS/cm), mức độ rửa giải serin proteaza tăng một cách đáng kể, trong khi mức độ rửa giải Yếu tố H giảm. Dữ liệu thu được của việc rửa giải ở độ pH=7,5 được thể hiện bằng đồ thị trên Hình 3.

Bảng 23. Rửa giải Yếu tố H và hoạt tính của serin proteaza ra khỏi SiO₂ nghiền mịn ở độ pH=6,0.

Hệ đệm: độ pH = 6,0	Mẫu	Cơ chất: CS2166	Yếu tố H	Protein
		tổng số nmol*phút	[g/l Huyết tương]	[nmol/g]
Đệm phosphat 100mM; điều kiện 11,88mS/cm	Dịch lọc	72745	0,27	61944
Đệm phosphat 50mM; điều kiện 6,55mS/cm	Dịch lọc	65055	0,19	64600
Đệm phosphat 25mM; điều kiện 3,48mS/cm	Dịch lọc	28591	0,05	63694
Đệm phosphat 5mM: điều kiện 0,882mS/cm	Dịch lọc	4816	0,0003	57331

Bảng 24. Rửa giải Yếu tố H và hoạt tính của serin proteaza ra khỏi SiO₂ nghiền mịn ở độ pH 7,5.

Hệ đệm: độ pH = 7,5	Mẫu	Cơ chất: CS2166	Yếu tố H	Protein
		tổng số nmol*phút	[g/l Huyết tương]	[nmol/g]
Đệm phosphat 100mM; điều kiện 18,81mS/cm	Dịch lọc	236456	0,21	156718
Đệm phosphat 50mM; điều kiện 10,91mS/cm	Dịch lọc	147829	0,29	109228
Đệm phosphat 25mM; điều kiện 6,08mS/cm	Dịch lọc	84622	0,39	57892
Đệm phosphat 5mM: điều kiện 1,524mS/cm	Dịch lọc	176685	0,33	134051

Ví dụ 5

Nhằm chứng minh khả năng rửa giải một cách biệt hóa các serin proteaza và Yếu tố H cùng gắn kết với SiO₂, quy trình rửa giải hai bước được phát triển. Một cách vắn tắt, bánh lọc chứa Phân đoạn II+III đã được tạo ra sau khi xử lý bằng SiO₂ được điều chế như

nêu trên. Sau đó, bánh lọc này được cho qua bước rửa giải thứ nhất trong điều kiện dung dịch là cường độ ion nằm trong khoảng từ 0,882mS/cm đến 11,88mS/cm và ở độ pH=6,0. Như được chứng minh trong Ví dụ 4, việc xử lý SiO₂ đã được gắn kết ở độ pH thấp (pH=6,0) và cường độ ion thấp (nhỏ hơn 6,5mS/cm) dẫn đến rửa giải các serin proteaza (ví dụ, FXIa), trong khi phân đoạn chủ yếu chứa Yếu tố H vẫn được gắn kết. Việc xử lý tiếp theo ở độ pH cao (pH=7,5) và cường độ ion cao dẫn đến rửa giải Yếu tố H ra khỏi SiO₂ (Bảng 25). Hơn thế nữa, phù hợp với kết quả được cung cấp trong Ví dụ 4, việc xử lý ban đầu SiO₂ ở độ pH cao (7,5) dẫn đến rửa giải Yếu tố H (

Bảng 26). Như đã được thể hiện, việc rửa giải ban đầu ở độ dẫn điện và độ pH nhỏ hơn 6,0 có thể được sử dụng để làm giảm một phần hoạt tính phân giải amit ra khỏi bánh lọc và sau đó Yếu tố H có thể được rửa giải ở nồng độ phosphat 100mM, NaCl 150mM, độ pH=7,6. Quy trình này tạo ra dịch lọc, Yếu tố H với hiệu suất 0,31g/l huyết tương, giảm được hoạt tính phân giải amit (CS2166) để xử lý tiếp.

Bảng 25. Rửa giải biệt hóa hai bước serin proteaza và Yếu tố H ra khỏi SiO₂ ở độ pH bằng 6,0/7,6.

