



(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)



1-0032782

(51)⁷ C12N 9/20; C07K 14/39; C12P 21/02; (13) B
A61K 38/46; C12N 1/16

(21) 1-2013-01933

(22) 15/06/2006

(62) 1-2009-00049

(86) PCT/FR2006/001352 15/06/2006

(87) WO2007/144475 21/12/2007

(45) 25/08/2022 413

(43) 25/09/2013 306A

(73) LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER (FR)

6, Avenue de L'Europe, F-78400 Chatou, France

(72) LEBLOND, Yves (FR); MOUZ, Nicolas (FR); Alain MARTY (FR); Jean-Louis
URIBELARREA (FR).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA LIPAZA KHÁNG AXIT NẤM MEN LIP2 TÁI TỔ HỢP VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA CHẾ PHẨM NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa lipaza kháng axit nấm men *Yarrowia lipolytica* LIP2 tái tổ hợp, trong đó lipaza này có thể thu được bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy không chứa sản phẩm bất kỳ có nguồn gốc từ động vật hoặc hỗn hợp không đặc trưng như trypton, pepton hoặc lactoserum.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa lipaza tái tổ hợp kháng axit, trong đó lipaza này thu được bằng cách sử dụng tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thức ăn hàng ngày con người tiêu hóa chủ yếu chứa lipit, protein và đường. Tất cả các thành phần này đều trải qua quá trình thủy phân được xúc tác bởi các enzym của đường tiêu hóa trước khi được hấp thu. Do đó, sự thiếu hụt bất kỳ enzym nào trong số các enzym này có thể gây ra các rối loạn tiêu hóa và dẫn đến suy dinh dưỡng đáng kể. Cụ thể là, ví dụ, trong trường hợp một số tình huống bệnh lý, như bệnh xơ hóa nang hoặc bệnh suy giảm tiết dịch tụy của tuyến tụy, mà có liên quan đến sự thiếu hụt lipaza tụy. Để điều chỉnh sự thiếu hụt này, việc sử dụng các dịch chiết từ tuyến tụy bằng đường miệng thường được đề xuất. Tuy nhiên, hiệu quả của liệu pháp này bị giới hạn bởi một thực tế là các enzym trong các dịch chiết này (lipaza, amylaza và proteaza) nhanh chóng bị bất hoạt bởi môi trường axit của dịch vị.

Do đó, việc sử dụng các chế phẩm chứa lipaza mà kháng lại các điều kiện trong dạ dày, như các chế phẩm chứa lipaza dạ dày của động vật có vú được tổng hợp bằng các thao tác di truyền đã được đề xuất, như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Pháp với số công bố 2 699 179, của INSTITUT DE RECHERCHE JOUVENIAL SA hoặc các chế phẩm lipaza vi khuẩn có hoạt tính chấp nhận được trong môi trường axit [ZENTLER-MONRO *et al.*, Pancreas, 7, 311-319 (1992)].

Trong số các lipaza vi khuẩn hoạt động được trong môi trường axit, lipaza có nguồn gốc từ nấm có thể được đề cập, như các lipaza thu được từ *Candida ernobii* [YOSHIDA *et al.*, Biochim. Biophys. Acta.; 154, 586-588 (1968)], từ *Trichosporon asteroid* [DHARMSTHITI *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 111-116 (1997)], từ *Rhizopus javanicus* [UYTTENBROECK *et al.*, Biol. Chem. Hoppe Seyler, 374, 245-254, (1993)], hoặc từ *Yarrowia lipolytica* [HADEBALL, Acta Biotechnol., 2, 159-167 (1991); NOVOTNY *et al.*, J. Basic Microbiol. 28, 221-227 (1988)]. Ngoài khả năng hoạt động ở độ pH axit, các lipaza này còn có các đặc điểm chung là kháng lại sự thủy phân bởi các

proteaza (trypsin, chymotrypsin và pepsin), khi có mặt cơ chất của chúng, và kháng lại tác dụng của muối mật (hoạt tính của chúng được bảo toàn khi có mặt natri taurocholat 10mM).

Việc sử dụng *Yarrowia lipolytica* để tổng hợp gen quan tâm đã được mô tả. Do đó, đơn EP 1 108 043, của INRA và CNRS, mô tả việc sử dụng vector tích hợp chứa cat-xet biểu hiện gen quan tâm và các trình tự zeta, tương ứng với các trình tự LTR của retrotransposon Ylt của *Yarrowia lipolytica*. Vector biểu hiện này cho phép tích hợp không cùng nguồn gốc và phân tán một vài bản sao của đoạn chèn quan tâm vào ADN bộ gen của chủng *Yarrowia lipolytica* thiếu trình tự zeta. Cụ thể là, hệ thống này được sử dụng để tích hợp gen LIP2, mã hóa lipaza, vào ADN của *Yarrowia lipolytica* và trong các điều kiện nuôi cấy không được mô tả chi tiết, cho phép tiết lipaza cao gấp đến 15 lần so với các chủng không được biến nạp.

Các nghiên cứu khác mô tả việc sử dụng vector biểu hiện giống như được mô tả trong đơn patent EP 1 108 043, để tổng hợp lipaza tái tổ hợp trong *Yarrowia lipolytica* (WO 01/83773; PIGNEDE *et al.*, Journal of Bacteriology, vol. 182, No. 10, p. 2802-2810 (2000) and PIGNEDE *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, No. 8, p. 3283-3289 (2000)). Do đó, WO 01/83773, của Laboratoires MAYOLY SPINDLER, mô tả sự tổng hợp dòng *Yarrowia lipolytica* MS4 (CNCM 1-2294), bao gồm 10 bản sao của cat-xet để biểu hiện gen LIP2 mà được tích hợp vào ADN của nó, và sử dụng nó để tổng hợp lipaza với hiệu suất bằng 0,5g lipaza mỗi lít dịch nổi nuôi cấy, và hoạt tính xúc tác bằng 12 000U/ml, được đo bằng cách sử dụng dầu ôliu làm cơ chất, một đơn vị tương ứng với lượng enzym có khả năng xúc tác để giải phóng 1 μ mol axit béo mỗi phút, tức là nhiều hơn 200 lần so với chủng ban đầu. Tuy nhiên, quy trình tổng hợp lipaza được mô tả trong đơn này có nhược điểm lớn vì quy trình này sử dụng môi trường nuôi cấy chứa bactopecton hoặc bactotrypton. Các sản phẩm này, không được mô tả và chứa nhiều sản phẩm thủy phân protein khác nhau, thường được sử dụng làm nguồn cacbon và nitơ. Do đó, quy trình được mô tả trong đơn này không thể thu được lipaza mà có thể được sử dụng trực tiếp làm được phẩm.

PIGNEDE *et al.* (Journal of Bacteriology, 2000) mô tả cụ thể hơn về lipaza ngoại bào được mã hóa bởi gen LIP2 *Yarrowia lipolytica* (chủng PO1d). Do đó, bài báo này đã nghiên cứu các vấn đề sau:

- sự tiết lipaza từ nhiều chủng *kiểu đại* khác nhau (PO1d mà không có mặt Ylt1

và E150 trong đó có mặt Ylt1) và từ nhiều chủng tái tổ hợp khác nhau bao gồm JMY184 (PO1d-6-15) và JMY279 (PO1d-6-17), và

- sự tổng hợp thừa lipaza, cụ thể là bởi tế bào biến nạp JMY184.

Bài báo của PIGNEDE *et al.* đã nêu so sánh sự tổng hợp lipaza bởi các chủng kiểu dại, các chủng đột biến và các chủng tái tổ hợp thu được bằng quy trình được mô tả trên đây (WO 01/83773). Các chủng kiểu dại tiết lipaza với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 50U/ml trong khi đó các chủng đột biến thu được nhờ tác dụng của N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NNNG) tổng hợp lipaza với lượng nhiều hơn 25 lần, tức là 1200U/ml trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu bao gồm môi trường chứa pepton (môi trường trước nuôi cấy) và môi trường chứa nước sữa (môi trường lên men) (cũng xem tài liệu DESTAIN *et al.*, 1997). Các chủng tái tổ hợp thu được với sự trợ giúp của cấu trúc mang gen LIP2 được điều hòa bởi trình tự khởi động PDX2 và bởi sự tích hợp không cùng nguồn gốc, trong nhiều bản sao và theo cách phân tán, của cat-xet biểu hiện này. PIGNEDE *et al.* đã thu được các chủng biến nạp ổn định (ví dụ chủng JMY184) mà tổng hợp 2000U/ml trong các điều kiện không tối ưu, tức là trong môi trường YPDH (chứa 10g/l dịch chiết nấm men, 10g/l bactopecton, 10g/l glucoza và 10g/l dầu ôliu) tương ứng với khoảng 0,5g lipaza/l dịch nổi. Theo cách như trên đây, các chế phẩm lipaza được mô tả bởi PIGNEDE *et al.* và bởi DESTAIN *et al.* là không thích hợp để sử dụng trong y học và cụ thể hơn là để bào chế các lô thuốc sử dụng trong lâm sàng, vì sự tổng hợp chúng cần sử dụng môi trường nuôi cấy chứa pepton hoặc nước sữa.

