



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

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

(11)



1-0053943

(51)^{2022.01} C12N 15/63

(13) B

(21) 1-2023-02800

(22) 08/10/2021

(86) PCT/EP2021/077820 08/10/2021

(87) WO 2022/074182 14/04/2022

(30) 20201096.3 09/10/2020 EP

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/07/2023 424A

(73) 1. STADA ARZNEIMITTEL AG (DE)

Stadastraße 2-18, 61118 Bad Vilbel, Germany

2. XBRANE BIOPHARMA AB (SE)

Retzius väg 8, 171 65 Solna, Sweden

(72) VIKSTRÖM, David (SE); ISMAIL, Nurzian (SG); SAMUELSON, Patrik (SE);

MIRZADEH, Kiavash (SE); GUDISE, Santhosh (IN); KADOW, Maria (DE);

SZEKÉR, Kathleen (DE); SALIH, Tagrid (SD); BARASZKIEWICZ, Mariusz (PL);

BASHIRI, Siavash (SE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CẤU TRÚC ADN BIỂU HIỆN RANIBIZUMAB, VECTƠ BIỂU HIỆN VÀ TẾ
BÀO CHỦ VI KHUẨN CHỨA CẤU TRÚC ADN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN
XUẤT RANIBIZUMAB

(21) 1-2023-02800

(57) Sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN thích hợp để biểu hiện protein tái tổ hợp *ranibizumab* ở tế bào chủ vi khuẩn trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa: trình tự khởi đầu *rhaBAD*, yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR, yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS, dấu chuẩn kháng kháng sinh, trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với axit nucleic mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh, yếu tố kết thúc *rrnB* T1, yếu tố kết thúc *rrnB* T2 và điểm khởi đầu sao chép *pMB1*. Cấu trúc ADN này cũng có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu *rhaBAD*. Sáng chế cũng đề cập đến vector và tế bào chủ vi khuẩn chứa cấu trúc ADN này cũng như phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp bằng cách cho tế bào chủ vi khuẩn tiếp xúc với rhamnoza và nhờ đó cảm ứng sự biểu hiện của protein tái tổ hợp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN thích hợp để biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào chủ vi khuẩn trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa: trình tự khởi đầu *rhaBAD*, yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR, yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS, dấu chuẩn kháng kháng sinh, ít nhất một yếu tố kết thúc, và điểm khởi đầu sao chép. Cấu trúc ADN cũng có thể bao gồm trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với axit nucleic mã hóa cho dấu chuẩn kháng kháng sinh, và trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp này được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu *rhaBAD*. Ít nhất một yếu tố kết thúc có thể là yếu tố kết thúc *rrnB* T1 và yếu tố kết thúc *rrnB* T2. Protein tái tổ hợp có thể là ranibizumab. Sáng chế cũng đề cập đến vectơ và tế bào chủ vi khuẩn chứa cấu trúc ADN này cũng như phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp bằng cách cho tế bào chủ vi khuẩn tiếp xúc với rhamnoza và nhờ đó cảm ứng sự biểu hiện của protein tái tổ hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quá trình chuyển hóa của rhamnoza liên quan đến việc L-rhamnoza được đưa vào tế bào thông qua RhaT permeaza và sau đó được đồng phân hóa thành L-rhamnuloza bởi L-rhamnoza isomerase (RhaA), và L-rhamnuloza sau đó được phosphoryl hóa thêm bởi rhamnulokinaza (RhaB) và cuối cùng được thủy phân bởi rhamnuloza-1-phosphat aldolaza (RhaD) để tạo ra dihydroxyaxetonphosphat và L-lactaldehyt [1]. Gen *rhaA*, *rhaB* và *rhaD* tạo thành một operon gọi là *rhaBAD* và được phiên mã với sự trợ giúp của *tự khởi đầu rhaBAD* [1]. So với các hệ thống khác, con đường chuyển hóa rhamnoza được phân biệt bởi thực tế là cần có hai chất hoạt hóa phiên mã được gọi là RhaS và RhaR để điều hòa như được giải thích dưới đây [1].

Operon *rhaBAD* là operon dị hóa được điều hòa tích cực mà phiên mã các gen *rhaB*, *rhaA* và *rhaD* nêu trên một cách khác biệt với operon *rhaSR* với khoảng 240 cặp bazơ của ADN tách các vị trí khởi đầu phiên mã của chúng [1]. Operon *rhaSR* mã hóa RhaS và RhaR trong đó mỗi monome của protein RhaS và RhaR dime chứa hai motif xoắn ốc và tiếp xúc với hai rãnh chính của ADN. RhaR điều hòa quá trình phiên mã của *rhaSR* bằng cách liên kết ADN trình khởi đầu của kéo dài từ bazơ -32 đến -82 so với vị trí bắt đầu phiên mã

rhaSR [1]. Sau khi biểu hiện *rhaSR*, RhaS liên kết ADN phía trước operon *rhaBAD* ở các bazơ -32 đến -81 so với vị trí bắt đầu phiên mã để tăng biểu hiện *rhaBAD* [1]. Hơn nữa, vùng liên gen *rhaSR-rhaBAD* chứa các vị trí liên kết CRP ở các vị trí -92,5 (CRP 1) so với vị trí bắt đầu phiên mã của operon *rhaBAD* và các vị trí liên kết CRP ở các vị trí -92,5 (CRP 2), -115,5 (CRP 3) và -116,5 (CRP 4) so với vị trí bắt đầu phiên mã của operon *rhaSR* [1]. Protein thụ thể AMP vòng (CRP) điều hòa sự biểu hiện của hơn 100 trình tự khởi đầu ở *Escherichia coli*.

Cấu trúc ADN bao gồm trình tự ADN mã hóa RhaS, RhaR và trình tự khởi đầu *rhaBAD* đã biết trong lĩnh vực. US8138324 bộc lộ plasmit có nguồn gốc pTACO và pLEMO (tức là cấu trúc ADN) chứa trình tự ADN mã hóa RhaS, RhaR và trình tự khởi đầu *rhaBAD*. Tuy nhiên, US8138324 không đề cập đến việc sử dụng tế bào chủ có sự chuyển hóa rhamnoza bị vô hiệu.

Cấu trúc ADN dựa trên plasmit có nguồn gốc Rha chứa trình tự ADN mã hóa RhaS, RhaR và trình tự khởi đầu *rhaBAD* cũng được biết trong lĩnh vực, ví dụ từ Giacalone *et al.* [5] hoặc Hjelm *et al.* [2]. Giacalone *et al.* mô tả ví dụ plasmit pRha67A và pRha109A trong khi đó Hjelm *et al.* mô tả plasmit pRha67K.

Mặc dù cấu trúc ADN bao gồm trình tự ADN mã hóa RhaS, RhaR và trình tự khởi đầu *rhaBAD* được biết trong lĩnh vực nhưng vẫn còn nhiều thách thức, đặc biệt là trong quá trình sản xuất protein tái tổ hợp ở quy mô công nghiệp, cụ thể là các kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh của chúng. Các thách thức chủ yếu là:

- (i) tế bào chủ chịu áp lực dẫn đến tổn thương các đại phân tử của tế bào như màng, protein và axit nucleic;
- (ii) tế bào chủ tăng trưởng kém;
- (iii) protein tái tổ hợp được sản xuất kém hoạt tính; và/hoặc
- (iv) thu được protein tái tổ hợp với hiệu suất thấp.

Do đó, vẫn có nhu cầu về cấu trúc ADN cải tiến cũng như tế bào chủ và phương pháp thích hợp để sản xuất hiệu quả protein tái tổ hợp, chẳng hạn kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của chúng ở hiệu suất cao, cụ thể là khi protein tái tổ hợp này được dành cho các ứng dụng điều trị.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế

Vì thế, mục đích của sáng chế là đề xuất cấu trúc ADN cải tiến, cũng như tế bào chủ vi khuẩn và phương pháp thích hợp để sản xuất hiệu quả protein tái tổ hợp, chẳng hạn kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của chúng ở tế bào chủ vi khuẩn với hiệu suất cao, đặc biệt khi protein tái tổ hợp này được dành cho các ứng dụng điều trị. Protein tái tổ hợp có thể là ranibizumab.

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN để biểu hiện ranibizumab trong tế bào chủ vi khuẩn, trong đó ranibizumab bao gồm (i) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID 3, (ii) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID 4, trong đó cấu trúc ADN này chứa trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab, trong đó cấu trúc ADN này còn bao gồm ít nhất một trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã với trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab và/hoặc chuỗi nặng của ranibizumab, trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS,
- dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- ít nhất một yếu tố kết thúc, và
- điểm khởi đầu sao chép pMB1.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN này còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố kết thúc *rrnB* T1 và yếu tố kết thúc *rrnB* T2.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN được đặc trưng bởi:

- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin, tốt hơn là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID 12 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh là trình tự khởi đầu *AmpR*, tốt hơn là trình tự khởi đầu *AmpR*

bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;

- yếu tố kết thúc rrnB T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- yếu tố kết thúc rrnB T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; và/hoặc
- điểm khởi đầu sao chép pMB1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN được đặc trưng bởi:

- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12;
- trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh là trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13;
- yếu tố kết thúc rrnB T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14;
- yếu tố kết thúc rrnB T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15; và/hoặc
- điểm khởi đầu sao chép pMB1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN được đặc trưng bởi:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 8 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 9 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 11 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;

- yếu tố kết thúc *rrnB* T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- yếu tố kết thúc *rrnB* T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; và
- điểm khởi đầu sao chép *pMB1* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN được đặc trưng bởi:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 8;
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaR* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 9;
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaS* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 11;
- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12;
- trình tự khởi đầu *AmpR* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13;
- yếu tố kết thúc *rrnB* T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14;
- yếu tố kết thúc *rrnB* T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15; và
- điểm khởi đầu sao chép *pMB1* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN bao gồm vị trí đa tách dòng bao gồm 17 vị trí giới hạn được phân cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI*, *NdeI*, *NotI*, *XhoI*, *PspXI*, *PaeR71*, *BbsI*, *StyI*, *AvrII*, *BanI*, *Acc65I*, *KpnI*, *Eco53kI*, *SacI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *AccI*, *PstI*, *SbfI*, *SphI* và *HindIII*.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 1, hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 1.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu *rhaBAD*.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab bao gồm (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %. Theo một phương án ưu tiên khác, trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab này bao gồm (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm

trình tự SEQ ID 5, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6.

Theo một phương án, trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã với một trong hai hoặc cả hai trình tự nucleotit SEQ ID 5 và SEQ ID 6.

Theo một phương án, peptit tín hiệu là PelB (pectat lyaza B). Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; tốt hơn nữa là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7.

Theo một phương án, peptit tín hiệu PelB thu được bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID 18 [6]: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA.

Theo một phương án ưu tiên, cấu trúc ADN bao gồm trình tự SEQ ID 17 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là bao gồm trình tự SEQ ID 17.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc ADN theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế đề cập đến tế bào chủ vi khuẩn chứa cấu trúc ADN theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế hoặc vector biểu hiện theo theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, trong đó tế bào chủ vi khuẩn tốt hơn là tế bào *Escherichia coli*, tốt hơn nữa là tế bào *E. coli* K-12.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này bao gồm (i) nhiễm sắc thể gồm có đột biến trong trình tự axit nucleic của gen *rhaB* mà làm cho RhaB bất hoạt, hoặc (ii) nhiễm sắc thể trong đó trình tự nucleotit mã hóa RhaB bị khuyết.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này là tế bào *Escherichia coli* W3110, tốt hơn là chứa nhiễm sắc thể mà bao gồm đột biến dịch khung trong trình tự nucleotit mã hóa RhaB.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này là tế bào *Escherichia coli* W3110 chứa nhiễm sắc thể mà bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 2 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 2, trong đó tùy ý nhiễm sắc thể của tế bào chủ vi khuẩn còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa RhaT.

Khía cạnh thứ tư của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất ranibizumab bao gồm bước cho tế bào chủ vi khuẩn theo khía cạnh thứ ba của sáng chế lộ ra với rhamnoza,

nhờ đó cảm ứng sự biểu hiện của ranibizumab. Theo một phương án ưu tiên, phương pháp còn bao gồm bước thu hồi ranibizumab từ tế bào chủ vi khuẩn; và tùy ý còn bao gồm một hoặc nhiều bước tinh chế ranibizumab được thu hồi, tốt hơn là bằng một hoặc nhiều bước sắc ký.

Khía cạnh thứ năm của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất ranibizumab, bao gồm các bước:

tách dòng trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp vào cấu trúc ADN mà bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 1 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 1, sao cho trình tự nucleotit mã hóa protein ranibizumab được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu *rhaBAD*; và

đưa trình tự nucleotit thu được vào tế bào chủ vi khuẩn chứa nhiễm sắc thể mà bao gồm đột biến hoặc cải biến mà vô hiệu quá trình chuyển hóa rhamnoza.

Theo một phương án ưu tiên, phương pháp này còn bao gồm bước cho tế bào chủ vi khuẩn tiếp xúc với rhamnoza, nhờ đó cảm ứng sự biểu hiện của protein tái tổ hợp.

Theo một phương án khác, phương pháp còn bao gồm bước thu hồi ranibizumab từ tế bào chủ vi khuẩn; và tùy ý còn bao gồm một hoặc nhiều bước tinh chế ranibizumab thu hồi, tốt hơn là bằng một hoặc nhiều bước sắc ký.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này là tế bào *Escherichia coli*, tốt hơn nữa là tế bào *E. coli* K-12, tốt nhất là tế bào *E. coli* W3110.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này chứa (i) nhiễm sắc thể chứa đột biến trình tự nucleotit của gen *rhaB* tạo ra RhaB bất hoạt, hoặc (ii) nhiễm sắc thể trong đó trình tự nucleotit mã hóa RhaB bị khuyết.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này là tế bào *E. coli* W3110 chứa nhiễm sắc thể bao gồm đột biến dịch khung trình tự nucleotit mã hóa RhaB.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn này là tế bào *E. coli* W3110 bao gồm nhiễm sắc thể mà bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 2 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 2, trong đó tùy ý nhiễm sắc thể của tế bào chủ vi khuẩn còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa RhaT.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab chứa (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi

nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; tốt hơn là trình tự nucleotit này mã hóa protein tái tổ hợp chứa (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit comprising SEQ ID 5 và/hoặc SEQ ID 6 còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã với trình tự nucleotit SEQ ID 5 và/hoặc SEQ ID 6.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB, tốt hơn là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; tốt hơn là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7 và được dung hợp với trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của ranibizumab.

Theo một phương án ưu tiên, trình tự nucleotit thu được được đưa vào tế bào chủ vi khuẩn bao gồm trình tự SEQ ID 17 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là bao gồm trình tự SEQ ID 17.

Khía cạnh thứ sáu của sáng chế đề cập đến tế bào chủ vi khuẩn là tế bào *E. coli* W3110 và chứa nhiễm sắc thể gồm có đột biến dịch khung trình tự nucleotit mã hóa RhaB. Theo một phương án, tế bào chủ *E. coli* W3110 này bao gồm nhiễm sắc thể chứa trình tự nucleotit SEQ ID 2 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 2. Theo một phương án khác, nhiễm sắc thể của tế bào chủ vi khuẩn chứa trình tự nucleotit mã hóa RhaT.

Một hoặc nhiều các SEQ ID 1-18 được chỉ ra ở trên của các khía cạnh khác nhau của sáng chế (và các phương án của nó) có thể được thay thế bằng trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %. Thuật ngữ "độ đồng nhất trình tự" khi được sử dụng ở đây liên quan đến trình tự axit amin hoặc nucleotit và độ đồng nhất trình tự là trên toàn bộ chiều dài của trình tự cụ thể. Do đó, một trình tự có thể đồng nhất về trình tự ít nhất là 90 %, ít nhất là 92 %, ít nhất là 95 %, ít nhất là 96 %, ít nhất là 97 %, ít nhất là 98 % hoặc ít nhất là 99 %, với trình tự axit amin hoặc nucleotit xác định. Các trình tự của sáng chế vì thế bao gồm các biến đổi một hoặc nhiều nucleotit hoặc axit amin (thêm, thay thế, gán chèn hoặc bớt) so với các trình tự theo sáng chế. Ở mức axit amin, các trình tự được ưu tiên với độ

đồng nhất trình tự đã xác định ở trên chứa tới 5, ví dụ chỉ 1, 2, 3, 4 hoặc 5, tốt hơn là 1, 2 hoặc 3, tốt hơn nữa là 1 hoặc 2, axit amin thay đổi trong trình tự theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 - Bản đồ plasmit đối với KTXHIS

Fig. 2 - Trình tự nucleotit của vị trí đa tách dòng (MCS) của KTXHIS

Fig.3 - Bản đồ plasmit của KTXHIS-PelbLC-PelbHC

Fig. 4a-4d - Thử nghiệm thấm tách Western sử dụng kháng thể kháng FAB - So sánh độ chuẩn trong các thử nghiệm quy mô nhỏ.

Fig. 5 - Tinh chế mẻ quy mô nhỏ từ mẫu ly giải đồng nhất hóa được làm sạch từ nguyên liệu thu hoạch bằng thử nghiệm thấm tách Western nhựa Capto L sử dụng kháng thể kháng FAB. Tải gel: 3 µg sản phẩm được đưa lên ngoại trừ XB17/67A (chỉ 0,2 µg sản phẩm được đưa lên cho năng suất thấp). Dấu chuẩn từ 18,4-116 kDa.

Fig. 6 - Tóm tắt dữ liệu của hiệu giá HPLC ái lực

Fig. 7a-7c - Thử nghiệm thấm tách Western sử dụng kháng thể kháng FAB - Đối chứng so sánh sự biểu hiện trong thí nghiệm quy mô nhỏ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến việc điều hòa việc sản xuất protein tái tổ hợp trên cơ sở trình tự khởi đầu *rhaBAD* L-rhamnoza.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp, tốt hơn là ranibizumab, bao gồm các bước:

- a. tách dòng trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp, tốt hơn là ranibizumab, vào cấu trúc ADN sao cho trình tự nucleotit được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu *rhaBAD*, và
- b. đưa trình tự nucleotit thu được vào tế bào chủ vi khuẩn chứa nhiễm sắc thể mà bao gồm đột biến hoặc cải biến mà vô hiệu quá trình chuyển hóa rhamnoza.