Hệ đệm rửa giải thứ nhất pH=6,0	Đệm rửa giải thứ hai	Mẫu	Yếu tố H [g/l Huyết tương]
Đệm phosphat 100mM; điều kiện 11,88mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,06
Đệm phosphat 50mM; điều kiện 6,55mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,11
Đệm phosphat 25mM; điều kiện 3,48mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,25
Đệm phosphat 5mM: điều kiện 0,882mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,31

Bảng 26. Rửa giải biệt hóa hai bước serin proteaza và Yếu tố H ra khỏi SiO₂ ở độ pH bằng 7,5/7,6.

Hệ đệm rửa giải thứ nhất pH 7,5	Đệm rửa giải thứ hai	Mẫu	Yếu tố H [g/l Huyết tương]
Đệm phosphat 100mM; điều kiện 11,88mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,05
Đệm phosphat 50mM; điều kiện 6,55mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,06
Đệm phosphat 25mM; điều kiện 3,48mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,06
Đệm phosphat 5mM; điều kiện 0,882mS/cm	Đệm phosphat 100mM + NaCl 150mM, độ pH=7,6	Rửa giải dịch lọc lần thứ hai	0,07

Ví dụ 6

Để xác định lượng SiO₂ nghiền mịn cần để loại bỏ một cách hữu hiệu các serin proteaza và tiền enzym serin proteaza ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III (tức là bánh lọc II+III) được hoà tan, lọc, xử lý bằng SiO₂, chất trợ lọc được trộn và cho qua bước lọc thứ hai. Một cách vắn tắt, bánh lọc chứa phân đoạn II+III được hoà tan lần thứ nhất trong đệm phosphat 0,1M chứa 150mM natri clorua (pH=7,5; 30mS/cm). Sau đó, lọc huyền phù này qua bộ lọc Cuno 50 SA và dịch lọc được gom. Aerosil 380 được trộn với dịch lọc chứa protein với nồng độ cuối cùng bằng 1,0 hoặc 2,5g/g và sau đó ủ trong thời gian ít nhất 50 phút. Chất trợ lọc CELPURE được bổ sung vào và việc lọc được thực hiện bằng cách sử dụng bộ lọc Cuno 50 SA. Sau đó, dịch lọc thu được được xác định đặc điểm về hoạt tính phân giải amit, như được thể hiện trong

Bảng 27. Điều đáng chú ý là, kết quả này cho thấy rằng việc bổ sung Aerosil vào với hàm lượng cuối cùng 2,5g/g protein làm giảm được hoạt tính phân giải amit của Kallikrein, FXIa và FXIIa trong chế phẩm này đến mức lớn hơn 90%, so với mẫu được xử lý bằng Aerosil với hàm lượng cuối cùng bằng 1,0g/g protein.

Bảng 27. Hoạt tính phân giải amit có mặt trong chất kết tủa chứa Phân đoạn II+III đã được tạo lại huyền phù sau khi xử lý bằng silic đioxit nghiền mịn.

Kallikrein, FXIa, FXIIa	Cơ chất: S-2302	Mức độ giảm do tăng Aerosil bổ sung
Mẫu	tổng số: nmol*phút	[%]
Dịch lọc FH027 Cuno, sau khi bổ sung 1g Aerosil cho mỗi g protein	83347	-
Dịch lọc FH027 Cuno, sau khi bổ sung 2,5g Aerosil cho mỗi g protein	6227	92,5

Ví dụ 7

Để đánh giá hiệu quả của việc xử lý bằng SiO₂ đối với việc loại bỏ tiền enzym Yếu tố XI trong quá trình bào chế ở quy mô công nghiệp chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, hàm lượng tiền enzym FXI của sáu nhóm bào chế ở quy mô công nghiệp được xác định đặc điểm. Bảng 28 và Bảng 29 thể hiện hàm lượng tiền enzym FXI trung bình của mỗi bước trước quy trình từ ba lần tinh chế được thực hiện tại cùng địa điểm sản xuất. Dữ liệu thể hiện trong Bảng 28 và Bảng 29 chứng tỏ rằng việc xử lý bằng SiO₂ các bước tinh chế ở quy mô công nghiệp có thể giảm được hàm lượng tiền enzym FXI của chế phẩm này đến mức ít nhất 90%. Điều đáng chú ý là, địa điểm sản xuất 1 trộn Aerosil với nồng độ cuối cùng bằng 50g/kg chất kết tủa II+III, trong khi địa điểm 2 sử dụng Aerosil với nồng độ cuối cùng bằng 40g/kg chất kết tủa II+III. Điều bất ngờ là, việc sử dụng Aerosil với lượng khác nhau không đáng kể tạo ra sự khác biệt đáng kể về hàm lượng tiền enzym của Yếu tố XI trong dịch lọc sau khi được xử lý bằng aerosil (8,1% nguồn dự trữ Cohn ban đầu ở địa điểm 2 so với 2,8% nguồn dự trữ Cohn ban đầu ở địa điểm 1).

