



(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)



1-0026036

(51)⁷ C07K 1/18; C07K 14/765

(13) B

(21) 1-2015-02227

(22) 09/05/2013

(86) PCT/CN2013/075405 09/05/2013

(87) WO 2014/094406 A1 26/06/2014

(30) 201210559390.7 21/12/2012 CN

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/01/2016 334A

(73) WUHAN HEALTHGEN BIOTECHNOLOGY CORP (CN)

#666 Gaoxin Avenue, East Lake High-Tech Development Zone, Wuhan, Hubei
430079 (CN)

(72) YANG, Daichang (CN); SHI, Bo (CN); SHI, Qianni (CN); OU, Jiquan (CN); LIU,
Jingru (CN).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ ĐỀ TÁCH VÀ TINH CHẾ ALBUMIN HUYẾT THANH
TÁI TỔ HỢP Ở NGƯỜI

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sắc ký để tách và tinh chế albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao, bao gồm các bước: tiến hành sắc ký trao đổi ion trên albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người, và bổ sung rượu vào dung dịch đệm để loại bỏ nội độc tố, để thu được sản phẩm sơ cấp I; trong các điều kiện gần, tiến hành sắc ký trao đổi nhựa composit anion/ky nước trên sản phẩm sơ cấp I để thu được sản phẩm trung gian II; tiến hành sắc ký ky nước trên sản phẩm trung gian II để thu được sản phẩm đích, albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao được tinh chế. Độ tinh khiết của albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người thu được bằng cách tách hoặc tinh chế bằng phương pháp sắc ký theo sáng chế là lớn hơn 99,9999%, và hàm lượng nội độc tố đáp ứng các tiêu chuẩn được quy định theo được điển Trung Quốc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực công nghệ sinh học, và cụ thể đề cập đến phương pháp tách và tinh chế albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao (OsrHSA- recombinant human serum albumin) cho các ứng dụng lâm sàng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Albumin huyết thanh ở người (HAS - Human serum albumin) là protein chuỗi đơn không được glycosyl hóa gồm có 585 axit amin, có trọng lượng phân tử là 66,5 kD và điểm đẳng điện nằm giữa 4,7 đến 4,9. Đây là một loại protein có nhiều nhất trong huyết tương máu người, chiếm khoảng 60% tổng số protein huyết tương. Có khoảng 40 g HAS trong mỗi lít máu người. Bên cạnh có mặt trong huyết tương, HAS cũng được tìm thấy trong các mô và các dịch tiết cơ thể, da và các khoang bạch huyết. Trong điều kiện sinh lý bình thường của con người, HSA có tác dụng duy trì áp lực thẩm thấu keo trong huyết tương, bổ dưỡng, đẩy nhanh quá trình chữa lành các tổn thương, như một chất vận chuyển, nó tham gia vào sự vận chuyển của nhiều phân tử sinh học kỵ nước như các kích thích tố, các hoạt chất sinh học và các loại thuốc trong máu. Do đó, HSA là protein y học quan trọng mà chủ yếu được sử dụng về mặt lâm sàng để điều trị chứng giảm protein huyết gây ra do mất máu, bỏng, vết bỏng, phẫu thuật tạo hình và tổn thương não, cũng như để điều trị bệnh xơ gan, chứng thận ứ nước v.v.

Hiện nay, HSA dành cho sử dụng lâm sàng chủ yếu được điều chế bằng cách chiết xuất và tách từ huyết tương người. Tuy nhiên, phương pháp tiếp cận điều chế này có những nhược điểm sau đây: một mặt, nguồn huyết tương là không đủ, tức là nguồn cung cấp máu bị hạn chế không thể đáp ứng các nhu cầu để sản xuất HSA và các chế phẩm liên quan của nó; mặt khác, bản thân máu có thể tiềm tàng yếu tố nguy cơ, ví dụ, nó có thể chứa các mầm bệnh truyền nhiễm nguy hiểm như virus viêm gan, virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV) và như vậy v.v., mà các nguyên nhân liên quan lớn về ứng dụng của HAS được chiết xuất từ huyết tương.

Với sự phát triển của các kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp ADN hiện đại, các nhà nghiên cứu có sự quan tâm sâu sắc trong sản xuất và ứng dụng albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người (OsrHSA). Cho đến nay, người ta đã cố gắng sử dụng các hệ thống biểu hiện khác nhau để sản xuất hàng loạt OsrHSA. Ví dụ, các sinh vật chưa có nhân điển hình như *E. coli* (Latta, M. et al., Bio/Technology, 5:1309-1314,(1987)), *bacillus subtilis* (Saunders, C. W. et al, J. Bacteriol. 169: 2917-2925, (1987)), các sinh vật nhân chuẩn như các loại nấm men (WO 00/44772, EP0683233A2, US 5612196) và nuôi cấy các tế bào động vật đã được sử dụng để sản xuất OsrHSA. Tuy nhiên, các phương pháp tiếp cận này không thích hợp cho sản xuất công nghiệp do mức độ biểu hiện thấp hoặc chi phí sản xuất cao.

Đơn sáng chế Trung Quốc số 201010606635.8 của các tác giả sáng chế đã bộc lộ phương pháp chiết xuất OsrHSA từ gạo. Dựa trên phương pháp này, sáng chế còn nghiên cứu quy trình loại bỏ nội độc tố khỏi OsrHSA và cải thiện độ tinh khiết của protein >99,9999%, nhờ đó thu được giải pháp kỹ thuật mới lạ này của sáng chế. Đơn số 201010606635.8 được kết hợp cụ thể ở đây và được sử dụng cho tất cả mục

đích thích hợp với sự kết hợp bằng cách tham chiếu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sắc ký để tách và tinh chế albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao từ dịch chiết protein thô của các hạt gạo biến đổi gen. Độ tinh khiết của albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người thu được có thể đạt 99,9999%. Hàm lượng nội độc tố đáp ứng các tiêu chuẩn của albumin huyết thanh ở người được quy định trong dược điển Trung Quốc.

Giải pháp kỹ thuật theo sáng chế là:

Phương pháp sắc ký để tách và tinh chế albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao (OsrHSA), bao gồm các bước sau đây:

- 1) đưa dịch chiết thô của albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người vào sắc ký trao đổi cation, bổ sung rượu vào dung dịch đệm để loại bỏ nội độc tố, thu được sản phẩm sơ cấp I;
- 2) đưa sản phẩm sơ cấp I vào sắc ký trao đổi anion, thu được sản phẩm thứ cấp II;
- 3) đưa sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký tương tác kỵ nước, để thu được sản phẩm đích, albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao.

Cụ thể, sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên nhựa composit cation/kỵ nước được chọn từ Capto-MMC hoặc Bestarose Diamond MMC. Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên nhựa composit anion/kỵ nước được chọn từ Capto-Adhere hoặc Bestarose Diamond MMA. Sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện trên nhựa được chọn từ Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Phenyl Bestarose HP hoặc Phenyl Bestarose FF.

Cụ thể, rượu theo phương pháp của sáng chế được chọn từ nhóm gồm có etanol và rượu isopropyl.

Cụ thể, dung dịch đệm theo phương pháp của sáng chế bao gồm dung dịch đệm rửa, dung dịch đệm cân bằng I và dung dịch đệm cân bằng II; trong đó dung dịch đệm rửa chứa từ 10 đến 20% rượu theo thể tích, dung dịch đệm cân bằng I chứa từ 0 đến 10% rượu theo thể tích, dung dịch đệm cân bằng II chứa từ 5 đến 15% rượu theo thể tích. Rượu nói trên được chọn từ nhóm gồm có các rượu đơn chức và các rượu hai chức. Cụ thể hơn, rượu nói trên được chọn là etanol hoặc rượu isopropyl.

