



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035961

(51)⁷ C12N 9/16

(13) B

(21) 1-2015-00310

(22) 28/06/2013

(86) PCT/US2013/048571 28/06/2013

(87) WO 2014/005019 03/01/2014

(30) 61/666,719 29/06/2012 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/06/2015 327A

(73) SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC. (US)

300 Shire Way, Lexington, Massachusetts 02421, USA

(72) BOLGOG, Ferenc (US); HEARTLEIN, Mike (US).

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

(54) TẾ BÀO TẠO RA IDURONAT-2-SULFATAZA TÁI TỔ HỢP

(57) Sáng chế đề xuất, trong số các đối tượng khác, các phương pháp và các dược phẩm để tạo ra protein I2S tái tổ hợp có hiệu lực và hoạt tính được cải thiện bằng cách sử dụng các tế bào cùng biểu hiện I2S và protein FGE. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế được xử lý để đồng thời biểu hiện quá mức protein I2S và FGE tái tổ hợp. Các tế bào theo sáng chế có thể thích ứng với nhiều điều kiện nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế thích ứng với việc nuôi cấy trong huyền phù không chứa huyết thanh ở quy mô lớn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các phương pháp và các dược phẩm để tạo ra protein I2S tái tổ hợp có hiệu lực và hoạt tính được cải thiện bằng cách sử dụng các tế bào cùng biểu hiện I2S và protein FGE. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế được xử lý để đồng thời biểu hiện quá mức protein I2S và FGE tái tổ hợp. Các tế bào theo sáng chế có thể thích ứng với nhiều điều kiện nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế thích ứng với việc nuôi cấy trong huyền phù không chứa huyết thanh ở quy mô lớn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh mô liên kết typ II (MPS II, hội chứng Hunter) là một rối loạn tích lũy thể tiêu bào liên quan đến nhiễm sắc thể X do sự thiếu hụt enzym iduronat-2-sulfatase (I2S) gây ra. I2S phân cắt các gốc 2-O-sulfat ngoài cùng ra khỏi các glycosaminoglycan (GAG) dermatan sulfat và heparan sulfat. Do mất hoặc thiếu hụt enzym I2S ở các bệnh nhân mắc hội chứng Hunter, GAG sẽ tích tụ tăng dần trong thể tiêu bào của nhiều loại kiểu tế bào, gây ra xung huyết tế bào, phì đại cơ quan, hủy mô, và loạn chức năng hệ cơ quan.

Nói chung, các biểu hiện trên cơ thể của các bệnh nhân mắc hội chứng Hunter bao gồm cả triệu chứng sinh dưỡng lẫn thần kinh. Ví dụ, trong một số trường hợp mắc hội chứng Hunter, sự ảnh hưởng đến hệ thần kinh trung ương sẽ dẫn đến đáp ứng muộn tăng dần và các vấn đề về hệ thần kinh. Mặc dù các triệu chứng không mang neuron thần kinh của hội chứng Hunter nói chung không xuất hiện khi mới sinh, sau một khoảng thời gian, sự tích tụ GAG tăng dần trong các tế bào của cơ thể có thể có tác động đáng kể đến các mô ngoại vi của cơ thể. Sự tích tụ GAG trong mô ngoại vi khiến cho mặt của bệnh nhân bị thô cứng và khiến cho trán gồ, mũi tẹt và lưỡi to, các dấu hiệu chỉ báo bệnh nhân mắc hội chứng Hunter. Tương tự, sự tích tụ GAG có thể tác động bất lợi đến hệ cơ quan của cơ thể. Biểu hiện ban đầu như làm dày vách tim, phổi và khí đạo, và làm phì đại bất thường gan, lá lách và thận, các thay đổi đáng kể này có thể dẫn đến suy nhược cơ quan đáng kể ở diện rộng. Kết quả là, hội chứng Hunter luôn nghiêm trọng, tiến triển, và làm giảm tuổi thọ.

Liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế (enzyme replacement therapy - ERT) là liệu pháp điều trị đã được chấp nhận để điều trị hội chứng Hunter (MPS II), mà bao gồm việc cho các bệnh nhân mắc hội chứng Hunter dùng enzym I2S thay thế ngoại sinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất, trong số các đối tượng khác, phương pháp và dược phẩm cải tiến để tạo ra protein I2S tái tổ hợp mà cho phép liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế hiệu quả hơn đối với hội chứng Hunter. Sáng chế bao gồm việc phát hiện ra rằng protein I2S tái tổ hợp có thể được tạo ra bởi tế bào của động vật có vú được xử lý để cùng biểu hiện protein I2S tái tổ hợp và enzym sinh ra formylglyxin (FGE). Điều bất ngờ là, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bởi các tế bào đã được xử lý có tỷ lệ phần trăm chuyển hóa C α -formylglyxin (FGly) cao bất thường (ví dụ, hơn 70% và đến 100%), cải thiện hoạt tính enzym của protein I2S tái tổ hợp ở mức độ đáng kể. Ngoài ra, tế bào của động vật có vú cùng biểu hiện các protein I2S và FGE theo sáng chế đã được làm thích nghi thành công để sinh trưởng trong việc nuôi cấy trong huyền phù ở quy mô lớn. Do đó, sáng chế cho phép tạo ra protein I2S tái tổ hợp rất hiệu nghiệm ở quy mô lớn.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chứa axit nucleic thứ nhất ghi mã protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và axit nucleic thứ hai ghi mã protein enzym sinh ra formylglyxin (FGE) chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:5, trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc thứ hai là ngoại sinh và trong đó tế bào, một khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào (ví dụ, trong huyền phù hoặc trong môi trường dính), sẽ tạo ra protein I2S có mức độ chuyển hóa ít nhất khoảng 70% (ví dụ, ít nhất khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) gốc cystein tương ứng với Cys59 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 thành C α -formylglyxin (FGly).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa axit nucleic thứ nhất ghi mã protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 50%

(ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và axit nucleic thứ hai ghi mã protein enzym sinh ra formylglyxin (FGE) chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:5, trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc thứ hai là ngoại sinh và trong đó tế bào, khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có mức độ chuyển hóa ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) gốc xystein tương ứng với Cys59 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 thành Ca-formylglyxin (FGly) và ở hiệu suất đặc hiệu lớn hơn khoảng 10 picogam/tế bào/ngày (ví dụ, lớn hơn khoảng 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 picogam/tế bào/ngày).

Theo một số phương án, axit nucleic thứ nhất ghi mã protein I2S có trình tự axit amin đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, axit nucleic thứ hai ghi mã protein FGE có trình tự axit amin đồng nhất với trình tự nêu trong SEQ ID NO:5.

Theo một số phương án, axit nucleic thứ nhất và/hoặc thứ hai được liên kết linh hoạt với gen khởi đầu hCMV.

Theo một số phương án, axit nucleic thứ nhất và/hoặc thứ hai được tối ưu hóa codon. Theo một số phương án, axit nucleic thứ nhất có trình tự tương đồng ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7. Theo các phương án cụ thể, axit nucleic thứ nhất có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, axit nucleic thứ hai chứa trình tự tương đồng ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:8. Theo một số phương án, axit nucleic thứ hai có trình tự tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:8.

Theo một số phương án, cả axit nucleic thứ nhất lẫn axit nucleic thứ hai là ngoại sinh (còn được gọi là tái tổ hợp). Theo một số phương án, axit nucleic thứ nhất và/hoặc thứ hai được hợp nhất (ví dụ, theo cách ổn định) vào hệ gen của tế bào. Theo một số phương án, axit nucleic thứ nhất và/hoặc thứ hai có mặt trong một hoặc nhiều cấu trúc ngoài nhiễm sắc thể.

Theo một số phương án, tế bào theo sáng chế là tế bào của động vật có vú. Theo các phương án nhất định, tế bào của động vật có vú thích hợp là tế bào của người. Theo các phương án nhất định, tế bào của động vật có vú thích hợp là tế bào CHO.

Theo một số phương án, tế bào theo sáng chế là có thể thích ứng với việc nuôi cấy trong huyền phù. Theo các phương án khác, tế bào theo sáng chế là tế bào bám.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp bằng cách nuôi cấy tế bào đã được bộc lộ theo các phương án khác nhau nêu trong bản mô tả này trong các điều kiện sao cho các protein I2S và FGE tái tổ hợp được cùng biểu hiện trong tế bào. Theo một số phương án, tế bào được nuôi cấy ở quy mô lớn. Theo một số phương án, quy mô lớn thích hợp đối với sáng chế là quy trình thùng phản ứng sinh học. Theo một số phương án, thùng phản ứng sinh học thích hợp đối với sáng chế là ở quy mô được chọn từ 10l, 200l, 500l, 1000l, 1500l, 2000l. Theo một số phương án, quy trình ở quy mô lớn (ví dụ, thùng phản ứng sinh học) thích hợp đối với sáng chế bao gồm quy trình nuôi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng. Theo một số phương án, quy trình ở quy mô lớn (ví dụ, thùng phản ứng sinh học) thích hợp đối với sáng chế bao gồm quy trình nuôi cấy theo mẻ. Theo một số phương án, quy trình ở quy mô lớn thích hợp đối với sáng chế là quy trình chai quay. Theo một số phương án, tế bào theo sáng chế được nuôi cấy trong huyền phù. Theo các phương án khác, tế bào theo sáng chế là tế bào được nuôi cấy bám dính.

Theo một số phương án, tế bào theo sáng chế được nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh (ví dụ, môi trường không có nguồn gốc động vật, xác định thành phần hóa học, hoặc không chứa protein). Theo các phương án khác, tế bào theo sáng chế được nuôi cấy trong môi trường chứa huyết thanh.

Theo các phương án khác nhau, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước tinh chế protein I2S tái tổ hợp.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất protein iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp tạo ra bởi tế bào hoặc phương pháp đã được bộc lộ theo các phương án khác nhau nêu trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất việc sản xuất protein iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp, trong đó protein I2S tái tổ hợp này có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1; và có mức độ

chuyển hóa ít nhất khoảng 70% (ví dụ, ít nhất khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) gốc xystein tương ứng với Cys59 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 thành C_α-formylglyxin (FGly). Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có trình tự axit amin tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp có hoạt tính đặc hiệu ít nhất khoảng 20U/mg, 30U/mg, 40U/mg, 50U/mg, 60U/mg, 70U/mg, 80U/mg, 90U/mg, hoặc 100U/mg như được xác định theo thử nghiệm hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất.

Trong số các đối tượng khác, sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa protein I2S tái tổ hợp đã được bộc lộ theo các phương án khác nhau nêu trong bản mô tả này và chất mang được dụng và phương pháp điều trị hội chứng Hunter bằng cách cho đối tượng có nhu cầu điều trị dùng protein I2S tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này hoặc được phẩm chứa nó.

Thuật ngữ “protein I2S”, “I2S”, “enzym I2S”, hoặc các biến thể ngữ pháp tương đương được dùng trong bản mô tả này, chỉ chế phẩm phân tử protein I2S tái tổ hợp trừ khi được chỉ ra khác.

Các thuật ngữ “khoảng” và “gần khoảng” được dùng trong bản mô tả này là tương đương với nhau. Số bất kỳ được dùng trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này kèm theo hoặc không kèm theo khoảng/gần khoảng mang ý nghĩa bao gồm sự thay đổi bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Các dấu hiệu, các đối tượng, và các ưu điểm khác theo sáng chế được thể hiện rõ trong phần Mô tả chi tiết sáng chế dưới đây. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng phần Mô tả chi tiết sáng chế, trong khi biểu thị các phương án theo sáng chế, chỉ được thể hiện nhằm mục đích minh họa, mà không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi và các cải biến khác nhau trong phạm vi của sáng chế là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi xem xét phần Mô tả chi tiết sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ kèm theo, mà cùng nhau tạo thành bộ hình vẽ, chỉ nhằm mục đích minh họa, mà không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Hình 1 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO:1) ghi mã protein iduronat-2-sulfatase (I2S) ở dạng thành thực của người và biểu thị các vị trí tiềm năng bên trong

trình tự protein để glycosyl hóa liên kết ở đầu N và chuyển hóa xystein.

Hình 2 thể hiện thiết kế cấu trúc làm ví dụ để đồng biểu hiện I2S và FGE (tức là SUMF1). (A) Đơn vị biểu hiện trên các vật truyền riêng biệt (để đồng chuyển nhiễm hoặc chuyển nhiễm tiếp theo); (B) Đơn vị biểu hiện trên cùng vật truyền (một lần chuyển nhiễm): (1) xistron riêng biệt và (2) xistron liên kết phiên mã.

Hình 3 thể hiện các mức độ làm ví dụ của hoạt tính đặc hiệu của I2S quan sát khi tương quan với phần trăm chuyển hóa formylglyxin.

Hình 4 thể hiện profin glycan làm ví dụ được sinh ra đối với enzym I2S tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng các dòng tế bào I2S-AF 2D và 4D được sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh so với enzym I2S tái tổ hợp đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

ĐỊNH NGHĨA

Để dễ hiểu sáng chế hơn, đầu tiên, các thuật ngữ nhất định được xác định. Các định nghĩa khác đối với các thuật ngữ sau và các thuật ngữ khác được nêu dưới đây trong toàn bộ bản mô tả này.

Axit amin: thuật ngữ “axit amin” được dùng trong bản mô tả này, theo nghĩa rộng nhất của nó, để chỉ hợp chất và/hoặc chất bất kỳ mà có thể được kết hợp vào chuỗi polypeptit. Theo một số phương án, axit amin có công thức chung $H_2N-C(H)(R)-COOH$. Theo một số phương án, axit amin là axit amin có trong tự nhiên. Theo một số phương án, axit amin là axit amin tổng hợp; theo một số phương án, axit amin là D-axit amin; theo một số phương án, axit amin là L-axit amin. Thuật ngữ “axit amin chuẩn” được dùng để chỉ axit amin bất kỳ trong số hai mươi L-axit amin chuẩn thường được tìm thấy ở peptit có trong tự nhiên. Thuật ngữ “axit amin không chuẩn” được dùng để chỉ axit amin bất kỳ, mà không phải là axit amin chuẩn, bất kể nó được sản xuất theo cách tổng hợp hoặc thu được từ nguồn tự nhiên. Thuật ngữ “axit amin tổng hợp” được dùng trong bản mô tả này, gồm axit amin được cải biến hóa học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, muối, chất dẫn xuất axit amin (như amit), và/hoặc thay thế. Axit amin, bao gồm các axit amin ở đầu tận cùng carboxy và/hoặc amin trong peptit, có thể được cải biến bằng cách metyl hóa, amit hóa, axetyl hóa, bảo vệ nhóm, và/hoặc thế bằng các nhóm khác về mặt hóa học mà có thể làm thay đổi thời gian bán tồn trong hệ

tuần hoàn của peptit này mà không ảnh hưởng có hại đến hoạt tính của chúng. Các axit amin có thể tham gia vào liên kết disulfua. Các axit amin có thể có một hoặc nhiều cải biến sau dịch mã, như liên kết với một hoặc nhiều đơn vị cấu trúc hóa học (ví dụ, nhóm metyl, nhóm axetat, nhóm axetyl, nhóm phosphat, gốc formyl, nhóm isoprenoit, nhóm sulfat, gốc polyetylen glycol, gốc lipit, gốc hydrat cacbon, gốc biotin, v.v.). Theo một số phương án, các axit amin theo sáng chế có thể được tạo ra trong hoặc được dùng để bổ sung vào môi trường để nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, các axit amin được tạo ra trong hoặc được sử dụng vào môi trường nuôi cấy tế bào bổ sung có thể được tạo ra ở dạng muối hoặc ở dạng hydrat.

Khoảng: thuật ngữ “khoảng” hoặc “khoảng chừng” được dùng trong bản mô tả này, áp dụng cho một hoặc nhiều trị số đáng quan tâm, để chỉ trị số là tương tự trị số tham chiếu đã nêu. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “khoảng” hoặc “khoảng chừng” để chỉ khoảng trị số trong khoảng 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, hoặc thấp hơn theo cả hai chiều (lớn hơn hoặc nhỏ hơn) trị số tham chiếu đã nêu trừ khi có quy định khác hoặc rõ ràng theo cách khác tùy theo ngữ cảnh (trừ trị số vượt quá trị số có thể là 100%).

Nuôi cấy theo mẻ: thuật ngữ “nuôi cấy theo mẻ” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp nuôi cấy các tế bào, trong đó tất cả các thành phần mà sẽ được dùng chủ yếu trong các tế bào nuôi cấy, bao gồm môi trường (xem định nghĩa “môi trường” dưới đây) cũng như chính các tế bào, được đưa vào khi bắt đầu quy trình nuôi cấy. Nuôi cấy theo mẻ thường ngừng tại một thời điểm và các tế bào và/hoặc các thành phần trong môi trường được thu gom và tùy ý được tinh chế.

Độ sinh khả dụng: thuật ngữ “độ sinh khả dụng” nói chung được dùng trong bản mô tả này để chỉ tỷ lệ phần trăm của liều được dùng mà đến được dòng máu của đối tượng.

Có hoạt tính sinh học: thuật ngữ “có hoạt tính sinh học” được dùng trong bản mô tả này để chỉ đặc tính của chất bất kỳ có hoạt tính trong hệ sinh học (ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào, cơ quan, v.v.). Ví dụ, chất, mà khi được dùng cho cơ quan, có tác dụng sinh học trên cơ quan đó, được coi là có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học cũng có thể được xác định bằng các thử nghiệm *in vitro* (ví dụ, các thử nghiệm enzym *in vitro* như thử nghiệm giải phóng sulfat). Theo các phương án cụ thể, khi protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học, phần protein hoặc polypeptit có ít nhất một hoạt tính

sinh học của protein hoặc polypeptit thường được gọi là phần “có hoạt tính sinh học”. Theo một số phương án, protein được tạo ra và/hoặc được tinh chế từ hệ dịch nuôi cấy tế bào, mà biểu thị hoạt tính sinh học khi được dùng cho đối tượng. Theo một số phương án, protein cần phải xử lý tiếp để có hoạt tính sinh học. Theo một số phương án, protein cần có cải biến sau dịch mã như, nhưng không chỉ giới hạn ở, glycosyl hóa (ví dụ, sialyl hóa), farnysyl hóa, phân cắt, gấp nếp, chuyển hóa formylglyxin và tổ hợp của chúng, để có hoạt tính sinh học. Theo một số phương án, protein được tạo ra ở tiền dạng (tức là dạng chưa thành thực), có thể cần phải cải biến thêm để trở thành có hoạt tính sinh học.

Thùng phản ứng sinh học: thuật ngữ “thùng phản ứng sinh học” được dùng trong bản mô tả này để chỉ thùng dùng để tế bào giống cấy của vật chủ sinh trưởng. Thùng phản ứng sinh học có thể có kích thước bất kỳ chừng nào nó hữu dụng để nuôi cấy tế bào của động vật có vú. Nói chung, thùng phản ứng sinh học sẽ có dung tích ít nhất là 1 lit và có thể là 10 lit, 100 lit, 250 lit, 500 lit, 1000 lit, 2500 lit, 5000 lit, 8000 lit, 10000 lit, 120000 lit hoặc nhiều hơn, hoặc dung tích bất kỳ nằm trong khoảng đó. Điều kiện bên trong của thùng phản ứng sinh học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, độ pH, độ thẩm thấu, CO₂ bão hòa, O₂ bão hòa, nhiệt độ và tổ hợp của chúng, thường được kiểm soát trong thời gian nuôi cấy. Thùng phản ứng sinh học có thể được làm bằng vật liệu bất kỳ mà là thích hợp để giữ các tế bào trong môi trường trong các điều kiện nuôi cấy theo sáng chế, bao gồm thủy tinh, nhựa hoặc kim loại. Theo một số phương án, thùng phản ứng sinh học có thể được sử dụng để thực hiện việc nuôi cấy tế bào động vật. Theo một số phương án, thùng phản ứng sinh học có thể được sử dụng để thực hiện việc nuôi cấy tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, thùng phản ứng sinh học có thể được dùng cho các tế bào và/hoặc các dòng tế bào thu được từ các sinh vật như, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào của động vật có vú, các tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men và tế bào của người. Theo một số phương án, thùng phản ứng sinh học được sử dụng để tạo ra môi trường nuôi cấy tế bào ở quy mô lớn và có dung tích thường ít nhất là 100 lit và có thể là 200 lit, 500 lit, 1000 lit, 2500 lit, 5000 lit, 8000 lit, 10000 lit, 120000 lit hoặc nhiều hơn, hoặc dung tích bất kỳ nằm trong khoảng đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết và sẽ có thể lựa chọn các thùng phản ứng sinh học thích hợp để dùng khi thực hiện sáng chế.

Giống cấy tế bào: Thuật ngữ này được dùng để chỉ quần thể tế bào sinh trưởng

trong môi trường trong các điều kiện thích hợp để quần thể tế bào sống sót và/hoặc sinh trưởng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng, thuật ngữ này được dùng ở đây có thể chỉ thể kết hợp chứa quần thể tế bào và môi trường trong đó quần thể được sinh trưởng.

Nuôi cấy: thuật ngữ “nuôi cấy” hoặc các dạng ngữ pháp tương đương được dùng để chỉ quy trình duy trì các tế bào trong các điều kiện có lợi cho sự sinh trưởng hoặc sống sót. Các thuật ngữ “nuôi cấy tế bào” và “giống cấy tế bào” hoặc từ đồng nghĩa bất kỳ được dùng thay đổi lẫn nhau trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này.

Thùng nuôi cấy: thuật ngữ “thùng nuôi cấy” được dùng trong bản mô tả này để chỉ vật chứa bất kỳ mà có thể mang lại môi trường vô khuẩn để nuôi cấy tế bào. Thùng nuôi cấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vật chứa bằng thủy tinh, nhựa, hoặc kim loại.

Liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế (enzyme replacement therapy - ERT): thuật ngữ “liệu pháp điều trị bằng enzym thay thế (ERT)” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chiến lược điều trị bất kỳ mà điều chỉnh sự thiếu hụt enzym bằng cách cung cấp enzym đã mất. Theo một số phương án, enzym đã mất được cung cấp bằng cách dùng qua đường nội tủy mạc. Theo một số phương án, enzym đã mất được cung cấp bằng cách truyền vào dòng máu. Khi được dùng, enzym được các tế bào hấp thu và vận chuyển đến thể tiêu bào, mà ở đó enzym hoạt động để loại bỏ chất liệu đã tích tụ trong thể tiêu bào do thiếu hụt enzym. Nói chung, để liệu pháp điều trị thể tiêu bào bằng enzym thay thế có hiệu quả, enzym điều trị được phân phối đến thể tiêu bào ở các tế bào thích hợp trong mô đích nơi dễ thấy có sự khiếm khuyết về mặt tích lũy.