Tiếp tục những kết quả từ công trình này, nhóm PIGNEDE (Applied and Environmental Microbiology, 2000) đã nghiên cứu các chủng *Yarrowia lipolytica* được biến nạp bằng vectơ chứa cat-xet để biểu hiện gen LIP2. Các tác giả xác định được rằng đối với 8 chủng trong số các chủng được biến nạp này, số bản sao cat-xet để biểu hiện gen LIP2 nằm trong khoảng từ 6 đến 16 (trung bình là 10 bản sao), mà dẫn đến 2 đến 15 sự kiện tích hợp cat-xet này ở các locut khác nhau. Do đó, chủng JMY184 chứa 12 bản sao của cat-xet biểu hiện gen LIP2, được tích hợp vào bốn locut khác nhau. Hơn thế nữa, các tác giả này đã nghiên cứu cụ thể hơn về chủng biến nạp JMY184 này. Các tác giả khẳng định rằng chủng JMY184 tổng hợp 0,5g lipaza/l dịch nổi có hoạt tính là 1500U/ml trên môi trường giàu YPDH (mà chứa bactopecton) (so với 50U/ml đối với chủng kiểu dại PO1d), được đo bằng cách sử dụng dầu oliu làm cơ chất. Các giá trị này có thể giúp suy ra hoạt tính đặc hiệu là khoảng 3000U/mg lipaza. Ngoài ra, các tác giả cho biết rằng sự tổng

hợp lipaza tối ưu trong bình lên men bởi chủng JMY184 có thể giúp thu được các chế phẩm có hoạt tính lên đến 10 000U/ml. Tuy nhiên các điều kiện nuôi cấy mà cho phép đạt được kết quả này không được mô tả. Trong bài báo này, các tác giả nghiên cứu thêm về độ ổn định của các chủng biến nạp này, và cụ thể là dòng JMY184, trong quá trình nuôi cấy và chỉ ra độ ổn định của chúng trong 120 thế hệ. PIGNEDE *et al.* xem xét thấy rằng để tối ưu hóa quá trình tổng hợp lipaza, các yếu tố phải được tính đến là độ ổn định của các chủng biến nạp và các điều kiện nuôi cấy.

Hơn thế nữa, các tác giả cũng chỉ ra rằng có sự tương quan mạnh giữa số lượng bản sao của gen LIP2 được tích hợp với sự tổng hợp thừa lipaza.

Tuy nhiên, để tổng hợp lipaza, môi trường nuôi cấy duy nhất được đề cập trong bài báo này là môi trường chứa pepton, như môi trường giàu YPDH.

Các quy trình tổng hợp lipaza đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật, ngay cả khi các quy trình này thu được hiệu suất lipaza cải thiện, nhưng không thích hợp để tổng hợp lipaza thích hợp để sử dụng cho các mục đích y tế.

Quả thực, môi trường nuôi cấy thường được sử dụng chứa tất cả các hỗn hợp không đặc trưng và/hoặc các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật, như pepton, trypton hoặc nước sữa. Do đó, tồn tại nhu cầu phát triển hệ thống cho phép tổng hợp các chế phẩm chứa lipaza tái tổ hợp thích hợp để sử dụng trong y tế.

Để giải quyết vấn đề này, các tác giả sáng chế đã phát triển quy trình tổng hợp lipaza mà đáp ứng các yêu cầu này tốt hơn so với các quy trình tổng hợp đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật. Cụ thể hơn là, các tác giả sáng chế đã phát triển quy trình tổng hợp lipaza, trong đó môi trường nuôi cấy được sử dụng không chứa các sản phẩm nêu trên, tức là môi trường này không chứa sản phẩm có nguồn gốc từ động vật và không chứa hỗn hợp không đặc trưng như pepton, trypton hoặc nước sữa. Các tác giả sáng chế đã lựa chọn thêm chủng *Yarrowia lipolytica* tái tổ hợp mới tổng hợp lipaza LIP2, mà kết hợp với quy trình này, có khả năng làm cho hiệu suất tổng hợp lipaza tăng đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình tổng hợp lipaza bằng cách sử dụng chủng *Yarrowia lipolytica* được biến nạp bằng vector chứa cat-xet biểu hiện lipaza kháng axit của nấm men, khác biệt ở chỗ môi trường nuôi cấy được sử dụng không chứa các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật hoặc hỗn hợp không đặc trưng, như pepton, trypton hoặc

nước sữa và chế phẩm chứa lipaza kháng axit nấm men LIP2 tái tổ hợp thu được từ quy trình này.

Cụ thể hơn, đối tượng của sáng chế là quy trình tổng hợp lipaza, bao gồm:

a) bước nuôi cấy các tế bào *Yarrowia lipolytica* được biến nạp bằng vector biểu hiện chứa cat-xet để biểu hiện lipaza kháng axit của nấm men, trong các điều kiện cho phép tổng hợp lipaza;

b) bước thu hồi lipaza tổng hợp được từ dịch nổi của môi trường nuôi cấy này;

quy trình này khác biệt ở chỗ bước a) để nuôi cấy được thực hiện trong môi trường nuôi cấy không chứa các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật hoặc không chứa các hỗn hợp không đặc trưng bao gồm các nguyên liệu protein có nguồn gốc động vật (ví dụ, nước sữa) hoặc các sản phẩm của quá trình tiêu hóa bằng enzyme của chúng (ví dụ, trypton hoặc pepton).

Theo một phương án ưu tiên của quy trình này, môi trường nuôi cấy theo bước a) chứa:

- nitơ vô cơ làm nguồn nitơ, và tốt hơn là amoni sulfat;
- nguồn cacbon được chọn từ các nguồn cacbon có nguồn gốc hydrat cacbon, các polyalcohol như glyxerol, và các nguồn cacbon có nguồn gốc lipid như axit béo và axylglyxerol; và
- muối vô cơ, các yếu tố vi lượng và vitamin.

Theo một phương án được ưu tiên khác của quy trình này, bước a) bao gồm:

a1) bước nuôi cấy sơ bộ các tế bào *Yarrowia lipolytica* đã biến nạp như được xác định trên đây trong môi trường chứa nguồn cacbon có nguồn gốc từ hydrat cacbon; và

a2) bước lên men bằng các tế bào này bao gồm pha sinh trưởng tế bào trong môi trường chứa nguồn cacbon có nguồn gốc từ hydrat cacbon và pha tổng hợp lipaza trong môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là axit béo được chọn từ triglyxerit mạch ngắn, mạch trung bình hoặc mạch dài. Do đó, việc lên men được thực hiện ở giai đoạn thứ nhất để cho phép tế bào sinh trưởng, ví dụ, khi có mặt nguồn cacbon có nguồn gốc từ hydrat cacbon, và ở giai đoạn thứ hai trong các điều kiện cho phép sinh tổng hợp lipaza này, ví dụ, khi có mặt nguồn cacbon duy nhất là chất cảm ứng hóa học loại axit béo, như triglyxerit mạch ngắn (như tributyrin), triglyxerit mạch trung bình (như trioctanoin hoặc trioctanoylglyxerol) hoặc triglyxerit mạch dài (như dầu ôliu hoặc triolein).

Quá trình lên men được thực hiện thuận lợi với pO₂ hằng định nằm trong khoảng từ 15% đến 25% và độ pH tốt hơn là dưới 6,5. Quá trình lên men có thể được thực hiện với tốc độ dòng khí là khoảng 1vvm, một đơn vị vvm bằng 1 thể tích không khí cho mỗi thể tích chất lỏng mỗi phút (ví dụ, đối với bình lên men 30l, 1 vvm bằng 30l/phút và đối với bình lên men 5l, 1 vvm bằng 5l/phút).

Theo một đặc điểm ưu tiên của phương án này, bước a1) để nuôi cấy sơ bộ được thực hiện đến trị số OD_{600nm} nằm trong khoảng từ 3 đến 10 mỗi 1ml, và trong bước a2) để lên men, pha tổng hợp lipaza này được khởi động khi trị số OD_{600nm} của môi trường nuôi cấy đạt tới trị số nằm trong khoảng từ 60 đến 70 mỗi 1ml.

Theo một đặc điểm ưu tiên khác của phương án này, bước b) được khởi động khi OD_{600nm} đạt tới trị số nằm trong khoảng từ 300 đến 350 mỗi ml. Bước b) có thể bao gồm thêm:

- b1) tách lipaza khỏi dịch nổi nuôi cấy;
- b2) tinh chế lipaza thu được ở bước b1).

Hai bước này được thực hiện bằng các kỹ thuật thông thường đã biết: tách cơ học (lọc, sắc ký, ly tâm) hoặc tách hóa lý (kết tủa).

Tách lipaza khỏi dịch nổi có thể được thực hiện bởi chuyên gia trong lĩnh vực này, ví dụ bằng kỹ thuật được chọn từ kỹ thuật lọc tiếp xúc với sợi rỗng, lọc trước và ly tâm gián đoạn hoặc ly tâm liên tục.