Tốt hơn là, dung dịch đệm rửa bao gồm 15% etanol khan, và dung dịch đệm cân bằng II chứa 10% etanol khan. Tốt hơn nữa là, dung dịch đệm rửa bao gồm natri axetat khan 2 g/L, 15% etanol khan; độ dẫn điện được điều chỉnh bằng NaCl đến 83 mS/cm, và độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,0 bằng axit axetic. Dung dịch đệm cân bằng I bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 15 g/L, độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,8 bằng axit axetic. Dung dịch đệm cân bằng II bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 15 g/L, 10% etanol khan, độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,8 bằng axit axetic.

Ngoài ra, tốt hơn là, dung dịch đệm rửa chứa từ 10 đến 16% rượu isopropyl theo thể tích; dung dịch đệm cân bằng II chứa từ 4 đến 11% rượu isopropyl theo thể tích. Tốt hơn nữa là, dung dịch đệm rửa bao gồm natri axetat khan 2 g/L, từ 15 đến 16% rượu isopropyl; độ dẫn điện được điều chỉnh với NaCl nằm trong khoảng từ 82 đến 89 mS/cm, độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,8 đến 4,9 bằng axit axetic. Dung dịch đệm cân bằng I bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 11g/L, độ pH được điều chỉnh đến 4,5 bằng axit axetic. Dung dịch đệm cân bằng II bao gồm:

natri axetat khan 2 g/L, NaCl 15g/L, từ 10 đến 11% rượu isopropyl, độ pH được điều chỉnh đến 4,5 bằng axit axetic.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hiệu suất tinh chế và khả năng nạp mẫu của sắc ký Capto-MMC trong các điều kiện khác nhau;

trong đó, M: chỉ thị phân tử, L: mẫu chiết, M1: nhóm đối chứng, M2: nhóm thử nghiệm 1, M3: nhóm thử nghiệm 2; FT: phân đoạn qua dòng chảy của mẫu được nạp; M3FT: phân đoạn qua dòng chảy của nhóm thử nghiệm M3, 600, 660 và 730 tương ứng với phân đoạn qua dòng chảy mẫu được nạp lần lượt là 600mL, 660mL và 730mL; rửa: rửa phân đoạn tạp chất chứa OsrHSA; Rửa giải: rửa giải phân đoạn chứa OsrHSA.

Fig.2 thể hiện sự so sánh độ tinh khiết của việc tinh chế sơ cấp được thực hiện trên Capto MMC và Bestarose Diamond MMC;

trong đó, GE-MMC: Capto-MMC; Best-MMC: Bestarose Diamond MMC; Elu: rửa giải phân đoạn từ việc tinh chế sơ cấp được thực hiện trên hai loại nhựa; M: chỉ thị phân tử; FT: phân đoạn qua dòng chảy mẫu được nạp; rửa: rửa phân đoạn tạp chất chứa OsrHSA; Elu: Rửa giải phân đoạn chứa OsrHSA; S: mẫu chiết; CIP1: Rửa giải phân đoạn tái sinh nhựa 1; CIP2: Rửa giải phân đoạn tái sinh nhựa 2.

Fig.3 thể hiện sự so sánh hiệu suất tinh chế của sắc ký UNO Sphere S có bổ sung hoặc không bổ sung rượu;

trong đó, CK: nhóm đối chứng; UE: nhóm thử nghiệm (10% etanol được bổ sung trong mẫu và dung dịch đệm cân bằng); M: chỉ thị phân tử; nạp: mẫu; FT: phân đoạn qua dòng chảy của mẫu được nạp; Rửa giải: Phân đoạn rửa giải được thu thập

chứa protein đích trong hai điều kiện; CIP: tái sinh nhựa.

Fig.4 thể hiện sự so sánh SDS-PAGE của việc tinh chế thứ cấp được thực hiện trên Capto-Adhere và Bestarose Diamond MMA trong các điều kiện qua dòng chảy;

trong đó, M: chỉ thị phân tử; MMC: mẫu; FT: phân đoạn qua dòng chảy chứa OsrHSA, CIP: tái sinh nhựa.

Fig.5 thể hiện sự so sánh việc tinh chế thứ cấp được thực hiện trên Capto-Adhere và Bestarose Diamond MMA trong các điều kiện gắn;

trong đó M: chỉ thị phân tử; L: mẫu; FT: phân đoạn qua dòng chảy chứa OsrHSA; Elu: phân đoạn rửa giải chứa OsrHSA; C: tái sinh nhựa.

Fig.6 thể hiện sự so sánh sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện trên Phenyl Sepharose HP và Phenyl Bestarose HP ở lần tinh chế cuối;

trong đó, M: chỉ thị phân tử; Ad: mẫu được nạp; FT: phân đoạn qua dòng chảy chứa OsrHSA; CIP: tái sinh nhựa.

Fig.7 thể hiện hình ảnh phát hiện tạp chất trước và sau tinh chế protein trong các hạt gạo;

trong đó, Bên trái: so sánh hình ảnh SDS-PAGE có phát hiện tạp chất trước và sau tinh chế albumin huyết thanh ở người trong các hạt gạo; Bên phải: hình ảnh phát hiện lai hóa Western Blotting với đầy đủ kháng thể tạp chất của các hạt gạo trước và sau tinh chế albumin huyết thanh ở người trong các hạt gạo; M: chỉ thị phân tử.

Fig.8 thể hiện hình ảnh SDS-PAGE của OsrHSA được tinh chế theo một ví dụ sáng chế;

trong đó, A: sắc ký Capto-MMC; B: sắc ký Capto-Adhere; C: sắc ký Phenyl HP; L: mẫu được nạp; FT: phân đoạn qua dòng chảy; W: phân đoạn rửa tạp chất; Elu: phân đoạn rửa giải; C: CIP của nhựa.

Fig.9 thể hiện hình ảnh SDS-PAGE (Bên trái) và tương ứng với hình ảnh Western Blot (Bên phải) của OsrHSA được tinh chế theo ví dụ khác của sáng chế;

trong đó, A: sắc ký Capto-MMC; B: sắc ký Capto-Adhere; C: sắc ký Phenyl HP; M: chỉ thị phân tử; L: mẫu được nạp; FT: phân đoạn qua dòng chảy; W: phân đoạn rửa tạp chất; E: phân đoạn rửa giải; C: CIP của nhựa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các đặc trưng và thuận lợi của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới dạng các ví dụ kết hợp với các hình vẽ kèm theo. Các ví dụ được đề xuất chỉ minh họa sáng chế, nhưng không nhằm giới hạn các nội dung khác được bộc lộ bởi các sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Trừ khi có quy định khác, các nguyên liệu và thuốc thử được sử dụng trong các ví dụ sau đây là có sẵn trên thị trường thông thường.

Ví dụ 1: Điều chế dịch chiết OsrHSA

Gạo biến đổi gen chứa OsrHSA được điều chế theo phương pháp trong đơn sáng chế Trung Quốc số 200510019084.4 và OsrHSA được chiết xuất từ các hạt gạo biến đổi gen trong đơn sáng chế Trung Quốc số 201010606635.8 để thu được toàn bộ dịch chiết OsrHSA.

Ví dụ 2: Chọn các điều kiện cho sắc ký trao đổi cation là lần tinh chế sơ cấp

Phương pháp: tham khảo phương pháp trong Đơn sáng chế Trung Quốc số 201010606635.8; Các nhóm: nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng.

1. Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên Capto MMC dưới dạng tinh chế sơ cấp và quy trình loại bỏ nội độc tố với rượu.