Biểu hiện: thuật ngữ “sự biểu hiện” của trình tự axit nucleic được dùng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều hiện tượng sau: (1) sự tạo ra khuôn ARN từ trình tự ADN (ví dụ, bằng cách phiên mã); (2) xử lý bản sao phiên mã ARN (ví dụ, bằng cách cắt ghép, chỉnh sửa, tạo ra đầu tận cùng 5', và/hoặc tạo ra đầu tận cùng 3'); (3) dịch mã ARN thành polypeptit hoặc protein; và/hoặc (4) cải biến sau dịch mã polypeptit hoặc protein.

Nuôi cấy theo mẻ nạp: thuật ngữ “nuôi cấy theo mẻ nạp” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp nuôi cấy các tế bào trong đó các thành phần bổ sung được đưa vào môi trường nuôi cấy tại một thời điểm sau khi bắt đầu quy trình nuôi cấy. Các thành phần được đưa vào thường bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng cho các tế bào

mà đã bị cạn kiệt trong quy trình nuôi cấy. Nuôi cấy theo mẻ có cung cấp dinh dưỡng thường bị ngừng tại một thời điểm và các tế bào và/hoặc các thành phần trong môi trường được thu gom và tùy ý được tinh chế.

Mảnh: thuật ngữ “mảnh” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các polypeptit và được xác định là phần riêng biệt bất kỳ của polypeptit nhất định mà là duy nhất hoặc đặc trưng của polypeptit này. Thuật ngữ đó được dùng trong bản mô tả này còn để chỉ phần riêng biệt bất kỳ của polypeptit nhất định mà giữ lại được ít nhất phân đoạn mang hoạt tính của polypeptit có chiều dài đầy đủ. Tốt hơn, nếu phân đoạn có hoạt tính này giữ lại được ít nhất 10% hoạt tính của polypeptit có chiều dài đầy đủ. Tốt hơn nữa, nếu phân đoạn mang hoạt tính được giữ lại ít nhất 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% hoạt tính của polypeptit có chiều dài đầy đủ. Còn tốt hơn nữa, nếu phân đoạn có hoạt tính được giữ lại ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoạt tính của polypeptit có chiều dài đầy đủ. Tốt nhất, nếu phân đoạn có hoạt tính được giữ lại 100% hoạt tính của polypeptit có chiều dài đầy đủ. Thuật ngữ đó được dùng trong bản mô tả này còn để chỉ phần bất kỳ của polypeptit nhất định mà có ít nhất một yếu tố trình tự xác lập tìm thấy ở polypeptit có chiều dài đầy đủ. Tốt hơn, nếu yếu tố trình tự chứa ít nhất 4 đến 5, tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 axit amin hoặc nhiều hơn trong polypeptit có chiều dài đầy đủ.

Gen: thuật ngữ “gen” được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự nucleotit, ADN hoặc ARN bất kỳ, ít nhất phần mà ghi mã sản phẩm cuối cùng riêng biệt, thường, nhưng không chỉ giới hạn ở, polypeptit, mà thực hiện chức năng theo khía cạnh nào đó của quy trình tế bào. Thuật ngữ này không chỉ có nghĩa được dùng để chỉ trình tự ghi mã mà mã hóa polypeptit hoặc sản phẩm cuối cùng riêng biệt khác, mà còn có thể bao gồm các vùng nằm trước và nằm sau trình tự ghi mã mà điều biến mức độ biểu hiện cơ bản, cũng như các trình tự xen vào (“intron”) nằm giữa các đoạn mã hóa riêng biệt (“exon”). Theo một số phương án, gen có thể bao gồm các trình tự điều biến (ví dụ, các gen khởi đầu, gen tăng cường, trình tự polyadenyl hóa, trình tự ngừng, trình tự Kozak, hộp tata, v.v.) và/hoặc trình tự cải biến. Theo một số phương án, gen có thể bao gồm các axit nucleic không mã hóa các protein mà lại mã hóa các phân tử ARN chức năng như ARN vận chuyển, các tác nhân tạo ARN can thiệp, v.v..

Sản phẩm gen hoặc *sản phẩm biểu hiện*: thuật ngữ “sản phẩm gen” hoặc thuật ngữ “sản phẩm biểu hiện” thường được dùng trong bản mô tả này để chỉ ARN đã được

phiên mã từ gen (trước và/hoặc sau xử lý) hoặc polypeptit (trước và/hoặc sau cải biến) được mã hóa bởi ARN đã được phiên mã từ gen.

Yếu tố kiểm soát di truyền: thuật ngữ “yếu tố kiểm soát di truyền” được dùng trong bản mô tả này để chỉ yếu tố trình tự bất kỳ mà điều biến sự biểu hiện gen mà yếu tố này liên kết linh hoạt với. Yếu tố kiểm soát di truyền có thể có chức năng làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện và có thể nằm trước, bên trong hoặc sau trình tự ghi mã. Yếu tố kiểm soát di truyền có thể hoạt động trong giai đoạn bất kỳ của mức độ biểu hiện gen bằng cách điều chỉnh, ví dụ, sự khởi đầu, kéo dài hoặc ngừng phiên mã, cắt ghép ARN thông tin, chỉnh sửa ARN thông tin, độ ổn định của ARN thông tin, sự định vị của ARN thông tin bên trong tế bào, sự khởi đầu, kéo dài hoặc ngừng dịch mã, hoặc giai đoạn khác bất kỳ của mức độ biểu hiện gen. Các yếu tố kiểm soát di truyền có thể hoạt động một cách riêng biệt hoặc kết hợp với nhau.

Mức độ tương đồng: thuật ngữ “mức độ tương đồng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ mối liên quan tổng thể giữa các phân tử polyme, ví dụ, giữa các phân tử axit nucleic (ví dụ, các phân tử ADN và/hoặc các phân tử ARN) và/hoặc giữa các phân tử polypeptit. Theo một số phương án, các phân tử polyme được xem là “tương đồng” với phân tử khác nếu trình tự của chúng giống nhau ít nhất 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 99%. Theo một số phương án, các phân tử polyme được xem là “tương đồng” với phân tử khác nếu các trình tự của chúng giống nhau ít nhất 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 99%.

Mức độ đồng nhất: thuật ngữ “mức độ đồng nhất” được dùng trong bản mô tả này để chỉ mối liên quan tổng thể giữa các phân tử polyme, ví dụ, giữa các phân tử axit nucleic (ví dụ, các phân tử ADN và/hoặc các phân tử ARN) và/hoặc giữa các phân tử polypeptit. Việc tính mức độ đồng nhất theo phần trăm của hai các trình tự axit nucleic, ví dụ, có thể được thực hiện bằng cách duỗi thẳng hai trình tự nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khe hở có thể được đưa vào một hoặc cả hai trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai để so sánh tối ưu và các trình tự không giống nhau có thể bị loại bỏ nhằm mục đích so sánh). Theo các phương án nhất định, chiều dài của trình tự đã được duỗi thẳng nhằm mục đích so sánh ít nhất bằng 30%, ít nhất bằng 40%, ít nhất bằng 50%, ít nhất bằng 60%, ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, hoặc gần như 100% chiều dài của trình tự tham chiếu. Sau đó, các nucleotit

ở vị trí nucleotit tương ứng được so sánh. Nếu vị trí trong trình tự thứ nhất bị chiếm bởi cùng nucleotit như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì các phân tử là giống hệt nhau ở vị trí đó. Mức độ đồng nhất tính theo phần trăm giữa hai trình tự là hàm của số lượng các vị trí giống nhau giữa các trình tự, tính cả số lượng khe hở, và chiều dài của từng khe hở, mà cần phải đưa vào để so sánh tối ưu hai trình tự này. Các trình tự so sánh và việc xác định mức độ đồng nhất theo phần trăm giữa hai trình tự có thể được hoàn thành bằng cách sử dụng thuật toán. Ví dụ, mức độ đồng nhất tính theo phần trăm giữa hai trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của Meyers và Miller (CABIOS, 1989, 4: 11- 17), mà đã được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0) bằng cách sử dụng bảng phần dư có trọng số PAM120, điểm phạt độ dài khe hở là 12 và điểm phạt khe hở là 4. Mức độ đồng nhất tính theo phần trăm giữa hai trình tự nucleotit có thể, theo cách khác, được xác định bằng cách sử dụng chương trình GAP trong GCG gói phần mềm bằng cách sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP. Có sẵn nhiều chương trình duỗi thẳng trình tự khác và có thể được dùng để xác định độ đồng nhất trình tự, ví dụ, Clustal.

Cải thiện, làm tăng, hoặc làm giảm: như được dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “cải thiện, “làm tăng” hoặc “làm giảm, hoặc các biến thể ngữ pháp tương đương, được dùng để chỉ trị số tương đối so với số đo ban đầu, như số đo trên cùng cá thể trước khi khởi đầu phép điều trị được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc số đo ở cá thể đối chứng (hoặc nhiều cá thể đối chứng) khi không có phép điều trị được bộc lộ trong bản mô tả này. “Cá thể đối chứng” là cá thể bị mắc cùng dạng bệnh tích lũy ở thể tiêu bào như cá thể được điều trị, là người ở cùng khoảng độ tuổi như cá thể được điều trị (để đảm bảo rằng các giai đoạn bệnh ở cá thể được điều trị và cá thể đối chứng là tương đương).

Dùng qua đường nội tủy mạc: các thuật ngữ “dùng qua đường nội tủy mạc” hoặc “tiêm vào nội tủy mạc” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc tiêm vào ống tủy sống (khoảng nội tủy mạc xung quanh tủy sống). Nhiều kỹ thuật có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tiêm vào não thất bên bằng cách khoan lỗ hoặc chọc vào bể não hoặc thất lưng hoặc vị trí tương tự. Theo một số phương án, “dùng qua đường nội tủy mạc” hoặc “phân phối vào nội tủy mạc” theo sáng chế chỉ việc sử dụng IT hoặc phân phối qua khu vực hoặc vùng thất lưng, tức là việc sử dụng hoặc phân phối IT ở thất lưng. Các thuật ngữ “vùng thất lưng” hoặc “khu vực thất lưng”

được dùng trong bản mô tả này để chỉ khu vực giữa đốt sống thắt lưng thứ ba và thứ tư (lưng dưới) và, kể cả vùng L2-S1 của cột sống.

Phân lập: thuật ngữ “phân lập” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất và/hoặc thực thể mà (1) được phân lập ra khỏi ít nhất một vài trong số các thành phần mà nó liên kết cùng khi được tạo ra ban đầu (kể cả trong tự nhiên và/hoặc trong thử nghiệm), và/hoặc (2) được tạo ra, chuẩn bị, và/hoặc sản xuất bởi bàn tay con người. Các chất và/hoặc các thực thể phân lập có thể được tách ra khoảng 10%, khoảng 20%, khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc nhiều hơn khoảng 99% các thành phần khác mà ban đầu chúng liên kết với. Theo một số phương án, các tác nhân phân lập được có độ tinh khiết khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99%, hoặc hơn 99%. Thuật ngữ một chất là “tinh khiết” được dùng trong bản mô tả này nếu nó hầu như không chứa các thành phần khác. Như được dùng trong bản mô tả này, việc tính độ tinh khiết của các chất và/hoặc các thực thể phân lập được theo phần trăm không nên bao gồm các tá dược (ví dụ, dung dịch đệm, dung môi, nước, v.v.).

Môi trường: các thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này để chỉ dung dịch chứa các chất dinh dưỡng nuôi dưỡng tế bào đang phát triển. Nói chung, các dung dịch này cung cấp axit amin thiết yếu và không thiết yếu, các vitamin, các nguồn năng lượng, lipid, và các nguyên tố vết cần thiết để tế bào sinh trưởng và/hoặc sống sót ở mức tối thiểu. Dung dịch này còn có thể chứa các thành phần làm gia tăng mức độ sinh trưởng và/hoặc sống sót lớn hơn tỷ lệ tối thiểu, bao gồm các hormon và các yếu tố sinh trưởng. Theo một số phương án, môi trường được pha chế đến độ pH và nồng độ muối tối ưu để tế bào sống sót và tăng sinh. Theo một số phương án, môi trường này có thể là “môi trường hóa học xác định” – môi trường không chứa huyết thanh mà không chứa các protein, sản phẩm thủy phân hoặc các thành phần có thành phần chưa biết. Theo một số phương án, môi trường hóa học xác định không chứa các thành phần có nguồn gốc động vật và tất cả các thành phần bên trong môi trường có công thức hóa học đã biết. Theo một số phương án, môi trường này có thể là “môi trường nền huyết thanh” – môi trường được bổ sung các thành phần có nguồn gốc động vật như, nhưng không chỉ giới

hạn ở, huyết thanh bào thai bò, huyết thanh ngựa, huyết thanh dê, huyết thanh lừa và/hoặc hỗn hợp của chúng.

Axit nucleic: Thuật ngữ “axit nucleic” được dùng trong bản mô tả này, theo nghĩa rộng nhất của nó, để chỉ hợp chất và/hoặc chất mà hoặc có thể được kết hợp vào mạch oligonucleotit. Theo một số phương án, axit nucleic là hợp chất và/hoặc chất mà hoặc có thể được kết hợp vào mạch oligonucleotit thông qua liên kết phosphodiester. Theo một số phương án, “axit nucleic” được dùng để chỉ gốc axit nucleic riêng biệt (ví dụ, nucleotit và/hoặc nucleosit). Theo một số phương án, “axit nucleic” được dùng để chỉ mạch oligonucleotit chứa gốc axit nucleic của cá thể. Thuật ngữ “oligonucleotit” và “polynucleotit” có thể được dùng thay thế nhau trong bản mô tả này. Theo một số phương án, “axit nucleic” bao gồm ARN cũng như ADN sợi đơn và/hoặc sợi đôi và/hoặc ADN hỗ trợ. Hơn thế nữa, các thuật ngữ “axit nucleic”, “ADN”, “ARN”, và/hoặc thuật ngữ tương tự bao gồm các chất tương tự axit nucleic, tức là các chất tương tự mà không phải là khung phosphodiester. Ví dụ, cái được gọi là “peptit axit nucleic”, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có liên kết peptit thay cho liên kết phosphodiester trong khung, được coi là nằm trong phạm vi của sáng chế. Thuật ngữ “trình tự nucleotit ghi mã trình tự axit amin” bao gồm tất cả các trình tự nucleotit mà là phiên bản suy biến của nhau và/hoặc mã hóa cùng trình tự axit amin. Các trình tự nucleotit mã hóa các protein và/hoặc ARN có thể bao gồm intron. Các axit nucleic có thể được tinh chế từ các nguồn tự nhiên, được tạo ra bằng cách sử dụng các hệ biểu hiện tái tổ hợp và tùy ý tinh chế, được tổng hợp hóa học, v.v.. Nếu thích hợp, ví dụ, trong trường hợp các phân tử được tổng hợp hóa học, các axit nucleic có thể chứa chất tương tự nucleosit như các chất tương tự có bazơ hoặc đường được cải biến hóa học, cải biến khung, v.v.. Trình tự axit nucleic được thể hiện theo hướng từ đầu tận cùng 5' đến đầu tận cùng 3', trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ “đoạn axit nucleic” được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự axit nucleic là phần của trình tự axit nucleic. Theo nhiều phương án, đoạn axit nucleic chứa ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc nhiều gốc. Theo một số phương án, axit nucleic là hoặc chứa nucleosit tự nhiên (ví dụ, adenosin, thymidin, guanosin, xytidin, uridin, deoxyadenosin, deoxythymidin, deoxyguanosin, và deoxyxytidin); chất tương tự nucleosit (ví dụ, 2-aminoadenosin, 2-thiothymidin, inosin, pyrolo-pyrimidin, 3-metyl adenosin, 5-metylxytidin, C-5 propynyl-xytidin, C-5 propynyl-uridin, 2-aminoadenosin, C5-bromouridin, C5-flouridin, C5-iodouridin, C5-

propynyl-uridin, C5-propynyl-xytidin, C5-metylxytidin, 2-aminoadenosin, 7-deazaadenosin, 7-deazaguanosin, 8-oxoadenosin, 8-oxoguanosin, O(6)-metylguanin, và 2-thioxytidin); bazơ được cải biến hóa học; bazơ được cải biến sinh học (ví dụ, bazơ được methyl hóa); bazơ xen vào; đường được cải biến (ví dụ, 2'-floriboza, riboza, 2'-đeoxyriboza, arabinoza, và hexoza); và/hoặc các nhóm phosphat được cải biến (ví dụ, phosphorothioat và liên kết 5'-N-phosphoramidit). Theo một số phương án, sáng chế đặc biệt đề xuất “axit nucleic không được cải biến”, nghĩa là các axit nucleic (ví dụ, polynucleotit và các gốc, bao gồm nucleotit và/hoặc nucleosit) mà không được cải biến hóa học để tạo điều kiện thuận lợi hoặc thực hiện thành công việc phân phối.

Quy trình nuôi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng: thuật ngữ “quy trình nuôi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phương pháp nuôi cấy các tế bào trong đó các thành phần bổ sung được đưa một cách liên tục hoặc bán liên tục vào môi trường nuôi cấy sau khi bắt đầu quy trình nuôi cấy. Các thành phần được đưa vào thường bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng cho các tế bào mà đã bị cạn kiệt trong quy trình nuôi cấy. Một phần các tế bào và/hoặc các thành phần trong môi trường thường được thu gom trên cơ sở liên tục hoặc bán liên tục và được tùy ý tinh chế. Nói chung, quy trình nuôi cấy tế bào bao gồm quy trình nuôi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng được gọi là “nuôi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng”. Nói chung, các chất bổ sung dinh dưỡng được đưa vào môi trường mới trong quy trình nuôi cấy có bổ sung chất dinh dưỡng. Theo một số phương án, môi trường mới có thể là giống hoặc tương tự môi trường cơ sở được dùng trong quy trình nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, môi trường mới có thể khác với môi trường cơ sở nhưng chứa các chất bổ sung dinh dưỡng mong muốn. Theo một số phương án, môi trường mới là môi trường hóa học xác định.

Protein: thuật ngữ “protein” được dùng trong bản mô tả này để chỉ polypeptit (tức là chuỗi gồm ít nhất hai axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit). Các protein có thể chứa các gốc khác với các axit amin (ví dụ, có thể là glycoprotein, proteoglycan, v.v.) và/hoặc có thể được xử lý hoặc cải biến theo cách khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng “protein” có thể là chuỗi polypeptit hoàn chỉnh như được tạo ra bởi tế bào (có hoặc không có trình tự tín hiệu), hoặc có thể là phần đặc trưng của chúng. Theo một số phương án, đôi khi protein có thể có nhiều hơn một chuỗi polypeptit, ví dụ, được liên kết bằng một hoặc nhiều liên kết disulfua hoặc được liên kết theo cách khác. Theo một số phương án, các polypeptit có thể chứa

L-axit amin, D-axit amin, hoặc cả hai và có thể chứa bất kỳ trong số các loại cải biến axit amin hoặc các chất tương tự đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cải biến hữu dụng bao gồm, ví dụ, axetyl hóa, amit hóa, metyl hóa ở đầu tận cùng, v.v.. Theo một số phương án, các protein có thể chứa axit amin tự nhiên, axit amin không tự nhiên, axit amin tổng hợp, và hỗn hợp của chúng. Thuật ngữ “peptit” nói chung được dùng để chỉ polypeptit có chiều dài ít hơn 100 axit amin, ít hơn 50 axit amin, ít hơn 20 axit amin, hoặc ít hơn 10 axit amin. Theo một số phương án, các protein là các kháng thể, các đoạn kháng thể, các phần có hoạt tính sinh học của chúng, và/hoặc các phần đặc trưng của chúng.

Protein tái tổ hợp và polypeptit tái tổ hợp: các thuật ngữ này được dùng ở đây để chỉ polypeptit được biểu hiện từ tế bào chủ, mà đã được xử lý di truyền để biểu hiện polypeptit này. Theo một số phương án, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thu được từ động vật. Theo một số phương án, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thu được từ côn trùng. Theo một số phương án, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thu được từ nấm men. Theo một số phương án, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thu được từ sinh vật không có nhân điển hình. Theo một số phương án, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thu được từ động vật có vú. Theo một số phương án, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện trong tế bào chủ thu được từ người. Theo một số phương án, polypeptit được biểu hiện tái tổ hợp có thể là polypeptit giống hoặc tương tự mà thường được biểu hiện trong tế bào chủ. Theo một số phương án, polypeptit được biểu hiện tái tổ hợp có thể là ngoại lai đối với tế bào chủ, tức là dị tương đồng đối với các peptit thường được biểu hiện trong tế bào chủ. Theo cách khác, theo một số phương án, polypeptit được biểu hiện tái tổ hợp có thể là polypeptit khảm, trong đó phần chứa các trình tự axit amin của polypeptit là giống hệt hoặc tương tự với các polypeptit thường được biểu hiện trong tế bào chủ, trong khi các phần khác là ngoại lai đối với tế bào chủ.

Enzym thay thế: thuật ngữ “enzym thay thế” được dùng trong bản mô tả này để chỉ enzym bất kỳ mà có thể hoạt động để thay thế cho ít nhất một phần enzym bị thiếu hụt hoặc bị mất ở bệnh cần được điều trị. Theo một số phương án, thuật ngữ “enzym thay thế” được dùng để chỉ enzym bất kỳ mà có thể hoạt động để thay thế ít nhất một phần enzym bị thiếu hụt hoặc bị mất trong thể tiêu bào ở bệnh tích lũy ở thể tiêu bào cần được điều trị. Theo một số phương án, enzym thay thế có khả năng làm giảm chất liệu

tích tụ ở thể tiêu bào của động vật có vú hoặc có thể cứu chữa hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh tích lũy ở thể tiêu bào. Enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế bao gồm cả enzym thông thường hoặc enzym được cải biến ở thể tiêu bào và có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp và tổng hợp hoặc được tinh chế từ các nguồn tự nhiên. Enzym thay thế có thể là enzym tái tổ hợp, enzym tổng hợp, enzym hoạt hóa gen hoặc enzym tự nhiên.

Vật truyền: Thuật ngữ “vật truyền” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó liên kết với. Theo một số phương án, các vật truyền có khả năng sao chép ngoài nhiễm sắc thể và/hoặc biểu hiện các axit nucleic mà chúng liên kết với trong tế bào chủ như tế bào nhân chuẩn và/hoặc không nhân. Các vật truyền có khả năng định hướng sự biểu hiện gen liên kết linh hoạt trong bản mô tả này được gọi là “vật truyền biểu hiện.”