Bảng 28. Trị số trung bình của hàm lượng tiền enzym của Yếu tố XI trong mỗi phân đoạn của ba mẻ sản xuất ở quy mô lớn được xử lý ở địa điểm 1.

Mẫu	Thể tích	Tiền enzym F-XI		
		(U/mL)	(U)	(tỷ lệ % nguồn dự trữ Cohn)
Nguồn dự trữ Cohn	3379	1,25	4233923	100,0
Dịch nổi I	3632	1,01	3669081	87,2
Dịch nổi II+II	3927	0,21	812077	19,1
Bột nhão II+III*	2302	1,31	3026261	71,6

Dịch lọc sau khi xử lý bằng Aerosil	2993	0,04	119107	2,8
Chất kết tủa G hòa tan	248	0,31	77300	1,8

Bảng 29. Trị số trung bình của hàm lượng tiền enzyme của Yếu tố XI trong mỗi phân đoạn của ba mẻ sản xuất ở quy mô lớn được xử lý ở địa điểm 2.

Mẫu	Thể tích	Tiền enzyme F-XI		
		(U/mL)	(U)	(tỷ lệ % của nguồn dự trữ Cohn)
Nguồn dự trữ Cohn	2885	1,11	3193460	100,0
Dịch nổi I	3076	1,04	3208517	100,5
Dịch nổi II+II	3376	0,29	968120	30,2
Bột nhão II+III*	474,3	4,96	2352714	74,0
Dịch lọc sau khi xử lý bằng Aerosil	2280	0,11	258466,7	8,1
Chất kết tủa G hòa tan	238,1	1,07	253912,33	8,0

Cần phải hiểu rằng các ví dụ và các phương án nêu trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và các dạng cải biến hoặc biến đổi khác của nó sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đề xuất và được bao hàm trong nội dung và phạm vi của đơn sáng chế này và phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tất cả các công bố, patent, và đơn yêu cầu cấp patent nêu trong bản mô tả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm giảm lượng serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza trong chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) thực hiện bước làm giàu thứ nhất protein đích để tạo ra chế phẩm được làm giàu thứ nhất;
- (b) cho chế phẩm này tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza; và
- (c) tách SiO_2 ra khỏi chế phẩm này để loại bỏ serin proteaza đã được gắn kết, trong đó ít nhất một serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là yếu tố XIa (FXIa), yếu tố XIIa (FXIIa), yếu tố XI (FXI), hoặc yếu tố XII (FXII);

trong đó bước làm giàu thứ nhất protein đích là bước làm kết tủa protein;

trong đó bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu; và

trong đó protein đích thu được từ huyết tương được chọn từ globulin miễn dịch (Ig), albumin, alpha-1-antitrypsin (A1PI), butyrylcholinesteraza, protein của hệ bổ thể, và chất ức chế inter-alpha-trypsin (I α I).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thực hiện bước làm giàu thứ hai protein đích trước khi cho chế phẩm được làm giàu tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bước làm giàu thứ hai protein đích là:

