



(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)



1-0031596

(51)⁸ C07K 14/59

(13) B

(21) 1-2017-03127

(22) 22/04/2016

(86) PCT/EP2016/059006 22/04/2016

(87) WO2016/170113 27/10/2016

(30) 15164965.4 24/04/2015 EP

(45) 25/04/2022 409

(43) 25/01/2018 358A

(73) FERRING B.V. (NL)

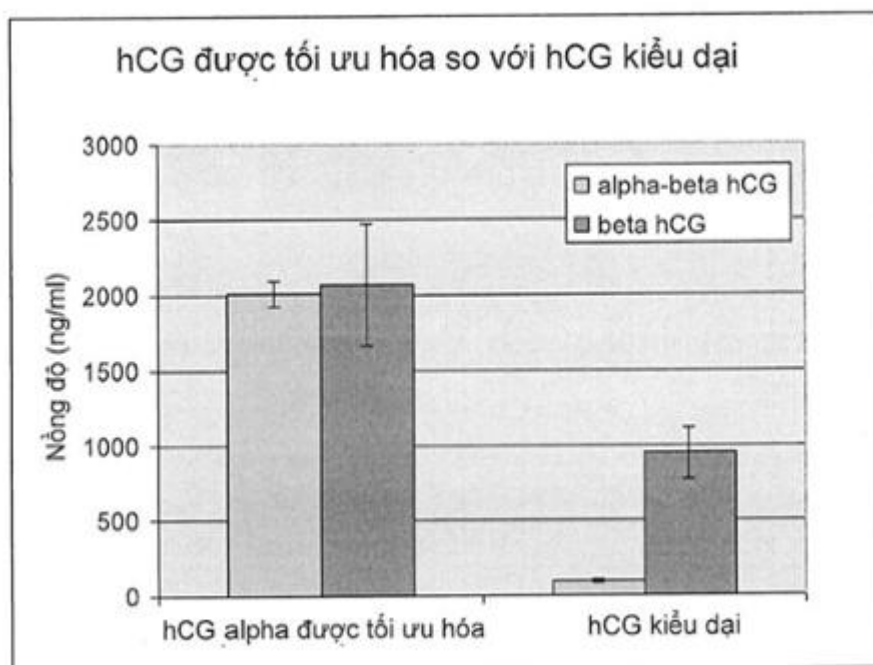
Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, Netherlands

(72) PLAKSIN, Daniel (IL); GRINHUT, Ayelet (IL).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) TRÌNH TỰ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA CHUỖI ALPHA CỦA HCG, TẾ BÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN TÁI TỔ HỢP TRONG TẾ BÀO NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào chủ, khác biệt ở chỗ nó chứa trình tự được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi α của hCG. Tế bào chủ này hữu ích để sản xuất hCG tái tổ hợp.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các gonadotrophin để sử dụng trong việc điều trị chứng vô sinh. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến gonadotrophin màng đệm ở người (human chorionic gonadotrophin - hCG).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các gonadotrophin là nhóm các hormon glycoprotein dạng heterodime mà điều hòa chức năng tuyến sinh dục ở nam và nữ. Chúng gồm hormon kích thích nang (follicle stimulating hormone - FSH), hormon lutein hóa (luteinising hormone - LH) và gonadotrophin màng đệm (chorionic gonadotrophin - CG).

Gonadotrophin màng đệm ở người (hCG) được tiết chủ yếu bằng nhau thai người trong quá trình mang thai và hỗ trợ sự nuôi dưỡng hoàng thể. hCG gồm phân đơn vị alpha 92 axit amin (chuỗi α), cũng là phổ biến với các hormon glycoprotein khác LH và FSH, và phân đơn vị beta 145 axit amin (chuỗi β) là duy nhất đối với hCG, phân đơn vị này tạo ra tính đặc hiệu hormon. Mỗi phân đơn vị được sửa đổi sau dịch mã bằng việc bổ sung gốc phức hydrat cacbon. Phân đơn vị alpha chứa 2 điểm glycosyl hóa được liên kết với N ở các axit amin 52 và 78 và phân đơn vị beta chứa 2 điểm glycosyl hóa được liên kết với N ở các axit amin 13 và 30 và bốn điểm glycosyl hóa được liên kết với O ở các axit amin 121, 127, 132 và 138.

hCG được chiết ra từ nước tiểu của phụ nữ mang thai [Choragon (Ferring)] đã được sử dụng trong nhiều năm để điều trị chứng vô sinh. Quy trình sản xuất hCG được chiết ra từ nước tiểu bao gồm việc thu gom và xử lý một lượng lớn nước tiểu. Ovitrelle (Serono), phiên bản tái tổ hợp của hCG, cũng có bán trên thị trường để sử dụng trong điều trị chứng vô sinh. Sản phẩm tái tổ hợp này được biểu hiện ở các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO), và có biên dạng được động lực khác với hCG được sản xuất từ nước tiểu người.

Các chế phẩm hCG có sự không đồng nhất đáng kể liên quan đến các khác biệt về lượng các isoform khác nhau có mặt trong đó. Các isoform hCG riêng lẻ biểu hiện các trình tự axit amin tương đồng nhưng khác nhau về mức độ biến đổi sau dịch mã

của chúng; các isoform cụ thể được đặc trưng bằng tính không đồng nhất của các cấu trúc nhánh hydrat cacbon và các lượng kết hợp khác nhau của axit sialic (đường đầu tận cùng), cả hai yếu tố này đều ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học isoform đặc hiệu.

Sự glycosyl hóa các sản phẩm hCG tái tổ hợp (“rhCG”) phản ánh mức các glycosyl-transferaza có mặt trong dòng tế bào chủ. Sản phẩm rhCG hiện có, Ovitrelle, được thu từ các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc được xử lý (các tế bào CHO). Mức biến đổi glycan trong rhCG thu được từ CHO là hạn chế hơn mức được phát hiện trong các sản phẩm tự nhiên, thu được từ nước tiểu. Các ví dụ về tính không đồng nhất glycan giảm được thấy ở rhCG thu được từ CHO gồm sự thiếu glucosamin phân giác và lượng fucosyl hóa nhân giảm và sự kéo dài axetyl lactosamin. Ngoài ra, các tế bào CHO chỉ có thể bổ sung axit sialic bằng cách sử dụng liên kết $\alpha 2,3$ (Kagawa *et al*, 1988, Takeuchi *et al*, 1988, Svensson *et al*, 1990).

hCG nước tiểu người (tức là, hCG được chiết ra từ nước tiểu của phụ nữ mang thai) đã được sử dụng cho đến nay để điều trị chứng vô sinh trên thực tế là hCG nhau thai; hCG được tạo ra trong nhau thai (người) và sau đó được tiết ra trong nước tiểu. hCG này được chiết ra từ nước tiểu để sử dụng làm dược phẩm. Bousfield *et al* (Rev Endocr Metab Disord (2011) 12:289-302) đã phát biểu rằng “trong khi các gonadotrophin tuyến yên có axit sialic liên kết $\alpha 2,3$ và $\alpha 2,6$, hCG nhau thai và các gonadotrophin tái tổ hợp được sản xuất trong các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc chỉ có axit sialic liên kết $\alpha 2,3$ ”. Do đó, hCG nước tiểu người (mà được sản sinh trong nhau thai) chỉ gồm sự $\alpha 2,3$ - sialyl hóa (giống như các sản phẩm tái tổ hợp thu được từ dòng tế bào CHO). Do đó, các dược phẩm đã biết mà gồm hCG chỉ gồm axit sialic liên kết $\alpha 2,3$, nhưng không gồm axit sialic liên kết $\alpha 2,6$.

Đã chứng minh được rằng dạng điều chế FSH tái tổ hợp (Organon) khác về lượng FSH với điểm đẳng điện (pI) nhỏ hơn 4 (xem xét các isoform có tính axit) so với FSH từ nước tiểu sau mãn kinh, huyết thanh hoặc tuyến yên (Ulloa-Aguirre *et al*. 1995). Lượng các isoform có tính axit trong các chế phẩm FSH từ nước tiểu là cao hơn nhiều so với các sản phẩm tái tổ hợp, Gonal-f (Serono) và Puregon (Organon) (Andersen *et al*. 2004). Lượng này cần phải phản ánh hàm lượng mol axit sialic thấp hơn trong rFSH vì hàm lượng glycan có điện tích âm được biến đổi bằng sulphat là thấp ở FSH. Hàm lượng axit sialic thấp hơn, so với FSH tự nhiên, là dấu hiệu của các sản phẩm FSH có trên thị trường và do đó cần phải được hạn chế trong quy trình sản

xuất (Bassett and Drievergen, 2005). Thời gian lưu thông của FSH đã được ghi lại đối với các nguyên liệu từ các nguồn khác nhau. Một số trong số các nguyên liệu này đã được phân đoạn trên cơ sở điện tích phân tử nói chung, như được đặc trưng bằng trị số pI của chúng, trong đó axit nhiều thì tương đương với điện tích âm cao hơn. Yếu tố góp phần chính vào điện tích phân tử nói chung là hàm lượng sialic tổng của mỗi phân tử FSH. Ví dụ, rFSH (Organon) có hàm lượng axit sialic khoảng 8 mol/mol, trong khi đó FSH thu được từ nước tiểu có hàm lượng axit sialic cao hơn (de Leeuw et al. 1996). Tốc độ thanh thải huyết tương tương ứng ở chuột cống là 0,34 và 0,14 ml/phút (Ulloa-Aguirre et al. 2003). Theo ví dụ khác trong đó mẫu FSH tái tổ hợp được phân chia thành các phân đoạn pI cao và thấp, hiệu lực in vivo của phân đoạn pI cao (hàm lượng axit sialic thấp hơn) là giảm và nó có thời gian bán thải trong huyết tương ngắn hơn (D'Antonio et al. 1999). Người nộp đơn đã phát hiện ra rằng, tương tự như FSH, sản phẩm hCG tái tổ hợp, thu được từ CHO đã biết (ví dụ, Ovitrelle) còn có lượng hCG thấp hơn với điểm đẳng điện (pI) nhỏ hơn 4 (xem xét các isoform có tính axit) so với hCG từ nước tiểu, còn phản ánh hàm lượng axit sialic thấp hơn của sản phẩm rhCG đã biết so với hCG từ nước tiểu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Người nộp đơn đã phát triển hCG tái tổ hợp thu được từ người (tức là, hCG tái tổ hợp mà được tạo ra hoặc được biểu hiện trong dòng tế bào người, ví dụ, được tạo ra bằng cách xử lý dòng tế bào người) mà có biên dạng axit nhiều hơn so với sản phẩm rhCG thu được từ dòng tế bào CHO, Ovitrelle, và có hàm lượng axit sialic cao hơn. rhCG này là đối tượng của đơn quốc tế số PCT/GB2010/001854, có số công bố là WO 2011/042688. hCG tái tổ hợp với hỗn hợp cả axit sialic liên kết $\alpha 2,3$ và axit sialic liên kết $\alpha 2,6$ được tạo ra bằng cách xử lý dòng tế bào người để biểu hiện cả rhCG và $\alpha 2,3$ sialyltransferaza. Sản phẩm được biểu hiện có tính axit cao, có hàm lượng axit sialic [được biểu thị dưới dạng tỷ số giữa số mol axit sialic với số mol protein] ví dụ là 19,1 mol/mol, và chứa hỗn hợp của axit sialic liên kết $\alpha 2,3$ và axit sialic liên kết $\alpha 2,6$; axit sialic liên kết $\alpha 2,6$ được tạo ra bằng hoạt tính sialyl transferaza nội sinh. Nghiên cứu của người nộp đơn đã chỉ ra rằng loại liên kết axit sialic, $\alpha 2,3$ - hoặc $\alpha 2,6$ -, có thể có ảnh hưởng mạnh mẽ đối với khả năng thanh thải sinh học của hCG. Các dòng tế bào người, trái ngược với các dòng tế bào CHO, có thể biểu hiện hCG tái tổ hợp với các axit sialic được liên kết bằng cả liên kết $\alpha 2,3$ và liên kết $\alpha 2,6$.

Dòng tế bào nêu trong WO 2011/042688 biểu hiện rõ hCG tái tổ hợp thu được từ người. Tuy nhiên, dòng tế bào này cũng biểu hiện mức chuỗi β tự do (phân đơn vị beta tự do) tương đối cao, và sự tinh chế (để loại bỏ chuỗi β tự do này ra khỏi sản phẩm hCG) là cần thiết.