Nhựa Capto MMC được sử dụng để thực hiện sắc ký trao đổi cation dưới dạng sắc ký chính và etanol được bổ sung vào dung dịch đệm của nhóm thử nghiệm để loại bỏ nội độc tố, trong khi etanol không được bổ sung vào nhóm đối chứng (M1).

Nhóm thử nghiệm 1 (M2): Dung dịch đệm cân bằng và mẫu được bổ sung 10% etanol theo thể tích, và quy trình cụ thể là:

Nạp vào cột: khoảng 30mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký XK16/400 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) cho đến khi độ pH đạt 4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: Toàn bộ mẫu chiết chứa OsrHSA được bổ sung với 10% (thể tích/thể tích) etanol khan và 11g/L NaCl, và NaOH được sử dụng để điều chỉnh độ pH đến 4,5; mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ, và độ dẫn điện của mẫu nằm trong khoảng từ 20 đến 21 mS/cm, độ pH là 4,5;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 100mL dung dịch đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2g/L, NaCl 58,5g/L, độ pH 4,8 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Nhóm thử nghiệm 2 (M3): Dung dịch đệm cân bằng và mẫu được bổ sung 10% etanol, dung dịch đệm rửa tạp chất được bổ sung 20% etanol, và quy trình cụ thể là:

Nạp vào cột: khoảng 30mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký XK16/400 mm (tăng cao: 21cm), và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sót;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ cho đến khi độ pH đạt 4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: Toàn bộ mẫu chiết chứa OsrHSA được bổ sung 10% (thể tích/thể tích) etanol khan và 11g/L NaCl, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng NaOH. Mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ. Độ dẫn điện của mẫu nằm trong khoảng từ 20 đến 21 mS/cm, và độ pH là 4,5;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 100mL dung dịch đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích)

etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2g/L, NaCl 120 g/L, độ pH 4,8 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3-6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Các kết quả: Các kết quả xác định độ tinh khiết và khả năng nạp được thể hiện trong Fig.1. Không có sự khác biệt rõ ràng về độ tinh khiết giữa nhóm đối chứng và hai nhóm thực nghiệm. Việc bổ sung rượu vào dung dịch đệm rửa thuận lợi để loại bỏ các dải từ 17 KD đến 26KD. Việc bổ sung rượu vào dung dịch đệm rửa không ảnh hưởng đến khả năng nạp của Capto-MMC. FT gồm ba nhóm thể hiện khả năng nạp của mỗi nhóm là trên 30mL dịch chiết/mL nhựa.

Nội độc tố: Như được thể hiện trong Bảng 1, việc bổ sung rượu vào dung dịch đệm rửa của sắc ký Capto-MMC có tác dụng loại bỏ tốt nội độc tố. Khi dung dịch đệm cân bằng và dung dịch đệm chiết xuất được bổ sung 10% (thể tích/thể tích) etanol và dung dịch đệm rửa được bổ sung 20% etanol, sắc ký Capto-MMC có tác dụng tốt nhất để loại bỏ nội độc tố, mà gấp 3,6 lần nhóm đối chứng.

Bảng 1: So sánh các hàm lượng nội độc tố của sắc ký Capto-MMC chứa rượu trong dung dịch đệm rửa

Nhóm	Dịch chiết (EU/mL)	Tổng EU của mẫu được nạp	Phân đoạn thu được (EU/mL)	Tổng EU của phân đoạn thu được	n-lần giảm của tổng EU
Nhóm đối chứng (M1)	1500-2000	3×10^5	400-600	$1,25 \times 10^4$	24
Nhóm thử nghiệm 1 (M2)		$3,3 \times 10^5$	100-200	$4,5 \times 10^3$	76
Nhóm thử nghiệm 2 (M3)		$3,7 \times 10^5$	100-200	$4,3 \times 10^3$	87

2. Tối ưu hóa quy trình loại bỏ nội độc tố bằng sắc ký Capto MMC với rượu được bổ sung trong dung dịch đệm.

2.1 Tác dụng loại bỏ nội độc tố mà không bổ sung hoặc bổ sung rượu vào mẫu chiết được so sánh, và quy trình cụ thể như sau:

Nhóm đối chứng 1 (M1): dung dịch đệm cân bằng và mẫu chiết được bổ sung với 10% etanol, và dung dịch đệm rửa được bổ sung với 20% etanol, quy trình cụ thể là:

Nạp vào cột: Khoảng 29mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/400 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng I (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt

4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: Toàn bộ mẫu dung dịch chiết xuất chứa OsrHSA được bổ sung 10% (thể tích/thể tích) etanol khan và 11g/L NaCl, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng NaOH; 870mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ, và độ dẫn điện của mẫu là nằm trong khoảng từ 20 đến 21 mS/cm, độ pH là 4,5; hàm lượng nội độc tố trong mẫu nằm trong khoảng từ 1000 đến 2000EU/mL;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 100mL dung dịch đệm cân bằng II (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2g/L, 20% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ dẫn điện là 83 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, độ pH 4,8 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Nhóm thử nghiệm (M2): Mẫu chiết và dung dịch đệm cân bằng I không được bổ sung với etanol. Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được làm cân bằng với 150mL dung dịch đệm cân bằng II chứa 10% etanol (khoảng 5 CV), dung dịch đệm rửa được bổ sung 20% etanol; các điều kiện khác giống như nhóm M1.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2. Sự giảm tổng EU về cơ bản giống

hết nhau trong hai nhóm thử nghiệm đồng thời. Mẫu chiết và dung dịch đệm cân bằng có bổ sung hoặc không bổ sung rượu không có tác dụng rõ ràng về loại bỏ nội độc tố. Có rất ít sự khác nhau giữa nồng độ và thể tích của các phân đoạn thu được giữa hai nhóm, và các hàm lượng nội độc tố là giống nhau. Điều này còn thể hiện rằng tác dụng loại bỏ nội độc tố giống nhau có thể đạt được ngay cả không có rượu trong mẫu và dung dịch đệm cân bằng I.

Bảng 2: So sánh nội độc tố của sắc ký Capto-MMC khi mẫu và dung dịch đệm cân bằng I có hoặc không có rượu

Nhóm thử nghiệm	Mẫu được nạp (mL)	Tổng EU của mẫu được nạp	Phân đoạn thu được (mL)	Nội độc tố của phân đoạn thu được (EU/mL)	Tổng EU của phân đoạn thu được	n-lần giảm
M1	870	$1,31 \times 10^6$	95	200-400	$2,4 \times 10^4$	55
M2	870	$1,31 \times 10^6$	100	200-300	$2,5 \times 10^4$	53

2.2 So sánh tác dụng loại bỏ nội độc tố khi các lượng rượu khác nhau được bổ sung vào dung dịch đệm rửa

Nhóm đối chứng 1 (M1):

Nạp vào cột: Khoảng 29mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/400 mm, và sau đó cột được rửa bằng NaOH 0,5N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng I (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt 4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: Toàn bộ mẫu chiết chứa OsrHSA được bổ sung với 11g/L NaCl, độ

pH được điều chỉnh đến 4,5 bằng NaOH; 650mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ, và độ dẫn điện của mẫu là từ 20 đến 21 mS/cm, độ pH là 4,5, hàm lượng nội độc tố trong mẫu từ 1000 đến 2000 EU/mL;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 150mL dung dịch đệm cân bằng II (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15 g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2 g/L, 20% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ dẫn điện là 83 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, độ pH 4,8 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Nhóm thử nghiệm 1 (M2): Ngoại trừ 15% (thể tích/thể tích) etanol khan được bổ sung vào dung dịch đệm rửa, các điều kiện là giống nhau như nhóm M1.

