



(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)



1-0025147

(51)<sup>7</sup> A61K 35/37; A61L 2/00

(13) B

(21) 1-2013-02178

(22) 14/12/2011

(86) PCT/US2011/064960 14/12/2011

(87) WO2012/082931 21/06/2012

(30) 61/423,512 15/12/2010 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/12/2013 309A

(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) FELGENHAUER, Martin (AT); MISON, Dominique (FR); MONTANDON, Frederic (FR); FARCET, Maria (AT).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẤT HOẠT VIRUT CÓ VỎ LIPIT VÀ YẾU TỐ VIII TÁI TỔ HỢP THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid và yếu tố VIII tái tổ hợp về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp này.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến phương pháp bất hoạt các virus nhiễm tạp trong quá trình sản xuất protein.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Việc sử dụng các dược phẩm chứa protein trị liệu ngày càng có vai trò quan trọng để điều trị nhiều bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý mà tác động đến sức khỏe của cá thể. Nhiều protein được sử dụng trong dược phẩm thường thu được nhờ phương pháp sản xuất tái tổ hợp sử dụng dòng tế bào động vật có vú hoặc bằng cách tinh chế từ chất lỏng sinh học. Tuy nhiên, protein trị liệu được sản xuất bằng các phương pháp này có thể bị nhiễm tạp virus gây bệnh truyền nhiễm có hại đối với sức khỏe của cá thể. Do đó, điều quan trọng là phải xử lý protein trị liệu để loại bỏ hoạt tính virus nhiễm tạp bất kỳ, bằng cách đó đảm bảo rằng dược phẩm thu được là an toàn để sử dụng cho các cá thể.

Hiện nay, có nhiều phương pháp khác nhau để làm bất hoạt các virus gây bệnh truyền nhiễm, bao gồm, ví dụ, bất hoạt bằng nhiệt, bất hoạt bằng dung môi/chất tẩy rửa (S/D), bất hoạt bằng pH, bất hoạt bằng hóa chất, và/hoặc bất hoạt bằng chiếu xạ tia cực tím. Trong số các phương pháp này, phương pháp bất hoạt bằng S/D có lẽ là phương pháp diệt virus được chấp nhận rộng rãi nhất vì gần như tất cả các mầm bệnh quan trọng đối với người đều là các virus có vỏ nhạy với sự phá vỡ màng bởi các dung môi và chất tẩy rửa. Ngoài ra, phương pháp S/D bảo toàn tốt hơn hàm lượng và hoạt tính sinh học của chất lỏng được xử lý so với các phương pháp diệt virus khác. Ví dụ, các phương pháp bất hoạt sử dụng nhiệt, độ pH axit, các hóa chất và chiếu xạ gặp phải một số vấn đề vì các tác nhân này khắc nghiệt và/hoặc có tính xâm lấn và có xu hướng làm biến tính hoặc theo cách khác, làm bất hoạt protein trị liệu được tinh chế.

Trong phương pháp bất hoạt bằng S/D, dung môi hữu cơ và chất tẩy rửa được trộn với chất lỏng bao gồm protein cần được tinh chế và được ủ. Dung môi tạo ra môi trường xúc tiến sự kết tụ giữa chất tẩy rửa và màng lipid bao bọc virus, và chất tẩy rửa phá vỡ tương tác giữa các phân tử trong màng lipid này. Một khi bị phá vỡ, virus có vỏ không còn có khả năng liên kết với và gây nhiễm tế bào và không thể tái sinh vì màng lipid nguyên vẹn là cần thiết cho các hoạt động này. Sự bất hoạt này nhìn chung được thực hiện ở nhiệt độ lớn hơn 20°C vì nhiệt độ cao hơn dễ gây phá vỡ vỏ. Ví dụ, điều kiện tiêu biểu được sử dụng theo hướng dẫn của tổ chức y tế thế giới (WHO) là 0,3% tri(n-butyl) phosphat (TNBP) và 1% polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) được ủ ở nhiệt độ 24°C trong tối thiểu 6 giờ, hoặc 0,3% TNBP và 1% polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) được ủ ở nhiệt độ 24°C trong tối thiểu 4 giờ. Xem, ví dụ, WHO Technical Report, Annex 4 Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products," Series No. 924, p 151-224, (2004).

Việc ủ hỗn hợp dung môi/chất tẩy rửa đến nhiệt độ lớn hơn 20°C có một số mặt hạn chế. Đầu tiên, sự bất hoạt ở nhiệt độ cao hơn tiêu tốn thời gian vì sự gia nhiệt sơ bộ hỗn hợp đến nhiệt độ lớn hơn 20°C làm tăng thời gian xử lý tổng cộng thêm khoảng hai đến khoảng sáu giờ. Thứ hai, việc ủ ở nhiệt độ cao hơn này, cùng với quá trình khuấy cần thiết để dễ gia nhiệt đồng đều, làm tăng sự tạo thành khối kết tụ protein dẫn đến sự giảm hiệu suất của protein có hoạt tính và/hoặc protein hữu dụng. Việc tiếp xúc với nhiệt độ lớn hơn 20°C cũng làm tăng tính nhạy của protein đối với sự phân rã. Sáng chế bộc lộ phương pháp S/D mới để làm bất hoạt virus gây bệnh truyền nhiễm từ mẫu khắc phục được các mặt hạn chế này. Phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này sử dụng thời gian ủ dưới hai giờ và nhiệt độ ủ dưới 20°C. Việc làm giảm thời gian ủ làm giảm thời gian tổng cộng cần để xử lý và/hoặc sản xuất protein thu được bằng phương pháp sản xuất tái tổ hợp hoặc tinh chế chất lỏng sinh học. Ngoài ra, việc làm giảm cả thời gian và nhiệt độ dẫn đến hiệu suất protein được cải thiện bằng cách làm giảm tính nhạy của nó đối với sự kết tụ và phân rã.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Do đó, theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid, phương pháp này bao gồm các bước a) cung cấp chất lỏng chứa protein có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó protein sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a). Chất lỏng có thể là dịch tan tế bào, dịch tế bào nổi bề mặt, dịch rửa giải từ bước tinh chế trước đó, hoặc chất lỏng sinh học. Protein có thể được thu nhận bằng phương pháp sản xuất tái tổ hợp sử dụng dòng tế bào hoặc bằng cách tinh chế từ chất lỏng sinh học. Dung môi hữu cơ có thể là ete, rượu, hoặc alkylphosphat như dialkylphosphat hoặc trialkylphosphat. Chất hoạt động bề mặt có thể là chất hoạt động bề mặt ion như chất hoạt động bề mặt anion hoặc chất hoạt động bề mặt cation, chất hoạt động bề mặt lưỡng cực (lưỡng tính), hoặc chất hoạt động bề mặt không ion. Phương pháp này có thể bao gồm hoặc không bao gồm thêm bước loại bỏ dung môi, chất hoạt động bề mặt và/hoặc virus không còn sống ra khỏi hỗn hợp sau bước (c).

Theo một số khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp bao gồm các bước: a) cung cấp chất lỏng chứa protein có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó protein sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

Theo một số khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid, phương pháp này bao gồm các bước: a) cung cấp chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

Theo một số khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất yếu tố VIII về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp bao gồm các bước: a) thu nhận chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Các khía cạnh của sáng chế bộc lộ, một phần, virus có vỏ lipid. Hạt virus hoàn chỉnh, được gọi là virion, gồm axit nucleic, ADN hoặc ARN, được bao quanh bởi vỏ protein bảo vệ gọi là capsit. Các virus có thể được chia thành virus không có vỏ và virus có vỏ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “virus có vỏ lipid” chỉ virus bất kỳ chứa màng hoặc vỏ bao gồm lipid, như, ví dụ, virus vỏ. Các virus có vỏ có capsit của nó được bao bởi màng lipoprotein, hoặc vỏ. Vỏ này có nguồn gốc từ tế bào chủ dưới dạng “chồi” virus từ bề mặt của nó và gồm chủ yếu là lipid không được mã hóa bởi hệ gen của virus. Mặc dù vỏ này mang yếu tố xác định phân tử để gắn và đi vào các tế bào đích, và cần thiết cho sự lây nhiễm của các virus có vỏ, nó không dễ bị kháng thuốc hoặc sự chuyển dịch

kháng nguyên. Các virus có vỏ có kích thước nằm trong khoảng từ khoảng 45-55 nm đến khoảng 120-200 nm. Virus có vỏ lipid mà có thể lây nhiễm tế bào động vật có vú bao gồm virus ADN như virus herpesviridae, virus poxviridae, hoặc virus hepadnaviridae; virus ARN như virus flaviviridae, virus togaviridae, virus coronaviridae, virus deltavirus, virus orthomyxoviridae, virus paramyxoviridae, virus rhabdoviridae, virus bunyaviridae, hoặc virus filoviridae; và virus phiên mã ngược như virus retroviridae hoặc virus hepadnaviridae. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về virus có vỏ lipid bao gồm virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus sindbis, virus gây bệnh mụn rộp, virus gây bệnh giả dại, virus sendai, virus gây viêm miệng, virus West Nile, virus gây bệnh tiêu chảy do virus ở bò, virus corona, virus gây viêm khớp ở ngựa, virus gây hội chứng hô hấp cấp nghiêm trọng, virus gây bệnh bạch cầu ở chuột Moloney, hoặc virus gây bệnh đậu mùa.

Virus không có vỏ chỉ virus mà capsit của nó không có màng lipoprotein, hoặc vỏ. Ở virus không có vỏ, capsit điều tiết sự gắn vào và thâm nhập vào tế bào chủ. Capsit nhìn chung có dạng xoắn hoặc khối hai mươi mặt. Các virus không có vỏ có kích thước nằm trong khoảng từ khoảng 18-26 nm đến khoảng 70-90 nm. Các virus không có vỏ mà có thể lây nhiễm tế bào động vật có vú bao gồm, ví dụ, virus parvoviridae, virus adenoviridae, virus birnaviridae, virus papillomaviridae, virus polyomaviridae, virus picornaviridae, virus reoviridae, và virus calciviridae.

Các khía cạnh của sáng chế bộc lộ, một phần, chất lỏng chứa protein có hoạt tính. Chất lỏng có thể là chất lỏng bất kỳ có khả năng bị nhiễm tạp bởi virus. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về chất lỏng bao gồm, ví dụ, bất kỳ chất lỏng hoặc chất keo được tinh chế, được tinh chế một phần hoặc thô bao gồm, ví dụ, dịch rửa giải từ bước tinh chế trước đó; dịch chiết nuôi cấy mô và tế bào như dịch tan tế bào, dịch tế bào nổi bề mặt, dịch chiết nhau, hoặc chất lỏng bệnh cổ trướng; chất lỏng sinh học như máu, huyết tương, huyết thanh, sữa, nước bọt, tinh dịch; hoặc chất lỏng khác bất kỳ bao gồm protein có hoạt tính.

Protein có hoạt tính có thể là protein quan tâm bất kỳ trong đó sự loại bỏ hoạt tính virus nhiễm tạp bất kỳ được mong muốn. Protein được bộc lộ trong bản mô tả này có thể là protein máu như, ví dụ, protein đông máu, albumin, và/hoặc immunoglobulin. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về protein máu bao gồm ADAMTS-13,  $\alpha$ 1-antiplasmin,  $\alpha$ 2-antiplasmin, antithrombin, antithrombin III, chất gây đông trước ung thư, erythropoietin, Yếu tố II, Yếu tố V, Yếu tố VI, Yếu tố VII, Yếu tố VIII, Yếu tố IX, Yếu tố X, Yếu tố XI, Yếu tố XII, Yếu tố XIII, fibronectin, fibrinogen, heparin đồng yếu tố II, kininogen khối lượng phân tử cao, immunoglobulin trong cơ, immunoglobulin trong tĩnh mạch, plasminogen, chất ức chế chất hoạt hóa plasminogen-1, chất ức chế chất hoạt hóa plasminogen-2, prekallikrein, protein C, protein S, protein Z, chất ức chế proteaza có liên quan đến protein Z, yếu tố mô, chất hoạt hóa plasminogen mô, urokinaza, hoặc Yếu tố Von Willebrand.

Protein được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thu nhận từ sinh vật mà biểu hiện tự nhiên protein này, từ sinh vật chuyển gen được biến đổi về mặt di truyền để biểu hiện protein này, hoặc từ dòng tế bào sản xuất tái tổ hợp protein này. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về sinh vật bao gồm chim và động vật có vú, như, ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, dê, cừu, ngựa, lừa, bò, động vật linh trưởng và người. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về sinh vật chuyển gen bao gồm các sinh vật được bộc lộ trong bản mô tả này mà đã được biến đổi về mặt di truyền để biểu hiện protein quan tâm. Protein được bộc lộ trong bản mô tả này từ sinh vật hoặc sinh vật chuyển gen có thể được thu nhận từ chất lỏng sinh học, dịch chiết mô hoặc cơ quan, hoặc nguồn khác từ sinh vật sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, để thu được protein máu, máu toàn phần từ sinh vật hoặc sinh vật chuyển gen có thể được rút trong ống tách huyết thanh. Máu được để cho đông cục và máu đã đông cục được ly tâm để vớt viên mảnh vụn. Mẫu huyết thanh thu được (*tức là*, dịch nổi bề mặt) sau đó có thể được chia thành các phần phân ước và/hoặc được bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi cần. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về các protocol đặc trưng để thu gom máu và điều chế huyết thanh

được mô tả trong, ví dụ, Di Lorenzo and Strasinger, BLOOD COLLECTION IN HEALTHCARE (F.A. Davis Company, 2001); và Diana Garza & Kathleen Becan-McBride, PHLEBOTOMY HANDBOOK: BLOOD COLLECTION ESSENTIALS (Prentice Hall, 6<sup>th</sup> ed., 2002).

Theo cách khác, nhiều hệ biểu hiện sinh vật không có nhân điển hình và/hoặc sinh vật có nhân điển hình cũng có thể được sử dụng để biểu hiện tái tổ hợp protein được bộc lộ trong bản mô tả này. Hệ biểu hiện có thể bao gồm đặc điểm bất kỳ trong số nhiều đặc điểm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, biểu hiện cảm ứng, biểu hiện không cảm ứng, biểu hiện cơ định, biểu hiện đặc hiệu mô, biểu hiện đặc hiệu tế bào, biểu hiện qua trung gian virus, biểu hiện được kết hợp ổn định, và biểu hiện tạm thời. Cách để tạo ra và sử dụng các hệ biểu hiện như vậy là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Nhìn chung, polynucleotit mã hóa protein quan tâm được tách dòng vào vector biểu hiện. Vector biểu hiện của sinh vật không có nhân điển hình thường bao gồm gốc sao chép, gen khởi đầu và/hoặc yếu tố gen tăng cường thích hợp, và cả các vị trí cần thiết cho sự liên kết của ribosom, polyadenyl hóa, kết thúc phiên mã, cũng như trình tự không được phiên mã bên sườn 5' và các yếu tố di truyền không được phiên mã khác. Vector của sinh vật không có nhân điển hình nêu làm ví dụ bao gồm pET và pRSET sử dụng gen khởi đầu như, ví dụ, gen khởi đầu T7 thể thực khuẩn. Vector biểu hiện của sinh vật có nhân điển hình thường bao gồm gốc sao chép, gen khởi đầu và/hoặc yếu tố gen tăng cường thích hợp, và cả các vị trí cần thiết cho sự liên kết của ribosom, polyadenyl hóa, ghép nối, kết thúc phiên mã, cũng như trình tự không được phiên mã bên sườn 5' và các yếu tố di truyền không được phiên mã khác. Vector nấm men nêu làm ví dụ bao gồm pAO, pMET, pPIC, pPICZ, và pYES sử dụng gen khởi đầu như, ví dụ, AOX1, AUG1, GAP, và GAL1. Vector côn trùng nêu làm ví dụ bao gồm pAc5, pBAC, pIB, pMIB, pMT sử dụng gen khởi đầu như, ví dụ, PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, và polh. Vector động vật có vú nêu làm ví dụ bao gồm pBPV, pCMV, pCMVTNT, pADN, pDisplay, pMSG, pOG44, pQBI25, pRc/RSV, pSECTag, pSECTag2, pSG, pSV2cat, pSVK3, pSVL, pUCIG-MET,

pVAX1, pWLneo, và pXT1 sử dụng gen khởi đầu như, ví dụ, beta-casein, beta-lactoglobulin, gen khởi đầu axit nước sữa, HSV thymidin kinaza, virus simian sớm và mụn 40 (SV40), LTR từ retrovirus, và metallothionein-1 của chuột nhắt. Chất đánh dấu thích hợp bao gồm ampicilin, cloramphenicol transferaza, kanamycin, neomycin, và tetracyclin. Vector biểu hiện thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có sẵn trên thị trường.