Người nộp đơn hiện đã phát triển dòng tế bào mới mà biểu hiện cả rhCG và $\alpha 2,3$ sialyltransferaza, và sản sinh rhCG với lượng chuỗi β tự do giảm, nhờ đó cải thiện hiệu suất và giảm mức độ tinh chế sản phẩm cần thiết (xem Fig.7).

Sáng chế đề xuất tế bào (ví dụ, tế bào chủ) khác biệt ở chỗ nó chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi α của hCG được chọn từ: trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1); trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:1); trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:4); và trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:4 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:4). Tốt hơn là trình tự (axit nucleic) mã hóa chuỗi α của hCG không phải là trình tự mà được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu AH007338 (tức là, tốt hơn là trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG không phải là trình tự mà được thể hiện trong SEQ ID NO:5). Tế bào này có thể còn chứa cADN được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa alpha-2,3-sialyltransferaza, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO: 3. Tế bào này có thể còn chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi β của hCG, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO:2.

Tế bào chủ có thể là, ví dụ, tế bào PER.C6®, tế bào HT1080, tế bào GT-5s v.v.. Tốt hơn là, tế bào này là tế bào PER.C6® như tế bào PER.C6® được ký thác dưới số hiệu ECACC no. 96022940.

Sáng chế đề xuất tế bào PER.C6® như tế bào PER.C6® được ký thác dưới số hiệu ECACC no. 96022940, khác biệt ở chỗ nó còn chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi α của hCG. Trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG có thể được chọn từ: trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:1); trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:1); trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90 % với trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:4); và trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:4 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:4). Tốt hơn là trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG không là trình tự mà được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu AH007338. Tế bào này có thể còn chứa cADN được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa alpha-2,3-sialyltransferaza, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO: 3. Tế bào này có thể còn chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi β của hCG, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO:2.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây với việc viện dẫn đến các ví dụ sau và viện dẫn đến các hình vẽ kèm theo trong đó:

Fig.1 thể hiện trình tự axit nucleic và trình tự axit amin thu được của trình tự hCG alpha được tối ưu hóa;

Fig.2 thể hiện trình tự axit nucleic và trình tự axit amin thu được của trình tự hCG beta;

Fig.3 thể hiện trình tự axit nucleic và trình tự axit amin thu được của ST3GAL4;

Fig.4 thể hiện bản đồ plasmit của vector biểu hiện phCGalpha/beta;

Fig.5 thể hiện vector biểu hiện α 2,3-sialyltransferaza (ST3GAL4);

Fig.6 thể hiện sự phát hiện các Isoform rhCG bằng IEF được nhuộm bằng xanh Coomassie trong các chế phẩm theo sáng chế (Các vạch 4, 5, 6 và 7, 15 μ g trên một

vạch); chế phẩm thu được từ CHO trong lĩnh vực này, Ovitrelle (Vạch 2, 15 μ g); và sản phẩm từ nước tiểu người thu được từ phụ nữ mang thai, Novarel (Vạch 3, 15 μ g); và Fig.7 so sánh nồng độ của hCG ("alpha-beta hCG") và chuỗi beta tự do ("beta hCG") được tạo ra bằng cách sử dụng các tế bào theo sáng chế chứa trình tự nucleic "được tối ưu hóa" của phân đơn vị alpha, với nồng độ của hCG ("alpha-beta hCG") và chuỗi beta tự do ("beta hCG") được tạo ra trong các tế bào ví dụ so sánh chứa phân đơn vị alpha WT (kiểu đại);

Mô tả chi tiết sáng chế

Cần hiểu rõ rằng thuật ngữ "trình tự mã hóa cho chuỗi α của hCG" hoặc "trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG" được sử dụng ở đây còn để chỉ trình tự mã hóa cho chuỗi α của FSH (hoặc trình tự mã hóa cho chuỗi α của LH) vì chuỗi α của hCG là giống như chuỗi α của FSH (và LH).

Thuật ngữ "trình tự axit nucleic" ở đây chỉ phân tử axit nucleic bất kỳ mà mã hóa cho các polypeptit như các peptit, các protein v.v.. Các phân tử axit nucleic này có thể được làm từ ADN, ARN hoặc các chất tương tự của chúng. Tuy nhiên, các phân tử axit nucleic được làm từ ADN là được ưu tiên.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ ràng rằng sự biến đổi của trình tự nucleotit ban đầu sẽ mô tả quy trình được tối ưu hóa đối với việc sử dụng codon. Các thay đổi được đưa vào có thể dễ dàng được xác định bằng cách so sánh trình tự được biến đổi và trình tự ban đầu. Hơn nữa, cả hai trình tự (tức là, trình tự ban đầu và trình tự được tối ưu hóa) sẽ mã hóa cho cùng trình tự axit amin.

Trình tự axit amin của chuỗi α của hCG người được bộc lộ trong WO2011/042688 (còn được đề cập là SEQ ID1 trong tài liệu đó), và là trình tự được mô tả trong Fiddes and Goodman 1979. Nó được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu AH007388, và được thể hiện là SEQ ID NO. 5 dưới đây. Trình tự axit amin của chuỗi β của hCG người được thể hiện trong SEQ ID No.2, và được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu NP_000728. Các trình tự axit amin này tương ứng với các trình tự axit amin kiểu đại của chuỗi α và chuỗi β của hCG người. Các thuật ngữ "trình tự axit nucleic kiểu đại" hoặc "trình tự axit nucleic ban đầu" nhằm mục đích của sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic mà được dự tính sử dụng để biểu hiện (quá mức) trong tế bào chủ và nó chưa được thích ứng với việc sử dụng codon trong tế bào chủ, mà là trình tự axit

nucleic kiểu đại thực tế mã hóa cho protein. Thuật ngữ "trình tự axit nucleic được tối ưu hóa" nhằm mục đích của sáng chế đề cập đến trình tự mà đã được biến đổi để biểu hiện ở tế bào chủ bằng cách làm thích ứng về trình tự trình tự axit nucleic ban đầu/không được biến đổi. Trình tự axit nucleic được tối ưu hóa mã hóa cho protein có trình tự axit amin giống như protein được mã hóa bởi trình tự không được biến đổi. Người nộp đơn đã phát triển các trình tự được tối ưu hóa mà mã hóa cho chuỗi α của hCG (xem, ví dụ, SEQ ID No. 1 và 4, Fig.1).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất trình tự polynucleotit (ví dụ, trình tự polynucleotit mã hóa cho chuỗi α của hCG) gồm trình tự được chọn từ trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO: 1; trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO: 4; trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 1 (ví dụ, trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 1); và trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 4).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hCG tái tổ hợp ở tế bào, bao gồm bước nuôi cấy tế bào trong môi trường thích hợp và thu hoạch protein tái tổ hợp (hCG) từ tế bào đã nêu và/hoặc môi trường đã nêu (ví dụ, thu hoạch hCG tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào), trong đó tế bào (tế bào chủ) này chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi α của hCG được chọn từ: trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:1); trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:1); trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90 % với trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:4); và trình

tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:4 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:4). Tốt hơn là trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG không là trình tự mà được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu AH007338. Tế bào này có thể còn chứa cADN được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa alpha-2,3-sialyltransferaza, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO: 3. Tế bào này có thể còn chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi β của hCG, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO:2. Phương pháp này có thể gồm bước hoặc các bước khác để tinh chế hCG tái tổ hợp thu được từ tế bào đã nêu và/hoặc môi trường đã nêu (ví dụ, tinh chế hCG tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào).

Tế bào (chủ) có thể là, ví dụ, tế bào PER.C6®, tế bào HT1080, tế bào GT-5s v.v.. Tốt hơn là, tế bào này là tế bào PER.C6® như tế bào PER.C6® được ký thác dưới số hiệu ECACC no. 96022940.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hCG tái tổ hợp ở tế bào, bao gồm bước nuôi cấy tế bào trong môi trường thích hợp và thu hoạch protein tái tổ hợp (hCG) từ tế bào đã nêu và/hoặc môi trường đã nêu (ví dụ, thu hoạch hCG tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào), trong đó tế bào này là tế bào PER.C6® (như tế bào PER.C6® được ký thác dưới số hiệu ECACC no. 96022940) chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi α của hCG. Trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG có thể được chọn từ: trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:1); trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:1); trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90 % với trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90% với trình tự SEQ ID NO:4); và trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:4 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:4). Tốt

hơn là trình tự (axit nucleic) mã hóa cho chuỗi α của hCG không là trình tự mà được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu AH007338. Tế bào này có thể còn chứa cADN được hợp nhất vào hệ gen của nó, cADN này mã hóa alpha-2,3-sialyltransferaza, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO: 3. Tế bào này có thể còn chứa trình tự (axit nucleic) được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi β của hCG, ví dụ, trình tự theo SEQ ID NO:2. Phương pháp này có thể gồm bước hoặc các bước khác để tinh chế hCG tái tổ hợp thu được từ tế bào đã nêu và/hoặc môi trường đã nêu (ví dụ, tinh chế hCG tái tổ hợp từ dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào).

Thuật ngữ "tế bào chủ" nhằm mục đích của sáng chế đề cập đến tế bào bất kỳ mà thường được sử dụng để biểu hiện, tức là phiên mã và dịch mã các trình tự axit nucleic để sản xuất, ví dụ, các polypeptit. Cụ thể là, thuật ngữ "tế bào chủ" hoặc "sinh vật" chỉ các sinh vật nhân sơ, các sinh vật nhân chuẩn thấp, thực vật, các tế bào côn trùng hoặc các hệ môi trường nuôi cấy tế bào động vật có vú. Tốt hơn là, tế bào chủ là tế bào động vật có vú, tốt hơn nữa là tế bào chủ là tế bào người, thậm chí tốt hơn nữa là tế bào PERC6®.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic tái tổ hợp" trong phạm vi ý nghĩa của sáng chế được dự tính là gồm tất cả các loại phân tử axit nucleic mà có khả năng được đưa vào tế bào chủ và tác động đến sự biểu hiện của trình tự axit nucleic mà được chứa trong phân tử axit nucleic tái tổ hợp. Thuật ngữ này bao gồm, ví dụ, các vectơ plasmit và các vectơ virus (ví dụ, các vectơ adenovirus, lentivirus và retrovirus), như được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic (thứ nhất) mã hóa cho chuỗi α của hCG, trình tự axit nucleic (thứ nhất) này được chọn từ trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1); trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:1); trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:14; và trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98%

hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:4 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:4). Tốt hơn là, phân tử axit nucleic tái tổ hợp theo khía cạnh này của sáng chế gồm cả trình tự axit nucleic được tối ưu hóa mã hóa cho chuỗi α của hCG người và trình tự axit nucleic mã hóa cho chuỗi β của hCG. Tốt hơn là, trình tự axit nucleic (thứ nhất) là dưới sự kiểm soát của promotor mà là hoạt tính trong tế bào chủ. Tốt hơn là phân tử axit nucleic tái tổ hợp còn gồm trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho chuỗi β của hCG. Trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa cho chuỗi β của hCG có thể là trình tự theo SEQ ID No. 2.

Trình tự axit nucleic thứ hai có thể là dưới sự kiểm soát của promotor riêng biệt mà là hoạt tính trong tế bào chủ. Trình tự axit nucleic thứ nhất và/hoặc trình tự axit nucleic thứ hai có thể dưới sự kiểm soát của promotor virus (ví dụ, promotor CMV).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa hoặc gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp như nêu trên đây (ví dụ, tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic tái tổ hợp chứa trình tự axit nucleic (thứ nhất) mã hóa cho chuỗi α của hCG, trình tự axit nucleic (thứ nhất) này được chọn từ trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1); trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:1 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:1); trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO: 4 (ví dụ, trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:4); và trình tự có độ tương đồng ít nhất là 97% với (ví dụ, có độ tương đồng ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% với) trình tự SEQ ID NO:4 (ví dụ trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với (ví dụ, độ đồng nhất về trình tự ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với) trình tự SEQ ID NO:4).