Sáng chế đề xuất, trong số các đối tượng khác, các phương pháp và các dược phẩm để tạo ra protein I2S tái tổ hợp có tính hiệu nghiệm và hoạt tính cải thiện bằng cách sử dụng các tế bào cùng biểu hiện protein I2S và FGE. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế được xử lý để đồng thời biểu hiện quá mức các protein I2S và FGE tái tổ hợp. Các tế bào theo sáng chế có thể thích ứng với nhiều điều kiện môi trường nuôi cấy tế bào. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế có thể thích ứng với việc nuôi cấy trong huyền phù không chứa huyết thanh ở quy mô lớn.

Sáng chế theo nhiều khía cạnh được bộc lộ một cách chi tiết hơn trong các tiểu phần dưới đây. Việc sử dụng các tiểu phần này không có ý nghĩa giới hạn phạm vi của sáng chế. Mỗi tiểu phần có thể áp dụng cho khía cạnh bất kỳ của sáng chế. Trong bản mô tả này, việc sử dụng “hoặc” có nghĩa là “và/hoặc” trừ khi có quy định khác.

Iduronat-2-sulfataza (I2S)

Protein I2S được dùng trong bản mô tả này là protein hoặc phần protein bất kỳ mà có thể thay thế ít nhất một phần hoạt tính của protein Iduronat-2-sulfataza (I2S) có trong tự nhiên hoặc cứu chữa một hoặc nhiều kiểu hình hoặc các triệu chứng liên quan đến sự thiếu hụt I2S. Các thuật ngữ “enzym I2S” và “protein I2S”, và các biến thể ngữ pháp tương đương được dùng thay đổi lẫn nhau trong bản mô tả này.

Thông thường, protein I2S của người được tạo ra ở dạng tiền chất. Dạng tiền chất của I2S của người chứa peptit dẫn truyền tín hiệu (các gốc axit amin 1 đến 25 của tiền chất có chiều dài đầy đủ), tiền-peptit (các gốc axit amin 26 đến 33 của tiền chất có

chiều dài đầy đủ), và mạch (các gốc 34 đến 550 của tiền chất có chiều dài đầy đủ) mà có thể được xử lý tiếp thành mạch dài 42kDa (các gốc 34 đến 455 của tiền chất có chiều dài đầy đủ) và mạch dài 14kDa (các gốc 446 đến 550 của tiền chất có chiều dài đầy đủ). Nói chung, dạng tiền chất còn được gọi là tiền chất có chiều dài đầy đủ hoặc protein I2S có chiều dài đầy đủ, mà chứa 550 axit amin. Các trình tự axit amin dạng thành thực (SEQ ID NO:1) có peptit dẫn truyền tín hiệu đã bị loại ra và tiền chất có chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO:2) của thông thường tiểu biểu hoặc protein I2S của người có trong tự nhiên được thể hiện trong Bảng 1. Peptit dẫn truyền tín hiệu được gạch chân. Ngoài ra, các trình tự axit amin của dạng đồng chức năng a và b của tiền chất protein I2S của người cũng được nêu trong Bảng 1, lần lượt là trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 và 4.

Bảng 1. Iduronat-2-sulfataza của người

Dạng thành thực	SETQANSTTDALNVLLIIIVDDLRLPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASH SLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGN FSTIPQYFKENGYVTMSVGKVFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYHP SSEKYENTKTCRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTL PDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPF FLAVGYHKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLA PDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGP I PVDFQRK IRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALG EHGEWAKYSNFDVATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLF PYLDPFD SASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVE LCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQW NSDKPSLKD IKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFN PDEFLANFSDIHAG ELYFVDS DPLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP (SEQ ID NO:1)
Tiền chất có chiều dài đầy đủ (Dạng đồng chức năng a)	MPPPR TGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIIVD DLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVS FLTGRRPDTTRL YDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGK VFHFGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHA NLLCPVDVLDVPEGTL PDKQSTEQA IQLLEKMKTSASPF FLAVGY HKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDI RQREDVQALNISVPYGP I PVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLL SALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFDVATHVPLI FYVPGRTASLPEAGEKLF PYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVS LFPTLAGLAGLQVPPRCPVPSFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEED PYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKD IKIMGYSIRTI

	DYRYTVWVGFPDEFNLANFSDIHAGELYFVDSDDLQDHNMYNDSQ GGDLFQLLMP (SEQ ID NO:2)
Tiền chất dạng đồng chức năng b	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVD DLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVS FLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGK VFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHA NLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGY HKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDI RQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQEDQSSTGFRLKTSSTRKYK (SEQ ID NO:3)
Tiền chất dạng đồng chức năng c	MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVD DLRPSLGCYGDKLVRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVS FLTGRRPDTTRLYDFNSYWRVHAGNFSTIPQYFKENGYVTMSVGK VFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPDGELHA NLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGY HKPHIPFRYPKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDI RQREDVQALNISVPYGPPIPVDFQRKIRQSYFASVSYLDTQVGRLL SALDDLQLANSTIIAFTSDHGFLMRTNT (SEQ ID NO:4)

Do đó, theo một số phương án, enzym I2S là protein I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1). Như được bộc lộ trong bản mô tả này, SEQ ID NO:1 thể hiện trình tự axit amin chính tắc đối với protein I2S của người. Theo một số phương án, protein I2S có thể là dạng đồng chức năng cắt và/hoặc biến thể của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, tạo ra từ việc phiên mã tại vị trí khởi đầu khác trong vùng dịch mã ở đầu tận cùng đầu 5' của gen I2S. Theo một số phương án, enzym thay thế thích hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S thành thực của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S thành thực của người có thể là protein I2S thành thực của người được cải biến có một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin vào so với protein I2S thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:1), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, theo một số phương án, enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với protein I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%,

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với protein I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, enzym thay thế thích hợp đối với sáng chế chứa một đoạn hoặc một phần của protein I2S thành thực của người.

Theo cách khác, enzym I2S là protein I2S có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, enzym I2S có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S có chiều dài đầy đủ của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein I2S có chiều dài đầy đủ của người có thể là protein I2S có chiều dài đầy đủ của người được cải biến có một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin vào so với protein I2S có chiều dài đầy đủ thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:2), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, Theo một số phương án, enzym I2S hầu như tương đồng với protein I2S có chiều dài đầy đủ của người (SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế chứa một đoạn hoặc một phần protein I2S có chiều dài đầy đủ của người. Như được dùng trong bản mô tả này, protein I2S có chiều dài đầy đủ thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế là dạng đồng chức năng a của protein I2S của người. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng a của protein I2S của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng a của protein I2S của người có thể là dạng đồng chức năng a của protein I2S của người được cải biến

chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin so với dạng đồng chức năng a của protein I2S của người thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:3), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, theo một số phương án, enzym I2S hầu như tương đồng với dạng đồng chức năng a của protein I2S của người (SEQ ID NO:3). Theo một số phương án, enzym I2S có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, enzym I2S hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế chứa một đoạn hoặc một phần của dạng đồng chức năng a của protein I2S của người. Như được dùng trong bản mô tả này, dạng đồng chức năng a của protein I2S của người thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Theo một số phương án, enzym I2S là dạng đồng chức năng b của protein I2S của người. Theo một số phương án, enzym I2S có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng b của protein I2S của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của dạng đồng chức năng b của protein I2S của người có thể là dạng đồng chức năng b của protein I2S của người được cải biến chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin so với dạng đồng chức năng b của protein I2S của người thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:4), trong khi vẫn giữ được hoạt tính quan trọng của protein I2S. Do đó, theo một số phương án, enzym I2S hầu như tương đồng với dạng đồng chức năng b của protein I2S của người (SEQ ID NO:4). Theo một số phương án, enzym I2S có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, enzym I2S hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, enzym I2S có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, enzym I2S thích hợp đối với sáng chế chứa một đoạn hoặc một phần của dạng đồng chức năng b

của protein I2S của người. Như được dùng trong bản mô tả này, dạng đồng chức năng b của protein I2S của người thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Chất đồng đẳng hoặc các chất tương tự của protein I2S của người có thể được tạo ra theo các phương pháp làm thay đổi trình tự polypeptit mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết như được nêu trong tài liệu sưu tập các phương pháp này. Theo một số phương án, các thay thế bảo toàn đối với axit amin bao gồm các thay thế được thực hiện trong số các axit amin thuộc các nhóm sau: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; và (g) E, D. Theo một số phương án, “thay thế axit amin bảo toàn” để chỉ việc thay thế axit amin mà không làm thay đổi các đặc tính tính điện hoặc kích thước tương đối của protein mà thay thế axit amin được thực hiện trong đó.

Theo một số phương án, enzym I2S chứa gốc liên kết với thụ thể trên bề mặt của các tế bào để tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thu vào tế bào và/hoặc hướng đích đến thể tiêu bào. Ví dụ, thụ thể này có thể là thụ thể mannoza-6-phosphat độc lập với cation (CI-MPR) mà liên kết với các gốc mannoza-6-phosphat (M6P). Ngoài ra, CI-MPR cũng liên kết với các protein khác bao gồm IGF-II. Gốc hướng đích đến thể tiêu bào thích hợp có thể là IGF-I, IGF-II, RAP, p97, và biến thể, chất đồng đẳng hoặc các đoạn của chúng (ví dụ, kể cả peptit có trình tự tương đồng ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% với trình tự peptit thông thường thành thực của người IGF-I, IGF-II, RAP, p97). Theo một số phương án, thụ thể thích hợp mà các gốc M6P liên kết với có thể phụ thuộc cation.

Enzym sinh ra formylglyxin (FGE)

Thông thường, hoạt tính của enzym I2S bị ảnh hưởng bởi cải biến sau dịch mã của cystein bảo toàn (ví dụ, tương ứng với axit amin 59 của I2S thành thực của người (SEQ ID NO:1)) thành formylglyxin, mà còn được gọi là axit 2-amin-3-oxo propionic, hoặc oxo-alanin. Cải biến sau dịch mã này thường xảy ra trong lưới nội chất trong quy trình tổng hợp protein và được xúc tác bởi enzym sinh ra formylglyxin (FGE). Hoạt tính đặc hiệu của enzym I2S thường tương quan thuận với mức độ cải biến formylglyxin của I2S đó. Ví dụ, chế phẩm chứa protein I2S có mức cải biến formylglyxin tương đối cao thường có hoạt tính enzym đặc hiệu tương đối cao; trong đó chế phẩm chứa protein I2S có mức cải biến formylglyxin tương đối thấp thường có hoạt tính enzym đặc hiệu tương đối thấp.

Do đó, các tế bào thích hợp để tạo ra protein I2S tái tổ hợp theo sáng chế thường cũng biểu hiện protein FGE. Theo một số phương án, các tế bào thích hợp biểu hiện protein FGE nội sinh. Theo một số phương án, các tế bào thích hợp được xử lý để biểu hiện enzym sinh ra formylglyxin (FGE) ngoại sinh (còn được gọi là tái tổ hợp) kết hợp với I2S tái tổ hợp. Theo một số phương án, các tế bào thích hợp được xử lý để hoạt hóa gen FGE nội sinh sao cho mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính của protein FGE gia tăng.

Thông thường, protein FGE của người được tạo ra ở dạng tiền chất. Dạng tiền chất của FGE của người chứa peptit dẫn truyền tín hiệu (các gốc axit amin 1 đến 33 của tiền chất có chiều dài đầy đủ) và một mạch (các gốc 34 đến 374 của tiền chất có chiều dài đầy đủ). Thông thường, dạng tiền chất còn được gọi là tiền chất có chiều dài đầy đủ hoặc protein FGE có chiều dài đầy đủ, mà chứa 374 axit amin. Các trình tự axit amin của dạng thành thực (SEQ ID NO:5) có peptit dẫn truyền tín hiệu bị loại ra và tiền chất có chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO:6) của protein FGE của người thông thường hoặc có trong tự nhiên tiêu biểu được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Enzym sinh ra formylglyxin (FGE) của người

Dạng thành thực	SQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSSRE ANAPGPVPPERQLAHSKMVPIAGVFTMGTDDEPQIKQDGEA PARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEKFFVNSTGYLTEAEKFGDSF VFEGMLSEQVKTNIQQAVAAAPWWLPVKGANWRHPEGPD STILHRPDHPVLHVSWNDAYCTWAGKRLPTEAEWEYSC RGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGF QGTAPVDAFPPNGYGLYNIVGNAWEWTSDDWWTVHHSVEE TLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTF DSSASNLGFRCAADRLPTMD (SEQ ID NO:5)
Tiền chất có chiều dài đầy đủ	MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGA GAGSLAGSCGCGTPQRPGAHGSSAAAHRYSSREANAPGPVPG ERQLAHSKMVPIAGVFTMGTDDEPQIKQDGEAPARRVTIDA FYMDAYEVSNTFEKFFVNSTGYLTEAEKFGDSFVFEGMLSE QVKTNIQQAVAAAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDH PVLHVSWNDAYCTWAGKRLPTEAEWEYSCRGGLHNRL FPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDA FPPNGYGLYNIVGNAWEWTSDDWWTVHHSVEETLNPKGPPS GKDRVKKGGSYMCHRSYCYRYRCAARSQNTFDSSASNLGF

Do đó, theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế là protein FGE thành thực của người (SEQ ID NO:5). Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein FGE thành thực của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein FGE thành thực của người có thể là protein FGE thành thực của người được cải biến chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin so với protein FGE thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:5), trong khi vẫn giữ được hoạt tính của protein FGE ở mức độ đáng kể. Do đó, theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với protein FGE thành thực của người (SEQ ID NO:5). Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:5. Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với protein FGE thành thực của người (SEQ ID NO:5). Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:5. Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế chứa một đoạn hoặc một phần của protein FGE thành thực của người.

Theo cách khác, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế là protein FGE có chiều dài đầy đủ. Theo một số phương án, enzym FGE có thể là chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein FGE có chiều dài đầy đủ của người. Ví dụ, chất đồng đẳng hoặc chất tương tự của protein FGE có chiều dài đầy đủ của người có thể là protein FGE có chiều dài đầy đủ của người được cải biến chứa một hoặc nhiều thay thế, xóa bỏ, và/hoặc cài xen axit amin so với protein FGE có chiều dài đầy đủ thông thường hoặc có trong tự nhiên (ví dụ, SEQ ID NO:6), trong khi vẫn giữ được hoạt tính của protein FGE ở mức độ đáng kể. Do đó, theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với protein FGE có chiều dài đầy đủ của người (SEQ ID NO:6). Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế hầu như tương đồng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một số phương án, enzym FGE thích hợp đối với sáng chế chứa một đoạn hoặc một phần của protein FGE có chiều dài đầy đủ của người. Như được dùng trong bản mô tả này, protein FGE có chiều dài đầy đủ thường chứa trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu.

Các trình tự axit nucleic làm ví dụ và các trình tự axit amin ghi mã các protein FGE làm ví dụ được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 20040229250, mà toàn bộ nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Tế bào cùng biểu hiện I2S và FGE

Các tác giả sáng chế đã nhận thấy nhu cầu về việc tạo ra I2S có hoạt tính sinh học với chất lượng cao, ở quy mô công nghiệp bằng cách sử dụng hệ nuôi cấy tế bào. Vì nhiều yếu tố sản xuất có thể có ảnh hưởng đến việc chọn lọc tế bào chủ đặc hiệu, các phân tử axit nucleic đã được bộc lộ trong sáng chế sẽ hướng vào nhiều loại tế bào không nhân và nhân chuẩn và/hoặc dòng tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dòng tế bào thu được từ chủng vi khuẩn, chủng nấm men, các tế bào côn trùng, tế bào động vật, tế bào của động vật có vú và tế bào của người. Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất cấu trúc biểu hiện và việc tạo ra dòng tế bào tái tổ hợp ổn định hữu dụng để biểu hiện các protein I2S và/hoặc FGE có trong tự nhiên, cũng như cải biến mà được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này. Ngoài ra, theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất dòng tế bào mà biểu hiện I2S và FGE bằng cách sử dụng các trình tự axit nucleic đã được bộc lộ trong sáng chế.

Axit nucleic ghi mã các protein I2S và/hoặc FGE

Theo một số phương án, các phân tử axit nucleic được đề xuất chứa các trình tự axit nucleic ghi mã gen tái tổ hợp đáng quan tâm (trong bản mô tả sáng chế này được gọi là gen chuyển) như protein I2S và/hoặc FGE đã được bộc lộ theo các phương án khác nhau nêu trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic ghi mã gen chuyển có thể được cải biến để làm tăng mức độ biểu hiện protein I2S và/hoặc FGE mã

hóa, mà còn được gọi là sự tối ưu hóa codon. Ví dụ, axit nucleic ghi mã gen chuyển có thể được cải biến bằng cách làm thay đổi khung đọc mở đối với trình tự ghi mã. Thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này, "khung đọc mở" đồng nghĩa với "ORF" và có nghĩa là trình tự nucleotit bất kỳ mà có khả năng mã hóa protein, hoặc một phần của protein. Khung đọc mở thường bắt đầu bằng codon khởi đầu (được biểu thị là, ví dụ AUG đối với phân tử ARN và ATG đối với phân tử ADN trong mã tiêu chuẩn) và được đọc theo codon-bộ ba đến khi khung đọc kết thúc bằng codon dừng (được biểu thị, ví dụ là UAA, UGA hoặc UAG đối với phân tử ARN và TAA, TGA hoặc TAG đối với phân tử ADN theo mã chuẩn). Thuật ngữ "codon" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là trình tự gồm ba nucleotit trong phân tử axit nucleic mà cụ thể hóa axit amin cụ thể trong quy trình tổng hợp protein; còn được gọi bộ ba hoặc codon-bộ ba. Ví dụ, trong 64 codon có thể có trong mã di truyền chuẩn, thì hai codon GAA và GAG mã hóa axit amin glutamin trong khi các codon AAA và AAG cụ thể hóa axit amin Lysin. Trong mã di truyền chuẩn, ba codon là codon dừng, mà không cụ thể hóa axit amin nào. Thuật ngữ "codon cùng nghĩa" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa codon bất kỳ và tất cả các codon mà mã hóa cùng một axit amin. Trừ methionin và tryptophan, các axit amin được mã hóa bởi hai đến sáu codon cùng nghĩa. Ví dụ, trong mã di truyền chuẩn, bốn codon cùng nghĩa mà mã hóa axit amin alanin là GCA, GCC, GCG và GCU, hai codon cùng nghĩa mà cụ thể hóa glutamin là GAA và GAG và hai codon cùng nghĩa mã hóa lysin là AAA và AAG.

Theo một số phương án, axit nucleic ghi mã khung đọc mở của protein I2S và/hoặc FGE có thể được cải biến bằng cách áp dụng các phương pháp tối ưu hóa codon chuẩn. Trên thị trường có nhiều thuật toán để tối ưu hóa codon và có thể được áp dụng để thực hiện sáng chế. Nói chung, việc tối ưu hóa codon không làm thay đổi trình tự axit amin được mã hóa. Theo một số phương án, việc tối ưu hóa codon có thể dẫn đến các sửa đổi axit amin như thay thế, xóa bỏ hoặc cài xen. Nói chung, các sửa đổi axit amin này hầu như không làm thay đổi hoạt tính của protein.

Các trình tự axit nucleic làm ví dụ lần lượt ghi mã các protein I2S và FGE, được thể hiện ở SEQ ID NO:7 và 8 dưới đây.

SEQ ID NO:7 Trình tự axit nucleic làm ví dụ ghi mã iduronat 2-sulfatase (I2S)

ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCTGAGCA
 GCGTGTGCGTGGCCCTGGGCAGCGAGACCCAGGCCAACAGCACCAACGACGCCCT
 GAACGTGCTGCTGATCATCGTGGACGACCTGCGCCCCAGCCTGGGCTGCTACGGC
 GACAAGCTGGTGCGCAGCCCCAACATCGACCAGCTGGCCAGCCACAGCCTGCTGT
 TCCAGAACGCCTTCGCCCAGCAGGCCGTGTGCGCCCCAGCCGCGTGAGCTTCCTG
 ACCGGCCGCCGCCCGACACCACCCGCCTGTACGACTTCAACAGCTACTGGCGCGT
 GCACGCCGGCAACTTCAGCACCATCCCCAGTACTTCAAGGAGAACGGCTACGTG
 ACCATGAGCGTGGGCAAGGTGTTCCACCCCGGCATCAGCAGCAACCACACCGACG
 ACAGCCCCTACAGCTGGAGCTTCCCCCCTACCACCCAGCAGCGAGAAGTACGA
 GAACACCAAGACCTGCCGCGGCCCGACGGCGAGCTGCACGCCAACCTGCTGTGC
 CCCGTGGACGTGCTGGACGTGCCCCGAGGGCACCCCTGCCCCACAAGCAGAGCACCG
 AGCAGGCCATCCAGCTGCTGGAGAAGATGAAGACCAGCGCCAGCCCCTTCTTCCT
 GGCCGTGGGCTACCACAAGCCCCACATCCCCTTCCGCTACCCCAAGGAGTTCCAGA
 AGCTGTACCCCCTGGAGAACATCACCTGGCCCCCGACCCCGAGGTGCCCGACGG
 CCTGCCCCCGGTGGCCTACAACCCCTGGATGGACATCCGCCAGCGCGAGGACGTG
 CAGGCCCTGAACATCAGCGTGCCCTACGGCCCCATCCCCGTGGACTTCCAGCGCAA
 GATCCGCCAGAGCTACTTCGCCAGCGTGAGCTACCTGGACACCCAGGTGGGCCGC
 CTGCTGAGCGCCCTGGACGACCTGCAGCTGGCCAACAGCACCATCATCGCCTTCAC
 CAGCGACCACGGCTGGGCCCTGGGCGAGCACGGCGAGTGGGCCAAGTACAGCAA
 CTTTCGACGTGGCCACCCACGTGCCCCTGATCTTCTACGTGCCCCGGCCGCACCGCCA
 GCCTGCCCCGAGGCCGGCGAGAAGCTGTTCCCCTACCTGGACCCCTTCGACAGCGCC
 AGCCAGCTGATGGAGCCCGGCCGCCAGAGCATGGACCTGGTGGAGCTGGTGAGCC
 TGTTCCCCACCCTGGCCGGCCTGGCCGGCCTGCAGGTGCCCCCCCCGCTGCCCCGTG
 CCCAGCTTCCACGTGGAGCTGTGCCGCGAGGGCAAGAACCTGCTGAAGCACTTCC
 GCTTCCGCGACCTGGAGGAGGACCCCTACCTGCCCCGGAACCCCCGCGAGCTGAT
 CGCCTACAGCCAGTACCCCCGCCCCAGCGACATCCCCCAGTGGAACAGCGACAAG
 CCCAGCCTGAAGGACATCAAGATCATGGGCTACAGCATCCGCACCATCGACTACC
 GCTACACCGTGTGGGTGGGCTTCAACCCCGACGAGTTCCTGGCCAACCTTCAGCGAC
 ATCCACGCCGGCGAGCTGTACTTCGTGGACAGCGACCCCTGCAGGACCACAACA
 TGTACAACGACAGCCAGGGCGGGCGACCTGTTCCAGCTGCTGATGCCCTAG

*SEQ ID NO:8 Trình tự axit nucleic làm ví dụ ghi mã tiền chất enzym sinh ra
 formylglyxin (FGE) có chiều dài đầy đủ*

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGT
 CCTCTTGCTGCTGCTGCTCTCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCG
 GGACCGGTGCGGGGCGCGGGGTCCCTTGCGGGTTCTTGCGGCTGCGGCACGCCCCA
 GCGGCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCT
 AACGCTCCGGGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCC
 CCATCCCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCACAGATGATCCTCAGATAAAGCAGGA
 TGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTACATGGATGCCTATG
 AAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAACTCAACTGGCTATTTGACAGAG
 GCTGAGAAGTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAA
 GACCAATATTCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCG
 CTAAGTGGAGACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCA
 TCCAGTTCTCCATGTGTCCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGA
 AGCGGCTGCCCACGGAAGCTGAGTGGGAATACAGCTGTGAGGAGGCCTGCATAA
 TAGACTTTTCCCCTGGGGCAACAACTGCAGCCCAAAGGCCAGCATTATGCCAAC
 ATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTCCAAGGAA
 CTGCGCCTGTTGATGCCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGG
 AACGCATGGGAATGGACTTCAGACTGGTGGACTGTTTCATCATTCTGTTGAAGAAAC
 GCTTAACCCAAAAGGTCCCCCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCC
 TACATGTGCCATAGGTCTTATTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAA
 CACACCTGATAGCTCTGCTTCGAATCTGGGATTCCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGC
 CCACCATGGACTGA

Theo một số phương án, sự thay đổi nucleotit có thể làm thay đổi codon cùng nghĩa bên trong khung đọc mở để phù hợp với việc sử dụng codon nội sinh tìm được ở tế bào dị tương đồng cụ thể đã được chọn để biểu hiện I2S và/hoặc FGE. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, sự thay đổi nucleotit có thể làm thay đổi lượng G+C bên trong khung đọc mở để cặp đôi tốt hơn với lượng G+C trung bình của khung đọc mở tìm được ở trình tự axit nucleic nội sinh có mặt trong tế bào chủ dị tương đồng. Sự thay đổi nucleotit còn có thể làm thay đổi vùng polymononucleotit hoặc vị trí điều biến bên trong hoặc vị trí cấu trúc tìm được bên trong trình tự I2S hoặc FGE. Do đó, nhiều loại trình tự nucleotit cải biến hoặc được tối ưu hóa được hình dung bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự axit nucleic làm tăng mức độ biểu hiện các protein I2S và/hoặc FGE trong tế bào không nhân; tế bào nấm men; tế bào côn trùng; và trong tế bào của động vật có vú.