Nhóm thử nghiệm 2 (M3): Ngoại trừ 10% (thể tích/thể tích) etanol khan được bổ sung vào dung dịch đệm rửa, các điều kiện là giống nhau như nhóm M1.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: So sánh hàm lượng nội độc tố khi các lượng rượu khác nhau được bổ sung vào dung dịch đệm rửa

Nhóm thử nghiệm	Tổng EU của mẫu được nạp	Phân đoạn thu được (mL)	Nội độc tố của phân đoạn thu được (EU/mL)	Tổng EU của phân đoạn thu được	n-lần giảm
M1	$1,17 \times 10^6$	78	200-300	$1,9 \times 10^4$	62
M2	$1,17 \times 10^6$	90	200-300	$2,25 \times 10^4$	52
M3	$1,17 \times 10^6$	88	300-400	$3,08 \times 10^4$	38

Như được thể hiện trong Bảng 3, tổng EU của nội độc tố trong nhóm M3 đã giảm 38 lần, và có sự khác nhau đáng kể so với nhóm M1 (nhóm đối chứng); 15% etanol được bổ sung vào nhóm M2, tổng EU của nội độc tố trong nhóm M2 đã giảm 52 lần; hàm lượng nội độc tố của phân đoạn thu được trong nhóm M2 giống như của nhóm M1 và không có sự khác nhau rõ ràng so với nhóm M1 (nhóm đối chứng). Nồng độ etanol trong dung dịch đệm rửa MMC có thể được giảm xuống còn khoảng 15%, mà không có ảnh hưởng rõ ràng về tác dụng loại bỏ nội độc tố.

2.3 Tác dụng loại bỏ nội độc tố khi dung dịch đệm rửa chứa rượu isopropyl

Nhóm đối chứng (CK): Nạp vào cột: Khoảng 29mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/400 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5 N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng I (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt 4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: 900mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ, và độ dẫn điện

của mẫu nằm trong khoảng từ 5 đến 8 mS/cm, độ pH là 4,5, hàm lượng nội độc tố trong mẫu nằm trong khoảng từ 1000 đến 2000 EU/mL;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 150mL dung dịch đệm cân bằng II (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 4,7 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2g/L, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 82 đến 89 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, 15% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH nằm trong khoảng từ 4,7 đến 4,9 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Nhóm thử nghiệm 1 (M1): Nạp vào cột: Khoảng 29mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/400 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5 N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng I (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt 4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: 900mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ, và độ dẫn điện của mẫu nằm trong khoảng từ 5 đến 8 mS/cm, độ pH là 4,5, hàm lượng nội độc tố

trong mẫu nằm trong khoảng từ 1000 đến 2000 EU/mL;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 150mL dung dịch đệm cân bằng II (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, từ 4 đến 6% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl, độ pH nằm trong khoảng từ 4,6 đến 4,7 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2g/L, từ 10 đến 11% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 82 đến 89 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, độ pH nằm trong khoảng từ 4,7 đến 4,9 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Nhóm thử nghiệm 2 (M2): Ngoại trừ dung dịch đệm cân bằng II được bổ sung từ 10 đến 11% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl thay vì từ 4 đến 6% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl, dung dịch đệm rửa được bổ sung từ 15 đến 16% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl thay vì từ 10 đến 11% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl, và độ dẫn điện giảm xuống nằm trong khoảng từ 75 đến 76 mS/cm, các điều kiện là giống như của nhóm M1.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: So sánh tác dụng loại bỏ nội độc tố khi rượu isopropyl được bổ sung vào dung dịch đệm rửa

Nhóm	Tổng EU của mẫu được nạp	Phân đoạn thu được (mL)	Nội độc tố của phân đoạn thu được (EU/mL)	Tổng EU của phân đoạn thu được	n-lần giảm
CK	$8,9 \times 10^5$	110	100-200	$1,7 \times 10^4$	52
M1	$7,2 \times 10^5$	110	10-20	$1,6 \times 10^3$	450
M2	$8,0 \times 10^5$	112	5-10	$1,1 \times 10^3$	710

Như được thể hiện trong Bảng 4, tổng EU của nội độc tố trong nhóm đối chứng đã giảm 52 lần, và của nhóm M1 và nhóm M2 lần lượt giảm 450 lần và 710 lần. Tác dụng loại bỏ nội độc tố được cải thiện đáng kể so với quy trình mà etanol được bổ sung trong dung dịch đệm rửa. Trong nhóm M2, 15% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl được bổ sung, và hàm lượng nội độc tố đã giảm 710 lần, tác dụng loại bỏ nội độc tố của nó được so sánh với nhóm M1. Điều này chứng minh rằng lượng rượu isopropyl được bổ sung vào dung dịch đệm cân bằng có thể nằm trong khoảng từ 4 đến 11% (thể tích/thể tích), lượng rượu isopropyl được bổ sung vào dung dịch đệm rửa có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 16% (thể tích/thể tích), và không có tác dụng rõ ràng về loại bỏ nội độc tố khi độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 75 đến 89mS/cm.

3. Chọn nhựa sắc ký cho sắc ký trao đổi cation và tác dụng loại bỏ nội độc tố với rượu được bổ sung vào dung dịch đệm rửa.

3.1 Bestarose Diamond MMC được sử dụng để thực hiện sắc ký trao đổi cation, và nội độc tố được loại bỏ bằng cách bổ sung rượu vào dung dịch đệm. Quy

trình cụ thể là:

Nạp vào cột: Khoảng 33mL nhựa Bestarose Diamond MMC được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/400 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5 N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 200mL dung dịch đệm cân bằng I (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt 4,5 và nằm trên đường chuẩn;

Nạp mẫu: Mẫu dung dịch chiết chứa OsrHSA được bổ sung với 11g/L NaCl, độ pH được điều chỉnh đến 4,5 bằng NaOH; 600mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 600 cm/giờ, và độ dẫn điện của mẫu nằm trong khoảng từ 20 đến 21 mS/cm, độ pH là 4,5, hàm lượng nội độc tố trong mẫu là nằm trong khoảng từ 1500 đến 2000EU/mL;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 150mL dung dịch đệm cân bằng II (natri axetat khan 2g/L, NaCl 15g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa tạp chất: 200mL dung dịch đệm rửa (natri axetat khan 2g/L, 15% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ dẫn điện là 83 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, độ pH 4,8 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng rửa giải các tạp chất ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được

phân đoạn chứa OsrHSA.

Các kết quả: Như được thể hiện trong Fig.2, độ tinh khiết không có sự khác nhau rõ ràng giữa nhựa Bestarose Diamond MMC và nhựa Capto-MMC. Điều này chứng minh rằng Bestarose Diamond MMC có thể được thay thế là Capto-MMC để tinh chế sơ cấp OsrHSA.

Nội độc tố: Sau khi mẫu chiết được đưa vào tinh chế sơ cấp trên nhựa Bestarose Diamond MMC với rượu được bổ sung trong dung dịch đệm, tổng EU của nội độc tố đã giảm 62 lần, đạt được tác dụng loại bỏ nội độc tố giống như nhựa Capto-MMC.

3.2 Sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên UNO Sphere S và quy trình loại bỏ nội độc tố với rượu được bổ sung vào dung dịch đệm.

Nhóm đối chứng (CK): đề cập tới phương pháp trong đơn sáng chế Trung Quốc CN 201010606635.8 của các tác giả sáng chế. Mẫu được nạp là 400mL.