Người nộp đơn sáng chế đã phát hiện ra rằng các tế bào (các tế bào chủ), các dòng tế bào kết hợp với các tế bào chủ này, các phân tử axit nucleic tái tổ hợp, các polynucleotit và các phương pháp theo sáng chế có thể sản xuất hCG tái tổ hợp với hiệu suất và độ tinh khiết cao (ví dụ, với ít chuỗi beta tự do).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hCG tái tổ hợp (“rhCG” hoặc “rechCG”) chứa sự $\alpha 2,3$ - và $\alpha 2,6$ - sialyl hóa, trong đó hCG tái tổ hợp được sản xuất trong tế bào như được mô tả và yêu cầu bảo hộ theo sáng chế. hCG tái tổ hợp có thể có hàm lượng axit sialic [được biểu thị dưới dạng tỷ số giữa số mol axit sialic với số mol protein] từ 12 mol/mol đến 20 mol/mol, ví dụ từ 12 mol/mol đến 15,5 mol/mol, ví dụ từ 12 mol/mol đến 14,9 mol/mol. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) có thể có hàm lượng axit sialic là 12,5 mol/mol đến 14,5 mol/mol, ví dụ, hàm lượng axit sialic từ 12,8 mol/mol đến 13,2 mol/mol. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) theo sáng chế có thể có hàm lượng axit sialic là 13 mol/mol.

Trong các ví dụ theo sáng chế, rhCG có thể có mặt dưới dạng isoform duy nhất hoặc hỗn hợp các isoform.

hCG tái tổ hợp (hoặc chế phẩm rhCG) được sản xuất bằng các phương pháp và các tế bào theo sáng chế chứa sự $\alpha 2,3$ - và $\alpha 2,6$ -sialyl hóa. Thuật ngữ “sialyl hóa” có nghĩa là lượng gốc sialic có mặt trên các cấu trúc hydrat cacbon của hCG. $\alpha 2,3$ -sialyl hóa nghĩa là sự sialyl hóa ở vị trí 2,3 (như đã được biết rõ trong lĩnh vực này); và $\alpha 2,6$ -sialyl hóa có nghĩa là sự sialyl hóa ở vị trí 2,6 (cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này). Do đó, ở đây, cụm từ “% của tổng mức sialyl hóa có thể là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa” chỉ % của tổng số gốc axit sialic có mặt trong hCG mà được sialyl hóa ở vị trí 2,3. Thuật ngữ “% của tổng mức sialyl hóa là $\alpha 2,6$ -sialyl hóa” chỉ % của tổng số gốc axit sialic có trong hCG mà được sialyl hóa ở vị trí 2,6. Thuật ngữ “% của tổng mức sialyl hóa là $\alpha 2,8$ -sialyl hóa” chỉ % của tổng số gốc axit sialic có trong hCG mà được sialyl hóa ở vị trí 2,8.

rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) được sản xuất bằng các phương pháp và các tế bào theo sáng chế có thể có của 1% đến 99% của tổng mức sialyl hóa là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) được sản xuất bằng các phương pháp và các tế bào theo sáng chế có thể có 1% đến 90% của tổng mức sialyl hóa là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) theo sáng chế có thể có 10% hoặc nhiều hơn của tổng mức sialyl hóa là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa, ví dụ, 10% đến 90% tổng mức sialyl hóa có thể là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa. Ví dụ, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 hoặc 90% hoặc nhiều hơn của tổng mức sialyl hóa có thể là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa. 45% đến 80% của tổng mức sialyl hóa có thể là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa, ví dụ 50% đến 70% của tổng mức sialyl hóa có thể là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa, ví dụ 55 đến 65% của tổng mức sialyl hóa có thể là $\alpha 2,3$ -sialyl hóa. rhCG (hoặc

chế phẩm rhCG) có thể gồm α 2,3-sialyl hóa với lượng từ 65 đến 95% của tổng mức sialyl hóa, ví dụ từ 70 đến 90% của tổng mức sialyl hóa, ví dụ từ 85 đến 90% của tổng mức sialyl hóa.

rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) được sản xuất bằng các phương pháp và các tế bào theo sáng chế có thể có 1 đến 99% của tổng mức sialyl hóa là α 2,6-sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) theo sáng chế có thể có 5 đến 50% của tổng mức sialyl hóa là α 2,6-sialyl hóa. Ví dụ, 5 đến 45%, ví dụ 6 đến 40%, ví dụ 7 đến 30%, ví dụ 8 đến 20% của tổng mức sialyl hóa có thể là α 2,6- sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) có thể gồm α 2,6-sialyl hóa với lượng từ 20 đến 75% của tổng mức sialyl hóa, ví dụ từ 30 đến 60% của tổng mức sialyl hóa, ví dụ từ 35 đến 45% của tổng mức sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) có thể gồm α 2,6-sialyl hóa với lượng từ 5 đến 35% của tổng mức sialyl hóa, ví dụ từ 10 đến 20% của tổng mức sialyl hóa. Ví dụ 11 đến 55% của tổng mức sialyl hóa có thể là α 2,6- sialyl hóa.

rhCG hoặc chế phẩm rhCG được sản xuất bằng các phương pháp và các tế bào này có thể tùy ý còn chứa α 2,8 sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) theo sáng chế có thể có 5% hoặc nhỏ hơn của tổng mức sialyl hóa là α 2,8-sialyl hóa, ví dụ, 0 đến 4%, ví dụ 0,1 đến 4% của tổng mức sialyl hóa có thể là α 2,8-sialyl hóa. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) theo sáng chế có thể không có α 2,8-sialyl hóa.

rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) được sản xuất bằng các phương pháp và các tế bào theo sáng chế có thể có hàm lượng axit sialic (lượng sialyl hóa trên phân tử hCG) là (tính trên khối lượng protein, thay vì khối lượng của protein cộng với hydrat cacbon) là 6% hoặc lớn hơn (ví dụ, nằm trong khoảng từ 6% đến 15%, ví dụ, nằm trong khoảng từ 7% đến 13%, ví dụ, nằm trong khoảng từ 8% đến 12%, ví dụ, nằm trong khoảng từ 11% đến 15%, ví dụ, nằm trong khoảng từ 12% đến 14%) theo khối lượng.

rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) có thể được sản xuất hoặc được biểu hiện trong dòng tế bào người, ví dụ, dòng tế bào PER.C6®, dòng tế bào HT1080 v.v.. rhCG (hoặc chế phẩm rhCG) có thể được sản xuất hoặc được biểu hiện trong dòng tế bào thu được từ người hoặc dòng tế bào người được biến đổi, ví dụ, dòng tế bào thu được từ PER.C6® hoặc dòng tế bào PER.C6® được biến đổi, dòng tế bào HT1080 được biến đổi hoặc dòng tế bào thu được từ HT1080 v.v.. Theo ví dụ được ưu tiên, rhCG được sản xuất hoặc được biểu hiện trong dòng tế bào PER.C6®, dòng tế bào thu được từ

PER.C6® hoặc dòng tế bào PER.C6® được biến đổi. rhCG mà được sản xuất hoặc được biểu hiện trong dòng tế bào người (ví dụ, dòng tế bào PER.C6®, dòng tế bào HT1080, dòng tế bào GT-5s) sẽ chứa một số axit sialic liên kết $\alpha 2,6$ ($\alpha 2,6$ sialyl hóa) được tạo ra bởi hoạt tính sialyl transferaza nội sinh [của dòng tế bào] và sẽ gồm một số axit sialic liên kết $\alpha 2,3$ ($\alpha 2,3$ sialyl hóa) được tạo ra bởi hoạt tính sialyl transferaza nội sinh [của dòng tế bào]. Dòng tế bào này có thể được biến đổi bằng cách sử dụng $\alpha 2,3$ -sialyltransferaza. Cách khác hoặc ngoài ra, dòng tế bào này có thể được biến đổi bằng cách sử dụng $\alpha 2,6$ -sialyltransferaza. Điều này có thể đơn giản hóa (và làm cho hiệu quả hơn) phương pháp sản xuất vì thao tác và sự kiểm soát, ví dụ, môi trường sinh trưởng tế bào để giữ sự sialyl hóa có thể là ít hạn chế hơn với các quy trình đã biết. Phương pháp này cũng có thể hiệu quả hơn vì có ít rhCG cơ bản được tạo ra hơn so với việc sản xuất các sản phẩm rhCG đã biết; rhCG có tính axit hơn được tạo ra và việc tách/loại bỏ hCG cơ bản ít khó khăn hơn.

rhCG có thể được sản xuất bằng cách sử dụng $\alpha 2,3$ - sialyltransferaza, ví dụ, được sản xuất bằng cách sử dụng dòng tế bào người được biến đổi sử dụng $\alpha 2,3$ -sialyltransferaza. rhCG có thể chứa các axit sialic liên kết $\alpha 2,6$ ($\alpha 2,6$ sialyl hóa) được tạo ra bởi hoạt tính sialyl transferaza nội sinh. rhCG có thể được sản xuất bằng cách sử dụng $\alpha 2,3$ - và/hoặc $\alpha 2,6$ -sialyltransferaza, ví dụ được sản xuất bằng cách sử dụng dòng tế bào người được biến đổi sử dụng $\alpha 2,3$ -sialyltransferaza và/hoặc $\alpha 2,6$ -sialyltransferaza.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hCG tái tổ hợp hoặc chế phẩm hCG tái tổ hợp như được mô tả ở đây mà được sản xuất hoặc được biểu hiện bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

Cấu trúc rhCG chứa các gốc glycan. Sự phân nhánh có thể diễn ra với kết quả là glycan có thể có 1, 2, 3, 4 hoặc nhiều gốc đường tận cùng hoặc các "râu", như được biết rõ trong lĩnh vực này. rhCG theo các khía cạnh của sáng chế có thể có các glycan với các cấu trúc glycan một râu và/hoặc hai râu và/hoặc ba râu và/hoặc bốn râu. rhCG có thể gồm các cấu trúc glycan một râu và/hoặc hai râu và/hoặc ba râu và/hoặc bốn râu, ví dụ với lượng tương đối như sau: 0,1 đến 3% một râu; 65% đến 85% hai râu; 15 đến 25% ba râu và 0,5 đến 1,5% bốn râu (ví dụ, như được thể hiện bằng cách phân tích WAX đối với các glycan có điện tích).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa hCG tái tổ hợp (rhCG) có $\alpha 2,3$ -sialyl hóa và $\alpha 2,6$ -sialyl hóa, trong đó hCG tái tổ hợp này được sản xuất bằng các phương pháp và/hoặc các tế bào được bộc lộ ở đây. rhCG có thể có hàm lượng axit sialic [được biểu thị dưới dạng tỷ số giữa số mol axit sialic với số mol protein] từ 12 mol/mol đến 15,5 mol/mol, ví dụ từ 12 mol/mol đến 14,9 mol/mol (ví dụ như được nêu ở phần trên). rhCG có thể có hàm lượng axit sialic là 12,5 mol/mol đến 14,5 mol/mol, ví dụ, hàm lượng axit sialic từ 12,8 mol/mol đến 13,2 mol/mol. Tốt hơn là rhCG theo sáng chế có thể có hàm lượng axit sialic là 13 mol/mol.

Dược phẩm này cũng có thể chứa thêm FSH và/hoặc LH.

FSH có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. FSH như được sử dụng ở đây gồm FSH tái tổ hợp và thu được từ người. FSH thu được từ người có thể được tinh chế từ nguồn thích hợp bất kỳ (ví dụ, nước tiểu) bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. FSH có thể là FSH tái tổ hợp – ví dụ được biểu hiện trong dòng tế bào người. Các phương pháp biểu hiện và tinh chế FSH tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

LH có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. LH, như được sử dụng ở đây, gồm LH tái tổ hợp và thu được từ người. LH thu được từ người có thể được tinh chế từ nguồn thích hợp bất kỳ (ví dụ, nước tiểu) bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp biểu hiện và tinh chế LH tái tổ hợp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Dược phẩm có thể để, hoặc để sử dụng trong việc, điều trị chứng vô sinh, ví dụ để sử dụng trong, ví dụ, các công nghệ hỗ trợ sinh sản (assisted reproductive technologies - ART), gây rụng trứng hoặc bơm tinh trùng vào buồng tử cung (intrauterine insemination - IUI). Dược phẩm có thể để, hoặc để sử dụng trong việc, kích hoạt sự chín / rụng trứng và lutein hóa (hoàng thể hóa), kích thích phát triển nang trứng ở phụ nữ bị thiếu hụt LH và FSH trầm trọng, và/hoặc trong việc hỗ trợ hoàng thể (rhCG/rLH). Dược phẩm có thể để, hoặc để sử dụng trong việc, gây phát triển đơn nang ở phụ nữ không rụng trứng WHO Typ II (ví dụ, rhCG với rLH), để tăng cường đáp ứng đa nang với việc mỗi LH ở các bệnh nhân trải qua COH (ví dụ, rhCG với rLH), và để bổ sung vào COH để cải thiện tỷ lệ làm tổ/mang thai (ví dụ, rhCG với rLH), và/hoặc tăng tỷ lệ mang thai trong các công nghệ hỗ trợ sinh sản. Dược phẩm

này có thể là đề, hoặc để sử dụng trong việc, ngăn ngừa sự sảy thai, và/hoặc ngăn ngừa sự sinh non. Dược phẩm này có thể là đề, hoặc để sử dụng trong việc, điều trị bệnh lạc nội mạc tử cung.