Do đó, theo một số phương án, axit nucleic ghi mã protein I2S thích hợp đối với sáng chế có trình tự nucleotit tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:7. Theo một số phương án, axit nucleic ghi mã protein FGE thích hợp đối với sáng chế có trình tự nucleotit tương đồng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn với trình tự nêu trong SEQ ID NO:8. Nói chung, axit nucleic được cải biến ghi mã protein I2S và/hoặc FGE có kèm theo hoặc không kèm theo sự sửa đổi trình tự axit amin. Trong trường hợp có sự sửa đổi axit amin, các sửa đổi thường không hầu như làm thay đổi hoạt tính protein I2S hoặc FGE.

Vật truyền biểu hiện

Trình tự axit nucleic ghi mã protein I2S và/hoặc FGE, như đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này, có thể được tách dòng (được cài xen) ở mức độ phân tử vào vật truyền thích hợp để nhân giống hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Nhiều loại vật truyền biểu hiện có thể được dùng để thực hiện sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vật truyền biểu hiện của tế bào không nhân; vật truyền biểu hiện nấm men; vật truyền biểu hiện côn trùng và vật truyền biểu hiện động vật có vú. Các vật truyền thích hợp làm ví dụ đối với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vật truyền trên cơ sở virus (ví dụ, vật truyền trên cơ sở AAV, vật truyền trên cơ sở retrovirus, vật truyền trên cơ sở plasmid). Theo một số phương án, các trình tự axit nucleic lần lượt ghi mã các protein I2S và FGE có thể được cài xen vào vật truyền riêng biệt. Theo một số phương án, các trình tự axit nucleic ghi mã lần lượt các protein I2S và FGE có thể được cài xen trong cùng vật truyền. Nói chung, axit nucleic ghi mã protein I2S hoặc FGE được liên kết linh hoạt với nhiều trình tự hoặc yếu tố điều biến.

Trình tự hoặc yếu tố điều biến

Nhiều trình tự hoặc yếu tố điều biến có thể được kết hợp vào vật truyền biểu hiện thích hợp đối với sáng chế. Các trình tự hoặc yếu tố điều biến làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen khởi đầu, gen tăng cường, đoạn ức chế hoặc đoạn kìm hãm, trình tự không dịch mã (hoặc không mã hóa) đầu tận cùng 5', intron, trình tự không dịch mã (hoặc không mã hóa) đầu tận cùng 3'.

Như được dùng trong bản mô tả này, “gen khởi đầu” hoặc “trình tự khởi đầu” là vùng điều biến ADN có khả năng liên kết với ARN polymeraza trong tế bào (ví dụ, một

cách trực tiếp hoặc thông qua các protein hoặc các chất liên kết với gen khởi đầu khác) và khơi mào sự phiên mã trình tự ghi mã. Trình tự khởi đầu, nói chung, được liên kết ở đầu tận cùng 3' của nó bằng điểm khởi đầu phiên mã và kéo dài ngược hướng (đầu tận cùng 5') để bao gồm số lượng tối thiểu bazơ hoặc yếu tố cần thiết để khơi mào quá trình phiên mã ở mức độ bất kỳ. Gen khởi đầu này có thể được gắn kết linh hoạt hoặc được liên kết linh hoạt với trình tự kiểm soát sự biểu hiện, bao gồm các trình tự tăng cường và ức chế hoặc với axit nucleic sẽ được biểu hiện. Theo một số phương án, gen khởi đầu này có thể được tạo ra. Theo một số phương án, gen khởi đầu được tạo ra có thể là theo một hướng hoặc theo hai hướng. Theo một số phương án, gen khởi đầu này có thể là gen khởi đầu cơ định. Theo một số phương án, gen khởi đầu này có thể gen khởi đầu lai, trong đó trình tự này chứa vùng điều biến phiên mã thu được từ một nguồn và trình tự chứa vùng khởi đầu phiên mã thu được từ nguồn thứ hai. Hệ để liên kết yếu tố kiểm soát với trình tự ghi mã bên trong gen chuyển là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (các kỹ thuật sinh học phân tử chung và ADN tái tổ hợp được nêu trong tài liệu: Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các vật truyền ở quy mô công nghiệp thích hợp để cài xen vào gen chuyển để biểu hiện trong nhiều tế bào chủ trong nhiều loại điều kiện sinh trưởng và cảm ứng cũng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, gen khởi đầu đặc hiệu có thể được dùng để kiểm soát sự biểu hiện của gen chuyển trong tế bào chủ là động vật có vú như, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu SR α (Takebe *et al.*, *Molec. and Cell. Bio.* 8:466-472 (1988)), gen khởi đầu sớm tức thì CMV của người (Boshart *et al.*, *Cell* 41:521-530 (1985); Foecking *et al.*, *Gene* 45:101-105 (1986)), gen khởi đầu CMV của người, gen khởi đầu của người CMV5, gen khởi đầu sớm tức thì CMV của chuột đồng, gen khởi đầu EF1- α , gen khởi đầu CMV lai để biểu hiện đặc hiệu ở gan (ví dụ, được tạo ra bằng cách tiếp hợp gen khởi đầu sớm tức thì CMV với yếu tố khởi đầu phiên mã của α -1-antitrypsin (HAT) hoặc gen khởi đầu albumin (HAL) của người), hoặc các gen khởi đầu để biểu hiện đặc hiệu ung thư gan (ví dụ, trong đó yếu tố khởi đầu phiên mã của albumin của người (HAL; khoảng 1000bp) hoặc α -1-antitrypsin của người (HAT, khoảng 2000 bp) được kết hợp với yếu tố tăng cường độ dài 145 của tiền gen α -1-microglobulin và bikunin (AMBP) của người; HAL-AMBP và HAT-AMBP); vùng khởi đầu sớm SV40 (Benoist

at al., *Nature* 290:304-310 (1981)), gen khởi đầu sớm tức thì *Orgyia pseudotsugata*, gen khởi đầu herpes thymidin kinaza (Wagner at al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)); hoặc các trình tự điều biến của gen metalothionein (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982)). Theo một số phương án, gen khởi đầu của động vật có vú là gen khởi đầu cơ định như, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu hypoxanthin phosphoribosyl transferaza (HPTR), gen khởi đầu adenosin deaminaza, gen khởi đầu pyruvat kinaza, gen khởi đầu beta-actin cũng như các gen khởi đầu cơ định khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Theo một số phương án, gen khởi đầu đặc hiệu có thể được dùng để kiểm soát sự biểu hiện của gen chuyển trong tế bào chủ không nhân như, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu β -lactamaza (Villa-Komaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731 (1978)); gen khởi đầu tac (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983)); gen khởi đầu T7, gen khởi đầu T3, gen khởi đầu M13 hoặc gen khởi đầu M16; trong tế bào chủ nấm men như, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu GAL1, GAL4 hoặc GAL10, gen khởi đầu ADH (rượu-dehydrogenaza), gen khởi đầu PGK (phosphoglyxerol kinaza), gen khởi đầu kiềm phosphataza, gen khởi đầu glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza III (TDH3), gen khởi đầu glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza II (TDH2), gen khởi đầu glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza I (TDH1), pyruvat kinaza (PYK), enolaza (ENO), hoặc trioza phosphat isomeraza (TPI).

Theo một số phương án, gen khởi đầu này có thể là gen khởi đầu virus, nhiều gen khởi đầu trong số đó cũng có thể điều tiết sự biểu hiện của gen chuyển trong vài kiểu tế bào chủ, kể cả tế bào của động vật có vú. Các gen khởi đầu virus mà đã được thấy là điều khiển sự biểu hiện cơ định của các trình tự ghi mã trong tế bào nhân chuẩn bao gồm, ví dụ, các gen khởi đầu của virus khỉ, các gen khởi đầu của virus ecpet simplex, các gen khởi đầu virus u nhú, các gen khởi đầu adenovirus, các gen khởi đầu của virus gây suy giảm miễn dịch ở người (HIV), các gen khởi đầu virus sacom Rous, các gen khởi đầu của virus xytomegalo (CMV), đoạn lặp dài ở đầu tận cùng (LTR) của virus gây bệnh bạch cầu ở chuột Moloney và các retro virus khác, gen khởi đầu thymidin kinaza của virus ecpet simplex cũng như các gen khởi đầu virus khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Theo một số phương án, yếu tố kiểm soát di truyền của vật truyền biểu hiện có thể còn bao gồm trình tự không phiên mã đầu tận cùng 5' và trình tự không dịch mã đầu tận cùng 5' lần lượt liên quan đến sự khởi đầu phiên mã và dịch mã, như khung TATA, trình tự chặn, trình tự CAAT, trình tự Kozak và các trình tự tương tự. Các yếu tố tăng cường có thể tùy ý được dùng để tăng mức độ biểu hiện của polypeptit hoặc protein cần được biểu hiện. Các ví dụ về yếu tố tăng cường mà đã được thấy là có chức năng ở tế bào của động vật có vú bao gồm gen tăng cường gen sớm SV40, như đã được bộc lộ trong tài liệu: Dijkema *et al.*, *EMBO J.* (1985) 4: 761 và gen tăng cường/gen khởi đầu thu được từ đoạn lặp dài ở đầu tận cùng (LTR) của virus sởi Ros (RSV), như đã được bộc lộ trong tài liệu: Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982b) 79:6777 và của virus cytomegalo của người, như đã được bộc lộ trong tài liệu: Boshart *et al.*, *Cell* (1985) 41:521. Yếu tố kiểm soát di truyền của vật truyền biểu hiện còn bao gồm các trình tự không phiên mã đầu tận cùng 3' và không dịch mã đầu tận cùng 3' lần lượt liên quan đến sự kết thúc phiên mã và dịch mã, như trình tự dẫn truyền tín hiệu poly polyadenyl hóa (polyA) để làm ổn định và xử lý đầu tận cùng 3' của ARN thông tin đã được phiên mã từ gen khởi đầu. Trình tự tín hiệu poly A bao gồm, ví dụ, trình tự tín hiệu beta globin polyA của thỏ, trình tự tín hiệu hormon sinh trưởng polyA của bò, trình tự tín hiệu của gen kết thúc beta globin /polyA của gà, hoặc vùng muộn polyA SV40.

Dấu chuẩn chọn lọc

Tốt hơn, nếu các vật truyền biểu hiện sẽ tùy ý chứa ít nhất một dấu chuẩn có thể chọn lọc. Theo một số phương án, dấu chuẩn có thể chọn lọc là trình tự axit nucleic ghi mã gen kháng liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều yếu tố điều biến di truyền, để khiến cho tế bào chủ có khả năng duy trì sự sống khi được sinh trưởng với sự có mặt của hóa chất và/hoặc được chất gây độc tế bào. Theo một số phương án, tác nhân chọn lọc được có thể được sử dụng để duy trì sự lưu giữ vật truyền biểu hiện bên trong tế bào chủ. Theo một số phương án, tác nhân chọn lọc được có thể được dùng để ngăn ngừa sự cải biến (tức là metyl hóa) và/hoặc làm câm trình tự gen chuyển bên trong vật truyền biểu hiện. Theo một số phương án, tác nhân chọn lọc được được sử dụng để duy trì sự biểu hiện của vật truyền này ở episom bên trong tế bào chủ. Theo một số phương án, tác nhân chọn lọc được được dùng để thúc đẩy sự hợp nhất ổn định trình tự gen chuyển vào hệ gen của tế bào chủ. Theo một số phương án, tác nhân và/hoặc gen kháng có thể bao

gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, metotrexat (MTX), dihydrofolat reductaza (DHFR, các patent Mỹ số 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017, ampicilin, neomycin (G418), zeomycin, axit mycophenolic, hoặc glutamin synthetaza (GS, các patent Mỹ số 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) đối với tế bào chủ nhân chuẩn; tetracyclin, ampicilin, kanamycin hoặc chloramphenicol đối với tế bào chủ không nhân; và URA3, LEU2, HIS3, LYS2, HIS4, ADE8, CUP1 hoặc TRP1 đối với tế bào chủ nấm men.

Các vật truyền biểu hiện có thể được chuyển nhiễm, biến nạp hoặc tải nạp vào tế bào chủ. Các thuật ngữ “chuyển nhiễm”, “biến nạp” và “tải nạp” đều được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc đưa trình tự axit nucleic ngoại sinh vào tế bào chủ. Theo một số phương án, các vật truyền biểu hiện chứa các trình tự axit nucleic ghi mã đối với I2S và/hoặc FGE được chuyển nhiễm, biến nạp hoặc tải nạp vào tế bào chủ tại cùng một thời điểm. Theo một số phương án, các vật truyền biểu hiện chứa các trình tự axit nucleic ghi mã đối với I2S và/hoặc FGE lần lượt được chuyển nhiễm, biến nạp hoặc tải nạp vào tế bào chủ. Ví dụ, vật truyền ghi mã protein I2S có thể được chuyển nhiễm, biến nạp hoặc tải nạp vào tế bào chủ thứ nhất, tiếp theo là chuyển nhiễm, biến nạp hoặc tải nạp vật truyền ghi mã protein FGE, và ngược lại. Các ví dụ về phương pháp biến nạp, chuyển nhiễm và tải nạp, mà là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm phân phối liposom, tức là phương pháp lipofectamin™ (Gibco BRL) trong tài liệu: Hawley-Nelson, *Focus* 15:73 (1193), xung điện, phương pháp phân phối CaPO_4 nêu trong tài liệu: Graham and van der Erb, *Virology*, 52:456-457 (1978), phân phối thông qua DEAE-Dextran, tiêm vi lượng, phân phối hạt bằng cách bắn gen, phân phối thông qua polybren, phân phối lipid thông qua cation, tải nạp, và nhiễm virus, ví dụ, retrovirus, lentivirus, virus liên kết adenovirus và *Baculovirus* (tế bào côn trùng). Các khía cạnh chung về việc biến nạp vào tế bào của vật chủ đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như bởi Axel trong patent Mỹ số 4,399,216; tài liệu nêu trên của Sambrook, chương 1 đến 4 và 16 đến 18; tài liệu nêu trên của Ausubel, chương 1, 9, 13, 15, và 16. Đối với các kỹ thuật biến nạp tế bào của động vật có vú, xem tài liệu: Keown *et al.*, *Methods in Enzymology* (1989), Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), và Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Một khi được đưa vào trong tế bào, các vật truyền biểu hiện có thể được hợp nhất theo cách ổn định trong hệ gen hoặc tồn tại ở dạng cấu trúc ngoài nhiễm sắc thể. Các

vật truyền còn có thể được khuếch đại và nhiều bản sao có thể tồn tại hoặc được hợp nhất trong hệ gen. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 hoặc nhiều bản sao của các axit nucleic ghi mã protein I2S. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 hoặc nhiều bản sao của các axit nucleic ghi mã protein FGE. Theo một số phương án, các tế bào theo sáng chế có thể chứa nhiều bản sao (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 hoặc nhiều hơn) của axit nucleic ghi mã cả protein I2S và protein FGE.

Tế bào chủ

Thuật ngữ “tế bào chủ” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các tế bào mà có thể được dùng để tạo ra enzym I2S tái tổ hợp. Cụ thể, các tế bào chủ là thích hợp để tạo ra enzym I2S tái tổ hợp ở quy mô lớn. Tế bào chủ thích hợp có thể thu được từ nhiều loại sinh vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các động vật có vú, thực vật, động vật lông vũ (ví dụ, hệ chim), côn trùng, nấm men, và vi khuẩn. Theo một số phương án, các tế bào chủ là tế bào của động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào chủ thích hợp không phải là tế bào bị thiếu sự axit hóa trong nội thể.

Dòng tế bào của động vật có vú

Tế bào hoặc kiểu tế bào bất kỳ của động vật có vú có thể được nuôi cấy tế bào, và để biểu hiện các polypeptit, có thể là hữu dụng để làm tế bào chủ theo sáng chế. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về tế bào của động vật có vú mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các tế bào phôi thận của người 293 (HEK293), các tế bào HeLa; dòng tế bào u tủy của chuột nhắt BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); tế bào nguyên bào võng mạc của người (PER.C6 (CruCell, Leiden, Hà Lan)); dòng tế bào thận của khỉ CV1 đã được biến nạp bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng thận bào thai người (các tế bào 293 hoặc 293 đã được tách dòng phụ để sinh trưởng khi nuôi cấy trong huyền phù, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); các tế bào thận của chuột đồng sơ sinh (BHK, ATCC CCL 10); tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); nguyên bào sinh của chuột (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); tế bào thận của khỉ (CV1 ATCC CCL 70); tế bào thận của khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1 587); các tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HeLa, ATCC CCL 2); các tế bào thận của chó (MDCK, ATCC CCL 34); các tế bào gan của chuột trâu (BRL 3A, ATCC CRL 1442); các tế bào phổi của người (W138, ATCC CCL 75);

các tế bào gan của người (Hep G2, HB 8065); u tuyến vú của chuột (MMT 060562, ATCC CCL51); các tế bào TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); các tế bào MRC 5; các tế bào FS4; và dòng tế bào ung thư gan của người (Hep G2). Theo một số phương án, tế bào của động vật có vú thích hợp không phải là tế bào bị thiếu sự axit hóa trong nội thể.

Ngoài ra, số lượng bất kỳ của các dòng tế bào lai có bán trên thị trường và không có bán trên thị trường mà biểu hiện các polypeptit hoặc các protein có thể là hữu dụng theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng các dòng tế bào lai có thể cần có nhu cầu dinh dưỡng khác nhau và/hoặc có thể cần đến điều kiện nuôi cấy khác nhau đối với sự sinh trưởng tối ưu và biểu hiện polypeptit hoặc protein, và có thể điều chỉnh các điều kiện, nếu cần.

Dòng tế bào không phải của động vật có vú

Tế bào hoặc kiểu tế bào có nguồn gốc không phải động vật có vú bất kỳ có thể chịu được cấy tế bào, và sự biểu hiện các polypeptit, có thể được sử dụng làm tế bào chủ theo sáng chế. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các tế bào chủ và các dòng tế bào không phải của động vật có vú mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các tế bào và các dòng tế bào thu được từ *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, và *Yarrowia lipolytica* đối với nấm men; *Sodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster* và *Manduca sexta* đối với côn trùng; và *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridia perfringens*, *Clostridia difficile* đối với vi khuẩn; và *Xenopus Laevis* thu được từ động vật lưỡng cư.

Thích ứng với việc sinh trưởng bám dính hoặc trong huyền phù

Theo các phương án nhất định, tế bào chủ được chọn để tạo ra dòng tế bào trên cơ sở các tập tính có thể được ưu tiên nhất định hoặc sinh trưởng trong điều kiện cụ thể đã được chọn để nuôi cấy tế bào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng, các tập tính này có thể được xác định trên cơ sở các đặc tính và/hoặc các đặc điểm đã biết của dòng tế bào đã được thiết lập (tức là dòng tế bào đã được xác định tính chất có bán trên thị trường) hoặc bằng cách đánh giá theo kinh nghiệm. Theo một số phương án, dòng tế bào có thể được chọn theo khả năng của nó để sinh trưởng trên lớp tế bào tiếp liệu. Theo một số phương án, dòng tế bào có thể được chọn theo khả

năng của nó để sinh trưởng trong huyền phù. Theo một số phương án, dòng tế bào có thể được chọn theo khả năng của nó để sinh trưởng ở dạng một lớp tế bào bám. Theo một số phương án, các tế bào này có thể được dùng với thùng nuôi cấy mô bất kỳ hoặc bình bất kỳ được xử lý bằng chất bám thích hợp. Theo một số phương án, chất bám thích hợp được chọn từ nhóm bao gồm collagen (ví dụ, collagen I, II, II, hoặc IV), gelatin, fibronectin, laminin, vitronectin, fibrinogen, BD Matrigel™, chất nền màng đáy, dermatan sulfat proteoglycan, Poly-D-Lysin và/hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, tế bào chủ bám có thể được chọn và cải biến trong điều kiện sinh trưởng đặc hiệu để sinh trưởng trong huyền phù. Các phương pháp cải biến tế bào bám để sinh trưởng trong huyền phù là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, tế bào có thể được cải biến để sinh trưởng khi nuôi cấy trong huyền phù, bằng cách loại bỏ từ từ huyết thanh động vật ra khỏi môi trường sinh trưởng này sau một khoảng thời gian.