Tinh chế lipaza bao gồm làm giảm mức tải vi sinh vật, tức là sự có mặt của vi sinh vật, và có thể được thực hiện bằng kỹ thuật tinh chế thích hợp bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, như kỹ thuật được chọn từ các kỹ thuật lọc, kết tủa phân đoạn, sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước và sắc ký lọc gel.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện quy trình chung để kiểm soát độ ổn định di truyền của dòng YL-LIP2-6C trong quy trình tổng hợp lipaza.

Fig.2 thể hiện sự thay đổi mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD_{600nm}, trục y bên trái) (-◆-) và sự thay đổi tốc độ sinh trưởng (giờ⁻¹, trục y bên phải) (-■-) ở dạng hàm số theo thời gian (giờ, trục x) trong quá trình lên men. Mũi tên thể hiện mức cảm ứng sự tổng hợp lipaza.

Fig.3 thể hiện kết quả phân tích thẩm tách Southern nhiều sự kiện tích hợp của

gen LIP2 ở các locut khác nhau vào bộ gen của 23 khuẩn lạc (các đường 24 đến 43) được thu gom ở thời điểm T33, tương ứng với thời điểm kết thúc quá trình lên men, khoảng 100 giờ sau khi bắt đầu lên men. Các bản sao 1 đến 6: 6 locut của gen LIP2 (5 locut để tích hợp cat-xet biểu hiện của gen LIP2 + một locut cho gen LIP2 nội sinh). M: chỉ thị kích thước.

Fig.4 thể hiện sự kiểm soát bởi SDS-PAGE, quá trình tổng hợp lipaza tái tổ hợp bằng dòng YL-LIP2-6C trong quy trình tổng hợp, từ T16 đến T33. Mũi tên chỉ mức cảm ứng sự tổng hợp lipaza (T17, 48 giờ lên men). M: thang khối lượng phân tử; năm đường của phần bên tay phải của gel tương ứng với lượng lipaza LIP2 tinh chế đã biết (2,5µg đến 20µg).

Fig.5 thể hiện phân tích mức độ tinh khiết của lipaza trong dịch nổi ở thời điểm T33 bằng SDS-PAGE (cuối quá trình lên men). MW: thang khối lượng phân tử; LIP2 F5 đối chứng: lipaza LIP2 nằm trong khoảng từ 1 đến 10µg; dịch nổi YL-LIP2-6C: thể tích dịch nổi phân tích tính theo µl.

Fig.6 thể hiện phổ khối, được xác định bằng phép đo phổ khối loại MALDI-TOF, của lipaza tái tổ hợp được tổng hợp bằng dòng YL-LIP2-6C.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tùy ý, quy trình tổng hợp lipaza theo sáng chế cũng có thể bao gồm bước cô đặc hoặc bước làm giàu bao gồm làm tăng nồng độ lipaza trong chế phẩm. Bước này có thể được thực hiện, ví dụ, sau bước tinh chế. Bước này cũng có thể diễn ra đồng thời với bước tinh chế.

Quy trình tổng hợp theo sáng chế có thể tổng hợp lipaza tái tổ hợp với lượng nằm trong khoảng từ 1g đến 3g lipaza đã tinh chế trong mỗi lít dịch nổi nuôi cấy. Theo cách đặc biệt thuận lợi, quy trình theo sáng chế cho phép tổng hợp chế phẩm lipaza tái tổ hợp có hoạt tính xúc tác cao hơn 15000U/ml dịch nổi nuôi cấy. Tốt hơn là, chế phẩm này có hoạt tính lớn hơn 20000U/ml dịch nổi nuôi cấy. Các trị số này được xác định ở độ pH=6, sử dụng trioctanoin làm cơ chất. Trị số hoạt tính này của chế phẩm lipaza là được quan tâm nhất khi phát triển dược phẩm. Thật vậy, việc sử dụng các liều lipaza giảm, được tổng hợp bởi quy trình theo sáng chế, trong khi vẫn duy trì được hiệu quả đủ để đạt được tác dụng điều trị mong muốn để có thể điều chỉnh tình trạng kém hấp thu mỡ có liên quan đến sự suy giảm tiết dịch tụy của tuyến tụy kèm theo thiếu hụt lipaza là khả thi hiện nay.

Thực tế là, lipaza LIP2 hiện nay có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các

chủng *Yarrowia lipolytica* tái tổ hợp mà không cần đến các sản phẩm có nguồn gốc động vật, như là trường hợp của quy trình theo sáng chế, tạo ra ưu điểm lớn và tạo thuận lợi cho việc sử dụng lipaza cho các mục đích y học.

Vectơ biểu hiện được sử dụng để thu được các tế bào *Yarrowia lipolytica* tái tổ hợp được sử dụng trong quy trình theo sáng chế là vectơ tích hợp có ít nhất một bản sao của gen LIP2 và các yếu tố điều hòa sự biểu hiện. Sau đó, vectơ này có thể được tích hợp vào ADN plasmit hoặc vào ADN bộ gen của nấm men. Một ví dụ về vectơ tích hợp đặc biệt được ưu tiên là vectơ JMP6 hoặc vectơ JMP10 như được mô tả trong WO 01/83773. Vectơ JMP6 chứa cat-xet để biểu hiện gen LIP2, mã hóa tiền LIP2p của lipaza LIP2 của *Yarrowia lipolytica*, mạch ngược dòng của nó là trình tự khởi động của *Yarrowia lipolytica* đối với axyl CoA oxidaza ACO2, được gọi là POX2. Vectơ JMP10 cũng chứa gen LIP2, trình tự ngược dòng của nó là trình tự khởi động của *Yarrowia lipolytica* đối với lipaza LIP2. Hai trình tự khởi động này có thể được cảm ứng bởi triglycerit và các axit béo. Trong mỗi vectơ này, cat-xet biểu hiện và trình tự khởi động được đặt nằm giữa các trình tự zeta như được mô tả trên đây. Sự tích hợp này có thể được nhắm đích, tức là được hướng đến các vị trí, hoặc ngẫu nhiên. Do đó, khi chủng *Yarrowia lipolytica* đã biến nạp không chứa trình tự zeta (tức là, ví dụ, trường hợp của chủng PO1d), sự tích hợp của cat-xet biểu hiện này bị gián đoạn ở ADN bộ gen của chủng này. Mặt khác, nếu chủng *Yarrowia lipolytica* chứa các trình tự zeta (tức là, trường hợp chủng E150), sự tích hợp này được định hướng chủ yếu ở mức độ các trình tự này.

Theo một phương án ưu tiên khác của quy trình này, chủng *Yarrowia lipolytica* đã biến nạp tốt hơn là chủng được gọi là YL-LIP2-6C, được lưu trữ ở Bảo tàng các chủng nuôi cấy vi sinh vật Quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes-C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, vào ngày 12/12/2005, dưới số 1-3542. Chủng YL-LIP2-6C này ổn định về mặt di truyền.

Đối với các mục đích theo sáng chế, thuật ngữ “ổn định”, “ổn định về mặt di truyền”, “độ ổn định di truyền”, và các thuật ngữ tương tự của chúng, được sử dụng để chỉ sự bảo toàn cùng một số lượng locut để tích hợp vào ADN của dòng được xem xét của axit nucleic cần quan tâm, trong ít nhất 30 thế hệ. Con số 30 thế hệ này được chọn làm cơ sở để tính toán độ ổn định di truyền vì các tác giả sáng chế nhận thấy rằng nó tương ứng với số lần nhân đôi của quần thể tế bào đủ để cho phép tổng hợp lipaza bằng cách sử dụng quy trình bao gồm ít nhất một bước nuôi cấy sơ bộ các tế bào *Yarrowia lipolytica* tái tổ

hợp và một bước tổng hợp lipaza thích hợp trong các điều kiện lên men. Đối với các mục đích của sáng chế, một thể hệ được xác định bởi sự nhân đôi quần thể tế bào và có thể được tính toán theo công thức $Y = X \cdot 2^g$ trong đó Y là quần thể tế bào ở thời điểm t (ví dụ, được thể hiện là mật độ tế bào), X là quần thể tế bào ban đầu ở thời điểm t_0 và g là số thế hệ cần thiết để quần thể tế bào chuyển từ trị số X thành trị số Y. Tốt hơn là, dòng này được coi là ổn định về mặt di truyền nếu ít nhất 90% các khuẩn lạc được phân tích, sau ít nhất 30 thế hệ, chứa số lượng locut của gen quan tâm bằng với dòng ban đầu. Do đó, rõ ràng là từ các ví dụ này, dòng YL-LIP2-6C được coi là ổn định vì gần 100% khuẩn lạc được phân tích sau 100 thế hệ có 6 locut của gen LIP2 (một locut tương ứng với gen LIP2 nội sinh + 5 locut để tích hợp cat-xet biểu hiện của gen LIP2).