Nhóm thử nghiệm (UE), quy trình cụ thể là:

Nạp vào cột: Khoảng 18mL nhựa UNO Sphere S được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/200 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5 N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt;

Làm cân bằng: Cột được làm cân bằng với 100mL dung dịch đệm cân bằng (natri axetat khan 2g/L, 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt 4,5 và không thay đổi;

Nạp mẫu: Mẫu dung dịch chiết chứa rHSA được bổ sung với 10% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH được điều chỉnh đến 4,5 bằng axit axetic; 400mL

mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ, và hàm lượng nội độc tố trong mẫu là từ 800 đến 1000EU/mL;

Làm cân bằng lại: Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 60mL dung dịch đệm cân bằng ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ;

Rửa giải: Dung dịch đệm rửa giải (natri axetat khan 2g/L, NaCl 14,6 g/L, độ pH 5,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) được sử dụng để rửa giải protein đích, thu được phân đoạn chứa OsrHSA.

Các kết quả: Như được thể hiện trong Fig.3, độ tinh khiết không có sự khác nhau rõ ràng giữa nhóm đối chứng UNO Sphere S và nhóm bổ sung rượu. Tức là, sắc ký nhựa UNO Sphere S bằng cách bổ sung rượu có thể được sử dụng để tinh chế sơ cấp.

Nội độc tố: Sau khi mẫu chiết được đưa vào tinh chế sơ cấp trên nhựa UNO Sphere S với bổ sung rượu, sự giảm tổng EU của nội độc tố là giống như của nhóm đối chứng. Điều này chứng minh rằng, rượu trong dung dịch đệm rửa không thể cho phép UNO Sphere S có tác dụng loại bỏ nội độc tố mạnh hơn. Điều này có thể liên quan đến thể mề của bản thân nhựa UNO Sphere S, và cả hai loại nhựa Capto-MMC và Bestarose Diamond MMC có các phối tử đa chức phức tạp và có đặc tính kỵ nước và trao đổi cation yếu.

Ví dụ 3: Chọn các điều kiện cho sắc ký trao đổi anion để tinh chế trung gian

1. Trong các điều kiện qua dòng chảy OsrHSA (tức là, trong các điều kiện độ dẫn điện là 40 mS/cm và độ pH 7,0, OsrHSA chảy qua thay vì gắn vào nhựa, trong khi các tạp chất gắn vào nhựa và do đó OsrHSA được phân tách từ các tạp chất). Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên Capto-Adhere và Bestarose Diamond MMA.

Khoảng 40mL nhựa Capto-Adhere được nạp vào cột sắc ký XK16×400mm, và độ cao nạp là 20,5cm. Cột được làm cân bằng với khoảng 8 CV dung dịch đệm cân bằng (25 mM PB, NaCl 23,4 g/L, độ pH 7,0) cho đến khi UV, độ pH và độ dẫn điện đạt đường chuẩn. Mẫu dung dịch đệm rửa giải thu được từ sắc ký Capto-MMC hoặc Bestarose Diamond MMC được điều chỉnh đến độ pH 7,0, và 288mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ. Khi trị số hấp thụ tia cực tím của phân đoạn qua dòng chảy >20 mAU, phân đoạn đích chứa OsrHSA được thu lại. Mẫu được lấy từ mỗi 20mL phân đoạn để theo dõi khả năng nạp mẫu và tổng số lượng mẫu khi độ tinh khiết của phân đoạn qua dòng chảy không được thay đổi rõ ràng; khả năng nạp thực tế của mỗi milimet nhựa Capto-Adhere ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ được tính toán.

Trong các điều kiện qua dòng chảy OsrHSA là Capto-Adhere, thử nghiệm đồng thời được thực hiện trên nhựa Bestarose Diamond MMA để so sánh hiệu quả tinh chế và khả năng nạp.

Trong các điều kiện qua dòng chảy OsrHSA, sau khi tinh chế thứ cấp với hai loại nhựa anion, độ tinh khiết HPLC của protein đích có thể đạt trên 98%. Như được thể hiện trong Fig.4, không có sự khác nhau rõ ràng về độ tinh khiết giữa hai loại nhựa.

2. Sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên nhựa Capto-Adhere trong các điều kiện gắn OsrHSA

Các điều kiện gắn OsrHSA nghĩa là protein đích thứ nhất gắn vào nhựa và một phần các tạp chất chảy qua cột, và sau đó protein đích được rửa giải qua muối riêng và độ pH, để đạt tác dụng tách và tinh chế, và làm giàu sản phẩm đích. Các

điều kiện gồm có: protein đích gắn vào nhựa trao đổi anion trong các điều kiện của độ dẫn điện là 20 mS/cm và độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,5, và sau đó protein đích được rửa giải trong các điều kiện của độ dẫn điện là 40 mS/cm và độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,2 để loại bỏ các tạp chất và làm giàu protein đích.

Khoảng 22mL nhựa Capto-Adher được nạp vào cột sắc ký BioRad 15/200 mm, và sau đó cột được làm cân bằng với 220mL dung dịch đệm cân bằng (natri dihydro phosphat 1,0 g/L, dinatri hydro phosphat 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 7,6) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ cho đến khi độ pH đạt từ 7,5 đến 7,6 và ổn định. Phân đoạn rửa giải mẫu từ sắc ký Capto-MMC hoặc Bestarose Diamond MMC được hòa tan với nước để đạt độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 19 đến 21mS/cm, và độ pH được điều chỉnh đến 7,0 bằng NaOH. 150mL mẫu được nạp ở tốc độ dòng là 300cm/giờ. Cột được cân bằng lại với 100mL dung dịch đệm. Protein đích được rửa giải với dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 1,5g/L, dinatri hydro phosphat 5,0 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,2) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ, thu được phân đoạn chứa OsrHSA. Hàm lượng nội độc tố trong phân đoạn thu được nằm trong khoảng từ 100 đến 200 EU/mL.

Trong cùng các điều kiện gắn OsrHSA như nhựa Capto-Adhere, thử nghiệm đồng thời được thực hiện trên nhựa Bestarose Diamond MMA để so sánh hiệu quả tinh chế và khả năng nạp mẫu.

Trong các điều kiện gắn OsrHSA, sau khi tinh chế thứ cấp với nhựa Capto-Adhere hoặc nhựa Bestarose Diamond MMA, độ tinh khiết của protein đích có thể đạt trên 99,9 % (Các kết quả phát hiện ELISA). Nhựa Bestarose Diamond

MMA và nhựa Capto-Adhere có cùng hiệu suất tinh chế. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig. 5.

3. Chọn các điều kiện sắc ký cho sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên Capto-Adhere và Bestarose Diamond MMA

Bằng cách so sánh đồng thời hai loại nhựa Bestarose Diamond MMA và Capto-Adhere, phát hiện ra rằng trong cùng các điều kiện, hai loại nhựa có hiệu suất tinh chế giống nhau về cơ bản và khả năng nạp mẫu vào phân đoạn rửa giải thu được từ tinh chế thứ cấp được thực hiện trên nhựa Capto-MMC hoặc nhựa Bestarose Diamond MMC, chứng minh rằng hai loại nhựa sắc ký trao đổi anion có thể được sử dụng để tinh chế thứ cấp.

Khả năng nạp mẫu của hai loại nhựa trong các điều kiện qua dòng chảy OrsHSA cao hơn của các điều kiện gắn OrsHSA. Khả năng nạp mẫu của điều kiện chảy là khoảng 25 mg mẫu/mL nhựa, trong khi khả năng nạp mẫu của điều kiện gắn là khoảng 20 mg mẫu/mL nhựa. Tuy nhiên, hiệu suất tinh chế trong các điều kiện gắn OrsHSA tốt hơn trong các điều kiện qua dòng chảy OrsHSA. Độ tinh khiết của điều kiện gắn có thể đạt trên 99,9%, và độ tinh khiết của điều kiện chảy chỉ là nằm trong khoảng từ 98 đến 99%.