Dược phẩm này có thể được sử dụng, ví dụ, trong các chỉ định y học mà trong đó các chế phẩm hCG đã biết được sử dụng. Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng rhCG và/hoặc chế phẩm rhCG được mô tả ở đây (theo các khía cạnh của sáng chế) đề, hoặc trong việc sản xuất thuốc để điều trị chứng vô sinh.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được phối chế thành các chế phẩm đã được biết rõ để dùng theo đường bất kỳ, ví dụ, qua đường miệng, qua trực tràng, ngoài đường tiêu hóa, qua da (ví dụ, công nghệ miếng dán), trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong bề, trong âm đạo, trong màng bụng, tại chỗ (bột, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ giọt) hoặc dưới dạng thuốc phun vào miệng hoặc mũi. Chế phẩm điển hình chứa chất mang được dụng, như dung dịch nước, tá dược không độc, gồm muối và các chất bảo quản, các chất đệm và các chất tương tự, như được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences fifteenth edition (Matt Publishing Company, 1975), ở các trang 1405 đến 1412 và 1461 – 87, và national formulary XIV fourteenth edition (American Pharmaceutical Association, 1975), v.v.. Ví dụ về các chất mang, chất pha loãng, dung môi hoặc chất dẫn dùng cho dược phẩm chứa nước hoặc không chứa nước thích hợp bao gồm nước, etanol, các rượu đa chức (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol và các rượu tương tự), carboxymetylxenluloza và các hỗn hợp thích hợp của chúng, các dầu thực vật (như dầu oliu), các este hữu cơ tiêm được như etyl oleat. Các chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa các chất phụ gia như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất bảo quản, các chất làm ướt, các chất nhũ hóa, và các chất làm phân tán. Các chất kháng khuẩn và các chất kháng nấm có thể được đưa vào để ngăn ngừa sự sinh trưởng của vi sinh vật và gồm, ví dụ, m-cresol, rượu benzylic, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và các chất tương tự. Hơn nữa, cũng có thể mong muốn chứa thêm các chất đẳng trương như đường, natri clorua và các chất tương tự.

Trong một số trường hợp, để có tác dụng kéo dài, mong muốn là làm chậm sự hấp thu hCG (và các thành phần hoạt tính khác, nếu có) từ việc tiêm dưới da hoặc trong cơ. Điều này có thể đạt được bằng cách sử dụng hỗn dịch lỏng chứa vật liệu tinh thể hoặc vô định hình với độ tan trong nước thấp. Tốc độ hấp thu hCG khi đó phụ thuộc vào tốc độ hòa tan của nó, tốc độ hòa tan này có thể phụ thuộc vào cỡ tinh thể và dạng

tinh thể. Theo cách khác, có thể đạt được sự hấp thu chậm đối với chế phẩm kết hợp hCG dùng ngoài đường tiêu hóa bằng cách hòa tan hoặc tạo hỗn dịch chế phẩm kết hợp hCG này trong chất dẫn dạng dầu. Dạng thuốc tiêm có thể được tạo ra bằng cách tạo nền vi nang hCG (và các chất khác, nếu có) trong các polyme có thể phân hủy sinh học như polylactit-polyglycolit. Tùy thuộc vào tỷ lệ hCG so với polyme và bản chất của polyme cụ thể được sử dụng, tốc độ giải phóng hCG có thể được kiểm soát. Ví dụ về các polyme có thể phân hủy sinh học khác gồm polyvinylpyrrolidon, poly(orthoeste), poly(anhydrit) v.v. Các chế phẩm tiêm được cũng được bào chế bằng cách bẫy hCG trong các liposom hoặc các vi nhũ tương mà tương thích với mô cơ thể. Các chế phẩm tiêm được có thể được khử trùng, ví dụ, bằng cách lọc qua bộ lọc giữ vi khuẩn lại, hoặc bằng cách kết hợp các chất khử trùng ở dạng chế phẩm rắn vô trùng mà có thể hòa tan được hoặc phân tán được trong nước vô trùng hoặc môi trường tiêm vô trùng khác ngay trước khi sử dụng. Các chế phẩm tiêm được có thể được cung cấp trong đồ chứa thích hợp bất kỳ, ví dụ, lọ, ống tiêm đã nạp trước, hộp thuốc tiêm, và các dạng tương tự.

Các chế phẩm (ví dụ, chế phẩm tiêm được) có thể được cung cấp dưới dạng sản phẩm có các dược phẩm chứa hCG (tùy ý với FSH, LH v.v.). Nếu có nhiều hơn một thành phần hoạt tính (tức là hCG và ví dụ, FSH hoặc LH) thì các thành phần hoạt tính này có thể thích hợp để dùng riêng rẽ hoặc cùng nhau. Nếu được dùng riêng rẽ, việc dùng có thể là theo tuần tự. Sản phẩm có thể được cung cấp trong gói thích hợp bất kỳ. Ví dụ, sản phẩm có thể chứa một số ống tiêm đã nạp trước hoặc lọ chứa hoặc là hCG, FSH, hoặc là kết hợp của cả FSH và hCG. Ống tiêm hoặc lọ có thể được đóng gói trong gói dạng phòng hoặc các phương tiện khác để duy trì sự vô trùng. Sản phẩm có thể tùy ý chứa các hướng dẫn để sử dụng các chế phẩm hCG và FSH.

Độ pH và nồng độ chính xác của các thành phần khác nhau của dược phẩm được điều chỉnh theo thực tiễn thông thường trong lĩnh vực này. Xem GOODMAN and GILMAN's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS, 7th ed. Theo phương án được ưu tiên, các chế phẩm theo sáng chế được cung cấp dưới dạng các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa. Các phương pháp chung để bào chế các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa đã được biết đến trong lĩnh vực này và được mô tả trong REMINGTON; THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, supra, ở các trang 780-820. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được cung

cấp dưới dạng chế phẩm lỏng hoặc dưới dạng chất rắn mà sẽ được trộn với môi trường tiêm được vô trùng ngay trước khi dùng. Theo một phương án, các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa được cung cấp dưới dạng đơn vị liều lượng để dễ dùng và làm đồng đều liều lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ 1 đến 7

Tổng quan về quy trình phát triển dòng tế bào

Plasmid đơn mang các chuỗi hCG alpha và beta, mỗi chuỗi được dẫn từ promotơ CMV riêng rẽ, được chuyển nhiễm vào các tế bào PER.C6® bằng phương pháp điện chuyển.

Plasmid này đã mang cassette gen kháng neomycin (Fig.4) cho phép chọn lọc các chất chuyển nhiễm sử dụng G418 (Geneticin). Các phần góp các chất chuyển nhiễm được nhân rộng và sau đó được đem tách dòng pha loãng hạn chế trong các đĩa 96 lỗ dưới sự chọn lọc G418. Các dòng tách dòng được nhân rộng và các khuẩn lạc biểu hiện cao được xác định dựa trên độ chuẩn hCG trong dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào.

Năm dòng dẫn đầu được chọn lọc, dựa trên năng suất cao, và sau đó mỗi dòng được chuyển nhiễm bằng plasmid thứ hai biểu hiện gen $\alpha 2,3$ -sialyltransferaza ST3GAL4 cùng với chỉ thị chọn lọc Hygromycin (Fig 5). Mỗi trong số năm phần góp chuyển nhiễm được nhân rộng và các dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào được đánh giá về nồng độ hCG và được động học (PK) *in vivo*.

Các phần góp nhiều triển vọng sau đó được đem thực hiện chu kỳ tách dòng pha loãng hạn chế khác. Các dòng thu được được nhân rộng và các dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào được đánh giá về nồng độ hCG và galactose lộ ra trên protein hCG (bằng phương pháp ELISA lectin). Các dòng có mức galactose lộ ra thấp được đem thực hiện các thử nghiệm khác bao gồm PK *in vivo*. Các dòng mà tạo ra hCG với biên dạng PK tối ưu, có mức galactose lộ ra thấp và biểu hiện protein ở mức cao được đánh giá và được chọn theo năng suất và các đặc tính sinh trưởng.

Ví dụ 1: Chọn lọc trình tự và các vector plasmit

Vùng gen mã hóa cho polypeptit hCG alpha được thể hiện trên Fig.1. Vùng gen mã hóa cho trình tự polypeptit hCG alpha được đề cập ở đây là SEQ ID NO: 1.

Vùng gen mã hóa cho polypeptit hCG beta được sử dụng theo Fiddes and Goodman (1980). Trình tự này được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu NP_000728 và là phù hợp với các trình tự protein CGbeta3, CGbeta5 và CGbeta7. Trình tự này được đề cập ở đây là SEQ ID NO: 2

Vùng gen mã hóa cho beta-galactosid alpha-2,3-sialyltransferaza 4 (α 2,3-sialyltransferaza, ST3GAL4) được sử dụng theo Kitagawa and Paulson (1994). Trình tự này được đặt trong ngân hàng dưới số hiệu L23767 và được đề cập ở đây là SEQ ID NO: 3.

Hai plasmit được sử dụng: plasmit thứ nhất, phCG, đồng biểu hiện các chuỗi hCG alpha và beta; và plasmit thứ hai biểu hiện gen sialyltransferaza ST3GAL4.

Ví dụ 2a: Cấu trúc của vector biểu hiện hCG

phCG là chuỗi alpha tổng hợp của hCG, được tối ưu hóa để sử dụng codon trong các tế bào động vật có vú gồm peptit tín hiệu hCG alpha tự nhiên. Nó có thể được xử lý bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Trình tự mã hóa của polypeptit hCG alpha (SEQ ID NO: 1) và polypeptit hCG beta (NP_000728, SEQ ID NO: 2) được khuếch đại bằng PCR sử dụng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2011/042688). ADN của phCG alpha được tiêu hóa với *Bam*HI và *Nhe*I và được chèn vào các vị trí *Bam*HI và *Nhe*I trên vector biểu hiện của động vật có vú được dẫn bằng CMV (vector Crucell pcDNA3002Neo). Vector này đặt gen này theo hướng chính xác để sự biểu hiện được dẫn dắt bằng promoter CMVie với tín hiệu BGH polyA xuôi chiều. Gen hCG beta tự nhiên chứa peptit tín hiệu tự nhiên được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *Asc*I và *Hpa*I và được chèn vào các vị trí *Asc*I và *Hpa*I nhờ đó sự biểu hiện sẽ được dẫn dắt bằng promoter CMVie thứ hai với tín hiệu BGH poly A xuôi chiều bổ sung. Khung vector này còn chứa chỉ thị kháng neomycin cũng như các yếu tố cần thiết để chọn lọc và sao chép trong các tế bào nhân sơ. Vector này được khuếch đại và được giải trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp chung đã biết trong lĩnh vực

này. Các trình tự của chuỗi hCG alpha được tối ưu hóa và chuỗi hCG beta tự nhiên (kiểu đại) lần lượt được đưa ra trên Fig.1 và Fig.2.

Tất cả các khuôn lặc được chọn để giải trình tự đều chứa các trình tự chính xác theo SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Plasmid phCG A+B được chọn để chuyển nhiễm (Fig.4).

Ví dụ 2b: Cấu trúc của vector biểu hiện ST3

Gen ST3GAL4 được biểu hiện trên pST3. Trình tự mã hóa của beta-galactosid alpha-2,3-sialyltransferaza 4 (ST3, L23767, SEQ ID NO: 3, Fig.3) được khuếch đại bằng PCR sử dụng kết hợp đoạn mồi 2,3STfw và 2,3STrev.