Ngạc nhiên là, nếu quy trình theo sáng chế sử dụng chủng cụ thể này, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc tổng hợp lipaza tái tổ hợp với lượng lớn và có sự kiểm soát tốt hơn quy trình tổng hợp này. Thực vậy, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc cải thiện hiệu suất tổng hợp lipaza và cụ thể là có thể tổng hợp được từ 1g đến 3g lipaza tinh khiết mỗi lit dịch nổi nuôi cấy. Các tác giả sáng chế cũng có thể thu được các chế phẩm chứa lipaza có hoạt tính gần bằng 20 000U/ml.

Đối với các mục đích của sáng chế, hoạt tính của lipaza tương ứng với hoạt tính enzym của nó. Hoạt tính xúc tác của dung dịch lipaza được biểu diễn bằng đơn vị (U) mỗi lit dung dịch được phân tích. Hoạt tính đặc hiệu được biểu diễn bằng đơn vị (U) mỗi mg protein đã tinh chế (lipaza). Một đơn vị tương ứng với lượng enzym có khả năng xúc tác giải phóng μmol axit béo mỗi phút. Hoạt tính đặc hiệu của lipaza thay đổi theo bản chất của triglycerit được sử dụng làm cơ chất.

Ngoài việc cải thiện hiệu suất của quá trình tổng hợp lipaza, các tác giả sáng chế cũng đề xuất tạo ra khả năng tái sử dụng quy trình tổng hợp này tốt hơn, cải thiện tính đồng nhất của sản phẩm cuối cùng và cải thiện các điều kiện tinh chế lipaza.

Do đó các cải biến khác nhau này giúp thu được lipaza thỏa mãn các điều kiện được yêu cầu để sử dụng trong y học. Quả thực, trong phạm vi nghiên cứu, các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng lipaza LIP2 hoạt động ở các trị số độ pH cao hơn 3 và đến trị số độ pH gần bằng 8, trong đó hoạt tính tối ưu ở độ pH từ 5 đến 6. Mặt khác, lipaza bị bất hoạt không thuận nghịch khi ủ 2 giờ ở độ pH=3 hoặc độ pH=8,5. Hoạt tính đặc hiệu của lipaza LIP2 cũng được phân tích dưới dạng chức năng của các cơ chất khác nhau và do đó các tác giả sáng chế xác định ở độ pH=4 các trị số là khoảng 10760U/mg, khoảng

16920U/mg và khoảng 12260U/mg lipaza đã tinh chế, lần lượt với triglyxerit mạch ngắn (tributyrin), triglyxerit mạch trung bình (trioctanoin) triglyxerit mạch dài (dầu ôliu). Cuối cùng, các tác giả sáng chế ngạc nhiên nhận thấy rằng lipaza LIP2 vẫn hoạt động khi có mặt các muối mật và hoạt động này tăng theo nồng độ muối mật. Sự hoạt động khi có mặt muối mật này đến nay chỉ được quan sát thấy với lipaza dạ dày và lipaza tuyến tụy kết hợp với co-lipaza. Do đó, việc sử dụng lipaza LIP2 có hoạt tính đặc hiệu cao không đòi hỏi sự có mặt của co-lipaza.

Dòng YL-LIP2-6C chứa một số bản sao của cat-xet biểu hiện lipaza LIP2 này dẫn đến 5 sự kiện tích hợp gen LIP2 ở nhiều locut khác nhau. Nếu gen này được đặt trong các điều kiện thích hợp để tổng hợp lipaza, thì dòng YL-LIP2-6C tổng hợp lipaza nhiều hơn các chủng *Yarrowia lipolytica* đã biến nạp của lĩnh vực kỹ thuật trước. Lipaza này được tổng hợp với hiệu suất lớn hơn 1g/l dịch nuôi cấy, tức là lớn hơn hiệu suất thu được ở các dòng của lĩnh vực kỹ thuật trước đã mô tả trên đây.

Đối tượng của sáng chế cũng là chế phẩm lipaza mà có thể thu được bằng quy trình theo sáng chế.

Theo một phương án ưu tiên của chế phẩm lipaza này, chế phẩm này có hoạt tính ít nhất bằng 15000U/ml, tốt hơn là cao hơn 20000U/ml khi được xác định như đã chỉ ra trên đây.

Ngoài ra, đối tượng của sáng chế là sử dụng chế phẩm chứa lipaza theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị bệnh có liên quan đến sự phá vỡ quá trình hấp thu chất béo (ví dụ axit béo mạch ngắn, mạch trung bình hoặc mạch dài), cụ thể là có liên quan đến sự suy giảm của tuyến tụy, cụ thể là sự suy giảm tiết dịch tụy của tuyến tụy.

Đối tượng của sáng chế cũng là thuốc, khác biệt ở chỗ thuốc này chứa chế phẩm chứa lipaza như được mô tả trên đây.

Đối tượng của sáng chế cũng là tế bào *Yarrowia lipolytica* được biến nạp bằng vector biểu hiện lipaza kháng axit của nấm men, khác biệt ở chỗ tế bào này là dòng được gọi là YL-LIP2-6C, được lưu trữ ở bảo tàng các chủng nuôi cấy vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes-C.N.C.M.), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, ngày 15/12/2005 dưới số I-3542.

Ngoài ra, đối tượng của sáng chế là sử dụng tế bào như được xác định trên đây để tổng hợp lipaza kháng axit của nấm men.

Ngoài các đặc điểm nêu trên, sáng chế cũng bao gồm các đặc điểm khác, mà được

đề cập trong bản mô tả dưới đây, mà đề cập đến các ví dụ về thực hiện quy trình mà là đối tượng của sáng chế và các hình vẽ đi kèm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nguyên liệu và quy trình

1) Môi trường sử dụng

Nồng độ cuối cùng được thể hiện là các nồng độ trong các dung dịch gốc.

Môi trường cơ bản không được làm giàu 02130S

Thành phần	Nồng độ cuối
Glucoza	10g/l
KH_2PO_4	3g/l
Na_2HPO_4	3g/l
H_3BO_3	0,34g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3g/l
$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4\text{NNa}$	1g/l
MgSO_4	0,5g/l
CaCl_2	0,023g/l
MnSO_4	0,038g/l
ZnSO_4	0,04g/l

Môi trường được làm giàu 02130S chứa thêm các chất phụ gia dưới đây:

Chất phụ gia	Nồng độ cuối
Dung dịch chứa các	1ml/l
Dung dịch vitamin	1ml/l

Thành phần của dung dịch chứa các nguyên tố vi lượng

Thành phần	Nồng độ cuối
CoCl_2	0,5g/l
Na_2MoO_4	0,06g/l
CuSO_4	0,9g/l

Thành phần của dung dịch chứa các vitamin

Thành phần	Nồng độ cuối
D-biotin	0,05g/l
Canxi pantothenat	1g/l
Axit Nicotinic	1g/l
Myoinositol	25g/l
Thiamin HCl	0,25g/l
Pyridoxol HCl	0,25g/l

Axit	0,05g/l
------	---------

Thành phần của dung dịch chứa các muối vô cơ

Thành phần	Nồng độ cuối
MgSO ₄	26,76g/l
CaCl ₂	6,40g/l
FeSO ₄	5,61 g/l
COCl ₂	0,29g/l
ZnSO ₄	7,72g/l
Na ₂ MoO ₄	0,09g/l
H ₃ BO ₃	0,34g/l
MnCl ₂	0,47g/l
CuSO ₄	0,61g/l

Thành phần của dung dịch chứa FeSO₄

Thành phần	Nồng độ cuối
FeSO ₄	0,9g/l

Dung dịch ammoniac, 14%

Dung dịch chống tạo bọt: Struktol J673 được pha loãng theo tỷ lệ 1/10 (Schill+Seilacher AG, Moorfleeter Str. 28, 22113, Hamburg, Germany)

2. Chiết ADN bộ gen và phân tích thâm tách Southern

a) Chiết ADN bộ gen

Kết tủa tế bào thu được từ 4ml môi trường nuôi cấy được tạo huyền phù trong 0,5ml dung dịch đệm sorbitol (sorbitol 0,9M; tris-HCl 0,1M, độ pH=8,0; EDTA 0,1M). 50µl Zymolase® 20T (6mg/ml) (Euromedex, 67458 Mundolsheim Cedex, France), 50µl 2-mercaptoetanol ở 0,28M được bổ sung vào và ủ dung dịch này trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C kèm theo khuấy (180 vòng/phút). Ly tâm dung dịch này và tạo huyền phù pellet này trong 0,5ml dung dịch đệm TE (tris-HCl 50mM, độ pH=8; EDTA 20mM). Bổ sung 50µl SDS 10% vào và trộn dung dịch này bằng cách lộn ngược và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ 65°C. Bổ sung 0,2ml kali axetat 5M vào, sau đó trộn dung dịch này và giữ trong nước đá trong 30 phút, và sau đó ly tâm trong 5 phút.