Chọn lọc và đánh giá dòng tế bào

Theo sáng chế, các tế bào được xử lý để biểu hiện protein I2S tái tổ hợp được chọn theo khả năng của nó trong việc tạo ra protein I2S tái tổ hợp ở quy mô công nghiệp. Cụ thể, các tế bào được xử lý theo sáng chế có thể để tạo ra I2S tái tổ hợp ở mức độ cao và/hoặc có hoạt tính enzym cao. Theo một số phương án, tế bào mong muốn, khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào (ví dụ, điều kiện huyền phù hoặc môi trường bám tiêu chuẩn ở quy mô lớn), có thể tạo ra enzym I2S với lượng khoảng 5 picogram/tế bào/ngày hoặc nhiều hơn (ví dụ, nhiều hơn khoảng 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 picogram/tế bào/ngày). Theo một số phương án, tế bào mong muốn, khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào (ví dụ, điều kiện huyền phù hoặc môi trường bám tiêu chuẩn ở quy mô lớn), có thể tạo ra enzym I2S với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100 picogram/tế bào/ngày (ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 90 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 5 đến 80 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 5 đến 70 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 5 đến 60 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 5 đến 50 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 5 đến 40 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 5 đến 30 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 90 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 80 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 70 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 60 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 50 picogram/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 40 picogram/tế bào/ngày).

bào/ngày, nằm trong khoảng từ 10 đến 30 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 90 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 80 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 70 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 60 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 50 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 40 picogam/tế bào/ngày, nằm trong khoảng từ 20 đến 30 picogam/tế bào/ngày).

Như đã nêu trên đây, nói chung hoạt tính enzym của I2S bị ảnh hưởng bởi sự cải biến sau dịch mã của xystein bảo toàn (ví dụ, tại axit amin 59) thành formylglyxin. Cải biến sau dịch mã này thường xảy ra trong lưới nội chất trong quy trình tổng hợp protein và được xúc tác bởi FGE. Hoạt tính enzym của I2S thường tương quan thuận với mức độ cải biến formylglyxin của I2S. Ví dụ, chế phẩm chứa I2S mà có lượng cải biến formylglyxin tương đối cao thường có hoạt tính enzym đặc hiệu tương đối cao; trong đó chế phẩm chứa I2S có mức cải biến formylglyxin tương đối thấp thường có hoạt tính enzym đặc hiệu tương đối thấp.

Còn dự tính rằng tỷ lệ giữa I2S và protein FGE hoặc ARN thông tin còn có thể ảnh hưởng đến sự cải biến formylglyxin trên protein I2S tái tổ hợp đã được tạo ra. Theo một số phương án, I2S và FGE được biểu thị theo tế bào mong muốn có mức độ biểu hiện protein và/hoặc ARN thông tin khác nhau. Theo một số phương án, mức độ biểu hiện protein I2S hoặc ARN thông tin cao hơn ít nhất 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8, 9, hoặc 10 lần so với protein hoặc nồng độ của ARN thông tin của FGE. Theo một số phương án, mức độ biểu hiện protein FGE tái tổ hợp hoặc ARN thông tin cao hơn ít nhất 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8, 9, hoặc 10 lần so với nồng độ của protein hoặc ARN thông tin của I2S.

Theo một số phương án, tế bào mong muốn, một khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào (ví dụ, điều kiện huyền phù hoặc môi trường bám tiêu chuẩn ở quy mô lớn), có thể tạo ra protein I2S chứa gốc xystein tương ứng với Cys59 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly) ở mức độ ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%). Theo một số phương án, tế bào mong muốn, một khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào (ví dụ, điều kiện huyền phù hoặc môi trường bám tiêu chuẩn ở quy mô lớn), có thể tạo ra enzym I2S chứa gốc xystein tương

ứng với Cys59 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly) ở mức độ ít nhất khoảng 50% (ví dụ, ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%) và với lượng khoảng 5 picogram/tế bào/ngày hoặc nhiều hơn (ví dụ, nhiều hơn khoảng 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, hoặc 100 picogram/tế bào/ngày).

Mức độ chuyển hóa FGly theo phần trăm

Đã biết các phương pháp khác nhau và chúng có thể được áp dụng để xác định mức độ chuyển hóa FGly theo phần trăm. Nói chung, mức độ chuyển hóa formylglyxin theo phần trăm (%FG) có thể tính bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\%FG \text{ (của DS)} = \frac{\text{số phân tử I2S hoạt tính}}{\text{số phân tử I2S toàn phần (hoạt tính + không hoạt tính)}} \times 100$$

Ví dụ, 50% FG có nghĩa là một nửa I2S tái tổ hợp đã được tinh chế không có hoạt tính enzym và không có bất kỳ hiệu quả điều trị bệnh nào. Các phương pháp khác nhau có thể được áp dụng để tính %FG. Ví dụ, cách lập bản đồ peptit có thể được áp dụng. Một cách vắn tắt, protein I2S có thể được phân cắt thành các peptit ngắn bằng cách sử dụng proteaza (ví dụ, trypsin hoặc chymotrypsin). Các peptit ngắn có thể được tách và được xác định tính chất bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký (ví dụ, sắc ký lỏng cao áp) sao cho bản chất và trọng lượng mỗi peptit (cụ thể là peptit chứa vị trí tương ứng với vị trí 59 của I2S thành thực của người) có thể được xác định, so với đối chứng (ví dụ, protein I2S không có sự chuyển hóa FGly hoặc protein I2S có sự chuyển hóa FGly ở mức 100%). Lượng peptit chứa FGly (tương ứng với số phân tử I2S hoạt tính) và tổng lượng peptit chứa cả FGly và Cys (tương ứng với tổng số phân tử I2S) có thể được xác định và tỷ lệ này phản ánh % FG tính được.

Hoạt tính đặc hiệu

Như được bàn luận ở trên đây, nói chung hoạt tính enzym của I2S bị ảnh hưởng bởi sự cải biến sau dịch mã của xystein bảo toàn (ví dụ, ở axit amin 59) thành formylglyxin. Do đó, hoạt tính enzym của I2S thường tương quan thuận với mức độ cải biến formylglyxin mà I2S có. Ví dụ, chế phẩm chứa I2S có lượng cải biến formylglyxin tương đối cao thường có hoạt tính enzym đặc hiệu tương đối cao; trong đó chế phẩm chứa I2S có mức độ cải biến formylglyxin tương đối thấp thường có hoạt tính enzym đặc hiệu tương đối thấp.

Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể biết, hoạt tính enzym của protein I2S tái tổ hợp tạo ra bởi các tế bào theo sáng chế có thể đo được bằng nhiều thử nghiệm *in vitro* và *in vivo*. Theo một số phương án, hoạt tính enzym mong muốn, như đo được theo thử nghiệm về hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất, của protein I2S tái tổ hợp đã được tạo ra ít nhất khoảng 20U/mg, 30U/mg, 40U/mg, 50U/mg, 60U/mg, 70U/mg, 80U/mg, 90U/mg, hoặc 100U/mg. Theo một số phương án, hoạt tính enzym mong muốn, như đo được theo thử nghiệm về hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất, của protein I2S tái tổ hợp được tạo ra nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 100U/mg (ví dụ, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 90U/mg, khoảng 20U/mg đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 70U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 60U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 20U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 100U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 90U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 70U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 60U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 30U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 100U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 90U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 80U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 70U/mg, khoảng 40U/mg đến 60U/mg, nằm trong khoảng từ 40U/mg đến 50U/mg). Điều kiện làm ví dụ để thực hiện thử nghiệm về hoạt tính giải phóng sulfat *in vitro* bằng cách sử dụng heparin disacarit làm cơ chất nêu dưới đây. Nói chung, thử nghiệm này đo khả năng của I2S khi giải phóng các ion sulfat ra khỏi cơ chất có nguồn gốc tự nhiên, heparin diasacarit. Sulfat giải phóng có thể được định lượng bằng sắc ký ion. Trong một số trường hợp, sắc ký ion có lắp bộ đo độ dẫn điện. Để làm ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế, đầu tiên các mẫu được trao đổi dung dịch đệm đến Na axetat 10mM, độ pH = 6 để loại bỏ sự ức chế do các ion phosphat trong dung dịch đệm. Sau đó, các mẫu này được pha loãng đến nồng độ 0,075mg/ml bằng dung dịch đệm phản ứng (Na axetat 10mM, độ pH=4,4) và ủ trong thời gian 2 giờ ở 37°C với heparin disacarit theo tỷ lệ giữa enzym và cơ chất là 0,3µg I2S/100µg cơ chất trong 30µl thể tích phản ứng. Sau đó, phản ứng này được ngừng bằng cách làm nóng các mẫu ở 100°C trong 3 phút. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng cột phân tích Dionex IonPac AS18 với cột bảo vệ IonPac AG18. Phương

pháp đẳng dung môi được áp dụng với 30mM kali hydroxit với tốc độ 1,0ml/phút trong thời gian 15 phút. Lượng sulfat giải phóng ra khỏi mẫu I2S được tính từ phân tích hồi quy tuyến tính của chất chuẩn sulfat trong khoảng từ 1,7nmol đến 16,0nmol. Trị số thông báo được biểu thị theo đơn vị trên mg protein, trong đó 1 đơn vị được xác định là 1 μ mol sulfat giải phóng trong mỗi giờ và nồng độ protein được xác định theo phép đo A280.

Theo một số phương án, hoạt tính enzym của protein I2S tái tổ hợp tạo ra bởi các tế bào theo sáng chế còn có thể được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, thử nghiệm 4-MUF để đo mức độ thủy phân 4-metylbeliferyl-sulfat thành sulfat và 4-metylbeliferon huỳnh quang tự nhiên (4-MUF). Theo một số phương án, hoạt tính enzym mong muốn, như đo được theo thử nghiệm 4-MUF *in vitro*, của protein I2S tái tổ hợp đã được tạo ra ít nhất là khoảng 2U/mg, 4U/mg, 6U/mg, 8U/mg, 10U/mg, 12U/mg, 14U/mg, 16U/mg, 18U/mg, hoặc 20U/mg. Theo một số phương án, hoạt tính enzym mong muốn, như đo được theo thử nghiệm 4-MUF *in vitro*, của protein I2S tái tổ hợp đã được tạo ra nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 50U/mg (ví dụ, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 0U/mg đến 10U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 2U/mg đến 10U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 4U/mg đến 10U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 50U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 40U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 30U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 20U/mg, nằm trong khoảng từ 6U/mg đến 10U/mg). Điều kiện làm ví dụ để thực hiện thử nghiệm 4-MUF *in vitro* được nêu dưới đây. Nói chung, thử nghiệm 4-MUF đo khả năng của protein I2S trong việc thủy phân 4-metylbeliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄) thành sulfat và 4-metylbeliferon (4-MUF) huỳnh quang tự nhiên. Một phần nghìn đơn vị hoạt tính được xác định là lượng enzym cần thiết để chuyển hóa một nanomol 4-MUF-SO₄ thành 4-MUF trong thời gian một phút ở 37°C. Nói chung, đơn vị huỳnh quang trung bình (MFU) đã được tạo ra bởi các mẫu thử

nghiệm I2S với hoạt tính đã biết có thể được dùng để tạo ra đường cong chuẩn, mà có thể được dùng để tính hoạt tính enzym của mẫu đáng quan tâm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy tế bào

Các môi trường và điều kiện nuôi cấy tế bào khác nhau có thể được dùng để tạo ra protein I2S tái tổ hợp bằng cách sử dụng các tế bào khác nhau được xử lý theo sáng chế. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp có thể được tạo ra trong môi trường chứa huyết thanh hoặc môi trường không chứa huyết thanh. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường không chứa huyết thanh. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra ở môi trường không có nguồn gốc động vật, tức là môi trường không có thành phần có nguồn gốc động vật. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra trong môi trường hóa học xác định. Thuật ngữ “môi trường dinh dưỡng hóa học xác định” được dùng trong bản mô tả này để chỉ môi trường mà hầu như toàn bộ các thành phần hóa học là đã biết. Theo một số phương án, môi trường dinh dưỡng hóa học xác định không chứa các thành phần có nguồn gốc động vật như huyết thanh, các protein có nguồn gốc từ huyết thanh (ví dụ, albumin hoặc fetuin), và các thành phần khác. Trong một số trường hợp, môi trường hóa học xác định chứa một hoặc nhiều protein (ví dụ, các yếu tố sinh trưởng protein hoặc các xytokin.) Trong một số trường hợp, môi trường dinh dưỡng hóa học xác định chứa một hoặc nhiều sản phẩm thủy phân protein. Trong trường hợp khác, môi trường dinh dưỡng hóa học xác định là môi trường không chứa protein, tức là môi trường không chứa huyết thanh mà không chứa các protein, sản phẩm thủy phân hoặc các thành phần có thành phần chưa biết.

Theo một số phương án, môi trường hóa học xác định có thể được bổ sung một hoặc nhiều thành phần có nguồn gốc động vật. Các thành phần có nguồn gốc động vật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, huyết thanh bào thai bê, huyết thanh ngựa, huyết thanh dê, huyết thanh lừa, huyết thanh người, và các protein có nguồn gốc từ huyết thanh như albumin (ví dụ, albumin huyết thanh bò hoặc albumin huyết thanh người).

Các điều kiện môi trường nuôi cấy tế bào khác nhau có thể được dùng để tạo ra các protein I2S tái tổ hợp ở quy mô lớn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc nuôi cấy trong chai quay, nuôi cấy mẻ trong thùng phản ứng sinh học và nuôi cấy mẻ có cho ăn trong thùng phản ứng sinh học. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được

tạo ra bằng các tế bào được nuôi cấy trong huyền phù. Theo một số phương án, protein I2S tái tổ hợp được tạo ra bởi các tế bào bám.

Môi trường tế bào và điều kiện nuôi cấy làm ví dụ được bộc lộ trong phần ví dụ. Các phương pháp và các thành phần làm ví dụ bổ sung để tạo ra protein I2S tái tổ hợp được bộc lộ trong đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ có tên “*Phương pháp và chế phẩm tạo ra Iduronat-2-sulfataza tái tổ hợp*” được nộp cùng ngày với đơn này, mà toàn bộ nội dung của đơn đó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Tinh chế protein I2S đã được biểu hiện

Các phương pháp khác nhau có thể được dùng để tinh chế hoặc phân lập protein I2S đã được tạo ra theo các phương pháp khác nhau được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, protein I2S đã được biểu hiện được tiết vào môi trường và do đó các tế bào và chất rắn khác có thể được tách loại, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc lọc, ở bước thứ nhất trong quy trình tinh chế. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, protein I2S biểu hiện được liên kết với bề mặt của tế bào chủ. Theo phương án này, các tế bào chủ biểu hiện polypeptit hoặc protein được phân giải để tinh chế. Việc phân giải tế bào chủ của động vật có vú có thể được thực hiện bằng cách bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, bao gồm việc phá vỡ theo cách thức vật lý bằng hạt thủy tinh và tiếp xúc với điều kiện độ pH cao.

Protein I2S có thể được phân lập và tinh chế bằng các phương pháp chuẩn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, loại trừ theo kích thước, và sắc ký dùng hydroxyapatit), lọc gel, ly tâm, hoặc độ hòa tan phân hóa, làm kết tủa bằng etanol hoặc bằng kỹ thuật bất kỳ sẵn có để tinh chế các protein (ví dụ, xem tài liệu: Scopes, *Protein Purification Principles and Practice* 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S. J. and Hames, B. D. (eds.), *Protein Expression: A Practical Approach*, Oxford Univ Press, 1999; và Deutscher, M. P., Simon, M. I., Abelson, J. N. (eds.), *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182)*, Academic Press, 1997, tất cả các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Cụ thể là, đối với sắc ký ái lực miễn dịch, protein có thể được phân lập bằng cách liên kết với cột ái lực chứa các kháng thể chống lại protein này và được cố định vào một giá đỡ tĩnh. Theo cách khác, các đồng vị đánh dấu ái lực như trình tự vỏ của virus cúm, poly-histidin, hoặc glutathion-S-transferaza có thể được gắn vào protein bằng các kỹ thuật tái tổ hợp tiêu chuẩn để cho phép dễ tinh chế bằng

cách chuyển qua cột ái lực thích hợp. Các chất ức chế proteaza như phenyl metyl sulfonyl florua (PMSF), leupeptin, pepstatin hoặc aprotinin có thể được bổ sung vào tại giai đoạn bất kỳ hoặc tất cả các giai đoạn để làm giảm hoặc loại trừ sự thoái biến polypeptit hoặc protein trong quy trình tinh chế. Các chất ức chế proteaza là đặc biệt cần thiết khi các tế bào phải được phân giải để phân lập và tinh chế polypeptit hoặc protein biểu hiện.

Các phương pháp tinh chế làm ví dụ được bộc lộ trong phần ví dụ thực hiện dưới đây. Các phương pháp tinh chế khác được bộc lộ trong đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ có tên “*Tinh chế protein I2S tái tổ hợp*” được nộp cùng ngày với đơn sáng chế này, mà toàn bộ nội dung của đơn đó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Dược phẩm và sử dụng

Protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được cho bệnh nhân mắc hội chứng Hunter dùng theo các phương pháp đã biết. Ví dụ, protein I2S tái tổ hợp đã được tinh chế có thể được phân phối qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong bắp, ngoài đường tiêu hóa, qua da, hoặc qua niêm mạc (ví dụ, qua đường miệng hoặc qua đường mũi).

Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó được cho đối tượng dùng qua đường tĩnh mạch.

Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó được cho đối tượng dùng qua đường nội tủy mạc. Các thuật ngữ “dùng qua đường nội tủy mạc” hoặc “tiêm vào nội tủy mạc” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc tiêm vào ống tủy sống (khoảng nội tủy mạc xung quanh tủy sống). Các kỹ thuật khác nhau có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tiêm vào não thất bên thông qua việc khoan lỗ hoặc chọc bể não hoặc thắt lưng hoặc vị trí tương tự. Theo một số phương án, các thuật ngữ “dùng qua đường nội tủy mạc” hoặc “phân phối nội tủy mạc” theo sáng chế được dùng để chỉ việc sử dụng hoặc phân phối IT qua khu vực hoặc vùng thắt lưng, tức là việc sử dụng hoặc phân phối IT vào vùng thắt lưng. Các thuật ngữ “vùng thắt lưng” hoặc “khu vực thắt lưng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ vùng giữa đốt sống thắt lưng (lưng dưới) thứ ba và thứ tư và, rộng hơn là, vùng L2-S1 của cột sống.

Theo một số phương án, I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó được cho đối tượng dùng dưới da (tức là bên dưới da). Nhằm mục đích đó, dược phẩm này có thể được tiêm bằng cách sử dụng bơm tiêm. Tuy nhiên, có sẵn các dụng cụ khác để sử dụng

chế phẩm như dụng cụ dùng để tiêm (ví dụ, dụng cụ Inject-easeTM và GenjectTM); bút tiêm (như GenPenTM); dụng cụ không dùng kim (ví dụ, MediJectorTM và BioJectorTM); và hệ phân phối qua da dạng miếng dán.

Theo một số phương án, cách dùng qua đường nội tủy mạc có thể được áp dụng cùng với các đường dùng khác (ví dụ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong bắp, ngoài đường tiêu hóa, qua da, hoặc qua niêm mạc (ví dụ, qua đường miệng hoặc qua đường mũi)).

Sáng chế bao gồm việc sử dụng đơn lẻ cũng như việc sử dụng nhiều lần I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó với lượng hữu hiệu để điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này. I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó có thể được dùng với thời gian ngắt quãng thông thường, tùy theo bản chất, mức độ nghiêm trọng và mức độ của tình trạng bệnh của đối tượng (ví dụ, bệnh tích lũy ở thể tiêu bào). Theo một số phương án, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó có thể được dùng một cách định kỳ với thời gian ngắt quãng thông thường (ví dụ, mỗi năm một lần, sáu tháng một lần, năm tháng một lần, ba tháng một lần, đôi tháng một lần (hai tháng một lần), hằng tháng (mỗi tháng một lần), đôi tuần một lần (hai tuần một lần), hằng tuần, hằng ngày hoặc liên tục).

I2S tái tổ hợp hoặc dược phẩm chứa nó có thể được bào chế với chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý hoặc tá dược để bào chế dược phẩm. Chất mang và tác nhân điều trị bệnh có thể là vô trùng. Dược phẩm này cần phù hợp với đường dùng.

Các chất mang được dùng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, dung dịch muối (ví dụ, NaCl), nước muối, nước muối được đậm, rượu, glyxerol, etanol, gôm arabic, dầu thực vật, rượu benzylic, các polyetylen glycol, gelatin, hydrat cacbon như lactoza, amyloza hoặc tinh bột, đường như manitol, sucroza, hoặc các chất khác, dextroza, magie stearat, bột talc, axit silixic, parafin nhớt, dầu thơm, este của axit béo, hydroxymetylxenluloza, polyvinyl pyrrolidon, v.v., cũng như hỗn hợp của chúng. Dược phẩm, nếu muốn, có thể được trộn với các tác nhân phụ trợ (ví dụ, chất làm trơn, chất bảo quản, chất làm ổn định, tác nhân thẩm ướt, chất nhũ hóa, muối để ảnh hưởng đến áp suất thẩm thấu, dung dịch đậm, chất tạo màu, điều vị và/hoặc hương liệu và các chất tương tự) mà không phản ứng có hại với các hoạt chất hoặc can thiệp vào hoạt tính của chúng. Theo một số phương án, chất mang hòa tan trong nước thích hợp đối với việc sử dụng qua đường tĩnh mạch được sử dụng.

Dược phẩm hoặc thuốc, nếu muốn, còn có thể chứa lượng không đáng kể tác nhân thẩm ướt hoặc tác nhân nhũ hóa, hoặc các chất đệm độ pH. Dược phẩm này có thể là dung dịch lỏng, hỗn dịch, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, dược phẩm giải phóng kéo dài, hoặc bột. Dược phẩm này cũng có thể được bào chế ở dạng thuốc đặt hậu môn, cùng với các chất kết dính và các chất mang thông thường như triglyxerit. Dược phẩm dùng qua đường miệng có thể chứa các chất mang chuẩn như manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, polyvinyl pyrrolidon, natri sacarin, xenluloza, magie cacbonat loại dùng cho dược phẩm, v.v.