2,3STfw 5'-CCAGGATCCGCCACCATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGC-3'
2,3STrev 5'-TTTTTTTCTTAAGTCAGAAGGACGTGAGGTTCTTG-3'

ADN ST3 được khuếch đại thu được được tiêu hóa bằng các enzym giới hạn *Bam*HI và *Afl*III và được chèn vào các vị trí *Bam*HI và *Afl*III trên vector biểu hiện của động vật có vú được dẫn dắt bằng CMV, vector này mang chỉ thị kháng hygromycin (vector pcDNA3002Neo) nhờ đó nó được định vị xuôi chiều với promoter CMVie và ngược chiều với trình tự BGH polyA. Khung vector này còn chứa chỉ thị kháng hygromycin cũng như các yếu tố cần thiết để chọn lọc và sao chép trong các tế bào nhân sơ. Vector này được khuếch đại như đã được mô tả và được giải trình tự. Dòng pST3#1 (Fig.5) chứa trình tự chính xác theo SEQ ID NO: 3 và được chọn để chuyển nhiễm.

Ví dụ 3: Chuyển nhiễm plasmid

Plasmid phCG (Fig.4), mà có vị trí PvuI đơn nằm trong gen beta-lactamaza nhân sơ, được duỗi thẳng với PvuI (New England Biolabs Cat. No. R0150). ADN plasmid duỗi thẳng được chuyển nhiễm vào các tế bào PER.C6® như sau.

Các môi trường nuôi cấy tế bào được giữ trong môi trường PERMAB đầy đủ (CD4PERMAB (Hyclone Cat. No. SH30871.01) được bổ sung bằng L-glutamin đến nồng độ cuối cùng là 3mM (Invitrogen Cat. No. 25030-123) và Pluronic F68 ở nồng độ cuối cùng là 1,0g/L (Invitrogen Cat. No. 24040-032) trong bình Erlenmeyer dung tích 250ml. Các tế bào được giữ trong tủ áp lực (Kuhner Climo-shaker ISF1-X) điều chỉnh ở tốc độ lắc 100 vòng/phút, 5% CO₂ và 37°C, trong ít nhất 14 ngày trước khi

chuyển nhiễm. 48 giờ trước khi chuyển nhiễm, các tế bào được chuyển vào môi trường mới ở mật độ $0,5 \times 10^6$ tế bào/ml.

Vào ngày chuyển nhiễm, các tế bào được đếm trong thiết bị Beckman Coulter ViCell XR để xác định mật độ tế bào và để đảm bảo khả năng sống sót là $>90\%$. Các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm và tái tạo huyền phù trong môi trường PERMAB mới trước khi được trộn với ADN pHCG đuổi thẳng. Hỗn hợp tế bào/ADN được sốc điện trong khoang của máy xung điện được điều chỉnh ở điện áp 250V trong 5 mili giây (ms), trước khi được nhanh chóng chuyển vào 10ml môi trường PERMAB đã được làm ấm trước. Quy trình này được lặp lại tổng cộng 6 lần và toàn bộ 6 dịch chuyển nhiễm được gộp lại vào một bình nuôi cấy mô T-175cm². Bình này được đặt trong tủ áp tĩnh được điều chỉnh ở 37°C, 5% CO₂. Sau 48 giờ, các tế bào được tái tạo huyền phù trong thể tích thích hợp của môi trường PERMAB chọn lọc (môi trường PERMAB đầy đủ + G418 (125µg/ml)) để thu được mật độ tế bào sống sót là $0,5 \times 10^6$ /ml.

Môi trường gộp lại này được cấy chuyển hai lần mỗi tuần, duy trì tế bào ở mật độ $0,3 \times 10^6$ tế bào/ml trong môi trường chọn lọc cho đến khi khả năng sống sót tế bào gia tăng đến $>50\%$. Tại thời điểm này, các tế bào được chuyển vào môi trường nuôi cấy lắc trong bình Erlenmeyer dung tích 250ml. Sau vài tuần trong môi trường nuôi cấy lắc, dịch nổi gộp lại được lấy mẫu và phân tích nồng độ hCG. Khi đã xác minh rằng phần góp là dương tính đối với sự biểu hiện hCG, các tế bào được chuẩn bị để tác dòng pha loãng hạn chế.

Huyền phù tế bào ở mức 0,3 tế bào sống sót được/ml được chuẩn bị trong môi trường PERMAB được bổ sung G-418 ở nồng độ 125µg/ml. Huyền phù tế bào được phân phối vào các đĩa nuôi cấy mô đáy bằng 96 lỗ ở mức 200µl/lỗ và được ủ trong khí quyển ẩm ở 37°C, 5% CO₂ (Binder CB150). Các đĩa được quét đều đặn sử dụng thiết bị Genetix Clone Select Imager để theo dõi sự sinh trưởng của các tế bào trong mỗi lỗ.

Sau hai tuần, 535 lỗ được xác định rằng chứa các khuẩn lạc tế bào sinh trưởng tích cực. Các dịch nổi từ các lỗ này được lấy mẫu và được phân tích hCG bằng cách sử dụng kit có bán trên thị trường (DRG diagnostics HCG ELISA Cat. No. EIA1469). Dựa vào các kết quả từ các thử nghiệm này, tổng cộng 162 trong số các khuẩn lạc

được chuyển vào các đĩa 24 lỗ chứa 0,5ml môi trường PERMAB chọn lọc/lỗ. Khi các tế bào trong các lỗ là gần đến mức hợp dòng, dịch nổi từ mỗi lỗ trong 162 lỗ được lấy mẫu và được phân tích các mức hCG. Dựa trên các kết quả này, 91 trong số các dòng tế bào biểu hiện tốt nhất được chọn để nhân rộng vào các bình T-25. Các dòng tế bào này được sinh trưởng lần nữa đến mức gần hợp dòng, tại thời điểm đó, các dịch nổi được lấy mẫu và được phân tích hCG như trên. Dựa vào các kết quả này, 58 dòng tế bào biểu hiện tốt nhất được nhân rộng vào các bình T-75. Phân tích tốc độ sản xuất đặc hiệu (Specific production rate - SPR) được thực hiện đối với mỗi trong số 58 dòng tế bào này bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và năng suất đặc hiệu được biểu hiện theo pg/tế bào/ngày.

Do đó, trong ví dụ này, plasmit kết hợp với các chuỗi hCG alpha và beta được chuyển nhiễm vào các tế bào PER.C6® và các chất chuyển nhiễm được chọn bằng cách sử dụng môi trường chứa G418. Các khuẩn lạc tế bào sinh trưởng được sàng lọc dựa trên nồng độ hCG trong dịch nổi và các khuẩn lạc biểu hiện mức cao nhất được nhân rộng tiếp. Sau các chu kỳ nhân rộng và sàng lọc tiếp theo, 20 dòng mà biểu hiện hCG được chọn để nghiên cứu sự sinh trưởng và năng suất. Dựa trên các kết quả của các nghiên cứu này, 5 dòng được chọn để chuyển nhiễm với plasmit thứ hai kết hợp gen ST3GAL4.

Ví dụ 4: Chuyển nhiễm với plasmit ST3GAL4 pST3

Các dòng ổn định được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 3.

Năm dòng tốt nhất được sản xuất bằng phương pháp như được mô tả trong ví dụ 3 được chọn để chuyển nhiễm với plasmit ST3GAL4 pST3 (xem Ví dụ 2, Fig.3 và 5). Việc chuyển nhiễm được thực hiện bằng cách điện chuyển sử dụng phương pháp giống như được mô tả trong ví dụ 3, ngoại trừ việc các chất biến nạp được chọn trong môi trường PERMAB đầy đủ được bổ sung Hygromycin ở nồng độ 0,5µg/ml thay cho G418. Sử dụng phương pháp này, thu được năm phân góp biểu hiện hCG.

Các mẫu dịch nổi từ các phân góp chuyển nhiễm được đánh giá trong mô hình được động học ở chuột cống và, dựa vào số liệu này cùng với số liệu từ thử nghiệm gắn kết RCA-lectin (đo mức galactosa lộ ra trên các chuỗi hCG), phân góp duy nhất được chọn để tách dòng pha loãng hạn chế tiếp, bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Việc tách dòng pha loãng này đạt được >600 dòng, mỗi dòng cũng được sàng lọc về sự biểu hiện hCG và mức độ galactosa lộ ra như được đo bằng phương pháp gắn kết RCA-lectin. Các dòng với mức galactosa lộ ra thấp nhất được nhân rộng tiếp và các mẫu được đem thử nghiệm PK *in vivo* và chứng thực số liệu gắn kết lectin. Năm dòng thu được từ phần góp duy nhất này được đánh giá tiếp về các đặc tính sinh trưởng và năng suất.

Mỗi trong số các dòng này được nhân rộng và ngân hàng tế bào gốc giống được tạo ra theo quy trình bảo quản đông lạnh chuẩn. Các tế bào gốc từ ngân hàng tế bào gốc giống được rã đông và được phát hiện là có thể sống sót.

Ví dụ 5: Phân tích bằng kỹ thuật hội tụ đẳng điện (isoelectric focussing).

Điện di được định nghĩa là sự vận chuyển các phân tử có điện tích qua dung môi bằng điện trường. Khả năng di động của phân tử sinh học qua điện trường sẽ phụ thuộc vào trường lực, điện tích toàn phần trên phân tử, cỡ và hình dạng phân tử, cường độ ion và các tính chất của môi trường mà các phân tử di chuyển qua nó.

Hội tụ đẳng điện (Isoelectric focusing - IEF) là kỹ thuật điện di để tách các protein dựa trên pI của chúng. pI là độ pH tại đó protein không có điện tích toàn phần và sẽ không di chuyển trong điện trường. Hàm lượng axit sialic của các isoform hCG làm thay đổi nhẹ điểm pI đối với mỗi isoform, điều này có thể được khai thác bằng cách sử dụng kỹ thuật này để hiển thị hóa các isoform hCG Per.C6 từ mỗi dòng.

Các điểm đẳng điện của các isoform hCG được tạo ra từ Per.C6 được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật hội tụ đẳng điện. hCG Per.C6 được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 6. Các mẫu hCG Per.C6 được tách trên các gel IEF Novex® chứa 5% polyacrylamit trong các điều kiện tự nhiên trên gradien độ pH bằng 3,0 đến 7,0 trong dung dịch chất điện ly lưỡng tính có độ pH bằng 3,0 đến 7,0. Các protein được hiển thị bằng cách nhuộm xanh Coomassie, sử dụng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Fig.6 thể hiện sự phát hiện các Isoform rhCG bằng kỹ thuật IEF được nhuộm với xanh Coomassie trong các chế phẩm được sản xuất theo sáng chế từ các dòng tế bào đã được tách dòng bằng phương pháp nêu trong ví dụ 6 (Các vạch 4, 5, 6 và 7, 15µg mỗi vạch); chế phẩm thu được từ CHO trong lĩnh vực này, Ovitrelle (Vạch 2, 15µg); và sản phẩm từ nước tiểu người thu được từ phụ nữ mang thai, Novarel (Vạch

3, 15 μ g). Các dải thể hiện các isoform của hCG chứa số lượng phân tử axit sialic khác nhau. Fig.6 chỉ ra rằng hCG tái tổ hợp thu được từ dòng tế bào người được xử lý với α 2,3- sialyltransferaza (các chế phẩm theo sáng chế) có tính axit nhiều hơn so với Ovitrelle và hCG từ nước tiểu của phụ nữ mang thai.

Fig.7 so sánh nồng độ của hCG (“alpha-beta hCG”) và chuỗi beta tự do (“beta hCG”) được sản xuất bằng cách sử dụng các tế bào theo sáng chế (tức là sử dụng các dòng tế bào được tạo ra bằng phương pháp được nêu trong các ví dụ 1 đến 4) mà chứa phân đơn vị alpha “được tối ưu hóa”, so với nồng độ của hCG (“alpha-beta hCG”) và chuỗi beta tự do (“beta hCG”) được sản xuất trong các tế bào ví dụ so sánh chứa phân đơn vị alpha kiểu dại (wild-type - WT). Fig.7 thể hiện rằng các tế bào theo sáng chế biểu hiện lượng hCG cao và lượng dư phân đơn vị beta tự do thấp. Nói cách khác, hiệu suất và độ tinh khiết của hCG tái tổ hợp được tạo ra bằng các tế bào và các phương pháp theo sáng chế đã được cải thiện rõ rệt.

Bảng A thể hiện phần trăm của phân đơn vị β -hCG tự do trong các mẫu bán tinh khiết của các mẻ hCG khác nhau được sản xuất bằng cách sử dụng các tế bào theo sáng chế (tức là, sử dụng các dòng tế bào được tạo ra bằng phương pháp được nêu trong các ví dụ 1 đến 4) mà chứa phân đơn vị alpha “được tối ưu hóa” (“Opt. alpha hCG”), so với phần trăm của phân đơn vị β -hCG tự do trong các mẫu bán tinh khiết của hCG được sản xuất trong các tế bào ví dụ so sánh chứa phân đơn vị alpha WT (kiểu dại) (“WT alpha hCG”), như được xác định bằng phương pháp sắc ký HPLC Phenyl-5PW kỵ nước.