Chuyển dịch nổi vào ống 1,5ml và sau đó bổ sung 0,8ml etanol 100%, đã được làm lạnh trước trên đá. Trộn dung dịch này bằng cách lộn ngược và sau đó ly tâm. Sau khi loại

bỏ dịch nổi, bổ sung 0,4ml dung dịch đệm TE chứa 100µg/ml RNaza A (Invitrogen, USA) và ủ dung dịch này trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi bổ sung 1ml ethanol 100%, đã được làm lạnh trước trong đá, trộn nhẹ dung dịch này cho đến khi ADN kết tủa, và sau đó ly tâm. Loại bỏ dịch nổi và sau đó làm khô pellet ADN ngoài trời và sau đó tạo huyền phù trong 100µl nước vô trùng và sau đó ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

b) Phân cắt bằng enzym HindIII

Đo nồng độ của ADN bộ gen bằng cách xác định độ hấp thụ ở bước sóng 260nm (A_{260}) và ở bước sóng 280nm (A_{280}). Trộn lượ ADN bộ gen với nước vô trùng đến thể tích cuối là 42,5µl. Bổ sung 5µl dung dịch đệm (pha loãng 5 lần) và 2,5µl HindIII (50u/µl) (Invitrogen, USA) và ủ dung dịch này ở 37°C trong 4 giờ.

c) Phân tích thẩm tách Southern

Các lần chuyển kiểu thẩm tách Southern được thực hiện theo quy trình của kit “DIG High Prime DNA Labeling and Detection” của công ty Roche Diagnostic.

d) Quy trình đánh dấu đoạn dò

Đoạn dò tương ứng với toàn bộ gen mã hóa lipaza LIP2 được thu gom bằng PCR được thực hiện trên ADN bộ gen với sự trợ giúp của enzym Phusion ADN polymeraza (Finzyme) và hai đoạn mồi dưới đây:

Đoạn mồi xuôi: 5'-GTGTACACCTCTACCGAGACCTCT-3' (SEQ ID NO. 1)

Đoạn mồi ngược: 5'-TTAGATACCACAGACACCCTCGGT-3' (SEQ ID NO. 2)

Sau phản ứng PCR, đoạn dò được tinh chế gel với sự trợ giúp của kit “Nucleospin Extract II” (Macherey Nagel). Sau đó, đoạn dò đã tinh chế được đánh dấu (digoxigenin) với sự trợ giúp của kit “DIG high prime DNA labeling” của Roche.

e) Phân tách gel, chuyển ADN và phát hiện tín hiệu

Trộn 2µg ADN đã phân cắt bằng HindIII với dung dịch đệm tải và sau đó cố định trên gel agarosa 0,8%. Thực hiện điện di ở 50V trong 2 giờ 30 phút và sau đó chuyển ADN lên màng Hybond+ (Amersham Bioscience). Số locut của gen LIP2 trong ADN bộ gen được phát hiện bằng quy trình lai, trên màng, của đoạn dò đã đánh dấu, sau đó quan sát bằng mắt thường dưới tia X.

3) Xác định nồng độ protein

Nồng độ protein được xác định bằng quy trình Bradford. Định lượng các protein với sự trợ giúp của quy trình Bradford trực tiếp trên dịch nổi môi trường nuôi cấy lên men. Do đó, lượng protein xác định được được so sánh với lượng lipaza LIP2 tinh chế đã

biết. Trộn 20µl các mẫu chuẩn trong các ống, ở các nồng độ pha loãng thích hợp với 1ml chất thử đã pha loãng (5 lần) chứa thuốc nhuộm. Sau đó, OD₅₉₅ được xác định so với OD₅₉₅ thu được cho mẫu đối chứng (chỉ có thuốc nhuộm pha loãng).

4) Đo hoạt tính đặc hiệu của lipaza tái tổ hợp

Hoạt tính của lipaza được đo bằng phép đo hiệu điện thế ở 37°C bằng thiết bị pH-stat (RADIOMETER). Cơ chất sử dụng là trioctanoin. Cơ chất 10mM được nhũ hóa trong 15ml dung dịch đệm phản ứng chứa tris- HCl 1mM (độ pH=5,5), NaCl 150mM, CaCl₂ 5mM và natri taurodeoxycholat 4mM (SIGMA). Một đơn vị hoạt tính đặc hiệu được xác định là 1µmol axit béo được giải phóng trong mỗi phút và trên mỗi mg protein.

5) Điện di gel polyacrylamit trong các điều kiện biến tính (SDS- PAGE)

12µl mẫu chứa 25% hỗn hợp chứa SDS và các chất khử được nạp lên gel 4-12% bistris (Biorad). Tiến hành điện di trong 45 phút ở 160V.

Sau đó, phân tích gel này bằng cách nhuộm bằng thuốc nhuộm xanh Coomassie.

6) Xác định khối lượng phân tử của lipaza LIP2 được tổng hợp bằng dòng YL-LIP2-6C bằng phép đo phổ khối của MALDI-TOF (ion hóa giải hấp bằng tia laze có sự trợ giúp của chất nền-thời gian bay - Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight)

Phân tích đo phổ khối kiểu ion hóa/giải hấp bằng tia laze được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị đo phổ khối “Voyager Elite XL time of flight” của công ty Perseptive Biosystems (Framingham, MA) được thực hiện với sự bức xạ tia laze của nito ở bước sóng 337nm. Phổ khối kiểu dương thu được bằng cách sử dụng kiểu tách tuyến tính và tách trễ với điện thế gia tốc bằng 25kV, dòng điện lưới là 0,3%, dòng điện dẫn ion là 0,3%, và thời gian chết bằng 1000 nano giây đối với protein LIP2. Mỗi phổ là kết quả của trung bình 100 xung laze. Nguyên liệu để phân tích được trộn với dung dịch axit sinapinic bão hòa với thể tích tương đương (Fluka) được điều chế trong dung dịch chứa 50% (thể tích/thể tích) axetonitril/axit trifloaxetic chứa nước. 2µl phân ước của hỗn hợp này được đặt trên đĩa mẫu làm bằng thép không gỉ và được làm khô ngoài trời trước khi tiến hành phân tích. Điều chỉnh bên ngoài được tiến hành với sự trợ giúp của alpha-chymotrypsinogen A (Sigma). Các trị số được biểu hiện là các trị số trung bình và tương ứng với ion [M+H]⁺.

Ví dụ 2: Xây dựng vector biểu hiện và sự tổng hợp của dòng YL- LIP2-6C

Chủng YL-LIP2-6C thu được bằng cách biến nạp *Yarrowia lipolytica* chủng PO1d, không có các trình tự zeta, bằng vector biểu hiện, được gọi là JMP6, được mô tả

trong đơn châu Âu số EP 1 108 043, và chứa gen LIP2 mã hóa tiền LIP2p của lipaza LIP2 của *Yarrowia lipolytica* mà đoạn ngược dòng của nó là trình tự khởi động ACO2. Cat-xet này được liên kết hai bên bởi các trình tự zeta, như được mô tả trên đây. Xây dựng vectơ JMP6 và biến nạp chủng PO1d được thực hiện theo quy trình giống như trong EP1108043. Chủng YL-LIP2-6C này, chứa 5 locut tích hợp khác nhau của cat-xet biểu hiện gen LIP2, được lưu trữ ở Bảo tàng các chủng nuôi cấy vi sinh vật quốc gia (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, dưới số hiệu I-3542, vào ngày 15/12/2005.

Ví dụ 3: Tổng hợp lipaza nhờ chủng YL-LIP2-6C và kiểm tra độ ổn định di truyền của chủng YL-LIP2-6C

Chủng YL-LIP2-6C được sử dụng trong quy trình tổng hợp lipaza bao gồm bước nuôi cấy sơ bộ và bước lên men thích hợp để tổng hợp lipaza. Toàn bộ cách tiến hành quy trình này được thể hiện trong fig.1. Do đó, lipaza đã tổng hợp được phân tích về hoạt tính và chất lượng. Hơn thế nữa, độ ổn định di truyền của chủng YL-LIP2-6C được phân tích bằng cách xác định số locut của cat-xet biểu hiện gen LIP2.

1) Quy trình tổng hợp

Nuôi cấy sơ bộ và lên men

Lọ chứa dung dịch gốc của dòng YL-LIP2-6C trong glyxerol được làm tan bằng và 5µl được nuôi cấy trong 25ml môi trường 02130S đã làm giàu, chứa 1% (thể tích/thể tích) dung dịch chứa các vitamin và 1% (thể tích/thể tích) dung dịch chứa các yếu tố vi lượng, trong bình Erlen Meyer 250ml. Ủ môi trường nuôi cấy này ở 28°C trong 36 giờ có kèm theo khuấy (180 vòng/phút). 25ml môi trường nuôi cấy sơ bộ tạo thành (môi trường nuôi cấy sơ bộ 1) được chủng vào 200ml môi trường 02130S đã làm giàu trong bình Erlen Meyer 2 lit chứa 2 lit môi trường nuôi cấy được ủ ở 28°C trong 36 giờ kèm theo khuấy (180 vòng/phút). Do đó, môi trường nuôi cấy sơ bộ 2 thu được (225ml) được chủng vào môi trường 02130S đã làm giàu trong bình lên men.