Dược phẩm hoặc thuốc có thể được bào chế theo các quy trình thông thường thành dược phẩm được làm thích ứng để sử dụng cho người. Ví dụ, theo một số phương án, dược phẩm để dùng qua đường tĩnh mạch thường là dung dịch trong nước đệm đẳng trương vô khuẩn. Nếu cần, dược phẩm này có thể còn chứa tác nhân hòa tan và chất gây tê tại chỗ để giảm đau ở vị trí tiêm. Nói chung, các thành phần được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn cùng nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ, ở dạng bột đông khô hoặc thể đặc không chứa nước trong vật chứa bịt kín như ống hoặc gói nhỏ có chỉ rõ lượng hoạt chất. Nếu dược phẩm này cần được dùng bằng cách truyền, nó có thể được phân phối bằng chai truyền chứa nước, nước muối hoặc dextroza/nước loại dùng cho dược phẩm vô khuẩn. Nếu dược phẩm này được dùng bằng cách tiêm, ống nước vô khuẩn dùng để tiêm hoặc nước muối có thể được bổ sung sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi dùng.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị bệnh” được dùng trong bản mô tả này được xác định rộng rãi trên cơ sở tổng lượng các tác nhân điều trị bệnh chứa trong các dược phẩm theo sáng chế. Nói chung, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh là đủ để đạt được lợi ích có ý nghĩa đối với đối tượng (ví dụ, điều trị bệnh, điều biến, chữa trị, phòng bệnh và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc tình trạng bệnh lý tiềm ẩn). Ví dụ, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh có thể là lượng đủ để đạt được tác dụng điều trị và/hoặc phòng bệnh mong muốn, như lượng đủ để điều biến các thụ thể enzym thể tiêu bào hoặc hoạt tính của chúng để qua đó, điều trị bệnh tích lũy ở thể tiêu bào hoặc các triệu chứng của chúng (ví dụ, giảm hoặc loại bỏ sự có mặt hoặc tỷ lệ mắc “thể vằn” hoặc tạo không bào tế bào sau khi cho đối tượng dùng dược phẩm theo sáng chế). Nói chung, lượng tác nhân điều trị bệnh (ví dụ, enzym tái tổ hợp trong thể tiêu bào) được cho đối tượng có nhu cầu điều trị dùng sẽ phụ thuộc vào các đặc tính của đối tượng này. Các đặc tính đó

bao gồm tình trạng bệnh, mức độ nặng của bệnh, tình trạng sức khỏe chung, lứa tuổi, giới tính và thể trọng của đối tượng này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định các liều lượng thích hợp tùy theo các yếu tố này và các yếu tố liên quan khác. Ngoài ra, cả hai thử nghiệm khách quan và chủ quan có thể tùy ý được dùng để xác định khoảng liều lượng tối ưu.

Lượng hữu hiệu để điều trị bệnh thường được dùng trong phác đồ liều có thể bao gồm nhiều liều đơn vị. Đối với protein điều trị bệnh cụ thể bất kỳ, lượng hữu hiệu để điều trị bệnh (và/hoặc liều đơn vị thích hợp trong phác đồ liều hữu hiệu) có thể thay đổi, ví dụ, tùy theo đường dùng, theo sự kết hợp với các dược phẩm khác. Ngoài ra, lượng hữu hiệu đặc hiệu để điều trị bệnh (và/hoặc liều đơn vị) đối với mỗi bệnh nhân cụ thể có thể phụ thuộc vào nhiều loại yếu tố bao gồm rối loạn cần được điều trị và mức độ nặng của rối loạn; hoạt tính của dược chất đặc hiệu được sử dụng; dược phẩm cụ thể được sử dụng; lứa tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính và chế độ dinh dưỡng của bệnh nhân; thời gian dùng, đường dùng, và/hoặc tốc độ bài tiết hoặc chuyển hóa của protein dung hợp đặc hiệu được sử dụng; khoảng thời gian kéo dài điều trị; và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y tế.

Các dược phẩm và các phương pháp sử dụng làm ví dụ khác được bộc lộ trong công bố đơn PCT số WO2011/163649 có tên “*Phương pháp và dược phẩm để phân phối Iduronat-2-sulfataza vào hệ thần kinh trung ương (CNS)*”; và đơn tạm thời yêu cầu cấp patent Mỹ số 61/618,638 có tên “*Sử dụng iduronat 2 sulfataza dưới da*” nộp ngày 30 tháng 3 năm 2012, mà toàn bộ nội dung của cả hai đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Cần phải hiểu thêm nữa rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, các chế độ liều lượng cụ thể cần được điều chỉnh sau một khoảng thời gian theo nhu cầu của cá thể đó và đánh giá chuyên môn của người dùng hoặc giám sát việc dùng liệu pháp điều trị bệnh bằng enzym thay thế và khoảng liều lượng nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và không nhằm để giới hạn phạm vi hoặc thực tiễn của sáng chế được yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tạo ra dòng tế bào được tối ưu hóa cùng biểu hiện I2S và FGE tái tổ hợp

Ví dụ này minh họa dòng tế bào được tối ưu hóa cùng biểu hiện I2S và FGE tái tổ hợp làm ví dụ mà có thể được dùng để tạo ra protein I2S tái tổ hợp. Người có hiểu biết

trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ rằng có sẵn nhiều phương pháp, vật truyền biểu hiện và kỹ thuật tách dòng khác.

Dạng thành thực tiêu biểu của iduronat-2-sulfataza enzym (I2S) của người là glycoprotein có 525 axit amin đã được xử lý chuyên biệt và cải biến sau dịch mã để hoạt hóa enzym, như glycosyl hóa và chuyển hóa xystein thành formylglyxin (Hình 1). Ở tế bào của động vật có vú, gốc xystein bảo toàn bên trong enzym I2S (tức là ở axit amin 59) được chuyển hóa thành formylglyxin bằng enzym sinh ra formylglyxin (FGE). Bước chuyển hóa xystein thành formylglyxin ở vị trí hoạt tính của enzym I2S là bước quan trọng để tạo ra enzym sulfataza ở dạng hoạt tính của người. Mục đích của thử nghiệm này là xử lý dòng tế bào được tối ưu hóa cùng biểu hiện I2S và FGE của người để tạo ra I2S tái tổ hợp hoạt tính.

Hình 2 minh họa nhiều thiết kế cấu trúc làm ví dụ để đồng biểu hiện I2S và FGE. Ví dụ, đơn vị biểu hiện của I2S và FGE có thể nằm trên các vật truyền riêng biệt và các vật truyền riêng biệt này có thể được đồng chuyển nhiễm hoặc được chuyển nhiễm riêng rẽ (Hình 2A). Theo cách khác, đơn vị biểu hiện của I2S và FGE có thể nằm trên cùng vật truyền (Hình 2B). Trong một cấu trúc, I2S và FGE có thể nằm trên cùng vật truyền nhưng dưới sự kiểm soát của các gen khởi đầu riêng biệt, còn được gọi là xistron riêng biệt (Hình 2B(1)). Theo cách khác, I2S và FGE có thể được thiết kế ở dạng xistron liên kết phiên mã, tức là I2S và FGE được thiết kế ở dạng một khung đọc mở dưới sự kiểm soát của cùng gen khởi đầu (Hình 2B(2)). Nói chung, vị trí đi vào bên trong ribosom (IRES) được thiết kế để cho phép khởi đầu dịch mã độc lập với đoạn chặn của ARN thông tin (Hình 2B(2)).

Dòng tế bào của người được xử lý để cùng biểu hiện protein I2S của người với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và enzym sinh ra formylglyxin (FGE) của người với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6.

SEQ ID NO: 2

> Tiền chất iduronat 2-sulfataza có chiều dài đầy đủ

MPPPRRTGRGLLWLGLVLSSVCVALGSETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCYGDKL
VRSPNIDQLASHSLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRLYDFNSYWRVHAGNF
STIPQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKYENTKTCRGPD
GELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEKMKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRY
PKEFQKLYPLENITLAPDPEVPDGLPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQ

RKIRQSYFASVSYLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNF
DVATHVPLIFYVPGRITASLPEAGEKLFYLPDPSASQLMEPGRQSMDELVELVSLFPTL
AGLAGLQVPPRCVPSPFHVELCREGKNLLKHFRFRDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRP
SDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSIRTIDYRYTVWVGFPDEFNLANFSDIHAGELYFVDS
PLQDHNMYNDSQGGDLFQLLMP

SEQ ID NO:6

Tiền chất FGE có chiều dài đầy đủ của người:

MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLSLLCGAAGSQEAGTGAGAGSLAGSCGCGTPQR
PGAHGSSAAAHRYSTREANAPGPVGERQLAHSKMVPIAGVFTMGTDTPQIKQDGEA
PARRVTIDAFYMDAYEVSNTFEKFFVNSTGYLTAEKFGDSFVFEGMLSEQVKTNIQQ
AVAAAPWWLPVKGANWRHPEGPDSTILHRPDHPVLHVSWNDAVAYCTWAGKRLPT
EAEWEYSCRGGLHNRLFPWGNKLQPKGQHYANIWQGEFPVTNTGEDGFQGTAPVDA
FPPNGYGLYNIVGNAWEWTSWWTVHHSVEETLNPKGPPSGKDRVKKGGSYMCHRS
YCYRYRCAARSQNTPDSSASNLGFRCAADRLPTMD

Để tạo ra dòng tế bào biểu hiện I2S, các tế bào đã được chuyển nhiễm theo cách ổn định với trình tự axit nucleic đã được tối ưu hóa bằng codon (SEQ ID NO. 7) ghi mã protein I2S với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2 và trình tự axit nucleic (SEQ ID NO. 8) ghi mã enzym FGE của người nêu trong SEQ ID NO. 6.

SEQ ID NO: 7

> iduronat 2-sulfatase (IDS) đã được tối ưu hóa bằng codon của người hiện đại, biến thể phiên mã 1, ARN thông tin

ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCTGAGCA
GCGTGTGCGTGGCCCTGGGCAGCGAGACCCAGGCCAACAGCACCAACCGACGCCCT
GAACGTGCTGCTGATCATCGTGGACGACCTGCGCCCCAGCCTGGGCTGCTACGGC
GACAAGCTGGTGCGCAGCCCCAACATCGACCAGCTGGCCAGCCACAGCCTGCTGT
TCCAGAACGCCTTCGCCCAGCAGGCCGTGTGCGCCCCCAGCCGCGTGAGCTTCCTG
ACCGGCCGCGCCCCGACACCAACCGCCTGTACGACTTCAACAGCTACTGGCGCGT
GCACGCCGGCAACTTCAGCACCATCCCCAGTACTTCAAGGAGAACGGCTACGTG
ACCATGAGCGTGGGCAAGGTGTTCCACCCCGGCATCAGCAGCAACCACACCGACG
ACAGCCCCTACAGCTGGAGCTTCCCCCCTACCAACCCAGCAGCGAGAAGTACGA
GAACACCAAGACCTGCCGCGGCCCGACGGCGAGCTGCACGCCAACCTGCTGTGC
CCCGTGGACGTGCTGGACGTGCCCCAGGGCACCCCTGCCCGACAAGCAGAGCACCG
AGCAGGCCATCCAGCTGCTGGAGAAGATGAAGACCAGCGCCAGCCCCCTTCTTCCT
GGCCGTGGGCTACCACAAGCCCCACATCCCCTTCCGCTACCCCAAGGAGTTCCAGA

AGCTGTACCCCCTGGAGAACATCACCTGGCCCCCGACCCCGAGGTGCCCCGACGG
 CCTGCCCCCGCTGGCCTACAACCCCTGGATGGACATCCGCCAGCGCGAGGACGTG
 CAGGCCCTGAACATCAGCGTGCCCTACGGCCCCATCCCCGTGGACTTCCAGCGCAA
 GATCCGCCAGAGCTACTTCGCCAGCGTGAGCTACCTGGACACCCAGGTGGGCCGC
 CTGCTGAGCGCCCTGGACGACCTGCAGCTGGCCAACAGCACCATCATCGCCTTAC
 CAGCGACCACGGCTGGGCCCTGGGCGAGCACGGCGAGTGGGCCAAGTACAGCAA
 CTTCGACGTGGCCACCCACGTGCCCCTGATCTTCTACGTGCCCCGGCCGCACCGCCA
 GCCTGCCCCGAGGCCGGCGAGAAGCTGTTCCCTACCTGGACCCCTTCGACAGCGCC
 AGCCAGCTGATGGAGCCCCGGCCGCCAGAGCATGGACCTGGTGGAGCTGGTGAGCC
 TGTTCCCCACCCTGGCCGGCCTGGCCGGCCTGCAGGTGCCCCCGCTGCCCCGTG
 CCCAGCTTCCACGTGGAGCTGTGCCGCGAGGGCAAGAACCTGCTGAAGCACTTCC
 GCTTCCGCGACCTGGAGGAGGACCCCTACCTGCCCCGCAACCCCCGCGAGCTGAT
 CGCCTACAGCCAGTACCCCCGCCCCAGCGACATCCCCCAGTGGAACAGCGACAAG
 CCCAGCCTGAAGGACATCAAGATCATGGGCTACAGCATCCGCACCATCGACTACC
 GCTACACCGTGTGGGTGGGCTTCAACCCCGACGAGTTCCTGGCCAACTTCAGCGAC
 ATCCACGCCGGCGAGCTGTACTTCGTGGACAGCGACCCCCTGCAGGACCACAACA
 TGTACAACGACAGCCAGGGCGGCGACCTGTTCCAGCTGCTGATGCCCTAG

SEQ ID NO: 8

> Tiên chất enzym sinh ra formylglyxin (FGE) có chiều dài đầy đủ của người hiện đại, ARN thông tin

ATGGCTGCGCCCGCACTAGGGCTGGTGTGTGGACGTTGCCCTGAGCTGGGTCTCGT
 CCTCTTGCTGCTGCTGCTCTCGCTGCTGTGTGGAGCGGCAGGGAGCCAGGAGGCCG
 GGACCGGTGCGGGCGCGGGGTCCCTTGCGGGTTCTTGCGGCTGCGGCACGCCCCA
 GCGGCCTGGCGCCCATGGCAGTTCGGCAGCCGCTCACCGATACTCGCGGGAGGCT
 AACGCTCCGGGGCCCCGTACCCGGAGAGCGGCAACTCGCGCACTCAAAGATGGTCC
 CCATCCCTGCTGGAGTATTTACAATGGGCACAGATGATCCTCAGATAAAGCAGGA
 TGGGGAAGCACCTGCGAGGAGAGTTACTATTGATGCCTTTTACATGGATGCCTATG
 AAGTCAGTAATACTGAATTTGAGAAGTTTGTGAACTCAACTGGCTATTTGACAGAG
 GCTGAGAAGTTTGGCGACTCCTTTGTCTTTGAAGGCATGTTGAGTGAGCAAGTGAA
 GACCAATATTCAACAGGCAGTTGCAGCTGCTCCCTGGTGGTTACCTGTGAAAGGCG
 CTA ACTGGAGACACCCAGAAGGGCCTGACTCTACTATTCTGCACAGGCCGGATCA
 TCCAGTTCTCCATGTGTCCTGGAATGATGCGGTTGCCTACTGCACTTGGGCAGGGA
 AGCGGCTGCCCACGGAAGCTGAGTGGGAATACAGCTGTCGAGGAGGCCTGCATAA
 TAGACTTTTCCCCTGGGGCAACAACTGCAGCCCAAAGGCCAGCATTATGCCAAC

ATTTGGCAGGGCGAGTTTCCGGTGACCAACACTGGTGAGGATGGCTTCCAAGGAA
 CTGCGCCTGTTGATGCCTTCCCTCCCAATGGTTATGGCTTATACAACATAGTGGGG
 AACGCATGGGAATGGACTTCAGACTGGTGGACTGTTTCATCATTCTGTTGAAGAAAC
 GCTTAACCCAAAAGGTCCCCCTTCTGGGAAAGACCGAGTGAAGAAAGGTGGATCC
 TACATGTGCCATAGGTCTTATTGTTACAGGTATCGCTGTGCTGCTCGGAGCCAGAA
 CACACCTGATAGCTCTGCTTCGAATCTGGGATTCCGCTGTGCAGCCGACCGCCTGC
 CCACCATGGACTGA

Cả trình tự axit nucleic ghi mã I2S lẫn FGE được kiểm soát bởi gen khởi đầu CMV của người. Sự dịch mã ARN thông tin I2S dẫn đến sự tổng hợp protein I2S có chiều dài đầy đủ gồm 550 axit amin (SEQ ID NO:2), mà bao gồm trình tự peptit dẫn truyền tín hiệu gồm 25 axit amin. Peptit dẫn truyền tín hiệu được loại bỏ và enzym hòa tan được tiết ra từ tế bào.

Trình tự ghi mã neomycin phosphotransferaza (neo) của vi khuẩn và/hoặc gen Blastixidin S Deaminaza (BSD) đã được dùng để cho phép chọn lọc các tế bào chuyển nhiễm bằng cách lần lượt sử dụng chất tương tự neomycin G418 và/hoặc blastixidin. Ngoài ra, gen dihydrofolat reductaza (DHFR) của chuột nhắt đã được sử dụng trên vật truyền ghi mã I2S và/hoặc FGE để cho phép phân lập các dòng tế bào chứa số lượng bản sao gia tăng của các trình tự ghi mã I2S và/hoặc FGE bằng cách chọn lọc metotrexat (MTX).

Tế bào tạo ra I2S đã được phân lập và được chọn lọc được chất thích hợp để phân lập các tế bào có số bản sao gia tăng của gen I2S và/hoặc FGE đã được chuyển nhiễm. Việc định lượng I2S được thực hiện bằng ELISA.

Quần thể tế bào cũng được chọn lọc từng bước trong metotrexat (MTX) để phân lập các tế bào có hiệu suất I2S gia tăng. Hiệu suất I2S được theo dõi trong khi chọn lọc trong MTX bằng ELISA.

Sau vài vòng nhân giống, sau đó, vài dòng tế bào tạo ra I2S đã được tạo huyền phù trong môi trường không chứa huyết thanh thông qua việc giảm từng bước từ DMEM chứa 10% huyết thanh bê sang môi trường xác định hóa học không chứa huyết thanh. Vài quần thể dòng tế bào cá thể được thiết lập thông qua việc tách dòng pha loãng hạn chế. Các khuẩn lạc được sàng lọc bằng thử nghiệm hoạt tính enzym I2S và ELISA. Hai dòng tế bào ổn định 2D và 4D thể hiện phần trăm sống sót cao và mức độ biểu hiện I2S mạnh và được chọn để phát triển tiếp.

Ví dụ 2. Đánh giá dòng tế bào ổn định cùng biểu hiện I2S và FGE

Các thử nghiệm khác được thực hiện để xác định đặc điểm của hai dòng tế bào 2D và 4D cùng biểu hiện I2S và FGE.

Hoạt tính đặc hiệu

Hoạt tính đặc hiệu thứ nhất của enzym I2S được đánh giá. Enzym I2S được tạo ra từ các dòng tế bào 2D và 4D được phân tích về hoạt tính đặc hiệu bằng cách áp dụng thử nghiệm 4-MUF trên cơ sở huỳnh quang. Một cách vắn tắt, thử nghiệm này đo mức độ thủy phân của cơ chất I2S là 4-metylbeliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄). Khi phân cắt cơ chất 4-MUF-SO₄ bằng I2S, phân tử được chuyển hóa thành sulfat và 4-metylbeliferon (4-MUF) huỳnh quang tự nhiên. Kết quả là, hoạt tính enzym I2S có thể được xác định bằng cách đánh giá mức độ thay đổi tổng thể về trình tự dẫn truyền tín hiệu huỳnh quang sau một khoảng thời gian. Đối với thử nghiệm này, enzym I2S tinh chế được tạo ra từ các dòng tế bào 2D và 4D I2S-AF của người được ủ với dung dịch chứa 4-metylbeliferyl-sulfat (4-MUF-SO₄), muối của kali, Sigma Cat. # M-7133). Việc hiệu chỉnh thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng một loạt mẫu tham chiếu đối chứng, bằng cách sử dụng enzym I2S có bán trên thị trường được pha loãng ở mức 1:100, 1:200 và 1:20000 từ dung dịch gốc. Thử nghiệm enzym được thực hiện ở 37°C và thử nghiệm bằng cách sử dụng huỳnh quang kế đã được hiệu chuẩn. Bằng cách sử dụng trị số huỳnh quang thu được đối với mỗi nhóm chất chuẩn tham chiếu, phần trăm hệ số biến thiên được xác định bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\% CV = \frac{\text{độ lệch chuẩn của trị số huỳnh quang thô (N=3)}}{\text{trị số huỳnh quang trung bình}} \times 100\%$$

Sau đó, trị số phần trăm CV được dùng để tính mức độ huỳnh quang trung bình đã được hiệu chỉnh đối với mỗi mẫu, để xác định hoạt tính enzym có thể thông báo, được biểu thị theo mU/ml bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\text{mU/ml} = (\text{CFU}) \left(\frac{1 \text{ nmol/l}}{10 \text{ FU}} \right) \left(\frac{11}{10^3 \text{ ml}} \right) \left(\frac{2.11 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1 \text{ giờ}}{60 \text{ phút}} \right) \left(\frac{1 \text{ mU}}{\text{nmol}} \right) (\text{DF})$$

CFU = Huỳnh quang trung bình đã hiệu chỉnh âm tính

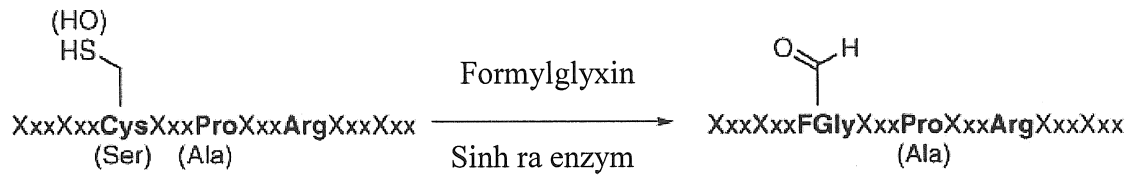
DF - Hệ số pha loãng

Một mili đơn vị hoạt tính là lượng enzym cần thiết để chuyển hóa 1 nanomol 4-metylbeliferyl-sulfat thành 4-metylbeliferon trong 1 phút ở 37°C.