Bảng A thể hiện rằng các tế bào theo sáng chế biểu hiện lượng hCG cao và lượng dư phân đơn vị beta tự do khá thấp (5,7 đến 10,6%) so với các tế bào chứa phân đơn vị alpha WT (64 đến 66%). Nói cách khác, hiệu suất và độ tinh khiết của hCG tái tổ hợp được tạo ra bằng các tế bào và các phương pháp theo sáng chế đã được cải thiện rõ rệt.

Bảng A

Dòng	% β -hCG tự do (PHE – 5PW)
WT alpha hCG (1G2)	64,1
WT alpha hCG (1G2)	66,0
Opt. alpha hCG (13,8)	5,7
Opt. alpha hCG (29)	7,5
Opt. alpha hCG (29)	6,6
Opt. alpha hCG (29)	10,6

Ví dụ 6: Tổng quan về sản xuất và tinh chế

Quy trình được phát triển để sản xuất hCG tái tổ hợp trong các tế bào PER.C6, các tế bào này được nuôi cấy dưới dạng huyền phù trong môi trường không chứa huyết thanh. Quy trình này được mô tả dưới đây và được áp dụng cho một số dòng tế bào PER.C6 sản xuất hCG.

hCG tái tổ hợp từ dòng được chuyển nhiễm α 2,3-sialyltransferaza được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp nêu trong các ví dụ 1 đến 4 trên đây.

Các tế bào được sinh trưởng trong các bình lắc trong môi trường 6GRO (SAFC) cho đến khi đạt được mật độ tế bào là 1×10^6 đến 3×10^6 tế bào/ml. Các tế bào này được chuyển vào thùng phản ứng sinh học bằng thủy tinh được khuấy, dung tích 5L với mật độ khoảng 1×10^6 tế bào/ml. Thùng phản ứng này làm việc theo phương thức truyền dịch sử dụng môi trường Proper1 (Lonza).

Sau đó, thực hiện tinh chế sản phẩm rhCG bằng cách sử dụng các bước siêu lọc khác nhau, sắc ký bất giữ trao đổi anion và cation, sắc ký kỵ nước và sắc ký giả ái lực, bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Trong tất cả các quy trình sắc ký, sự có mặt của hCG tái tổ hợp phản ứng miễn dịch được xác nhận bằng kỹ thuật ELISA (DRG EIA 1469) và IEF (Ví dụ 5).

Ví dụ 7: Hàm lượng axit sialic

Axit sialic là hydrat cacbon gắn kết với protein được xem như là mono-sacarit và xuất hiện kết hợp với các mono-sacarit khác như galactosa, manosa, glucosamin, galactosamin và fucosa. Axit sialic tổng trên rhCG đã tinh chế theo sáng chế được đo bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên phương pháp của Stanton *et. al.* (J. Biochem. Biophys. Methods. 30 (1995), 37 – 48).

Hàm lượng axit sialic tổng của các mẫu hCG tái tổ hợp Per.C6 được biến đổi bằng α 2,3- sialyltransferaza (được sản xuất bằng các phương pháp nêu trong ví dụ 4 và 6) được đo và kết quả được thể hiện trong bảng 1 dưới đây [được biểu thị dưới dạng tỷ lệ giữa số mol axit sialic với số mol protein].

Ví dụ 8: Thử nghiệm sinh học hCG theo USP

Thử nghiệm sinh học hCG được thực hiện, để xác định hoạt tính đặc hiệu của hCG, đối với mỗi mẫu trong số các mẫu nêu trong bảng 1 dưới đây. Hoạt tính được đo theo USP (USP Monographs: Chorionic Gonadotropin, USPC Official 8/1/09-11/30/09), sử dụng Ovitrelle làm chuẩn. Ovitrelle có hoạt tính sinh học là 26.000 IU/mg (Curr Med Res Opin. 2005 Dec; 21(12): 1969 – 76). Giới hạn chấp nhận được là >21.000 IU hCG/mg. Hoạt tính sinh học đối với các mẫu hCG tái tổ hợp thu được từ dòng tế bào người được xử lý bằng α 2,3- sialyltransferaza được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1

Mẫu	1	2	3	4	5	6
Hàm lượng axit sialic (SA) (μ mol SA/ μ mol hCG)	13	13	13	13	13	15
Hiệu lực IU/mg	25363	25009	24904	24623	25645	26623
Hiệu lực % (Ovitrelle 26000 IU/mg)	97,5	96,2	95,8	94,7	98,6	102,4
Mẫu	7	8	9	10	11	
Hàm lượng axit sialic (SA) (μ mol SA/ μ mol hCG)	14	14	13	13	13	
Hiệu lực IU/mg	27227	26142	26539	26181	24230	
Hiệu lực % (Ovitrelle 26000 IU/mg)	104,7	100,5	102	101	93,2	

Như thấy được trên đây, hiệu lực là tương tự, và có thể lớn hơn hiệu lực của Ovitrelle (xem, ví dụ, mẫu 7).

Tài liệu viện dẫn

Andersen CY, Westergaard LG, and van Wely M. (2004). FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? *Reprod Biomed Online*. 9(2), 231-236.

Bassett RM, and Driebergen R. (2005). Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online*. 10(2), 169-177.

D'Antonio M., Borrelli F. , Datola A., Bucci R. , Mascia M. , Polletta P., Piscitelli D., and Papoian R. (1999) Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Human Reproduction* 14, 1160-1167

Fiddes, J. C. and Goodman, H. M. (1979) Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281, 351-356.

Fiddes, J. C. and Goodman, H. M. (1980) The cDNA for the beta-subunit of human chorionic gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. *Nature*, 286, 684-387.

Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N, and Kobata A. (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of natural human interferon-beta 1 and recombinant human interferon-beta 1 produced by three different mammalian cells. *J Biol Chem*. 263(33), 17508-17515.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1), 265-75.

Lowry, PJ, McLean, C, Jones RL and Satgunasingam N. (1976) Purification of anterior pituitary and hypothalamic hormones *Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*. 7, 16-21.

Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA and Rudd PM (2006) *Methods in Molecular Biology*, ed I Brockhausen-Schutzbach (Humana Press), 347: Glycobiology protocols, 125-144.

Steelman SL, and Pohley FM. (1953) Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 53(6), 604-616.

Svensson EC, Soreghan B, and Paulson JC. (1990) Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem*. 265(34):20863-20868.

Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, and Kobata A (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 263(8), 3657-3663.

Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, and Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*. 16(6), 765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, and Nayudu P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biol Reprod*. 69(2), 379-389.

hCG alpha được tối ưu hóa

Trình tự nucleotit của hCG alpha được tối ưu hóa (SEQ ID NO: 1)

```

1  ATGGACTACT ACCGGAAGTA CGCCGCCATC TTCCTGGTGA
CCCTGAGCGT GTTCCTGCAC
61  GTGCTGCACA GCGCCCCTGA CGTGCAGGAC TGCCCCGAGT
GCACCCTGCA GGAAAACCCC
121 TTCTTCAGCC AGCCTGGCGC CCCTATCCTG CAGTGCATGG
GCTGCTGCTT CAGCAGAGCC
181 TACCCACCCC CCCTGCGGAG CAAGAAAACC ATGCTGGTGC
AGAAAAACGT GACCAGCGAG
241 AGCACCTGCT GCGTGGCCAA GAGCTACAAC CGGGTGACCG
TGATGGGCGG CTTCAAGGTG
301 GAGAACCACA CCGCCTGCCA CTGCAGCACC TGCTACTACC
ACAAGTCCT

```

Trình tự protein của hCG alpha được tối ưu hóa

```

1  MDYYRKYAAI FLVTLNVFLH VLHSAPDVQD CPECTLQENP
FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA
61  YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV
ENHTACHCST CYYHKS

```

Polypeptit beta Chorionic Gonadotrophin của người

Số hiệu truy cập NP_000728

Trình tự nucleotit của hCG beta (SEQ ID NO: 2)

Trình tự nucleotit

```

1  ATGGAGATGT TCCAGGGGCT GCTGCTGTTG CTGCTGCTGA
GCATGGGCGG GACATGGGCA

```

61 TCCAAGGAGC CGCTTCGGCC ACGGTGCCGC CCCATCAATG
 CCACCCTGGC TGTGGAGAAG
 121 GAGGGCTGCC CCGTGTGCAT CACCGTCAAC ACCACCATCT
 GTGCCGGCTA CTGCCCCACC
 181 ATGACCCGCG TGCTGCAGGG GGTCTGCCG GCCCTGCCTC
 AGGTGGTGTG CAACTACCGC
 241 GATGTGCGCT TCGAGTCCAT CCGGCTCCCT GGCTGCCCCG
 GCGGCGTGAA CCCCCTGGTC
 301 TCCTACGCCG TGGCTCTCAG CTGTCAATGT GCACTCTGCC
 GCCGCAGCAC CACTGACTGC
 361 GGGGGTCCCA AGGACCACCC CTTGACCTGT GATGACCCCC
 GCTTCCAGGA CTCCTCTTCC
 421 TCAAAGGCC CTCCCCCAG CCTTCCAAGT CCATCCCGAC
 TCCCGGGGCC CTCGGACACC
 481 CCGATCCTCC CACAATAA

Trình tự protein của hCG beta

1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK
 EGCPVCITVN TTICAGYCPT
 61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV
 SYAVALSCQC ALCRRSTTDC
 121 GGP KDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

Beta-galactosid alpha-2,3-sialyltransferaza 4

Số hiệu truy cập L23767

Trình tự nucleotit của ST3GAL4 (SEQ ID NO: 3)

1 ATGTGTCCTG CAGGCTGGAA GCTCCTGGCC ATGTTGGCTC
 TGGTCCTGGT CGTCATGGTG

61 TGGTATTCCA TCTCCCGGGA AGACAGGTAC ATCGAGCTTT
TTTATTTTCC CATCCCAGAG

121 AAGAAGGAGC CGTGCCTCCA GGGTGAGGCA GAGAGCAAGG
CCTCTAAGCT CTTTGGCAAC

181 TACTCCCGGG ATCAGCCCAT CTCCTGCGG CTTGAGGATT
ATTTCTGGGT CAAGACGCCA

241 TCTGCTTACG AGCTGCCCTA TGGGACCAAG GGGAGTGAGG
ATCTGCTCCT CCGGGTGCTA

301 GCCATCACCA GCTCCTCCAT CCCCAAGAAC ATCCAGAGCC
TCAGGTGCCG CCGCTGTGTG

361 GTCGTGGGGA ACGGGCACCG GCTGCGGAAC AGCTCACTGG
GAGATGCCAT CAACAAGTAC

421 GATGTGGTCA TCAGATTGAA CAATGCCCCA GTGGCTGGCT
ATGAGGGTGA CGTGGGCTCC

481 AAGACCACCA TCGTCTCTT CTACCCTGAA TCTGCCCACT
TCGACCCCAA AGTAGAAAAC

541 AACCCAGACA CACTCCTCGT CCTGGTAGCT TTCAAGGCAA
TGGACTTCCA CTGGATTGAG

601 ACCATCCTGA GTGATAAGAA GCGGGTGCGA AAGGGTTTCT
GGAAACAGCC TCCCCTCATC

661 TGGGATGTCA ATCCTAAACA GATTCGGATT CTCAACCCCT
TCTTCATGGA GATTGCAGCT

721 GACAAACTGC TGAGCCTGCC AATGCAACAG CCACGGAAGA
TTAAGCAGAA GCCCACCACG

781 GGCCTGTTGG CCATCACGCT GGCCCTCCAC CTCTGTGACT
TGGTGCACAT TGCCGGCTTT

841 GGCTACCCAG ACGCCTACAA CAAGAAGCAG ACCATTCACT
ACTATGAGCA GATCACGCTC

901 AAGTCCATGG CGGGGTCAGG CCATAATGTC TCCAAGAGG
CCCTGGCCAT TAAGCGGATG

961 CTGGAGATGG GAGCTATCAA GAACCTCACG TCCTTCTGA

Trình tự protein của ST3GAL4

```

1  MCPAGWKLLA  MLALVLVVMV  WYSISREDRY  IELFYFPIPE
KKEPCLQGEA ESKASKLFGN
61  YSRDQPIFLR  LEDYFWVKTP  SAYELPYGTK  GSEDLLLRVL
AITSSSIPKN IQSLRCRRCV
121  VVGNGHRLRN  SSLGDAINKY  DVVIRLNNAP  VAGYEGDVGS
KTTMRLFYPE SAHFDPKVEN
181  NPDTLLVLVA  FKAMDFHWIE  TILSDKKRVR  KGFWKQPPLI
WDVNPQKQIRI LNPFFMEIAA
241  DKLLSLPMQQ  PRKIKQKPTT  GLLAITLALH  LCDLVHIAGF
GYPDAYNKKQ TIHYEQITL
301  KSMAGSGHNV  SQEALAIKRM  LEMGAIKNLT  SF