Cấu trúc ADN được bộc lộ ở trong phương pháp nêu trên có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự khởi đầu *rhaBAD*. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit của trình tự khởi đầu *rhaBAD* bao gồm trình tự SEQ ID 8 (và trong đó trình tự này được gọi là “*rhaBAD*” trên các fig. 1 và 3):

CACCACAATTCAGCAAATTGTGAACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGC
CAATGGCCCATTTTCTTGTCTAGTAACGAGAAGGTCGCGAATCCAGGCGCTTTT
TAGACTGGTCGTA.

Cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit của yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR bao gồm trình tự SEQ ID 9 (và trong đó trình tự này được gọi là “rhaR” trên các Fig. 1 và 3):

ATGGCTTTCTGCAATAACGCGAATCTTCTCAACGTATTTGTACGCCATATTGC
GAATAATCAACTTCGTTCTCTGGCCGAGGTAGCCACGGTGGCGCATCAGTTA
AACTTCTCAAAGATGATTTTTTTTGCCAGCGACCAGCAGGCAGTCGCTGTGG
CTGACCGTTATCCGCAAGATGTCTTTGCTGAACATACACATGATTTTTGTGAG
CTGGTGATTGTCTGGCGCGGTAATGGCCTGCATGTACTCAACGATCGCCCTTA
TCGCATTACCCGTGGCGATCTCTTTTACATTCATGCTGATGATAAACTCCT
ACGCTTCCGTAAACGATCTGGTTTTGCAGAATATTATTTATTGCCCGGAGCGT
CTGAAGCTGAATCTTGACTGGCAGGGGGCGATTCCGGGATTTAACGCCAGCG
CAGGGCAACCACACTGGCGCTTAGGTAGCATGGGGATGGCGCAGGCGCGGC
AGGTTATTGGTCAGCTTGAGCATGAAAGTAGTCAGCATGTGCCGTTTGCTAA
CGAAATGGCTGAGTTGCTGTTTCGGGCAGTTGGTGATGTTGCTGAATCGCCATC
GTTACACCAGTGATTTCGTTGCCGCCAACATCCAGCGAAACGTTGCTGGATAA
GCTGATTACCCGGCTGGCGGCTAGCCTGAAAAGTCCCTTTGCGCTGGATAAA
TTTTGTGATGAGGCATCGTGCAGTGAGCGCGTTTTGCGTCAGCAATTTGCGCA
GCAGACTGGAATGACCATCAATCAATATCTGCGACAGGTCAGAGTGTGTCAT
GCGCAATATCTTCTCCAGCATAGCCGCCTGTTAATCAGTGATATTTGACCGA
ATGTGGCTTTGAAGATAGTAATAATTTTTTCGGTGGTGTTTACCCGGGAAACCG
GGATGACGCCAGCCAGTGGCGTCATCTCAATTCGCAGAAAGAT.

Cấu trúc ADN có thể còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa phần mở rộng của yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR nằm trong khung với RhaR do thiếu codon kết thúc. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit của phần mở rộng của yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR bao gồm trình tự SEQ ID 10 (và trong đó trình tự này được gọi là “rhaR được mở rộng” trên các Fig. 1 và 3):

AGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAG.

Cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit của yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS bao gồm trình tự SEQ ID 11 (và trong đó trình tự này được gọi là “rhaS” trên các Fig. 1 và 3):

ATGACCGTATTACATAGTGTGGATTTTTTTCCGTCTGGTAACGCGTCCGTGGC
GATAGAACCCCGGCTCCCGCAGGCGGATTTTCCTGAACATCATCATGATTTTC
ATGAAATTGTGATTGTCTGAACATGGCACGGGTATTCATGTGTTTAATGGGCA
GCCCTATACCATCACCGGTGGCACGGTCTGTTTCGTACGCGATCATGATCGGC
ATCTGTATGAACATACCGATAATCTGTGTCTGACCAATGTGCTGTATCGCTCG
CCGGATCGATTTTCAGTTTCTCGCCGGGCTGAATCAGTTGCTGCCACAAGAGCT
GGATGGGCAGTATCCGTCTCACTGGCGCGTTAACCACAGCGTATTGCAGCAG
GTGCGACAGCTGGTTGCACAGATGGAACAGCAGGAAGGGGAAAATGATTTA
CCCTCGACCGCCAGTCGCGAGATCTTGTTTATGCAATTACTGCTCTTGCTGCG
TAAAAGCAGTTTGCAGGAGAACCTGGAAAACAGCGCATCACGTCTCAACTTG
CTTCTGGCCTGGCTGGAGGACCATTTTGCCGATGAGGTGAATTGGGATGCCG
TGGCGGATCAATTTTCTCTTTCACTGCGTACGCTACATCGGCAGCTTAAGCAG
CAAACGGGACTGACGCCTCAGCGATACCTGAACCGCCTGCGACTGATGAAAG
CCCGACATCTGCTACGCCACAGCGAGGCCAGCGTTACTGACATCGCCTATCG
CTGTGGATTTCAGCGACAGTAACCACTTTTCGACGCTTTTTCGCCGAGAGTTTA
ACTGGTCACCGCGTGATATTCGCCAGGGACGGGATGGCTTTCTGCAATAA.

Cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa "dấu chuẩn kháng kháng sinh" hoặc “dấu chuẩn chọn lọc”. Dấu chuẩn này là mảnh ADN chứa gen mã sản phẩm của nó tạo ra tính kháng kháng sinh (ví dụ chloramphenicol, ampicillin, gentamycin, streptomycin, tetracyclin, kanamycin, neomycin) hoặc khả năng phát triển trên môi trường chọn lọc (ví dụ, ura (uraxil)), leu (leuxin), trp (tryptophan), his (histidin)). Thông thường, plasmid chứa dấu chuẩn kháng kháng sinh để buộc tế bào vi khuẩn duy trì plasmid. Theo một phương án của sáng chế, cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit của dấu chuẩn kháng kanamycin. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự nucleotit để tạo ra tính kháng kanamycin bao gồm trình tự SEQ ID 12 (và trong đó trình tự này được gọi là “KanR” trên các Fig. 1 và 3):

ATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCA
ACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCA

ATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTG
 TTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGG
 TCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTT
 ATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAA
 CAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGA
 TGCGCTGGCAGTGTTCCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGTC
 CTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAAT
 AACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTG
 TTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTC
 AGTCGTCATCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGA
 AATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCA
 GGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGA
 AACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAG
 TTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA.

Cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh. Trình tự khởi đầu như vậy có thể làm tăng sự biểu hiện của các dấu chuẩn kháng kháng sinh được thảo luận trong đoạn trên đây. Theo một phương án của sáng chế, trình tự khởi đầu đối với kháng ampicillin là trình tự khởi đầu AmpR không chỉ có khả năng thúc đẩy sự biểu hiện của dấu chuẩn kháng ampicillin mà còn có khả năng thúc đẩy sự biểu hiện của các dấu chuẩn kháng kanamycin. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự axit nucleic của trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự SEQ ID 13 (và trong đó trình tự này để chỉ “trình tự khởi đầu AmpR” trên các Fig. 1 và 3):

CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC
 ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT

Cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho ít nhất một yếu tố kết thúc. Cấu trúc ADN có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa cho cả hai yếu tố kết thúc rrnB T1 và yếu tố kết thúc rrnB T2. Yếu tố kết thúc rrnB T1 và T2 đều là yếu tố kết thúc phiên mã hữu hiệu ở dạng phân lập, tuy nhiên, khi được sử dụng cùng nhau, các yếu tố kết thúc rrnB T1 và T2 có thể có thể kết thúc phiên mã hiệu quả hơn.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự nucleotit của yếu tố kết thúc *rrnB* T1 bao gồm trình tự SEQ ID 14:

CAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTT
GTTTGTCTGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAT

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự nucleotit của yếu tố kết thúc *rrnB* T2 bao gồm trình tự SEQ ID 15:

AGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT

Cấu trúc ADN có thể còn bao gồm điểm khởi đầu sao chép mà là trình tự nucleotit cụ thể mà tại đó việc sao chép ADN được bắt đầu. Sự sao chép DNA có thể tiến hành từ thời điểm này theo hai hướng hoặc một hướng. Một số điểm khởi đầu sao chép thường được sử dụng là *ColE1*, *pMB1*, *pSC101*, *R6K*, *pBR322*, *R6K*, *p15A* và *pUC*. Theo một phương án của sáng chế, điểm khởi đầu sao chép là *pMB1* hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự axit nucleic của *pMB1* bao gồm trình tự SEQ ID 16:

TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGT
CAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTG
TCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG
GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA
TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCC
TAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAA

Theo một phương án khác của sáng chế, cấu trúc ADN là plasmit biểu hiện mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa một hoặc nhiều:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaR*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaS*,

- dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- ít nhất một yếu tố kết thúc, và
- điểm khởi đầu sao chép,

trong đó cấu trúc ADN tùy ý bao gồm vị trí đa tách dòng chứa 17 vị trí giới hạn được phân cắt bằng enzym giới hạn EcoRI, NdeI, NotI, XhoI, PspXI, PaeR71, BbsI, StyI, AvrII, BanI, Acc65I, KpnI, Eco53kI, SacI, BamHI, XbaI, SalI, AccI, PstI, SbfI, SphI và HindIII. Tùy ý, cấu trúc ADN này còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh và/hoặc trình tự nucleotit mã hóa yếu tố kết thúc *rrnB* T1 và yếu tố kết thúc *rrnB* T2.

Theo một phương án của sáng chế, plasmit biểu hiện được mô tả ở trên bao gồm trình tự nucleotit mã hóa:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaR*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaS*,
- dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- ít nhất một yếu tố kết thúc, và
- điểm khởi đầu sao chép.

Tùy ý, cấu trúc ADN này còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh và/hoặc trình tự nucleotit mã hóa yếu tố kết thúc *rrnB* T1 và yếu tố kết thúc *rrnB* T2.

Theo một phương án của sáng chế, plasmit biểu hiện được mô tả ở trên bao gồm trình tự nucleotit mã hóa:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaR*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaS*,
- dấu chuẩn kháng kanamycin,
- trình tự khởi đầu *AmpR*,
- ít nhất một yếu tố kết thúc, và
- điểm khởi đầu sao chép *pMB1*.

Tùy ý, trình tự nucleotit mã hóa trình tự khởi đầu AmpR được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kanamycin và/hoặc cấu trúc ADN còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố kết thúc *rrnB* T1 và yếu tố kết thúc *rrnB* T2.

Theo một phương án của sáng chế, plasmit biểu hiện được mô tả ở trên bao gồm trình tự nucleotit mã hóa:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 8,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 9,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 11,
- dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12,
- trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13,
- yếu tố kết thúc *rrnB* T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14,
- yếu tố kết thúc *rrnB* T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15, và
- điểm khởi đầu sao chép *pMB1* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16.

Theo một phương án của sáng chế, cấu trúc ADN là plasmit mà chứa trình tự nucleotit SEQ ID 1 và trong đó cấu trúc ADN này cũng để chỉ KTXHIS trong sáng chế.

Trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp mà được tách dòng vào cấu trúc ADN được mô tả ở trên có thể bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của nó, tốt hơn là ranibizumab hoặc mảnh của nó. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, axit nucleic mã hóa ranibizumab bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab. Ranibizumab là mảnh kháng thể đơn dòng (Fab) là chất chống tạo mạch mà được phê chuẩn để điều trị thoái hóa điểm vàng do tuổi tác thể "ướt", một dạng mất thị lực phổ biến do tuổi tác.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6:

```
GAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCC
TGCCTCTGAGCTGTGCAGCAAGCGGTTATGATTTTACCCATTATGGTATGAAT
TGGGTTCGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGGTGGATTAAATA
CCTATACCGGTGAACCGACCTATGCAGCAGATTTTAAACGTCGTTTTACCTTT
AGCCTGGATACCAGCAAAAGCACCGCATATCTGCAGATGAATAGCCTGCGTG
CAGAGGATACCGCAGTGTATTATTGTGCAAAATATCCGTATTATTACGGCAC
CAGCCATTGGTATTTTCGATGTTTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGCA
```

GCGCAAGCACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCACCGAGCAGCAAAAG
TACCAGCGGTGGCACCGCAGCACTGGGTTGTCTGGTTAAAGATTATTTTCCGG
AACCGGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGGTGTTTCATAC
CTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGAGCAGCGTTGTTA
CCGTTCCGAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGTAATGTTAATCAT
AAACCGAGCAATACCAAAGTGGATAAAAAAGTGGAAACCGAAAAGCTGCGAT
AAAACCCATCTGTAA.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5:

GATATTCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCAAGCGTTGGTGATC
GTGTTACCATTACCTGTAGCGCAAGCCAGGATATTAGCAATTATCTGAATTGG
TATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCACCGAAAGTGCTGATCTATTTTACCAGCA
GCCTGCATAGCGGTGTTCCGAGCCGTTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGA
TTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCAACCTATTATT
GTCAGCAGTATAGCACCGTTCCGTGGACCTTTGGTCAGGGCACCAAAGTTGA
AATTAAACGTACCGTTGCAGCACCGAGCGTTTTTATCTTTCCGCCTAGTGATG
AACAGCTGAAAAGCGGCACCGCAAGCGTTGTTTGTCTGCTGAATAACTTTTA
TCCGCGTGAAGCAAAAGTTCAGTGGAAAGTTGATAATGCACTGCAGAGCGGT
AATAGCCAAGAAAGCGTTACCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGC
CTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGATTATGAAAAACACAAAGTGT
ATGCCTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAGCAGTCCGGTTACCAAAGTTT
TAATCGTGGTGAATGCTAA.

Theo một phương án khác của sáng chế, axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu được liên kết hoạt động với một hoặc cả hai trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab. Trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu có thể là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB. Theo một phương án cụ thể của sáng chế, trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7:

ATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAGCAC
AGCCTGCAATGGCA.

Trình tự nucleotit thu được (tức là sản phẩm của việc tách dòng trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp, tốt hơn là ranibizumab, vào cấu trúc ADN) tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 17 còn được gọi là KTXHIS-PelbLC-PelbHC trong sáng chế.

Tế bào chủ vi khuẩn được sử dụng để sản xuất protein tái tổ hợp chứa nhiễm sắc thể có đột biến hoặc cải biến bất hoạt quá trình chuyển hóa rhamnoza. Tế bào chủ vi khuẩn có thể tế bào *E. coli*. Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ vi khuẩn là tế bào *E. coli* K-12, tốt hơn nữa là tế bào chủ vi khuẩn là tế bào *E. coli* W3110. Quá trình chuyển hóa rhamnoza bị vô hiệu đạt được nhờ đột biến trình tự nucleotit mã hóa RhaB làm cho RhaB bất hoạt. Theo cách khác, quá trình chuyển hóa rhamnoza bị vô hiệu đạt được bằng cách sử dụng tế bào chủ vi khuẩn có nhiễm sắc thể trong đó trình tự nucleotit mã hóa RhaB bị khuyết; việc này có ví dụ thể đạt được bằng cách làm khuyết trình tự nucleotit mã hóa RhaB. Tốt hơn là, nhiễm sắc thể của tế bào chủ vi khuẩn bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa RhaT, tức là gen RhaT là nguyên vẹn.

Theo một phương án của sáng chế, quá trình chuyển hóa rhamnoza bị vô hiệu đạt được bằng đột biến dịch khung trình tự nucleotit mã hóa RhaB. Đột biến như vậy dẫn đến tế bào chủ vi khuẩn có nhiễm sắc thể bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID 2:

GTTGGCCCCGCTCCACGCCAGTAGCGACTCGTCCCAGTCGTCGCTATTGATAT
 TGACCAGTTGCGTGGTCGTGGCGTTGGTATATTCCCAGTTCATCTTGCCGGTC
 AGGCGATAACTGAAGTAATCCGGCATCAGCAGAGCGTGAGCAATGTGTGGA
 ATAAGTTCAGGTTGTTGCTCCGTCAGCGCACGCAACTGATAAAGCGTATTGA
 AGGGCAGAACTGGATGCCGCTACGTTGATAAATATCGCGTTTGCCGAGTTG
 TTGTTGTGCCTGCGCCATTAGGCCATTGGTGCGGCTATCGCGATAAGCAACG
 GGCAGGCCCACACGCTGACCCTGTTGGTCGAGCAGCACAAAGTCCACGCCCC
 AGGTATCAATCCCAATGCTATCGCGATACGAATCCCTTCCTCGCACACCTTGT
 TTAATCCAAGGCGAATGGCACTTTCCAGGCTATCCACATCCCAGGTGACATA
 GCCGTTCTGACTATGCAGCCCATTGTTAAAACGATGGATTTCGCGCAGCGTCA
 GGCTGCGGCATTACGCTCGTAACGCGCCAGCATCACGCGCCCACTGGATGC
 GCCGAGATCGACGGCGACACAATTGCGAAAGGTCATAATGTGATCCTGCTGA
 ATTCATTACGACCAGTCTAAAAAGCGCCTGAATTCGCGACCTTCTCGTTACT
 GACAGGAAAATGGGCCATTGGCAACCAGGGAAAGATGAACGTGATGATGTT
 CACAATTTGCTGAATTGTGGTGATGTGATGCTCACC.

Tế bào chủ vi khuẩn có nhiễm sắc thể mà bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 2 trong sáng chế để chỉ XdevK.

Theo một phương án của sáng chế phương pháp phát triển tế bào chủ XdevK bao gồm các bước sau đây:

- a) tạo cấu trúc plasmit pRhaBFS, và
- b) tạo cấu trúc đột biến dịch khung RhaB.

Để tạo cấu trúc plasmit pRhaBFS hai đoạn môi để khuếch đại PCR các phần của operon *rhaBAD* từ nhiễm sắc thể của chủng *E. coli* BL21 (tên của các đoạn môi trong ngoặc đơn) tốt hơn là:

- (SBamHI1680 – SEQ ID 19) 5' GTACGCTAGGATCCTGTGGCAGCAACTGATTC 3'

- (BSalI1681 – SEQ ID 20) 5' GTAGATAGGTCGACAGCGATCGTCATTGGGAT 3'

Sáng chế bao gồm các phương án sau đây:

1. Cấu trúc ADN thích hợp để biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào chủ vi khuẩn, trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự nucleotit mã hóa:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD*,
- RhaR transcription activator,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS,
- dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- yếu tố kết thúc *rrnB* T1,
- yếu tố kết thúc *rrnB* T2, và
- điểm khởi đầu sao chép *pMB1*.