Phản trăm chuyển hóa formylglyxin

Việc lập bản đồ peptit có thể được dùng để xác định phản trăm chuyển hóa FGly. Việc hoạt hóa I2S cần đến sự chuyển hóa xystein (tương ứng với vị trí 59 của I2S thành

thực của người) thành formylglyxin bằng enzym sinh ra formylglyxin (FGE) như được thể hiện dưới đây:



Do đó, tỷ lệ phần trăm của formylglyxin chuyển hóa (%FG) có thể được tính bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\%FG \text{ (của DS)} = \frac{\text{số lượng phân tử I2S hoạt tính}}{\text{số lượng phân tử I2S toàn phần (hoạt tính + không hoạt tính)}} \times 100$$

Ví dụ, 50% FG có nghĩa là một nửa I2S tái tổ hợp tinh chế không có hoạt tính enzym và không có tác dụng điều trị bệnh.

Việc lập bản đồ peptit được dùng để tính % FG. Một cách vắn tắt, protein I2S tái tổ hợp được phân cắt thành các peptit ngắn bằng cách sử dụng proteaza (ví dụ, trypsin hoặc chymotrypsin). Các peptit ngắn được tách và được xác định tính chất bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC). Peptit này chứa vị trí tương ứng với vị trí 59 của I2S thành thực của người được xác định tính chất để xác định xem Cys ở vị trí 59 có được chuyển hóa thành FGly hay không so với đối chứng (ví dụ, protein I2S mà không chuyển hóa thành FGly hay protein I2S mà chuyển hóa 100% FGly). Lượng các peptit chứa FGly (tương ứng với số lượng phân tử I2S hoạt tính) và tổng lượng các peptit với cả FGly và Cys (tương ứng với tổng số phân tử I2S) có thể được xác định trên cơ sở diện tích pic tương ứng và tỷ lệ này phản ánh %FG được tính.

Mối tương quan giữa tỷ lệ phần trăm chuyển hóa FGly và hoạt tính đặc hiệu

Mối tương quan làm ví dụ giữa tỷ lệ phần trăm chuyển hóa FGly và hoạt tính đặc hiệu được thể hiện trên Hình 3. Như có thể thấy được, dữ liệu này gợi ý rằng tỷ lệ phần trăm chuyển hóa formylglyxin càng cao thì dẫn đến hoạt tính enzym I2S càng cao.

Bản đồ Glycan

Thành phần glycan của protein I2S tái tổ hợp đã được tạo ra bởi dòng tế bào 2D và 4D được xác định. Việc định lượng thành phần glycan được thực hiện, bằng cách sử dụng sắc ký trao đổi anion. Như được mô tả dưới đây, bản đồ glycan của I2S tái tổ hợp được lập trong các điều kiện bao gồm bảy nhóm pic, rửa giải theo lượng điện tích âm tăng dần, ít nhất một phần được lấy từ axit sialic và mannoza-6-phosphat glycoform thu

được do phân cắt bằng enzym. Một cách vắn tắt, I2S tái tổ hợp đã được tinh chế thu được bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào trong môi trường không chứa huyết thanh (I2S-AF 2D không chứa huyết thanh và I2S-AF 4D không chứa huyết thanh) và I2S tái tổ hợp tham chiếu được tạo ra, xử lý bằng cách (1) enzym neuraminidaza tinh chế (phân lập được từ *Arthrobacter Ureafaciens* (10mU/ μ l), do Roche Biochemical (Indianapolis, IN) cung cấp, số thứ tự trong danh mục sản phẩm (Cat. #) 269 611 (1U/100 μ l)) để loại bỏ gốc axit sialic, (2) phosphataza kiềm trong thời gian 2 giờ ở $37\pm 1^\circ\text{C}$ để giải phóng hoàn toàn các gốc mannoza-6-phosphat, (3) phosphataza kiềm + neuraminidaza, hoặc (4) không xử lý. Mỗi bước phân cắt bằng enzym được phân tích bằng sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao với bộ dò xung điện (HPAE-PAD) bằng cách sử dụng cột phân tích CarboPac PA1 có lắp cột bảo vệ Dionex CarboPac PA1. Một loạt chất chuẩn axit sialic và mannoza-6-phosphat có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,4nmol đến 2,0nmol được chạy cho mỗi thử nghiệm. Phương pháp đẳng dòng bằng cách sử dụng dung dịch chứa 48mM natri axetat trong dung dịch chứa 100mM natri hydroxit được thực hiện trong thời gian ít nhất 15 phút với lưu tốc 1,0ml/phút ở nhiệt độ môi trường để rửa giải mỗi pic. Dữ liệu lấy được từ mỗi lần chạy mẫu riêng biệt, đối với cả hai mẫu I2S-AF và I2S tham chiếu, từng dữ liệu được gộp lại thành một sắc ký đồ duy nhất để biểu thị bản đồ glycan đối với mỗi nhóm protein tái tổ hợp tương ứng. Như được thể hiện trên Hình 4, bản đồ glycan làm ví dụ đối với I2S đã được tạo ra bởi dòng tế bào 2D và 4D thể hiện các pic rửa giải đại diện (theo thứ tự rửa giải) bao gồm các glycan trung tính, mono-, disialyl hóa, được mono phosphoryl hóa, trisialyl hóa và lai (monosialyl hóa và mannoza-6-phosphat đã chặn mạch), tetrasialyl hóa và lai (disialyl hóa và mannoza-6-phosphat đã chặn mạch) và được diphosphoryl hóa.

Ví dụ 3. Nuôi cấy tế bào huyền phù không chứa huyết thanh

Ví dụ này thể hiện rằng việc nuôi cấy huyền phù không chứa huyết thanh ở quy mô lớn có thể được phát triển để nuôi cấy dòng tế bào tối ưu hóa để tạo ra I2S tái tổ hợp.

Hệ môi trường huyền phù nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh

Một cách vắn tắt, môi trường nuôi cấy giống được thiết lập bằng cách sử dụng dòng tế bào 2D hoặc 4D của Ví dụ 1. Các tế bào được chuyển sang bình lắc nuôi cấy mô dung tích 250ml chứa môi trường mở rộng xác định hóa học không chứa huyết

thanh có bổ sung MTX để chọn lọc, được điều chỉnh bằng natri bicacbonat đến độ pH bằng 7,3 và được sinh trưởng ở 37°C với 5% CO₂ trong vài ngày. Khi môi trường nuôi cấy đạt đến nồng độ tế bào và mức độ sống sót đủ, môi trường nuôi cấy giống ban đầu đã được sử dụng để cấy loạt thứ nhất trong một loạt môi trường nuôi cấy tế bào từng bước sẽ phát triển trong bình lắc nuôi cấy mô dung tích 500ml, tiếp theo trong bình lắc nuôi cấy mô 1l.

Việc mở rộng nuôi cấy theo mẻ được thực hiện bằng cách chuyển mỗi giống cấy với dung tích 1l vào Cellbag bioreactor® 10l (do Wave Europe cung cấp), và bổ sung môi trường mở rộng. Sau khi đạt đến mật độ tế bào đủ, môi trường mở rộng mới được bổ sung vào và các tế bào được sinh trưởng đến đủ mật độ. Túi tế bào 10l được chuyển sang hệ Wave bioreactor® (do Wave Europe cung cấp) và điều kiện nuôi cấy được cải biến để cho phép sinh trưởng trong khi làm tràn môi trường liên tục. Môi trường nuôi cấy mở rộng được phân phối và các mẫu được gom để phân tích riêng biệt độ pH, glutamin, glutamat, glucoza, amoni, lactat, pCO₂ và nồng độ mol đồng thẩm thấu.

Khi đạt đến đủ mật độ tế bào, toàn bộ 10l môi trường nuôi cấy tế bào được chuyển sang Wave Cellbag bioreactor® dung tích 50l, chứa môi trường mở rộng tươi, và được sinh trưởng đến mật độ tế bào đủ bằng cách sử dụng hệ Wave Cellbag bioreactor®.

Tiếp theo, việc sinh trưởng tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng thùng phản ứng sinh học dùng một lần dung tích 200l và dụng cụ làm tràn ly tâm (Centritech® CELL II unit, Pneumatic Scale Corporation), mà được thiết kế nhằm tập trung tế bào và làm trong môi trường để tái sử dụng trong môi trường nuôi cấy tế bào do việc làm tràn tạo ra. Môi trường mở rộng (được điều chỉnh đến độ pH=7,10) được cấy bằng một phần chứa 50l dịch nuôi cấy và được sinh trưởng đến mật độ đủ tế bào.

Tiếp theo, phần chứa 200l dịch nuôi cấy được dùng để gieo cấy vào thùng phản ứng sinh học 2000l dùng một lần và dụng cụ làm tràn ly tâm (Centritech® CELL II unit, Pneumatic Scale Corporation) trong môi trường sản xuất (được điều chỉnh đến độ pH=7,20). Các tế bào đã được sinh trưởng trong điều kiện sinh trưởng mẻ. Sau hai ngày sinh trưởng, điều kiện được điều chỉnh để làm tràn liên tục, đến khi đạt đến pha chuyển tiếp. Các tế bào đã được sinh trưởng trong điều kiện sinh trưởng làm tràn trong pha chuyển tiếp trong thời gian 24 giờ.

Đối với giai đoạn sản xuất, hai đơn vị Centritech CELL II được sử dụng. Giai đoạn sản xuất được bắt đầu khoảng 24 giờ sau khi bắt đầu giai đoạn chuyển tiếp và được duy trì trong thời gian mong muốn, bằng cách điều chỉnh tốc độ lấy máu.

Mặc dù một số hợp chất, được phẩm và phương pháp nhất định bộc lộ trong bản mô tả này đã được mô tả riêng theo một số khía cạnh nhất định, các ví dụ sau chỉ nhằm minh họa các hợp chất theo sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Quán từ “một” như được dùng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ, trừ khi được chỉ ra hoàn toàn trái lại, cần được hiểu là bao gồm cả dạng số nhiều. Yêu cầu bảo hộ hoặc phần mô tả bao gồm “hoặc” giữa một hoặc nhiều thành viên của nhóm được coi là đáp ứng nếu một, nhiều hơn một, hoặc tất cả thành viên nhóm này có mặt, được sử dụng, hoặc liên quan theo cách khác đến sản phẩm hoặc quy trình đã định trừ khi có quy định khác hoặc hiển nhiên từ ngữ cảnh. Sáng chế bao gồm các phương án theo đó chính xác là một thành viên của nhóm này sẽ có mặt, được sử dụng, hoặc liên quan theo cách khác đến sản phẩm hoặc quy trình nhất định. Sáng chế còn bao gồm các phương án trong đó nhiều hơn một, hoặc tất cả các thành viên trong nhóm đều có mặt trong, được sử dụng trong, hoặc liên quan theo cách khác đến sản phẩm hoặc quy trình nhất định. Hơn thế nữa, cần phải hiểu rằng sáng chế bao hàm tất cả các biến thể, hỗn hợp, và dạng hoán vị trong đó một hoặc nhiều giới hạn, yếu tố, mệnh đề, thuật ngữ mô tả, v.v., từ một hoặc nhiều điểm yêu cầu bảo hộ được đưa vào điểm yêu cầu bảo hộ khác phụ thuộc vào cùng điểm yêu cầu bảo hộ (hoặc, nếu thích hợp là điểm yêu cầu bảo hộ khác bất kỳ) trừ khi có quy định khác hoặc trừ khi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ rằng sẽ có mâu thuẫn hoặc không thống nhất. Nếu các yếu tố được liệt kê (ví dụ, trong nhóm Markush hoặc dạng tương tự), cần phải hiểu rằng mỗi phân nhóm yếu tố này cũng đã được bộc lộ, và yếu tố bất kỳ có thể bị loại bỏ nhóm này. Cần phải hiểu rằng, nói chung, nếu sáng chế, hoặc các khía cạnh theo sáng chế, được đề cập là bao gồm yếu tố, đặc tính cụ thể, v.v., thì một số phương án nhất định của sáng chế hoặc các khía cạnh theo sáng chế sẽ bao gồm, hoặc chủ yếu bao gồm, các yếu tố, đặc tính này, v.v.. Nhằm mục đích đơn giản hóa, các phương án đó không được mô tả cụ thể trong mọi trường hợp trong bản mô tả này. Cũng cần phải hiểu rằng phương án hoặc khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể bị loại trừ ra khỏi các điểm yêu cầu bảo hộ, bất kể việc loại trừ cụ thể này có được nêu trong bản mô tả này hay không. Các công bố, trang web và tài liệu tham chiếu được nêu trong bản mô tả này nhằm mô

tả tình trạng kỹ thuật của sáng chế và để bổ sung chi tiết khác liên quan đến việc thực hiện sáng chế được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào chứa

axit nucleic thứ nhất mã hóa protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%; và

axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:5 ít nhất là 90%,

trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc axit nucleic thứ hai là ngoại sinh và trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly), và trong đó mức protein iduronat-2-sulfataza được biểu hiện bởi tế bào cao gấp từ 0,3-lần đến 10-lần so với mức protein enzym tạo ra formylglyin được biểu hiện bởi tế bào này.

2. Tế bào chứa

axit nucleic thứ nhất mã hóa iduronat-2-sulfataza (I2S) protein có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%; và

axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:5 ít nhất là 90%,

trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc axit nucleic thứ hai là ngoại sinh và trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly) và ở tỷ lệ năng suất riêng lớn hơn khoảng 30 picogram/tế bào/ngày.

3. Tế bào theo điểm 1, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 80% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly).

4. Tế bào theo điểm 1, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 90% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly).

5. Tế bào theo điểm 1, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 95% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly).
6. Tế bào theo điểm 1, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 97% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành Ca-formylglyxin (FGly).
7. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc axit nucleic thứ hai được liên kết có điều khiển với đoạn khởi đầu hCMV.
8. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ nhất có trình tự giống SEQ ID NO:7 với ít nhất là 70%.
9. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ hai có trình tự giống với SEQ ID NO:8 ít nhất là 70%.
10. Tế bào theo điểm 1, trong đó cả axit nucleic thứ nhất lẫn các axit nucleic thứ hai đều là ngoại sinh.
11. Tế bào theo điểm 1, trong đó tế bào này là tế bào động vật có vú.
12. Tế bào theo điểm 11, trong đó tế bào động vật có vú này là tế bào CHO.
13. Phương pháp sản xuất protein iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo điểm 1 trong các điều kiện sao cho các protein I2S và FGE tái tổ hợp được đồng biểu hiện ở tế bào.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó tế bào được nuôi cấy trong quy trình sử dụng thiết bị phản ứng sinh học quy mô lớn ở quy mô được chọn từ 10 L, 200 L, 500 L, 1000 L, 1500 L, hoặc 2000 L.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó quy trình sử dụng thiết bị phản ứng sinh học là quy trình tưới dịch.

16. Phương pháp theo điểm 13, trong đó tế bào được nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh.

17. Phương pháp theo điểm 13, trong đó tế bào được nuôi cấy trong hỗn dịch .

18. Phương pháp theo điểm 13, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế protein I2S tái tổ hợp.

19. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ nhất mã hóa protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 95%.

20. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:5 ít nhất là 95%.

21. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ nhất mã hóa protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1.

22. Tế bào theo điểm 1, trong đó axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:5.

23. Tế bào chứa

axit nucleic thứ nhất mã hóa protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%; và

axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:5 ít nhất là 90%,

trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc axit nucleic thứ hai là ngoại sinh và trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được

chuyển hóa thành α -formylglyxin (FGly), và trong đó mức ARN thông tin iduronat-2-sulfataza được biểu hiện bởi tế bào cao hơn từ 0,1-lần đến 10-lần mức ARN thông tin enzym tạo ra formylglyxin được biểu hiện bởi tế bào.

24. Tế bào chứa

axit nucleic thứ nhất mã hóa iduronat-2-sulfataza (I2S) protein có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%; và

axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyxin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO:5 ít nhất là 90%,

trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc axit nucleic thứ hai là ngoại sinh và trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 70% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành α -formylglyxin (FGly) và ở tỷ lệ năng suất riêng lớn hơn khoảng 5 picogam/tế bào/ngày.

25. Tế bào theo điểm 23, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 80% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành α -formylglyxin (FGly).

26. Tế bào theo điểm 23, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 90% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO:1 được chuyển hóa thành α -formylglyxin (FGly).

27. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc axit nucleic thứ hai được liên kết có điều khiển với đoạn khởi đầu hCMV.

28. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ hai có trình tự giống với SEQ ID NO:8 ít nhất là 70%.

29. Tế bào theo điểm 23, trong đó cả axit nucleic thứ nhất lẫn các axit nucleic thứ hai là ngoại sinh.

30. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc các axit nucleic thứ hai được tích hợp trong hệ gen của tế bào.
31. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ nhất và/hoặc các axit nucleic thứ hai có mặt trong một hoặc nhiều cấu trúc bên ngoài nhiễm sắc thể.
32. Tế bào theo điểm 23, trong đó tế bào là tế bào động vật có vú.
33. Phương pháp sản xuất protein iduronat-2-sulfataza (I2S) tái tổ hợp bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo điểm 23 trong các điều kiện sao cho các protein I2S và FGE tái tổ hợp được đồng biểu hiện ở tế bào.
34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó tế bào được nuôi cấy ở quy mô lớn.
35. Phương pháp theo điểm 34, trong đó quy mô lớn là quy trình sử dụng thiết bị phản ứng sinh học.
36. Phương pháp theo điểm 35, trong đó quy trình sử dụng thiết bị phản ứng sinh học là quy trình tưới dịch.
37. Phương pháp theo điểm 35, trong đó thiết bị sinh học ở quy mô được chọn từ 10 L, 200 L, 500 L, 1000 L, 1500 L, hoặc 2000 L.
38. Phương pháp theo điểm 33, trong đó tế bào được nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh.
39. Phương pháp theo điểm 33, trong đó tế bào được nuôi cấy trong hỗn dịch.
40. Phương pháp theo điểm 33, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế protein I2S tái tổ hợp.

41. Tế bào theo điểm 23, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 95% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO: 1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly).

42. Tế bào theo điểm 23, trong đó tế bào này, ngay khi được nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy tế bào, tạo ra protein I2S có ít nhất khoảng 97% gốc xystein tương ứng với Cys59 của SEQ ID NO: 1 được chuyển hóa thành C α -formylglyxin (FGly).

43. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ nhất có trình tự giống với SEQ ID NO: 7 ít nhất là 70%.

44. Tế bào theo điểm 32, trong đó tế bào động vật có vú này là tế bào CHO.

45. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ nhất mã hóa protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO: 1 ít nhất là 95%.

46. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO: 5 ít nhất là 95%.

47. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ nhất mã hóa protein iduronat-2-sulfataza (I2S) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO: 1.

48. Tế bào theo điểm 23, trong đó axit nucleic thứ hai mã hóa protein enzym tạo ra formylglyin (FGE) có trình tự axit amin giống với SEQ ID NO: 5.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boldog, Ferenc

Heartlein, Mike

<120> TẾ BÀO TẠO RA IDURONAT-2-SULFATAZA TÁI TỔ HỢP

<130> 2006685-0340

<150> 61/666,719

<151> 2012-06-29

<160> 8

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 525

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu

1 5 10 15

Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys

20 25 30

Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu

35 40 45

Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val

50 55 60

Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe

65 70 75 80

Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln

85 90 95

Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe

100	105	110
His Pro Gly Ile Ser Ser Asn His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp		
115	120	125
Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys		
130	135	140
Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro		
145	150	155
Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser		
165	170	175
Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser		
180	185	190
Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg		
195	200	205
Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu		
210	215	220
Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn		
225	230	235
Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile		
245	250	255
Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg		
260	265	270
Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg		
275	280	285
Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile		
290	295	300
Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp		
305	310	315
		320

Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe

325

330

335

Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu

340

345

350

Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro

355

360

365

Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr

370

375

380

Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro

385

390

395

400

Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His

405

410

415

Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro

420

425

430

Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro

435

440

445

Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly

450

455

460

Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe

465

470

475

480

Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu

485

490

495

Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn

500

505

510

Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe Gln Leu Leu Met Pro

515

520

525

<210> 2

<211> 550

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 2

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val

1

5

10

15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser

20

25

30

Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg

35

40

45

Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile

50

55

60

Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln

65

70

75

80

Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg

85

90

95

Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His

100

105

110

Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr

115

120

125

Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn

130

135

140

His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro

145

150

155

160

Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly

165

170

175

Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro

35961

180	185	190
Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu		
195	200	205
Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly		
210	215	220
Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys		
225	230	235
Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro		
245	250	255
Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln		
260	265	270
Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile		
275	280	285
Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val		
290	295	300
Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp		
305	310	315
Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly		
325	330	335
Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp		
340	345	350
Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly Arg Thr Ala		
355	360	365
Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe		
370	375	380
Asp Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu		
385	390	395
		400

Val Glu Leu Val Ser Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu
 405 410 415

Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro Ser Phe His Val Glu Leu Cys
 420 425 430

Arg Glu Gly Lys Asn Leu Leu Lys His Phe Arg Phe Arg Asp Leu Glu
 435 440 445

Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser
 450 455 460

Gln Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro
 465 470 475 480

Ser Leu Lys Asp Ile Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp
 485 490 495

Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala
 500 505 510

Asn Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val Asp Ser Asp
 515 520 525

Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr Asn Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu
 530 535 540

Phe Gln Leu Leu Met Pro
 545 550

<210> 3

<211> 312

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser
 20 25 30
 Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg
 35 40 45
 Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile
 50 55 60
 Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln
 65 70 75 80
 Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg
 85 90 95
 Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His
 100 105 110
 Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr
 115 120 125
 Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn
 130 135 140
 His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro
 145 150 155 160
 Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly
 165 170 175
 Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro
 180 185 190
 Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu
 195 200 205
 Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly
 210 215 220
 Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys

35961

```

225                230                235                240
Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro

                245                250                255
Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln

                260                265                270
Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile

                275                280                285
Pro Val Asp Phe Gln Glu Asp Gln Ser Ser Thr Gly Phe Arg Leu Lys

                290                295                300
Thr Ser Ser Thr Arg Lys Tyr Lys

305                310

<210> 4
<211> 343
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 4

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1                5                10                15
Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Ser Glu Thr Gln Ala Asn Ser

                20                25                30
Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Leu Ile Ile Val Asp Asp Leu Arg

                35                40                45
Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile

                50                55                60
Asp Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln

65                70                75                80
Gln Ala Val Cys Ala Pro Ser Arg Val Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg

```

85	90	95
Pro Asp Thr Thr Arg Leu Tyr Asp Phe Asn Ser Tyr Trp Arg Val His		
100	105	110
Ala Gly Asn Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu Asn Gly Tyr		
115	120	125
Val Thr Met Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser Asn		
130	135	140
His Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Phe Pro Pro Tyr His Pro		
145	150	155
Ser Ser Glu Lys Tyr Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly		
165	170	175
Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro Val Asp Val Leu Asp Val Pro		
180	185	190
Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala Ile Gln Leu		
195	200	205
Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly		
210	215	220
Tyr His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys		
225	230	235
Leu Tyr Pro Leu Glu Asn Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro		
245	250	255
Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln		
260	265	270
Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu Asn Ile Ser Val Pro Tyr Gly Pro Ile		
275	280	285
Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val		
290	295	300