```

Chuỗi hCG alpha được tối ưu hóa

Trình tự nucleotit của chuỗi hCG alpha được tối ưu hóa (SEQ ID NO: 4)

```

1  GCCCCTGACG  TGCAGGACTG  CCCCAGAGTGC  ACCCTGCAGG
AAAACCCCTT CTTCAGCCAG
61  CCTGGCGCCC  CTATCCTGCA  GTGCATGGGC  TGCTGCTTCA
GCAGAGCCTA CCCCACCCCC
121  CTGCGGAGCA  AGAAAACCAT  GCTGGTGCAG  AAAAACGTGA
CCAGCGAGAG CACCTGCTGC
181  GTGGCCAAGA  GCTACAACCG  GGTGACCGTG  ATGGGCGGCT
TCAAGGTGGA GAACCACACC
241  GCCTGCCACT  GCAGCACCTG  CTACTACCAC  AAGTCCT

```

Trình tự protein của chuỗi hCG alpha được tối ưu hóa

```

1  APDVQDCPEC  TLQENPFFSQ  PGAPILQCMG  CCFSRAYPTP
LRSKKTMLVQ KNVTSSESTCC

```


61 VAKSYNRVTV MGGFKVENHT ACHCSTCYHH KS

Polypeptit hCG alpha

Số hiệu truy cập AH007338

Trình tự nucleotit của hCG alpha (SEQ ID NO: 5)

1 ATGGATTACT ACAGAAAATA TGCAGCTATC TTTCTGGTCA
CATTGTCGGT GTTTCTGCAT

61 GTTCTCCATT CCGCTCCTGA TGTGCAGGAT TGCCCAGAAT
GCACGCTACA GGAAAACCCA

121 TTCTTCTCCC AGCCGGGTGC CCCAATACTT CAGTGCATGG
GCTGCTGCTT CTCTAGAGCA

181 TATCCCACTC CACTAAGGTC CAAGAAGACG ATGTTGGTCC
AAAAGAACGT CACCTCAGAG

241 TCCAATTGCT GTGTAGCTAA ATCATATAAC AGGGTCACAG
TAATGGGGGG TTTCAAAGTG

301 GAGAACCACA CGGCGTGCCA CTGCAGTACT TGTTATTATC
ACAAATCTTA A

Trình tự protein của hCG alpha

1 MDYYRKYAAI FLVTLVFLH VLHSAPDVQD CPECTLQENP
FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA

61 YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE STCCVAKSYN RVTVMGGFKV
ENHTACHCST CYHHKS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Trình tự polynucleotit chứa trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO: 1; hoặc trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 1.
2. Trình tự polynucleotit chứa trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO: 4; hoặc trình tự axit nucleic có độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97% với axit nucleic có trình tự SEQ ID NO: 4.
3. Tế bào, khác biệt ở chỗ, tế bào này chứa trình tự được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi α của hCG được chọn từ: trình tự theo SEQ ID NO: 1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO:1; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 97% với trình tự SEQ ID NO:1; trình tự theo SEQ ID NO. 4; trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 96,5% với trình tự SEQ ID NO: 4; và trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 97% với trình tự SEQ ID NO:4.
4. Tế bào theo điểm 3, trong đó tế bào này là tế bào PER.C6®.
5. Tế bào theo điểm 3 hoặc 4, khác biệt ở chỗ, tế bào này còn chứa cADN được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa alpha-2,3-sialyltransferaza.
6. Tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5, khác biệt ở chỗ, tế bào này còn chứa trình tự axit nucleic được hợp nhất vào hệ gen của nó mã hóa cho chuỗi β của hCG.
7. Phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp trong tế bào, bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 6 trong môi trường thích hợp và thu hoạch protein tái tổ hợp từ tế bào này và/hoặc môi trường này.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó protein tái tổ hợp là hCG.

alpha signal																opt alpha chain																							
M	D	Y	Y	R	K	Y	A	I	F	L	V	T	L	S	V	F	L	H	V	L	H	S	A	P	D	V	Q	D	C	P	E	C	T	L	Q	E	N	P	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TTTCTTACGACGCTGGGCGCCCTATCTCTGCGTGCATGGGCTGCTCTTCAGCAGAGCCCTCCACCCCTGGGGAGGAGGAAAACATCTGCTGTCAGAAAAAGTGTACCCAGGACG																																							
alpha signal																opt alpha chain																							
F	F	S	Q	P	G	A	P	I	L	Q	C	M	G	C	C	F	S	R	A	Y	P	T	P	L	R	S	K	K	T	M	L	V	Q	K	N	V	T	S	E
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
AGCACCTGCTGCTGGCCGAAAGAGCTACACCGGGTGCACCGTGAATGGGCGGCTTCAAGTGGAGAAACACACCGGCTGGCCATCTGCAGACACCTGCTACTACCAACAGTCTCT																																							
alpha signal																opt alpha chain																							
S	T	C	C	V	A	K	S	Y	N	R	V	T	V	M	G	G	F	K	V	E	N	H	T	A	C	H	C	S	T	C	Y	Y	H	K	S				
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92				

atggagatgctccagggtgatgtttcgtgtgctgagcatggcgacatgggcattccaaggaagcgcgttcggcacagggtgccgcccataaat																																
beta signal wt beta chain																																
M	E	M	F	Q	G	L	L	L	L	S	M	G	T	W	A	S	K	E	P	L	R	P	R	C	R	P	I	N				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
caaccctggctgtggagaaggagggtgccccgtgtgcatacccgtaaacacacacacatatgtgcgggtactgccccacacatgaccccgctgtgcagg																																
wt beta chain																																
A	T	L	A	V	E	K	E	G	C	P	V	C	I	T	V	N	T	I	C	A	G	Y	C	P	T	M	T	R	V	L	O	G
34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
ggctectgcggacctgcctcaggttgtgcacaactacggcgatgtggcttcgagtcacatccggctccctggctgccccggcgggcggtgaaaccccgctgttgc																																
wt beta chain																																
V	L	P	A	L	P	Q	V	V	C	N	Y	R	D	V	R	F	E	S	I	R	L	P	G	C	P	R	G	V	N	P	V	V
68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
tctaagcgcgtggctatcagctgtcaatgtgaacttgccgcgcgcgcgcgcacacactgaatggcgggggtcccaaggacacaccccttgacctgtgatgaccccc																																
wt beta chain																																
S	Y	A	V	A	I	S	C	Q	C	A	L	C	R	R	S	T	I	D	C	G	G	P	K	D	H	P	L	T	C	D	D	P
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133
gctccaggactcatcttcccaaaggccccctccccagccttcccaagtccatccccgaactccccgggggcctccggacacccccgatctctccacacataagt																																
wt beta chain																																
R	F	Q	Q	S	S	S	S	K	A	P	P	P	S	L	P	S	P	S	R	L	P	G	P	S	D	T	P	I	L	P	Q	
134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166

[illegible]

Fig.4 và Fig.5: Các bản đồ plasmit của các vector biểu hiện phCGalpha/beta và pST3. CMV = promoter cytomegalovirus, BGHp(A) = trình tự poly-adenyl hóa hormon sinh trưởng bò (Bovine Growth Hormone poly-adenylation), fl ori = gốc sao chép fl, SV40 = promoter Simian Virus 40, Neo = chỉ thị kháng Neomycin, Hyg = chỉ thị kháng Hygromycin, SV40 p(A) = trình tự poly-adenyl hóa Simian Virus 40, hCG α = polypeptit alpha gonadotropin màng đệm ở người, hCG β = polypeptit beta gonadotropin màng đệm ở người, ST3GAL4 = α 2,3-sialyltransferaza, ST6GAL1 = α 2,6-sialyltransferaza, CoIE1 = gốc sao chép CoIE1, Amp = chỉ thị kháng ampicillin.

Fig.4. Vector biểu hiện phCG

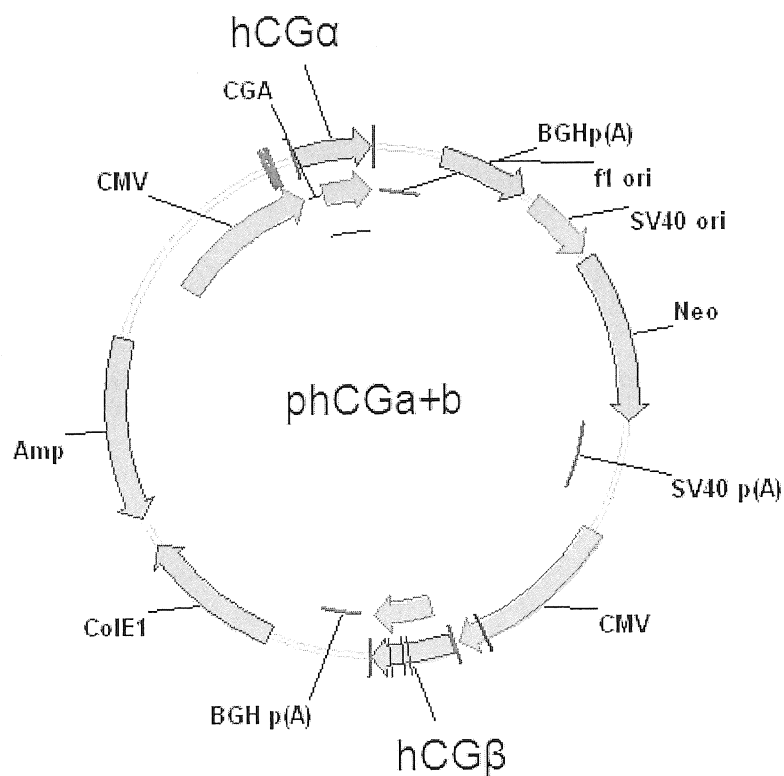


Fig.5. Vector biểu hiện α 2,3-sialyltransferaza (ST3GAL4)

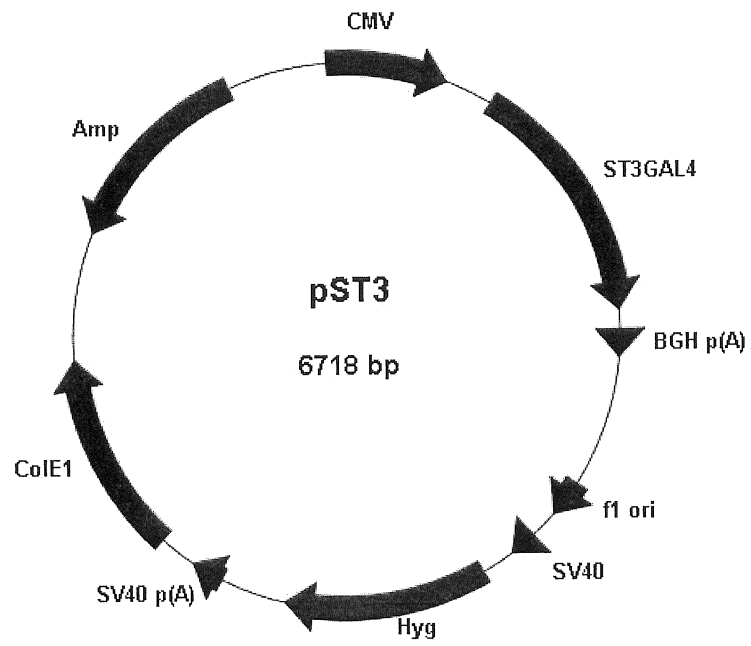


Fig.6: thể hiện sự phát hiện các Isoform rhCG bằng kỹ thuật IEF được nhuộm với xanh Coomassie trong các chế phẩm theo sáng chế (Các vạch 4, 5, 6 và 7, 15 μ g mỗi vạch); chế phẩm thu được từ CHO trong lĩnh vực này, Ovitrelle (Vạch 2, 15 μ g); và sản phẩm từ nước tiểu người thu được từ phụ nữ mang thai, Novarel (Vạch 3, 15 μ g); chỉ thị IEF (Vạch 1 (tính từ đỉnh, pI lần lượt là: 7,0, 6,8, 6,5, 6,0, 5,1 và 4,75))