2. Cấu trúc ADN theo phương án 1, trong đó

- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin, tốt hơn là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh là trình tự khởi đầu *AmpR*, tốt hơn là trình tự khởi đầu *AmpR* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;

- yếu tố kết thúc rrnB T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
 - yếu tố kết thúc rrnB T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; và/hoặc
 - điểm khởi đầu sao chép pMB1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %.
3. Cấu trúc ADN theo phương án 1 hoặc 2, trong đó
- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12;
 - trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh là trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự nucleotit of SEQ ID 13;
 - yếu tố kết thúc rrnB T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14;
 - yếu tố kết thúc rrnB T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15; và/hoặc
 - điểm khởi đầu sao chép pMB1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16.
4. Cấu trúc ADN theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó:
- trình tự khởi đầu rhaBAD bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 8 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 8;
 - yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 9 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 9;
 - yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 11 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 11;
 - dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 12;
 - trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 13;
 - yếu tố kết thúc rrnB T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 14;
 - yếu tố kết thúc rrnB T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 15; và
 - điểm khởi đầu sao chép pMB1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 16.

5. Cấu trúc ADN theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó cấu trúc ADN bao gồm vị trí đa tách dòng gồm có 17 vị trí giới hạn được phân cắt bằng enzym giới hạn EcoRI, NdeI, NotI, XhoI, PspXI, PaeR71, BbsI, StyI, AvrII, BanI, Acc65I, KpnI, Eco53kI, SacI, BamHI, XbaI, SalI, AccI, PstI, SbfI, SphI và HindIII.
6. Cấu trúc ADN theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID 1 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 1.
7. Cấu trúc ADN theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp này, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu rhaBAD, trong đó protein tái tổ hợp này là kháng thể đơn dòng hoặc mảnh của nó; tốt hơn là protein tái tổ hợp này là ranibizumab hoặc mảnh của nó; và tốt hơn nữa là protein tái tổ hợp này là ranibizumab bao gồm (i) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID 3 và/hoặc (ii) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID 4.
8. Cấu trúc ADN theo phương án 7, trong đó trình tự nucleotit này mã hóa protein tái tổ hợp bao gồm (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; tốt hơn là trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp này bao gồm (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6.
9. Cấu trúc ADN theo phương án 8, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp này còn bao gồm ít nhất một trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã với một hoặc cả hai trình tự nucleotit SEQ ID 5 và SEQ ID 6, tốt hơn là peptit tín hiệu là PelB; tốt hơn nữa là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; tốt nhất là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7.
10. Cấu trúc ADN theo phương án 9, trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự SEQ ID 17 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là bao gồm trình tự SEQ ID 17.

11. Vector biểu hiện chứa cấu trúc ADN theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10.
12. Tế bào chủ vi khuẩn chứa cấu trúc ADN theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10 hoặc vector biểu hiện theo phương án 11, trong đó tế bào chủ vi khuẩn này tốt hơn là tế bào *Escherichia coli*, tốt hơn nữa là tế bào *E. coli* K-12.
13. Tế bào chủ theo phương án 12, trong đó tế bào chủ này bao gồm (i) nhiễm sắc thể mà chứa đột biến trình tự nucleotit của gen *rhaB* mà làm cho *RhaB* bất hoạt, hoặc (ii) nhiễm sắc thể trong đó trình tự nucleotit mã hóa *RhaB* bị khuyết.
14. Tế bào chủ theo phương án 12 hoặc 13, trong đó tế bào chủ này là tế bào *Escherichia coli* W3110, tốt hơn là chứa nhiễm sắc thể gồm có đột biến dịch khung trong trình tự nucleotit mã hóa *RhaB*.
15. Tế bào chủ theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 12 đến 14, trong đó tế bào chủ này là tế bào *Escherichia coli* W3110 chứa nhiễm sắc thể bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 2 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 2; trong đó tùy ý, nhiễm sắc thể của tế bào chủ còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa *RhaT*.
16. Phương pháp sản xuất protein tái tổ hợp bao gồm bước cho tế bào chủ vi khuẩn theo phương án bất kỳ trong số các phương án 12-15 tiếp xúc với rhamnoza, nhờ đó cảm ứng sự biểu hiện của protein tái tổ hợp này.
17. Phương pháp theo phương án 16, còn bao gồm bước thu hồi protein tái tổ hợp từ tế bào chủ vi khuẩn; tùy ý còn bao gồm một hoặc nhiều bước tinh chế protein tái tổ hợp được thu hồi, tốt hơn là bằng một hoặc nhiều bước sắc ký.

Sáng chế có nhiều khía cạnh, được minh họa trong các ví dụ 1-8 trong phần ví dụ không nhằm giới hạn dưới đây. Nên hiểu rằng các ví dụ này, liên quan đến việc sử dụng tế bào chủ XdevK và/hoặc plasmit KTXHIS, trong khi chỉ ra các phương án ưu tiên của sáng chế, chỉ được đưa ra nhằm mục đích minh họa. Từ các phương án được bộc lộ trên đây và các ví dụ dưới đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các dấu hiệu cơ bản của sáng chế, và không trệch khỏi phần đề cập và phạm vi của nó, có thể thực hiện các thay đổi và các cải biến khác nhau với sáng chế để điều chỉnh nó thành các loại kháng thể và globulin trị liệu khác nhau. Do đó, các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài những phần được thể hiện và được mô tả ở đây sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ phần mô tả nêu trên. Các cải biến như vậy

thì cũng nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Ví dụ về việc cải biến như vậy là một hoặc nhiều trong số các SEQ ID 1-18 được chỉ ra ở trên có thể được thay thế bằng trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 đề cập đến việc tạo cấu trúc tế bào chủ XdevK.

Ví dụ 2 đề cập đến việc tạo cấu trúc vector biểu hiện KTXHIS-PelbLC-PelbHC.

Ví dụ 3 đề cập đến chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab được biểu hiện bởi vector biểu hiện trong Ví dụ 2.

Ví dụ 4 thể hiện hiệu giá vượt trội của ranibizumab được sản xuất theo sáng chế so với hiệu giá của ranibizumab được sản xuất bằng phương pháp được mô tả trong tài liệu tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ 5 thể hiện rằng ranibizumab được sản xuất theo sáng chế không có thể thực khuẩn.

Ví dụ 6 là thử nghiệm so sánh thể hiện hiệu giá vượt trội của sáng chế khi so sánh với tế bào chủ và/hoặc plasmit trong tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ 7 là thử nghiệm thể hiện chất lượng, độ tinh khiết và hiệu giá vượt trội của sáng chế khi so sánh với tế bào chủ và/hoặc plasmit trong tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ 8 là thử nghiệm thể hiện sự kiểm soát biểu hiện vượt trội của sáng chế so với tế bào chủ và/hoặc plasmit trong tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ 1 – Phát triển chủng

Tế bào chủ XdevK là dẫn xuất *E. coli* W3310 với sự dịch khung trong bản sao nhiễm sắc thể của RhaB làm cho nó không có khả năng sử dụng rhamnoza làm nguồn cacbon. Tế bào chủ XdevK được phát triển thành chủng cho hệ thống cảm ứng rhamnoza trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein tái tổ hợp quan tâm được tách dòng thành plasmit KTXHIS và được biểu hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu cảm ứng rhamnoza.

Chủng khởi đầu cho tế bào chủ XdevK là *E. coli* W3110 và phương pháp tương tự sản xuất tế bào chủ XdevK được mô tả trong Wilms *et al.* Trong phần có tựa “Construction of the Production Strain *E. coli* BW3110” [3].

Phương pháp phát triển tế bào chủ XdevK bao gồm các bước sau đây:

- c) tạo cấu trúc plasmit pRhaBFS, và
- d) tạo cấu trúc đột biến dịch khung RhaB.

Bước (a) - Tạo cấu trúc plasmit pRhaBFS:

Hai đoạn môi sau đây được sử dụng để khuếch đại PCR các phần của operon *rhaBAD* từ nhiễm sắc thể của *E. coli* chủng BL21 (tên của các đoạn môi trong ngoặc đơn):

- (SBamHI1680) 5' GTACGCTAGGATCCTGTGGCAGCAACTGATTC 3'

- (BSalI1681) 5' GTAGATAGGTCGACAGCGATCGTCATTGGGAT 3'

Sản phẩm PCR được tinh chế và phân cắt bằng BamHI và SalI rồi lai ghép vào plasmit pLemo (chẳng hạn như pLemo được mô tả trong US8138324) đã được phân cắt bằng BamHI và SalI. Plasmit pLemo với đoạn chèn sau đó được phân cắt bằng ClaI. Sản phẩm phân cắt được ủ với T4 polymeraza để tạo ra các đầu cùn và sau đó được thất lại. Plasmit pLemo thu được với vùng gen operon *rhaBAD* được gắn chèn với hai bazơ bổ sung được ủ với BamHI và SalI. Mảnh chứa vùng gen operon *rhaBAD* với 2 bazơ bổ sung được tinh chế và được nối bằng plasmit pmak705 được phân cắt bằng BamHI và SalI. Plasmit thu được từ việc nối này được đặt tên là pRhaBFS và trình tự được xác nhận bằng cách giải trình tự.

Bước (b) – Tạo cấu trúc đột biến dịch khung RhaB.

Tế bào *E. coli* W3110 được biến nạp với plasmit pRhaBFS thay thế gen rồi cấy trên thạch LB vegetone chứa chloramphenicol (20µg/ml) và ủ ở 30°C trong 20 giờ. Khuẩn lạc duy nhất được chọn và được đặt trong LB vegetone và được sinh trưởng ở 30° C cho đến khi OD₆₀₀ đạt giá trị 0,5. 5 µl được chuyển từ dịch nuôi cấy vào đĩa thạch LB chứa chloramphenicol (20µg/ml) và được ủ ở 43 °C trong 16 giờ. Các khuẩn lạc đã được kiểm tra để chèn chính xác vào nhiễm sắc thể bằng PCR. Các khuẩn lạc có đoạn chèn chính xác được nuôi cấy trong LB vegetone chứa chloramphenicol (20µg/ml) đến bão hòa ba lần và sau đó nuôi cấy 20 giờ trong LB vegetone. Một µl sau đó được cấy lên đĩa LB vegetone. Đĩa LB vegetone được sử dụng làm khuôn mẫu để cấy bản sao lên đĩa thạch McConkey được bổ sung 1% rhamnoza để xác nhận rằng các tế bào không thể sử dụng rhamnoza làm nguồn carbon. Một chủng đã được chọn và sinh trưởng trong LB vegetone (Sigma), sau đó được chia nhỏ và đặt tên là chủng biểu hiện XdevK. Bản sao nhiễm sắc thể của gen *rhaB* từ XdevK được khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm PCR được giải trình tự và việc gắn chèn chính xác hai bazơ (CG) được khẳng định (xem các bazơ CG được gạch chân trong SEQ ID 2):

GTTGGCCCCGCTCCACGCCAGTAGCGACTCGTCCCAGTCGTCGCTATTGATAT
TGACCAGTTGCGTGGTCGTGGCGTTGGTATATTCCCAGTTCATCTTGCCGGTC
AGGCGATAACTGAAGTAATCCGGCATCAGCAGAGCGTGAGCAATGTGTGGA

ATAAGTTCAGGTTGTTGCTCCGTCAGCGCACGCAACTGATAAAGCGTATTGA
 AGGGCAGAACTGGATGCCGCTACGTTGATAAATATCGCGTTTGCCGAGTTG
 TTGTTGTGCCTGCGCCATTAGGCCATTGGTGCGGCTATCGCGATAAGCAACG
 GGCAGGCCCACACGCTGACCCTGTTGGTTCGAGCAGCACAAAGTCCACGCCCC
 AGGTATCAATCCCAATGCTATCGCGATACGAATCCCTTCCTCGCACACCTTGT
 TTAATCCAAGGCGAATGGCACTTTCCAGGCTATCCACATCCCAGGTGACATA
 GCCGTTCTGACTATGCAGCCCATTGTTAAAACGATGGATTTTCGCGCAGCGTCA
 GGCTGCGGCATTCACGCTCGTAACGCGCCAGCATCACGCGCCCCACTGGATGC
 GCCGAGATCGACGGCGACACAATTGCGAAAGGTCATAATGTGATCCTGCTGA
 ATTCATTACGACCAGTCTAAAAAGCGCCTGAATTCGCGACCTTCTCGTTACT
 GACAGGAAAATGGGCCATTGGCAACCAGGGAAAGATGAACGTGATGATGTT
 CACAATTTGCTGAATTGTGGTGATGTGATGCTCACC

Ví dụ 2 - KTXHIS-PelbLC-PelbHC

Peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 7 được dung hợp trước axit nucleic mã hóa cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của ranibizumab, sau đó được tách dòng vào plasmid biểu hiện KTXHIS. Trình tự nucleotit thu được bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 17 và nó được gọi là KTXHIS-PelbLC-PelbHC trong sáng chế. Hơn nữa, bản đồ plasmit của KTXHIS-PelbLC-PelbHC được minh họa trên Fig. 3.

Trình tự nucleotit SEQ ID 17 được bộc lộ dưới đây và trình tự của axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được dung hợp trình tự tín hiệu PelB được gạch chân và trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được dung hợp với trình tự tín hiệu PelB được in đậm (cũng xem Fig. 3 về sự sắp xếp của PelB so với các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của ranibizumab):

ATCTTTCTGCGAATTGAGATGACGCCACTGGCTGGGCGTCATCCCGGTTTCCC
 GGGTAAACACCACCGAAAAATAGTTACTATCTTCAAAGCCACATTCGGTCTGA
 AATATCACTGATTAACAGGCGGCTATGCTGGAGAAGATATTGCGCATGACAC
 ACTCTGACCTGTGCGAGATATTGATTGATGGTCATTCCAGTCTGCTGGCGAAA
 TTGCTGACGCAAAACGCGCTCACTGCACGATGCCTCATCAGAAAATTTATCC
 AGCGCAAAGGGACTTTTCAGGCTAGCCGCCAGCCGGGTAATCAGCTTATCCA
 GCAACGTTTCGCTGGATGTTGGCGGCAACGAATCACTGGTGTAACGATGGCG
 ATTCAGCAACATCACCAACTGCCCCGAACAGCAACTCAGCCATTTTCGTTAGCA
 AACGGCACATGCTGACTACTTTCATGCTCAAGCTGACCAATAACCTGCCGCG
 CCTGCGCCATCCCCATGCTACCTAAGCGCCAGTGTGGTTGCCCTGCGCTGGCG

TTAAATCCCGGAATCGCCCCCTGCCAGTCAAGATTCAGCTTCAGACGCTCCG
GGCAATAAATAATATTCTGCAAAACCAGATCGTTAACGGAAGCGTAGGAGTG
TTTATCATCAGCATGAATGTAAAAGAGATCGCCACGGGTAAATGCGATAAGGG
CGATCGTTGAGTACATGCAGGCCATTACCGCGCCAGACAATCACCAGCTCAC
AAAAATCATGTGTATGTTTCAGCAAAGACATCTTGCGGATAACGGTCAGCCAC
AGCGACTGCCTGCTGGTCGCTGGCAAAAAAATCATCTTTGAGAAGTTTAAAC
TGATGCGCCACCGTGGCTACCTCGGCCAGAGAACGAAGTTGATTATTCGCAA
TATGGCGTACAAATACGTTGAGAAGATTCGCGTTATTGCAGAAAGCCATCCC
GTCCCTGGCGAATATCACGCGGTGACCAGTTAAACTCTCGGCGAAAAAGCGT
CGAAAAGTGGTTACTGTGCTGAATCCACAGCGATAGGCGATGTCAGTAACG
CTGGCCTCGCTGTGGCGTAGCAGATGTCGGGCTTTCATCAGTCGCAGGCGGTT
CAGGTATCGCTGAGGCGTCAGTCCCGTTTGCTGCTTAAGCTGCCGATGTAGCG
TACGCAGTGAAAGAGAAAAATTGATCCGCCACGGCATCCCAATTCACCTCATC
GGCAAAATGGTCCTCCAGCCAGGCCAGAAGCAAGTTGAGACGTGATGCGCTG
TTTTCCAGGTTCTCCTGCAAACCTGCTTTTACGCAGCAAGAGCAGTAATTGCAT
AAACAAGATCTCGCGACTGGCGGTGAGGGTAAATCATTTTCCCCTTCCTGCT
GTTCCATCTGTGCAACCAGCTGTGCGACCTGCTGCAATACGCTGTGGTTAACG
CGCCAGTGAGACGGATACTGCCCATCCAGCTCTTGTGGCAGCAACTGATTCA
GCCCCGGCGAGAACTGAAATCGATCCGGCGAGCGATACAGCACATTGGTCA
GACACAGATTATCGGTATGTTTCATACAGATGCCGATCATGATCGCGTACGAA
ACAGACCGTGCCACCGGTGATGGTATAGGGCTGCCCATTAACACATGAATA
CCCGTGCCATGTTTCGACAATCACAATTTTCATGAAAATCATGATGATGTTTCAGG
AAAATCCGCCTGCGGGAGCCGGGGTTCTATCGCCACGGACGCGTTACCAGAC
GGAAAAAATCCACACTATGTAATACGGTCATACTGGCCTCCTGATGTCGTC
AACACGGCGAAATAGTAATCACGAGGTCAGGTTCTTACCTTAAATTTTCGAC
GGAAAACCACGTAAAAAACGTCGATTTTCAAGATACAGCGTGAATTTTCAG
GAAATGCGGTGAGCATCACATCACCACAATTCAGCAAATTGTGAACATCATC
ACGTTTCATCTTTCCTGGTTGCCAATGGCCCATTTTCTTGTGTCAGTAACGAGAA
GGTCGCGAATCCAGGCGCTTTTTAGACTGGTCGTAATGAAATTCAGGAGGAA
TTCCTAATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAGCAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGC
AGCACAGCCTGCAATGGCAGATATTCAGCTGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTG
AGCGCAAGCGTTGGTGATCGTGTTACCATTACCTGTAGCGCAAGCCAGGATA

TTAGCAATTATCTGAATTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCACCGAAAGT
GCTGATCTATTTTACCAGCAGCCTGCATAGCGGTGTTCCGAGCCGTTTTAGCG
GTAGCGGTAGTGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGA
AGATTTTGCAACCTATTATTGTCAGCAGTATAGCACCGTTCGGTGGACCTTTG
GTCAGGGGCACCAAAGTTGAAATTAAACGTACCGTTGCAGCACCGAGCGTTTT
TATCTTTCCGCCTAGTGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCAAGCGTTGTT
TGTCTGCTGAATAACTTTTTATCCGCGTGAAGCAAAAGTTCAGTGGAAAGTTG
ATAATGCACTGCAGAGCGGTAATAGCCAAGAAAGCGTTACCGAACAGGATA
GCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAG
ATTATGAAAAACACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTTACCCATCAGGGTCTGAG
CAGTCCGGTTACCAAAAAGTTTTAATCGTGGTGAATGCTAATAATCTAGAACT
GTTATCGATATCAGGAGGATTAGCATATGAAATATCTGCTGCCGACCGCAG
CAGCGGGTCTGCTGCTGCTGGCAGCACAGCCTGCAATGGCAGAAGTTCA
GCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCCTGCGT
CTGAGCTGTGCAGCAAGCGGTTATGATTTTACCCATTATGGTATGAATTG
GGTTCGTCAGGCACCGGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGGTGGATTAAT
ACCTATACCGGTGAACCGACCTATGCAGCAGATTTTAAACGTCGTTTTAC
CTTTAGCCTGGATACCAGCAAAAGCACCGCATATCTGCAGATGAATAGC
CTGCGTGCAGAGGATACCGCAGTGTATTATTGTGCAAAATATCCGTATTA
TTACGGCACCCAGCCATTGGTATTTTCGATGTTTGGGGTCAGGGCACCCCTG
GTTACCGTTAGCAGCGCAAGCACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGG
CACCGAGCAGCAAAAGTACCAGCGGTGGCACCGCAGCACTGGGTGTCT
GGTTAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTACCGTGAGCTGGAATAGCGGT
GCACTGACCAGCGGTGTTTCATACCTTTCCGGCAGTTCTGCAGAGCAGCG
GTCTGTATAGCCTGAGCAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCAGCAGCCTGGG
CACCCAGACCTATATTTGTAATGTTAATCATAAACCGAGCAATACCAAAG
TGGATAAAAAAGTGGAACCGAAAAGCTGCGATAAAACCCATCTGTAATA
AAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATT
AAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGT
AGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTA
GCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGC
ATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTG

TTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGAT
TTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCA
TAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTT
TTGCGTTTCTACAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTAT
CCGCTCATGAGACTAGGCTTCCGCGCCCTCATCCGAAAGGGCGTATTCATAT
ATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGG
CGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTCGGCTGCG
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG
ACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG
GACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCG
TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGC
GCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC
GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGG
ACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT
TGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGG
GATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT
AAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGA
CAGTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCA
GGATTATCAATACCATATTTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAA
ACTACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGAT
TCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAA
GGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGG
CAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCT
CGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCC
TGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGA

ATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCAC
 CTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCA
 GTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCG
 GAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAC
 ATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGG
 GCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGA
 GCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCT
 AGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATT
 ATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
 ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
 CACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAG
 GCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCT

Ví dụ 3 – Protein tái tổ hợp – ranibizumab

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của ranibizumab được biểu hiện bởi vector biểu hiện KTXHIS-PelbLC-PelbHC bao gồm trình tự SEQ ID 3:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự axit amin của chuỗi nặng của ranibizumab được biểu hiện bởi vector biểu hiện KTXHIS-PelbLC-PelbHC bao gồm trình tự SEQ ID 4:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN
 TYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTS
 HWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHL

Hơn nữa, peptit tín hiệu PelB thu được bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID 18 [6]: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

Ví dụ 4 – Hiệu giá vượt trội của ranibizumab được sản xuất theo sáng chế so với hiệu giá trong tình trạng kỹ thuật

3 mẻ chứa ranibizumab khác nhau được sản xuất theo phương pháp được mô tả dưới đây.

Môi trường tối thiểu được chuẩn bị và được chủng tế bào chủ XdevK nuôi cấy qua đêm chứa vector biểu hiện KTXHIS-PelbLC-PelbHC từ bình lắc. Nhiệt độ lên men được thiết lập là 30°C và các giống nuôi cấy được nuôi cấy trong 22 giờ theo đợt. Giai đoạn này được theo sau bởi một giai đoạn tăng trưởng trong 10 giờ. Nhiệt độ được điều chỉnh đến 28,5°C và tốc độ tăng trưởng sau đó được giảm xuống bằng cách kiểm soát lượng glucoza nạp vào. Dịch cấy được cảm ứng bằng 500 μ M rhamnoza được bơm vào thiết bị lên men. Thức ăn glucoza cũng được bổ sung rhamnoza để cảm ứng liên tục trong suốt giai đoạn cảm ứng. Nguyên liệu được thu hoạch sau 36 giờ cảm ứng. Tổng thời gian lên men là 68 giờ và thể tích thu hoạch là 8530 ml.

Sau khi thu hoạch, tất cả nguyên liệu, môi trường và tế bào, được đồng nhất. 5500 ml được lưu trữ ở -80°C và 3000 ml được làm trong và được rửa bằng TFF. Các tế bào được rửa với thể tích gấp ba lần thể tích ban đầu để tăng khả năng giải phóng sản phẩm. Sản phẩm thu được chứa ranibizumab được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký ái lực capto L, đây cũng là phương pháp sắc ký được sử dụng trong Kumar *et al.* [4] (xem các phần 2.4 và 3.2 trong Kumar *et al.*) và sau đó nồng độ của ranibizumab tinh chế được xác định. Các mẻ thứ nhất, thứ hai và thứ ba có hiệu giá ranibizumab lần lượt là 531 mg/L, 487 mg/L và 518 mg/L.

Để so sánh, trong tài liệu tình trạng kỹ thuật trước đó, Kumar *et al* (bộc lộ các phương pháp tinh chế tương tự), hiệu giá ranibizumab nằm trong khoảng từ 5 mg/L đến 25 mg/L như được chỉ ra trong Fig. 6 và phần Tóm tắt của tài liệu này [4].

Do đó, phương pháp theo sáng chế (cũng như việc sử dụng tế bào chủ XdevK và vector biểu hiện KTXHIS-PelbLC-PelbHC trong đó) cung cấp mức hiệu giá ranibizumab cao hơn bất ngờ khi so sánh với các phương pháp trong tình trạng kỹ thuật trước đó.

Ví dụ 5 – Tạo ngân hàng tế bào

XdevK được biến nạp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC. Một khuẩn lạc duy nhất được chọn và phát triển trong môi trường thiết bị phản ứng sinh học xác định (DBM) qua đêm, ngày hôm sau 20% glyxerol được thêm vào, dịch cấy được chia nhỏ và bảo quản ở -80°C. Một lượng nhỏ (50 μ l) được sử dụng để chủng vào 100 ml môi trường thiết bị phản ứng sinh học xác định (DBM) và nuôi cấy trong 24 giờ ở 30°C, nhiệt độ được chuyển sang 35°C và các tế bào được nuôi cấy thêm 6 giờ để tăng OD. 1) OD A600nm = 4,44. 20%

glyxerol được bổ sung, dịch nuôi cấy được chia nhỏ thành các lượng nhỏ (100 μ l phần) và đông lạnh ở -80°C dưới dạng RCB100.

Các phần nhỏ của chủng này được gửi đi để thử nghiệm thể thực khuẩn và thử nghiệm độ tinh khiết của vi sinh vật tại Phòng thí nghiệm Charles River. Báo cáo nêu rằng: “Đã kết luận được rằng RCB100 không chứa thể thực khuẩn khi thử nghiệm cho cả thể tiền thực khuẩn tiềm tan và thể thực khuẩn tự do. Giới hạn số lượng của thể thực khuẩn tự do nhỏ hơn 1 đơn vị hình thành vết tan trên mỗi mL của giống nuôi cấy qua đêm.”

Ví dụ 6 – Các thử nghiệm thể hiện hiệu giá vượt trội

Nguyên liệu và phương pháp

Ba chủng sau đây được sử dụng trong các thử nghiệm:

1. Tế bào chủ XdevK được mô tả trong Ví dụ 1 ở trên; nói cách khác, nó là chủng mà:
 - Có nền tảng của chủng W3110 có kiểu gen: F-, λ -, IN(rrnD-rrnE)1, rph-1);
 - là dẫn xuất chủng K và chứa đột biến ở gen RhaB, làm cho nó không thể phân giải rhamnoza và sử dụng rhamnoza làm nguồn cacbon.
2. XB210 được mô tả trong Hjelm *et al.* [2] mà:
 - là chủng BL21 (DE3) có kiểu gen: F- dompt hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3));
 - Là dẫn xuất chủng B và chứa đột biến ở gen RhaB và mất gen thông báo rhamnoza (RhaT), làm cho nó không thể vận chuyển tích cực, phân giải rhamnoza và sử dụng rhamnoza làm nguồn cacbon;
 - Chứa các phần của thể tiền thực khuẩn DE3 được gắn chèn vào nhiễm sắc thể và không biểu hiện lon proteaza hoặc OmpT proteaza; và
3. MG1655 được mô tả trong Giacalone *et al.* [5] là *E. coli* chủng K kiểu đại.

Bốn plasmit biểu hiện sau đây được sử dụng để biểu hiện trình tự axit nucleic đối với ranibizumab, tức là trình tự mã hóa mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab được tách dòng vào plasmit biểu hiện sau đây:

1. KTXHIS;
2. pRha109A được mô tả trong Giacalone *et al.* [5];
3. pRha67A được mô tả trong Giacalone *et al.* [5]; và
4. pRha67K được mô tả trong Hjelm *et al.* [2].

Vector biểu hiện tạo thành được xác nhận bằng cách giải trình tự đầy đủ.

Hơn nữa, vector biểu hiện thu được được đưa vào các chủng XdevK, XB201 và MG1655 (tức là các tế bào chủ) để thử nghiệm các sự kết hợp khác nhau của các chủng và plasmit để hiểu về sự ảnh hưởng của độ chuẩn, hiệu giá, chất lượng và kiểm soát sự biểu hiện.

Thiết lập thử nghiệm để so sánh chuẩn độ

Vector biểu hiện chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab được biến nạp vào XdevK, XB201 và MG1655 bằng quy trình chuẩn. Các giống nuôi cấy qua đêm được chuẩn bị bằng cách chủng khuẩn lạc duy nhất trong 3 ml môi trường lỏng LB-veg chứa 100 µg/ml ampicillin hoặc 50 µg/ml kanamycin phụ thuộc vào cấu trúc. Các dịch cấy được ủ trong 15 ml ống falcon ở 37°C đồng thời lắc trong 16 giờ. Sau đó, dịch cấy được pha loãng ngược (1:50) vào 5 ml LB-veg cộng với kháng sinh trong đĩa tăng trưởng 24 giếng và ủ như trước cho đến khi đạt được OD600 khoảng 0,3-0,5. Sự biểu hiện được cảm ứng bằng cách bổ sung 5, 50, 100, 250, 500, 5000 µM rhamnoza và ủ trong 5 giờ ở 30 °C kèm theo lắc. Thể tích tế bào tương ứng với OD600 là 0,2 đơn vị được thu gom, được huyền phù lại trong 20 µl 2x dung dịch đệm tải mẫu Laemlli, được đun sôi trong 5 phút sau đó 7,5 µl được phân tích bằng mini SDS-PAGE 12%. Sau đó gel được chuyển ngay sang màng nitroxenluloza/PVDF và được dò bằng kháng thể kháng Fab đối với phân tích thâm tách Western.

Kết quả và bàn luận: Chuẩn độ

Fig. 4a, 4b, 4c và 4d thể hiện các thử nghiệm thâm tách Western để so sánh chuẩn độ. Mỗi lần đối chứng được nạp ranibizumab tinh khiết.

Fig. 4a thể hiện:

- sự tích lũy ranibizumab biểu hiện ở chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC; và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67K (67K).

Fig. 4b thể hiện:

- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XB201 kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67K (67K). và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67A (67A).

Fig. 4c thể hiện:

- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha109A (109A); và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng MG1655 kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67A (67A).

Fig. 4d thể hiện:

- lặp lại thí nghiệm cho thấy sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC để trực quan hóa khả năng chuẩn độ khi sử dụng kết hợp XdevK và thiết lập KTXHIS-PelbLC-PelbHC.

Fig. 4a, 4b, 4c và 4d thể hiện rõ ràng và rõ ràng rằng thiết lập với XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC có hiệu quả kỹ thuật vượt trội so với các thiết lập khác khi so sánh khả năng chuẩn độ vì: rõ ràng và rõ rệt thể hiện rằng thiết lập với XdevK kết hợp KTXHIS-PelbLC-PelbHC có hiệu quả kỹ thuật vượt trội so với các thiết lập khác khi so sánh chuẩn độ do:

- sự biểu hiện của ranibizumab tăng dần đối với XdevK/KTXHIS-PelbLC-PelbHC mỗi lần bổ sung 5, 50, 100, 250, 500, 5000 μ M rhamnoza; và
- sự biểu hiện của ranibizumab không tăng dần trong bất kỳ sự kết khác bất kỳ – xem Ví dụ tổ hợp của XB201/67K tạo ra “vai”, tức là tăng dần nhưng sau đó giảm dần.

Ngoài ra, các fig. 4a, 4b, 4c cũng thể hiện rằng các tế bào chứa các vector biểu hiện dựa trên các plasmit pRha109A hoặc pRha67A tích lũy rất ít ranibizumab, ít hơn ít nhất 100 lần so với các thiết lập khác sử dụng KTXHIS-PelbLC-PelbHC hoặc vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67K (trong đó sự thay đổi gấp cuộn nói trên được quan sát bằng cách so sánh lượng đối chứng dương tính đã nạp).

Lưu ý là tổ hợp của:

- MG1655 và vector biểu hiện trên cơ sở plasmit pRha109A (xem Fig. 6),
- MG1655 và vector biểu hiện trên cơ sở plasmit pRha67K (xem Fig. 7b),
- MG1655 và KTXHIS-PelbLC-PelbHC (xem Fig. 7b),

không làm phát sinh quá trình sản xuất ranibizumab có thể phát hiện được và do đó các thử nghiệm chuẩn độ không được tiến hành đối với các tổ hợp nói trên.

Do đó, theo kết luận, XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC cung cấp chuẩn độ vượt trội so với các thiết lập đã biết từ giải pháp kỹ thuật trước đó. Do đó, điều này cho phép điều chỉnh chính xác tốc độ sản xuất protein tái tổ hợp và do đó tốc độ sản xuất protein tái tổ hợp có thể được thiết lập chính xác và ổn định.

Ví dụ 7 – Các thử nghiệm thể hiện chất lượng và hiệu giá vượt trội

Thiết lập thử nghiệm cho các thử nghiệm hiệu giá và chất lượng

Các vectơ biểu hiện bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab được biến nạp vào XdevK, XB201 và MG1655 bằng cách sử dụng các quy trình chuẩn để sản xuất ngân hàng tế bào nghiên cứu (Research Cell Bank RCB) của các tổ hợp của chúng và plasmid tương ứng. Dịch cấy sơ bộ (trong bình lắc) được cấy từ một lọ RCB duy nhất và được tăng trưởng qua đêm (O/N) trong môi trường thiết bị phản ứng xác định; Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) 4,5 g/L, di-Kali hydro phosphat (K_2HPO_4) 3,0 g/L, Amoni sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 3,75 g/L, tri-natri xitrat dihydrat ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1,8 g/L, sắt(III) clorua hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,0525 g/L, kẽm sulfat heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,0158 g/L, đồng(II) sulfat pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,00397 g/L, Mangan sulfat monohydrat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,0198 g/L, Canxi clorua dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,0207 g/L bổ sung 17,1 mL dung dịch glucoza 60% (thể tích/khối lượng) tiệt trùng, 2,432 mL 2,5 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL dung dịch Kanamycin 50 mg/mL. Độ pH được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1,5 mL dung dịch Amoni hydroxit 25% (đến 6,95). Thiết bị lên men hộp DAS được chuẩn bị với môi trường lò phản ứng xác định và được cấy dịch tiền nuôi cấy O/N. Sự tăng trưởng tế bào được kiểm soát bằng cách nạp glucoza tiệt trùng 60% (thể tích/khối lượng) vào dịch cấy. Pha sản xuất được bắt đầu bằng việc bổ sung rhamnoza làm chất cảm ứng. Nếu cần, profin thức ăn đã được điều chỉnh và muối được thêm vào dịch cấy. Tế bào được thu hoạch sau 20-42 giờ cảm ứng sau đó tinh chế theo mẻ. Các mẫu thu hoạch được thêm vào đĩa vi chuẩn độ giếng sâu 96 giếng bao gồm các giếng có nước được đông lạnh trước để đảm bảo làm mát mẫu. Các giếng trống được nạp nước MilliQ (MQ). Việc siêu âm được thực hiện bằng cách sử dụng đầu dò 24 phần tử trên thiết bị rung tế bào sonic trong 3 chu kỳ, mỗi chu kỳ 20 giây ở biên độ 40% với 30 giây tạm dừng giữa các chu kỳ. Các mẫu được siêu âm được chuyển vào các ống quay 2 mL và được ly tâm trong 20 phút ở tốc độ 20 000 x g ở 4°C trong máy ly tâm 5430 R. Dịch

nồi được lấy cẩn thận bằng pipet và được bổ sung vào huyền phù đặc 50 % nhựa ái lực Capto L đã được cân bằng trước. Việc cân bằng được thực hiện ba lần với natri photphat 20 mM, NaCl 150 mM, độ pH=7,2 (EQ). 1,9 mL dịch nổi được sử dụng để tải 100 μ L huyền phù đặc Capto L, mà tương ứng với tốc độ tải 9,5 nhựa mL/mL. Dịch nổi và nhựa được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong khi lắc ở 1500 vòng/phút trên ThermoMixer C sau đó ly tâm trong 1 phút ở 2000 x g ở nhiệt độ trong phòng. Dịch nổi được loại bỏ. Nhựa được rửa hai lần bằng cách bổ sung 500 μ L EQ và tách nhựa bằng cách ly tâm ở tốc độ 2000 x g, như trên. Trong bước rửa thứ ba bằng cách sử dụng 300 μ L EQ, nhựa được chuyển sang cốc xoay lọc xenluloza axetat thích hợp cho 400 μ L và được ly tâm như trên. Bước rửa thứ tư được thực hiện với 150 μ L EQ. Cốc xoay được chuyển sang ống thu gom mới và rửa giải với 50 mM natri axetat độ pH=3,0 được thực hiện trong ba chu trình sử dụng tổng cộng 0,4 μ L cho mỗi μ L nhựa (ví dụ 3 x 40 μ L cho 50 μ L huyền phù đặc được sử dụng). Nồng độ protein trong cách chất rửa giải được phân tích bằng cách thiết lập HPLC ái lực. Chất lượng của mẫu được phân tích bằng SDS-PAGE và SCX-HPLC.