Tế bào có khả năng biểu hiện vector tương thích bao gồm tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình, tế bào của sinh vật có nhân điển hình, và các dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào của sinh vật chưa có nhân điển hình và sinh vật có nhân điển hình. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về các chủng sinh vật chưa có nhân điển hình bao gồm các chủng có nguồn gốc từ, ví dụ, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile*, *Caulobacter crescentus*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas fluorescens* và *Salmonella typhimurium*. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về các chủng nấm men bao gồm các chủng có nguồn gốc từ, ví dụ, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* và *Yarrowia lipolytica*. Các tế bào thực vật và các dòng tế bào có nguồn gốc từ thực vật bao gồm các tế bào từ, ví dụ, loài cây một lá mầm, như, ví dụ, *Zea mays* và loài cây hai lá mầm, như, ví dụ, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Lemna gibba* và *Lemna minor*. Tế bào côn trùng và các dòng tế bào có nguồn gốc từ côn trùng bao gồm các tế bào từ, ví dụ, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* và *Manduca sexta*. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về các dòng tế bào côn trùng bao gồm High-Five, Kc, dòng ruồi giấm Schneider 2 (S2), SF9, và các dòng tế bào SF21. Tế bào động vật có vú và các dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào động vật có vú bao gồm các tế bào từ, ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, lợn, bò, ngựa, động vật linh trưởng và người. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về dòng tế bào động vật có vú bao gồm 1A3, 3T3, 6E6, 10T1/2, APRT, BALB/3T3, BE (2)-C, BHK, BT, C6, C127, CHO, CHP3, COS-1,

COS-7, CPAE, ESK-4, FB2, GH1, GH3, HeLa, HEK-293, HepG2, HL-60, IMR-32, L2, LLC-PK1, L-M, MCF-7, NB4, NBL-6, NCTC, Neuro 2A, NIE-115, NG108-15, NIH3T3, PC12, PK15, SBAC, SH-SY5Y, SK-Hep, SK-N-DZ, SK-N-F1, SK-N-SH, ST, SW-13, và các dòng tế bào VV-1. Các dòng tế bào có thể được thu nhận từ American Type Culture Collection, European Collection of Cell Cultures và/hoặc German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

Sau quá trình thu hoạch ban đầu từ sinh vật, sinh vật chuyển gen, hoặc hệ nuôi cấy tế bào, protein được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện quy trình tinh chế protein. Nhìn chung, bước tinh chế protein bao gồm giữ protein ở dạng cô đặc hơn, các bước tinh chế trung gian để loại bỏ các tạp chất, đánh bóng để loại bỏ các tạp chất bổ sung và các biến thể protein. Xem, ví dụ, *Current Protocols in Protein Science*, "Conventional chromatographic Separation," Ch. 8-9, (John Wiley & Sons Inc., Hoboken, N.J., 1995). Các phương pháp bất giữ phổ biến bao gồm sắc ký ái lực, lọc gel, kết tủa, và/hoặc sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Quy trình hữu dụng làm các bước trung gian hoặc bước đánh bóng bao gồm sắc ký trao đổi cation, sắc ký trao đổi anion, sắc ký tương tác kỵ nước, và sắc ký gồm hydroxyapatit, HPLC pha đảo, lọc gel, kết tủa, phân lọc, sắc ký ái lực, hoặc sắc ký tập trung (chromatofocusing).

Phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được thực hiện tại thời điểm bất kỳ trong quy trình tinh chế này. Nhìn chung, lượng chất phản ứng lớn hơn và thời gian ủ dài hơn là cần thiết khi phương pháp bộc lộ trong bản mô tả này được thực hiện vào lúc bắt đầu của quy trình sản xuất hơn là được thực hiện ở giai đoạn muộn hơn trong quy trình. Điều này là vì thể tích xử lý là lớn hơn và sản phẩm thường ít tinh khiết hơn vào lúc bắt đầu, trong khi đó vào giai đoạn muộn hơn, các tạp chất đã được làm giảm và sản phẩm trong hầu hết các trường hợp được xác định là tốt hơn và có độ tinh khiết và công hiệu lớn hơn với thể tích được làm giảm, hoặc trong đó lượng tải virus đã được làm giảm hoặc giảm bớt nhờ các quy trình tinh chế trước đó.

Các khía cạnh của sáng chế đề xuất, một phần, trộn chất lỏng được bọc lộ trong bản mô tả này với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp. Việc trộn chất lỏng với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt có thể trong khoảng thời gian bất kỳ, với điều kiện là thời gian trộn được sử dụng tạo ra hỗn hợp mà kết hợp đầy đủ dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này. Như vậy, việc trộn cần phải đảm bảo rằng 1) dung môi hữu cơ xúc tiến sự tiếp xúc giữa chất hoạt động bề mặt và vỏ lipoprotein bao bọc virus có vỏ lipid và 2) chất hoạt động bề mặt phá vỡ các tương tác giữa các phân tử trong màng lipoprotein của virus có vỏ lipid. Theo các khía cạnh của phương án này, việc trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt được thực hiện trong khoảng thời gian là, ví dụ, không nhiều hơn 1 phút, không nhiều hơn 5 phút, hoặc không nhiều hơn 10 phút. Theo các khía cạnh khác của phương án này, việc trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt được thực hiện trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 1 phút đến khoảng 5 phút, khoảng 2 phút đến khoảng 5 phút, khoảng 3 phút đến khoảng 5 phút, khoảng 1 phút đến khoảng 10 phút, khoảng 2 phút đến khoảng 10 phút, khoảng 3 phút đến khoảng 10 phút, khoảng 4 phút đến khoảng 10 phút, hoặc khoảng 5 phút đến khoảng 10 phút. Như được bọc lộ trong bản mô tả này, việc trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C.

Có thể trộn một dung môi hữu cơ với chất lỏng được bọc lộ trong bản mô tả này, hoặc có thể trộn nhiều dung môi hữu cơ với chất lỏng được bọc lộ trong bản mô tả này. Theo khía cạnh của phương án này, chất lỏng có thể được trộn với ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, hoặc ít nhất năm dung môi hữu cơ. Dung môi hữu cơ hữu dụng tạo ra môi trường xúc tiến sự tiếp xúc giữa chất hoạt động bề mặt và vỏ lipoprotein bao bọc virus. Như vậy, dung môi hữu cơ bất kỳ xúc tiến sự tiếp xúc như vậy có thể được sử dụng trong phương pháp được bọc lộ trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ete, rượu, alkylphosphat như dialkylphosphat hoặc trialkylphosphat, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Ete hữu dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm các ete có công thức  $R^1-O-R^2$ , trong đó,  $R^1$  và  $R^2$  độc lập là  $C_1-C_{18}$  alkyl hoặc  $C_1-C_{18}$  alkenyl mà có thể chứa nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh, tốt hơn là  $C_1-C_{18}$  alkyl hoặc  $C_1-C_{18}$  alkenyl. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về ete bao gồm dimetyl ete, dietyl ete, etyl propyl ete, metyl-butyl ete, metyl isopropyl ete và metyl isobutyl ete. Rượu hữu dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm rượu có nhóm  $C_1-C_8$  alkyl hoặc nhóm  $C_1-C_8$  alkenyl. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về rượu bao gồm metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, n-pentanol và isopentanol. Alkylphosphat hữu dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm các alkylphosphat có nhóm  $C_1-C_{18}$  alkyl hoặc nhóm  $C_1-C_{18}$  alkenyl, một trong hai nhóm này có thể chứa nguyên tử oxy hoặc lưu huỳnh. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về alkylphosphat bao gồm dialkylphosphat như di-(n-butyl)phosphat, di-(t-butyl)phosphat, di-(n-hexyl)phosphat, di-(2-ethylhexyl)phosphat, di-(n-dexyl)phosphat, hoặc etyl di(n-butyl) phosphat; và trialkylphosphat như tri-(n-butyl)phosphat, tri-(t-butyl)phosphat, tri-(n-hexyl)phosphat, tri-(2-ethylhexyl)phosphat, hoặc tri-(n-dexyl)phosphat. Các ví dụ không giới hạn sáng chế khác về dung môi hữu cơ hữu dụng trong các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được tìm thấy trong, ví dụ, Winslow, et al., *Methods and Composition for Simultaneously Isolating Hemoglobin from Red Blood Cells and Inactivating viruses*, U.S. 2008/0138790, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Có thể sử dụng nồng độ bất kỳ của dung môi hữu cơ, với điều kiện là nồng độ được sử dụng là đủ để xúc tiến sự kết tụ giữa chất hoạt động bề mặt và màng lipoprotein của virus có vỏ lipid. Theo các khía cạnh của phương án này, chất hoạt động bề mặt được sử dụng ở nồng độ cuối bằng, ví dụ, khoảng 0,01% (theo thể tích), khoảng 0,05% (theo thể tích), khoảng 0,075% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích), khoảng 0,3% (theo thể tích), khoảng 0,4% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích), khoảng 0,6% (theo thể tích), khoảng 0,7% (theo thể tích), khoảng 0,8% (theo thể tích),

khoảng 0,9% (theo thể tích), hoặc khoảng 1,0% (theo thể tích). Theo các khía cạnh khác của phương án này, chất hoạt động bề mặt được sử dụng ở nồng độ cuối bằng, ví dụ, ít nhất 0,01% (theo thể tích), ít nhất 0,05% (theo thể tích), ít nhất 0,075% (theo thể tích), ít nhất 0,1% (theo thể tích), ít nhất 0,25% (theo thể tích), ít nhất 0,5% (theo thể tích), ít nhất 0,75% (theo thể tích), hoặc ít nhất 1,0% (theo thể tích). Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, chất hoạt động bề mặt được sử dụng ở nồng độ cuối bằng, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,75% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,75% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 0,75% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích).

Chất hoạt động bề mặt là các hợp chất mà làm giảm sức căng bề mặt của chất lỏng, cho phép sự lan rộng dễ dàng hơn, và làm giảm sức căng bề mặt chung giữa hai chất lỏng, hoặc giữa chất lỏng và chất rắn. Có thể trộn một chất hoạt động bề mặt với chất lỏng được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc có thể trộn nhiều chất hoạt động bề mặt với chất lỏng được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo khía cạnh của phương án này, chất lỏng có thể được trộn với ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, hoặc ít nhất năm chất hoạt động bề mặt. Chất hoạt động bề mặt hữu dụng phá vỡ tương tác giữa các phân tử trong màng lipoprotein của virus có vỏ lipid. Như vậy, chất hoạt động bề mặt bất kỳ mà tạo điều kiện thuận lợi cho sự phá vỡ như vậy có thể được sử dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất hoạt động bề mặt ion, chất hoạt động bề mặt lưỡng cực (lưỡng tính), chất hoạt động bề mặt không ion, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Chất hoạt động bề mặt ion bao gồm chất hoạt động bề mặt anion dựa trên anion cố định (sulfat, sulfonat, phosphat) hoặc anion phụ thuộc độ pH (carboxylat). Chất hoạt động bề mặt anion bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

alkyl sulfat như amoni lauryl sulfat và natri lauryl sulfat (SDS); alkyl ete sulfat như natri laureth sulfat và natri myreth sulfat; docusat như dioctyl natri sulfosuxinat; chất hoạt động bề mặt chứa flo sulfonat như perflooctansulfonat (PFOS) và perflobutansulfonat; alkyl benzen sulfonat; alkyl aryl ete phosphat; alkyl ete phosphat; alkyl carboxylat như muối axit béo và natri stearat; natri lauroyl sarcosinat; và chất hoạt động bề mặt chứa flo carboxylat như perflononanoat và perflooctanoat.

Chất hoạt động bề mặt ion còn bao gồm chất hoạt động bề mặt cation dựa trên cation cố định hoặc phụ thuộc độ pH. Chất hoạt động bề mặt cation bao gồm, nhưng không giới hạn ở, muối alkyltrimetylamoni như xetyl trimetylamoni bromua (CTAB) và xetyl trimetylamoni clorua (CTAC); xetylpyridini clorua (CPC); amin mỡ động vật đã được polyetoxyl hóa (POEA); benzalkoni clorua (BAC); benzethoni clorua (BZT); 5-brom-5-nitro-1,3-dioxan; dimetyldioctadexylamoni clorua; và dioctadexyldimetylamoni bromua (DODAB), cũng như chất hoạt động bề mặt như các amin bậc một, bậc hai hoặc bậc ba phụ thuộc độ pH ở đó các amin bậc một trở nên tích điện dương ở độ pH < 10, hoặc các amin bậc hai trở nên tích điện ở độ pH < 4, như octenidin dihydroclorua.

Chất hoạt động bề mặt lưỡng cực dựa trên các amin bậc một, bậc hai hoặc bậc ba hoặc cation amoni bậc bốn với sulfonat, carboxylat, hoặc phosphat. Chất hoạt động bề mặt lưỡng cực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 3-[(3-cholamidopropyl)dimetylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS); sultain như cocamidopropyl hydroxysultain; betain như cocamidopropyl betain; hoặc lexitin.

Chất hoạt động bề mặt không ion là ít biến tính hơn và như vậy là hữu dụng để làm hòa tan protein và lipid màng trong khi giữ được tương tác protein-protein. Các ví dụ không giới hạn sáng chế về chất hoạt động bề mặt bao gồm polyoxyetylen glycol sorbitan alkyl este như polysorbat 20 sorbitan monooleat (TWEEN® 20), polysorbat 40 sorbitan monooleat (TWEEN® 40), polysorbat 60

sorbitan monooleat (TWEEN® 60), polysorbat 61 sorbitan monooleat (TWEEN® 61), polysorbat 65 sorbitan monooleat (TWEEN® 65), polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), và polysorbat 81 sorbitan monooleat (TWEEN® 81); poloxame (copolyme polyetylen-polypropylen), như Poloxame 124 (PLURONIC® L44), Poloxame 181 (PLURONIC® L61), Poloxame 182 (PLURONIC® L62), Poloxame 184 (PLURONIC® L64), Poloxame 188 (PLURONIC® F68), Poloxame 237 (PLURONIC® F87), Poloxame 338 (PLURONIC® L108), Poloxame 407 (PLURONIC® F127); alkyl phenol polyglycol ete; polyetylen glycol alkyl aryl ete; polyoxyetylen glycol alkyl ete, như octaetylen glycol monododexyl ete, pentaetylen glycol monododexyl ete, BRIJ® 30, và BRIJ® 35; 2-dodecoxyetanol (LUBROL®-PX); polyoxyetylen glycol octylphenol ete như polyoxyetylen (4-5) p-t-octyl phenol (TRITON® X-45) và polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100); polyoxyetylen glycol alkylphenol ete như Nonoxynol-9; phenoxypolyetoxyetanol như nonyl phenoxypolyetoxyetanol và octyl phenoxypolyetoxyetanol; glucosit alkyl ete như octyl glucopyranosit; maltosit alkyl ete như dodexyl maltopyranoside; thioglucosit alkyl ete như heptyl thioglucopyranosit; digitonin; glyxerol alkyl este như glyxeryl laurat; alkyl aryl polyete sulfat; alcohol sulfonat; sorbitan alkyl este; cocamit etanolamin như cocamit monoetanolamin và cocamit dietanolamin; sucroza monolaurat; dodexyl dimetylamin oxit, và natri cholat. Các ví dụ không giới hạn sáng chế khác về chất hoạt động bề mặt hữu dụng trong các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được tìm thấy trong, ví dụ, Winslow, et al., *Methods and Composition for Simultaneously Isolating Hemoglobin from Red Blood Cells and Inactivating viruses*, U.S. 2008/0138790; Pharmaceutical Dosage Forms và Drug Delivery Systems (Howard C. Ansel et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 7<sup>th</sup> ed. 1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Alfonso R. Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 20<sup>th</sup> ed. 2000); Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Joel G. Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional, 10<sup>th</sup> ed. 2001); và Handbook of

Pharmaceutical Excipients (Raymond C. Rowe et al., APhA Publication, 4<sup>th</sup> edition 2003), các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Có thể sử dụng nồng độ bất kỳ của chất hoạt động bề mặt, với điều kiện là nồng độ được sử dụng đủ để phá vỡ tương tác giữa các phân tử trong màng lipoprotein của virus có vỏ lipid gây ra sự bất hoạt của virus. Theo các khía cạnh của phương án này, chất hoạt động bề mặt được sử dụng với nồng độ là, ví dụ, khoảng 0,01% (theo thể tích), khoảng 0,05% (theo thể tích), khoảng 0,075% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích), khoảng 0,3% (theo thể tích), khoảng 0,4% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích), khoảng 0,6% (theo thể tích), khoảng 0,7% (theo thể tích), khoảng 0,8% (theo thể tích), khoảng 0,9% (theo thể tích), khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 2,0% (theo thể tích), khoảng 3,0% (theo thể tích), khoảng 4,0% (theo thể tích), khoảng 5,0% (theo thể tích), khoảng 6,0% (theo thể tích), khoảng 7,0% (theo thể tích), khoảng 8,0% (theo thể tích), khoảng 9,0% (theo thể tích), hoặc khoảng 10,0% (theo thể tích). Theo các khía cạnh khác của phương án này, chất hoạt động bề mặt được sử dụng với nồng độ là, ví dụ, ít nhất 0,01% (theo thể tích), ít nhất 0,05% (theo thể tích), ít nhất 0,075% (theo thể tích), ít nhất 0,1% (theo thể tích), ít nhất 0,25% (theo thể tích), ít nhất 0,5% (theo thể tích), ít nhất 0,75% (theo thể tích), ít nhất 1,0% (theo thể tích), ít nhất 2,5% (theo thể tích), ít nhất 5,0% (theo thể tích), ít nhất 7,5% (theo thể tích), hoặc ít nhất 10,0% (theo thể tích). Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, chất hoạt động bề mặt được sử dụng với nồng độ là, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 2,0% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích), hoặc khoảng 1,0% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích).