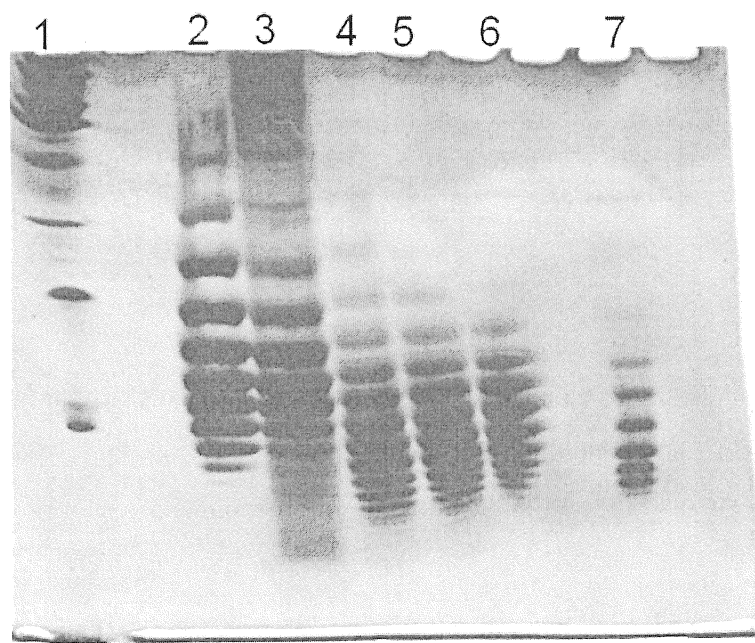
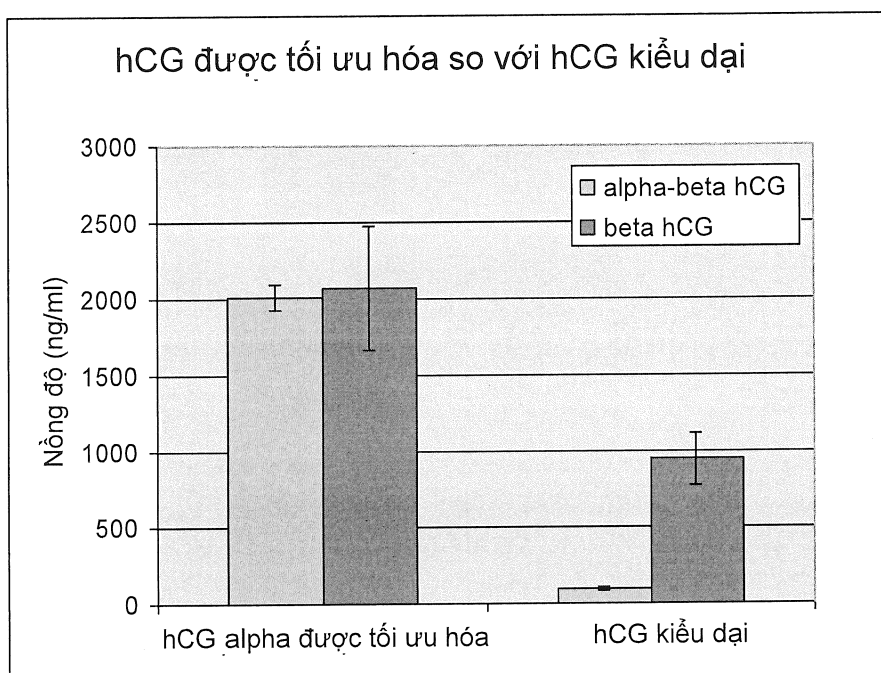


Fig.7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ferring Pharmaceutical A/S

<120> TRÌNH TỰ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA CHUỖI ALPHA CỦA hCG, TẾ BÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN TÁI TỔ HỢP TRONG TẾ BÀO NÀY

<130> P/68899.WO01

<150> 15164965.4

<151> 2015-04-24

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 349

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 1
 atggactact accggaagta cgccgccatc ttcttggtga ccctgagcgt gttcctgcac 60
 gtgctgcaca ggcgccctga cgtgcaggac tgccccgagt gcaccctgca ggaaaacccc 120
 ttcttcagcc agcctggcgc ccctatcctg cagtgcattg gctgctgctt cagcagagcc 180
 taccacaccc ccctgcggag caagaaaacc atgctggtgc agaaaaacgt gaccagcgag 240
 agcacctgct gcggtggcaa gagctacaac cgggtgaccg tgatgggcgg cttcaagggtg 300
 gagaaccaca ccgcttgcca ctgcagcacc tgctactacc acaagtcct 349

<210> 2

<211> 498

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 2
 atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggcgg gacatgggca 60
 tccaaggagc cgcttcggcc acgggtgccg cccatcaatg ccaccctggc tgtggagaag 120
 gagggctgcc ccgtgtgcat caccgtcaac accaccatct gtgccggcta ctgccccacc 180
 atgaccgcgg tgctgcaggg ggtcctgccg gccctgcctc aggtgggtgtg caactaccgc 240
 gatgtgcgct tcgagtccat ccggtccct ggctgccgc gcggcgtgaa ccccggtggtc 300
 tcctacgccg tggctctcag ctgtcaatgt gcactctgcc gccgcagcac cactgactgc 360

gggggtccca aggaccaccc cttgacctgt gatgaccccc gcttccagga ctctcttcc 420
tcaaaggccc ctccccccag ccttccaagt ccatcccgac tcccggggcc ctoggacaac 480
ccgatcctcc cacaataa 498

<210> 3
<211> 999
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 3
atgtgtcctg caggctggaa gctcctggcc atgttggctc tggtcctggt cgtcatggtg 60
tggatttcca tctcccgga agacaggtac atcgagcttt tttattttcc catcccagag 120
aagaaggagc cgtgcctcca gggtagaggca gagagcaagg cctctaagct ctttggcaac 180
tactcccgga atcagcccat ctctctgagg cttgaggatt atttctgggt caagaagcca 240
tctgcttacg agctgcccta tgggaccaag gggagtgagg atctgctcct ccgggtgcta 300
gccatcacca gctcctccat cccaagaac atccagagcc tcagggtgag ccgctgtgtg 360
gtcgtgggga acgggcaacc gctgcggaac agctcactgg gagatgccat caacaagtac 420
gatgtgggtca tcagattgaa caatgccccg gtggctgggt atgaggggtga cgtgggctcc 480
aagaccacca tgcgtctctt ctacctgaa tctgccact tcgaccccaa agtagaaaac 540
aaccagaca cactcctcgt cctggtagct ttcaaggcaa tggacttcca ctggattgag 600
accatcctga gtgataagaa gcgggtgaga aagggtttct ggaaacagcc tccctcctc 660
tgggatgtca atcctaaaca gattcggatt ctcaacctct tcttcatgga gattgcagct 720
gacaaaactgc tgagcctgcc aatgcaacag ccaaggaaga ttaagcagaa gccaccacg 780
ggcctgttgg ccatcacgct ggccctccac ctctgtgact tgggtgcacat tgccggcttt 840
ggctaccag acgcctacaa caagaagcag accattcact actatgagca gatcacgctc 900
aagtccatgg cggggtcagg ccataatgtc tccaagagg cctgggcat taagcggatg 960
ctggagatgg gagctatcaa gaacctcag tcttctga 999

<210> 4
<211> 277
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 4

gcccctgacg tgcaggactg ccccgagtgc accctgcagg aaaacccctt cttcagccag 60
 cctggcgccc ctatcctgca gtgcatgggc tgetgcttca gcagagccta cccaccccc 120
 ctgcgagca agaaaaccat gctggtgcag aaaaacgtga ccagcgagag cacctgctgc 180
 gtggccaaga gctacaaccg ggtgaccgtg atgggcggct tcaaggtgga gaaccacacc 240
 gcctgccact gcagcacctg ctactaccac aagtcct 277

<210> 5
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 5
 atggattact acagaaaata tgcagctatc tttctggtca cattgtcggg gtttctgcat 60
 gttctccatt ccgctcctga tgtgcaggat tgcccagaat gcacgctaca ggaaaaccca 120
 ttcttctccc agccgggtgc cccaatactt cagtgcattgg gctgctgctt ctctagagca 180
 tatcccactc cactaagggtc caagaagacg atgttggtcc aaaagaacgt cacctcagag 240
 tccacttgct gtgtagctaa atcatataac agggtcacag taatggggggg tttcaaagtg 300
 gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact tggtattatc acaaatttta a 351

<210> 6
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 6

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
 20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
 35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
 50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
 65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100 105 110

Tyr His Lys Ser
115

<210> 7

<211> 165

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 7

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
1 5 10 15

Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile
20 25 30

Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
35 40 45

Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val
50 55 60

Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
85 90 95

Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
100 105 110

Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
115 120 125

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
130 135 140

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 145 150 155 160

Pro Ile Leu Pro Gln
 165

<210> 8
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

-
 <400> 8

Met Cys Pro Ala Gly Trp Lys Leu Leu Ala Met Leu Ala Leu Val Leu
 1 5 10 15

Val Val Met Val Trp Tyr Ser Ile Ser Arg Glu Asp Arg Tyr Ile Glu
 20 25 30

Leu Phe Tyr Phe Pro Ile Pro Glu Lys Lys Glu Pro Cys Leu Gln Gly
 35 40 45

Glu Ala Glu Ser Lys Ala Ser Lys Leu Phe Gly Asn Tyr Ser Arg Asp
 50 55 60

Gln Pro Ile Phe Leu Arg Leu Glu Asp Tyr Phe Trp Val Lys Thr Pro
 65 70 75 80

Ser Ala Tyr Glu Leu Pro Tyr Gly Thr Lys Gly Ser Glu Asp Leu Leu
 85 90 95

Leu Arg Val Leu Ala Ile Thr Ser Ser Ser Ile Pro Lys Asn Ile Gln
 100 105 110

Ser Leu Arg Cys Arg Arg Cys Val Val Val Gly Asn Gly His Arg Leu
 115 120 125

Arg Asn Ser Ser Leu Gly Asp Ala Ile Asn Lys Tyr Asp Val Val Ile
 130 135 140

Arg Leu Asn Asn Ala Pro Val Ala Gly Tyr Glu Gly Asp Val Gly Ser
 145 150 155 160

Lys Thr Thr Met Arg Leu Phe Tyr Pro Glu Ser Ala His Phe Asp Pro
 165 170 175

Lys Val Glu Asn Asn Pro Asp Thr Leu Leu Val Leu Val Ala Phe Lys
 180 185 190

Ala Met Asp Phe His Trp Ile Glu Thr Ile Leu Ser Asp Lys Lys Arg
 195 200 205

Val Arg Lys Gly Phe Trp Lys Gln Pro Pro Leu Ile Trp Asp Val Asn
 210 215 220

Pro Lys Gln Ile Arg Ile Leu Asn Pro Phe Phe Met Glu Ile Ala Ala
 225 230 235 240

Asp Lys Leu Leu Ser Leu Pro Met Gln Gln Pro Arg Lys Ile Lys Gln
 245 250 255

Lys Pro Thr Thr Gly Leu Leu Ala Ile Thr Leu Ala Leu His Leu Cys
 260 265 270

Asp Leu Val His Ile Ala Gly Phe Gly Tyr Pro Asp Ala Tyr Asn Lys
 275 280 285

Lys Gln Thr Ile His Tyr Tyr Glu Gln Ile Thr Leu Lys Ser Met Ala
 290 295 300

Gly Ser Gly His Asn Val Ser Gln Glu Ala Leu Ala Ile Lys Arg Met
 305 310 315 320

Leu Glu Met Gly Ala Ile Lys Asn Leu Thr Ser Phe
 325 330

<210> 9

<211> 92

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 9

Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys
20 25 30

Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu
35 40 45

Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser
50 55 60

Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr
65 70 75 80

Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser
85 90

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 10

Met Asp Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val Thr Leu Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu His Val Leu His Ser Ala Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro
20 25 30

Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro
35 40 45

Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro
50 55 60

Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr Asn Arg Val Thr Val Met Gly
85 90 95

Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr
100 105 110

Tyr His Lys Ser
115

<210> 11
<211> 37
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 11
ccaggatccg ccaccatgtg tcctgcaggc tggaagc

37

<210> 12
<211> 35
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 12
tttttttctt aagtcagaag gacgtgaggt tcttg

35