Ở thời điểm T0 của quá trình lên men, 2ml dung dịch FeSO₄ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Mỗi 6 đến 9 giờ, bổ sung từ 2 đến 3ml dung dịch vitamin vào môi trường nuôi cấy lên men và sau 34 giờ lên men (ở thời điểm T12), bắt đầu cung cấp glucoza. Tăng dần lượng glucoza cung cấp trong 14 giờ và sau đó ngừng cung cấp ở thời điểm T17 (tương ứng với 48 giờ lên men) và sau đó bắt đầu cảm ứng bằng axit oleic. Tăng dần mức cung cấp axit oleic trong 54 giờ tiếp theo, và sau đó ở thời điểm T33 (102

giờ lên men) đạt được OD₆₀₀ là 340 và dùng quá trình lên men. Ly tâm 3 lit môi trường nuôi cấy cuối cùng (14000 vòng/phút). Thu hồi dịch nổi và bảo quản ở -20°C.

Theo dõi môi trường nuôi cấy

Trong quá trình lên men, nhiệt độ và áp suất oxy riêng phần và độ pH được kiểm tra và được duy trì lần lượt ở mức 28°C, 20% và 6,2. Mỗi 3 giờ, thu gom mẫu nuôi cấy 1 lần và đo OD₆₀₀ để theo dõi sự thay đổi tốc độ sinh trưởng. Các kết quả được thể hiện trong fig.2. Hai mẫu dịch chiết 1ml trong số các mẫu này được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 14000 vòng/phút và các pelet và các dịch nổi được bảo quản ở -20°C. Bảng I thể hiện sự theo dõi quy trình lên men.

T	Thời gian lên men/giờ	OD600	Tốc độ tăng trưởng (giờ-1)	Các vitamin được bổ sung: 2ml cách nhau 12 giờ	Tốc độ khuấy (vòng/phút)	PO2 (%)	Độ pH	Các hoạt động và các chú thích khác	Nhiệt độ (°C)
T0	0,00	0,28		2ml	300	98	6,21	2ml FeSO4	28
T1	3,00	0,3	0,02299762		300	98	6,47		28
T2	6,00	0,32	0,02151284		300	98	6,51		28
T3	9,00	0,34	0,02020821		300	98	6,53		28
T4	12,00	0,4	0,05417298	2ml	300	100	6,57		28
T5	15,00	0,5	0,07438118		300	98	6,2	điều chỉnh pH bằng axit	28
T6	18,00	0,62	0,07170379		300	97	6,2		28
T7	21,00	0,92	0,1315514	2ml	300	92,7	6,19		28
T8	24,00	1,54	0,17172134		300	80,9	6,2		28
T9	27,00	2,36	0,14229307		300	61,4	6,19		28
T10	30,00	3,99	0,1750432	2ml	300	20	6,19		28
T11	31,00	4,67	0,15736784		331	20	6,2	Ván đề nạp glucoza	28
T12	34,00	9,97	0,25280717		392	20,6	6,2	Bắt đầu nạp glucoza	28
T13	36,00	11,96	0,09099358	2ml	378	17,6	6,2		28
T14	39,00	21,5	0,19549506		401	19,7	6,23		28
T15	42,00	37,2	0,18275194		424	18,9	6,2		28
T16	45,00	61	0,16485503		445	20	6,2		28
T17	48,00	70	0,04587379	2ml	470	20	6,4	Cảm ứng bằng axit oleic	28

T18	51,00	89	0,08004704		366	20	6,38		28
T19	54,00	93,86	0,01772265		409	20,3	6,17		28
T20	57,00	85	-0,03305102		535	19,5	6,19		28
T21	60,00	95	0,03707521	3ml	615	20,2	6,21		28
T22	63,00	105	0,03336115		563	21,5	6,2		28
T23	66,00	129	0,06861735		583	20,4	6,2		28
T24	69,00	159	0,06969727		580	21,2	6,18		28
T25	72,00	178	0,03762645	3ml	563	19	6,18		28
T26	75,00	210	0,05510799		565	19,5	6,2		28
T27	78,00	216	0,09939029		589	20	6,2		28
T28	80,00	235	0,04215355		590	20	6,2		28
T29	83,50	240	0,00601526	3ml	610	20	6,2		28
T30	90,50	280	0,02202153		640	21	6,2		28
T31	94,00	310	0,02908077		687	19,5	6,19		28
T32	99,00	342	0,01964769		691	20	6,19		28
T33	100	340	-0,00586512		680	20	6,2		28

Bảng I: Theo dõi quy trình lên men

Tinh chế lipaza

Tùy ý, có thể thực hiện thêm bước tinh chế lipaza.

Tách lipaza khỏi môi trường nuôi cấy bằng thiết bị vi lọc tiếp xúc trên màng gốm (pilot X6 của PALL) để giữ lại nấm men có kích thước lớn hơn ngưỡng (0,1 μm). Dịch thấm chứa lipaza được thu hồi trước tiên bằng cách cô, sau đó bằng cách lọc thấm tách. Các bước này được thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất với các thay đổi thích hợp. Sau đó, giảm nồng độ vi sinh vật chứa trong dịch thấm bằng cách lọc (0,2 μm) (Millipore) để thu được mức tải vi sinh vật thấp hơn 10cfu/ml. Bằng cách sử dụng thiết bị Profux M12 (Millipore), dung dịch lipaza được cô đến thể tích khoảng 5 lít, và được siêu lọc tiếp xúc bằng cách sử dụng màng Pellicon chuẩn Biomax 10kDa để loại bỏ các tạp chất có trọng lượng phân tử thấp. Dịch siêu lọc, không chứa lipaza, được loại bỏ. Sau đó, dung dịch lipaza được tinh chế lại bằng cách loại bỏ vi sinh vật, như được chỉ ra trên đây, để thu được mức tải vi sinh vật dưới 5cfu/ml. Do đó, lipaza đã tinh chế có thể được làm đông khô tiếp.

3) Mô tả lipaza tái tổ hợp được tổng hợp bởi YL-LIP2-6C

a) Theo dõi sự tổng hợp lipaza bởi chủng YL-LIP2-6C trong quá trình lên men

Ở mỗi thời điểm đo, mẫu nuôi cấy được ly tâm và dịch nổi được phân tích bằng SDS-PAGE. 75 μl dịch nổi được trộn với 75 μl nước và sau đó nạp 5 μl lên gel có 26 lỗ. Các mẫu chứa lượng lipaza LIP2 đã biết cũng được phân tích. Các kết quả được thể hiện trong fig.4. Bằng cách so sánh lượng lipaza thu được ở cuối quá trình lên men (T33), với gradien các lượng lipaza LIP2 đã biết, nồng độ lipaza thu được sau 100 giờ lên men có thể được ước tính là 1,5g/l.

Hơn thế nữa, các tác giả sáng chế sử dụng quy trình tổng hợp lipaza theo sáng chế đối với thể tích cuối cùng là khoảng 35 lít, mà cho phép tổng hợp lipaza với hiệu suất nằm trong khoảng từ 1 đến 3g mỗi lít dịch nổi nuôi cấy.

b) Xác định nồng độ protein và ước tính hiệu suất tổng hợp lipaza tái tổ hợp

Nồng độ protein trong dịch nổi nuôi cấy được xác định như được chỉ ra trong ví dụ 1 (quy trình Bradford). 7 lần đo độc lập được thực hiện và nồng độ protein trong dịch nổi bằng 2,3g/l. Độ tinh khiết của protein LIP2 trong dịch nổi được đánh giá bằng SDS-PAGE. Các kết quả được thể hiện trong fig.5. Mức độ tinh khiết được ước tính là khoảng 70%. Hiệu suất tổng hợp lipaza thu được trong bước lên men với dòng YL-LIP2-6C là 1,6g/l.

c) *Đo hoạt tính đặc hiệu của lipaza tái tổ hợp được tổng hợp bởi dòng YL-LIP2-6C*

Hoạt tính đặc hiệu của lipaza được tổng hợp bởi dòng YL-LIP2-6C được đo như đã chỉ ra trong ví dụ 1. Mẫu tương ứng với dịch nổi lên men được pha loãng 100 lần trong dung dịch đệm chứa Na_2HPO_4 50mM, KH_2PO_4 50mM, NaCl 150mM, độ pH=6,0. Hoạt tính xúc tác xác định được ở 37°C với trioctanoin trong ba thử nghiệm độc lập là 21883,33U/ml dịch nổi (Bảng II).

	Hoạt tính lipaza (U/ml)				
	Các thử nghiệm			Trị số trung bình	SD
Mẫu	20800,00	22750,00	22100,00	21883,33	992,89

Bảng II: Đo hoạt tính của các mẫu dịch nổi lên men

Từ nồng độ ước tính của lipaza LIP2 trong dịch nổi (xem trên đây), hoạt tính đặc hiệu của lipaza là 13675 U/mg, so với hoạt tính đặc hiệu của lipaza tổng hợp được trong các nghiên cứu lâm sàng. Hoạt tính đặc hiệu của lipaza được tổng hợp bởi dòng YL-LIP2-6C là thích hợp với các điều kiện được yêu cầu trong các mẻ lâm sàng.

d) *Khối lượng phân tử của lipaza tái tổ hợp*

Phân tích phổ khối (xem ví dụ 1) được thực hiện trong dịch nổi nuôi cấy lên men sau khi ly tâm mà không tinh chế. Kết quả được thể hiện trong fig.6. Đỉnh chính quan sát được thể hiện khối lượng phân tử là 37648 Da. Lipaza LIP2 được tổng hợp bởi YL-LIP2-6C có khối lượng phân tử đáng kể vì trị số quan sát được phù hợp với các điều kiện được yêu cầu cho các mẻ lâm sàng, tức là bằng 37500 +/- 1000Da.