Kết quả và thảo luận về các thử nghiệm hiệu giá và chất lượng

Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng SDS-PAGE như được minh họa trên Fig. 5. Không phát hiện được có sự khác biệt về chất lượng, không tăng kiểu dải lên hoặc tăng số lượng chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng tự do, có thể được phát hiện. Tuy nhiên, thiết lập sử dụng chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67A đã cho rất ít vật liệu và không thể phát hiện được dải nào. Hơn nữa, thiết lập sử dụng chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha109A tăng trưởng rất kém và do đó được thu hoạch sau thời gian cảm ứng ngắn hơn (20 giờ trong khi tất cả các mẫu khác được thu hoạch sau 42 giờ).

Lượng vật liệu tạo ra được đánh giá bằng cách sử dụng HPLC ái lực và được tóm tắt trên Fig. 6 chỉ ra rõ ràng rằng thiết lập tạo ra năng suất cao nhất là chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC.

Chất lượng của mẻ nguyên liệu đã tinh chế được đánh giá bằng SCX-HPLC và được tóm tắt trong bảng 1. Vật liệu được phân tích từ thiết lập với chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67A là không đáng tin cậy vì thiết lập này tạo ra quá ít vật liệu nên khó phân tích. Vật liệu từ quá trình thiết lập với chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha109A được thu hoạch sau thời gian cảm ứng ngắn

hơn do các tế bào này tăng trưởng rất chậm so với các tế bào khác. Dữ liệu SCX HPLC được tóm tắt trong bảng 1 cho thấy rõ ràng rằng chất lượng của vật liệu được sản xuất và tinh chế từ chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC có độ tinh khiết cao hơn (nghĩa là chất lượng) so với các thiết lập khác.

Bảng 1. Tóm tắt dữ liệu về độ tinh khiết của SCX HPLC.

Mô tả	MG1655/67 A	XdevK /109A	XdevK /67A	XdevK /67K	XdevK / KTXHIS- PelbLC- PelbHC	XB201/67A
Độ tinh khiết của Ranibizumab theo %	30,6	53,0	59,3	73,8	83,0	71,5

Do đó, kết luận rằng chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC vượt trội so với các thiết lập khác cả về chất lượng của ranibizumab được sản xuất và sản lượng của ranibizumab được sản xuất.

Ví dụ 8 – Các thử nghiệm so sánh cho thấy khả năng kiểm soát biểu hiện vượt trội

Thiết lập thử nghiệm để đánh giá khả năng kiểm soát sự biểu hiện

Vectơ biểu hiện chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ranibizumab được biến nạp vào XdevK và MG1655 bằng quy trình chuẩn. Các dịch cấy qua đêm được chuẩn bị bằng cách chủng một khuẩn lạc duy nhất trong 3 ml môi trường lỏng LB-veg chứa 100 µg/ml ampicillin hoặc 50 µg/ml kanamycin phụ thuộc vào plasmit được sử dụng. Các dịch cấy được ủ trong 15 ml ống falcon ở 37°C đồng thời lắc trong 16 giờ. Dịch cấy sau đó được pha loãng trở lại (1:50) vào 5 ml LB-veg cộng chất kháng sinh trong đĩa tăng trưởng 24 giếng, và được ủ như trước cho đến khi giá trị OD600 đạt được khoảng 0,3-0,5 và các điều kiện biểu hiện khác nhau được phân tích. Một tập hợp các dịch cấy được tăng trưởng với sự hiện diện của glucoza 0,2%. Sự biểu hiện được cảm ứng bằng cách thêm 250 µM rhamnoza vào tập hợp con của các dịch cấy và ủ ở 30°C có lắc. Thử nghiệm tế bào tương ứng với giá trị OD600 là 0,2 đơn vị được thu gom (xoáy xuống) sau 24 giờ, được huyền phù lại trong 20 µl 2x dung dịch đệm tải mẫu Laemlli, đun sôi trong 5 phút và được phân tích (7,5 µl) bằng khoảng 12% mini SDS-PAGE. Sau đó gel được chuyển ngay sang màng nitroxenluloza/PVDF và được dò bằng kháng thể kháng Fab.

Kết quả và thảo luận về khả năng kiểm soát sự biểu hiện

Fig. 7a, 7b và 7c thể hiện kết quả của phương pháp thẩm tách Western trong việc so sánh khả năng kiểm soát sự biểu hiện. Mỗi lần đối chứng được nạp ranibizumab. Các mẫu ở làn 1 từ mỗi thiết lập được tăng trưởng với sự có mặt của glucoza 0,2% và được cảm ứng bằng 250 μ m rhamnoza. Các mẫu ở làn 2 từ mỗi thiết lập được tăng trưởng với sự có mặt của glucoza 0,2%. Các mẫu ở làn 3 từ mỗi thiết lập được cảm ứng bằng 250 μ m rhamnoza. Các mẫu ở làn 4 từ mỗi thiết lập được tăng trưởng mà không có sự bổ sung bất kỳ.

Fig. 7a thể hiện:

- sự tích lũy ranibizumab biểu hiện ở chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC; và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67K (67K); và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67A (67A).

Fig. 7b thể hiện:

- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng XdevK kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha109A (109A).
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện ở chủng MG1655 kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC; và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng MG1655 kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67K (67K).

Fig. 7c thể hiện:

- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng MG1655 kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha67A (67A). và
- Sự tích lũy ranibizumab biểu hiện trong chủng MG1655 kết hợp với vector biểu hiện dựa trên plasmit pRha109A (109A).

Khi sự tích lũy ranibizumab được so sánh giữa các thiết lập khác nhau trên các fig. 7a-7c, rõ ràng là biểu hiện cao nhất của ranibizumab, gây ra bởi việc bổ sung 250 μ M rhamnoza như đã chỉ ra trong làn 3, đã được phát hiện trong chủng XdevK kết hợp với KTXHIS- PelbLC-PelbHC.

Thứ vị là, như được chỉ ra ở làn 3 trên các fig. 7b và 7c, không có cách thiết lập nào liên quan đến chủng MG1655 dẫn đến sự biểu hiện rõ ràng của ranibizumab.

Ngoài ra, trong số các cách thiết lập dẫn đến sự biểu hiện của ranibizumab ở làn 3 (tức là các cách thiết lập mà chủng XdevK được sử dụng), chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC dẫn đến biểu hiện ranibizumab thấp nhất khi được tăng trưởng với sự hiện diện của glucoza 0,2% như được chỉ ra trong làn 2. Điều này cho thấy rằng chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC có xu hướng ít bị biểu hiện rò rỉ hơn khi không có chất cảm ứng. Biểu hiện rò rỉ có thể có tác động tiêu cực đến sự tăng trưởng của các tế bào dẫn đến hiệu suất tổng thể thấp hơn. Biểu hiện rò rỉ cũng có thể ảnh hưởng đến chất lượng của nguyên liệu được sản xuất, dẫn đến hỗn hợp các loại của protein đã biểu hiện được tích lũy khác nhau có thể gây khó xử lý trong bước tinh chế tiếp theo và do đó dẫn đến năng suất thấp hơn và quy trình tinh chế phức tạp hơn.

Do đó, việc kiểm soát mức biểu hiện ranibizumab ở chủng XdevK kết hợp với KTXHIS-PelbLC-PelbHC vượt trội hơn khi so sánh với các thiết lập khác.

Tóm lại, kết quả thử nghiệm được thể hiện trong các Ví dụ 4, 6, 7 và 8 chứng tỏ rằng sáng chế cung cấp các ưu điểm và hiệu quả bất ngờ sau đây so với vector biểu hiện và/hoặc tế bào chủ trong tình trạng kỹ thuật vì thế cụ thể là thích hợp cho sản xuất protein tái tổ hợp trên quy mô công nghiệp.

- Độ chuẩn vượt trội (Ví dụ 6);
- Độ tinh khiết và chất lượng vượt trội (Ví dụ 7);
- Hiệu giá vượt trội (các Ví dụ 4, 7 và 8); và
- Khả năng vượt trội trong việc kiểm soát sự biểu hiện (Ví dụ 8).

Tài liệu tham khảo

1. Holcroft CC *et al.* Interdependence of activation at rhaSR by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and rhaR. *J Bacteriol.* 2000;182(23): 6774–6782
2. Hjelm, A. *et al.* Tailoring Escherichia coli for the l-rhamnoza PBAD Promoter-Based Production of Membrane and Secretory Proteins. *ACS synthetic biology* 2017; 6 6: 985-994 .
3. Wilms, B. *et al.* High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 73: 95-103
4. Kumar, D. *et al.* QbD Based Media Development for the Production of Fab Fragments in E. coli. *Bioengineering* 2019; 6, 29.
5. Giacalone MJ *et al.* “Toxic protein expression in Escherichia coli using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system. *Biotechniques.* 2006; 40(3): 355-364.
6. Choi, J.H. *et al.* Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64, 625–635

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cấu trúc ADN để biểu hiện ranibizumab trong tế bào chủ vi khuẩn, trong đó ranibizumab bao gồm (i) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID 3, và (ii) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID 4,

trong đó cấu trúc ADN này chứa trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab, trong đó cấu trúc ADN này còn chứa ít nhất một trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu mà được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã với trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab và/hoặc chuỗi nặng của ranibizumab,

trong đó cấu trúc ADN này còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD*,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR,
- yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS,
- dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh,
- yếu tố kết thúc rrnB T1
- yếu tố kết thúc rrnB T2, và
- điểm khởi đầu sao chép pMB1.

2. Cấu trúc ADN theo điểm 1, trong đó

- Dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin, tốt hơn là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- Trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh là trình tự khởi đầu AmpR, tốt hơn là trình tự khởi đầu AmpR bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;

- Yếu tố kết thúc *rrnB* T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %;
- Yếu tố kết thúc *rrnB* T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %; và/hoặc
- Điểm khởi đầu sao chép *pMB1* bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID 16 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %.

3. Cấu trúc ADN theo điểm 1 hoặc 2, trong đó

- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12;
- trình tự khởi đầu được liên kết hoạt động với trình tự nucleotit mã hóa dấu chuẩn kháng kháng sinh là trình tự khởi đầu *AmpR* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13;
- yếu tố kết thúc *rrnB* T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14;
- yếu tố kết thúc *rrnB* T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15; và/hoặc
- điểm khởi đầu sao chép *pMB1* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16.

4. Cấu trúc ADN theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

- trình tự khởi đầu *rhaBAD* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 8 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 8;
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaR* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 9 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 9;
- yếu tố hoạt hóa phiên mã *RhaS* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 11 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 11;
- dấu chuẩn kháng kháng sinh là dấu chuẩn kháng kanamycin bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 12 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 12;
- trình tự khởi đầu *AmpR* bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 13 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 13;

- yếu tố kết thúc rrnB T1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 14 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 14;
- yếu tố kết thúc rrnB T2 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 15 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 15; và
- điểm khởi đầu sao chép pMB1 bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 16 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 16.

5. Cấu trúc ADN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu *rhaBAD*.

6. Cấu trúc ADN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab bao gồm (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %.

7. Cấu trúc ADN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó trình tự nucleotit mã hóa ranibizumab bao gồm (i) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 5, và/hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng của ranibizumab bao gồm trình tự SEQ ID 6.

8. Cấu trúc ADN theo điểm 7, trong đó trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu được liên kết hoạt động theo hướng phiên mã với một hoặc cả hai trình tự nucleotit SEQ ID 5 và SEQ ID 6.

9. Cấu trúc ADN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó peptit tín hiệu là PelB.

10. Cấu trúc ADN theo điểm 9, trong đó trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit mã hóa peptit tín hiệu PelB bao gồm trình tự SEQ ID 7.

11. Cấu trúc ADN theo điểm 9 hoặc 10, trong đó cấu trúc ADN này bao gồm trình tự SEQ ID 17 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là bao gồm trình tự SEQ ID 17.
12. Vector biểu hiện chứa cấu trúc ADN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11.
13. Tế bào chủ vi khuẩn chứa cấu trúc ADN theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 hoặc vector biểu hiện theo điểm 12, trong đó tế bào chủ vi khuẩn này tốt hơn là tế bào *Escherichia coli*, tốt hơn nữa là tế bào *E. coli* K-12.
14. Tế bào chủ theo điểm 13, trong đó tế bào chủ này chứa (i) nhiễm sắc thể mà chứa đột biến trong trình tự nucleotit của gen *rhaB* làm cho RhaB bất hoạt, hoặc (ii) nhiễm sắc thể trong đó trình tự nucleotit mã hóa RhaB bị khuyết.
15. Tế bào chủ theo điểm 13 hoặc 14, trong đó tế bào chủ này là tế bào *Escherichia coli* W3110, tốt hơn là chứa nhiễm sắc thể bao gồm đột biến dịch khung trong trình tự nucleotit mã hóa RhaB.
16. Tế bào chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 15, trong đó tế bào chủ này là tế bào *Escherichia coli* W3110 chứa nhiễm sắc thể bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID 2 hoặc trình tự có độ đồng nhất trình tự với nó ít nhất là 90 %, tốt hơn là trình tự nucleotit SEQ ID 2; trong đó tùy ý, nhiễm sắc thể của tế bào chủ còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa RhaT.
17. Phương pháp sản xuất ranibizumab bao gồm bước cho tế bào chủ vi khuẩn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 16 tiếp xúc với rhamnoza, nhờ đó cảm ứng sự biểu hiện của ranibizumab.
18. Phương pháp theo điểm 17, còn bao gồm bước thu hồi ranibizumab từ tế bào chủ vi khuẩn; tùy ý còn bao gồm một hoặc nhiều bước tinh chế ranibizumab được thu hồi, tốt hơn là bằng một hoặc nhiều bước sắc ký.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Xbrane Biopharma AB
STADA Arzneimittel AG

<120> Cấu trúc ADN biểu hiện ranibizumab, vectơ biểu hiện và tế bào chủ vi khuẩn chứa cấu trúc ADN này và phương pháp sản xuất ranibizumab

<130> S12481WO/RN

<150> EP 20201096.3

<151> 2020-10-09

<160> 21

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 4673

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> KTXHIS

<400> 1

atcttttctgc gaattgagat gacgccactg gctgggcgctc atcccgggttt cccgggtaaa
60

caccaccgaa aaatagttac tatcttcaaa gccacattcg gtcgaaatat cactgattaa
120

caggcggtta tgctggagaa gatattgcgc atgacacact ctgacctgtc gcagatattg
180

attgatggtc attccagtct gctggcgaaa ttgctgacgc aaaacgcgct cactgcacga
240

tgccatca caaaatttat ccagcgcaaa gggacttttc aggctagccg ccagccgggt
300

aatcagctta tccagcaacg tttcgctgga tgttggcggc aacgaatcac tgggtgaacg
360

atggcgattc agcaacatca ccaactgccc gaacagcaac tcagccattt cgtagcaaa
420

cggcacatgc tgactacttt catgctcaag ctgaccaata acctgccgcg cctgcgcat
480

ccccatgcta cctaagcgcc agtgtggttg ccctgcgctg gcgttaaata ccggaatcgc
540

cccctgccag tcaagattca gttcagacg ctccgggcaa taaataatat tctgcaaaac
600

cagatcggtta acggaagcgt aggagtgttt atcatcagca tgaatgtaaa agagatcgcc
660

acgggtaatg cgataagggc gatcgttgag tacatgcagg ccattaccgc gccagacaat
720

caccagctca caaaaatcat gtgtatgttc agcaaagaca tcttgcggtat aacggtcagc
780

cacagcgact gcctgctggt cgctggcaaa aaaatcatct ttgagaagtt ttaactgatg
840

cgccaccgtg gctacctcgg ccagagaacg aagttgatta ttcgcaatat ggcgtacaaa
900

tacgttgaga agattcgcgt tattgcagaa agccatcccg tccctggcga atatcacgcg
960

gtgaccagtt aaactctcgg cgaaaaagcg tcgaaaagtg gttactgtcg ctgaatccac
1020

agcgataggc gatgtcagta acgctggcct cgctgtggcg tagcagatgt cgggctttca
1080

tcagtcgcag gcggttcagg tatcgctgag gcgtcagtc cgtttgctgc ttaagctgcc
1140

gatgtagcgt acgcagtga agagaaaatt gatccgccac ggcattccaa ttcacctcat
1200

cggcaaaatg gtcctccagc caggccagaa gcaagttgag acgtgatgcg ctgttttcca
1260

ggtttctcctg caaactgctt ttacgcagca agagcagtaa ttgcataaac aagatctcgc
1320

gactggcggc cgagggtaaa tcattttccc ctctctgctg ttccatctgt gcaaccagct
1380

gtcgcacctg ctgcaatacg ctgtgggttaa cgcgccagtg agacggatac tgcccatcca
1440

gctcttggtg cagcaactga ttcagcccgg cgagaaaactg aaatcgatcc ggcgagcgat
1500

acagcacatt ggtagacac agattatcgg tatgttcata cagatgccga tcatgatcgc
1560

gtacgaaaca gaccgtgcca ccggtgatgg tatagggctg cccattaaac acatgaatac
1620

ccgtgccatg ttcgacaatc acaatttcat gaaaatcatg atgatgttca ggaaaatccg
1680

cctgcgggag ccgggggttct atcgccacgg acgcgttacc agacggaaaa aaatccacac
1740

tatgtaatac ggtcatactg gcctcctgat gtcgtcaaca cggcgaaata gtaatcacga
1800

ggtcagggtc ttaccttaaa ttttcgacgg aaaaccacgt aaaaaacgtc gatttttcaa
1860

gatacagcgt gaattttcag gaaatgcggt gagcatcaca tcaccacaat tcagcaaatt
1920

gtgaacatca tcacgttcat ctttccttgg ttgccaatgg cccattttct tgtcagtaac
1980

gagaaggctg cgaatccagg cgcttttttag actgggtcgta atgaaattca ggaggaattc
2040

catatggcgg ccgcactcga gcaccaccac caccaccact gatgaagacg gccgcctagg
2100

ggtaccgagc tcggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg ctgtttttggc
2160

ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag aacgcagaag cggctctgata
2220

aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtgggtccac ctgaccccat gccgaactca
2280

gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggggtctc cccatgcgag agtagggaac
2340

tgccaggcat caaataaaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gttttatctg
2400

ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt
2460

tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgccg ccataaactg ccaggcatca
2520

aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa ctcttttgtt
2580

tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag actaggcttc cgcgccctca
2640

tccgaaaggg cgtattcata tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa
2700

taccgcatca ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggctggttcgg
2760

ctgcggcgag cggatatcagc tactcaaag gcggtataac ggttatccac agaatacagg
2820

gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag
2880

gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga
2940

cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct
3000

ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc
3060

tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg
3120

gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc
3180

tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca
3240

ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag
3300

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct
3360

ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc
3420

accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga
3480

tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca
3540

cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat
3600

taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttag
3660

aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tatcaggatt atcaatacca
3720

tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca gttccatagg
3780

atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt
3840

aattttccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa
3900

tccggtgaga atggcaaaaag tttatgcatt tctttccaga cttgttcaac aggccagcca
3960

ttacgctcgt catcaaaatc actcgcatca accaaaccgt tattcattcg tgattgcgcc
4020

tgagcgagac gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat taaaacagg aatcgaatgc
4080

aaccggcgca ggaacactgc cagcgcatca acaatatttt cacctgaatc aggatattct
4140

tctaatacct ggaatgctgt tttcccgagg atcgcagtggt tgagtaacca tgcacatca
4200

ggagtacgga taaaatgctt gatggtcgga agaggcataa attccgtcag ccagtttagt
4260

ctgaccatct catctgtaac atcattggca acgctacctt tgccatgttt cagaaacaac
4320

tctggcgcat cgggcttccc atacaatcga tagattgtcg cacctgattg cccgacatta
4380

tcgcgagccc atttataccc atataaatca gcatccatgt tggaatttaa tcgcggccta
4440

gagcaagacg tttcccggtg aatatggctc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc
4500

atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa
4560

caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt
4620

attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tct
4673

<210> 2

<211> 767

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đột biến dịch khung

<400> 2

```

gttggcccccg ctccacgcca gtagcgactc gtcccagtcg tcgctattga tattgaccag      60
ttgcgtgggtc gtggcggttg tatattccca gttcatcttg ccggtcaggc gataactgaa      120
gtaatccggc atcagcagag cgtgagcaat gtgtggaata agttcagggt gttgctccgt      180
cagcgcacgc aactgataaa gcgtattgaa gggcagaaac tggatgccgc tacgttgata      240
aatatcgcgt ttgccgagtt gttgttgtgc ctgcgccatt aggccattgg tgcggctatc      300
gcgataagca acgggcaggc ccacacgctg accctgttgg tcgagcagca caaagtccac      360
gccccaggta tcaatcccaa tgctatcgcg atacgaatcc ctctctcgca caccttgttt      420
aatccaaggc gaatggcact ttccaggcta tccacatccc aggtgacata gccgttctga      480
ctatgcagcc cattgttaaa acgatggatt tcgcgacgcg tcaggctgcg gcattcacgc      540
tcgtaacgcg ccagcatcac gcgccactg gatgcgccga gatcgacggc gacacaattg      600
cgaaagggtca taatgtgatc ctgctgaatt tcattacgac cagtctaaaa agcgccgtgaa      660
ttcgcgacct tctcgttact gacaggaaaa tgggccattg gcaaccaggg aaagatgaac      720
gtgatgatgt tcacaatttg ctgaattgtg gtgatgtgat gctcacc      767

```

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ Ranibizumab

<400> 3

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35          40          45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85          90          95

```

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

<210> 4
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng Ranibizumab