- (i) bước làm kết tủa protein;
- (ii) bước siêu lọc/lọc thẩm tách; hoặc
- (iii) bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc thực hiện bước làm giàu thứ ba protein đích sau khi cho chế phẩm tiếp xúc với silic đioxit (SiO_2) nghiền mịn.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó bước làm giàu thứ ba protein đích là:
- (i) bước làm kết tủa protein;
 - (ii) bước siêu lọc/lọc thẩm tách; hoặc
 - (iii) bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó bước làm kết tủa protein là bước phân đoạn bằng rượu.
8. Phương pháp theo điểm 3 hoặc 6, trong đó bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ nêu dưới đây:
- (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết protein đích thu được từ huyết tương; và
 - (ii) rửa giải protein đích thu được từ huyết tương ra khỏi nhựa sắc ký.
9. Phương pháp theo điểm 3 hoặc 6, trong đó bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm các bước phụ nêu dưới đây:
- (i) cho chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương đã được làm giàu thứ nhất tiếp xúc với nhựa sắc ký trong điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất một tạp chất; và
 - (ii) tách nhựa ra khỏi chế phẩm chứa protein thu được từ huyết tương, trong đó protein đích thu được từ huyết tương không gắn kết với nhựa sắc ký ở bước phụ (i).
10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó nhựa sắc ký được chọn từ nhóm bao gồm nhựa trao đổi anion, nhựa trao đổi cation, nhựa tương tác kỵ nước, nhựa hỗn hợp, nhựa hydroxyapatit, nhựa ái lực phối tử, nhựa ái lực miễn dịch, và nhựa sắc ký loại cỡ.

11. Phương pháp theo điểm 3 hoặc 6, trong đó bước làm giàu bằng kỹ thuật sắc ký bao gồm bước tách ít nhất một tạp chất ra khỏi protein đích theo kích thước và/hoặc hình dạng bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký loại cỡ.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó protein thu được từ huyết tương là protein của hệ bổ thể, và trong đó protein của hệ bổ thể này được chọn từ nhóm bao gồm yếu tố H (FH), yếu tố D, protein bổ thể C3, và protein gắn kết C4.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó chế phẩm chứa protein đích thu được từ huyết tương là chất trung gian trong quy trình điều chế.

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm được cho tiếp xúc với SiO_2 với nồng độ cuối cùng là:

(i) ít nhất 1g SiO_2 /g protein;

(ii) ít nhất 2g SiO_2 /g protein; hoặc

(iii) ít nhất 2,5g SiO_2 /g protein.

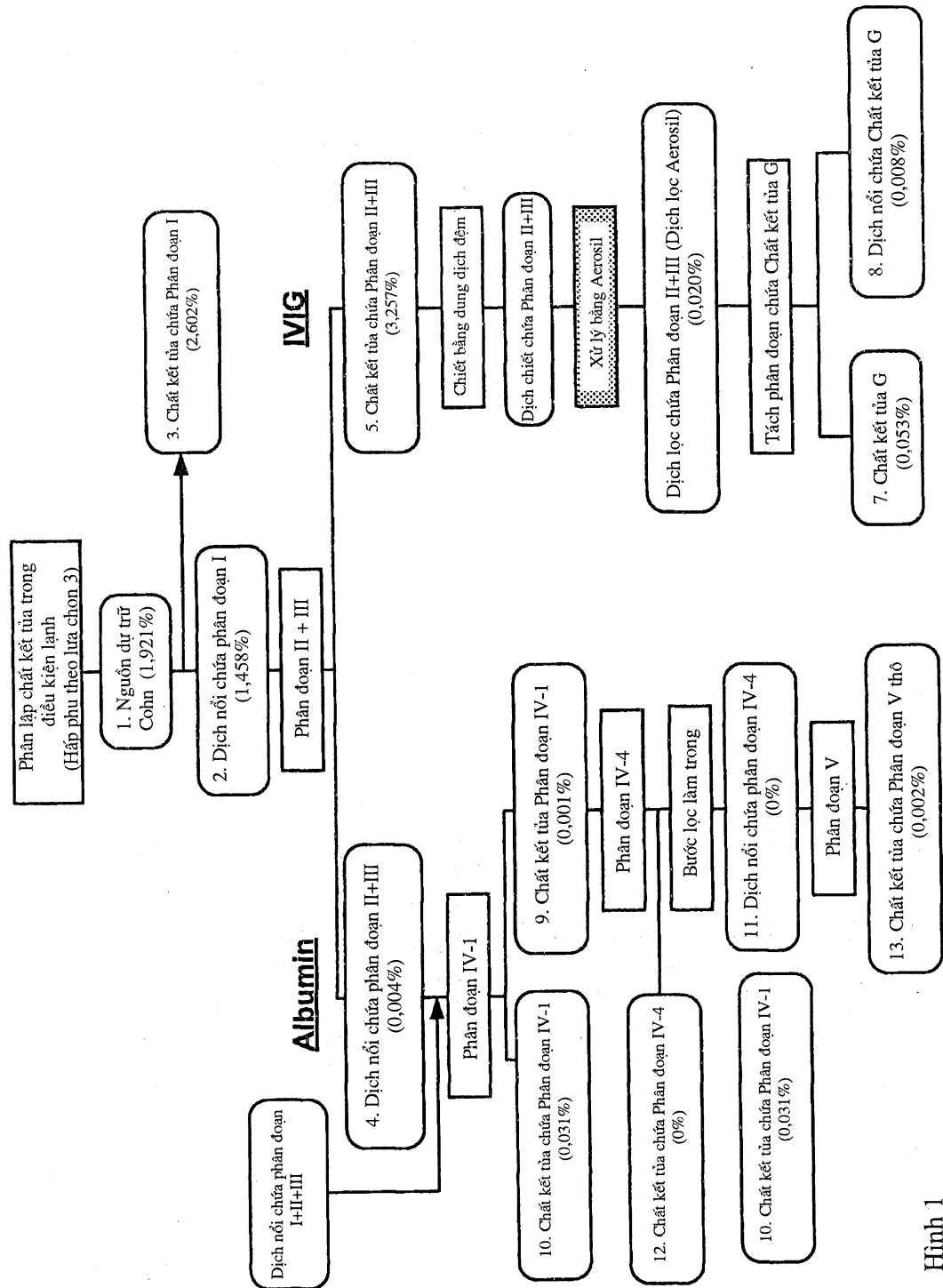
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó serin proteaza hoặc tiền enzym serin proteaza là:

(i) yếu tố XI;

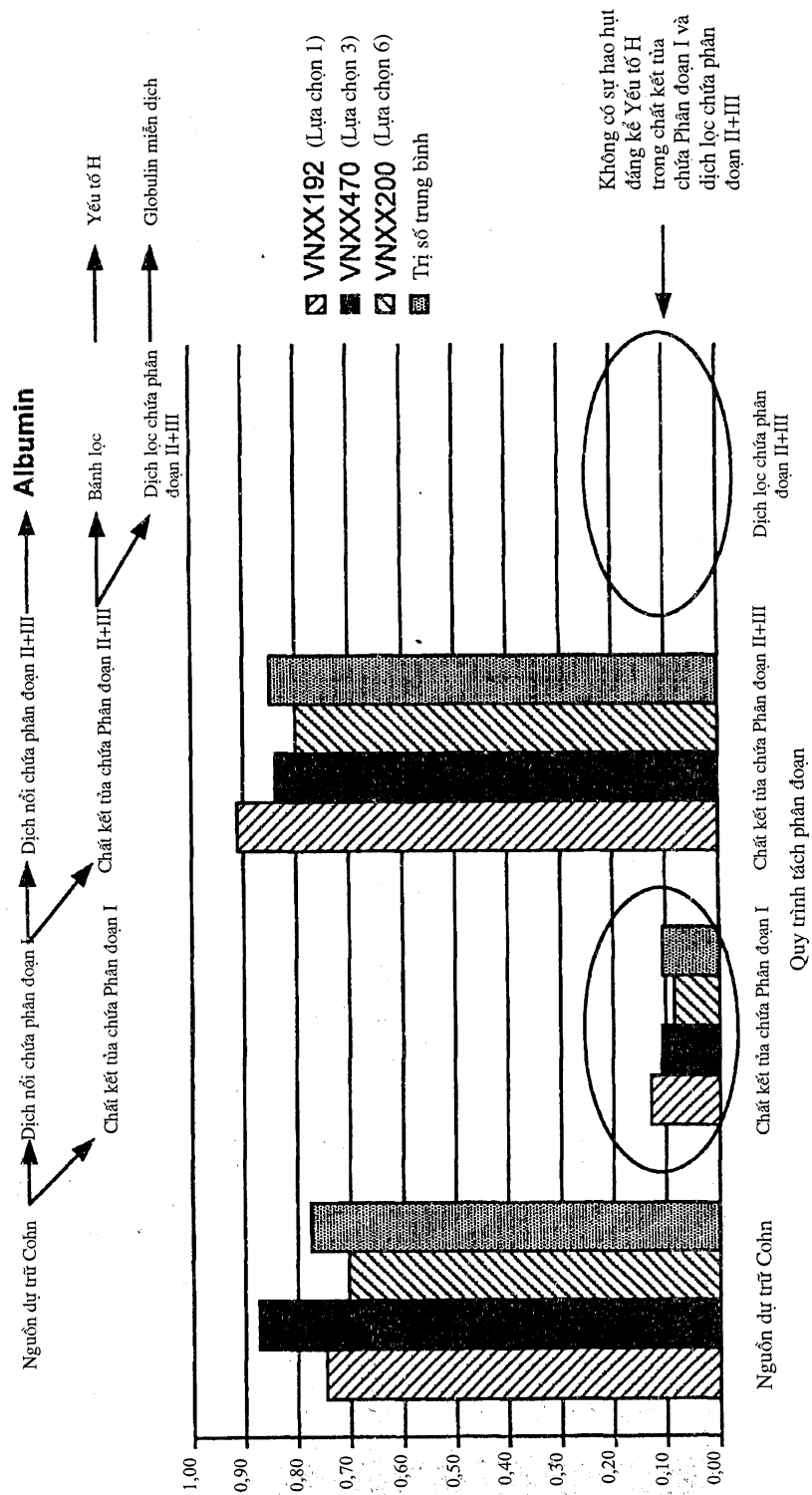
(ii) yếu tố XII;