Chất lỏng được bọc lộ trong bản mô tả này có thể được trộn với một dung môi hữu cơ và nhiều chất hoạt động bề mặt, nhiều dung môi hữu cơ và một chất hoạt động bề mặt, hoặc nhiều dung môi hữu cơ và nhiều chất hoạt động bề mặt. Thông thường, nồng độ cuối của dung môi hữu cơ và một chất hoạt động bề mặt trong chất lỏng là khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5% (theo thể tích) của dung môi hữu cơ và khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 10% (theo thể tích) của chất hoạt động bề mặt. Khi nhiều chất hoạt động bề mặt được trộn với chất lỏng, nồng độ cuối của dung môi hữu cơ là khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5% (theo thể tích), nồng độ cuối của một chất hoạt động bề mặt là khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 10% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 5% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), và nồng độ cuối của phần còn lại của các chất hoạt động bề mặt là khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 4% (theo thể tích).

Theo một khía cạnh của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat và polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat và khoảng 1,0% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100). Theo khía cạnh khác của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat và khoảng 1,0% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80).

Theo khía cạnh khác của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể

tích) tri(n-butyl) phosphat, khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,7% (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat, khoảng 0,6% (theo thể tích) đến khoảng 1,4% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,7% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat, khoảng 0,7% (theo thể tích) đến khoảng 1,3% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80).

Theo khía cạnh khác của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat, khoảng 0,7% (theo thể tích) đến khoảng 1,3% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,4% (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat, khoảng 0,8% (theo thể tích)

đến khoảng 1,2% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,4% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, chất lỏng được trộn với tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) sao cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 0,3% (theo thể tích) (theo thể tích) tri(n-butyl) phosphat, khoảng 1,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và khoảng 0,3% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80).

Sau khi trộn chất lỏng với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt, hỗn hợp thu được được ủ trong thời gian xác định ở nhiệt độ xác định. Thời gian ủ bất kỳ có thể được sử dụng, với điều kiện là thời gian được sử dụng tạo ra hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống. Theo các khía cạnh của phương án này, chất lỏng được ủ trong khoảng thời gian là, ví dụ, khoảng 10 phút, khoảng 20 phút, khoảng 30 phút, khoảng 40 phút, khoảng 50 phút, khoảng 60 phút, khoảng 70 phút, khoảng 80 phút, khoảng 90 phút, khoảng 100 phút, khoảng 110 phút, hoặc khoảng 120 phút. Theo các khía cạnh khác của phương án này, chất lỏng được ủ trong khoảng thời gian là, ví dụ, không nhiều hơn khoảng 10 phút, không nhiều hơn khoảng 20 phút, không nhiều hơn khoảng 30 phút, không nhiều hơn khoảng 40 phút, không nhiều hơn khoảng 50 phút, không nhiều hơn khoảng 60 phút, không nhiều hơn khoảng 70 phút, không nhiều hơn khoảng 80 phút, không nhiều hơn khoảng 90 phút, không nhiều hơn khoảng 100 phút, không nhiều hơn khoảng 110 phút, hoặc không nhiều hơn khoảng 120 phút. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, chất lỏng được ủ trong khoảng thời gian là, ví dụ, từ khoảng 10 phút đến khoảng 60 phút, từ khoảng 10 phút đến khoảng 90 phút, từ khoảng 10 phút đến khoảng 120 phút, từ khoảng 30 phút đến khoảng 60 phút, từ khoảng 30 phút đến khoảng 90 phút, từ khoảng 30 phút đến khoảng 120 phút, từ khoảng 60 phút đến khoảng 90 phút, từ khoảng 60 phút đến khoảng 120 phút, hoặc từ khoảng 90 phút đến khoảng 120 phút.

Các khía cạnh của sáng chế đề xuất, một phần, trong đó chất lỏng được trộn với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C, và trong đó hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C. Nhiệt độ ủ bất kỳ có thể được sử dụng, với điều kiện là nhiệt độ được sử dụng là nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C và tạo ra hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống và protein có hoạt tính được thu hồi sau khi ủ. Mặc dù thường được ủ ở cùng nhiệt độ, chất lỏng có thể được trộn với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt ở một nhiệt độ, và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ khác.

Theo các khía cạnh của phương án này, chất lỏng được trộn và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ, ví dụ, khoảng 2°C, khoảng 4°C, khoảng 6°C, khoảng 8°C, khoảng 10°C, khoảng 12°C, khoảng 14°C, khoảng 16°C, khoảng 18°C, hoặc khoảng 20°C. Theo các khía cạnh khác của phương án này, chất lỏng được trộn và được ủ ở nhiệt độ, ví dụ, không nhiều hơn 2°C, không nhiều hơn 4°C, không nhiều hơn 6°C, không nhiều hơn 8°C, không nhiều hơn 10°C, không nhiều hơn 12°C, không nhiều hơn 14°C, không nhiều hơn 16°C, không nhiều hơn 18°C, hoặc không nhiều hơn 20°C. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, chất lỏng được trộn và hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ, ví dụ, từ khoảng 0°C đến khoảng 2°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 4°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 6°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 8°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 10°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 12°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 14°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 16°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 18°C, từ khoảng 0°C đến khoảng 20°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 4°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 6°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 8°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 10°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 12°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 14°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 16°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 18°C, từ khoảng 2°C đến khoảng 20°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 6°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 8°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 10°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 12°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 14°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 16°C, từ khoảng 4°C đến khoảng 18°C, hoặc từ khoảng 4°C đến khoảng 20°C.

Theo một phương án, hỗn hợp được bọc lộ trong bản mô tả này có thể được ủ trong khoảng thời gian bất kỳ và ở nhiệt độ bất kỳ không cao hơn khoảng 20°C với điều kiện là thời gian ủ và nhiệt độ được sử dụng tạo ra hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống và chứa protein có hoạt tính. Theo các khía cạnh của phương án này, hỗn hợp được ủ trong khoảng thời gian không nhiều hơn 120 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C, như, ví dụ, không nhiều hơn 90 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C, không nhiều hơn 60 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C, hoặc không nhiều hơn 30 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp được ủ trong khoảng thời gian không nhiều hơn 120 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 16°C, không nhiều hơn 120 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 12°C, hoặc không nhiều hơn 120 phút ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 8°C. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp được ủ trong khoảng 10 phút đến khoảng 120 phút ở nhiệt độ khoảng 0°C đến khoảng 20°C, khoảng 30 phút đến khoảng 120 phút ở nhiệt độ khoảng 0°C đến khoảng 16°C, khoảng 30 phút đến khoảng 120 phút ở nhiệt độ khoảng 0°C đến khoảng 12°C, hoặc khoảng 30 phút đến khoảng 120 phút ở nhiệt độ khoảng 2°C đến khoảng 8°C. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, hỗn hợp được ủ trong khoảng 45 phút đến khoảng 75 phút ở nhiệt độ khoảng 2°C đến khoảng 8°C, khoảng 60 phút ở nhiệt độ khoảng 2°C đến khoảng 8°C, khoảng 45 phút đến khoảng 75 phút ở nhiệt độ khoảng 4°C, hoặc khoảng 60 phút ở nhiệt độ khoảng 4°C.

Các khía cạnh của sáng chế đề xuất, một phần, hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid” có nghĩa là chỉ có lượng vết của virus có vỏ lipid còn sống có thể được phát hiện hoặc được xác nhận bằng dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của virus có vỏ lipid còn sống và lượng vết này của virus có vỏ lipid còn sống là không đủ để có hại đối với sức khỏe của con người. Theo một khía cạnh của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ hoàn toàn không chứa virus có vỏ lipid.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoàn toàn không chứa virus có vỏ lipid” có nghĩa là sự có mặt của virus có vỏ lipid còn sống không thể được phát hiện hoặc được xác nhận trong khoảng phát hiện của dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của virus có vỏ lipid còn sống. Protein chứa trong chất lỏng về cơ bản không chứa hoặc hoàn toàn không chứa virus có vỏ lipid còn sống có thể được sử dụng để bào chế được phẩm an toàn để sử dụng cho người vì virus không đủ có hại đối với sức khỏe của con người.

Theo khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ chứa ít hơn  $1 \times 10^1$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống. Đơn vị hình thành mảng bám (PFU) là thước đo số lượng hạt virus có khả năng hình thành các mảng bám cho mỗi đơn vị thể tích. Đây là thước đo chức năng hơn là thước đo lượng hạt tuyệt đối vì các hạt virus mà không có hoạt tính, bị khiếm khuyết, hoặc không lây nhiễm tế bào đích của chúng sẽ không tạo ra mảng bám và do đó sẽ không được đếm. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ chứa, ví dụ, ít hơn  $1 \times 10^0$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn  $1 \times 10^{-1}$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống,  $1 \times 10^{-2}$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống, hoặc  $1 \times 10^{-3}$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống.

Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ chứa ít hơn  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống trước khi ủ.  $ID_{50}$  là lượng virus sẽ lây nhiễm 50% quần thể tế bào đích. Nó là thước đo chức năng vì các hạt virus mà không có hoạt tính hoặc bị khiếm khuyết sẽ không lây nhiễm tế bào đích của chúng và do đó sẽ không được đếm. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ chứa ví dụ, ít hơn ít nhất 10 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 100 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 200 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 300 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 400 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 500 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 600 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 700 lần  $ID_{50}$  đối với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 800 lần  $ID_{50}$  đối

với virus có vỏ lipid còn sống, ít hơn ít nhất 900 lần ID<sub>50</sub> đối với virus có vỏ lipid còn sống, hoặc ít hơn ít nhất 1000 lần ID<sub>50</sub> đối với virus có vỏ lipid còn sống trước khi ủ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm bất hoạt virus” hoặc “việc làm bất hoạt virus” chỉ quy trình trong đó virus không còn có khả năng lây nhiễm tế bào, sao chép, và nhân lên, và việc loại bỏ virus. Như vậy, thuật ngữ “việc làm bất hoạt virus” nhìn chung chỉ quy trình tạo ra chất lỏng được bọc lộ trong bản mô tả này hoàn toàn không có các virus nhiễm tạp có tính lây nhiễm. Mức độ bất hoạt virus bất kỳ sử dụng các phương pháp được bọc lộ trong bản mô tả này là được mong muốn. Tuy nhiên, mong muốn đạt được mức độ bất hoạt virus cần thiết để đáp ứng được quy định nghiêm ngặt về độ an toàn đối với dược phẩm. Các quy định này được WHO đưa ra và đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc phát hiện virus có vỏ lipid còn sống có thể được thực hiện bởi kỹ thuật bất kỳ mà có thể xác định định tính hoặc định lượng sự có mặt hoặc hoạt tính của virus có vỏ lipid còn sống. Thông thường, thử nghiệm dựa trên sự nuôi cấy tế bào được sử dụng để xác định mức chuẩn độ của virus, nhưng các thử nghiệm độ lây nhiễm *in vivo* cũng có thể được sử dụng. Việc phát hiện sự khuếch đại của virus có thể được tiến hành, ví dụ, bằng cách kiểm tra sử dụng kính hiển vi (trong trường hợp tác động gây bệnh tế bào có thể nhìn thấy rõ ràng), thử nghiệm phát hiện dựa trên PCR, hoặc thử nghiệm phát hiện dựa trên kháng thể. Một ví dụ không giới hạn là thử nghiệm độ lây nhiễm *in vitro* gọi là thử nghiệm liều lượng lây nhiễm nuôi cấy mô 50 (TCID<sub>50</sub>). Trong thử nghiệm này, các mẫu chất lỏng và dung dịch pha loãng theo dãy của chúng được phân phối vào đĩa có 96 lỗ đã được gieo các tế bào mà có thể đóng vai trò là vật chủ cho virus có vỏ lipid đang được thử nghiệm. Sau khi cấy, các đĩa được ủ trong khoảng thời gian và ở nhiệt độ đủ để cho phép virus sao chép trong tế bào chủ. Sau khi ủ, các tế bào được kiểm tra bằng kính hiển vi về các dấu hiệu của sự lây nhiễm, như, ví dụ, các tế bào bị làm tan, các tế bào thể hiện tác động gây bệnh tế bào, hoặc các tiêu chuẩn bất kỳ khác biểu thị sự lây nhiễm virus. Từ mô

hình của các lỗ dương tính (lây nhiễm virus) và âm tính (không có sự lây nhiễm virus), độ chuẩn virus được tính toán. Sự vắng mặt của các lỗ bất kỳ thể hiện các dấu hiệu dương tính của sự lây nhiễm là dấu hiệu biểu thị rằng chất lỏng về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid.

Thử nghiệm dựa trên sự nuôi cấy tế bào khác là thử nghiệm màng bám, trong đó tác động do virus gây ra trong lớp môi trường nuôi cấy tế bào là nhìn thấy được hoặc được làm cho nhìn thấy được khi kiểm tra bằng mắt dưới dạng các màng bám. Sự vắng mặt của các màng bám bất kỳ là dấu hiệu biểu thị rằng chất lỏng về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid.

Sáng chế đề xuất, một phần, hỗn hợp sau khi ủ có hoạt tính protein bằng ít nhất 25% hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các khía cạnh của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ có hoạt tính protein bằng, ví dụ, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, hoặc khoảng 100%, hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ có hoạt tính protein bằng, ví dụ, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% của hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ có hoạt tính protein nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 25% đến khoảng 100%, khoảng 30% đến khoảng 100%, khoảng 40% đến khoảng 100%, khoảng 50% đến khoảng 100%, khoảng 60% đến khoảng 100%, khoảng 70% đến khoảng 100%, khoảng 75% đến khoảng 100%, khoảng 80% đến khoảng 100%, khoảng 85% đến khoảng 100%, khoảng 90% đến khoảng 100%, khoảng 25% đến khoảng 95%, khoảng 30% đến khoảng 95%, khoảng 40% đến khoảng 95%, khoảng 50% đến khoảng 95%, khoảng 60% đến khoảng 95%, khoảng 70% đến khoảng 95%, khoảng 75% đến khoảng 95%, khoảng 80% đến khoảng 95%, khoảng 85% đến khoảng 95%, khoảng 90% đến khoảng 95%, khoảng 25% đến khoảng 90%, khoảng 30% đến khoảng 90%, khoảng 40% đến khoảng 90%, khoảng 50% đến khoảng

90%, khoảng 60% đến khoảng 90%, khoảng 70% đến khoảng 90%, khoảng 75% đến khoảng 90%, khoảng 80% đến khoảng 90%, hoặc khoảng 85% đến khoảng 90% hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ.

Sáng chế đề xuất, một phần, hoạt tính protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ bằng, ví dụ, ít nhất 25% hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ với dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các khía cạnh của phương án này, hoạt tính protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ bằng, ví dụ, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, hoặc khoảng 100%, hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hoạt tính protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ bằng, ví dụ, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, hoạt tính protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 25% đến khoảng 100%, khoảng 30% đến khoảng 100%, khoảng 40% đến khoảng 100%, khoảng 50% đến khoảng 100%, khoảng 60% đến khoảng 100%, khoảng 70% đến khoảng 100%, khoảng 75% đến khoảng 100%, khoảng 80% đến khoảng 100%, khoảng 85% đến khoảng 100%, khoảng 90% đến khoảng 100%, khoảng 25% đến khoảng 95%, khoảng 30% đến khoảng 95%, khoảng 40% đến khoảng 95%, khoảng 50% đến khoảng 95%, khoảng 60% đến khoảng 95%, khoảng 70% đến khoảng 95%, khoảng 75% đến khoảng 95%, khoảng 80% đến khoảng 95%, khoảng 85% đến khoảng 95%, khoảng 90% đến khoảng 95%, khoảng 25% đến khoảng 90%, khoảng 30% đến khoảng 90%, khoảng 40% đến khoảng 90%, khoảng 50% đến khoảng 90%, khoảng 60% đến khoảng 90%, khoảng 70% đến khoảng 90%, khoảng 75% đến khoảng 90%, khoảng 80% đến khoảng 90%, hoặc khoảng 85% đến khoảng 90% hoạt tính protein được cung cấp trước khi ủ.