Ser Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Leu Ser Ala Leu Asp Asp
 305 310 315 320

Leu Gln Leu Ala Asn Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly
 325 330 335

Phe Leu Met Arg Thr Asn Thr
 340

<210> 5

<211> 341

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 5

Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly Ser
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Gly Thr Pro Gln Arg Pro Gly Ala His Gly Ser Ser Ala
 20 25 30

Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val Pro
 35 40 45

Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala Gly
 50 55 60

Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly Glu
 65 70 75 80

Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala Tyr
 85 90 95

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

Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly Met
 115 120 125

Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala Ala
 130 135 140
 Pro Trp Trp Leu Pro Val Lys Gly Ala Asn Trp Arg His Pro Glu Gly
 145 150 155 160
 Pro Asp Ser Thr Ile Leu His Arg Pro Asp His Pro Val Leu His Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Asp Ala Val Ala Tyr Cys Thr Trp Ala Gly Lys Arg Leu
 180 185 190
 Pro Thr Glu Ala Glu Trp Glu Tyr Ser Cys Arg Gly Gly Leu His Asn
 195 200 205
 Arg Leu Phe Pro Trp Gly Asn Lys Leu Gln Pro Lys Gly Gln His Tyr
 210 215 220
 Ala Asn Ile Trp Gln Gly Glu Phe Pro Val Thr Asn Thr Gly Glu Asp
 225 230 235 240
 Gly Phe Gln Gly Thr Ala Pro Val Asp Ala Phe Pro Pro Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Gly Leu Tyr Asn Ile Val Gly Asn Ala Trp Glu Trp Thr Ser Asp Trp
 260 265 270
 Trp Thr Val His His Ser Val Glu Glu Thr Leu Asn Pro Lys Gly Pro
 275 280 285
 Pro Ser Gly Lys Asp Arg Val Lys Lys Gly Gly Ser Tyr Met Cys His
 290 295 300
 Arg Ser Tyr Cys Tyr Arg Tyr Arg Cys Ala Ala Arg Ser Gln Asn Thr
 305 310 315 320
 Pro Asp Ser Ser Ala Ser Asn Leu Gly Phe Arg Cys Ala Ala Asp Arg
 325 330 335
 Leu Pro Thr Met Asp

340

<210> 6

<211> 374

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 6

Met Ala Ala Pro Ala Leu Gly Leu Val Cys Gly Arg Cys Pro Glu Leu

1 5 10 15

Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Cys Gly Ala Ala

20 25 30

Gly Ser Gln Glu Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gly

35 40 45

Ser Cys Gly Cys Gly Thr Pro Gln Arg Pro Gly Ala His Gly Ser Ser

50 55 60

Ala Ala Ala His Arg Tyr Ser Arg Glu Ala Asn Ala Pro Gly Pro Val

65 70 75 80

Pro Gly Glu Arg Gln Leu Ala His Ser Lys Met Val Pro Ile Pro Ala

85 90 95

Gly Val Phe Thr Met Gly Thr Asp Asp Pro Gln Ile Lys Gln Asp Gly

100 105 110

Glu Ala Pro Ala Arg Arg Val Thr Ile Asp Ala Phe Tyr Met Asp Ala

115 120 125

Tyr Glu Val Ser Asn Thr Glu Phe Glu Lys Phe Val Asn Ser Thr Gly

130 135 140

Tyr Leu Thr Glu Ala Glu Lys Phe Gly Asp Ser Phe Val Phe Glu Gly

145 150 155 160

Met Leu Ser Glu Gln Val Lys Thr Asn Ile Gln Gln Ala Val Ala Ala

	165		170		175										
Ala	Pro	Trp	Trp	Leu	Pro	Val	Lys	Gly	Ala	Asn	Trp	Arg	His	Pro	Glu
	180		185		190										
Gly	Pro	Asp	Ser	Thr	Ile	Leu	His	Arg	Pro	Asp	His	Pro	Val	Leu	His
	195		200		205										
Val	Ser	Trp	Asn	Asp	Ala	Val	Ala	Tyr	Cys	Thr	Trp	Ala	Gly	Lys	Arg
	210		215		220										
Leu	Pro	Thr	Glu	Ala	Glu	Trp	Glu	Tyr	Ser	Cys	Arg	Gly	Gly	Leu	His
225			230		235									240	
Asn	Arg	Leu	Phe	Pro	Trp	Gly	Asn	Lys	Leu	Gln	Pro	Lys	Gly	Gln	His
	245		250		255										
Tyr	Ala	Asn	Ile	Trp	Gln	Gly	Glu	Phe	Pro	Val	Thr	Asn	Thr	Gly	Glu
	260		265		270										
Asp	Gly	Phe	Gln	Gly	Thr	Ala	Pro	Val	Asp	Ala	Phe	Pro	Pro	Asn	Gly
	275		280		285										
Tyr	Gly	Leu	Tyr	Asn	Ile	Val	Gly	Asn	Ala	Trp	Glu	Trp	Thr	Ser	Asp
	290		295		300										
Trp	Trp	Thr	Val	His	His	Ser	Val	Glu	Glu	Thr	Leu	Asn	Pro	Lys	Gly
305			310		315									320	
Pro	Pro	Ser	Gly	Lys	Asp	Arg	Val	Lys	Lys	Gly	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys
	325		330		335										
His	Arg	Ser	Tyr	Cys	Tyr	Arg	Tyr	Arg	Cys	Ala	Ala	Arg	Ser	Gln	Asn
	340		345		350										
Thr	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Ser	Asn	Leu	Gly	Phe	Arg	Cys	Ala	Ala	Asp
	355		360		365										
Arg	Leu	Pro	Thr	Met	Asp										
	370														

<210> 7

<211> 1653

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 7

atgccccgcg cccgcaccgg ccgcggcctg ctgtggctgg gcctgggtgct gagcagcgtg	60
tgctggggcc tgggcagcga gaccagggcc aacagcacca ccgacgccct gaacgtgctg	120
ctgatcatcg tggacgacct gcgccccagc ctgggctgct acggcgacaa gctgggtgcgc	180
agccccaaca tcgaccagct ggccagccac agcctgctgt tccagaacgc cttcgcccag	240
caggccgtgt gcgccccag ccgcgtgagc ttctgaccg gccgccgccc cgacaccacc	300
cgctgtacg acttcaacag ctactggcgc gtgcacgccg gcaacttcag caccatcccc	360
cagtacttca aggagaacgg ctacgtgacc atgagcgtgg gcaaggtgtt ccaccccggc	420
atcagcagca accacaccga cgacagcccc tacagctgga gcttcccccc ctaccacccc	480
agcagcgaga agtacgagaa caccaagacc tgccgcggcc ccgacggcga gctgcacgcc	540
aacctgctgt gccccgtgga cgtgctggac gtgcccagag gcaccctgcc cgacaagcag	600
agcaccgagc aggccatcca gctgctggag aagatgaaga ccagcgccag ccccttcttc	660
ctggccgtgg gctaccacaa gcccacatc cccttcgct accccaagga gttccagaag	720
ctgtaccccc tggagaacat caccctggcc cccgaccccg aggtgcccga cggcctgccc	780
cccgtggcct acaaccctg gatggacatc cgccagcgcg aggacgtgca ggccctgaac	840
atcagcgtgc cctacggccc catccccgtg gacttccagc gcaagatccg ccagagctac	900
ttcgccagcg tgagctacct ggacaccag gtgggcccgc tgctgagcgc cctggacgac	960
ctgcagctgg ccaacagcac catcatcgcc ttaccagcg accacggctg ggccctgggc	1020
gagcacggcg agtggggcaa gtacagcaac ttcgacgtgg ccaccacgt gccctgatc	1080
ttctacgtgc ccggccgcac cgccagcctg cccgaggccg gcgagaagct gttcccctac	1140
ctggacccct tcgacagcgc cagccagctg atggagcccg gccgccagag catggacctg	1200
gtggagctgg tgagcctgtt cccacccctg gccggcctgg ccggcctgca ggtgcccccc	1260
cgctgccccg tgcccagctt ccacgtggag ctgtgccgcg agggcaagaa cctgctgaag	1320

cacttccgct tccgcgacct ggaggaggac ccctacctgc ccggcaaccc ccgcgagctg 1380
 atcgcttaca gccagtaccc ccgccccagc gacatccccc agtggaacag cgacaagccc 1440
 agcctgaagg acatcaagat catgggctac agcatccgca ccatcgacta ccgctacacc 1500
 gtgtgggtgg gcttcaaccc cgacgagttc ctggccaact tcagcgacat ccacgccggc 1560
 gagctgtact tcgtggacag cgaccccctg caggaccaca acatgtacaa cgacagccag 1620
 ggcggcgacc tggtccagct gctgatgccc tag 1653

<210> 8

<211> 1125

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 8

atggctgctg ccgcactagg gctggtgtgt ggacgttgcc ctgagctggg tctcgtcctc 60
 ttgctgctgc tgctctcgct gctgtgtgga gcggcaggga gccaggaggc cgggaccggc 120
 gcgggctgct ggtcccttgc gggttcttgc ggctgcggca cgcgccagcg gcctggcgcc 180
 catggcagtt cggcagccgc tcaccgatac tcgcgggagg ctaacgctcc gggccccgta 240
 cccggagagc ggcaactcgc gcactcaaag atgggtccca tccctgctgg agtatattaca 300
 atgggcacag atgatactca gataaagcag gatggggaag cacctgagag gagagttact 360
 attgatgcct ttacatgga tgcctatgaa gtcagtaata ctgaatttga gaagtgtgtg 420
 aactcaactg gctatttgac agaggctgag aagtttggcg actcctttgt ctttgaaggc 480
 atgttgagtg agcaagtga gaccaatatt caacaggcag ttgcagctgc tccctgggtg 540
 ttacctgtga aaggcgctaa ctggagacac ccagaagggc ctgactctac tattctgcac 600
 aggccggatc atccagttct ccatgtgtcc tggaatgatg cggttgccta ctgcacttgg 660
 gcagggaagc ggctgccac ggaagctgag tgggaataca gctgtcgagg aggcctgcat 720
 aatagacttt tcccctgggg caacaaactg cagcccaaag gccagcatta tgccaacatt 780
 tggcagggcg agtttccggg gaccaacact ggtgaggatg gcttccaagg aactgctcct 840
 gttgatgcct tccctcccaa tggttatggc ttatacaaca tagtggggaa cgcatgggaa 900
 tggacttcag actggtggac tggtcatcat tctgttgaag aaacgcttaa cccaaaaggt 960

cccccttctg ggaaagaccg agtgaagaaa ggtggatcct acatgtgcca taggtcttat	1020
tgttacaggt atcgctgtgc tgctcggagc cagaacacac ctgatatgctc tgcttcgaat	1080
ctgggattcc gctgtgcagc cgaccgcctg cccaccatgg actga	1125

1/5

SEQ ID NO: 1
 1 Ser Glu Thr Gln Ala **Asn** Ser Thr Thr Asp Ala Leu Asn Val Leu Ile Ile Val Asp
 21 Asp Leu Arg Pro Ser Leu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys Leu Val Arg Ser Pro Asn Ile Asp
 41 Gln Leu Ala Ser His Ser Leu Leu Phe Gln Asn Ala Phe Ala Gln Ala Val **Cys** Ala
 61 Pro Ser Arg Bal Ser Phe Leu Thr Gly Arg Arg Pro Asp Thr Arg Leu Tyr Asp Phe
 81 Asn Ser Tyr Trp Arg Val His Ala Gly **Asn** Phe Ser Thr Ile Pro Gln Tyr Phe Lys Glu
 101 Asn Gly Tyr Val Thr Met Ser Ser Val Gly Lys Val Phe His Pro Gly Ile Ser Ser **Asn** His
 121 Thr Asp Asp Ser Pro Tyr Ser Trp Ser Ser Phe pro pro Tyr His Pro Ser Ser Glu Lys Tyr
 141 Glu Asn Thr Lys Thr Cys Arg Gly Pro Asp Gly Glu Leu His Ala Asn Leu Leu Cys Pro
 161 Val Asp Val Leu Asp Val Pro Glu Gly Thr Leu Pro Asp Lys Gln Ser Thr Glu Gln Ala
 181 Ile Gln Leu Leu Glu Lys Met Lys Thr Ser Ala Ser Pro Phe Phe Leu Ala Val Gly Tyr
 201 His Lys Pro His Ile Pro Phe Arg Tyr Pro Lys Glu Phe Gln Lys Leu Tyr Pro Leu Glu
 221 **Asn** Ile Thr Leu Ala Pro Asp Pro Glu Val Pro Asp Gly Leu Pro Pro Val Ala Tyr Asn
 241 Pro Trp Met Asp Ile Arg Gln Arg Glu Asp Val Gln Ala Leu **Asn** Ile Ser Val Pro Tyr
 261 Gly pro Ile Pro Val Asp Phe Gln Arg Lys Ile Arg Gln Ser Tyr Phe Ala Ser Val Ser

HINH 1A

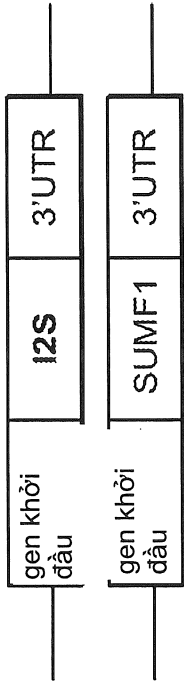
281 Tyr Leu Asp Thr Gln Val Gly Arg Leu Ser Ala Leu Asp Asp Leu Gln Leu Ala **Asn**
 301 Ser Thr Ile Ile Ala Phe Thr Ser Asp His Gly Trp Ala Leu Gly Glu His Gly Glu Trp
 321 Ala Lys Tyr Ser Asn Phe Asp Val Ala Thr His Val Pro Leu Ile Phe Tyr Val Pro Gly
 341 Arg Thr Ala Ser Leu Pro Glu Ala Gly Glu Lys Leu Phe Pro Tyr Leu Asp Pro Phe Asp
 361 Ser Ala Ser Gln Leu Met Glu Pro Gly Arg Gln Ser Met Asp Leu Val Glu Leu Val Ser
 381 Leu Phe Pro Thr Leu Ala Gly Leu Ala Gly Leu Gln Val Pro Pro Arg Cys Pro Val Pro
 401 Ser Phe His Val Glu Leu Cys Arg Clu Gly Lys Asn Leu Lys His Phe Arg Phe Arg
 421 Asp Leu Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Pro Gly Asn Pro Arg Glu Leu Ile Ala Tyr Ser Gln
 441 Tyr Pro Arg Pro Ser Asp Ile Pro Gln Trp Asn Ser Asp Lys Pro Ser Leu Lys Asp Ile
 461 Lys Ile Met Gly Tyr Ser Ile Arg Thr Ile Asp Tyr Arg Tyr Thr Val Trp Val Gly Phe
 481 Asn Pro Asp Glu Phe Leu Ala **Asn** Phe Ser Asp Ile His Ala Gly Glu Leu Tyr Phe Val
 501 Asp Ser Asp Pro Leu Gln Asp His Asn Met Tyr **Asn** Asp Ser Gln Gly Gly Asp Leu Phe
 521 Gln Leu Leu Met Pro **Asn** - vị trí đánh dấu của việc glycosyl hóa liên kết đầu N
Cys - vị trí tiêu biểu của việc chuyển hóa xystein

HÌNH 1B

HÌNH 2A

các lựa chọn cùng biểu hiện I2S và SUMF1

đơn vị cùng biểu hiện trên các vật truyền riêng biệt (cùng chuyển nhiệm hoặc chuyển nhiệm tiếp theo)



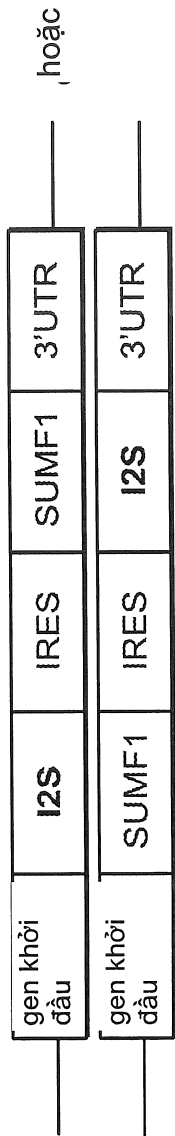
HÌNH 2B

các đơn vị biểu hiện trên cùng một vật truyền (một lần chuyển nhiệm)

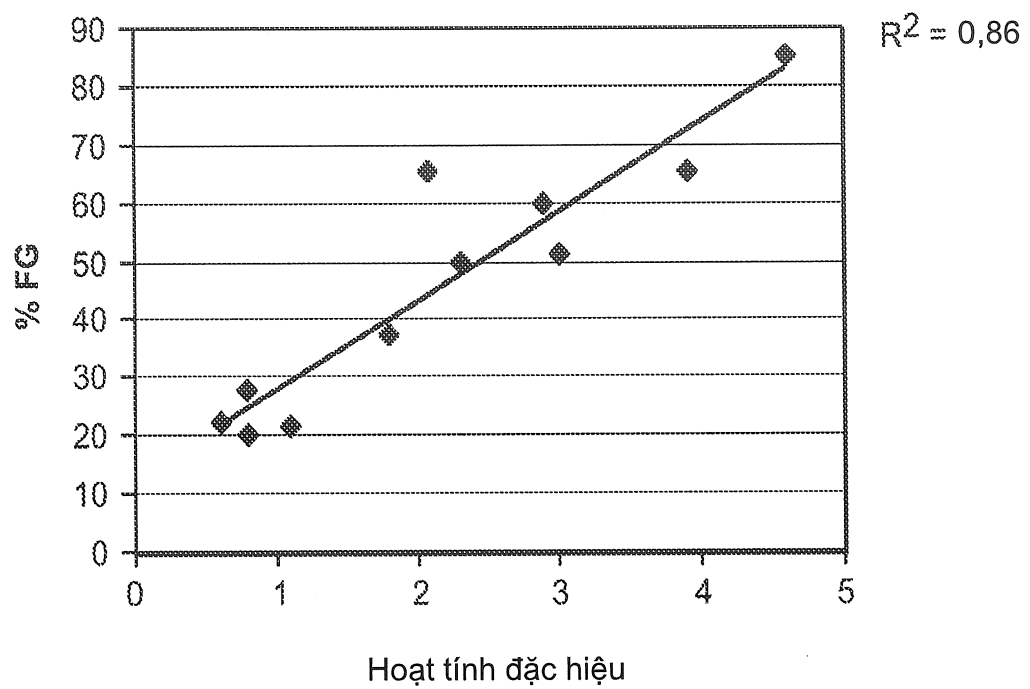
1) xistron riêng biệt



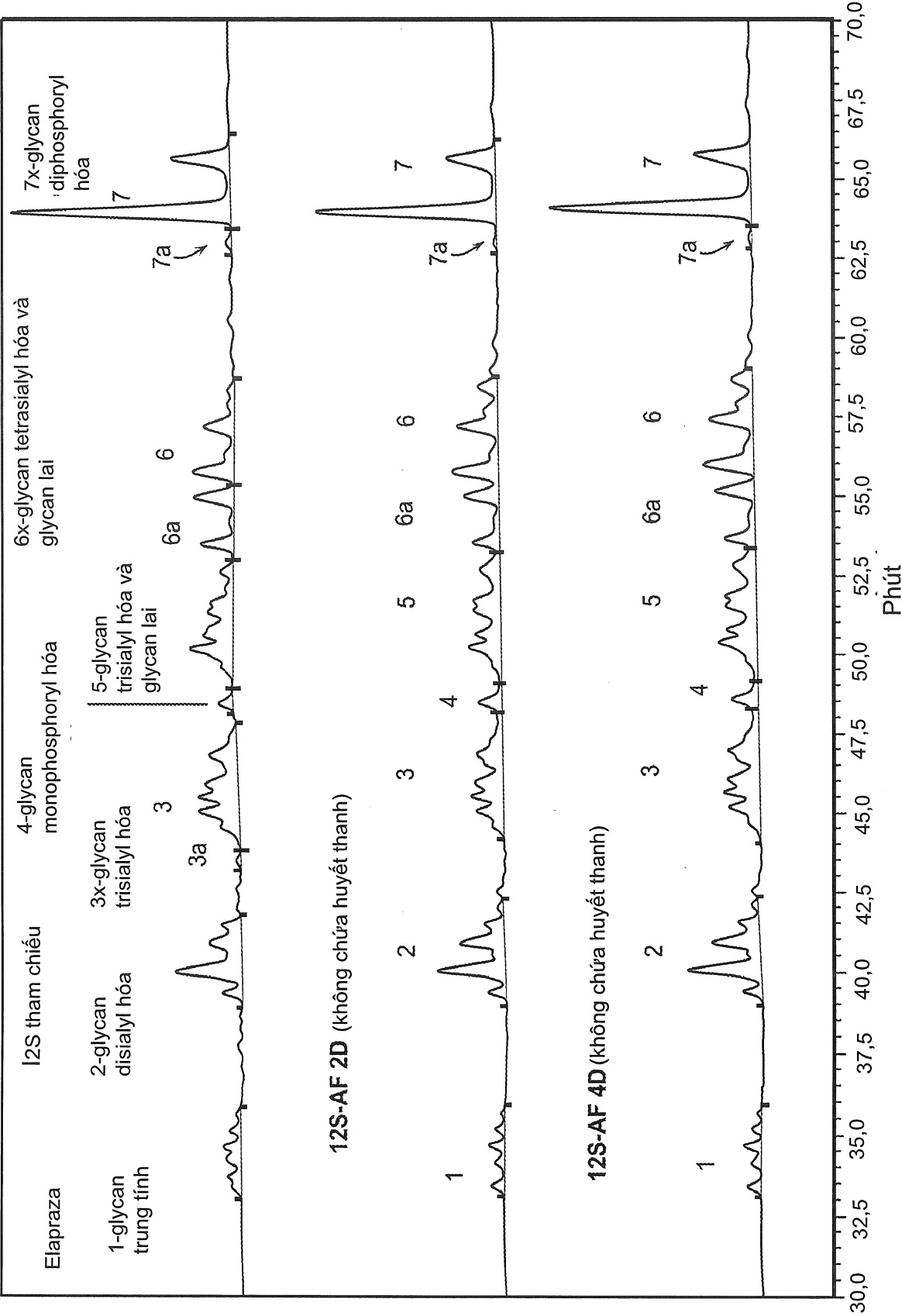
2) xistron liên kết phiên mã



Mối tương quan giữa hoạt tính đặc hiệu và tỷ lệ chuyển hóa Formlyglyxin
Hoạt tính đặc hiệu của I2S đối với % Formlyglyxin



HÌNH 3



HÌNH 4