```

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
      20      25      30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
      50      55      60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
      100      105      110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
      115      120      125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
      130      135      140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      145      150      155      160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      165      170      175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      180      185      190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
      195      200      205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

```

210
Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
225 230

220

<210> 5
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Ranibizumab

<400> 5
gatattcagc tgaccagag cccgagcagc ctgagcgcaa gcgttggtga tcgtgttacc 60
attacctgta gcgcaagcca ggatattagc aattatctga attggtatca gcagaaaccg 120
ggtaaagcac cgaaagtgc gatctatctt accagcagcc tgcatagcgg tgttccgagc 180
cgttttagcg gtagcggtag tggcaccgat tttaccctga ccattagcag cctgcagccg 240
gaagattttg caacctatta ttgtcagcag tatagcaccg ttccgtggac ctttggtcag 300
ggcaccaaag ttgaaattaa acgtaccgtt gcagcaccga gcgtttttat ctttccgcct 360
agtgatgaac agctgaaaag cggcaccgca agcgttggtt gtctgctgaa taacttttat 420
ccgcgtgaag caaaagttca gtggaaagtt gataatgcac tgcagagcgg taatagccaa 480
gaaagcgtta ccgaacagga tagcaaagat agcacctata gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaaag cagattatga aaaacacaaa gtgtatgcct gcgaagttac ccatcagggt 600
ctgagcagtc cggttaccaa aagttttaat cgtggtgaat gctaa 645

<210> 6
<211> 696
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Ranibizumab

<400> 6
gaagttcagc tgggtgaaag cgggtggtgt ctggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60
agctgtgcag caagcgggtta tgattttacc cattatggta tgaattgggt tcgtcaggca 120
ccgggtaaag gtctggaatg ggttggttgg attaatacct ataccggtga accgacctat 180
gcagcagatt ttaaactgcg ttttaccttt agcctggata ccagcaaaag caccgcatat 240

ctgcagatga atagcctgcg tgcagaggat accgcagtgt attattgtgc aaaatatccg 300
tattattacg gcaccagcca ttggtatttc gatgtttggg gtcagggcac cctgggttacc 360
gttagcagcg caagcaccaa aggtccgagc gtttttccgc tggcaccgag cagcaaaagt 420
accagcgggtg gcaccgcagc actgggttgt ctgggttaaag attattttcc ggaaccgggtt 480
accgtgagct ggaatagcgg tgcactgacc agcgggtgttc atacctttcc ggcagttctg 540
cagagcagcg gtctgtatag cctgagcagc gttgtttaccg ttccgagcag cagcctgggc 600
acccagacct atattttgtaa tgttaatcat aaaccgagca ataccaaagt ggataaaaaa 660
gtggaaccga aaagctgcga taaaacccat ctgtaa 696

<210> 7
<211> 66
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu PelB - ADN

<400> 7
atgaaatatac tgctgccgac cgcagcagcg ggtctgctgc tgctggcagc acagcctgca 60
atggca 66

<210> 8
<211> 119
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự khởi đầu rhaBAD

<400> 8
caccacaatt cagcaaattg tgaacatcat cacgttcatac tttccctggg tgccaatggc 60
ccattttctt gtcagtaacg agaaggtcgc gaatccaggc gctttttaga ctggtcgta 119

<210> 9
<211> 936
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaR

<400> 9

atggctttct gcaataacgc gaatcttctc aacgtatttg tacgccatat tgcgaataat	60
caacttcggt ctctggccga ggtagccacg gtggcgcatc agttaaaact tctcaaagat	120
gatttttttg ccagcgacca gcaggcagtc gctgtggctg accgttatcc gcaagatgtc	180
tttgctgaac atacacatga tttttgtgag ctggtgattg tctggcgcg taatggcctg	240
catgtactca acgatcgccc ttatcgcatc acccgtggcg atctctttta cattcatgct	300
gatgataaac actcctacgc ttccgttaac gatctggttt tgcagaatat tattttattgc	360
ccggagcgtc tgaagctgaa tcttgactgg cagggggcga ttccgggatt taacgccagc	420
gcagggcaac cacactggcg cttaggtagc atggggatgg cgcaggcgcg gcaggttatt	480
ggtcagcttg agcatgaaag tagtcagcat gtgccgtttg ctaacgaaat ggctgagttg	540
ctgttcgggc agttggtgat gttgctgaat cgccatcggt acaccagtga ttcgttgccg	600
ccaacatcca gcgaaacgtt gctggataag ctgattaccc ggctggcggc tagcctgaaa	660
agtccctttg cgctggataa attttgtgat gaggcacgtg gcagtgagcg cgttttgcgt	720
cagcaatttc gccagcagac tggaatgacc atcaatcaat atctgcgaca ggtcagagtg	780
tgtcatgcgc aatatcttct ccagcatagc cgctgttaa tcagtgatat ttcgaccgaa	840
tgtggctttg aagatagtaa ctatttttcg gtggtgttta cccgggaaac cgggatgacg	900
cccagccagt ggcgtcatct caattcgag aaagat	936

<210> 10

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> RhaR kéo dài

<400> 10

agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttatag	36
---	----

<210> 11

<211> 837

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Yếu tố hoạt hóa phiên mã RhaS

<400> 11

atgaccgtat tacatagtgt ggattttttt ccgtctggta acgcgtccgt ggcatagaa	60
ccccggctcc cgcaggcgga ttttcctgaa catcatcatg attttcatga aattgtgatt	120
gtcgaacatg gcacgggtat tcatgtgttt aatgggcagc cctataccat caccggtggc	180
acggtctgtt tcgtacgca tcatgatcgg catctgtatg aacataccga taatctgtgt	240
ctgaccaatg tgctgtatcg ctgccggat cgatttcagt ttctcgccgg gctgaatcag	300
ttgctgccac aagagctgga tgggcagtat ccgtctcact ggcgcgtaa ccacagcgta	360
ttgcagcagg tgcgacagct ggttgcacag atggaacagc aggaagggga aatgattta	420
ccctcgaccg ccagtcgca gatcttgttt atgcaattac tgctcttgct gcgtaaaagc	480
agtttgcagg agaacctgga aaacagcgca tcacgtctca acttgcttct ggctggctg	540
gaggaccatt ttgccgatga ggtgaattgg gatgccgtgg cgcatcaatt ttctctttca	600
ctgcgtacgc tacatcggca gcttaagcag caaacgggac tgacgcctca gcgatacctg	660
aaccgcctgc gactgatgaa agcccgacat ctgctacgcc acagcgaggc cagcgttact	720
gacatcgctt atcgctgtgg attcagcgac agtaaccact tttcgacgct ttttcgccga	780
gagtttaact ggtcaccgcg tgatattcgc cagggacggg atggctttct gcaataa	837

<210> 12

<211> 816

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> KanR

<400> 12

atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc tctaggccgc gattaaattc caacatggat	60
gctgatttat atgggtataa atgggctcgc gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc	120
tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc	180
gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct	240
cttccgacca tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg	300

atccccggga aaacagcatt ccaggtatta gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt 360
gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg ttgcattcga ttcctgtttg taattgtcct 420
tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgct caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg 480
gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa 540
gaaatgcata aacttttgcc attctcaccg gattcagtcg tcaatcatgg tgattttctca 600
cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc 660
ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct 720
ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa tatggtattg ataatcctga tatgaataaa 780
ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt ttctaa 816

<210> 13
<211> 105
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự khởi đầu AmpR

<400> 13
cgcggaaccc ctatgtgtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 60
caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagt 105

<210> 14
<211> 87
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Yếu tố kết thúc rrnB T1

<400> 14
caaataaaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg 60
gtgaacgctc tcctgagtag gacaaat 87

<210> 15
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Yếu tố kết thúc rrnB T2

<400> 15

agaaggccat cctgacggat ggcctttt

28

<210> 16

<211> 589

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Điểm khởi đầu sao chép pMB1

<400> 16

tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg	60
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg	120
ctctcctggt cgcaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag	180
cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc	240
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa	300
ctatcgtctt gagtccaacc cggttaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg	360
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc	420
taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac	480
cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcggtgg	540
tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaa	589

<210> 17

<211> 6088

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> KTXHIS-pelbLC-pelbHC

<400> 17

atctttctgc gaattgagat gacgccactg gctgggcgtc atcccggttt cccgggtaaa
60

caccaccgaa aaatagttac tatcttcaaa gccacattcg gtcgaaatat cactgattaa
120

caggcggcta tgctggagaa gatattgcgc atgacacact ctgacctgtc gcagatattg
180

attgatggtc attccagtct gctggcgaaa ttgctgacgc aaaacgcgct cactgcacga