Trong các điều kiện gắn OrsHSA, hai loại nhựa có tác dụng loại bỏ nội độc tố tốt hơn các điều kiện qua dòng chảy. Trong các điều kiện qua dòng chảy OrsHSA, hầu hết nội độc tố chảy qua cột cùng với OrsHSA, dẫn đến tác dụng loại bỏ nội độc tố kém. Nhưng trong các điều kiện gắn OrsHSA, phần không có nội độc tố chảy qua, và phần nội độc tố khác gắn với nhựa chặt chẽ sao cho OrsHSA có thể được rửa giải một cách chọn lọc, dẫn đến tác dụng loại bỏ nội độc tố tốt hơn.

Lấy các yếu tố khác nhau vào xem xét, thích hợp hơn là sử dụng các điều kiện gắn OrsHSA như các điều kiện sắc ký của hai loại nhựa trao đổi anion, Capto-Adhere và Bestarose Diamond MMA.

Ví dụ 4: Chọn các điều kiện cho sắc ký nước ở lần tinh chế cuối

1. Sắc ký nước được thực hiện trên Phenyl Sepharose HP

Đề cập đến phương pháp trong đơn sáng chế Trung Quốc CN201010606635.8 của chủ đơn, khoảng 28mL nhựa Phenyl sepharose HP được nạp vào cột sắc ký 20 XK16/200 mm, và cột được làm cân bằng với 150mL dung dịch đệm cân bằng (natri axít axetic khan 2,32g/L, natri dihydro phosphat 2,81g/L, natri octanat 2g/L, amoni sunfat, 66 g/L, độ pH 6,5) ở tốc độ dòng là 100 cm/giờ. 100mL phân đoạn rửa giải chứa OrsHSA thu được từ sắc ký Capto-Adhere hoặc Bestarose Diamond MMA được bổ sung với amoni sunfat để điều chỉnh độ dẫn điện đến 75 mS/cm, và sau đó bổ sung với 0,15g caprylat natri, và sau đó điều chỉnh độ pH đến 6,5 bằng axit clohydric. Nó được nạp vào cột ở tốc độ dòng là 100 cm/giờ. Dòng chảy qua được thu gom để thu phân đoạn chứa OrsHSA. Các mẫu phân đoạn được lấy để xác định khả năng nạp và tính toán khả năng nạp thực tế của mẫu từ tinh chế thứ cấp trên mỗi milimet nhựa. Điện di đồ được thể hiện trong Fig.6.

2. Sắc ký nước được thực hiện trên Phenyl Bestarose HP

Khoảng 24mL nhựa Phenyl Bestarose HP được nạp vào cột sắc ký XK16/200 mm. Thử nghiệm đồng thời được tiến hành theo phương pháp nêu trên trong mục 1 của ví dụ này. Các điện di đồ được thể hiện trong các Fig.6 và Fig.7.

Các kết quả và phân tích:

Sau khi mẫu phân đoạn thu được từ tinh chế thứ cấp với Capto-Adhere hoặc

Bestarose Diamond MMA được đưa vào sắc ký tương tác kỵ nước với Phenyl Sepharose HP hoặc Phenyl Bestarose HP, độ tinh khiết của protein đích có thể đạt 99,9999% (bằng ELISA). Các protein tạp chất trong hạt gạo không được phát hiện. Hai loại nhựa kỵ nước không có sự khác nhau đáng kể về độ tinh khiết. Các hàm lượng nội độc tố của các phân đoạn chứa OsrHSA thu được từ sắc ký tương tác kỵ nước được thực hiện trên hai loại nhựa nhỏ hơn 0,06 EU/mg. Các kết quả đã thể hiện rằng cả nhựa sắc ký kỵ nước Phenyl Sepharose HP và Phenyl Bestarose HP có thể được sử dụng để tinh chế lần cuối OsrHSA, và có thể đạt được sự tinh chế tốt hơn và loại bỏ nội độc tố.

Ví dụ 5: Tinh chế Albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người

Sắc ký trao đổi cation là lần tinh chế sơ cấp: Khoảng 400mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký XK50/400 mm và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5 N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt. Cột sắc ký được làm cân bằng với 2L dung dịch đệm cân bằng I (natri axít axetic khan 2 g/L, NaCl 11g/L, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axít axetic) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ, cho đến khi độ pH đạt 5,0 và ổn định. 10L mẫu được nạp vào các cột, và mẫu có độ dẫn điện là 20,3 mS/cm và độ pH là 4,8. Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được làm cân bằng với 2L dung dịch đệm cân bằng II (natri axít axetic khan 2 g/L, NaCl 15 g/L, từ 10 đến 11% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ pH 4,8 được điều chỉnh bằng axít axetic, được điều chế với nước để phun) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ. Các tạp chất được rửa giải với 3000mL dung dịch đệm rửa (natri axít axetic khan 2 g/L, 16% (thể tích/thể tích) etanol khan, độ dẫn điện là 83,5 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, độ pH 5,0 được điều chỉnh bằng axít axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300

cm/giờ. Protein đích được rửa giải với dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước có thể rót vào) để thu được phân đoạn chứa OsrHSA. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig. 8A.

Nhựa composit anion/ky nước được sử dụng cho sắc ký trao đổi là lần tinh chế thứ cấp: Khoảng 68mL của nhựa Capto-Adhere được nạp vào cột sắc ký XK26/200 mm. Cột được làm cân bằng với 600mL dung dịch đệm cân bằng (natri dihydro phosphat 1,0 g/L, dinatri hydro phosphat 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 7,6) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ, cho đến khi độ pH đạt từ 7,5 đến 7,6 và ổn định. 500mL mẫu được nạp vào cột ở tốc độ dòng 300 cm/giờ. Cột được cân bằng lại với khoảng 200mL dung dịch đệm cân bằng, và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 1,5 g/L, dinatri hydro phosphat 5,0 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,2) ở tốc độ dòng là 300cm/giờ, để thu phân đoạn chứa OsrHSA. Hàm lượng nội độc tố của phân đoạn thu được nằm trong khoảng từ 100 đến 200 EU/mL. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig.8B.

Sắc ký ky nước là lần tinh chế cuối: Khoảng 15mL nhựa Phenyl sepharose HP được nạp vào cột sắc ký XK16/200 mm. Cột được làm cân bằng với 100mL dung dịch đệm cân bằng (natri axit axetic khan 2,32 g/L, natri dihydro phosphat 2,81 g/L, caprylat natri 2g/L, amoni sunfat 66 g/L, độ pH 6,5) ở tốc độ dòng là 100 cm/giờ. 100mL phân đoạn rửa giải chứa OsrHSA thu được từ sắc ký Capto-Adhere được bổ sung amoni sunfat để điều chỉnh độ dẫn điện đến 75 mS/cm, sau đó bổ sung 0,15 g caprylat natri, axit clohydric để điều chỉnh độ pH đến 6,5. Mẫu được nạp ở tốc độ

dòng là 100cm/giờ. Dòng chảy thu được là phân đoạn chứa OsrHSA. Hàm lượng nội độc tố nhỏ hơn 0,08 EU/mg, và độ tinh khiết của protein đích lớn hơn 99,9999%. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig.8C.