Việc phát hiện hoạt tính của protein có thể được thực hiện bằng thử nghiệm bất kỳ mà có thể xác định định tính hoặc định lượng dấu hiệu đặc trưng

của hoạt tính có liên quan đến protein đang được theo dõi, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm protein không đặc hiệu, như, ví dụ, sự hấp thụ UV hoặc thử nghiệm dựa trên hóa học như thử nghiệm Bradford; hoặc thử nghiệm protein đặc hiệu, như, ví dụ, thử nghiệm *in vitro*, thử nghiệm dựa trên tế bào, hoặc thử nghiệm *in vivo*. Thử nghiệm trên thực tế được sử dụng để phát hiện hoạt tính của protein như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này tính đến các yếu tố, bao gồm, nhưng không giới hạn, protein được thử nghiệm, lượng protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ, đặc điểm được thử nghiệm, và sự ưu tiên của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ, thử nghiệm sinh màu dựa trên thác đông tụ máu có thể được sử dụng để phát hiện hoạt tính của Yếu tố VIII. Trong thử nghiệm này, Yếu tố VIII được hoạt hóa bởi thrombin tạo thành phức hợp với Yếu tố IXa, và phức hợp này sau đó hoạt hóa Yếu tố X. Hoạt tính Yếu tố X đã được hoạt hóa có thể được đánh giá bằng cách thủy phân cơ chất sinh màu mà giải phóng nhóm sinh màu như p-nitro-anilin (pNA). Tốc độ ban giải phóng pNA ban đầu, như được xác định bởi sự thay đổi độ hấp thụ cho mỗi phút được xác định ở 405 nm trong dOD, là tỷ lệ với hoạt tính của yếu tố Xa và sau đó là với hoạt tính của Yếu tố VIII trong mẫu. Bằng cách sử dụng lượng dư của Yếu tố IXa, và Yếu tố X, tốc độ hoạt hóa Yếu tố X chỉ tỷ lệ với lượng Yếu tố VIII đã được phân cắt bởi thrombin có mặt trong mẫu. Theo cách khác, hoạt tính Yếu tố IXa có thể được xác định bằng cách thay đổi điều kiện sao cho Yếu tố VIII và Yếu tố X là dư, và như vậy, Yếu tố IXa là bị hạn chế tốc độ. Tương tự, hoạt tính Yếu tố X có thể được xác định bằng cách thay đổi điều kiện sao cho Yếu tố VIII và Yếu tố IXa là dư, và như vậy, Yếu tố X là bị hạn chế tốc độ. Do đó, hoạt tính của Yếu tố VIII, cũng như Yếu tố IXa và Yếu tố X, có thể được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh màu dựa trên thác đông tụ máu.

Để làm ví dụ khác, thử nghiệm đóng cục một giai đoạn mà áp dụng Thời gian thromboplastin một phần được hoạt hóa một phần (Partial Activated Partial Thromboplastin Time) (APTT) có thể được sử dụng để phát hiện hoạt

tính của Yếu tố VIII. Trong thử nghiệm này, các mẫu chứa Yếu tố VIII, cùng với  $\text{CaCl}_2$ , được bổ sung vào huyết tương thiếu hụt Yếu tố VIII để xúc tiến sự đông tụ và ảnh hưởng của mẫu này đến thời gian đông cục APTT của huyết tương là thước đo hoạt tính của Yếu tố VIII. Hoạt tính của các mẫu chưa biết được tính toán bằng cách so sánh hoạt tính của Yếu tố VIII quan sát được với đường cong chuẩn tạo ra từ các mẫu hoạt tính của Yếu tố VIII đã biết. Thử nghiệm đông cục máu này cũng có thể được sử dụng cho protein bất kỳ khác có liên quan đến thác đông tụ máu bằng cách sử dụng huyết tương thiếu hụt protein đang được thử nghiệm.

Sáng chế đề xuất, một phần, hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa các khối kết tụ protein của protein có hoạt tính. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “về cơ bản không chứa các khối kết tụ protein” có nghĩa là chỉ có lượng vết của các khối kết tụ protein của protein có hoạt tính (protein quan tâm) có thể được phát hiện hoặc được xác nhận bằng dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của các khối kết tụ protein và lượng vết của các khối kết tụ protein này không đủ có hại đối với sức khỏe của con người, như, ví dụ, gợi ra đáp ứng miễn dịch ở cá thể. Theo một khía cạnh của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ hoàn toàn không chứa các khối kết tụ protein của protein có hoạt tính. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoàn toàn không chứa các khối kết tụ protein” có nghĩa là sự có mặt của các khối kết tụ protein của protein có hoạt tính (protein quan tâm) không thể được phát hiện hoặc được xác nhận trong khoảng phát hiện của dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của các khối kết tụ protein. Chất lỏng về cơ bản không chứa hoặc hoàn toàn không chứa các khối kết tụ protein của protein có hoạt tính (protein quan tâm) có thể được sử dụng để bào chế được phẩm an toàn để sử dụng cho người vì các khối kết tụ protein không đủ có hại đối với sức khỏe của con người.

Theo các khía cạnh của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ có ít hơn, ví dụ, khoảng 10%, khoảng 9%, khoảng 8%, khoảng 7%, khoảng 6%, khoảng 5%, khoảng 4%, khoảng 3%, khoảng 2%, khoảng 1%, khoảng 0,9%, khoảng 0,8%,

khoảng 0,7%, khoảng 0,6%, khoảng 0,5%, khoảng 0,4%, khoảng 0,3%, khoảng 0,2%, khoảng 0,1%, khoảng 0,09%, khoảng 0,08%, khoảng 0,07%, khoảng 0,06%, khoảng 0,05%, khoảng 0,04%, khoảng 0,03%, khoảng 0,02%, hoặc khoảng 0,01% protein có hoạt tính ở dạng kết tụ. Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp sau khi ủ có ít hơn từ, ví dụ, khoảng 1% đến khoảng 0,01%, 0,9% đến khoảng 0,01%, 0,8% đến khoảng 0,01%, 0,7% đến khoảng 0,01%, 0,6% đến khoảng 0,01%, 0,5% đến khoảng 0,01%, 0,4% đến khoảng 0,01%, 0,3% đến khoảng 0,01%, 0,2% đến khoảng 0,01%, hoặc 0,1% đến khoảng 0,01% protein có hoạt tính ở dạng kết tụ.

Việc phát hiện sự tạo thành của các khối kết tụ protein có thể được thực hiện bởi thử nghiệm bất kỳ mà có thể xác định định tính hoặc định lượng sự có mặt hoặc hoạt tính của các khối kết tụ protein có liên quan đến protein quan tâm đang được theo dõi, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sắc ký loại trừ theo kích cỡ cùng với thử nghiệm protein đặc hiệu và/hoặc không đặc hiệu được bộc lộ trong bản mô tả này. Thử nghiệm trên thực tế được sử dụng để phát hiện các khối kết tụ protein như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này tính đến các yếu tố, bao gồm, nhưng không giới hạn, protein được thử nghiệm, lượng protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ, đặc điểm được thử nghiệm, và sự ưu tiên của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm thêm bước loại bỏ dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác được sử dụng trong các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này ra khỏi hỗn hợp sau khi ủ. Sau khi hoàn thành phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác có thể được loại bỏ. Các phương pháp thường được sử dụng để loại bỏ chất tẩy rửa bao gồm chiết, lọc, phân lọc, trao đổi đệm, sắc ký ái lực hoặc trao đổi ion, kết tủa, hoặc làm khô lạnh. Xem, ví dụ, Current Protocols in Protein Science, "Conventional Chromatographic Separation," Ch. 8-9, (John Wiley & Sons Inc., Hoboken, N.J.), tài liệu này

được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Sau khi loại bỏ, lượng dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác còn lại là lượng về cơ bản không có ảnh hưởng có hại lâu dài hoặc vĩnh cửu khi được sử dụng cho người.

Theo một phương án, hỗn hợp sau khi loại bỏ dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác về cơ bản không chứa dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác này. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “về cơ bản không chứa dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác” có nghĩa là chỉ có lượng vết của dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác có thể được phát hiện hoặc được xác nhận bằng dụng cụ hoặc quy trình đang được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác và lượng vết như vậy của dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác không có ảnh hưởng có hại lâu dài hoặc vĩnh cửu khi được sử dụng cho người. Theo một khía cạnh của phương án này, hỗn hợp sau khi loại bỏ dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác hoàn toàn không chứa dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác này. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoàn toàn không chứa dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác” có nghĩa là sự có mặt của dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác không thể được phát hiện hoặc được xác nhận trong khoảng phát hiện của dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác. Protein chứa trong hỗn hợp về cơ bản không chứa hoặc hoàn toàn không chứa dung môi hữu cơ, chất hoạt động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác có thể được sử dụng để bào chế được phẩm an toàn để sử dụng cho người vì lượng của dung môi hữu cơ, chất hoạt

động bề mặt, và/hoặc chất phản ứng hoặc thành phần khác không đủ có hại đối với sức khỏe của con người.

Theo các khía cạnh của phương án này, lượng dung môi hữu cơ còn lại trong hỗn hợp là, ví dụ, khoảng 1ppm, khoảng 3ppm, khoảng 5ppm, khoảng 10ppm, khoảng 15ppm, khoảng 20ppm, khoảng 25ppm, khoảng 30ppm, hoặc khoảng 35ppm. Theo các khía cạnh khác của phương án này, lượng của dung môi hữu cơ còn lại trong hỗn hợp là, ví dụ, không nhiều hơn 1ppm, không nhiều hơn 3ppm, không nhiều hơn 5ppm, không nhiều hơn 10ppm, không nhiều hơn 15ppm, không nhiều hơn 20ppm, không nhiều hơn 25ppm, không nhiều hơn 30ppm, hoặc không nhiều hơn 35ppm. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, lượng của dung môi hữu cơ còn lại trong hỗn hợp nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 1ppm đến khoảng 20ppm, khoảng 1ppm đến khoảng 25ppm, khoảng 1ppm đến khoảng 30ppm, khoảng 1ppm đến khoảng 35ppm, khoảng 3ppm đến khoảng 20ppm, khoảng 3ppm đến khoảng 25ppm, khoảng 3ppm đến khoảng 30ppm, hoặc khoảng 3ppm đến khoảng 35ppm.

Theo các khía cạnh của phương án này, lượng chất hoạt động bề mặt còn lại trong hỗn hợp là, ví dụ, khoảng 1ppm, khoảng 3ppm, khoảng 5ppm, khoảng 10ppm, khoảng 15ppm, khoảng 20ppm, khoảng 25ppm, khoảng 30ppm, khoảng 35ppm, khoảng 40ppm, khoảng 45ppm, khoảng 50ppm, khoảng 55ppm, khoảng 60ppm, khoảng 65ppm, khoảng 70ppm, khoảng 75ppm, khoảng 80ppm, khoảng 85ppm, khoảng 90ppm, hoặc khoảng 100ppm. Theo các khía cạnh khác của phương án này, lượng chất hoạt động bề mặt còn lại trong hỗn hợp là, ví dụ, không nhiều hơn 1ppm, không nhiều hơn 10ppm, không nhiều hơn 20ppm, không nhiều hơn 30ppm, không nhiều hơn 40ppm, không nhiều hơn 50ppm, không nhiều hơn 60ppm, không nhiều hơn 70ppm, không nhiều hơn 80ppm, không nhiều hơn 90ppm, hoặc không nhiều hơn 100ppm. Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, lượng chất hoạt động bề mặt còn lại trong hỗn hợp nằm trong khoảng từ, ví dụ, khoảng 1ppm đến khoảng 25ppm, khoảng 1ppm đến khoảng 50ppm, khoảng 1ppm đến khoảng 75ppm, khoảng 1ppm đến khoảng 100ppm, khoảng 5ppm đến khoảng

25ppm, khoảng 5ppm đến khoảng 50ppm, khoảng 5ppm đến khoảng 75ppm, khoảng 5ppm đến khoảng 100ppm, khoảng 10ppm đến khoảng 25ppm, khoảng 10ppm đến khoảng 50ppm, khoảng 10ppm đến khoảng 75ppm, hoặc khoảng 10ppm đến khoảng 100ppm.

Theo một khía cạnh của phương án này, lượng dung môi hữu cơ còn lại trong hỗn hợp là không nhiều hơn 35ppm và lượng chất hoạt động bề mặt còn lại trong hỗn hợp là không nhiều hơn 100ppm. Theo khía cạnh khác của phương án này, lượng dung môi hữu cơ còn lại trong hỗn hợp là không nhiều hơn 3ppm và lượng chất hoạt động bề mặt còn lại trong hỗn hợp là không nhiều hơn 10ppm. Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, lượng dung môi hữu cơ còn lại trong hỗn hợp là khoảng 1ppm đến khoảng 35ppm và lượng chất hoạt động bề mặt còn lại trong hỗn hợp là khoảng 1ppm đến khoảng 100ppm.

Theo khía cạnh khác của phương án này, phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này không bao gồm bước loại bỏ dung môi hữu cơ ra khỏi hỗn hợp sau khi ủ. Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này không bao gồm bước loại bỏ chất hoạt động bề mặt ra khỏi hỗn hợp sau khi ủ.

Các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể bao gồm thêm bước loại bỏ virus ra khỏi hỗn hợp sau khi ủ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "loại bỏ virus" hoặc "việc loại bỏ virus" chỉ quy trình loại bỏ virus khỏi hỗn hợp được bộc lộ trong bản mô tả này, sao cho các hạt virus được chiết một cách hiệu quả ra khỏi hỗn hợp. Virus có thể là virus còn sống hoặc virus đã được làm bất hoạt. Việc loại bỏ thường được thực hiện bởi sắc ký loại trừ theo kích cỡ hoặc sắc ký hấp phụ dương ở đó protein quan tâm liên kết với nhựa sắc ký. Sau khi loại bỏ, lượng của virus còn lại là lượng về cơ bản không có ảnh hưởng có hại lâu dài hoặc vĩnh cửu khi được sử dụng cho người.

Theo một phương án, hỗn hợp sau khi loại bỏ virus về cơ bản không chứa virus. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "về cơ bản không chứa virus" có nghĩa là chỉ có lượng vết của virus có thể được phát hiện hoặc được xác nhận

bằng dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của virus và lượng vết như vậy của virus không đủ có hại đối với sức khỏe của con người. Theo một khía cạnh của phương án này, hỗn hợp sau khi loại bỏ virus hoàn toàn không chứa virus. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoàn toàn không chứa virus” có nghĩa là sự có mặt của virus không thể được phát hiện hoặc được xác nhận trong khoảng phát hiện của dụng cụ hoặc quy trình được sử dụng để phát hiện hoặc xác nhận sự có mặt hoặc hoạt tính của virus. Protein chứa trong hỗn hợp về cơ bản không chứa hoặc hoàn toàn không chứa virus có thể được sử dụng để bào chế được phẩm an toàn để sử dụng cho người vì virus không đủ có hại đối với sức khỏe của con người.

Theo các khía cạnh khác của phương án này, hỗn hợp sau khi loại bỏ virus chứa ít hơn  $1 \times 10^1$  PFU/mL virus, như, ví dụ, ít hơn  $1 \times 10^0$  PFU/mL virus, ít hơn  $1 \times 10^{-1}$  PFU/mL virus,  $1 \times 10^{-2}$  PFU/mL virus, hoặc  $1 \times 10^{-3}$  PFU/mL virus.

Theo các khía cạnh khác nữa của phương án này, hỗn hợp sau khi loại bỏ virus chứa ít hơn  $ID_{50}$  đối với virus, như, ví dụ, ít hơn ít nhất 10 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 100 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 200 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 300 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 400 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 500 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 600 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 700 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 800 lần  $ID_{50}$  đối với virus, ít hơn ít nhất 900 lần  $ID_{50}$  đối với virus, hoặc ít hơn ít nhất 1000 lần  $ID_{50}$  đối với virus.

Theo khía cạnh khác của phương án này, phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này không bao gồm bước loại bỏ virus ra khỏi hỗn hợp sau khi ủ.

Các khía cạnh của sáng chế cũng có thể được mô tả như sau:

1. Phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid, phương pháp này bao gồm các bước: a) cung cấp chất lỏng chứa protein có hoạt tính; b) trộn dung môi

hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó protein sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

2. Protein về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp bao gồm các bước: a) cung cấp chất lỏng chứa protein có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó protein sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

3. Phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid, phương pháp này bao gồm các bước: a) cung cấp chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

4. Yếu tố VIII về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp bao gồm các bước: a) thu nhận chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt tính; b) trộn dung môi hữu cơ và chất hoạt động bề mặt với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp; và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản

không chứa virut có vỏ lipit còn sống; và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

5. Các phương án theo mục từ 1 đến 4, trong đó chất lỏng là dịch tan tế bào, dịch tế bào nổi bề mặt, dịch rửa giải từ bước tinh chế trước đó, hoặc chất lỏng sinh học.