Ví dụ này minh họa cho việc lựa chọn dòng ổn định, YL-LIP2-6C (trong trường hợp này, 100% các dòng phân tích sau 30 thế hệ có số locut của gen LIP2 bằng với dòng ban đầu). Ngoài ra, độ ổn định di truyền của dòng này không bị ảnh hưởng bởi các điều kiện nuôi cấy được sử dụng để tổng hợp lipaza (trong các lần nuôi cấy sơ bộ; ngay trước khi lên men; ngay trước khi cảm ứng sự tổng hợp lipaza bằng axit oleic; ở thời điểm kết thúc quá trình lên men).

4) *Độ ổn định di truyền của dòng YL-LIP2-6C*

Độ ổn định di truyền của dòng YL-LIP2-6C trong quy trình tổng hợp lipaza, bao gồm bước nuôi cấy sơ bộ và bước lên men, được phân tích bằng cách xác định số sự kiện tích hợp của cat-xet biểu hiện gen LIP2 ở locut khác nhau trong ADN của *Yarrowia lipolytica*, trong các khuẩn lạc được chọn ở các thời điểm T0, T17 và T33.

a) *Lựa chọn các khuẩn lạc*

Mẫu nuôi cấy sơ bộ 2 (thời điểm T0, bắt đầu lên men), mẫu nuôi cấy trong các điều kiện lên men ở thời điểm T17 (ngay trước khi cảm ứng) và ở thời điểm T33 (kết thúc quá trình lên men) được pha loãng, ở giai đoạn thứ nhất đến $OD_{600}=1$, và sau đó được pha loãng 1000 lần. Mỗi 10 μ l các dung dịch pha loãng này được trải lên ba đĩa nuôi cấy trên môi trường YPD. Sau đó, ủ các đĩa này ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến khi lựa chọn các khuẩn lạc để phân tích số lượng locut.

20 khuẩn lạc thu được từ mẫu được thu gom ở thời điểm bắt đầu lên men (thời điểm T0), 20 khuẩn lạc thu được từ mẫu được thu gom ngay trước khi cảm ứng (T17) và 100 khuẩn lạc thu được từ mẫu được thu gom ở thời điểm kết thúc quá trình lên men (T33) được chủng riêng biệt vào 4ml môi trường 02130S được làm giàu và sau đó được nuôi cấy trong 72 giờ. Sau đó, các dung dịch gốc trong 30% glyxerol được điều chế để chiết ADN và phân tích thẩm tách Southern (nguyên liệu và quy trình).

b) Xác định số lượng sự kiện tích hợp gen LIP2 ở các locut khác nhau cho 140 khuẩn lạc thu được từ chủng YL-LIP2-6C

Các kết quả của phân tích thẩm tách Southern về số lượng sự kiện tích hợp ở các locut khác nhau của gen LIP2 trên 20 khuẩn lạc được thu gom ở thời điểm T0 (thời điểm bắt đầu lên men), 20 khuẩn lạc được thu gom ở thời điểm T17 (48 giờ lên men) và 100 khuẩn lạc được thu gom ở thời điểm T33 (100 giờ lên men) được minh họa trong fig.3. Các kết quả này chỉ ra rằng tất cả các khuẩn lạc được phân tích đều có 6 locut của gen LIP2. Vì chủng *kiểu đại* mang bản sao của gen LIP2 nội sinh, do đó chủng YL-LIP2-6C có 5 locut để tích hợp của cat-xet để biểu hiện gen LIP2. Do đó, dòng YL-LIP2-6C ổn định 100% trong suốt quá trình lên men 100 giờ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa lipaza kháng axit nấm men LIP2 tái tổ hợp, chế phẩm này thu được bằng phương pháp bao gồm các bước:

a) nuôi cấy tế bào *Yarrowia lipolytica* được biến nạp bằng vector chứa cat-xet để biểu hiện lipaza kháng axit nấm men LIP2, và

b) thu hồi lipaza LIP2 tái tổ hợp được tạo ra bởi các tế bào nêu trên từ dịch nổi nuôi cấy,

trong đó bước nuôi cấy được thực hiện trong môi trường nuôi cấy không chứa sản phẩm có nguồn gốc động vật hoặc hỗn hợp chưa được xác định chứa các nguyên liệu protein có nguồn gốc động vật hoặc chứa sản phẩm của quá trình tiêu hóa bằng enzym của chúng, và

chế phẩm này có hoạt tính xúc tác ở độ pH=6 bằng ít nhất là 15000 đơn vị trên mỗi ml dịch nổi nuôi cấy, một đơn vị tương ứng với lượng enzym có khả năng xúc tác sự giải phóng 1 μ mol axit béo mỗi phút khi cơ chất được sử dụng là trioctanoin và/hoặc ở nồng độ của lipaza nêu trên trong chế phẩm nêu trên là lớn hơn 1g lipaza mỗi lít,

trong đó tế bào *Yarrowia lipolytica* nêu trên là dòng YL-LIP2-6C, được lưu trữ ở Viện Lưu trữ quốc gia Giống nuôi cấy vi sinh vật (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - C.N.C.M.) địa chỉ 28 rue de Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, với số I-3542 vào ngày 15 tháng 12 năm 2005.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này có hoạt tính xúc tác ở độ pH=6 ít nhất bằng 20000 đơn vị trên mỗi ml dịch nổi nuôi cấy, một đơn vị tương ứng với lượng enzym có khả năng xúc tác sự giải phóng 1 μ mol axit béo mỗi phút khi cơ chất được sử dụng là trioctanoin.