Ví dụ 6: Tinh chế Albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người

Khoảng 400mL nhựa Capto MMC được nạp vào cột sắc ký XK50/400 mm, và sau đó được rửa bằng NaOH 0,5 N trong khoảng thời gian 30 phút để khử các chất gây sốt. Cột sắc ký được làm cân bằng với 2000mL dung dịch đệm cân bằng I (natri axít axetic khan 2 g/L, NaCl 11 g/L, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ, cho đến khi độ pH đạt 4,5 và ổn định. 10000mL mẫu có độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,0 mS/cm và độ pH là 4,5 được nạp vào cột. Sau khi nạp mẫu, cột sắc ký được cân bằng lại với 2000mL dung dịch đệm cân bằng II (natri axít axetic khan 2 g/L, NaCl 15g/L, từ 10 đến 11% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl, độ pH 4,5 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế bằng nước có thể rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ. Các tạp chất được rửa giải với 3000mL dung dịch đệm rửa (natri axít axetic khan 2 g/L, từ 15 đến 16% (thể tích/thể tích) rượu isopropyl, độ dẫn điện nằm trong khoảng từ 82 đến 89 mS/cm được điều chỉnh bằng NaCl, độ pH nằm trong khoảng từ 4,8 đến 4,9 được điều chỉnh bằng axit axetic, được điều chế với nước để rót vào) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ. Protein đích được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 2,67 g/L, dinatri hydro phosphat 2,82 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH từ 6,3 đến 6,4, được điều chế với nước để rót vào) để thu được phân đoạn chứa OsrHSA. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig.9A.

Nhựa composit anion /kỵ nước được sử dụng cho sắc ký là lần tinh chế thứ cấp: Khoảng 68mL nhựa Capto-Adhere được nạp vào cột sắc ký XK26/200 mm. Cột được làm cân bằng với 600mL dung dịch đệm cân bằng (natri dihydro phosphat 1,0

g/L, dinatri hydro phosphat 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 7,5 đến 7,6) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ, cho đến khi độ pH đạt từ 7,5 đến 7,6 và ổn định. 500mL mẫu được nạp vào cột ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ. Cột được cân bằng lại với khoảng 200mL dung dịch đệm cân bằng, và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (natri dihydro phosphat 1,5 g/L, dinatri hydro phosphat 5,0 g/L, NaCl 23,4 g/L, độ pH nằm trong khoảng từ 7,1 đến 7,2) ở tốc độ dòng là 300 cm/giờ, để thu phân đoạn chứa OsrHSA. Hàm lượng nội độc tố của phân đoạn thu được nằm trong khoảng từ 100 đến 200 EU/mL. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig.9B.

Sắc ký kỵ nước là lần tinh chế cuối: Khoảng 15mL nhựa Phenyl sepharose HP được nạp vào cột sắc ký XK16/200 mm. Cột được làm cân bằng với 100mL dung dịch đệm cân bằng (natri axít axetic khan 2,32g/L, natri dihydro phosphat 2,81 g/L, caprylat natri 2 g/L, amoni sunfat 66g/L, độ pH 6,5) ở tốc độ dòng là 100 cm/giờ. 100mL phân đoạn rửa giải chứa OsrHSA thu được từ sắc ký Capto-Adhere được bổ sung amoni sunfat để điều chỉnh độ dẫn điện đến 75 mS/cm, sau đó bổ sung 0,15 g caprylat natri, độ pH 6,5 được điều chỉnh bằng axit clohydric, được nạp ở tốc độ dòng là 100cm/giờ. Dòng chảy được thu là chứa OsrHSA. Hàm lượng nội độc tố nhỏ hơn 0,08 EU/mg, và độ tinh khiết của protein đích lớn hơn 99,9999%. Các điện di đồ được thể hiện trong Fig.9C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sắc ký để tách và tinh chế albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao, phương pháp này bao gồm các bước theo thứ tự sau đây:

1) đưa dịch chiết thô của albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người vào sắc ký trao đổi cation, bổ sung rượu vào dung dịch đệm để loại bỏ nội độc tố, để thu sản phẩm sơ cấp I;

dung dịch đệm bao gồm dung dịch đệm rửa, dung dịch đệm cân bằng I và dung dịch đệm cân bằng II; dung dịch đệm rửa chứa từ 10 đến 20% rượu theo thể tích, dung dịch đệm cân bằng I chứa từ 0 đến 10% rượu theo thể tích, dung dịch đệm cân bằng II chứa từ 5 đến 15% rượu theo thể tích;

sắc ký trao đổi cation được thực hiện trên nhựa composit cation/ky nước được chọn từ Capto-MMC hoặc Bestarose Diamond MMC;

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

sắc ký trao đổi anion được thực hiện trên nhựa composit anion/ky nước được chọn từ Capto-Adhere hoặc Bestarose Diamond MMA;

3) đưa sản phẩm thứ cấp II vào sắc ký ky nước để thu được albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người có độ tinh khiết cao;

sắc ký ky nước được thực hiện trên nhựa được chọn từ Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Phenyl Bestarose HP hoặc Phenyl Bestarose FF;

albumin huyết thanh tái tổ hợp ở người được tinh chế thu được bằng phương pháp trên có độ tinh khiết cao hơn 99,9% bởi HPLC.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu ở bước 1) được chọn từ etanol hoặc

rượu isopropyl.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm rửa chứa 15% etanol khan theo thể tích, dung dịch đệm II chứa 10% etanol khan theo thể tích.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm rửa bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, 15% etanol khan theo thể tích; độ dẫn điện của nó được điều chỉnh bằng NaCl đến 83mS/cm, độ pH của nó được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,6 đến 5,0 bằng axit axetic.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm I bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 15g/L; độ pH của nó được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,8 bằng axit axetic.

6. Phương pháp theo 1, trong đó dung dịch đệm II bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 15g/L, 10% etanol khan theo thể tích; độ pH của nó được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 4,2 đến 4,8 bằng axit axetic.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó dung dịch đệm bao gồm dung dịch đệm rửa, dung dịch đệm cân bằng I và dung dịch đệm cân bằng II; trong đó dung dịch đệm rửa chứa từ 10 đến 16% rượu isopropyl theo thể tích, dung dịch đệm cân bằng II chứa từ 4 đến 11% rượu theo thể tích.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó dung dịch đệm rửa chứa từ 15 đến 16% rượu isopropyl theo thể tích, dung dịch đệm cân bằng II chứa từ 10 đến 11% rượu isopropyl theo thể tích.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó dung dịch đệm rửa bao gồm natri axetat khan 2 g/L, từ 15 đến 16% rượu isopropyl theo thể tích; độ dẫn điện của nó được điều chỉnh bằng NaCl nằm trong khoảng từ 82 đến 89 mS/cm, độ pH của nó được điều

chỉnh đến độ pH từ 4,8 đến 4,9 bằng axit axetic.

10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó dung dịch đệm I bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 11g/L; độ pH của nó được điều chỉnh đến 4,5 bằng axit axetic.

11. Phương pháp theo điểm 7, trong đó dung dịch đệm II bao gồm: natri axetat khan 2 g/L, NaCl 15g/L, từ 10 đến 11% rượu isopropyl theo thể tích; độ pH của nó được điều chỉnh đến 4,5 bằng axit axetic.