(iii) yếu tố XIa; hoặc

(iv) yếu tố XIIa.

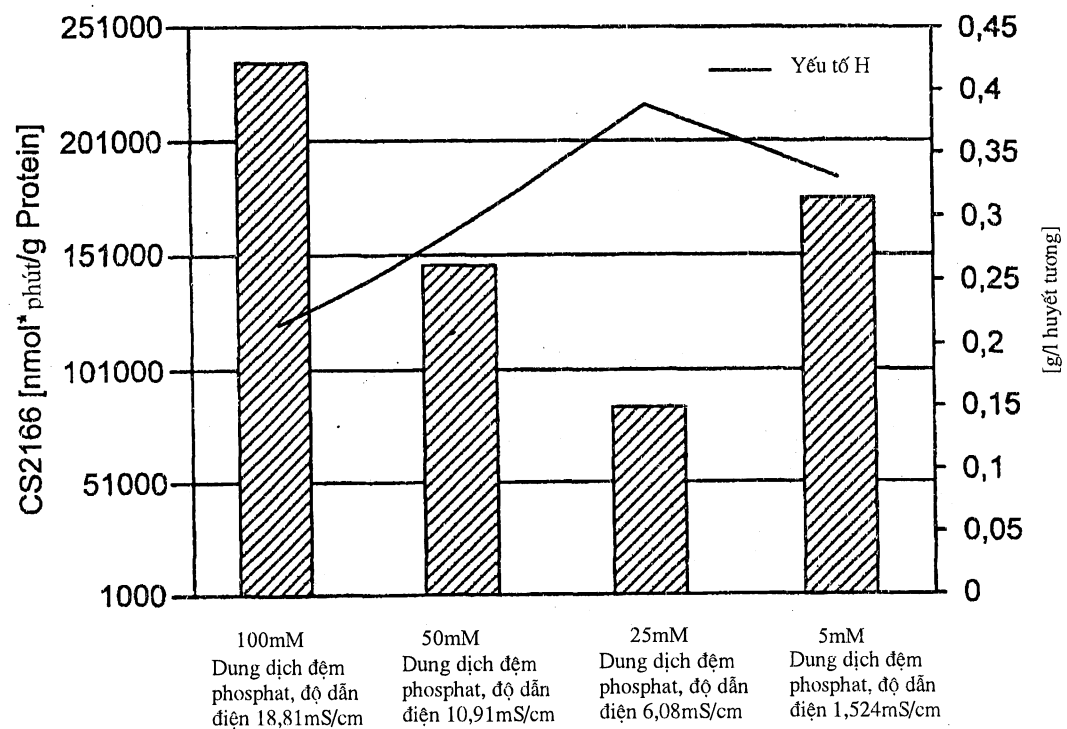


Hình 1



Hình 2

Hệ dung dịch đệm phosphat: pH = 7,5



Hình 3