240

tgccatcatca caaaatttat ccagcgcaaa gggacttttc aggctagccg ccagccgggt
300

aatcagctta tccagcaacg tttcgctgga tgttggcggc aacgaatcac tgggtgaacg
360

atggcgattc agcaacatca ccaactgcc gaacagcaac tcagccattt cgttagcaaa
420

cggcacatgc tgactacttt catgctcaag ctgaccaata acctgccgcg cctgcgccat
480

ccccatgcta cctaagcgcc agtgtggttg ccctgcgctg gcgttaaata ccggaatcgc
540

cccctgccag tcaagattca gcttcagacg ctccgggcaa taaataatat tctgcaaaac
600

cagatcgтта acggaagcgt aggagtgttt atcatcagca tgaatgtaaa agagatcgcc
660

acgggtaatg cgataagggc gatcgttgag tacatgcagg ccattaccgc gccagacaat
720

caccagctca caaaaatcat gtgtatgttc agcaaagaca tcttgcggat aacggtcagc
780

cacagcgact gcttgctggт cgctggcaaa aaaatcatct ttgagaagtt ttaactgatg
840

cgccaccgtg gctacctcgг ccagagaacg aagttgatta ttcgcaatat ggcgtacaaa
900

tacgttgaga agattcgгgt tattgcagaa agccatcccг tccctggcga atatcacgг
960

gtgaccagtt aaactctcgг cgaaaaagcg tcgaaaagtg gttactgtcg ctgaatccac
1020

agcgataggc gatgtcagta acgctggcct cgctgtggгг tagcagatgt cgggctttca
1080

tcagtcgcag gcggttcagg tatcgctgag gcgtcagtcс cgtttgctgc ttaagctgcc
1140

gatgtagcgt acgcagtgaa agagaaaatt gatccgccac ggcattccaa ttcacctcat
1200

cggcaaaatg gtctccagc caggccagaa gcaagttgag acgtgatgcg ctgttttcca
1260

ggttctcctg caaactgctt ttacgcagca agagcagtaa ttgcataaac aagatctcgc
1320

gactggcggg cgaggggtaaa tcattttccc cttcctgctg ttccatctgt gcaaccagct
1380

gtcgcacctg ctgcaatacg ctgtggttaa cgcgccagtg agacggatac tgcccatcca
1440

gctcttgtag cagcaactga ttcagcccgg cgagaaactg aaatcgatcc ggcgagcgat
1500

acagcacatt ggtcagacac agattatcgg tatgttcata cagatgccga tcatgatcgc
1560

gtacgaaaca gaccgtgcc cgggtgatgg tatagggctg cccattaaac acatgaatac
1620

ccgtgccatg ttcgacaatc acaatttcac gaaaatcatg atgatgttca ggaaaatccg
1680

cctgcgggag ccgggggttct atcgccacgg acgcgttacc agacggaaaa aaatccacac
1740

tatgtaatac ggtcatactg gcctcctgat gtctgcaaca cggcgaaata gtaatcacga
1800

ggtcaggttc ttaccttaaa ttttcgacgg aaaaccacgt aaaaaacgtc gatttttcaa
1860

gatacagcgt gaattttcag gaaatgcggg gagcatcaca tcaccacaat tcagcaaatt
1920

gtgaacatca tcacgttcat ctttccctgg ttgccaatgg cccattttct tgtcagtaac
1980

gagaaggtag cgaatccagg cgcttttttag actggtagta atgaaattca ggaggaattc
2040

ctaatgaaat atctgctgcc gaccgcagca gcgggtctgc tgctgctggc agcacagcct
2100

gcaatggcag atattcagct gaccagagc ccgagcagcc tgagcgcaag cgttggtgat
2160

cgtgttacca ttacctgtag cgcaagccag gatattagca attatctgaa ttggtatcag
2220

cagaaaccgg gtaaagcacc gaaagtgtg atctatttta ccagcagcct gcatagcgg
2280

gttccgagcc gtttttagcg tagcggtagt ggcaccgatt ttaccctgac cattagcagc
2340

ctgcagccgg aagattttgc aacctattat tgtcagcagt atagcacctg tccgtggacc
2400

tttggtcagg gcaccaaagt tgaaattaaa cgtaccgttg cagcacccag cgtttttattc
2460

tttccgccta gtgatgaaca gctgaaaagc ggcaccgcaa gcgttggttg tctgctgaat
2520

aactttttatc cgcgtgaagc aaaagttcag tggaaagttg ataatgcact gcagagcgg
2580

aatagccaag aaagcgttac cgaacaggat agcaaagata gcacctatag cctgagcagc
2640

acctgaccc tgagcaaagc agattatgaa aaacacaaag tgtatgcctg cgaagttacc
2700

catcagggtc tgagcagtc ggttaccaa agttttaatc gtggtgaatg ctaataatct
2760

agaactgtta tcgatatcag gaggattagc atatgaaata tctgctgccg accgcagcag
2820

cgggtctgct gctgctggca gcacagcctg caatggcaga agttcagctg gttgaaagcg
2880

gtggtggtct ggttcagcct ggtggtagcc tgcgtctgag ctgtgcagca agcggttatg
2940

attttaccca ttatggtatg aattgggttc gtcaggcacc gggtaaaggc ctggaatggg
3000

ttggttggtat taataacctat accggtgaac cgacctatgc agcagatttt aaacgtcgtt
3060

ttaccttttag cctggatacc agcaaaagca ccgcataatct gcagatgaat agcctgcgtg
3120

cagaggatac cgcagtgtat tattgtgcaa aatatccgta ttattacggc accagccatt
3180

ggtattttcga tgtttggggc cagggcaccc tggttaccgt tagcagcgca agcaccaaag
3240

gtccgagcgt ttttccgctg gcaccgagca gcaaaagtac cagcgggtggc accgcagcac
3300

tgggttggtct ggttaaagat tattttccgg aaccggttac cgtgagctgg aatagcgggtg
3360

cactgaccag cgggtgttcat acctttccgg cagttctgca gagcagcgggt ctgtatagcc
3420

tgagcagcgt tgttaccgtt ccgagcagca gcctgggcac ccagacctat atttgtaatg
3480

ttaatcataa accgagcaat accaaagtgg ataaaaaagt ggaaccgaaa agctgcgata
3540

aaacccatct gtaataaaag cttggctggt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga
3600

tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct ggcggcagta
3660

gcgcgggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgcggatg
3720

gtagtggtggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgccca ggcatcaaataaaaacgaaaag
3780

gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt tgcgggtgaa cgctctcctg
3840

agtaggacaa atccgccggg agcggatttg aacgttgcca agcaacggcc cggagggtgg
3900

cgggcaggac gcccgccata aactgccagg catcaaatta agcagaaggc catcctgacg
3960

gatggccttt ttgcgtttct acaaactctt ttgtttatct ttctaaatac attcaaatat
4020

gtatccgctc atgagactag gcttccgcgc cctcatccga aagggcgtat tcatatatgc
4080

ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataaccg catcaggcgc tcttccgctt
4140

cctcgtcac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact
4200

caaaggcggg aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag
4260

caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata
4320

ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc
4380

cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg
4440

ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc
4500

tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg
4560

gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc
4620

ttgagtccaa cccggttaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga
4680

ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg
4740

gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa
4800

aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg
4860

tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt
4920

ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat
4980

tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct
5040

aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa
5100

actgcaattht attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgttttctgta
5160

atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tatcgggtctg
5220

cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcgtca aaaataaggt
5280

tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat
5340

gcattttcttt ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctcgatcatca aaatcactcg
5400

catcaaccaa accgttattc attcgtgatt gcgcctgagc gagacgaaat acgcgatcgc
5460

tggttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg
5520

catcaacaat attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttcc
5580

cggggatcgc agtgggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg
5640

tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat
5700

tggcaacgct acctttgcc a tgtttcagaa acaactctgg cgcacggggc ttcccatata
5760

atcgatagat tgtcgcacct gattgcccga cattatcgcg agcccattta tacccatata
5820

aatcagcatc catgttgga tttaatcgcg gcctagagca agacgtttcc cgttgaatat
5880

ggctcact ctctctttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga
5940

gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc
6000

cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa
6060

ataggcgtat cagcaggccc tttcgtct
6088

<210> 18
<211> 22
<212> PRT
<213> Erwinia

<220>
<223> Peptit tín hiệu PelB - peptit

<400> 18
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala
 20

<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> SBamHI1680

<400> 19

gtacgctagg atcctgtggc agcaactgat tc

32

<210> 20

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> BSalI1681

<400> 20

gtagataggt cgacagcgat cgtcattggg at

32

<210> 21

<211> 180

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Fig. 2 - Vị trí đa dòng

<400> 21

gagaaggtcg cgaatccagg cgcttttttag actggtcgta atgaaattca ggaggaattc

60

catatggcgg ccgcactcga gcaccaccac caccaccact gatgaagacg gccgcctagg

120

ggtaccgagc tcggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg ctgttttggc

180

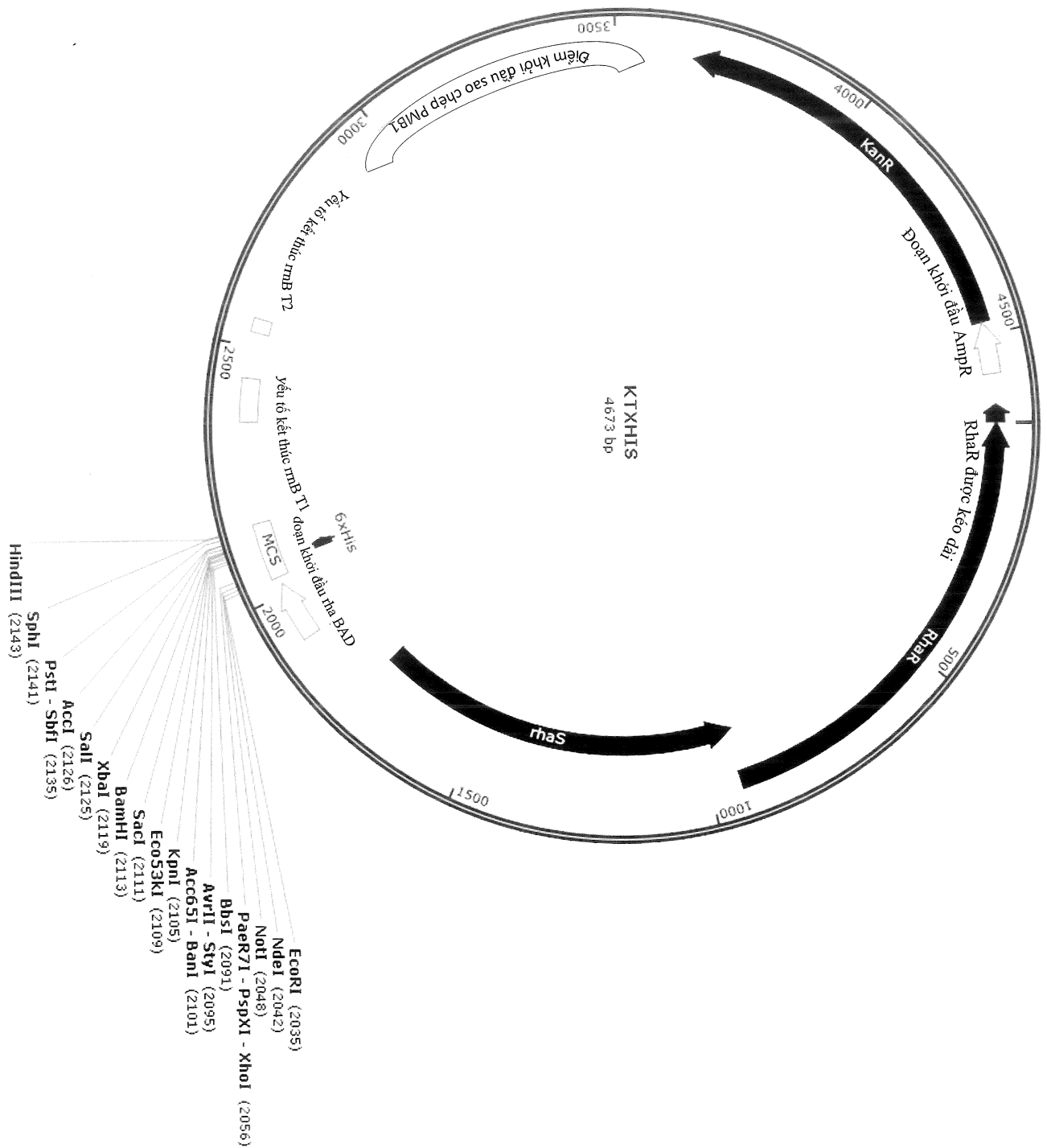


Fig.1

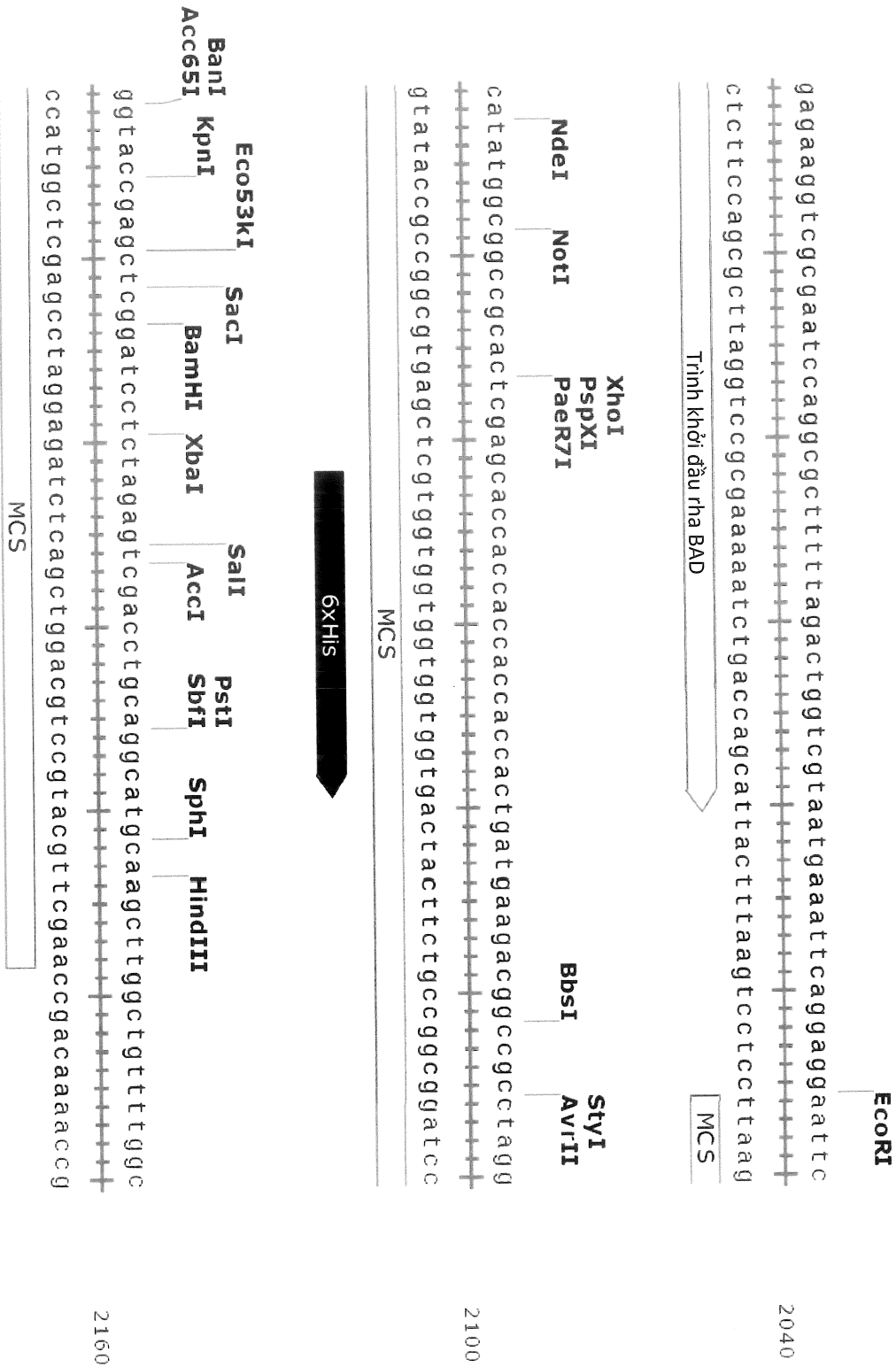


Fig.2

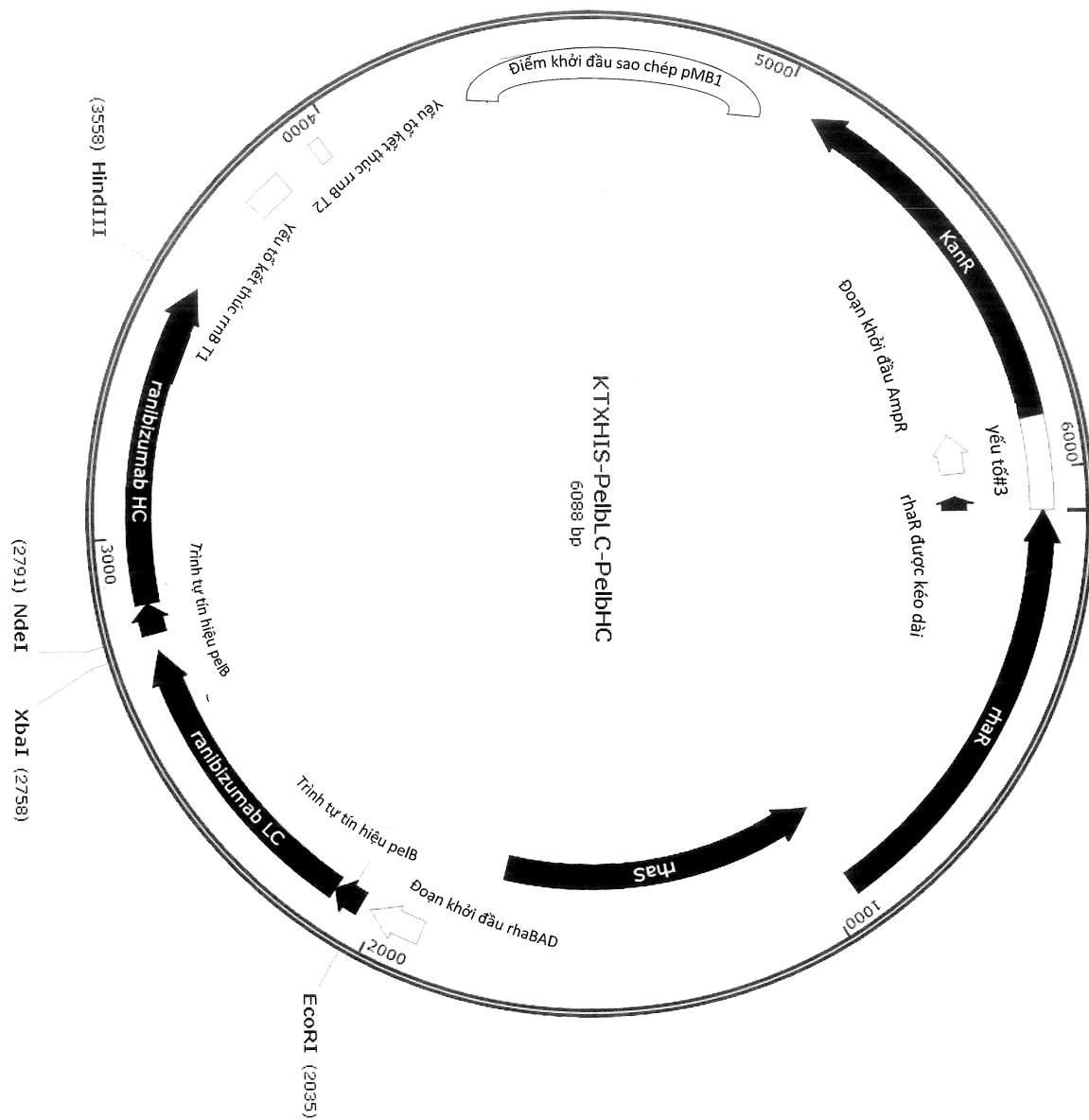


Fig.3

4/9

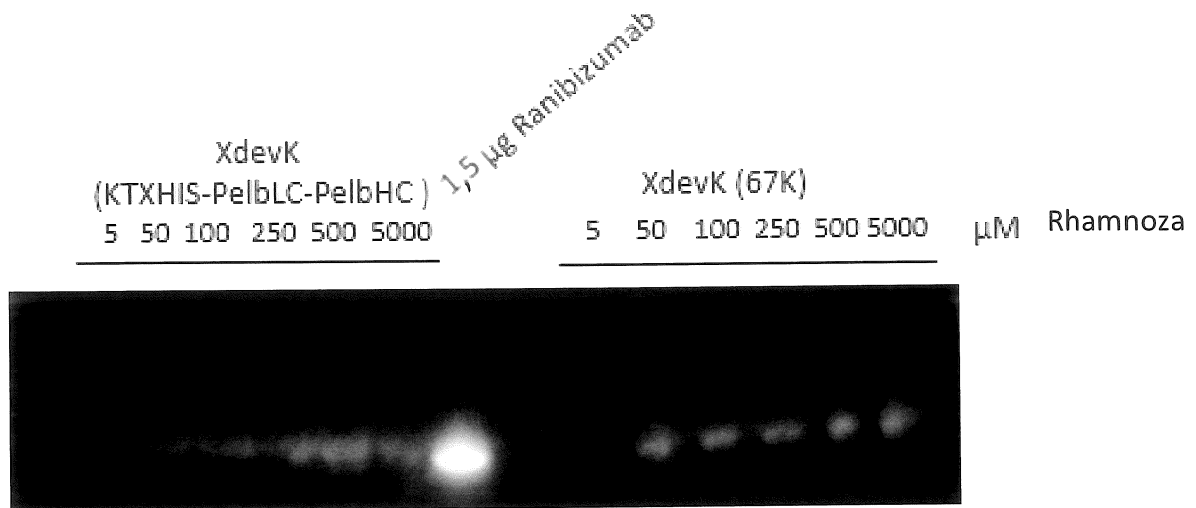


Fig.4a

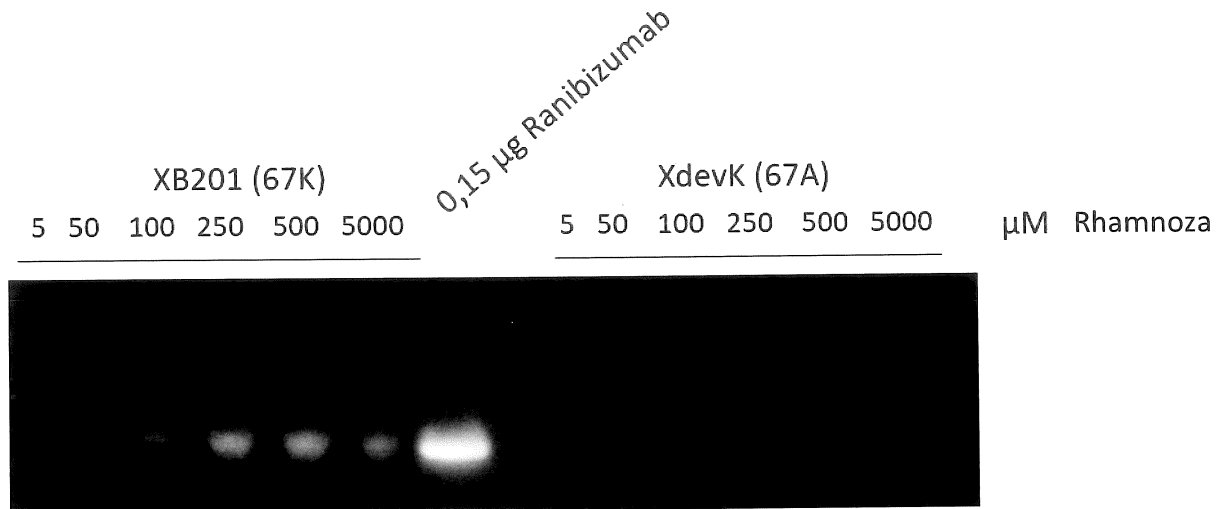


Fig.4b

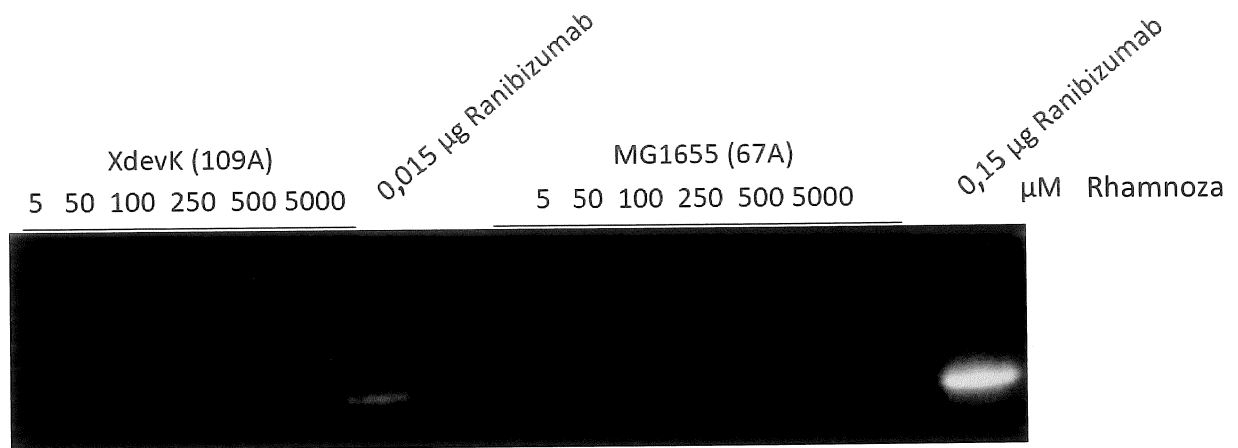


Fig.4c

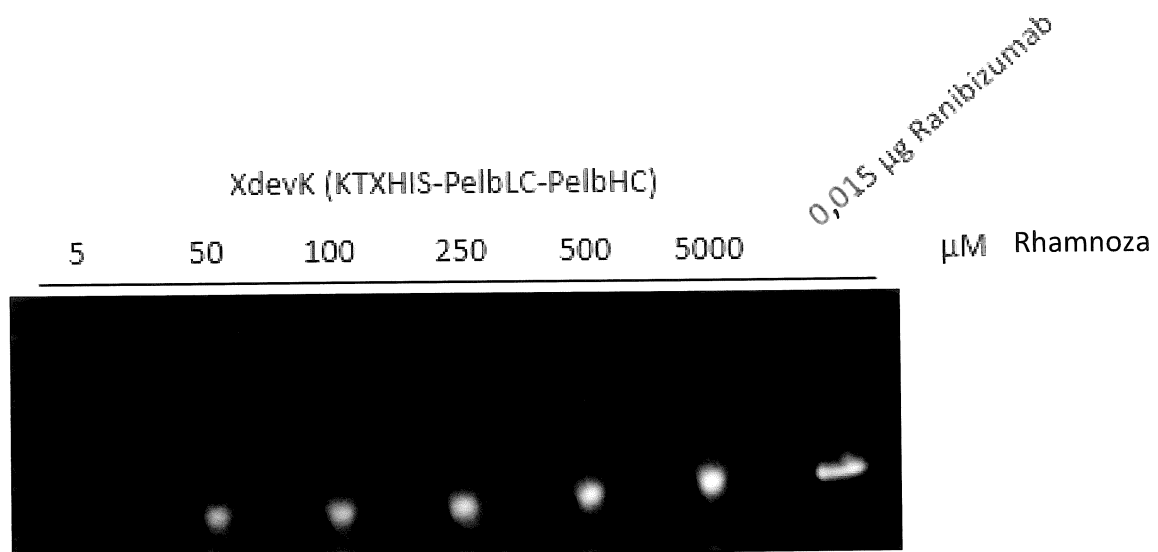


Fig.4d

Fig.4c

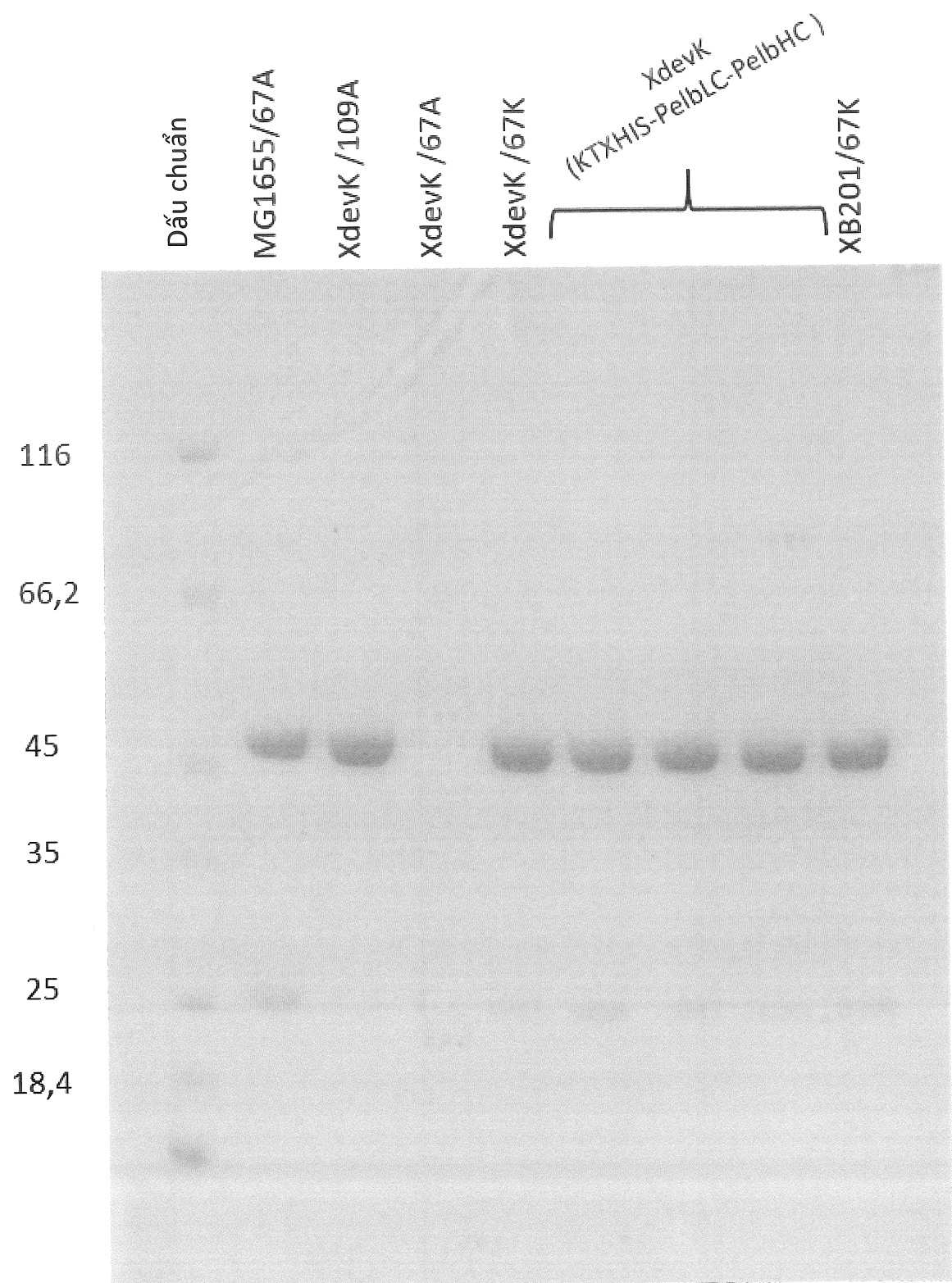


Fig.5

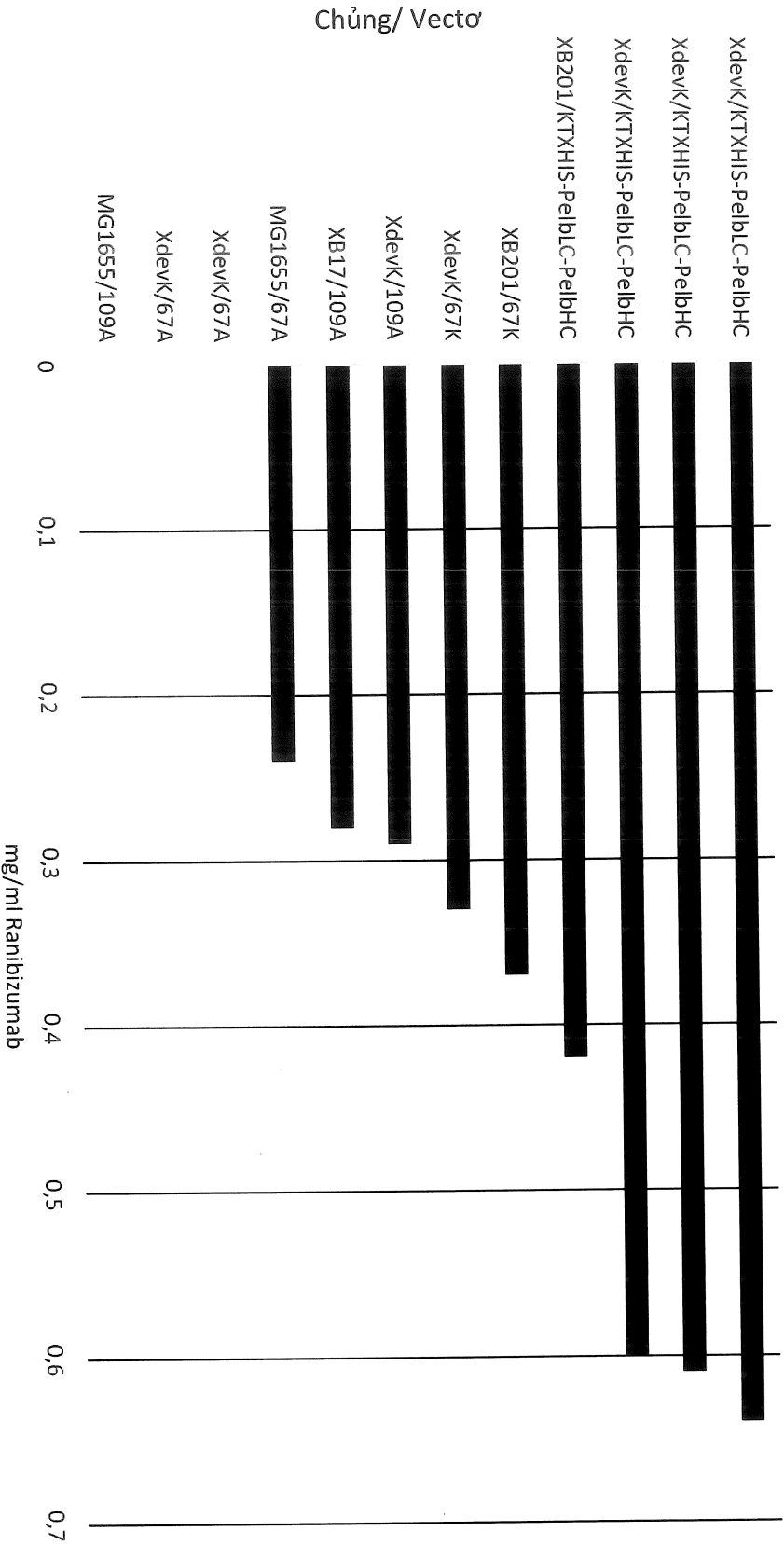


Fig.6

8/9

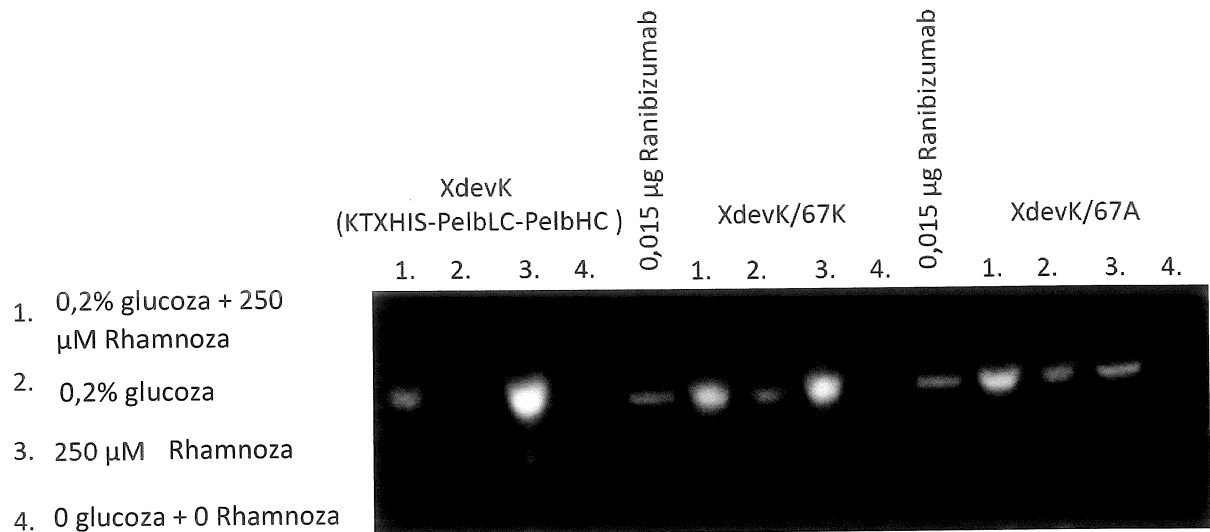


Fig.7a

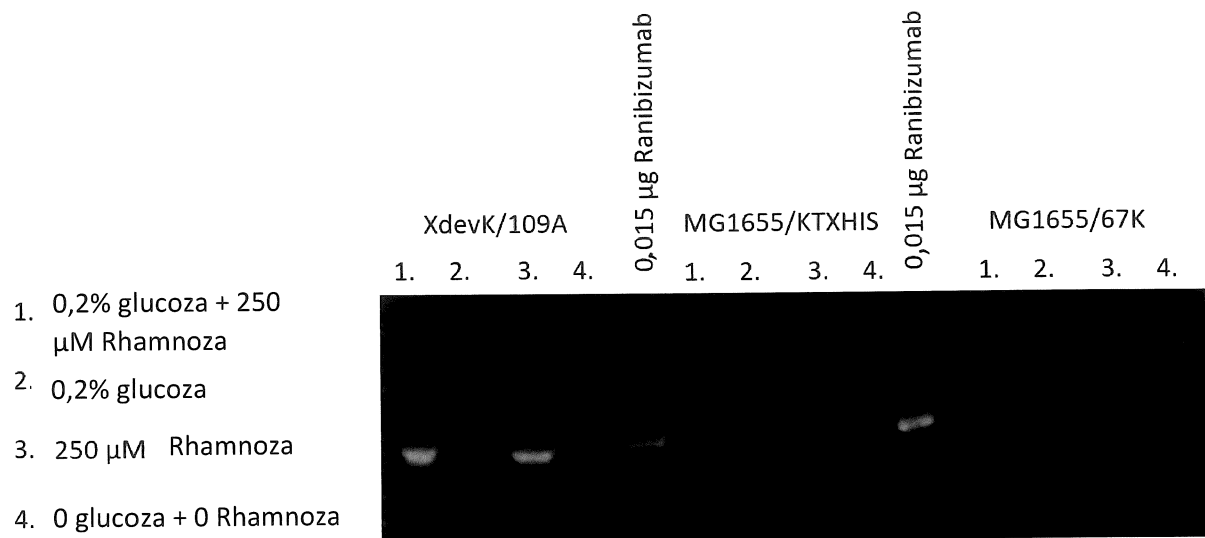


Fig.7b

9/9

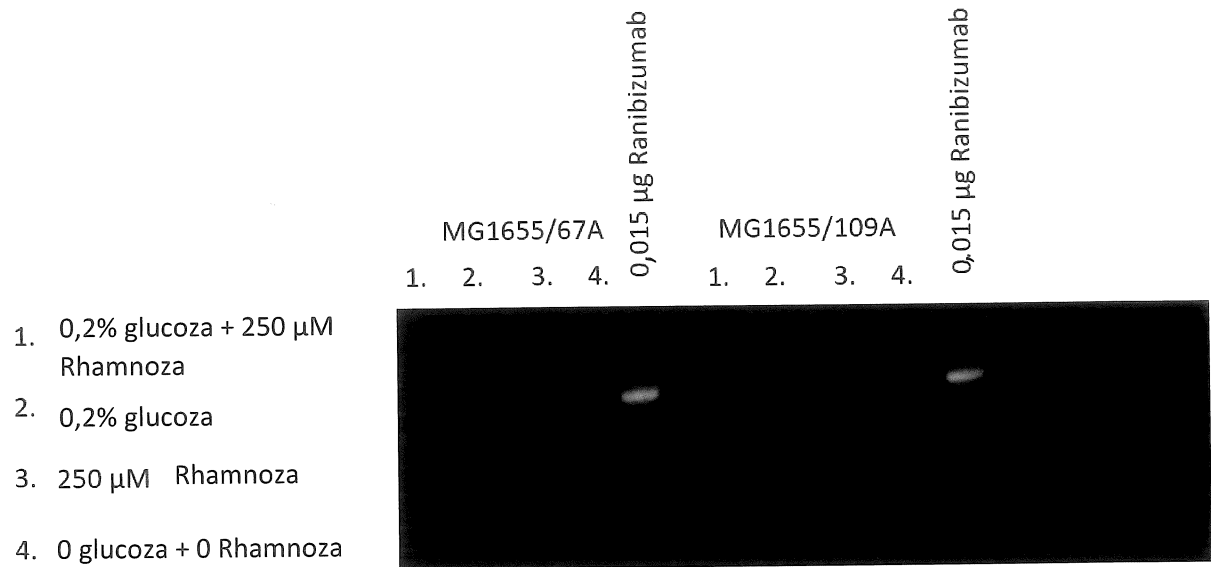


Fig.7c