6. Phương án theo mục 5, trong đó dịch tan tế bào được thu nhận từ dòng tế bào động vật có vú.

7. Phương án theo mục 6, trong đó dòng tế bào động vật có vú là dòng tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO).

8. Các phương án theo mục từ 1 đến 4, trong đó protein là protein tái tổ hợp.

9. Các phương án theo mục từ 1 đến 4, trong đó protein từ sinh vật hoặc sinh vật chuyển gen.

10. Các phương án theo mục từ 8 đến 9, trong đó protein là protein máu.

11. Các phương án theo mục 10, trong đó protein máu là protein đông máu.

12. Các phương án theo mục từ 8 đến 10, trong đó protein máu là ADAMTS-13,  $\alpha$ 1-antiplasmin,  $\alpha$ 2-antiplasmin, antithrombin, antithrombin III, chất gây đông trước ung thư, erythropoietin, Yếu tố II, Yếu tố V, Yếu tố VI, Yếu tố VII, Yếu tố VIII, Yếu tố IX, Yếu tố X, Yếu tố XI, Yếu tố XII, Yếu tố XIII, fibronectin, fibrinogen, heparin đồng yếu tố II, kininogen khối lượng phân tử cao, immunoglobulin trong cơ, immunoglobulin trong tĩnh mạch, plasminogen, chất ức chế chất hoạt hóa plasminogen-1, chất ức chế chất hoạt hóa plasminogen-2, prekallikrein, protein C, protein S, protein Z, chất ức chế proteaza có liên quan đến protein Z, Yếu tố mô, chất hoạt hóa plasminogen mô, urokinaza, hoặc Yếu tố Von Willebrand.

13. Các phương án theo mục từ 1 đến 12, trong đó dung môi hữu cơ là ete, rượu, dialkylphosphat hoặc trialkylphosphat.

14. Phương án theo mục 13, trong đó ete là dimetyl ete, dietyl ete, etyl propyl ete, metyl-butyl ete, metyl isopropyl ete, hoặc metyl isobutyl ete.

15. Phương án theo mục 13, trong đó rượu là metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, n-pentanol, hoặc isopentanol.

16. Phương án theo mục 13, trong đó dialkylphosphat là di-(n-butyl)phosphat, di-(t-butyl)phosphat, di-(n-hexyl)phosphat, di-(2-ethylhexyl)phosphat, di-(n-dexyl)phosphat, hoặc etyl di(n-butyl) phosphat.

17. Phương án theo mục 13, trong đó trialkylphosphat là tri-(n-butyl)phosphat, tri-(t-butyl)phosphat, tri-(n-hexyl)phosphat, tri-(2-ethylhexyl)phosphat, hoặc tri-(n-dexyl)phosphat.

18. Các phương án theo mục từ 1 đến 17, trong đó nồng độ cuối của dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,5% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,4% (theo thể tích), khoảng 0,3% (theo thể tích).

19. Các phương án theo mục từ 1 đến 18, trong đó chất hoạt động bề mặt là chất hoạt động bề mặt ion, chất hoạt động bề mặt lưỡng cực (lưỡng tính), hoặc chất hoạt động bề mặt không ion.

20. Phương án theo mục 19, trong đó chất hoạt động bề mặt ion là chất hoạt động bề mặt anion hoặc chất hoạt động bề mặt cation.

21. Phương án theo mục 20, trong đó chất hoạt động bề mặt anion là alkyl sulfat, alkyl ete sulfat, docusat, chất hoạt động bề mặt flo sulfonat, alkyl benzen sulfonat, alkyl aryl ete phosphat, alkyl ete phosphat, alkyl carboxylat, natri lauroyl sarcosinat, hoặc chất hoạt động bề mặt flo carboxylat.

22. Phương án theo mục 21, trong đó alkyl sulfat là amoni lauryl sulfat hoặc natri lauryl sulfat (SDS).

23. Phương án theo mục 21, trong đó alkyl ete sulfat là natri laureth sulfat hoặc natri myreth sulfat.

24. Phương án theo mục 21, trong đó docusat là dioctyl natri sulfosuxinat.

25. Phương án theo mục 21, trong đó chất hoạt động bề mặt flo sulfonat là perflooctansulfonat (PFOS) hoặc perflobutansulfonat.

26. Phương án theo mục 21, trong đó alkyl carboxylat là muối axit béo hoặc natri stearat.

27. Phương án theo mục 21, trong đó chất hoạt động bề mặt flo carboxylat là perflononanoat và perflooctanoat.

28. Phương án theo mục 20, trong đó chất hoạt động bề mặt cation là muối alkyltrimetylamoni, xetylpyridini clorua (CPC), amin mỡ động vật đã được polyetoxyl hóa (POEA), benzalkoni clorua (BAC), benzethoni clorua (BZT), 5-brom-5-nitro-1,3-dioxan, dimetyldioctadexylamoni clorua, dioctadexyldimetylamoni bromua (DODAB), amin bậc một phụ thuộc vào độ pH, amin bậc hai phụ thuộc vào độ pH, hoặc amin bậc ba phụ thuộc vào độ pH.

29. Phương án theo mục 28, trong đó muối alkyltrimetylamoni là xetyl trimetylamoni bromua (CTAB) hoặc xetyl trimetylamoni clorua (CTAC).

30. Phương án theo mục 28, trong đó amin bậc một trở nên tích điện dương ở độ pH < 10 hoặc amin bậc hai trở nên tích điện ở độ pH < 4.

31. Phương án theo mục 20, trong đó chất hoạt động bề mặt cation là octenidin dihydroclorua.

32. Phương án theo mục 20, trong đó chất hoạt động bề mặt lưỡng cực là 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), sultain, betain, hoặc lexitin.

33. Phương án theo mục 32, trong đó sultain là cocamidopropyl hydroxysultain.

34. Phương án theo mục 32, trong đó betain là cocamidopropyl betain.

35. Phương án theo mục 20, trong đó chất hoạt động bề mặt không ion là polyoxyetylen glycol sorbitan alkyl este, poloxame, alkyl phenol polyglycol ete, polyetylen glycol alkyl aryl ete, polyoxyetylen glycol alkyl ete, 2-dodecoxyetanol (LUBROL®-PX), polyoxyetylen glycol octylphenol ete, polyoxyetylen glycol alkylphenol ete, phenoxypolyetoxyletanol, glucosit alkyl ete, maltosit alkyl ete, thioglucosit alkyl ete, digitonin, glyxerol alkyl este, alkyl aryl polyete sulfat, rượu sulfonat, sorbitan alkyl este, cocamit etanolamin, sucroza monolaurat, dodexyl dimetylamin oxit, hoặc natri cholat.

36. Phương án theo mục 35, trong đó polyoxyetylen glycol sorbitan alkyl este là polysorbat 20 sorbitan monooleat (TWEEN® 20), polysorbat 40 sorbitan monooleat (TWEEN® 40), polysorbat 60 sorbitan monooleat (TWEEN® 60), polysorbat 61 sorbitan monooleat (TWEEN® 61), polysorbat 65 sorbitan monooleat (TWEEN® 65), polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), hoặc polysorbat 81 sorbitan monooleat (TWEEN® 81).

37. Phương án theo mục 35, trong đó poloxame là Poloxame 124 (PLURONIC® L44), Poloxame 181 (PLURONIC® L61), Poloxame 182 (PLURONIC® L62), Poloxame 184 (PLURONIC® L64), Poloxame 188 (PLURONIC® F68), Poloxame 237 (PLURONIC® F87), Poloxame 338 (PLURONIC® L108), hoặc Poloxame 407 (PLURONIC® F127).

38. Phương án theo mục 35, trong đó polyoxyetylen glycol alkyl ete là octaetylen glycol monododexyl ete, pentaetylen glycol monododexyl ete, BRIJ® 30, hoặc BRIJ® 35.

39. Phương án theo mục 35, trong đó polyoxyetylen glycol octylphenol ete là polyoxyetylen (4-5) p-t-octyl phenol (TRITON® X-45) hoặc polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100).

40. Phương án theo mục 35, trong đó polyoxyetylen glycol alkylphenol ete là nonoxynol-9.

41. Phương án theo mục 35, trong đó phenoxypolyetoxyletanol là nonyl phenoxypolyetoxyletanol hoặc octyl phenoxypolyetoxyletanol.

42. Phương án theo mục 35, trong đó glucosit alkyl ete là octyl glucopyranosit.

43. Phương án theo mục 35, trong đó maltosit alkyl ete là dodexyl maltopyranosit.

44. Phương án theo mục 35, trong đó thioglucosit alkyl ete là heptyl thioglucopyranosit.

45. Phương án theo mục 35, trong đó glyxerol alkyl este là glyxeryl laurat.

46. Phương án theo mục 35, trong đó cocamit etanolamin là cocamit monoetanolamin hoặc cocamit dietanolamin.

47. Phương án theo mục từ 1 đến 46, trong đó nồng độ cuối của chất hoạt động bề mặt là từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích).

48. Phương án theo mục từ 1 đến 47, trong đó chất hoạt động bề mặt là nhiều chất hoạt động bề mặt.

49. Phương án theo mục từ 1 đến 48, trong đó nhiều chất hoạt động bề mặt là theo các điểm 19-46.

50. Phương án theo mục 48 hoặc 49, trong đó nồng độ cuối của một chất hoạt động bề mặt nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích), khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), và nồng độ cuối của phần còn lại của các chất hoạt động bề mặt là khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5% (theo thể tích), khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 1,0% (theo thể tích), hoặc khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 4% (theo thể tích).

51. Phương án theo mục từ 1 đến 50, trong đó trong bước (c) hỗn hợp được ủ trong khoảng từ khoảng 10 phút đến khoảng 90 phút.

52. Phương án theo mục từ 1 đến 50, trong đó trong bước (c) hỗn hợp được ủ trong khoảng từ khoảng 30 phút và khoảng 60 phút.

53. Phương án theo mục từ 1 đến 52, trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 0°C và khoảng 16°C.

54. Phương án theo mục từ 1 đến 52, trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C và khoảng 12°C.

55. Phương án theo mục từ 1 đến 52, trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C và khoảng 8°C.

56. Phương án theo mục từ 1 đến 52, trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến khoảng 4°C.

57. Phương án theo mục từ 1 đến 56, trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống.

58. Phương án theo mục từ 1 đến 57, trong đó hỗn hợp sau khi ủ hoàn toàn không chứa virus có vỏ lipid còn sống.

59. Phương án theo mục từ 1 đến 58, trong đó hỗn hợp sau khi ủ chứa ít hơn  $1 \times 10^1$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống.

60. Phương án theo mục từ 1 đến 59, trong đó hỗn hợp sau khi ủ chứa ID50 ít hơn ít nhất 100 lần đối với virus có vỏ lipid còn sống so với trước khi ủ.

61. Phương án theo mục từ 1 đến 60, trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa các khối kết tụ protein.

62. Phương án theo mục từ 1 đến 61, trong đó hỗn hợp sau khi ủ hoàn toàn không chứa các khối kết tụ protein.

63. Phương án theo mục từ 1 đến 62, trong đó hỗn hợp sau khi ủ có ít hơn khoảng 1%, ít hơn khoảng 0,9%, ít hơn khoảng 0,8%, ít hơn khoảng 0,7%, ít hơn khoảng 0,6%, ít hơn khoảng 0,5%, ít hơn khoảng 0,4%, ít hơn khoảng 0,3%, ít hơn khoảng 0,2%, hoặc ít hơn khoảng 0,1% protein có hoạt tính ở dạng kết tụ.

64. Phương án theo mục từ 1 đến 63, trong đó hoạt tính protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ bằng ít nhất 50% hoạt tính protein được cung cấp trong bước (a) hoặc ít nhất 75% hoạt tính protein được cung cấp trong bước (a).

65. Phương án theo mục từ 1 đến 64, trong đó chất lỏng chứa thêm virus có vỏ lipid.

66. Phương án theo mục 65, trong đó virus có vỏ lipid là virus ADN, virus ARN, hoặc virus phiên mã ngược.

67. Phương án theo mục 66, trong đó virus ADN là virus herpesviridae, virus poxviridae, hoặc virus hepadnaviridae.

68. Phương án theo mục 66, trong đó virus ARN là virus flaviviridae, virus togaviridae, virus coronaviridae, virus deltavirus, virus orthomyxoviridae, virus paramyxoviridae, virus rhabdoviridae, virus bunyaviridae, hoặc virus filoviridae.

69. Phương án theo mục 66, trong đó virus phiên mã ngược là virus retroviridae hoặc virus hepadnaviridae.

70. Phương án theo mục 65, trong đó virus có vỏ lipid là virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus sindbis, virus gây bệnh mụn rộp, virus gây bệnh giả dại, virus sendai, virus gây viêm miệng, virus West Nile, virus gây bệnh tiêu chảy do virus ở bò, virus corona, virus gây viêm khớp ở ngựa, virus gây hội chứng hô hấp cấp nghiêm trọng, virus gây bệnh bạch cầu ở chuột Moloney, hoặc virus gây bệnh đậu mùa.

71. Phương án theo mục từ 1 đến 70, trong đó phương pháp bao gồm thêm bước loại bỏ dung môi ra khỏi hỗn hợp sau bước (c).

72. Phương án theo mục từ 1 đến 71, trong đó phương pháp bao gồm thêm bước loại bỏ chất hoạt động bề mặt không ion ra khỏi hỗn hợp sau bước (c).

73. Phương án theo mục từ 1 đến 72 trong đó phương pháp bao gồm thêm bước loại bỏ virus không còn sống ra khỏi hỗn hợp sau bước (c).

74. Phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid, phương pháp này bao gồm các bước: a) cung cấp chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt tính; b) trộn tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl, và polysorbat 80 sorbitan với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, trong đó nồng độ cuối của tri(n-butyl) phosphat nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích), nồng độ cuối của polyoxyetylen octyl phenyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích), và nồng độ cuối của polysorbat 80 sorbitan nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích); và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

75. Yếu tố VIII về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp bao gồm các bước: a) thu nhận chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt

tính; b) trộn tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl, và polysorbat 80 sorbitan với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, trong đó nồng độ cuối của tri(n-butyl) phosphat nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích), nồng độ cuối của polyoxyetylen octyl phenyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích), và nồng độ cuối của polysorbat 80 sorbitan nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích); và c) ủ hỗn hợp này trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút; trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ không cao hơn khoảng 20°C; trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

76. Phương án theo mục 74 hoặc 75, trong đó nồng độ của tri(n-butyl) phosphat nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,7%, nồng độ của polyoxyetylen octyl phenyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,6% (theo thể tích) đến khoảng 1,4% (theo thể tích), và nồng độ của polysorbat 80 sorbitan nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,7%.

77. Phương án theo mục 74 hoặc 75, trong đó nồng độ của tri(n-butyl) phosphat nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,5%, nồng độ của polyoxyetylen octyl phenyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,7% (theo thể tích) đến khoảng 1,3% (theo thể tích), và nồng độ của polysorbat 80 sorbitan nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 0,5%.

78. Phương án theo mục 74 hoặc 75, trong đó nồng độ của tri(n-butyl) phosphat nằm trong khoảng từ khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,4%, nồng độ của polyoxyetylen octyl phenyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,8% (theo thể tích) đến khoảng 1,2% (theo thể tích), và nồng độ của polysorbat 80 sorbitan nằm trong khoảng từ khoảng 0,2% (theo thể tích) đến khoảng 0,4%.

79. Phương án theo mục 74 hoặc 75, trong đó nồng độ của tri(n-butyl) phosphat là khoảng 0,3% (theo thể tích), nồng độ của polyoxyetylen octyl

phenyl là khoảng 1,0% (theo thể tích), và nồng độ của polysorbat 80 sorbitan là khoảng 0,3% (theo thể tích).

80. Phương án theo mục từ 74 đến 79, trong đó hỗn hợp sau khi ủ có ít hơn khoảng 1%, ít hơn khoảng 0,9%, ít hơn khoảng 0,8%, ít hơn khoảng 0,7%, ít hơn khoảng 0,6%, ít hơn khoảng 0,5%, ít hơn khoảng 0,4%, ít hơn khoảng 0,3%, ít hơn khoảng 0,2%, hoặc ít hơn khoảng 0,1% protein có hoạt tính ở dạng kết tụ.

81. Phương án theo mục từ 74 đến 80, trong đó hoạt tính protein có mặt trong hỗn hợp sau khi ủ bằng ít nhất 50% hoạt tính protein được cung cấp trong bước (a) hoặc ít nhất 75% hoạt tính protein được cung cấp trong bước (a).