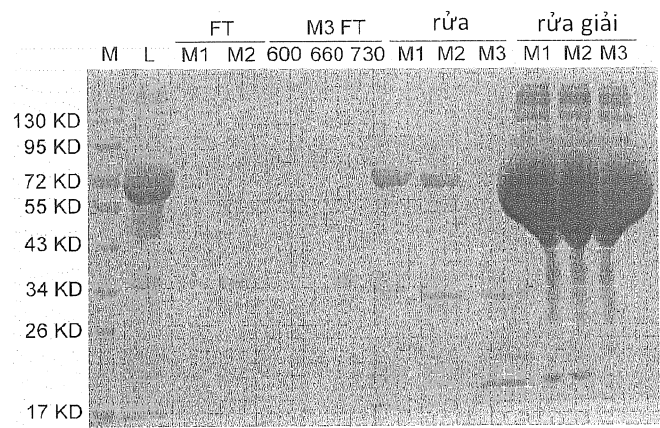


Fig. 1

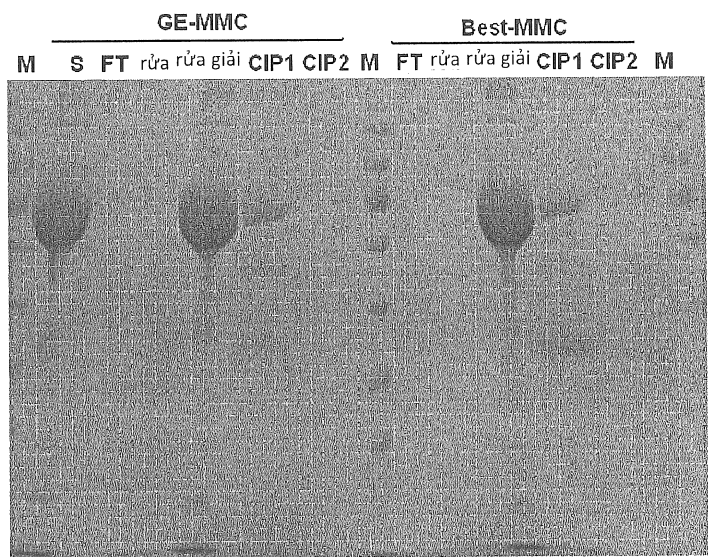


Fig. 2

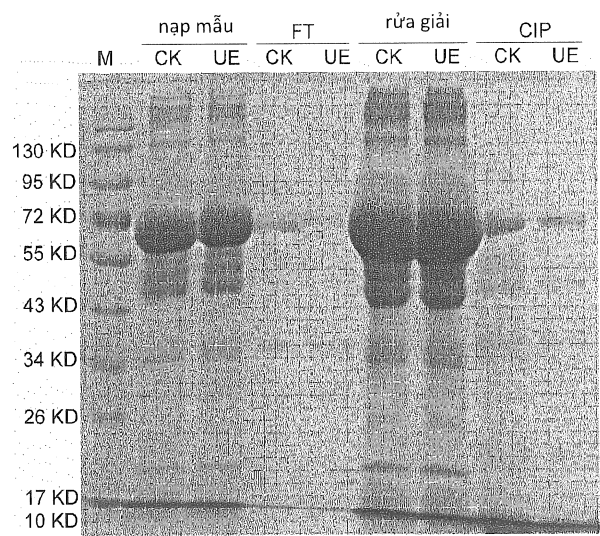


Fig. 3

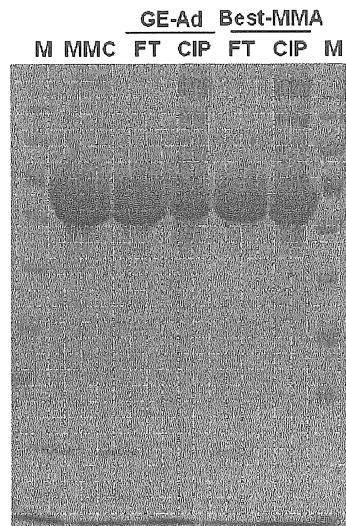


Fig. 4

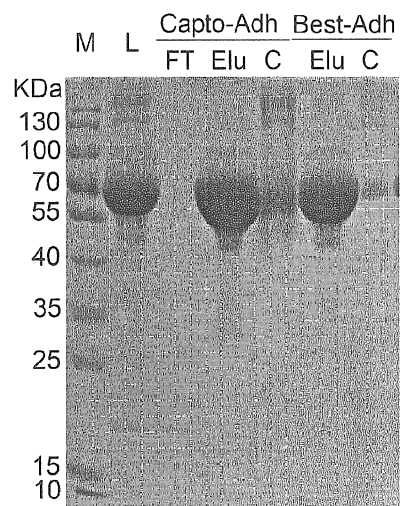


Fig. 5

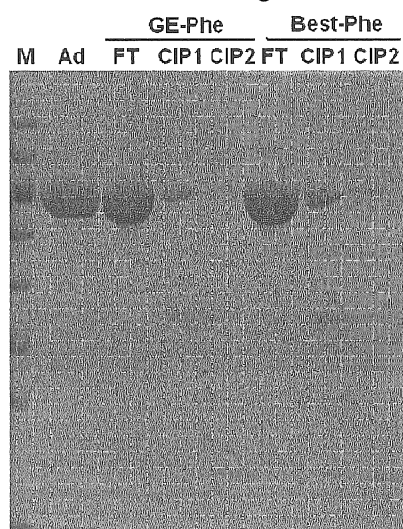


Fig. 6

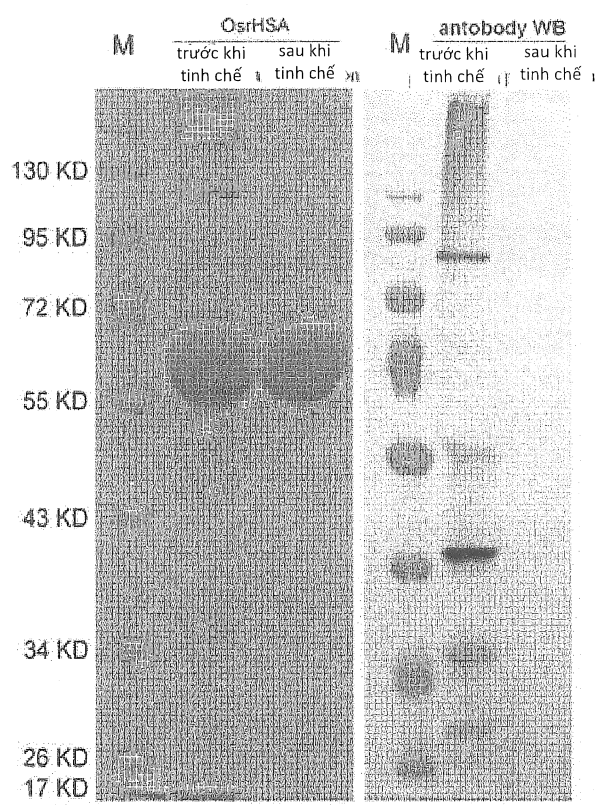


Fig.7

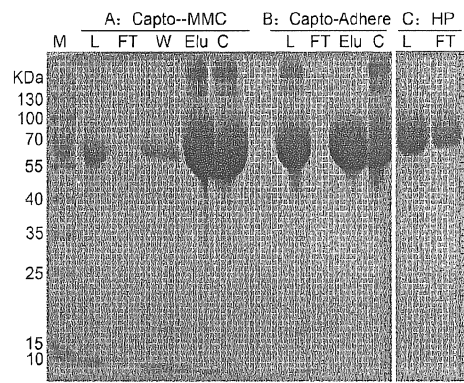


Fig. 8

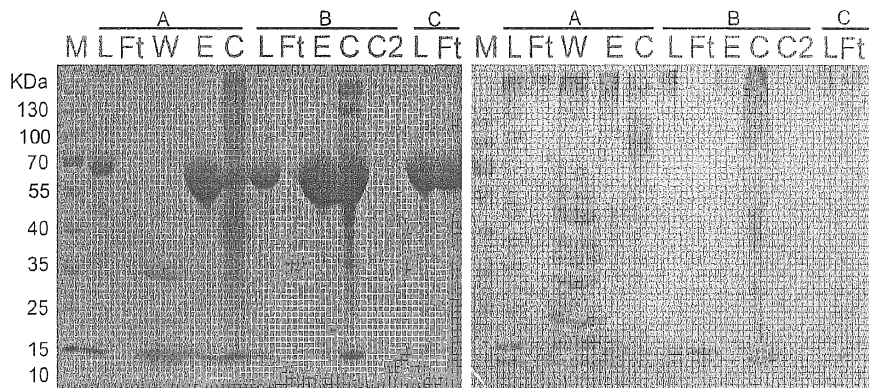


Fig. 9