3. Dược phẩm chứa chế phẩm lipaza theo điểm 1.

1/3

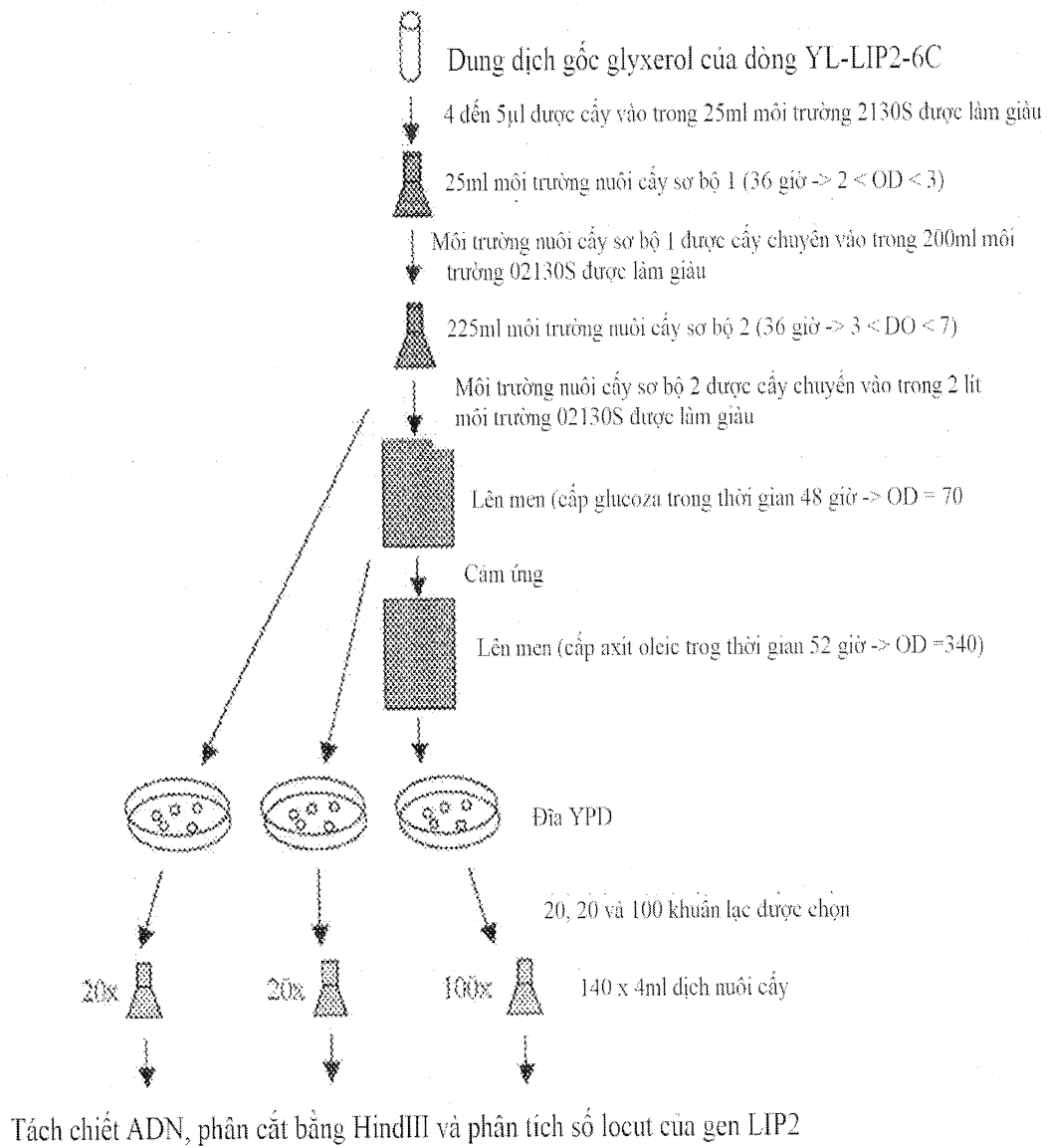


FIG. 1

2/3

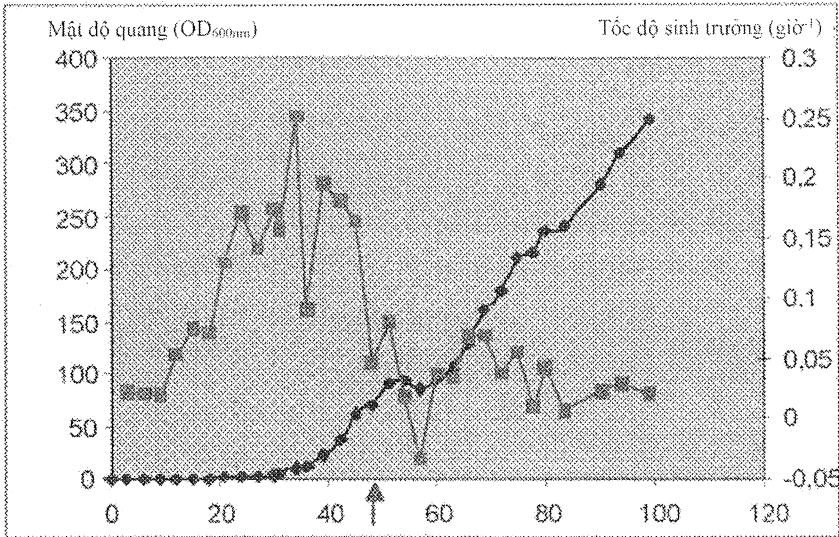


Fig.2

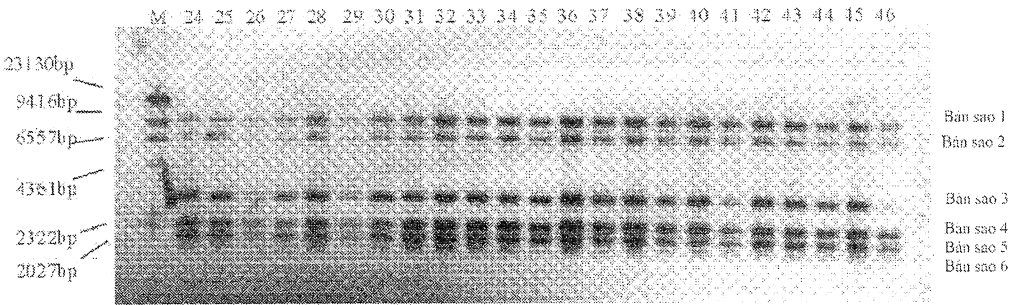


Fig.3

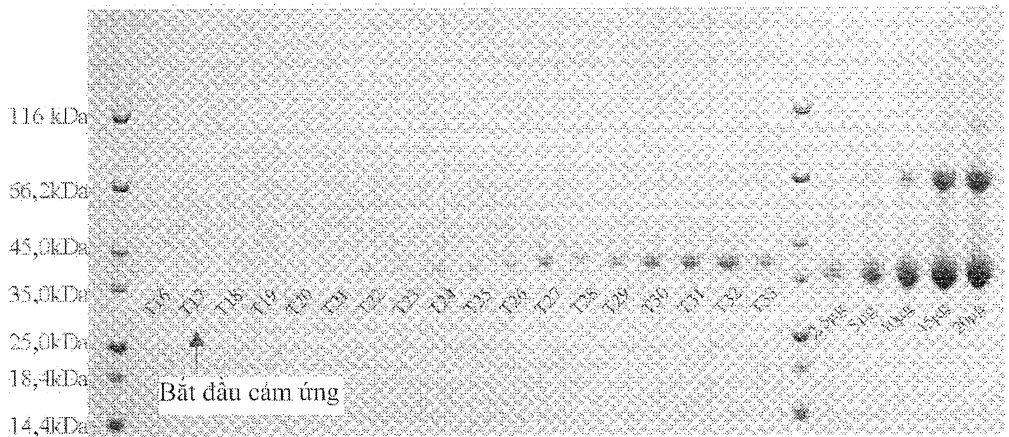


Fig.4

3/3

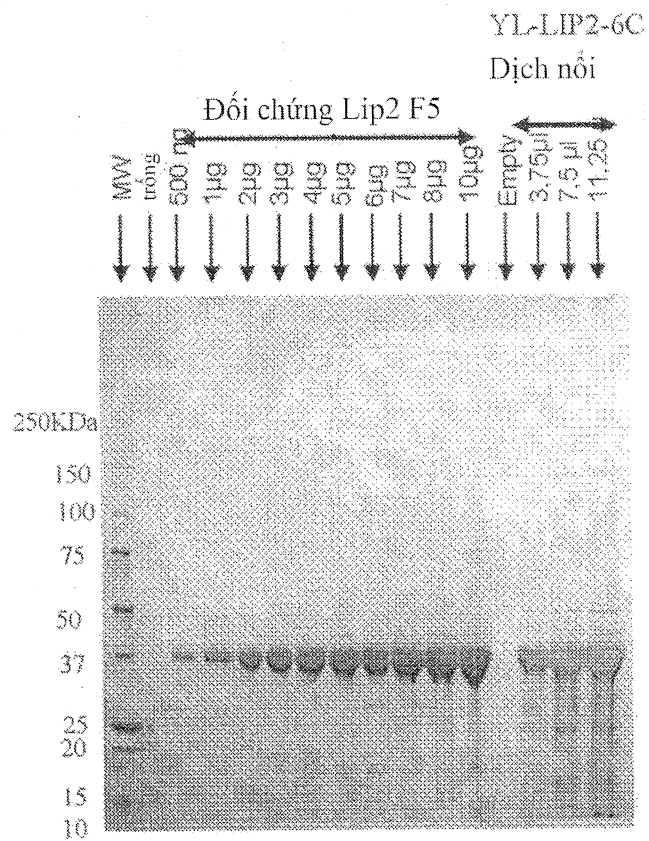


Fig.5

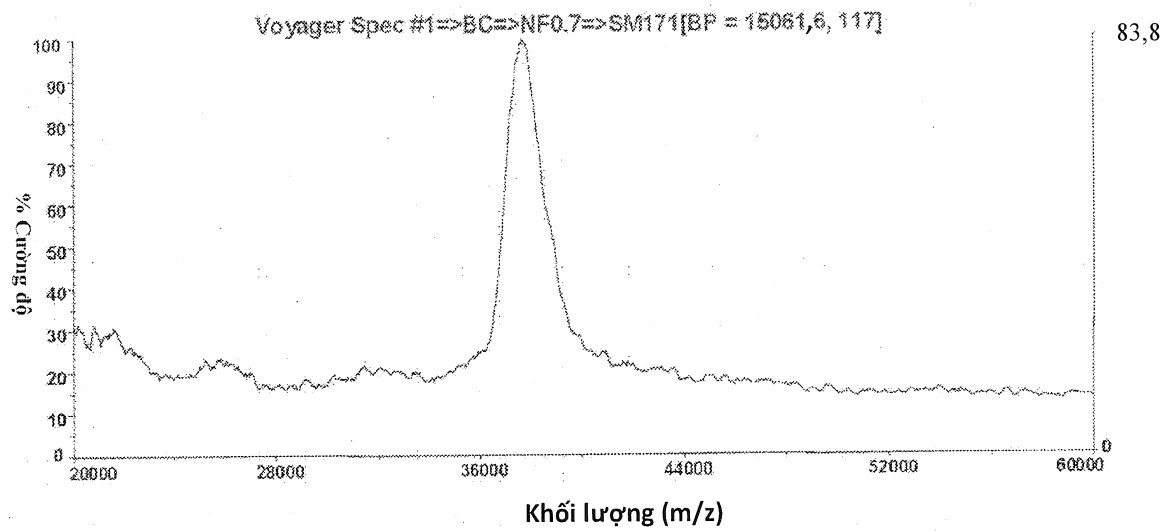


Fig.6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER LEBLOND, Yves MOUZ, Nicolas	
<120>	Chế phẩm chứa lipaza kháng axit nấm men LIP2 tái tổ hợp và dược phẩm chứa chế phẩm này	
<130>	F269Cas39PCT	
<160>	2	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Mỗi ngược	
<400>	1 gtgtacacct ctaccgagac ctct	24
<210>	2	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Mỗi ngược	
<400>	2 ttagatacca cagacaccct cggc	24