82. Phương án theo mục từ 1 đến 81 như đã được nêu ở đây.

83. Phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid như đã được nêu ở đây.

84. Yếu tố VIII về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp như đã được nêu ở đây.

85. Protein về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được từ phương pháp như đã được nêu ở đây.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các ví dụ không giới hạn sáng chế dưới đây được cung cấp chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế để hiểu đầy đủ hơn về các phương án đại diện hiện được dự tính. Các ví dụ này không nên được hiểu là giới hạn phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả trong sáng chế, bao gồm các phương án liên quan đến các phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid được bộc lộ trong bản mô tả này và sản phẩm được xử lý bằng cách sử dụng các phương pháp này.

#### **Ví dụ 1**

Đánh giá hiệu quả làm bất hoạt virus

Ví dụ này minh họa rằng các phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid được bộc lộ trong bản mô tả này tạo ra hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống.

Yếu tố VIII tái tổ hợp, được tạo ra bởi dòng tế bào CHO mà tiết protein vào trong môi trường nuôi cấy tế bào, được thu hoạch bằng cách thu gom môi trường và ly tâm nó để loại bỏ mảnh vụn tế bào. Trong phòng lạnh được giữ ở 10°C hoặc dưới 10°C, dịch nổi bề mặt đã được thu hoạch được pha loãng và được lọc qua bộ lọc 0,2 µm, và yếu tố VIII được bắt giữ bằng cách đi qua cột sắc ký ái lực miễn dịch chứa kháng thể đơn dòng của chuột nhắt kháng α-Yếu tố VIII đã được giữ cố định và thu gom nước giải hấp. Yếu tố VIII được xử lý tiếp bằng cách cho nước giải hấp sắc ký ái lực miễn dịch đi qua cột sắc ký trao đổi cation chứa nhóm được sulfonat hóa tích điện âm. Sau đó, nước giải hấp đã được thu gom từ cột trao đổi này được làm lạnh xuống nhiệt độ khoảng 2°C hoặc khoảng 10°C.

Sau đó, nước giải hấp đã được làm lạnh được chia thành ba lượng nhỏ và virus kiểu mẫu có vỏ lipid là virus gây bệnh giả dại được bổ sung ở tỷ lệ 1:13 (ví dụ, 24 mL vật liệu cấp của quy trình cộng với 2 mL dung dịch virus gốc). Sau đó, các lượng nhỏ này được trộn với dung dịch dung môi/chất tẩy rửa, và được làm lạnh xuống cùng nhiệt độ, như sau: Lượng nhỏ 1, 0,21% (theo thể tích) tri(n-butyl)phosphat (TNBP), 0,7% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,21% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80); lượng nhỏ 2, 0,06% (theo thể tích) tri(n-butyl)phosphat (TNBP), 0,2% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,06% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80); và lượng nhỏ 3, 0,03% (theo thể tích) tri(n-butyl)phosphat (TNBP), 0,1% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,03% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Nồng độ các thành phần của dung dịch dung môi/chất tẩy rửa lần lượt bằng 70%, 20% và 10% nồng độ định mức của các thành phần này trong quy trình sản xuất thông thường. Các nồng độ cận tối ưu này được sử dụng để đánh giá

độ chắc chắn của phương pháp bằng cách sử dụng các điều kiện ít thuận lợi nhất đối với việc làm bất hoạt virus, cũng như đánh giá động học của sự bất hoạt.

Để đánh giá tính hiệu quả của phương pháp xử lý S/D, sự giảm  $\log_{10}$  của virus có vỏ lipid được xác định. Các mẫu từ nguyên liệu khởi đầu được chích virus và trong quá trình xử lý S/D được rút; tác dụng làm bất hoạt virus của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa được làm dừng trong các mẫu bằng cách pha loãng ngay với môi trường nuôi cấy tế bào lạnh trước khi chuẩn độ virus. Hệ số giảm log được tính toán bằng cách trừ độ chuẩn (log) của mẫu cuối cùng khỏi độ chuẩn (log) của nguyên liệu khởi đầu đã được chích; ở đó không thể quan sát thấy có sự lây nhiễm trong mẫu cuối cùng, giới hạn phát hiện được lấy đối với phép tính toán này.

Các kết quả cho thấy rằng việc làm bất hoạt virus gây bệnh giả dại xảy ra trong khoảng 1 đến khoảng 2 phút ở khoảng 2°C hoặc khoảng 10°C (Bảng 1). Vì các mẻ thử nghiệm được tiến hành ở hoặc dưới các giới hạn dưới của nồng độ thành phần dung môi/chất tẩy rửa và dưới các giới hạn dưới của khoảng thời gian xử lý S/D, các hệ số giảm thu được là các ước tính chắc chắn về khả năng làm bất hoạt virus của quy trình có quy mô lớn. Các kết quả này chứng tỏ rằng việc xử lý bằng S/D ở nhiệt độ khoảng 10°C và ở nhiệt độ khoảng 2°C là mạnh và rất hiệu quả và các virus có vỏ lipid được làm bất hoạt một cách nhanh chóng.

| Bảng 1. Hiệu quả làm bất hoạt virus PRV                                     |                                                     |                                  |                 |               |                                        |                                  |      |               |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------------|----------------------------------|------|---------------|
| Dung dịch<br>dung<br>môi/chất<br>tẩy rửa                                    | Nhiệt độ ủ                                          |                                  |                 |               |                                        |                                  |      |               |
|                                                                             | 2°C                                                 |                                  |                 |               | 10°C                                   |                                  |      |               |
|                                                                             | Thời gian<br>làm bất<br>hoạt<br>(phút) <sup>1</sup> | Hệ số giảm virus ( $\log_{10}$ ) |                 |               | Thời<br>gian làm<br>bất hoạt<br>(phút) | Hệ số giảm virus ( $\log_{10}$ ) |      |               |
|                                                                             |                                                     | Mẻ 1                             | Mẻ 2            | Trung<br>bình |                                        | Mẻ 1                             | Mẻ 2 | Trung<br>bình |
| 70%                                                                         | 1-2                                                 | >4,5                             | >4,6            | >4,6          | 1-2                                    | >4,8                             | >4,5 | >4,6          |
| 20%                                                                         | 1-2                                                 | >5,3                             | ND <sup>2</sup> | ND            | 1-2                                    | >5,0                             | ND   | ND            |
| 10%                                                                         | 1-2                                                 | >5,7                             | ND              | ND            | 1-2                                    | >5,5                             | ND   | ND            |
| <sup>1</sup> Thời gian cần để bất hoạt virus xuống dưới giới hạn phát hiện. |                                                     |                                  |                 |               |                                        |                                  |      |               |
| <sup>2</sup> ND, Không được xác định.                                       |                                                     |                                  |                 |               |                                        |                                  |      |               |

## Ví dụ 2

## Đánh giá hiệu quả làm bất hoạt virus

Ví dụ này minh họa rằng các phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid được bộc lộ trong bản mô tả này tạo ra hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống.

Yếu tố VIII tái tổ hợp được biểu hiện và được tinh chế về cơ bản như được mô tả trong Ví dụ 1. Sau đó, nước giải hấp đã được thu gom từ cột trao đổi cation được làm lạnh xuống nhiệt độ khoảng 2°C.

Sau đó, nước giải hấp đã được làm lạnh được chia thành sáu lượng nhỏ và các virus có vỏ lipid được bổ sung vào các lượng nhỏ này ở tỷ lệ 1:13 (ví dụ, 24 mL vật liệu cấp của quy trình cộng với 2 mL dung dịch virus gốc) như sau: Lượng nhỏ 1 và 2, virus gây bệnh giả dại (PRV) được bổ sung; Lượng nhỏ 3 và 4, virus gây bệnh bạch cầu ở chuột Moloney (X-MuLV) được bổ sung; và Lượng nhỏ 5 và 6, virus gây bệnh tiêu chảy do virus ở bò (BVDV) được bổ sung. Sau đó, các lượng nhỏ này được trộn với dung dịch dung môi/chất tẩy rửa, và được làm lạnh xuống nhiệt độ khoảng 2°C, như sau: Lượng nhỏ 1, 3 và 5; 0,21% (theo thể tích) tri(n-butyl)phosphat (TNBP), 0,7% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,21% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80); và lượng nhỏ 2, 4, và 6; 0,03% (theo thể tích) tri(n-butyl)phosphat (TNBP), 0,1% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,03% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Nồng độ các thành phần của dung dịch dung môi/chất tẩy rửa lần lượt bằng 70% và 10% nồng độ định mức của các thành phần này trong quy trình sản xuất thông thường. Các nồng độ cận tối ưu này được sử dụng để đánh giá độ chắc chắn của phương pháp bằng cách sử dụng các điều kiện ít thuận lợi nhất đối với việc làm bất hoạt virus, cũng như đánh giá động học của sự bất hoạt.

Để đánh giá tính hiệu quả của phương pháp xử lý S/D, sự giảm  $\log_{10}$  của mỗi trong số ba virus có vỏ lipid được xác định. Các mẫu từ nguyên liệu khởi đầu được chích virus và trong quá trình xử lý S/D được rút; tác dụng làm bất hoạt virus của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa được làm dừng trong các mẫu bằng cách pha loãng ngay với môi trường nuôi cấy tế bào lạnh trước khi chuẩn độ virus. Hệ số giảm log được tính toán bằng cách trừ độ chuẩn (log) của mẫu cuối cùng từ độ chuẩn (log) của nguyên liệu khởi đầu đã được chích; ở đó không thể quan sát thấy có sự lây nhiễm trong mẫu cuối cùng, giới hạn phát hiện được lấy đối với phép tính toán này.

Các kết quả cho thấy rằng sự bất hoạt PRV, X-MuLV, và BVDV tất cả đều xảy ra trong khoảng 1-2 phút ở nhiệt độ khoảng 2°C khi được ủ với dung dịch dung môi/chất tẩy rửa 70% (Bảng 2). Vì các mẻ thử nghiệm được thực hiện ở hoặc dưới các giới hạn dưới của nồng độ thành phần dung môi/chất tẩy rửa và dưới các giới hạn dưới của khoảng thời gian xử lý S/D, các hệ số giảm thu được là các ước tính chắc chắn về khả năng làm bất hoạt virus của quy trình có quy mô lớn. Các kết quả này chứng tỏ rằng việc xử lý bằng S/D ở nhiệt độ khoảng 2°C là mạnh và rất hiệu quả và các virus có vỏ lipid được làm bất hoạt một cách nhanh chóng.

| Bảng 2. Hiệu quả làm bất hoạt PRV, X-MuLV, và BVDV                          |                                 |                                            |                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| Virut                                                                       | Dung dịch dung môi/chất tẩy rửa | Thời gian làm bất hoạt (phút) <sup>1</sup> | Hệ số giảm virus ( $\log_{10}$ ) |
| PRV                                                                         | 10%                             | 10                                         | >5,2                             |
|                                                                             | 70%                             | 1-2                                        | >4,1                             |
|                                                                             | 70%                             | 1-2                                        | >4,5                             |
| X-MuLV                                                                      | 10%                             | >60                                        | 2,7                              |
|                                                                             | 70%                             | 1-2                                        | >4,9                             |
|                                                                             | 70%                             | 1-2                                        | >3,8                             |
| BVDV                                                                        | 10%                             | >60                                        | 2,4                              |
|                                                                             | 70%                             | 1-2                                        | >5,3                             |
|                                                                             | 70%                             | 1-2                                        | >5,1                             |
| <sup>1</sup> Thời gian cần để bất hoạt virus xuống dưới giới hạn phát hiện. |                                 |                                            |                                  |

## Ví dụ 3

## Đánh giá thời gian trộn, lọc, và hiệu suất của protein

Ví dụ này minh họa rằng các phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid được bộc lộ trong bản mô tả này không có tác động tiêu cực đến thời gian trộn của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa, sự lưu giữ của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa trong quá trình lọc, và hiệu suất lọc protein.

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ thấp hơn đến thời gian trộn của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa, 50 mL dung dịch dung môi/chất tẩy rửa được điều chế bằng cách bổ sung 0,3% (theo thể tích) TNBP, 1,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,3% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) và khuấy ở nhiệt độ  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 10, 20, hoặc 30 phút. Vì dung dịch dung môi/chất tẩy rửa đã chứa 0,1% polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), nồng độ cuối đối với hợp chất này là 0,4%. Nồng độ của TNBP và polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) được xác định đồng thời bằng cách sử dụng C18 RP-HPLC với bộ dò chỉ số khúc xạ (RID). Nồng độ của polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) được xác định bởi C1 RP-HPLC bằng cách sử dụng bộ dò tán xạ ánh sáng bốc hơi (ELSD). Đối với phân tích HPLC của TNBP và polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), sự rửa giải đẳng dung ly được sử dụng bằng cách sử dụng 68% metanol trong nước. Trong thử nghiệm của polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), sự rửa giải với gradien từ 60% metanol trong nước đến 100% metanol được sử dụng.

| Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian trộn đến thành phần dung môi/chất tẩy rửa |                            |                |                 |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|
| Thời gian (phút)                                                          | Nồng độ thành phần S/D (%) |                |                 |
|                                                                           | TNBP                       | TRITON X-100   | Tween 80        |
| 10                                                                        | 0,36                       | 1,2            | 0,42            |
| 20                                                                        | 0,35                       | 1,1            | 0,40            |
| 30                                                                        | 0,37                       | 1,2            | 0,44            |
| Trung bình                                                                | $0,36 \pm 0,01$            | $1,2 \pm 0,06$ | $0,42 \pm 0,02$ |

Các kết quả này xác nhận rằng nồng độ của TNBP, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) được làm ổn định một cách nhanh chóng và trong 10 phút và nhiệt độ thấp bằng  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  không có ảnh hưởng bất lợi đến thời gian trộn của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa (Bảng 3).

Để đánh giá tác động của nhiệt độ đối với khả năng lưu giữ của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa trong bước lọc, 50 mL dung dịch dung môi/chất tẩy rửa được điều chế bằng cách bổ sung 0,3% (theo thể tích) TNBP, 1,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,3% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), khuấy ở nhiệt độ  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 30 phút và nồng độ của mỗi thành phần được xác định như nêu trên. Sau đó, dung dịch dung môi/chất tẩy rửa được xử lý trong ba điều kiện nhiệt độ khác nhau:  $22,5^{\circ}\text{C}$  với thời gian làm ấm khoảng 8 giờ;  $22,5^{\circ}\text{C}$  với thời gian làm ấm khoảng 2 giờ; và  $4^{\circ}\text{C}$  không có bước làm ấm hoặc bước gia nhiệt sơ bộ bất kỳ. Vào cuối khoảng thời gian ủ, các mẫu được lọc qua bộ lọc 0,2  $\mu\text{m}$  và nồng độ TNBP, polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) được xác định bằng HPLC.

| Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến các thành phần dung môi/chất tẩy rửa |            |                                                            |               |           |                                                          |               |           |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------|---------------|-----------|----------------------------------------------------------|---------------|-----------|
| Điều kiện nhiệt độ<br>(n=3)                                             | Mê         | Nồng độ thành phần S/D (%) trước khi lọc 0,2 $\mu\text{m}$ |               |           | Nồng độ thành phần S/D (%) sau khi lọc 0,2 $\mu\text{m}$ |               |           |
|                                                                         |            | TNBP                                                       | TRITON® X-100 | TWEEN® 80 | TNBP                                                     | TRITON® X-100 | TWEEN® 80 |
| $22,5^{\circ}\text{C}$ / 2H                                             | 1          | 0,28                                                       | 1,00          | 0,41      | 0,28                                                     | 1,00          | 0,38      |
|                                                                         | 2          | 0,28                                                       | 1,00          | 0,42      | 0,29                                                     | 1,10          | 0,44      |
|                                                                         | 3          | 0,27                                                       | 1,00          | 0,41      | 0,28                                                     | 1,00          | 0,41      |
|                                                                         | Trung bình | 0,28                                                       | 1,00          | 0,41      | 0,28                                                     | 1,03          | 0,41      |
| $22,5^{\circ}\text{C}$ / 8H                                             | 1          | 0,23                                                       | 0,80          | 0,33      | 0,28                                                     | 1,00          | 0,40      |
|                                                                         | 2          | 0,28                                                       | 1,00          | 0,39      | 0,28                                                     | 1,00          | 0,39      |
|                                                                         | 3          | 0,28                                                       | 1,00          | 0,42      | 0,25                                                     | 0,90          | 0,37      |
|                                                                         | Trung bình | 0,26                                                       | 0,93          | 0,38      | 0,27                                                     | 0,97          | 0,39      |

|          |            |      |      |      |      |      |      |
|----------|------------|------|------|------|------|------|------|
|          |            |      |      |      |      |      |      |
| 4°C / 2H | 1          | 0,27 | 1,00 | 0,38 | 0,27 | 1,00 | 0,40 |
|          | 2          | 0,28 | 1,00 | 0,40 | 0,28 | 1,00 | 0,41 |
|          | 3          | 0,27 | 1,00 | 0,42 | 0,27 | 1,00 | 0,41 |
|          | Trung bình | 0,27 | 1,00 | 0,40 | 0,27 | 1,00 | 0,41 |

Các kết quả cho thấy rằng không có thành phần dung môi/chất tẩy rửa nào được giữ lại bên trên bộ lọc 0,2  $\mu\text{m}$  (Bảng 4). Ngoài ra, nhiệt độ ủ thấp hơn ( $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) không có ảnh hưởng bất lợi đến khả năng lọc của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa.

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ thấp hơn đến hoạt tính protein được thu hồi, 50 mL dung dịch dung môi/chất tẩy rửa được điều chế bằng cách bổ sung 0,3% (theo thể tích) TNBP, 1,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,3% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), khuấy ở nhiệt độ  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 30 phút. Sau đó, dung dịch dung môi/chất tẩy rửa được xử lý trong ba điều kiện nhiệt độ khác nhau:  $22,5^{\circ}\text{C}$  với thời gian làm ấm khoảng 8 giờ;  $22,5^{\circ}\text{C}$  với thời gian làm ấm khoảng 2 giờ; và  $4^{\circ}\text{C}$  không có bước làm ấm hoặc bước gia nhiệt sơ bộ bất kỳ. Vào cuối khoảng thời gian ủ, các mẫu được lọc qua bộ lọc 0,2  $\mu\text{m}$  và hoạt tính của Yếu tố VIII được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cơ chất sinh màu trước và sau khi lọc.

Để thực hiện thử nghiệm sinh màu của hoạt tính của Yếu tố VIII, lượng nhỏ dung dịch đã được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa được pha loãng sơ bộ trong đệm pha loãng mẫu (Tris 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, NaCl 225 mM, polysorbat 80 sorbitan monooleat 0,1% (TWEEN® 80), pH  $6,7 \pm 0,2$ ) đến khoảng 25 IU/mL và sau đó được pha loãng tiếp đến 1 IU/mL trong huyết tương đã được làm nghèo Yếu tố VIII. Sau đó, 100  $\mu\text{L}$  mẫu đã được pha loãng sơ bộ được trộn với  $\text{CaCl}_2$  0,03 M, phospholipit 0,06 mM, 100  $\mu\text{L}$  Yếu tố Ixa 0,3  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{L}$  Yếu tố X 1  $\mu\text{M}$ , và 500  $\mu\text{L}$  cơ chất sinh màu  $\text{CH}_3\text{OCO-D-xyclohexylglyxyl-glyxyl-arginyl-p-nitroanilit}$  3,4  $\mu\text{M}$  để đảm bảo rằng yếu tố

VIII là thành phần giới hạn tốc độ của phản ứng. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 90 giây và sau đó, các số đọc quang phổ kế thực hiện ở 405 nm được lấy để xác định tốc độ của sự thủy phân cơ chất sinh màu và sự giải phóng của p-nitro-anilin.

Hoạt tính của Yếu tố VIII đã được xác định là tương đương trước và sau bước lọc 0,2  $\mu\text{m}$ . Kết quả này xác nhận rằng nhiệt độ thấp hơn không có ảnh hưởng bất lợi đến việc thu hồi Yếu tố VIII sau bước lọc 0,2  $\mu\text{m}$ , trong sự vắng mặt của các thành phần S/D.

| Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của Yếu tố VIII |                                                                   |                                                                 |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Điều kiện nhiệt độ (n=3)                                     | Hoạt tính của Yếu tố VIII trước khi lọc 0,2 $\mu\text{m}$ (UI/mL) | Hoạt tính của Yếu tố VIII sau khi lọc 0,2 $\mu\text{m}$ (UI/mL) |
| 22,5°C / 2H                                                  | 2960 $\pm$ 199                                                    | 3003 $\pm$ 369                                                  |
| 22,5°C / 8H                                                  | 2965 $\pm$ 303                                                    | 3069 $\pm$ 201                                                  |
| 4°C / 2H                                                     | 2806 $\pm$ 314                                                    | 2787 $\pm$ 198                                                  |

Các kết quả cho thấy rằng việc thu hồi Yếu tố VIII là khoảng 100% đối với tất cả các điều kiện nhiệt độ đã được đánh giá và hoạt tính protein là tương đương trước và sau bước lọc bất kể sự có mặt của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa (Bảng 5).

#### Ví dụ 4

Làm bất hoạt virus có vỏ lipid trong chất lỏng chứa protein có hoạt tính

Ví dụ này minh họa các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này để làm bất hoạt virus có vỏ lipid trong chất lỏng chứa protein có hoạt tính.

Để đánh giá hiệu quả chung của phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid được bộc lộ trong bản mô tả này đến hoạt tính protein được thu hồi, 50 mL dung dịch dung môi/chất tẩy rửa được điều chế bằng cách bổ sung 0,3% (theo thể tích) TNBP, 1,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và 0,3% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80), khuấy ở nhiệt độ 4  $\pm$  2°C trong thời gian 30 phút. Sau đó, dung dịch dung

môi/chất tẩy rửa được xử lý trong ba điều kiện nhiệt độ khác nhau: 22,5°C với thời gian làm ấm khoảng 8 giờ; 22,5°C với thời gian làm ấm khoảng 2 giờ; và 4°C không có bước làm ấm hoặc bước gia nhiệt sơ bộ bất kỳ. Vào cuối khoảng thời gian ủ, các mẫu được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký cột trao đổi ion và hoạt tính của Yếu tố VIII được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cơ chất sinh màu trước và sau khi lọc về cơ bản như được mô tả trong Ví dụ 3.

Các kết quả cho thấy rằng hiệu suất thu hồi trung bình đối với Yếu tố VIII là 83,02% khi tiến hành xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa ở nhiệt độ 4°C trong hai giờ; 82,83% khi tiến hành xử lý ở nhiệt độ 22,5°C trong hai giờ; và 80,93% khi tiến hành xử lý ở nhiệt độ 22,5°C trong tám giờ (Bảng 6).

Các kết quả này xác nhận rằng việc xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa được tiến hành ở nhiệt độ 4°C trong hai giờ không ảnh hưởng đáng kể đến việc thu hồi Yếu tố VIII có hoạt tính. Ngoài ra, hoạt tính đặc hiệu của Yếu tố VIII dường như được giữ tốt hơn khi tiến hành ủ ở nhiệt độ 4°C thay vì 22,5°C. Khoảng 6% hoạt tính đặc hiệu bị mất khi tiến hành xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa ở nhiệt độ 22,5°C, trong khi đó chỉ quan sát thấy sự giảm không đáng kể hoạt tính đặc hiệu khoảng 1% ở Yếu tố VIII khi tiến hành xử lý ở nhiệt độ 4°C. Do đó, quan sát thấy sự tăng bất ngờ hiệu quả thu hồi trung bình yếu tố VIII khi tiến hành xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa được tiến hành ở nhiệt độ thấp.

| Bảng 6. Hoạt tính và hiệu suất của Yếu tố VIII sử dụng phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid.                                                                                                                                                                 |            |                                                      |               |               |          |             |                                                      |               |          |             |            |                       |       |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------------|---------------|---------------|----------|-------------|------------------------------------------------------|---------------|----------|-------------|------------|-----------------------|-------|-------|
| Điều kiện nhiệt độ (n=3)                                                                                                                                                                                                                                       | Mê         | Chất lỏng trước khi xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa |               |               |          |             | Bề rửa giải sau khi xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa |               |          |             |            | Hiệu suất thu hồi (%) |       |       |
|                                                                                                                                                                                                                                                                |            | TSP (µg/mL)                                          | FVIII (UI/mL) | SpAct (UI/mg) | Vol (mL) | TSP (µg/mL) | FVIII (UI)                                           | SpAct (UI/mg) | Vol (mL) | TSP (µg/mL) | FVIII (UI) | SpAct (UI/mg)         |       |       |
| 22,5°C / 2H                                                                                                                                                                                                                                                    | 1          | 484                                                  | 2959          | 6121          | 24,92    | 12061       | 73738                                                | 6114          | 8,26     | 1226        | 8475       | 6750                  | 6748  | 94,94 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | 2          | 473                                                  | 3307          | 6991          | 24,90    | 11778       | 82344                                                | 6992          | 7,67     | 1337        | 8308       | 6214                  | 6214  | 77,39 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | 3          | 469                                                  | 3077          | 6561          | 24,91    | 11683       | 766648                                               | 6561          | 7,67     | 1362        | 7613       | 5591                  | 5590  | 76,18 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | Trung bình |                                                      |               |               |          | 11841       | 77577                                                | 6555          |          |             |            | 10359                 | 64039 | 82,83 |
| 22,5°C / 8H                                                                                                                                                                                                                                                    | 1          | 491                                                  | 3096          | 6305          | 24,90    | 12226       | 77090                                                | 6305          | 8,26     | 1242        | 7975       | 6421                  | 65874 | 85,45 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | 2          | 479                                                  | 3162          | 6608          | 24,91    | 11932       | 78765                                                | 6601          | 8,26     | 1265        | 8772       | 6937                  | 72457 | 91,99 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | 3          | 470                                                  | 3007          | 6398          | 24,92    | 11712       | 74934                                                | 6398          | 7,67     | 1335        | 6385       | 4785                  | 48973 | 65,35 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | Trung bình |                                                      |               |               |          | 11957       | 76930                                                | 6435          |          |             |            | 10316                 | 62434 | 80,93 |
| 4°C / 2H                                                                                                                                                                                                                                                       | 1          | 491                                                  | 2904          | 5920          | 24,90    | 12226       | 72310                                                | 5914          | 8,26     | 1218        | 8085       | 6640                  | 66782 | 92,36 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | 2          | 475                                                  | 3082          | 6495          | 24,89    | 11823       | 76711                                                | 6488          | 8,26     | 1183        | 7808       | 6603                  | 64494 | 84,07 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | 3          | 467                                                  | 3027          | 6483          | 24,87    | 11614       | 75281                                                | 6482          | 7,67     | 1309        | 7129       | 5448                  | 54679 | 72,63 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                | Trung bình |                                                      |               |               |          | 11888       | 74767                                                | 6295          |          |             |            | 9957                  | 61985 | 83,02 |
| TSP: Protein hòa tan tổng cộng được xác định bằng cách sử dụng quang phổ kế UV-VIS và độ hấp thụ ở 285 nm và 350 nm.<br>FVIII, Yếu tố VIII<br>SpAct: Hoạt tính đặc hiệu, Hoạt tính của Yếu tố VIII cho mỗi mg của protein hòa tan tổng cộng.<br>Vol: thể tích. |            |                                                      |               |               |          |             |                                                      |               |          |             |            |                       |       |       |

## Ví dụ 5

## Đánh giá sự kết tụ protein

Ví dụ này minh họa rằng các phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid được bộc lộ trong bản mô tả này ngăn ngừa sự kết tụ protein.

Để đánh giá ảnh hưởng của bước làm bất hoạt virus ở nhiệt độ thấp đến sự tạo thành khối kết tụ protein, tiến hành xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa trong ba điều kiện nhiệt độ khác nhau: 22,5°C với thời gian làm ấm khoảng 8 giờ; 22,5°C với thời gian làm ấm khoảng 2 giờ; và 4°C không có bước làm ấm hoặc bước gia nhiệt sơ bộ bất kỳ. Ở tất cả các điều kiện, chất phản ứng dung môi/chất tẩy rửa được bổ sung khi đạt đến nhiệt độ đích. Sau khoảng thời gian ủ, được điều chỉnh ở 1 giờ đối với tất cả các điều kiện nhiệt độ, các thành phần dung môi/chất tẩy rửa được loại bỏ bằng sắc ký trao đổi ion và lượng kết tụ được xác định trong khối cuối cùng. Tất cả các điều kiện dung môi/chất tẩy rửa đều được lặp lại ba lần.

Việc xác định các khối kết tụ (được biểu thị bằng phần trăm) được tiến hành bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) trên hệ HPLC được trang bị cột Bio-Sep-SEC-S4000. Pha cố định chứa các nhóm ưa nước được liên kết với nền silic oxit mà thích hợp để phân tách protein có khối lượng phân tử nằm trong khoảng từ 15 đến 2000 kDa. Các mẫu lấy từ dung dịch đã được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa được pha loãng xuống 50 µg/mL và 11 µL được tiêm vào cột. Đệm rửa giải là Tris 20 mM, NaCl 250mM, CaCl<sub>2</sub> dihydrat 3 mM, polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) 0,05% (theo thể tích), etylen glycol 7,5% (theo thể tích), pH được điều chỉnh xuống 7,0 ± 0,2. Tiến hành phân tách trong đệm pha động đẳng dung ly. Việc phát hiện được tiến hành bằng cách sử dụng máy dò huỳnh quang ở bước sóng kích thích bằng 285 nm và bước sóng phát xạ bằng 335 nm. Đáp ứng là tỷ lệ thuận với lượng protein có mặt trong các đỉnh khác nhau của biểu

đồ sắc ký thu được. Tỷ lệ phần trăm của các khối kết tụ được tính toán dưới dạng tỷ số của phần diện tích đỉnh so với diện tích tổng cộng (Bảng 7).

| Bảng 7. Sự hình thành khối kết tụ |                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Điều kiện nhiệt độ<br>(n=3)       | Sự hình thành khối kết tụ trung bình<br>(tiêu chuẩn < 1%) |
| 22,5°C / 2H                       | 0,7 ± 0,13                                                |
| 22,5°C / 8H                       | 0,6 ± 0,07                                                |
| 4°C / 2H                          | Không phát hiện được                                      |

Ngạc nhiên là, các thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 4°C dẫn đến lượng kết tụ không phát hiện được (< 0,25%) trong nước giải hấp của khối cuối cùng, trong khi đó trong các quy trình được tiến hành ở nhiệt độ 22,5°C, phát hiện thấy sự hình thành khối kết tụ lớn hơn nhiều (0,7% và 0,6%). Sự giảm khối kết tụ trong khối cuối cùng là đáng kể vì các khối kết tụ thường được nhận thấy là tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại các dạng monome của protein.

#### Ví dụ 6

Làm bất hoạt virus có vỏ lipid trong chất lỏng chứa protein có hoạt tính

Ví dụ này minh họa các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này để làm bất hoạt virus có vỏ lipid trong chất lỏng chứa protein có hoạt tính.

Yếu tố VIII tái tổ hợp, được tạo ra bởi dòng tế bào CHO mà tiết protein vào trong môi trường nuôi cấy tế bào được sinh trưởng trong thiết bị phản ứng sinh học dung tích 2500 lít và được thu hoạch bằng cách làm lạnh xuống nhiệt độ 10°C, thu gom môi trường, và ly tâm nó để loại bỏ các mảnh vụn tế bào. Trong phòng lạnh được giữ ở hoặc dưới 10°C, dịch nổi bề mặt đã được thu hoạch được pha loãng và được lọc qua bộ lọc 0,2 µm, và yếu tố VIII được bắt giữ bằng cách đi qua cột sắc ký ái lực miễn dịch chứa kháng thể đơn dòng của chuột nhất kháng α-Yếu tố VIII đã được giữ cố định và thu gom nước giải hấp. Yếu tố VIII được xử lý tiếp

bằng cách cho nước giải hấp sắc ký ái lực miễn dịch đi qua cột sắc ký trao đổi cation chứa nhóm được sulfonat hóa tích điện âm. Sau đó, khoảng 8 lít nước giải hấp đã được thu gom từ cột trao đổi này được làm lạnh xuống khoảng 4°C và được trộn trong khoảng 10 phút với dung dịch dung môi/chất tẩy rửa, được làm lạnh xuống cùng nhiệt độ, với lượng bằng 16,6 g dung dịch dung môi/chất tẩy rửa cho mỗi kg nước giải hấp của thiết bị trao đổi cation. Dung dịch dung môi/chất tẩy rửa chứa tri(n-butyl) phosphat (TNBP), polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100), và polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) với tỷ lệ bằng 18,3:66,3:20,2 khối lượng. Điều này ngang bằng với nồng độ cuối khoảng 0,3% (theo thể tích) tri(n-butyl)phosphat (TNBP), khoảng 1,0% (theo thể tích) polyoxyetylen octyl phenyl ete (TRITON® X-100) và khoảng 0,3% (theo thể tích) polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80). Sau khi trộn liên tục ở nhiệt độ khoảng 4°C trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút, nước giải hấp đã được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa sau đó được lọc qua bộ lọc 0,2 µm để loại bỏ mảnh vụn virus. Dung dịch được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa đã được lọc được pha loãng với đệm cân bằng sắc ký trao đổi anion và được xử lý tiếp bằng cách đi qua cột sắc ký trao đổi anion để loại bỏ các thành phần dung môi/chất tẩy rửa. Dung dịch được tinh chế cuối cùng chứa Yếu tố VIII được thu gom từ phân đoạn rửa giải sắc ký trao đổi anion. Sự có mặt của virus có vỏ lipid, hoạt tính của Yếu tố VIII, lượng kết tụ, và lượng vết của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa sau đó được xác định trong dung dịch được tinh chế cuối cùng chứa Yếu tố VIII.

Để thử nghiệm sự có mặt hoặc hoạt tính của virus có vỏ lipid còn sống trong dung dịch được tinh chế cuối cùng chứa Yếu tố VIII, thử nghiệm TCID<sub>50</sub> được thực hiện. Mẫu dung dịch được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa đã được lọc được rút ra và được pha loãng 1:00 hoặc 1:10 với môi trường nuôi cấy tế bào Vero. Các dung dịch pha loãng theo dãy 0,5 log<sub>10</sub> của các mẫu được điều chế trong môi trường nuôi cấy tế bào Vero và 100 µL mỗi dung dịch pha loãng được bổ

sung vào mỗi trong số 8 lỗ của cột đĩa vi chuẩn độ đã được gieo tế bào Vero. Các đĩa vi chuẩn độ được ủ trong thiết bị ủ đã được làm ẩm và được điều hòa CO<sub>2</sub> ở nhiệt độ  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 7 ngày. Sau khi ủ, các tế bào được kiểm tra bằng kính hiển vi về các dấu hiệu của sự lây nhiễm, như, ví dụ, các tế bào bị làm tan, các tế bào thể hiện tác động gây bệnh tế bào, hoặc các tiêu chuẩn bất kỳ khác biểu thị sự lây nhiễm virus. Từ mô hình của các lỗ dương tính (lây nhiễm virus) và âm tính (không có sự lây nhiễm virus), độ chuẩn của virus được tính toán theo phân bố *Poisson* và được biểu thị dưới dạng PFU/mL và log<sub>10</sub> [TCID<sub>50</sub>/mL]. Sự vắng mặt của các dấu hiệu dương tính của sự lây nhiễm trong các lỗ bất kỳ biểu thị rằng dung dịch đã được xử lý về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid.

Để thử nghiệm lượng hoạt tính của Yếu tố VIII có mặt trong dung dịch được tinh chế cuối cùng, thử nghiệm sinh màu của hoạt tính của Yếu tố VIII được thực hiện. Lượng nhỏ của dung dịch được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa đã được lọc được pha loãng sơ bộ trong đệm pha loãng mẫu (Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 225 mM, polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80) 0,1%, pH  $6,7 \pm 0,2$ ) đến khoảng 25 IU/mL và sau đó được pha loãng tiếp đến 1 IU/mL trong huyết tương đã được làm nghèo Yếu tố VIII. 100µL mẫu đã được pha loãng sơ bộ sau đó được trộn với CaCl<sub>2</sub> 0,03 M, phospholipid 0,06 mM, 100µL Yếu tố Ixa 0,3 µM, 100µL Yếu tố X 1µM, và 500µL cơ chất sinh màu CH<sub>3</sub>OCO-D-xyclohexylglyxyl-glyxyl-arginyl-*p*-nitroanilit 3,4 µM để đảm bảo rằng yếu tố VIII là thành phần giới hạn tốc độ của phản ứng. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 90 giây và sau đó các số đọc quang phổ kế được thực hiện ở 405 nm được lấy để xác định tốc độ thủy phân cơ chất sinh màu và sự giải phóng của *p*-nitro-anilin.

Để thử nghiệm lượng hoạt tính của Yếu tố VIII có mặt trong dung dịch được tinh chế cuối cùng, thử nghiệm đông tụ một giai đoạn của hoạt tính Yếu tố VIII được thực hiện. Lượng nhỏ của dung dịch được xử lý bằng dung môi/chất tẩy rửa đã được lọc được pha loãng sơ bộ trong đệm pha loãng mẫu (Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 225 mM, polysorbat 80 sorbitan monooleat (TWEEN® 80)

0,1%, pH  $6,7 \pm 0,2$ ) đến khoảng 25 IU/mL và sau đó được pha loãng tiếp đến 1 IU/mL trong huyết tương đã được làm nghèo Yếu tố VIII. 100 $\mu$ L mẫu đã được pha loãng sơ bộ sau đó được trộn với 100 $\mu$ L huyết tương thiếu hụt Yếu tố VIII. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 3 phút và 100 $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> 25 mM được bổ sung để bắt đầu quá trình đông tụ. Lượng Yếu tố VIII có mặt được xác định bằng cách so sánh giá trị thời gian đông cục APTT với đường cong chuẩn được tính toán nhờ thiết bị chạy chương trình tính toán mà tạo ra đồ thị lôgarit kép của thời gian đông cục so với nồng độ yếu tố VIII. Thiết bị phân tích sự đông tụ và các chất phản ứng thích hợp cho các thử nghiệm đông tụ được thiết kế để xác định các thông số về hoạt tính đông tụ trong khoảng sinh lý. Các kết quả cho thấy rằng hoạt tính đặc hiệu trung bình đối với Yếu tố VIII là khoảng 6120 UI/mg. Hoạt tính đặc hiệu trung bình này là cao hơn 5809 UI/mg, hoạt tính đặc hiệu trung bình đối với Yếu tố VIII được xử lý bằng cách sử dụng phương pháp bất hoạt virus mà ủ chất lỏng trong hỗn hợp dung môi hữu cơ/chất hoạt động bề mặt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến khoảng 25°C.

Để thử nghiệm lượng của các khối kết tụ protein có mặt trong dung dịch được tinh chế cuối cùng chứa Yếu tố VIII, các thử nghiệm sắc ký loại trừ theo kích cỡ và sự hấp thụ UV được tiến hành về cơ bản như được mô tả trong Ví dụ 5.

Để thử nghiệm lượng vết của các thành phần dung môi/chất tẩy rửa có mặt trong dung dịch được tinh chế cuối cùng chứa Yếu tố VIII, các thử nghiệm RP-HPLC được tiến hành về cơ bản như được mô tả trong Ví dụ 3.

Cuối cùng, cần phải hiểu rằng mặc dù các khía cạnh của sáng chế được nhấn mạnh bằng cách đề cập đến các phương án cụ thể, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng hiểu rằng các phương án đã được bộc lộ này chỉ nhằm mục đích minh họa các nguyên lý của đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả này. Do đó, cần phải hiểu rằng đối tượng đã được bộc lộ không bị giới hạn ở hệ phương pháp, protocol, và/hoặc chất phản ứng, v.v., cụ thể được mô tả

trong bản mô tả này. Như vậy, các cải biến hoặc thay đổi khác nhau đối với hoặc cấu hình thay thế của đối tượng đã được bộc lộ có thể được thực hiện theo phần bộc lộ trong bản mô tả này mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Cuối cùng, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ cho mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định để làm giới hạn phạm vi của sáng chế như được xác định chỉ bởi các điểm yêu cầu bảo hộ. Do đó, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án như đã được thể hiện và mô tả cụ thể.

Một số phương án nhất định của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, kể cả phương án tốt nhất đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Tất nhiên, các cải biến đối với các phương án đã được mô tả này sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả nêu trên. Các tác giả sáng chế cho rằng người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ sử dụng các cải biến này khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định rằng sáng chế sẽ được thực hiện theo cách khác với những gì đã được mô tả cụ thể trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế bao gồm tất cả các cải biến và phương án tương đương của đối tượng được trích dẫn trong các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm theo đây như được cho phép bởi pháp luật. Ngoài ra, sự kết hợp bất kỳ của các phương án đã được mô tả ở trên trong tất cả các cải biến có thể có của nó được bao hàm bởi sáng chế trừ khi có quy định khác hoặc được nêu khác đi.

Việc nhóm các phương án, yếu tố, hoặc bước thay thế của sáng chế không được hiểu là làm giới hạn. Mỗi thành phần nhóm có thể được đề cập và được yêu cầu bảo hộ một cách riêng rẽ hoặc trong sự kết hợp bất kỳ với các thành phần nhóm khác được bộc lộ trong bản mô tả này. Được đoán trước rằng một hoặc nhiều thành phần của nhóm có thể được bao gồm trong nhóm, hoặc được loại bỏ khỏi nhóm vì lý do thuận tiện và/hoặc khả năng cấp bằng. Khi xảy ra bất kỳ sự bao hàm hoặc loại bỏ như vậy, bản mô tả được cho là chứa nhóm như đã được biến đổi do đó đáp ứng sự mô tả bằng văn bản của tất cả các nhóm Markush được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các con số biểu hiện đặc điểm, hạng mục, số lượng, thông số, tính chất, điều kiện, và v.v. được sử dụng trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ được hiểu là được cải biến trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ “khoảng.” Trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” có nghĩa là đặc điểm, hạng mục, số lượng, thông số, tính chất, hoặc điều kiện được xác định như vậy bao gồm khoảng cộng với hoặc trừ đi mười phần trăm ở trên và ở dưới giá trị của đặc điểm, hạng mục, số lượng, thông số, tính chất, hoặc điều kiện đã nêu. Do đó, trừ khi có chỉ dẫn khác, các thông số bằng số nêu trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm là dạng xấp xỉ mà có thể thay đổi. Ở mức tối thiểu, và không cố gắng giới hạn việc áp dụng học thuyết tương đương ở phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ, mỗi dấu hiệu bằng số phải ít nhất được hiểu dưới con số của các số quan trọng đã được báo cáo và bằng cách áp dụng các kỹ thuật làm tròn thông thường. Mặc dù các khoảng và giá trị số đưa ra phạm vi rộng của sáng chế là dạng xấp xỉ, các khoảng và giá trị số được nêu trong các ví dụ cụ thể được báo cáo càng chính xác càng tốt. Tuy nhiên, khoảng hoặc giá trị số bất kỳ, vốn chứa các sai số nhất định tất yếu tạo ra từ độ sai lệch chuẩn được phát hiện thấy trong các phép đo thử nghiệm tương ứng của chúng. Việc trích dẫn khoảng giá trị số trong bản mô tả này chỉ được dự định là phương pháp tốc ký để đề cập riêng rẽ đến mỗi giá trị số riêng biệt nằm trong khoảng này. Trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này, mỗi giá trị riêng rẽ của khoảng số được đưa vào sáng chế như thể giá trị này được trích dẫn một cách riêng rẽ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ số ít “một” và các ám chỉ tương tự được sử dụng trong phần mô tả sáng chế (đặc biệt là trong phần mô tả các yêu cầu bảo hộ sau đây) được hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc được quy định khác đi. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi có chỉ dẫn khác trong bản mô tả này hoặc được quy định khác đi. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn từ nêu làm ví dụ (ví dụ, “như”) được đưa ra trong bản mô tả này chỉ

được dự định để làm rõ hơn sáng chế và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Không có ngôn từ nào trong bản mô tả được hiểu là biểu thị yếu tố không được yêu cầu bảo hộ bất kỳ cần thiết để thực hành sáng chế.

Các phương án cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được giới hạn thêm trong các điểm yêu cầu bảo hộ bằng cách sử dụng ngôn từ gồm hoặc về cơ bản gồm. Khi được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ, cho dù như đã được nộp hoặc được bổ sung đối với mỗi lần sửa đổi, thuật ngữ chuyển tiếp “gồm” loại trừ yếu tố, bước, hoặc thành phần bất kỳ không được nêu rõ trong các điểm yêu cầu bảo hộ. Thuật ngữ chuyển tiếp “về cơ bản gồm” giới hạn phạm vi của yêu cầu bảo hộ ở các vật liệu hoặc bước đã được nêu rõ và các vật liệu hoặc các bước đã được nêu rõ này không ảnh hưởng thiết yếu đến (các) đặc điểm cơ bản và mới. Các phương án của sáng chế được yêu cầu bảo hộ như vậy vốn được mô tả hoặc được mô tả rõ ràng và được cho phép trong bản mô tả này.

Tất cả các tài liệu patent, công bố patent, và các tài liệu công bố khác được viện dẫn và nêu trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn nhằm mục đích mô tả và bộc lộ, ví dụ, các chế phẩm và hệ phương pháp được mô tả trong các tài liệu công bố này mà có thể được sử dụng liên quan đến sáng chế. Các tài liệu công bố này được đưa ra chỉ vì chúng được bộc lộ trước ngày nộp đơn của đơn sáng chế này. Về điều này, không có gì được hiểu là sự thừa nhận rằng các tác giả sáng chế không được quyền đề lùi ngày tháng phần bộc lộ như vậy vì sáng chế trước hoặc vì lý do bất kỳ khác. Tất cả các tuyên bố về ngày tháng hoặc mô tả về nội dung của các tài liệu này được dựa trên thông tin có sẵn đối với người nộp đơn và không phải là thừa nhận bất kỳ về tính đúng đắn của các ngày tháng hoặc nội dung của các tài liệu này.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bất hoạt virus có vỏ lipid, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cung cấp chất lỏng chứa yếu tố VIII có hoạt tính;

(b) trộn tri(n-butyl) phosphat, polyoxyetylen octyl phenyl và polysorbat 80 sorbitan với chất lỏng này, bằng cách đó tạo ra hỗn hợp, trong đó nồng độ cuối của tri(n-butyl) phosphat nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích), nồng độ cuối của polyoxyetylen octyl phenyl nằm trong khoảng từ khoảng 0,5% (theo thể tích) đến khoảng 10,0% (theo thể tích), và nồng độ cuối của polysorbat 80 sorbitan nằm trong khoảng từ khoảng 0,1% (theo thể tích) đến khoảng 5,0% (theo thể tích); và

(c) ủ hỗn hợp thu được từ bước (b) trong khoảng thời gian không nhiều hơn khoảng 120 phút, trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến khoảng 8°C, trong đó hỗn hợp sau khi ủ về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống, và trong đó yếu tố VIII sau khi ủ có hoạt tính bằng ít nhất 25%, ít nhất 50% hoặc ít nhất 75% hoạt tính được cung cấp trong bước (a).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ của tri(n-butyl) phosphat là khoảng 0,3% (theo thể tích), nồng độ của polyoxyetylen octyl phenyl là khoảng 1,0% (theo thể tích), và nồng độ của polysorbat 80 sorbitan là khoảng 0,3% (theo thể tích).

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất lỏng là dịch tan tế bào, dịch tế bào nổi bề mặt, dịch rửa giải từ bước tinh chế trước đó hoặc chất lỏng sinh học.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó yếu tố VIII là yếu tố VIII tái tổ hợp.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm chất hoạt động bề mặt cation bao gồm amin bậc một phụ thuộc độ pH và/hoặc amin bậc hai phụ thuộc độ pH, trong đó amin bậc một trở nên tích điện dương ở độ pH < 10 và amin bậc hai trở nên tích điện ở độ pH < 4.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó trong bước (c) hỗn hợp được ủ trong khoảng từ khoảng 10 phút đến khoảng 90 phút hoặc từ khoảng 30 phút đến khoảng 60 phút.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó cả hai bước (b) và (c) đều được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 2°C đến khoảng 4°C.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó hỗn hợp sau khi ủ: chứa ID<sub>50</sub> ít hơn ít nhất 100 lần đối với virus có vỏ lipid còn sống so với trước khi ủ; chứa ít hơn  $1 \times 10^1$  PFU/mL virus có vỏ lipid còn sống; về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid còn sống; và/hoặc hoàn toàn không chứa virus có vỏ lipid còn sống.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó virus có vỏ lipid là virus ADN, virus ARN, virus phiên mã ngược, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus sindbis, virus gây bệnh mụn rộp, virus gây bệnh giả dại, virus sendai, virus gây viêm miệng, virus West Nile, virus gây bệnh tiêu chảy do virus ở bò, virus corona, virus gây viêm khớp ở ngựa, virus gây hội chứng hô hấp cấp nghiêm trọng, virus gây bệnh bạch cầu ở chuột Moloney, virus gây bệnh đậu mùa, virus herpesviridae, virus poxviridae, virus hepadnaviridae; virus flaviviridae, virus togaviridae, virus coronaviridae, virus deltavirus, virus orthomyxoviridae, virus paramyxoviridae, virus rhabdoviridae, virus bunyaviridae, virus filoviridae, virus retroviridae và/hoặc virus hepadnaviridae.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm thêm một hoặc nhiều bước sau bước (c) bao gồm: loại bỏ tri (n-butyl) phosphat ra khỏi hỗn hợp; loại bỏ polyoxyetylen octyl phenyl và polysorbat 80 sorbitan ra khỏi hỗn hợp; và/hoặc loại bỏ virus không còn sống ra khỏi hỗn hợp.

11. Yếu tố VIII tái tổ hợp về cơ bản không chứa virus có vỏ lipid thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.